

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



**Interakce postranních řetězců hemu s apoproteinem: srovnání
cytochromů P450 a NO-synthas**

**Interaction of apoprotein with heme side chains: A comparison of
cytochromes P450 and NO-synthases**

Diplomová práce

Dagmar Fastová

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Prof. RNDr. Jiřího Hudečka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum:

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli, Prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc., za vedení práce, pomoc při jejím vypracování, ochotu a za to, že mi vždy vyšel vstříc. Velký dík patří také mé rodině a blízkým, za podporu nejen při psaní této práce, ale i během celého studia.

Abstrakt

Cytochromy P450 a NO-synthasy jsou hem-thiolátové proteiny podílející se na katalýze významných biochemických reakcí. V této práci byla provedena srovnávací analýza obou těchto skupin enzymů z hlediska hodnoty torzních úhlů pro vinylové postranní řetězce hemu v pozicích 2 a 4 na základě dostupných krystalografických dat pomocí programu Yasara. Zatímco hodnoty torzních úhlů obou vinylů u NO-synthas ukazují na velmi "konzervativní" konformace obou vinylů (v rozmezí od -30° do 90° pro pozici 2, resp. od -150° do 120° pro pozici 4) a na prakticky zanedbatelné rozdíly mezi jednotlivými formami těchto enzymů, pro savčí cytochromy P450 se ukázalo, že mezi jednotlivými rodinami jsou dosti výrazné rozdíly. V souladu s výsledky dřívějších analýz je rozmezí hodnot torzních úhlů pro vinyly v pozici 2 obvykle užší (od -120° do 150°) než pro vinyly v pozici 4, které jsou výrazně konformačně flexibilnější (hodnoty torzních úhlů se pohybovaly v rozmezí od -30° do 180°). V druhé části práce byla zkoumána interakce cytochromu P450 a jeho reakčního partnera, cytochrom P450 reduktasy. Analýzou krystalografických dat bylo ověřeno, nakolik jsou prostorové pozice bazických aminokyselinových zbytků, odpovídající v primární struktuře různých savčích forem těm zbytkům v isoformě 2B4, o nichž se předpokládá, že odpovídají specificky za interakci s reduktasou (Arg-422, Lys-433, Arg-434), kompatibilní s jejich účastí v této interakci. Výsledky se výrazně lišily pro jednotlivé isoformy cytochromu P450. Nejméně jasná byla situace u cytochromu P450 3A4, kde se nevyskytuje v primární struktuře odpovídající triáda bazických zbytků. Na základě vzdálenosti od Arg-440, který odpovídá Arg-434 ve formě 2B4, byla vytipována další možná interakční místa.

Klíčová slova

Cytochromy P450, NO-synthasy, hem-thiolátové proteiny, hemové enzymy, analýza prostorových struktur, torzní úhly vinylových postranních řetězců hemu, mikrosomální monooxygenasy, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa, přenos elektronu.

Abstract

Cytochromes P450 and NO-synthases are two classes of heme-thiolate proteins, participating in catalysis of important biochemical reactions. In this work we analysed and compared both enzyme groups from the viewpoint of torsional angles of vinyl side chains of heme in positions 2 and 4. We used the Yasara programme to analyse the available crystallographic data. Whereas the torsional angle distributions for both vinyl groups in NO-synthases are pointing to a rather "conservative" conformations of both vinyls (between -30° and 90° for position 2, -150° to 120° for position 4, resp.) with little differences for individual forms of these enzymes, the mammalian cytochromes P450 display considerable differences between different families. In accordance with previous analyses is the distribution of torsional angles of 2-vinyls in most cases narrower (-120° to 150°) compared to 4-vinyls, which display more conformational flexibility (with torsional angles between -30° and 180°). In the second part of the Thesis we analysed the interaction of cytochrome P450 with its reaction partner, cytochrome P450 reductase. On the basis of crystallographic data we tried to prove, if the spatial positions of basic aminoacids, corresponding in the primary structure of various mammalian forms the those in the isoform 2B4 supposed to interact specifically with the reductase (Arg-422, Lys-433, Arg-434), are compatible with this interaction. Results are quite different for different cytochrome P450 isoforms. Most complicated situation was found for the isoform 3A4, which does not have the corresponding triad of basic aminoacids in its primary structure. On the basis of their distance from Arg-440 (homologue of Arg-434 in 2B4), we attempted to predict the possible interaction sites. (In Czech)

Keywords

Cytochromes P450, NO-synthases, heme-thiolate proteins, heme enzymes, analysis of spatial structures, heme vinyl chains torsional angles, microsomal monooxygenases, NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase, electron transfer.

Obsah

Seznam zkratek.....	7
1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Xenobiotika	9
2.2. Mikrosomální monooxygenasový systém – MFO	9
2.2.1. Cytochromy P450	11
2.2.1.1. Struktura P450.....	12
2.2.1.2. Mechanismus působení P450	15
2.2.1.3. Výskyt P450	17
2.2.1.4. Dělení cytochromů P450 podle řetězce přenosu elektronů.....	18
2.2.2. Cytochrom P450 reduktasa	19
2.2.3. Interakce mezi cytochromy P450 a cytochrom P450 reduktasou.....	20
2.2.3.1. Interakce P450 2B4 – cytochrom P450 reduktasa	21
2.2.4. Cytochrom b ₅	22
2.3. Další hem-thiolátové proteiny	23
2.3.1. NO-synthasy	24
2.3.2. Srovnání cytochromů P450 a NO-synthas.....	27
2.3.3. Chloridové peroxidasy	28
2.3.4. Interakce hem-protein v hem-thiolátových proteinech.....	28
3. Cíl práce	31
4. Praktická část.....	32
4.1. Metody studia	32
4.1.1. Interakce hem - apoprotein v cytochromech P450 a NO-synthasách.....	32
4.1.2. Interakce cytochrom P450 – cytochrom P450 reduktasa.....	35
4.2. Výsledky.....	36
4.2.1. Interakce hem – apoprotein v cytochromech P450 a NO-synthasách	36
4.2.2. Interakce cytochrom P450 – cytochrom P450 reduktasa.....	41
5. Diskuse.....	48
6. Závěr.....	54
Seznam použité literatury	55
Příloha č.1	61

Seznam zkratek

AMK	aminokyselina(y)
ARR	N-(4-{2-[(3-chlorobenzyl)amino]ethyl}fenyl)thiofen-2-karboximidamid
CPO	chloridové peroxidasy, EC 1.11.1.10., systematický název: chlorid:vodík peroxidové oxidoreduktasy
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa, EC 1.6.2.4., NADPH:hemoprotein oxidoreduktasa
CYP	cytochromy P450, EC 1.14.14.1., systematický název: substrát, redukovaný flavoprotein: kyslík oxidoreduktasa (hydroxylující RH nebo epoxidující)
MFO	mikrosomální monooxygenasový systém
MPW	2-[2-(-methoxypyridin-2-yl)ethyl]-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
NOS	NO-synthasy, EC 1.14.13.39., systematický název: L-arginin, NADPH:kyslík oxidoreduktasy (tvořící NO)
eNOS	endotheliální NO-synthasy
iNOS	inducibilní NO-synthasy
nNOS	neuronální NO-synthasy
P450	cytochromy P450, EC 1.14.14.1., systematický název: substrát, redukovaný flavoprotein:kyslík oxidoreduktasa (hydroxylující RH nebo epoxidující)
pdb	označení krystalografických souborů uložených v Protein data bank
wt	z angl. wild-type - protein bez mutace

1. Úvod

V současné době je organismus vystaven mnoha škodlivým látkám, se kterými se dříve buď neseťkal, anebo se neobjevovaly v takové míře.

V posledních letech se dostává do popředí zájmů otázka, jakým způsobem je organismus schopen poradit si s cizorodými látkami, jako jsou polutanty životního prostředí nebo léčiva.

Jedním z klíčových systémů metabolizující xenobiotika v organismu savců je jaterní mikrosomální monooxygenasový systém. Jedná se o multienzymový komplex, jehož klíčovou složkou je cytochrom P450. Dalším klíčovým enzymem tohoto komplexu je cytochrom P450 reduktasa. Interakce mezi těmito dvěma proteiny hraje zásadní roli při přenosu elektronu z NADPH na hemové železo a dále molekulární kyslík. V této diplomové práci budou pro různé savčí formy cytochromu P450, pro které jsou k dispozici údaje o prostorové struktuře, analyzovány prostorové vztahy mezi trojicí bazických aminokyselin, které podle v literatuře publikované hypotézy hrají rozhodující roli při interakci s reduktasou.

Cytochrom P450 patří do skupiny hem-thiolátových proteinů, pro které je charakteristická koordinační vazba hemového železa na thiolátovou skupinu, vzniklou deprotonací sulfhydrylu z postranního řetězce cysteinu. Dalšími hem-thiolátovými oxygenasami jsou NO-synthasy (které oxidují L-arginin za vzniku oxidu dusnatého, významného vazodilatans). Díky thiolátové ligaci hemu sdílejí cytochromy P450 a NO-synthasy řadu charakteristických spektrálních vlastností.

Tato práce navazuje na analýzy distribuce torzních úhlů vinylových postranních řetězců v hemech různých forem cytochromu P450, provedené v minulosti v laboratoři školitele (při níž byly zjištěny rozdíly ve flexibilitě vinylových řetězců v polohách 2 a 4 hemu). Rozborem krystalografických údajů jsme chtěli zjistit, nakolik je flexibilita vinylových řetězců hemu NO-synthas podobná.

2. Teoretická část

2.1. Xenobiotika

Jako xenobiotika (xenos – cizí) se označují cizorodé látky, které se v organismu normálně nevyskytují. V mikrobiologicky orientovaných publikacích se mnohdy za xenobiotikum považují syntetické sloučeniny, s nimiž se žádný z organismů žijících na Zemi v průběhu evoluce nesetkal. Naopak polutanty jsou látky, které se v přírodě mohou vyskytovat i ve vysokých koncentracích (ropa, těžké kovy), a to obvykle v důsledku lidské činnosti. Primárním zdrojem xenobiotik je téměř vždy chemický průmysl, zatímco jako sekundární zdroj takových látek se označují ty oblasti lidské činnosti, kde jsou produkty chemického průmyslu používány [1].

Jako biotransformaci cizorodých látek označujeme procesy, které mění strukturu cizorodých látek, a při nichž dochází ke snížení toxických účinků (detoxikace), nebo naopak ke zvýšení toxicity či jiných biologických účinků (aktivace) [2]. V dalším textu se budeme zabývat zejména biotransformací hydrofobních organických sloučenin v živočišných organismech, která obvykle probíhá ve dvou hlavních fázích:

I.fáze biotransformace – derivatizační fáze. Dochází při ní většinou ke zvýšení polárnosti příslušných xenobiotik. Cizorodá molekula může být modifikována oxidačními reakcemi (za přítomnosti oxidas se smíšenou funkcí - MFO či peroxidas), redukčními reakcemi (pomocí enzymů jako je např. xanthinoxidasa) anebo reakcemi hydrolytickými (kterých se účastní esterasy nebo amidasy). Výsledkem je modifikace molekuly cizorodé látky tak, aby byla schopna konjugace v další fázi.

II.fáze biotransformace – konjugační fáze. Jak už název napovídá, podstatou druhé fáze biotransformace xenobiotik je konjugace endogenní sloučeniny s cizorodou molekulou, která je dostatečně polární a může tak dojít k vyloučení konjugované molekuly. Většina konjugačních reakcí je katalyzována enzymy ze třídy transferas [1], [3].

2.2. Mikrosomální monooxygenasový systém – MFO

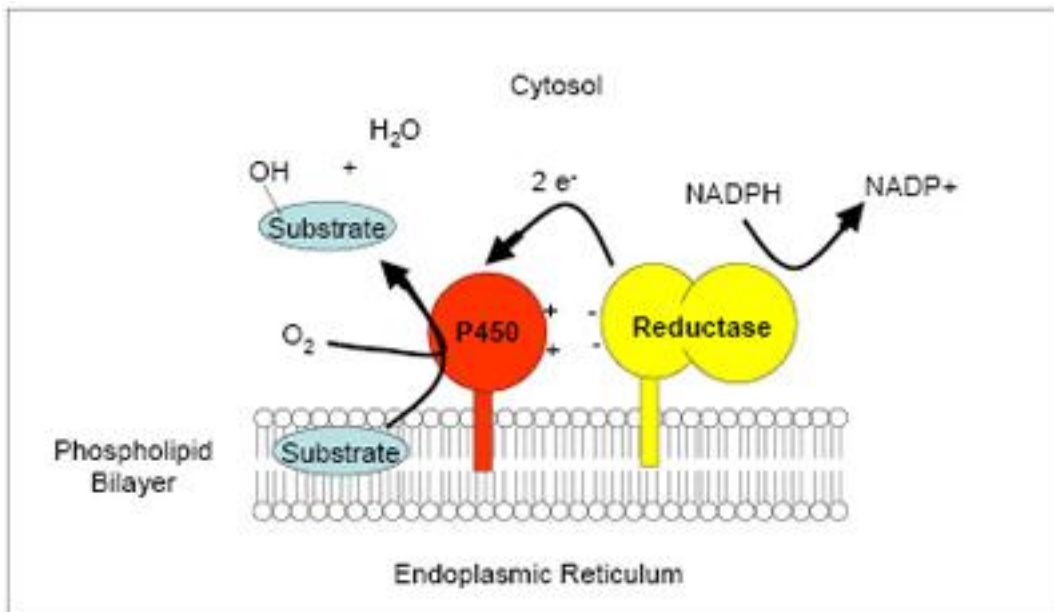
Většina xenobiotik se u savců metabolizuje v játrech. V endoplazmatickém retikulu jaterních buněk jsou přítomny mikrosomální monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí (MFO, z angl. „mixed function oxidases“) [4]. Jako mikrosomální se tyto monooxygenasy

označují proto, že při izolaci se endoplazmatické retikulum rozbíjí a vznikají malé uzavřené „pseudoorganely“, tzv. mikrosomy.

V typických reakcích katalyzovaných MFO je molekula kyslíku redoxně aktivována, jeden atom začleněn do molekuly substrátu (monooxygenasová funkce) a druhý atom přijímá dva ionty vodíku za vzniku molekuly vody (oxidasová funkce) [5].

Mikrosomální monooxygenasový systém je multienzymový komplex, který působí v oxidačně-redukčních reakcích. Jeho klíčovou složkou je cytochrom P450, který zde funguje jako terminální oxidasa a monooxygenasa [4]. Dalšími členy jaterního monooxygenasového systému jsou NADPH:CYP reductasa, která přijímá dva elektrony od NADPH a přenáší je na cytochrom P450. Tato oxidoreduktasa je flavoprotein, na přenosu elektronu se podílejí postupně obě její prostetické skupiny (FMN a FAD). Dále jsou pro funkci enzymového komplexu potřebné NADPH (donor elektronů) a molekulární kyslík. V některých případech se činnosti komplexu účastní také další hemoprotein, cytochrom b_5 , a jeho specifická reductasa (NADH:cytochrom b_5 reductasa). Detaily fungování a struktury tohoto složitého komplexu a význam jeho jednotlivých komponent nejsou dosud přesně poznány [6].

Základní představu o tom, jak je v MFO propojena funkce cytochromu P450 a cytochrom P450 reductasy ilustruje následující schematický obrázek (obr. 1, str. 11):



Obr. 1: Propojení cytochromů P450 a cytochrom P450 reductasy v mikrosomálním monooxygenasovém systému. Převzato z [7]. Pojem „reductase“ označuje cytochrom P450 reductasu, „substrate“ substrát, „endoplasmic reticulum“ označuje endoplazmatické retikulum a „phospholipid bilayer“ pak fosfolipidovou dvojvrstvou.

2.2.1. Cytochromy P450

Cytochromy P450 (někdy označovány jako CYP nebo P450) jsou hemoproteiny obsahující hem typu b. Název získaly díky tomu, že redukovaná forma tvoří s oxidem uhelnatým komplex s absorpčním maximem Soretova pásu při 450 nm, přičemž P značí pigment [9].

Za objevitele cytochromů P450 jsou považováni David Garfinkel a Martin Klingenberg – v roce 1958 objevili nový mikrosomální pigment schopný vázat CO [10], [11]. Roku 1962 dokázali Omura a Sato, že neznámým pigmentem je hemoprotein a nazvali jej cytochrom P450 [12].

Typické reakce katalyzované cytochromy P450 probíhají tak, že CYP inkorporují jeden atom kyslíku z molekuly O_2 do molekuly substrátu, přičemž druhý z atomů kyslíku je redukován na vodu [13]. Bližší princip mechanismu působení většiny savčích cytochromů P450 – viz kap. 2.2.1.2.

Mikrosomální cytochromy P450 se klasifikují s ohledem na typ katalyzované reakce jako EC 1.14.14.1. První číslo označuje skupinu enzymů, což jsou v tomto případě oxidoreduktasy. Druhé číslo značí podtřídu – jedná se o to, která skupina je donorem

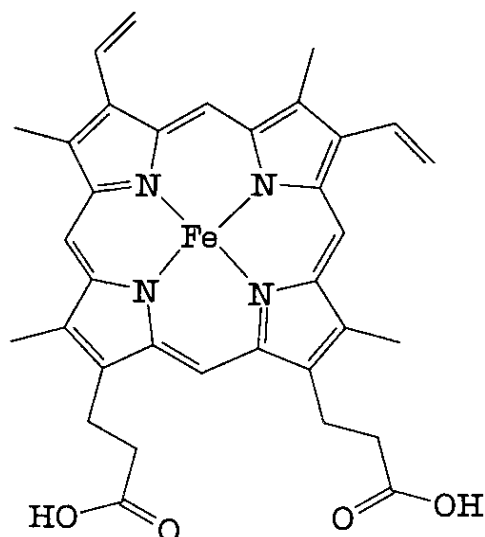
vodíku a podléhá oxidaci. Další číslo je označení pro skupinu enzymů, označuje typ akceptoru, číslo 14 patří oxidoreduktasám pracujícím s redukováným flavinem nebo flavoproteinem jako jedním z donorů a inkorporací jednoho atomu kyslíku. Poslední číslo už je přímo daný enzym ve své skupině, v tomto případě nespecifické monooxygenasy [14].

Z hlediska strukturního patří cytochromy P450 do skupiny hem-thiolátových proteinů, spolu s hemovými chloroperoxidasami (EC 1.11.1.10.) a NO synthasami (EC 1.14.13.39.) [15].

2.2.1.1. Struktura P450

Prvním cytochromem P450, který se podařilo získat v dostatečně čisté formě, byl CYP101. Protože jde o enzym izolovaný z mikroorganismu *Pseudomonas putida* pěstovaného na živné půdě s kafrem jako výlučným zdrojem uhlíku, je tato forma označována také jako P450_{cam}. Jde - na rozdíl od většiny ostatních cytochromů P450 - o rozpustný protein, což usnadnilo získání dat o jeho primární i prostorové struktuře. Krystalovou strukturu CYP101 s vysokým rozlišením publikovali roku 1987 Poulos a spol. [16], roku 1993 pak byla rozřešena struktura další rozpustné formy CYP102 (izolované z *Bacillus megaterium*; cytochrom P450 BM-3) [17]. Jelikož jsou savčí formy cytochromů P450 asociovány s membránou, je jejich izolace, purifikace a krystalizace velmi obtížná. Do této chvíle nebyla proto plně rozřešena krystalová struktura žádné izolované savčí mikrosomální formy cytochromů P450 - pro krystalizaci jsou nutné často dosti výrazné úpravy primární struktury (především delece membránové kotvy). Veškerá data o struktuře savčích forem, které jsou v této práci zkoumány, pocházejí tedy z analýzy podobných chimérických molekul, získaných v umělých expresních systémech.

Podobně jako mnohé další hemoproteiny (např. cytochrom b, myoglobin) má cytochrom P450 v aktivním místě tzv. hem *b*, Fe-protoporfyryin IX, jehož struktura je uvedena na obr. 2, str. 13.



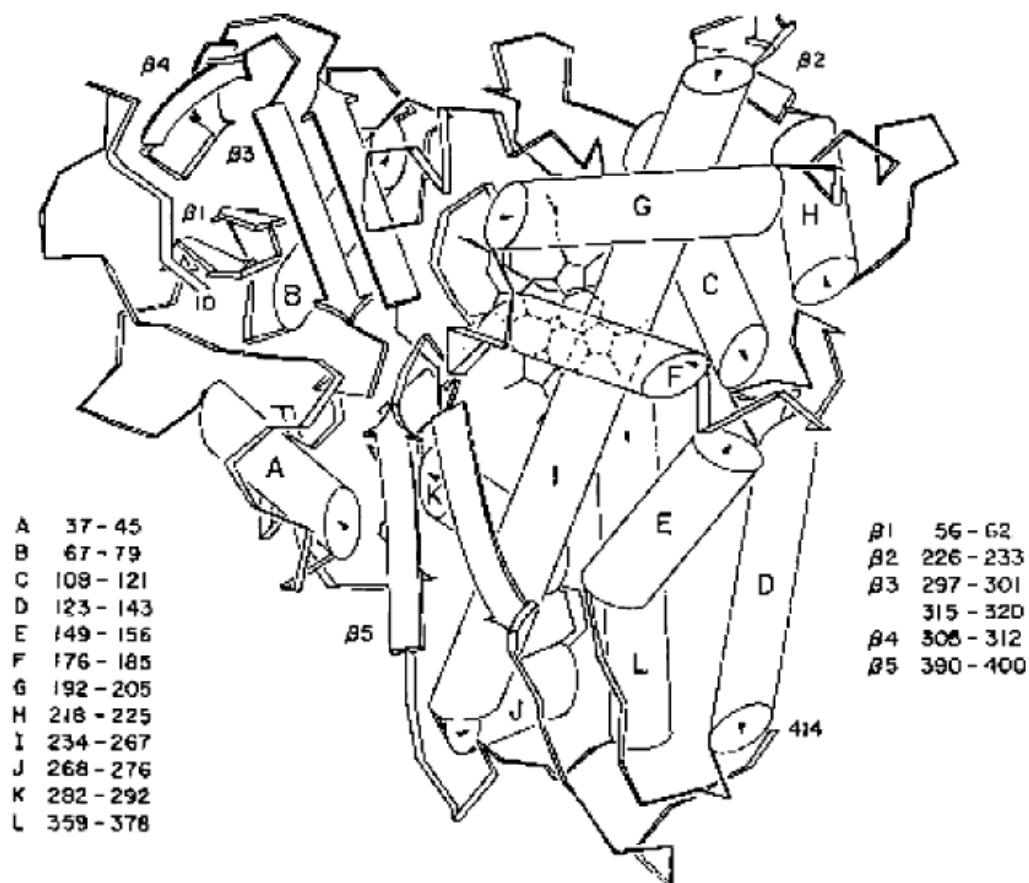
Obr. 2: Struktura protoporphyrinu IX, převzato z [18].

Základem této skupiny (viz obr. 2) je tetrapyrolový kruh s charakteristickým rozložením substituentů (dvě vinylové skupiny, dva propionáty a čtyři methylové skupiny) s iontem železa umístěným ve středu, přičemž železo je koordinované se čtyřmi atomy dusíku z pyrolových jader. Další dvě koordinační valence železa (tzv. axiální) jsou k dispozici pro vazbu na protein, popř. pro vazbu substrátu nebo dalších molekul.

V molekule cytochromů P450 je hem vázán nekovalentně (především hydrofobně a vodíkovými vazbami) a zároveň koordinační vazbou prostřednictvím thiolátové síry (odvozené z cysteinu v peptidovém řetězci enzymu). Vazba thiolátového aniontu na železo podmiňuje výjimečné chování těchto hemoproteinů (zejména specifické spektrální vlastnosti) [19], [20], [21], [22]. Šestáým ligandem je v základním stavu enzymu (tzv. „resting state“) obvykle atom kyslíku z molekuly vody [4].

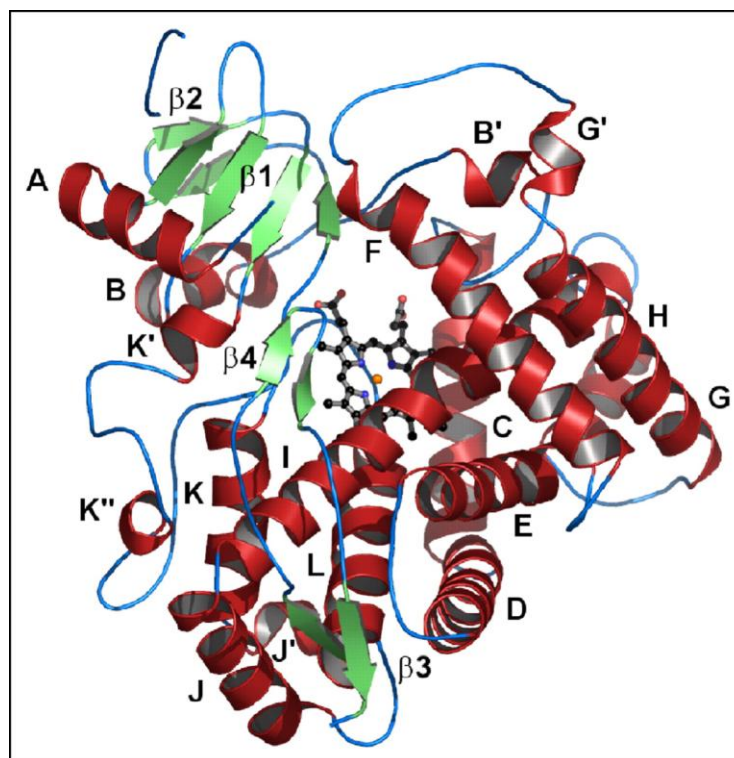
Jak již bylo uvedeno v předešlém textu, první krystalovou strukturou cytochromů P450 byla struktura P450_{cam} (CYP101), kterou získal Poulos se svými kolegy [16].

Trojrozměrné strukturu CYP101 dominuje 12 helikálních segmentů (viz obr. 3, str. 14) označovaných A až L. Helixy I, L a D jsou přibližně v paralelním uspořádání (s dipólovými momenty orientovanými jedním směrem). Hem je pohřben uvnitř molekuly, jeho okolí tvoří proximální (L) a distální (I) helix. Takové uspořádání je typické pro mnoho hemoproteinů, ale P450_{cam} (jehož struktura je zde popisována) se od ostatních liší v tom, že uspořádání helixů I a L je v tomto případě paralelní raději než antiparalelní. Na vstupu substrátu a specifitě jeho vazby se podílí helixy B, C, F a G [16], [24].



Obr. 3: První 3D známá struktura P450 – P450_{cam}. Písmena A až L značí jednotlivé helixy, čísla u nich potom označují počet aminokyselin v jednotlivých helixech. Převzato z [16].

V následujícím období se však podařilo vyřešit krystalové struktury dalších cytochromů P450, a to nejen prokaryotických, ale i eukaryotických, mezi nimi i savčích mikrosomálních forem. Na rozdíl od prokaryotických P450, které většinou nejsou asociovány s membránou, eukaryotické P450 jsou membránové proteiny. Většina z nich je inkorporována do endoplazmatického retikula hepatocytů, najdeme je ale i jinde, například formy zapojené do syntézy steroidů se nacházejí ve vnitřní mitochondriální membráně buněk kůry nadledvinek [22]. Trojrozměrná struktura savčího cytochromu P450 2D6 je na obrázku 4, str. 15.



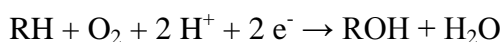
Obr. 4: Trojrozměrná struktura lidského cytochromu P450 2D6. Převzato z [23].

Poněkud překvapivě se ukázalo, že prokaryotické a eukaryotické P450 si jsou základním strukturním uspořádáním dosti podobné, ačkoliv sekvenčně vykazují jen malý stupeň homologie. Nejvýraznější analogii vykazuje rozmístění elementů sekundární struktury. Obecně je známo, že čím blíže jsou jednotlivé struktury hemu, tím podobnější si elementy sekundární struktury jsou mezi jednotlivými cytochromy P450 navzájem. Toto platí hlavně pro helixy I a L, které jsou s hemem přímo propojeny. Helix I, který prochází v těsné blízkosti hemového železa, se jako strukturní prvek vyskytuje ve všech dosud známých cytochomech P450 [24].

2.2.1.2. Mechanismus působení P450

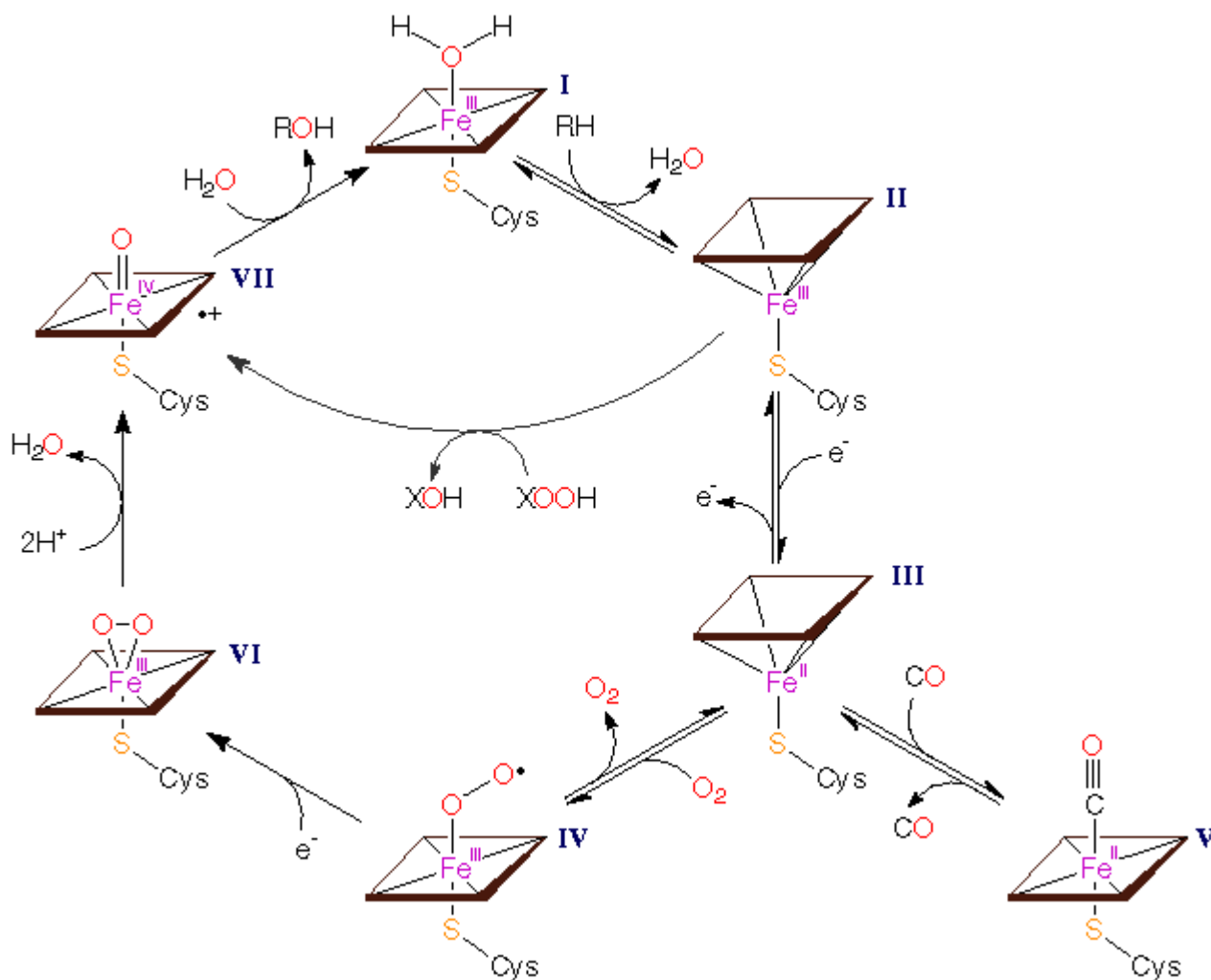
Systemy cytochromů P450 jsou v eukaryotických buňkách nejčastěji vázány v membráně hladkého endoplazmatického retikula buněk jater nebo mitochondrií převážně kůry nadlečin [22].

Obecně lze reakce katalyzované cytochromem P450 vyjádřit touto rovnicí:



(RH v této reakci značí substrát, ROH potom hydroxylovaný produkt reakce) [15]

Reakční cyklus cytochromů P450 probíhá uspořádaným mechanismem a sestává se alespoň z osmi kroků. Schéma cyklu je následující (obr. 5):



Obr. 5 – Mechanismus reakčního cyklu většiny cytochromů P450, převzato z [15].

I - II: Na počátku je hemové železo hexakoordinované, v nízkospinovém stavu a má formální oxidační číslo +III (jedná se tedy o ferri- formu). Šestým ligandem je molekula vody. Reakce začíná vazbou substrátu (RH) do aktivního místa, které je lokalizováno mimo hem, avšak v jeho blízkosti. Toto způsobí změnu konformace molekuly – dochází k vytlačení molekuly vody, ferri- forma železa zůstává, dochází však

k přeměně na vysokospinový stav, který se projeví posunem absorpčního (Soretova) pásu hemu a změnou spektrálních vlastností hemu.

II - III: V dalším kroku železo redukuje. Redukce je usnadněna vazbou substrátu, elektron dodává NADPH:CYP reductasa (v případě P450, které patří do skupiny Class II, viz kap. 2.2.1.4., str. 18). Oxidační číslo železa je nyní +II (ferro- forma). Železo zůstává pentakoordinované, ve vysokospinovém stavu.

III - IV: Po navázání molekulárního kyslíku na železo vzniká adukt s hexakoordinovanou, nízkospinovou formou železa. Šestým ligandem se stává právě kyslík. Tento adukt se nazývá ternární ferri-superoxidový komplex a není příliš stabilní.

IV – VI: V dalším kroku dochází opět k redukcii. Druhý elektron je dodáván v případě Class II NADPH:CYP reductasou. Kyslík je aktivován na superoxidový anion. Tento komplex je již zcela aktivovanou formou cytochromu P450.

VI – VII: V předposlední části tohoto cyklu je rozštěpena molekula kyslíku, jeden z atomů přijme dva protony a dojde k uvolnění molekuly vody, zatímco druhý zůstává vázán na hemovém železe, čímž vzniká ferrioxenový komplex. Tento komplex je stabilizován mezomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík.

VII – VIII: Kyslíkový radikál se váže do molekuly substrátu (který je, jak již bylo řečeno, vázán na enzym, avšak mimo hem) a díky tomu se tvoří hydroxylovaný produkt, jež je z enzymu uvolněn a samotný hem se regeneruje do nativního stavu [15], [22].

Podle toho, jakým způsobem jsou dodávány elektrony do reakce popsané výše, můžeme cytochromy P450 rozdělit do několika tříd – více viz kap. 2.2.1.4.

2.2.1.3. Výskyt P450

Ačkoliv byly cytochromy P450 objeveny v savčích jaterních preparátech, byly následně nalezeny v mnohých dalších orgánech a tkáních – v ledvinách, plicích, gonádách, nadledvinkách, mozku, nosním epitelu, placentě, slinivce, slezině, GIT či kůži [26]. V buňkách jsou lokalizovány hlavně v membránách hladkého endoplazmatického retikula, některé rovněž v membránách mitochondrií [4].

Po objevu prvního cytochromu P450 začaly být zkoumány další a další struktury CYP. Nárůst počtu známých forem si vynutil sjednocení nomenklatury.

V současnosti používané rozdělení a pojmenování jednotlivých forem cytochromů P450 je založeno na podobnosti sekvencí [25]. Označení začíná zkratkou CYP, která symbolizuje příslušnost k tzv. superrodině cytochromů P450. Následuje číslo označující rodinu enzymů (jednotliví členové této rodiny vykazují podobnost aminokyselinové sekvence alespoň 40%), velké písmeno vyjadřující příslušnost k podrodině (kdy je sekvenční podobnost jednotlivých cytochromů P450 alespoň 55%), poslední číslo označuje danou individuální formu cytochromu P450. Obdobné označení se používá také pro příslušné geny, je však psáno kurzívou. Například, *CYP2E1* je gen, který kóduje CYP2E1 (cytochrom P450 2E1). V některých případech se používá paralelně i jiných názvů (například CYP5A1 je thromboxan A₂-synthasa, která je častěji označována zkratkou TBXAS1), popř. přežívá starší označení (cytochrom P450_{cam}) [26].

2.2.1.4. Dělení cytochromů P450 podle řetězce přenosu elektronů

Cytochromy P450 je možné klasifikovat také podle toho, z jakého zdroje jsou elektrony, které redukují molekulární kyslík, a pomocí jakých redox partnerů se tyto elektrony k cytochromu P450 dostávají. Široce přijímané je rozdělení do čtyř tříd:

- Třída I (Class I) – donorem elektronů je NADH nebo NADPH, vyžadují NAD(P)H ferredoxin reduktasu obsahující FAD, a dále Fe-S protein, který zprostředkovává přenos elektronu z reduktázy na P450. Vyskytují se v bakteriích i mitochondriích eukaryot.
- Třída II (Class II) – nejběžnější typ cytochromů P450 v eukaryotech, nalezneme je asociované s endoplazmatickým retikulem. Je pro ně nezbytná NADPH:CYP reduktasa obsahující FAD/FMN.
- Třída III (Class III) – P450 patřící do této třídy nevyžadují žádný exogenní zdroj elektronů, proto jsou nazývány „independent“ [27].
- Třída IV (Class IV) – cytochromy P450 řazené do této třídy přijímají elektrony přímo od NAD(P)H bez nutnosti elektronových přenašečů [28].

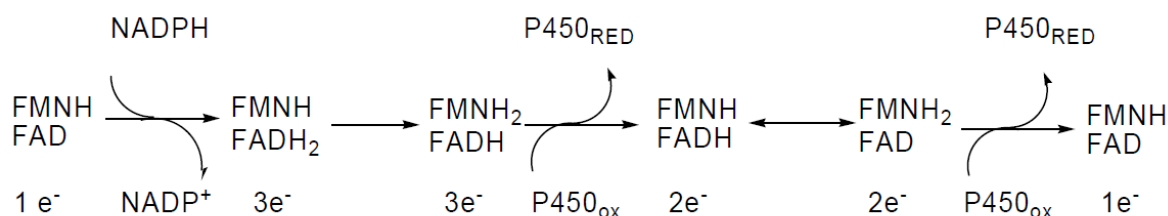
V posledních letech však několik tříd přibylo, nejlépe je popisuje článek Hannemanna a kol. [27], kde autoři zmiňují i jinou možnost rozdělení cytochromů P450, a to až do deseti tříd.

Experimentální část práce je věnována převážně cytochromům P450, které patří do Class II.

2.2.2. Cytochrom P450 reduktasa

Cytochrom P450 reduktasa (CPR; NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa, EC 1.6.2.4.) je integrální membránový protein o molekulové hmotnosti asi 78 kDa, který je nezbytný pro přenos elektronů z NADPH na všechny známé mikrosomální cytochromy P450 [29]. Je to jeden ze dvou známých savčích enzymů, který obsahuje jak FAD, tak FMN koenzymy (dalším případem jsou NO-synthasy) [29], [30]. Současná přítomnost FAD i FMN v molekule enzymu umožňuje působit jako dělič elektronového páru a redukovat tak cytochrom P450 v sekvenčně oddělených krocích [22].

CPR katalyzuje přenos elektronů cestou $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FMN} \rightarrow \text{P450}$ a organizuje přenos elektronů z NADPH na P450 tak, že stabilizuje jedoelektronovou redukovanou formu flavinových kofaktorů FAD a FMN [31]. Akceptorem elektronů od NADPH je tedy FAD, který elektrony následně předává FMN. Za jedoelektronovou redukci akceptorové molekuly – cytochromu P450 – je (v případě savčí CPR) zodpovědný zcela redukovaný hydrochinon FMNH_2 (viz obr. 6) [22].



Obr. 6: Přenos elektronů mezi FAD a FMN. Převzato z [22].

Cytochrom P450 reduktasa se skládá ze dvou prostorově oddělených částí. První je hydrofobní N-terminální α -helikální transmembránová kotva (~ 6 kDa), díky které je CPR ukotvena v endoplazmatickém retikulu a zároveň je tímto zajištěna správná orientace pro elektronový přenos. Druhou, o poznání větší část, tvoří hydrofilní cytosolární část (~ 66 kDa). Obě části jsou spojeny tzv. linkerem [32].

Strukturně je možné v CPR rozlišit čtyři domény: FMN-vazebnou, FAD-vazebnou, NADPH-vazebnou a spojovací doménu [32], viz obr. 7, str. 20.



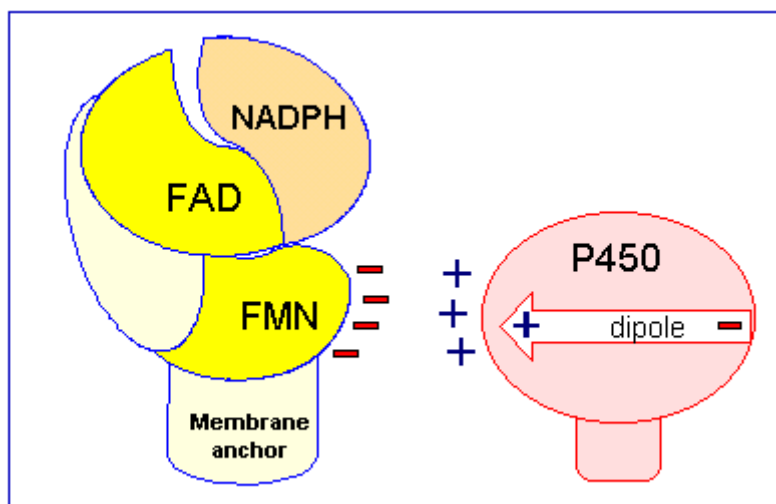
Obr. 7: Cytochrom P450 reduktasa. Zeleně obarvená část obsahuje FAD kofaktor a NADPH-vazebnou doménu, modrá FMN kofaktor, červená část je doména (linker) spojující FAD a FMN doménu. Převzato z [33].

2.2.3. Interakce mezi cytochromy P450 a cytochrom P450 reduktasou

U cytochromů P450 je hem pohřben uvnitř struktury molekuly a není přístupný rozpouštědлу či jiné látce v okolí P540. Bylo předpokládáno, že bazické zbytky by se na proximální straně P450 (tam, kde se hem nejvíce přibližuje povrchu P450) měly vázat na své redoxní partnery (tedy ty s kyselými aminokyselinami na povrchu). Obecně platí, že tyto proteiny interagují s povrchy, které jsou komplementární z hlediska náboje a tvaru [34].

Studie využívající chemické síťování a modifikační studie [35] ukazují, že CPR obsahuje větší množství karboxylových skupin, k čemuž pravděpodobně přispívají kyselé aminokyseliny aspartát a glutamát [35]. Takto nabitě skupiny se budou párovat s aminokyselinami bazickými (lysiny, argininy), které musí být přítomny na povrchu molekuly elektronového akceptoru, tedy cytochromu P450.

Navíc tvoří cytochrom P450 dipól s pozitivním nábojem na proximální straně enzymu, kde je hem nejbližší k povrchu molekuly [37], viz obr. 8, str. 21. Tato část povrchu je pravděpodobně nejvhodnějším místem pro interakci s CPR.



Obr. 8: Interakce CPR a CYP, převzato z [38]. Pojem „membrane anchor“ označuje membránovou kotvu CPR.

Zatímco elektrostatické síly mohou sloužit k propojení a orientaci páru, tak hydrofobní síly, ke kterým přispívají nepolární AMK (leucin, tryptofan, valin a další), mohou být odpovědné za přiblížení dvou proteinů tak blízko k sobě, že může dojít k přenosu elektronu [38], [39].

2.2.3.1. Interakce P450 2B4 – cytochrom P450 reduktasa

Podle literatury [40], [41], [42] jsou do interakce cytochromu P450 2B4 a cytochrom P450 reduktasy zapojeny tři aminokyseliny: Arg-422, Lys-433, Arg-434. Toto tvrzení bylo ověřováno v roce 1998 Angelou Bridges a jejími kolegy [43]. O těchto aminokyselinách bylo zjištěno následující:

- Arg-422 – mutace R422A – tento mutant umístěný na proximální straně ligandu cytochromu P450 2B4 vykazoval sníženou schopnost vazby k cytochrom P450 reduktase.
- Lys-433 – mutace K433A – mutant, který se rovněž nachází na proximální straně cytochromu P450 2B4, vykazoval sníženou schopnost vazby cytochromu b₅ i cytochrom P450 reduktasy. V důsledku mutace také došlo ke ztrátě solného můstku s Asp-90 reduktasy.

- Arg-434 – mutace R434A – i tento aminokyselinový zbytek se vyskytuje na proximální straně cytochromu P450 2B4. Záměnou alaninu za arginin došlo k vytvoření hydrofilní dutiny. Záměna alaninu za arginin také způsobila, že nedošlo k expresi holoproteinu.

2.2.4. Cytochrom b₅

Cytochrom b₅ je malý protein (~ 17 kDa) obsahující 134 zbytků. Struktura je oddělena na N-terminální hydrofilní hemovou doméni a C-terminální hydrofobní membránou vázané oblasti. Zatímco membránově vázané formy cytochromu b₅ se účastní elongace a desaturace mastných kyselin [44], biosyntézy cholesterolu a metabolismu léčiv, rozpustné formy b₅ a b₅ reduktasa se mohou vyskytovat například v erythrocytech, kde katalyzují redukci methemoglobinu [31].

Cytochrom b₅ byl původně objeven v larvách bource morušového [45]. Jedná se o enzym, který je velmi intenzivně studován u savců. Stejně jako cytochrom P450 a cytochrom P450 reduktasa je i cytochrom b₅ integrální membránový protein lokalizovaný na cytosolické straně endoplazmatického retikula, kde je zapojen do biosyntézy lipidů. Návrhy, že cytochrom b₅ je zapojen do reakcí cytochromů P450, je znám už od počátku studií [31], [46], [47].

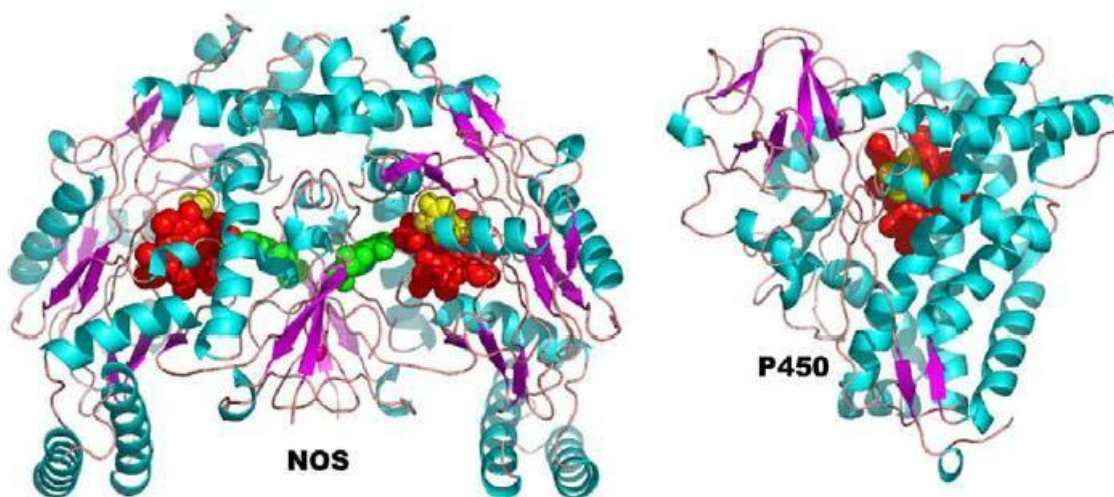
Obecně je akceptován názor, že nábojové interakce řídí formaci komplexů cytochrom P450:cytochrom b₅. Tato teorie je podpořena řadou studií řízené mutagenéze. Například výsledky Bridges a kol. [43] ukazuje, že kladně nabitě zbytky R122, R126, R133, K139 a K433 na povrchu cytochromu P450 jsou zapojeny do interakcí s cytochromem b₅ [43]. Avšak přesný mechanismus, jakým b₅ podporuje funkci enzymu P450, zatím není objasněn [34]. Je známo, že cytochrom b₅ může cytochrom P450 stimulovat, inhibovat, nebo na něj také nemusí mít žádný vliv. Jakým způsobem bude cytochrom b₅ na cytochrom P450 působit závisí na isoformě cytochromu P450, substrátu a podmínkách experimentu [48].

2.3. Další hem-thiolátové proteiny

Hem-thiolátové proteiny, mezi které patří vedle již popsaných cytochromů P450 také NO-synthasy (dále NOS) a chloridové peroxidasy (dále CPO), katalyzují velké množství důležitých biologických reakcí, o kterých bude pojednáno v následujícím textu.

Stejně jako u P450, i aktivní místa těchto proteinů jsou velmi dobře prozkoumána díky znalosti krystalových struktur. Centrum aktivního místa tvoří protoporphyrin IX s železem vázaným ve středu molekuly, koordinovaným k cysteinthiolátové síře. Všechny tři enzymy jsou oxidoreduktasami, které aktivují buď molekulární kyslík (CYP a NOS), nebo peroxid vodíku (CPO) a následně inkorporují jeden z atomů kyslíku do molekuly substrátu. Druhý atom kyslíku je následně přeměněn na vodu [13].

Molekulární modely NO-synthasy a cytochromu P450 jsou na obr. 9.



Obr. 9: Molekulární modely NO-synthasy a cytochromu P450. Kromě hemu v aktivním centru mezi modely neexistuje výraznější strukturní podobnost. – převzato z [49].

2.3.1. NO-synthasy

Oxid dusnatý je molekula, která je velmi reaktivním volným radikálem. V dřívějších letech bylo předpokládáno, že NO pouze znečišťuje ovzduší a přispívá ke smogu a kyselým dešťům, v současnosti se jedná o velmi často zkoumanou molekulu.

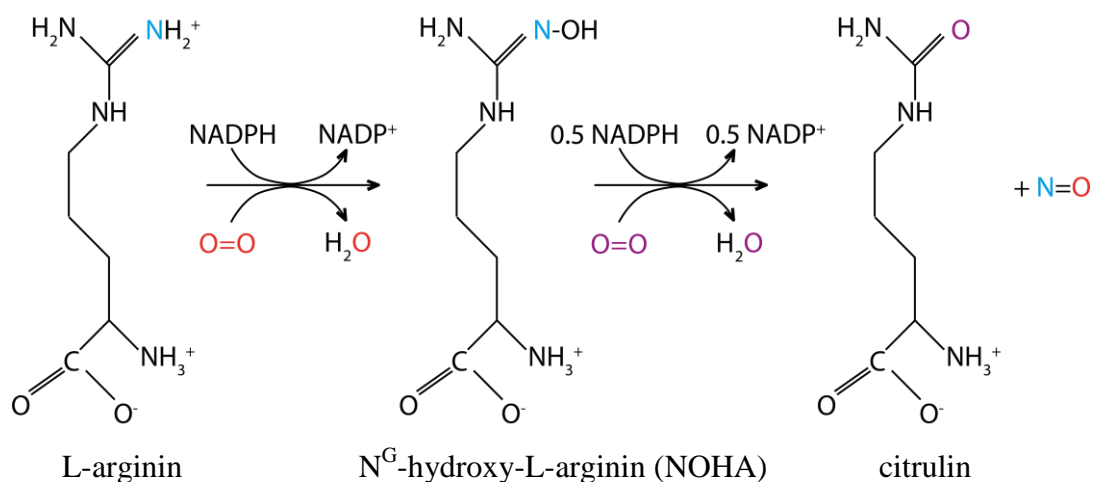
Zajímavostí je, že až okolo roku 1998 došlo ke klíčovým objevům týkajících se NO jako signální molekuly v kardiovaskulárním systému, Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro a Ferid Murad za tyto objevy obdrželi Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství [50].

V dnešní době je tedy známo, že NO je molekula, která hraje roli v mnoha fyziologických jevech jako je například udržování cévního tonu, účinkem na hladké svalstvo cévy způsobuje vazodilataci (rozšíření cév), plní roli neurotransmiteru jak v centrální, tak v periferní nervové soustavě, dále také zprostředkovává buněčnou obranu. Další neméně zajímavou funkcí NO je interakce s mitochondriálními systémy, díky čemuž dochází k regulaci buněčného dýchání a k tvorbě reaktivních forem kyslíku. Dá se tedy zjednodušeně říci, že záleží na NO, zda buňka přežije, či dojde k buněčné smrti [51].

Je tedy patrné, že oxid dusnatý je velmi důležitou molekulou pro lidský organismus a jeho vznik pomocí NO-synthas významnou biochemickou reakcí.

NO-synthasy (dále NOS, EC 1.14.13.39.) jsou monooxygenasy, přičemž v reakci, kterou katalyzují, vzniká právě oxid dusnatý a citrulin z L-argininu s využitím NADPH a O_2 .

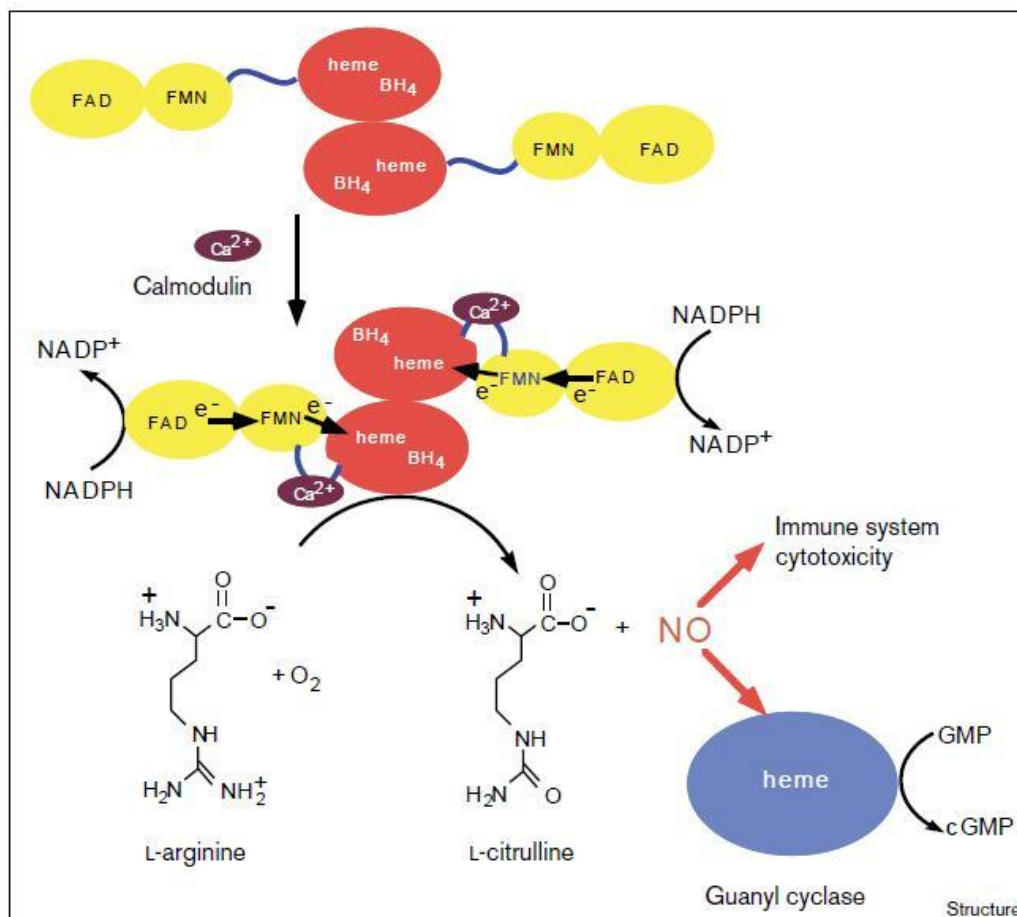
Katalýza pomocí NOS je proces skládající se ze dvou redoxních kroků: nejprve je substrát, L-arginin, přeměněn na N-hydroxy-L-arginin (NOHA), jež se následně přemění na NO a citrulin (viz obr. 10, str. 25). První krok této reakce je někdy srovnáván s reakcí cytochromu P450 – avšak až na povahu substrátu, jež se v obou případech výrazně liší (více viz kap. 2.3.2.). Přeměna N-hydroxy-L-argininu na citrulin je naopak reakcí zcela typickou pro NO-synthasy.



Obr. 10 – Reakce katalyzovaná enzymem NO-synthasou – převzato z [52].

Jak je patrné z obr. 10, atom dusíku v molekule NO pochází z molekuly L-argininu, atom kyslíku potom z molekuly O_2 [52].

NOS jsou výjimečné tím, že využívají vazby pěti kofaktorů/prostetických skupin: flavinadenindinukleotidu (FAD), flavinmononukleotidu (FMN), hemu, tetrahydrobiopterinu (BH_4) a Ca^{2+} -kalmodulinu (CaM) [50]. Elektrony jsou k hemu NO-synthas dodávány díky tomu, že flavinová reduktasa je kovalentně vázána k hemové doméně přes linker, který váže kalmodulin [33] (viz obr. 11, str. 26).



Obr. 11: Vznik NO z L-argininu a jeho využití. NOS je znázorněna jako homodimer. Zvýšení koncentrace vápníku v buňce stimuluje aktivitu NOS přes Ca-kalmodulin vazbu na NOS, což podporuje přenos elektronu z FAD-FMN domény k hemu. Převzato z [33].

NO-synthasy se vyskytují ve třech funkčně odlišných isoformách – neuronální, inducibilní a endotheliální. nNOS, tedy neuronální isoforma, je nejvíce rozšířena v nervovém systému [53]. Další dvě formy, eNOS (endotheliální) a iNOS (inducibilní) jsou konstitutivně exprimovány převážně v endotheliálních buňkách, iNOS je pak lokalizována i v imunitním systému [54].

Všechny 3 isoformy mají společné následující rysy:

- obsahují hem v aktivním centru;
- jsou aktivní jako homodimery;
- jsou stereospecifické (D-arginin nemůže být substrátem);
- všechny isoformy NO-synthas vážou pět kofaktorů/prostetických skupin: FAD, FMN, hem, tetrahydrobiopterin (BH₄) a Ca²⁺-kalmodulin (CaM) [50].

Podrobnější informace o jejich rozdílech poskytuje následující tabulka:

Tab. 1: Jednotlivé isoformy NO-synthas, jejich výskyt a funkce. Převzato z [50].

Doporučené označení	NOS I	NOS II	NOS III
Alternativní označení	nNOS (neuronální)	iNOS (inducibilní)	eNOS (endotheliální)
Molekulová váha	~ 160 kDa	~ 130 kDa	~ 133 kDa
Lokalizace v buňce	cytosol	cytosol	buněčná membrána (kalveoly)
Výskyt	některé centrální a periferní neurony , některé buňky epitelu a cévního hladkého svalu, kosterní sval	makrofágy , glie, hepatocyty, endotel, epitel, srdeční myocyty, hladký sval,...	cévní endotel , plicní a renální epitel, trombocyty, srdeční myocyty, hipokampus
Exprese proteinu	konstitutivní (trvalá)	většinou inducibilní (pouze po stimulaci cytokiny apod.)	konstitutivní (trvalá)
Regulace aktivity	Ca ²⁺ , ser/tyr fosforylace, NO	jákmile je protein exprimován, není aktivita regulována; NO	Ca ²⁺ , ser/tyr fosforylace, modulace exprese
Hlavní fyziologický význam	neurotransmise, neuromodulace	boj s infekcí, tumory (cytotoxicita)	regulace cévního tonu, průtoku krve tkáněmi, krevního tlaku

2.3.2. Srovnání cytochromů P450 a NO-synthas

Cytochromy P450 i NO-synthasy patří do skupiny hem-thiolátových proteinů. Oba enzymy jsou také oxidoreduktasami, které aktivují molekulární kyslík a následně inkorporují jeden z atomů kyslíku do molekuly substrátu. Druhý atom kyslíku je poté přeměněn na vodu [13].

Je nutné na tomto místě zopakovat, že NOS obsahují i všechny složky monooxygenasového systému: hem, FMN, FAD. Tetrahydrobiopterin nebo kalmmodulin jsou naopak u NO-synthas oproti P450 navíc.

Zatímco reduktasová doména obou enzymů je velmi podobná, oxygenasová (hemová) vykazuje malou podobnost. Jedním z mála podobných motivů je například

axiální ligand hemu, kterým je u obou enzymů thiolátová síra sulfhydrylové skupiny cysteinu [33].

Velkým rozdílem mezi oběma enzymy je také katalyzovaná reakce. Zatímco cytochrom P450 působí převážně na nepolární sloučeniny, NO-synthasy katalyzují přeměnu velmi polární aminokyseliny, L-argininu. Oba dva enzymy se liší také počtem elektronů, které je nutné použít pro katalýzu dané reakce - cytochromy P450 pro jednu reakci potřebují 2 elektrony, NO-synthasy pro podobnou reakci stejný počet elektronů [52]. Nicméně v dalším reakčním kroku u NO-synthas dochází ke spotřebě ještě dalšího elektronu.

2.3.3. Chloridové peroxidasy

Chloridové peroxidasy (CPO, EC 1.11.1.10., také chloroperoxidasy) jsou také řazeny do skupiny hem-thiolátových proteinů. Současně bývají zařazovány mezi peroxidasy [55], [56].

Nejvýznamnější funkcí těchto enzymů je katalýza halogenace různých alifatických substrátů (1). Nicméně se jedná o enzym univerzální – CPO vykazují také peroxidasovou (2), katalasovou (3) a monooxygenasovou (4) aktivitu, jak je vyjádřeno v následujících rovnicích: [15]



2.3.4. Interakce hem-protein v hem-thiolátových proteinech

Jednou z velmi zajímavých otázek je, jakým způsobem komunikuje hem s proteinem, který jej obklopuje. Zjištění, jak hem s apoproteinem interaguje v odpovědi na vazbu například substrátu nebo inhibitoru, je třeba pro prozkoumání regulace enzymové aktivity, zejména modulace redox potenciálu a schopnosti vazby kyslíku [57].

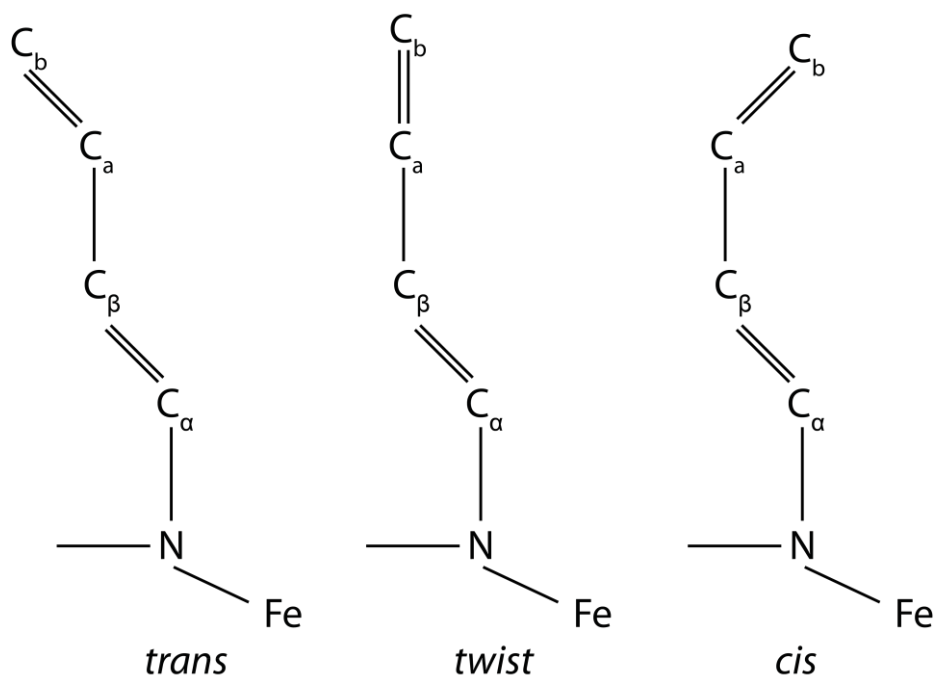
Existuje několik možností, jakým způsobem hem (a železo) může interagovat s okolním proteinem:

- Apoprotein může mít vliv na axiální ligand(y) hemového železa, a to buď sterický (jako například u přechodu mezi stavy R – T u hemoglobinu), nebo prostřednictvím vlivu na elektronový stav ligandu [19]. Obecně platí, že tento mechanismus zahrnuje i změny na neligandové straně hemu a v extrémním případě může dojít i k výměně ligandu (ligandů) hemového železa [57].
- Vlivem apoproteinu může dojít k odchýlení hemu od planarity. Tento mechanismus hraje pravděpodobně významnou roli pro mnoho hemoproteinů, včetně cytochromů P450 [59], [60].
- Apoprotein může interagovat s hemem prostřednictvím postranních řetězců hemu, pravděpodobně propionátů (díky jejich možnosti tvořit vodíkové můstky a vzniku částečného náboje) a vinylů [61], [62].
- Ovlivnění separace nábojů (tím pádem je ovlivněn redoxní potenciál) změnou permitivity okolí iontu železa z porfyriu. U cytochromů P450 je tento mechanismus navržen jako jedno z vysvětlení specifických vlastností. Je realizován například přibližováním či vzdalováním hydrofobních řetězců [60], [63].

Tato práce bude blíže zaměřená na variantu, že hem s apoproteinem, který jej obklopuje, interaguje prostřednictvím postranních řetězců hemu – vinylů a propionátů.

Existuje velké množství nejrůznějších studií, které prokazují, že propionáty nejsou pouze jakási „kotva“ pro vazbu hemu, ale současně také aktivně ovlivňují elektronové vlastnosti. Studie Gullara a Olsena z roku 2006 [64] naznačuje, že propionáty hrají aktivní roli v dodávání elektronu k hemovému železu. Mechanismus tohoto děje je založen na křehké rovnováze mezi volnými párovými orbitaly propionátu a π -systémem porfyriu.

Dalšími řetězci, které mohou fungovat jako mediátory v interakci hem-protein, jsou vinyly [57]. Pro vinylové skupiny platí, že je možné rozlišit tři základní orientace vinylu vůči hemu – dvě jsou v rovině anebo přibližně v rovině (cis a trans konformace), jedna je mimo rovinu (twist konformace) [65]. Tyto možné orientace vinylu vůči hemu jsou znázorněny na obr. 12, str. 30.



Obr. 12: Různé konformace vinylových řetězců, převzato z [65].

Tato práce navazuje na diplomovou práci Kristýny Majerové [60] a bude se blíže věnovat interakcím vinylových postranních řetězců hemu. V předchozích pracích se při analýze různých cytochromů P450 (nejen savčích) zjistilo, že vinyly v pozici 2 jsou konformačně omezenější a jejich torzní úhly spadají do užšího intervalu ve srovnání s vinyly v pozici 4, kde jsou tyto postranní řetězce více flexibilní [57], [60]. Při analýze torzních úhlů vinyků v pozici 2 savčích cytochromů P450 se prokázalo, že tyto úhly leží v rozmezí hodnot -120° až 150° (až na některé výjimky). Na rozdíl od tohoto úzkého intervalu hodnot byla situace u torzních úhlů v pozici 4 odlišná – zde se jednalo o interval úhlů od 0° do 180° [57], [60]. Prokázalo se také, že existuje strukturální variabilita mezi jednotlivými podrodinami cytochromů P450, která je typická pro 4-vinyly [57].

Kromě těchto dvou prací, které zkoumaly hodnoty torzních úhlů pro cytochromy P450, existuje i studie zabývající se torzními úhly vinyků peroxidás [65]. V té bylo zjištěno, že torzní úhly pro vinyly v pozici 2 jsou u peroxidás v daleko širším intervalu než u cytochromů P450, a to od 0° do 152° . Naopak torzní úhly vinyků v pozici 4 jsou v intervalu užším, a to od 110° do 157° .

3. Cíl práce

Tato práce se bude v první části zabývat interakcemi hemové části molekul cytochromů P450 a NO-synthas s apoproteinovou částí. Cílem je analyzovat různé formy savčích cytochromů P450 i NO-synthas, jejichž struktury jsou dostupné v databázi Protein Data Bank. Analýza měla zjistit, zda závěry o rozdílu ve flexibilitě vinylů v pozicích 2 a 4, zjištěné v předchozích pracích pro některé formy CYP, mají obecnější platnost, a dále nakolik se uplatňují i pro NO-synthasy.

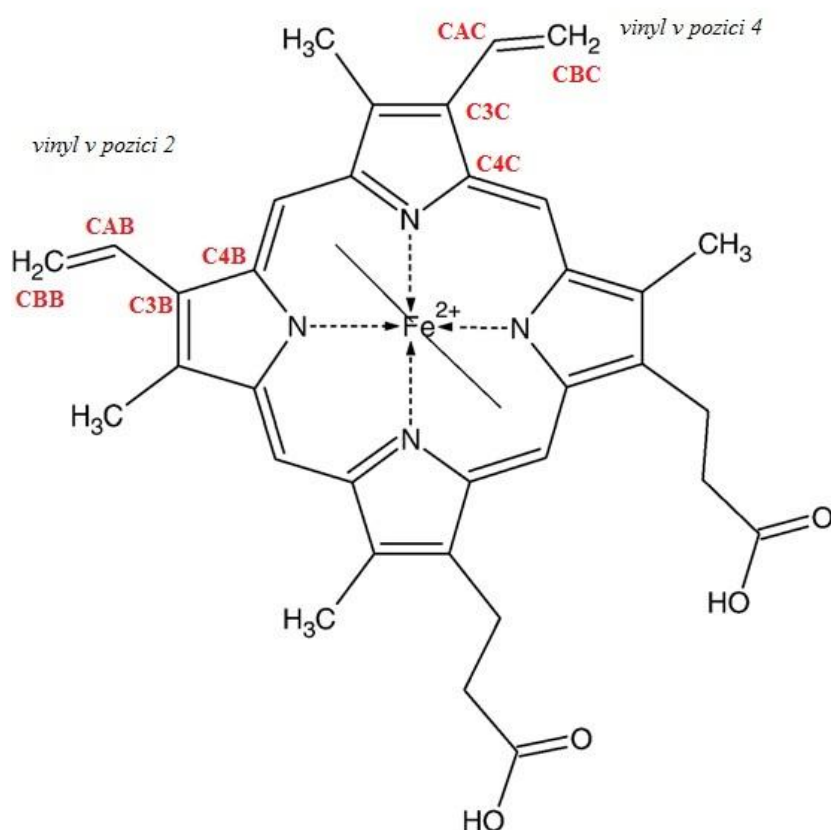
Druhá část práce je pak zaměřena na interakce cytochromu P450 s cytochrom P450 reduktasou. Je známo, že u cytochromu P450 2B4 jsou za tyto interakce odpovědné převážně tři aminokyselinové zbytky: Arg-422, Lys-433, Arg-434. Cílem tedy bude zjistit, jakou roli hrají tyto aminokyselinové zbytky u dalších cytochromů, zda i u ostatních jsou za reakci odpovědné právě tyto tři aminokyseliny, zda jsou na stejných nebo jiných místech v primární struktuře, případně nakolik jsou prostorové vztahy (vzdálenosti) mezi zbytky v těchto pozicích kompatibilní s představou o konzervativní povaze interakce P450 s reduktasou.

4. Praktická část

4.1. Metody studia

4.1.1. Interakce hem - apoprotein v cytochromech P450 a NO-synthasách

Nejprve byla stažena data pro jednotlivé savčí cytochromy P450 a NO-synthasy z databáze Protein Data Bank [66]. Byly vybrány pouze takové krystalové formy P450 a NOS, jejichž rozlišení bylo maximálně 3.0 Å. V případě, že některá z forem byla složená z více než jednoho proteinového řetězce, byl analyzován každý řetězec zvlášť. Využitím programu Yasara [71] byly měřeny torzní úhly vinylů v pozici 2 a 4. Pro 2-vinyly se jednalo o řadu atomů C4B-C3B-CAB-CBB, pro 4-vinyly pak C4C-C3C-CAC-CBC.



Obr. 13: Umístění a číslování zkoumaných vinylů, převzato z [57] a upraveno.

Které struktury cytochromů P450 byly zkoumány, ukazuje tabulka 2. V některých případech krystalizují cytochromy P450 jako dimery, nebo oligomery. Jednotlivé řetězce

těchto oligomerů byly zkoumány samostatně a tyto případy jsou v dalším textu označeny jako řetězce A a B.

Tab. 2: Seznam zkoumaných cytochromů P450 spolu s počtem analyzovaných řetězců.

pdb kód	typ cytochromu P450, počet analyzovaných řetězců	pdb kód	typ cytochromu P450, počet analyzovaných řetězců
3NA0	11A1, 2 řetězce	2NNH	2C8, 4 řetězce
2HI4	1A2, 2 řetězce	2NNI	2C8, 4 řetězce
3PM0	1B1, 4 řetězce	2NNJ	2C8, 2 řetězce
3K9V	24A1, 4 řetězce	2VN0	2C8, 2 řetězce
3K9Y	24A1, 2 řetězce	1OG5	2C9, 2 řetězce
1Z10	2A6, 2 řetězce	1R9O	2C9, 4 řetězce
1Z11	2A6, 2 řetězce	3E4E	2E1, 4 řetězce
2FDU	2A6, 2 řetězce	3GPH	2E1, 4 řetězce
2FDV	2A6, 2 řetězce	3C6G	2R1, 4 řetězce
2FDW	2A6, 2 řetězce	3DL9	2R1, 4 řetězce
2FDY	2A6, 4 řetězce	1TQN	3A4, 4 řetězce
2PG5	2A6, 4 řetězce	1W0E	3A4, 2 řetězce
2PG6	2A6, 2 řetězce	1W0F	3A4, 4 řetězce
3EBS	2A6, 4 řetězce	1W0G	3A4, 4 řetězce
2P85	2A13, 8 řetězců	2J0D	3A4, 2 řetězce
1PO5	2B4, 4 řetězce	3NXU	3A4, 2 řetězce
1SUO	2B4, 4 řetězce	2Q9F	46A1, 4 řetězce
2BDM	2B4, 4 řetězce	2Q9G	46A1, 4 řetězce
3G5N	2B4, 2 řetězce	3MDM	46A1, 4 řetězce
3KW4	2B4, 4 řetězce	3MDR	46A1, 4 řetězce
3MVR	2B4, 4 řetězce	3MDT	46A1, 4 řetězce
3IBD	2B6, 2 řetězce	3MDV	46A1, 4 řetězce
1N6B	2C5, 2 řetězce	3DAX	7A1, 2 řetězce
1NR6	2C5, 2 řetězce		

Následující tabulka 3 ukazuje analyzované struktury NO-synthas:

Tab. 3: Seznam zkoumaných NO-synthas. U typu isoformy (zkratka IF) značí N neuronální, E endotheliální a I inducibilní.

pdb kód	IF	pdb kód	IF	pdb kód	IF	pdb kód	IF	pdb kód	IF
1K2R	N	3JT6	N	1DM8	E	3N5T	E	2ORP	I
1K2S	N	3JT7	N	1DMI	E	3NLD	E	2ORQ	I
1K2T	N	3JT8	N	1DMJ	E	3NLE	E	2ORR	I
1K2U	N	3JT9	N	1DMK	E	3NLF	E	2ORS	I
1LZX	N	3JTA	N	1ED4	E	3NLG	E	2ORT	I
1LZZ	N	3N2R	N	1ED5	E	3NLT	E	2Y37	I
1M00	N	3N5V	N	1ED6	E	3NLU	E	3E65	I
1MMV	N	3N5W	N	1FOI	E	3NOS	E	3E67	I
1MMW	N	3N5X	N	1FOJ	E	3NSE	E	3E68	I
1OM4	N	3N5Y	N	1FOL	E	3PNH	E	3E6L	I
1OM5	N	3N5Z	N	1FOO	E	4NSE	E	3E6N	I
1P6H	N	3N60	N	1FOP	E	5NSE	E	3E6O	I
1P6I	N	3NLM	N	1I83	E	6NSE	E	3E6T	I
1P6J	N	3NLV	N	1M9J	E	7NSE	E	3E7G	I
1QW6	N	3NLW	N	1M9K	E	8NSE	E	3E7I	I
1QWC	N	3NLX	N	1M9M	E	9NSE	E	3E7M	I
1RS6	N	3NLY	N	1M9Q	E	1DD7	I	3E7T	I
1RS7	N	3NLZ	N	1M9R	E	1DF1	I	3EAI	I
1VAG	N	3NM0	N	1NSE	E	1DWV	I	3EBD	I
1ZVI	N	3NNY	N	1P6L	E	1DWW	I	3EBF	I
1ZVL	N	3NNZ	N	1P6M	E	1DWX	I	3NOD	I
2G6H	N	3PNE	N	1P6N	E	1M8D	I	3NQS	I
2G6I	N	3PNF	N	1RS8	E	1M8E	I	3NW2	I
2G6K	N	3PNG	N	1RS9	E	1M8H	I		
2G6L	N	3Q99	N	2G6O	E	1M8I	I		
2G6M	N	3Q9A	N	2HX2	E	1M9T	I		
2G6N	N	3SVP	N	2NSE	E	1N2N	I		
2HX3	N	3SVQ	N	3DQS	E	1NOC	I		
2HX4	N	3TYL	N	3DQT	E	1NOD	I		
3B3M	N	3TYM	N	3E7S	E	1NOS	I		
3B3N	N	3TYN	N	3EAH	E	1QOM	I		
3B3O	N	1D0C	E	3JWW	E	1QW4	I		
3B3P	N	1D0O	E	3JWX	E	1QW5	I		
3HSN	N	1D1V	E	3JWY	E	1R35	I		
3HSO	N	1D1W	E	3JWZ	E	1VAF	I		
3HSP	N	1D1X	E	3N5P	E	2NOD	I		
3JT3	N	1D1Y	E	3N5Q	E	2NOS	I		
3JT4	N	1DM6	E	3N5R	E	2NSI	I		
3JT5	N	1DM7	E	3N5S	E	2ORO	I		

Grafické znázornění výsledků bylo provedeno v počítačovém programu Matlab, verze 7.12.0. Skript pro tvorbu grafů uvedených ve výsledcích je v příloze č. 1.

4.1.2. Interakce cytochrom P450 – cytochrom P450 reduktasa

Při tomto výzkumu byla využita data pro cytochromy P450 stažená z Protein Data Bank [66]. Podle Shena a Strobela a dále pak Shimizu a kolegů [40], [41], [42] jsou za interakci cytochromu P450 2B4 a cytochrom P450 reduktasy zodpovědné tři aminokyseliny, Arg-422, Lys-433, Arg-434 – tato domněnka byla dále zkoumána i A. Bridges a jejími kolegy [43]. V programu Yasara byly měřeny vzdálenosti mezi těmito aminokyselinovými zbytky (respektive mezi jednotlivými C_{α}) právě pro cytochrom 2B4. Aby se předešlo chybě, byly vzdálenosti mezi aminokyselinovými zbytky ještě ověřeny výpočtem pro zjištění vzdálenosti mezi dvěma body v rovině:

$$|AX| = \sqrt{(x_a - x_x)^2 + (y_a - y_x)^2 + (z_a - z_x)^2}$$

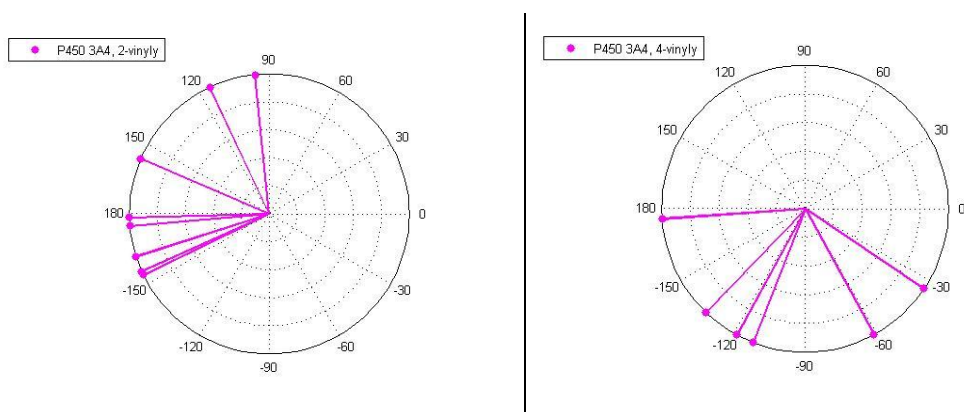
Jelikož webová stránka, ve které byly hodnoceny sekvence vybraných cytochromů, bohužel nenabízela sekvenci P450 2B4, ale pouze P450 2B6, bylo nejprve nutné k pozicím Arg-422, Lys-433 a Arg-434 v sekvenci P450 2B4 přiřadit odpovídající aminokyselinové zbytky v P450 2B6. Následně pak bylo možné pomocí webové stránky Berlínského institutu molekulární biologie a bioinformatiky [67] porovnat sekvence cytochromu P450 2B6 se sekvencemi vybraných cytochromů P450. V případě, že na místech odpovídajících Arg-422, Lys-433 a Arg-434 byly jiné aminokyselinové zbytky, bylo na základě fyzikálně-chemických vlastností posouzeno, zda se mohou účastnit interakce s cytochrom P450 reduktasou. Pokud ne, bylo zkoumáno v alignmentu ostatních cytochromů, zda jsou přítomny v blízkosti těchto tří míst kladně nabitě aminokyseliny, které by se na interakci s reduktasou mohly podílet. Pokud byly takové AMK zbytky na jiných pozicích nalezeny, byly měřeny vzdálenosti mezi jednotlivými AMK zbytky a porovnány se vzdálenostmi naměřenými pro cytochrom P450 2B4.

4.2. Výsledky

4.2.1. Interakce hem – apoprotein v cytochromech P450 a NO-synthasách

Prvním úkolem v této práci bylo určit distribuci torzních úhlů vinylů jak v pozici 2, tak 4 (rozdíl mezi nimi viz obr. 13 na str. 32) pro vybrané savčí cytochromy P450 i NO-synthasy. Každá čára na následujících obrázcích ukazuje jednu zjištěnou hodnotu torzního úhlu.

Nejprve byly proměřeny torzní úhly vinylů pro cytochrom P450 3A4, který tvoří významné procento ze všech cytochromů P450 přítomných v lidském těle a který se nejčastěji vyskytuje v játrech. Výsledky měření jsou na obr. 14.

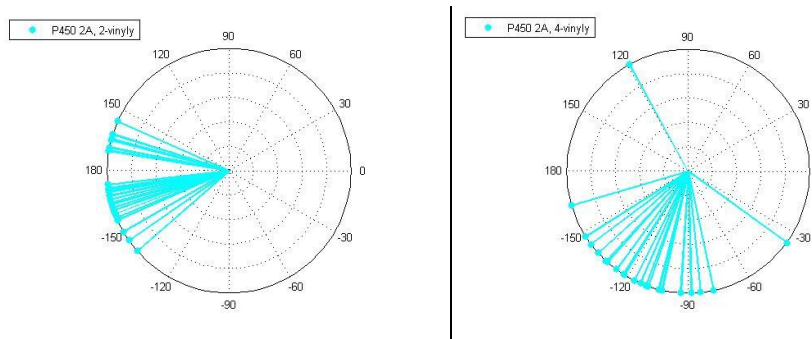


Obr. 14: Hodnoty torzních úhlů pro cytochrom P450 3A4. Vlevo na obrázku 2-vinyly, vpravo 4-vinyly.

Z obr. 14 je patrné, že rozpětí hodnot torzních úhlů pro cytochrom P450 3A4 poměrně široké jak pro vinyly v pozici 2, tak v pozici 4. Pro pozici 2 je výrazněji odchýlena hodnota torzního úhlu 96° (pdb kód 1W0F) a 115° (pdb kód 1W0F), pro pozici 4 zase hodnota -176° (pdb kód 3NXU), nicméně vzhledem k ostatním hodnotám torzních úhlů se nedá říci, že by byla odchylka zvlášť výrazná. Z obr. 14 je ale zřejmé, že hodnoty torzních úhlů pro vinyly v pozici 2 a 4 se výrazně liší.

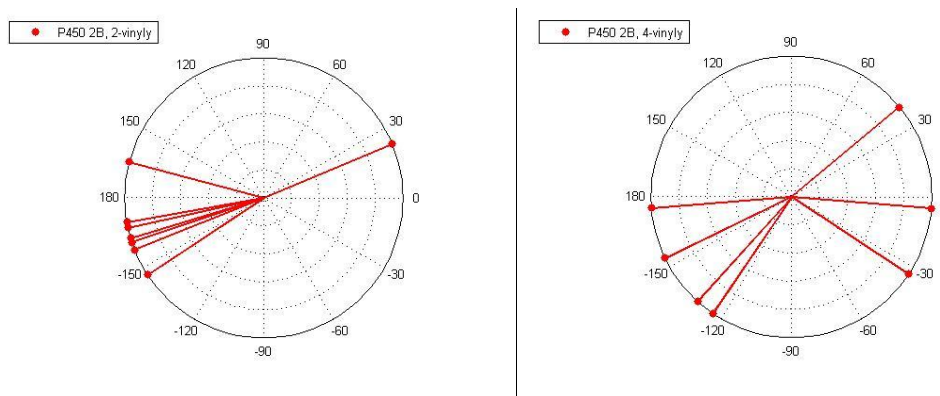
Dalšími zkoumanými cytochromy P450 byla podrodina 2A. Zajímavostí je, že krajní hodnoty torzních úhlů pro vinyly v pozici 2 u této podrodiny patřily stejnému cytochromu P450 2A6, pdb kód 2PG6. Tyto úhly jsou -139° a 156° . Důvodem těchto odchylek je mutace cytochromu P450 2A6, pdb kód 2PG6, a to L240C a N297Q. Tato, dá se říci konformační rigidita pro vinyly-2 už neplatí pro torzní úhly vinylů v pozici 4. Pro ty

byly u této podrodiny charakteristické hodnoty torzních úhlů mezi cca -90° a 150° . Odlehlé hodnoty byly v tomto případě dvě, a to -36° (P450 2A6, pdb kód 3EBS) a 119° (P450 2A13, pdb kód 2P85). Výsledky jsou na obr. 15.



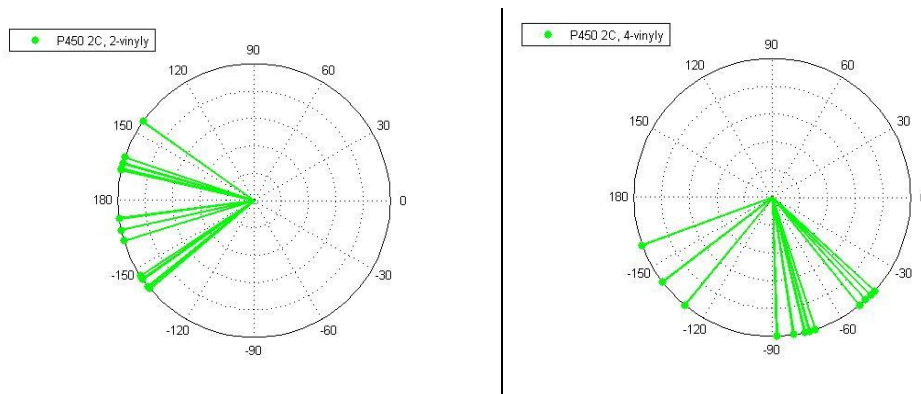
Obr. 15: Hodnoty torzních úhlů pro 2A podrodinu cytochromů P450. Vlevo na obrázku 2-vinyly, vpravo 4-vinyly.

Následující obrázek 16 ukazuje rozložení hodnot torzních úhlů cytochromů P450, podrodiny 2B. Zatímco vinyly v pozici 2 jsou v poměrně úzkém intervalu hodnot a výjimku tvoří jen torzní úhel 23° (P450 2B4, pdb kód 3G5N), hodnoty torzních úhlů pro vinyly v pozici 4 jsou od sebe výrazněji vzdáleny. Nejvíce patrné je to pro hodnotu 40° (P450 2B4, pdb kód 1PO5).



Obr. 16: Hodnoty torzních úhlů pro 2B podrodinu cytochromů P450. Vlevo na obrázku 2-vinyly, vpravo 4-vinyly

Poslední podrodinou, jejíž torzní úhly byly měřeny, byla podrodina 2C. Výsledky jsou na obr. 17, str. 38. Ani v jednom případě se nedá říci, že by se některá z hodnot torzních úhlů (ať už se jedná o vinyly v pozici 2 nebo 4) výrazněji odchylovala.

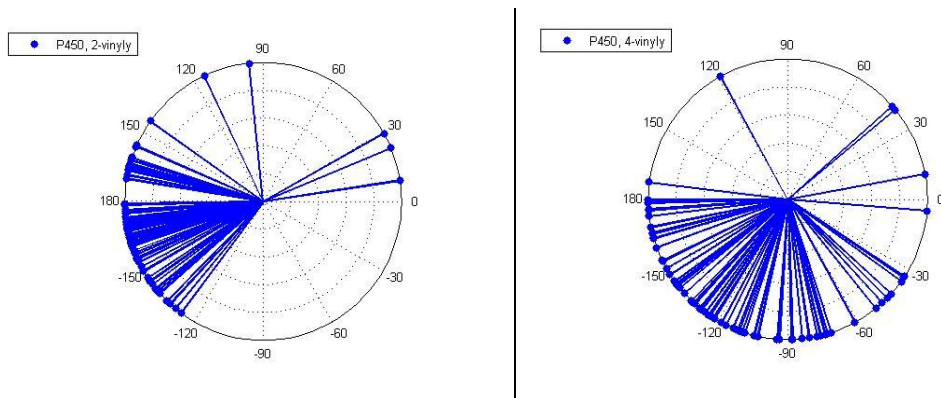


Obr. 17: Hodnoty torzních úhlů pro 2C podrodinu cytochromů P450. Vlevo na obrázku 2-vinyly, vpravo 4-vinyly

Na dalším obrázku 18, str. 39 jsou zobrazeny hodnoty torzních úhlů, které byly naměřeny pro všechny zkoumané savčí cytochromy P450 (jejich seznam viz tab. 2, str. 33). Pro vinyly v pozici 2 byly torzní úhly nalezeny převážně v intervalu od cca -120° do 150° . Ostatní hodnoty se dají považovat za odchylky – jedná se o následující torzní úhly: 9° (P450 2E1, pdb kód 3GPH), 23° (P450 2B4, pdb kód 3G5N), 30° (P450 2E1, pdb kód 3GPH), 96° (P450 3A4, pdb kód 1W0G) a 115° (P450 3A4, pdb kód 1W0F).

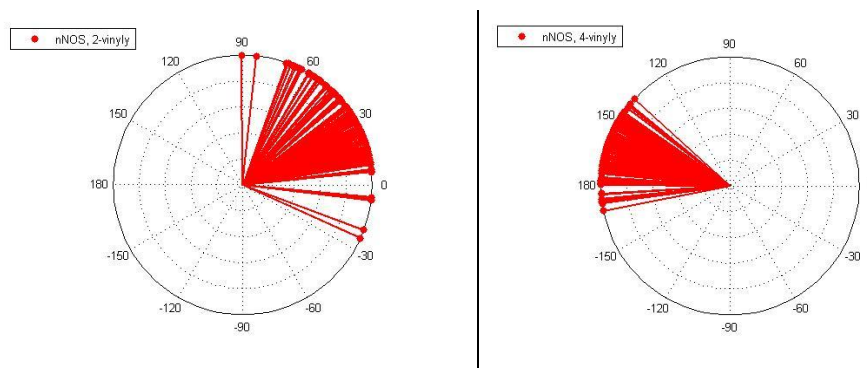
Torzní úhly pro vinyly v pozici 4 se vyskytují převážně v intervalu přibližně od -30° do 180° . Výjimkami jsou tyto torzní úhly: -5° (P450 2B4, pdb kód 3G5N), 10° (P450 7A1, pdb kód 3DAX), 40° (P450 2B4, pdb kód 1PO5), 42° (P450 7A1, pdb kód 3DAX) a 119° (P450 2A13, pdb kód 2P85).

Při porovnání těchto dvou obrázků je jasné, že zatímco hodnoty torzních úhlů pro vinyly v pozici 4 se nacházejí v širším rozmezí a jsou tedy, zdá se, flexibilnější, hodnoty torzních úhlů pro savčí cytochrom P450 jsou (až na odchylky) v rozmezí jednoznačně užším.



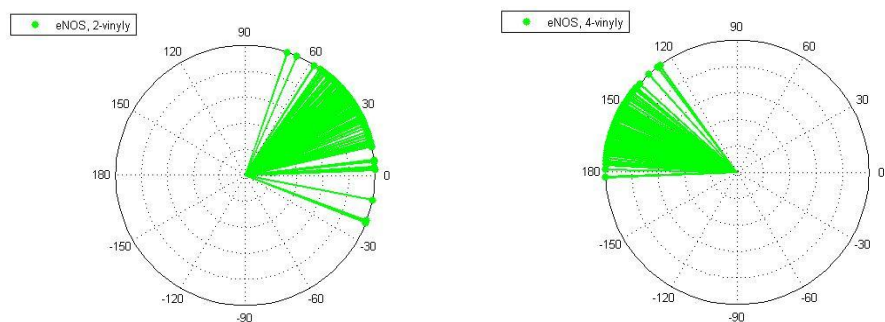
Obr. 18: Hodnoty torzních úhlů pro savčí cytochromy P450. Vlevo na obrázku 2-vinyly, vpravo 4-vinyly.

Kromě cytochromů P450 byly měřeny torzní úhly vinylů i pro další hem-thiolátové proteiny, a to NO-synthasy. První skupinou, u níž byla zjišťována distribuce torzních úhlů, byla skupina neuronálních NO-synthas. Výsledky jsou na obr. 19. Žádná z hodnot se ani u vinylů nijak výrazně neodchyluje.



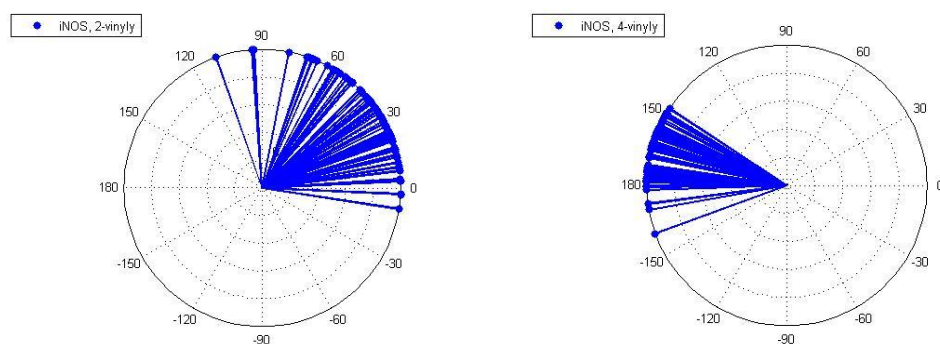
Obr. 19: Hodnoty torzních úhlů pro neuronální NO-synthasy. Vlevo na obrázku 2-vinyly, vpravo 4-vinyly.

Hodnoty torzních úhlů byly měřeny i pro další isoformu NO-synthas (viz obr. 20, str. 40), a sice endotheliální NOS. Stejně jako v přechozím případě se hodnoty torzních úhlů u vinylů v pozici 2 pohybují mezi přibližně -30° a 60° .



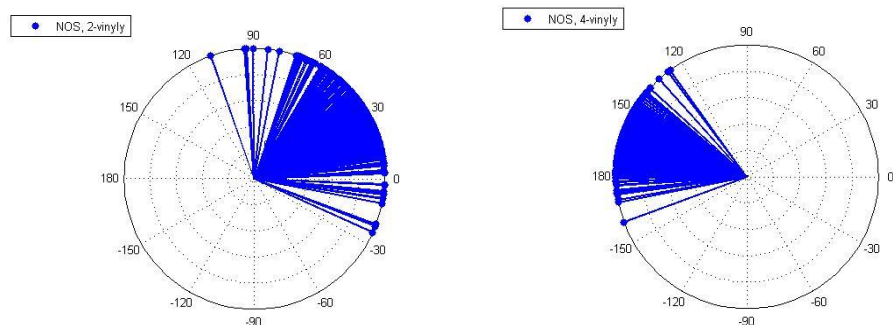
Obr. 20: Hodnoty torzních úhlů pro endotheliální NO-synthasy. Vlevo na obrázku 2-vinyly, vpravo 4-vinyly.

Poslední isoformou, jejíž torzní úhly byly analyzovány, byly NO-synthasy indukibilní (viz obr. 21). Oproti přechozím dvěma isoformám se mírně vychylují hodnoty 109° (pdb kód 1VAF, komplex iNOS s inhibítoem ARR) pro vinyl v pozici 2 a -160° (pdb kód 3NW2, komplex s inhibítoem MPW) pro vinyl v pozici 4.



Obr. 21: Hodnoty torzních úhlů pro indukibilní NO-synthasy. Vlevo na obrázku 2-vinyly, vpravo 4-vinyly.

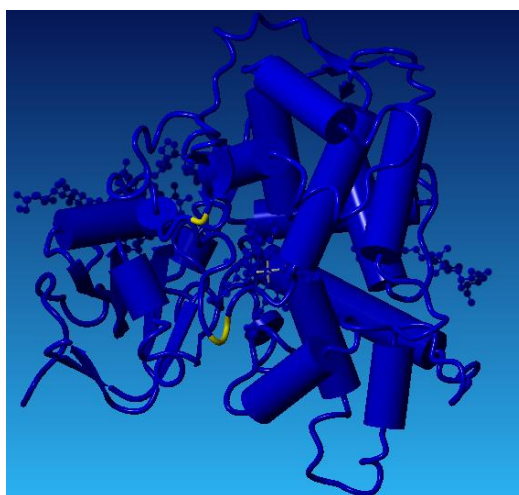
Na následujícím obr. 22, str. 41 jsou potom vidět všechny hodnoty torzních úhlů pro vinyly v pozicích 2 a 4. V pozici 2 se výrazněji odchylují již zmiňované hodnoty 109° (iNOS, pdb kód 1VAF) a -160° (iNOS, pdb kód 3NW2) v pozici 4. Kromě tohoto je zřejmé, že zatímco se hodnoty torzních úhlů u vinyků v pozici 2 soustřeďují do rozmezí hodnot od -30° do 90° , pro torzní úhly v pozici 4 jsou typické hodnoty v rozmezí od -150° do 120° .



Obr. 22: Hodnoty torzních úhlů pro NO-synthasy. Vlevo na obrázku 2-vinily, vpravo 4-vinily.

4.2.2. Interakce cytochrom P450 – cytochrom P450 reduktasa

Druhým úkolem byla nejprve přesná lokalizace tří aminokyselin u cytochromu P450 2B4, které pravděpodobně interagují s cytochrom P450 reduktasou, tedy Arg-422, Lys-433 a Arg-434, které se nacházejí na povrchu cytochromu P450. Na obr. 23 jsou tyto tři aminokyseliny žlutě zvýrazněny:



Obr. 23: Umístění aminokyselinových zbytků Arg-422, Lys-433, Arg-434 (žlutě zvýrazněny) u cytochromu P450 2B4, pdb kód 3KW4.

Dalším krokem bylo změření vzdáleností mezi jednotlivými aminokyselinami pro cytochrom P450 2B4, výsledky jsou v tab. 3, str. 42. To bylo provedeno za pomoci programu Yasara a ověřeno výše uvedeným matematickým vztahem.

Tab. 3: vzdálenosti mezi Arg-422, Lys-433 a Arg-434 u cytochromu P450 2B4. Vzdálenosti mezi AMK jsou udány v Å.

pdb kód	P450	AMK zbytek			[Arg ₄₂₂ ; Lys ₄₃₃]	[Lys ₄₃₃ ; Arg ₄₃₄]	[Arg ₄₂₂ ; Arg ₄₃₄]
		Arg-422	Lys-433	Arg-434			
2BDM	2B4	Arg-422	Lys-433	Arg-434	19,6	3,8	20,3
1SUO	2B4	Arg-422	Lys-433	Arg-434	20,4	3,8	20,8
3G5N	2B4	Arg-422	Lys-433	Arg-434	20,2	3,8	20,6
3KW4	2B4	Arg-422	Lys-433	Arg-434	19,7	3,8	20,2
3MVR	2B4	Arg-422	Lys-433	Arg-434	20,1	3,9	20,5

Nejprve byly podle článku doc. Šulce a kolegů [68] porovnány sekvence cytochromů P450 2B4 a 2B6. Bylo zjištěno, že na vybraných místech (tedy na místech, kde se vyskytují aminokyseliny, které pravděpodobně interagují s reduktasou) jsou si velmi podobné, v cytochromu P450 2B6 jsou na těchto místech přítomny tyto aminokyseliny: Lys-422, Lys-433 a Arg-434. Následně byly pomocí webové stránky Berlínského institutu molekulární biologie a bioinformatiky [67] porovnány sekvence cytochromu P450 2B6 se sekvencemi vybraných savčích cytochromů P450. Následující tabulka 4 na str. 43 dokládá, které aminokyseliny odpovídají Arg-422, Lys-433 a Arg-434 u cytochromům P450 2B4 (tedy Lys-422, Lys-433 a Arg-434 u 2B6). Tyto informace byly následně ověřeny v odpovídajících pdb souborech.

Tab. 4: Přehled aminokyselinových zbytků, které se u vybraných cytochromů P450 vyskytují po porovnání sekvencí na místě Lys-422, Lys-433 a Arg-434 cytochromu P450 2B6 (zvýrazněno zeleně), což podle [68] odpovídá pozicím Lys-422, Lys-433 a Arg-434 pro P450 2B4.

CYP	pdb kódy	AMK zbytky		
1A2	2HI4	Leu - 444	Lys - 455	Arg - 456
1B1	3PM0	Lys - 454	Lys - 467	Arg - 468
2A6	1Z10, 1Z11, 2FDU, 2FDV, 2FDW, 2FDY, 2PG5, 2PG6, 2PG7, 3EBS	Lys - 425	Lys - 436	Arg - 437
2B4	2BDM, 1SUO, 3G5N, 3KW4, 3MVR	Arg - 422	Lys - 433	Arg - 434
2B6	3IBD	Lys - 422	Lys - 433	Arg - 434
2C8	1PQ2, 2NNH, 2NNI, 2NNJ, 2VN0	Lys - 421	Lys - 432	Arg - 433
2C9	1OG2, 1OG5, 1R9O	Lys - 421	Lys - 432	Arg - 433
2E1	3E4E, 3GPH	Tyr - 423	Lys - 434	Arg - 435
3A4	1TQN, 1W0E, 1W0F, 1W0G, 2J0D, 3NXU	Asp - 428	Pro - 439	Arg - 440

V dalším kroku bylo vyhodnoceno, že u P450 1B1, 2A6, 2C8 a 2C9 je velmi pravděpodobné, že s reduktasou budou nejspíše reagovat Lys, Lys a Arg (přesné pozice u jednotlivých P450 viz předchozí tabulka 4).

Domněnka, že budou v tabulce uvedené aminokyseliny cytochromů P450 1B1, 2A6, 2C8 a 2C9 pravděpodobně reagovat s reduktasou, byla dále ověřena změřením vzdálenosti mezi těmito aminokyselinovými zbytky. Výsledky jsou v tab. 5.

Tab. 5: Naměřené vzdálenosti mezi AMK zbytky podezřelými z interakce s cytochrom P450 reduktasou.

Vzdálenosti mezi AMK jsou udány v Å.

pdb kód	P450	AMK zbytek			[Lys ₄₅₄ ; Lys ₄₆₇]	[Lys ₄₆₇ ; Arg ₄₆₈]	[Lys ₄₅₄ ; Arg ₄₆₈]
3PM0	1B1	Lys - 454	Lys - 467	Arg - 468	22,2	3,8	22,4
					[Lys ₄₂₁ ; Lys ₄₃₂]	[Lys ₄₃₂ ; Arg ₄₃₃]	[Lys ₄₂₁ ; Arg ₄₃₃]
1PQ2	2C8	Lys - 421	Lys - 432	Arg - 433	20,2	3,8	20,7
2NNH	2C8	Lys - 421	Lys - 432	Arg - 433	20,2	3,8	20,6
2NNI	2C8	Lys - 421	Lys - 432	Arg - 433	20	3,8	20,5
2NNJ	2C8	Lys - 421	Lys - 432	Arg - 433	20,1	3,8	20,7
2VN0	2C8	Lys - 421	Lys - 432	Arg - 433	20,1	3,8	20,5
1OG2	2C9	Lys - 421	Lys - 432	Arg - 433	20,9	3,9	21,1
1OG5	2C9	Lys - 421	Lys - 432	Arg - 433	21	3,8	21,2
1R9O	2C9	Lys - 421	Lys - 432	Arg - 433	20,5	3,8	20,9
					[Lys ₄₂₅ ; Lys ₄₃₆]	[Lys ₄₃₆ ; Arg ₄₃₇]	[Lys ₄₂₅ ; Arg ₄₃₇]
1Z10	2A6	Lys - 425	Lys - 436	Arg - 437	20,8	3,8	21,6
1Z11	2A6	Lys - 425	Lys - 436	Arg - 437	20,8	3,8	21,6
2FDU	2A6	Lys - 425	Lys - 436	Arg - 437	20,8	3,8	21,5
2FDV	2A6	Lys - 425	Lys - 436	Arg - 437	20,8	3,8	21,5
2FDW	2A6	Lys - 425	Lys - 436	Arg - 437	20,9	3,8	21,7
2FDY	2A6	Lys - 425	Lys - 436	Arg - 437	21,1	3,8	21,8
2PG5	2A6	Lys - 425	Lys - 436	Arg - 437	20,8	3,8	21,6
2PG6	2A6	Lys - 425	Lys - 436	Arg - 437	20,9	3,8	21,8
2PG7	2A6	Lys - 425	Lys - 436	Arg - 437	20,9	3,8	21,7
3EBS	2A6	Lys - 425	Lys - 436	Arg - 437	20,9	3,8	21,7

Dále byly studovány pouze následující cytochromy P450: 1A2, 2E1 a 3A4 a to z toho důvodu, že nebylo zcela jasné, které aminokyseliny by mohly být zapojeny do interakce s cytochrom P450 reduktasou. U P450 3A4 byla situace ještě o něco málo obtížnější, neboť se podle porovnání sekvencí zdálo, že by s reduktasou měla interagovat mimo jiné kyselina asparagová (pozice 428) a prolin (pozice 439), což je značně nepravděpodobné (viz kap. 2.2.3., str. 20).

Pomocí webové stránky Berlínského institutu molekulární biologie a bioinformatiky tedy bylo podrobněji prozkoumáno okolí následujících aminokyselin: Leu-444 u 1A2, Tyr-423 u 2E1 a Asp-428 a Pro-439 u 3A4. V případě, že v okolí byla přítomna bazická aminokyselina, u které by se předpokládala interakce s cytochrom P450 reduktasou, byla změřena její vzdálenost k dalším aminokyselinovým zbytkům.

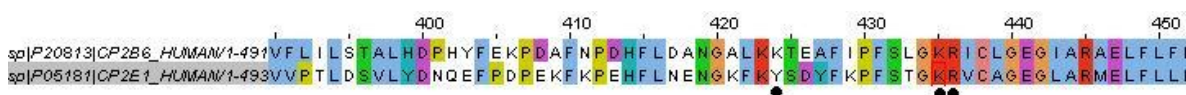
Cytochrom P450 1A2



Obr. 23: Srovnání sekvencí cytochromů P450 1A2 a 2B6. Černé tečky označují Lys-422, Lys-433 a Arg-434 u P450 2B6.

Pro cytochrom P450 1A2 (obr. 23) jsou pravděpodobně za interakci s cytochrom P450 reduktasou odpovědné aminokyselinové zbytky Lys a Arg, které odpovídají Lys-433 a Arg-434 cytochromu P450 2B6. Naopak aminokyselina Lys v pozici 422 pro cytochrom P450 2B6 zde nemá protějšek.

Cytochrom P450 2E1



Obr. 24: Srovnání sekvencí cytochromů P450 2E1 a 2B6. Černé tečky označují Lys-422, Lys-433 a Arg-434 u P450 2B6.

Lys-433 a Arg-434 u cytochromu P450 2B6 po porovnání sekvence s formou 2E1 (obr. 24) odpovídají Lys a Arg pro cytochrom P450 2E1. Naopak tyrosin, který se zdá jako protějšek pro Lys-422 u P450 2B6 se interakce účastnit nebude, za tu by však mohl být zodpovědný Lys-422 (u 2E1)

Cytochrom P450 3A4



Obr. 25: Srovnání sekvencí cytochromů P450 3A4 a 2B6. Černé tečky označují Lys-422, Arg-433 a Arg-434 u P450 2B6.

Méně jasná situace vznikla u cytochromu P450 3A4 (obr. 25). Zatímco je velmi pravděpodobné, že se interakce bude účastnit arginin (který odpovídá Arg-434 u 2B6), tak další aminokyseliny (Asp-428 a Pro-439 odpovídající Lys-422 a Arg-433 u 2B6) nemají vhodné vlastnosti, které jsou třeba k interakci s reduktasou.

Dalším krokem bylo ověření domněnky, že za interakci cytochrom P450 2E1 - cytochrom P450 reduktasa je odpovědný aminokyselinový zbytek Lys-422 – a to změřením vzdálenosti mezi aminokyselinovými zbytky – viz tab. 6.

Tab. 6: Naměřené vzdálenosti mezi AMK zbytky cytochromu P450 2E1 podezřelými z interakce s cytochrom P450 reduktasou. Vzdálenosti mezi AMK jsou udány v Å.

pdb kód	P450	AMK zbytek			[Lys ₄₂₂ ; Lys ₄₃₄]	[Lys ₄₃₄ ; Arg ₄₃₅]	[Lys ₄₂₂ ; Arg ₄₃₅]
3E4E	2E1	Lys-422	Lys-434	Arg-435	25,4	3,8	25,4
3GPH	2E1	Lys-422	Lys-434	Arg-435	25,6	3,8	25,5

Poslední částí této práce byla analýza okolí AMK zbytku Arg-440 u cytochromu P450 3A4 (viz tab. 7). Na základě zjištění, že aminokyselinové zbytky Arg-422 a Lys-433 jsou u cytochromu P450 2B4 vzdáleny od Arg-434 cca 4 Å, resp. 21 Å, bylo analyzováno okolí AMK zbytku Arg-440 u cytochromu 3A4. První tabulka ukazuje nalezené aminokyselinové zbytky, které byly vzdáleny do 4 Å od zbytku Arg-440.

Tab. 7: Bazické aminokyselinové zbytky ve vzdálenosti do 4 Å od Arg-440 u cytochromu P450 3A4.

pdb kód	P450	bazické AMK vzdálené do 4 Å od Arg-440
1TQN	3A4	Arg-105, Arg-130, Arg-375
1W0E	3A4	Arg-105, Arg-130
1W0F	3A4	Arg-105, Arg-375
1W0G	3A4	Arg-105, Arg-375
2J0D	3A4	<u>1.řetězec (A): Arg-105, Arg-130, Arg-375</u> <u>2.řetězec (B): Arg-105, Arg-130, Arg-375</u>
3NXU	3A4	<u>1.řetězec (A): Arg-105, Arg-130, Arg-375</u> <u>2. řetězec (B): Arg-105, Arg-375</u>

Následující tabulka 8 na str. 47 ukazuje nalezené aminokyselinové zbytky, které byly od Arg-440 vzdáleny od 19 do 22 Å.

Tab. 8: Bazické aminokyselinové zbytky ve vzdálenosti 19-22 Å od Arg-440 u cytochromu P450 3A4.

pdb kód	P450	bazické AMK vzdálené od 19 Å do 22 Å od Arg-440
1TQN	3A4	Lys-70, Lys-141, Lys-143, Lys-209, Arg-243, Lys-257, Arg-250, Lys-424, Arg-403, Lys-453,
1W0E	3A4	Lys-70, Lys-143, Lys-173, Lys-209, Arg-243, Arg-250, Lys-257, Arg-403, Lys-424, Lys-453
1W0F	3A4	Lys-70, Lys-141, Lys-143, Lys-173, Lys-209, Arg-243, Arg-250, Lys-257, Arg-403, Lys-453,
1W0G	3A4	Lys-70, Lys-141, Lys-143, Lys-173, Lys-209, Arg-243, Arg-250, Arg-403, Lys-424, Arg-453,
2J0D	3A4	<u>1.řetězec (A):</u> Lys-70, Lys-143, Arg-212, Arg-243, Arg-250, Arg-403, Lys-424, Lys-453 <u>2.řetězec (B):</u> Lys-70, Lys-141, Lys-143, Lys-173, Lys-209, Arg-243, Arg-250, Lys-254, Arg-424, Arg-403, Lys-453
3NXU	3A4	<u>1.řetězec (A):</u> Lys-143, Lys-173, Lys-209, Arg-212, Arg-250, Arg-260, Arg-268, Arg-403, Lys-424, Lys-453 <u>2.řetězec (B):</u> Lys-141, Lys-173, Lys-209, Arg-212, Arg-250, Lys-257, Lys-330, Arg-403, Arg-418

5. Diskuse

V první části této práce byly analyzovány torzní úhly vinylů v pozici 2 a 4 cytochromů P450 a NO-synthas. Již dříve bylo prokázáno, že se torzní úhly mezi jednotlivými cytochromy P450 (ať už se jednalo o torzní úhly vinylů v pozici 2 nebo 4) značně liší a lze tedy říci, že žádný z těchto úhlů není skutečně typický pro cytochromy P450.

Dřívější závěry pro cytochromy P450 uvedené v pracích [57] a [60] byly potvrzeny. Zatímco pro hodnoty torzních úhlů vinylů v pozici 2 bylo typické rozpětí hodnot od -120° do 150° , tedy poměrně úzké rozmezí, u hodnot torzních úhlů vinylů v pozici 4 bylo toto rozmezí širší. Hodnoty se u většiny cytochromů P450 pohybovaly od -30° do 180° . Prokázalo se tedy, že vinyly v pozici 2 jsou konformačně omezenější a vinyly v pozici 4 zase flexibilnější.

U NO-synthas se dokázalo, že vinyly v pozici 2 i 4 jsou konformačně velmi omezené. Velmi jasně to dokazují vinyly v pozici 4, jejichž hodnoty torzních úhlů se vešly do rozmezí -150° až 120° . Hodnoty torzních úhlů vinylů v pozici 2 byly až na výjimky v rozmezí -30° až 90° .

Zásadním rozdílem mezi cytochromy P450 a NO-synthasami je tedy mimo jiné orientace torzních úhlů vinylů, kdy se tyto hodnoty nacházejí v jiných rozmezích.

Pokud tyto hodnoty torzních úhlů porovnáme s hodnotami získanými pro peroxidasy [65], situace je zde velmi odlišná. Zatímco pro peroxidasy je typický širší interval torzních úhlů vinylů v pozici 2 (od 0° do 152°) a užší pro vinyly v pozici 4 (od 110° do 157°), u savčích P450 bylo zjištěno užší rozmezí hodnot torzních úhlů v pozici 2, zatímco vinyly v pozici 4 jsou konformačně méně omezené. NO-synthasy se vyznačovaly poměrně úzkým intervalem hodnot torzních úhlů vinylů v obou pozicích.

Při měření torzních úhlů vinylů-4 pro podrodinu 2A cytochromů P450 (obr. 15, str. 37) se velmi výrazně odchyluje hodnota 119° (cytochrom P450 2A13, pdb kód 2P85). U této struktury s rozlišením $2,35 \text{ \AA}$ je za takovouto odchylku pravděpodobně odpovědný indol, který je ligandem, nebo mutace proteinu V23M, W24A, R25K, Q26K, R27T, K28S a R30K. Další odchylkou je hodnota -36° (cytochrom P450 2A6, pdb kód 3EBS), za tu může být odpovědná buď vazba fenacetinu, který byl zkoumán jako substrát, anebo aminokyselinové mutace I208S, I300F, G301A, S369G

Co se týče podrodiny 2B, torzní úhly vinylů v pozici 2 jsou v poměrně úzkém intervalu hodnot, výjimkou je úhel 23° (cytochrom P450 2B4, pdb kód 3G5N). Tato odchylka je nejspíš způsobena vazbou dvou ligandů na tento cytochrom, a to 5-cyklohexyl-1-pentyl- β -D-maltosid a 1-(bifenyl-4-ylmethyl)-1H-imidazol.

Torzní úhly vinylů v pozicích 2 i 3 pro podrodinu 2C jsou v poměrně úzkém intervalu hodnot, žádná z nich se výrazněji neodchyluje od ostatních.

Při analýze všech dostupných savčích cytochromů P450 bylo zjištěno, že v pozici 2 se odchyľují tyto hodnoty:

- 9° (cytochrom P450 2E1, pdb kód 3GPH), ligand: 10-(1H-imidazol-1-yl)dekanová kyselina
- 23° (cytochrom P450 2B4, pdb kód 3G5N), ligandy: 5-cyklohexyl-1-pentyl- β -D-maltosid a 1-(bifenyl-4-ylmethyl)-1H-imidazol
- 29° (cytochrom P450 2E1, pdb kód 3GPH), ligand: 10-(1H-imidazol-1-yl)dekanová kyselina
- 96° (cytochrom P450 3A4, pdb kód 1W0G), ligand: metyrapon
- 115° (cytochrom P450 3A4, pdb kód 1W0F), ligand: progesteron

U vinylů v pozici 4 se nejvýrazněji odchyľovaly následující hodnoty:

- -5° (cytochrom P450 2B4, pdb kód 3G5N), ligandy: 5-cyklohexyl-1-pentyl- β -D-maltosid a 1-(bifenyl-4-ylmethyl)-1H-imidazol
- 10° (cytochrom P450 7A1, pdb kód 3DAX), ligand: neidentifikovaný
- 40° (cytochrom P450 2B4, pdb kód 1PO5), v tomto případě se pravděpodobně jedná o tzv. otevřenou konformaci
- 42° (cytochrom P450 7A1, pdb kód 3DAX), ligand: neidentifikovaný
- 119° (cytochrom P450 2A13, pdb kód 2P85), ligand: indol

Vzhledem k poměrně vysokému rozlišení všech analyzovaných struktur se dá zjednodušeně říci, že za odchylku od běžných hodnot torzních úhlů je zodpovědný (až na výjimku – P450 2B4, pdb kód 1PO5) vázaný ligand, případně mutace aminokyselin.

Analýza torzních úhlů pro cytochromy P450 tedy ukazuje, že mezi vinyly v pozici 2 a 4 existuje určitý rozdíl. Zatímco vinyly v pozici 2 jsou výrazněji konformačně omezeny, pozice 4 je z pohledu vinylů více flexibilní. Kromě tohoto existuje i jistý rozdíl mezi vinyly v rámci jednotlivých podrodin, tento rozdíl však není nikterak velký – vinyly-2 se v rámci svých podrodin poměrně podobají. Pro vinyly-4 už tento trend tak výrazný není.

Dalším úkolem pro tuto práci bylo analyzovat torzní úhly pro vinylové postranní řetězce pro NO-synthasy. U NO-synthas se ukázalo, že torzní úhly vinylů se pohybují mezi -30° a 90° . Vinyly v pozici 4 jsou v porovnání s těmi v pozici 2 ještě konformačně omezenější – hodnoty torzních úhlů vinylů v pozici 4 se pohybují v rozmezí od -150° do 120° . Zatímco u cytochromů P450 byla u vinylů konformačně flexibilnější pozice 2, u NO-synthas se spíše jedná o pozici 4, nicméně i vinyly v pozici 2 jsou poměrně konformačně omezené.

U vinylů v pozici 2 se žádný z úhlů neodchyluje nijak výrazně, mírně vzdálen od ostatních hodnot je torzní úhel 109° (iNOS, pdb kód 1VAF), kdy se jedná o komplex NO-synthasy s inhibitorem ARR, v pozici 4 se pak od ostatních hodnot mírně vzdaluje torzní úhel -160° (iNOS, pdb kód 3NW2). I v tomto případě je za toto odchýlení pravděpodobně zodpovědná vazba ligandu MPW na tuto inducibilní NO-synthasu.

Druhá část této práce byla věnována interakci cytochromu P450 s cytochrom P450 reduktasou. Jelikož CPR obsahuje poměrně velké množství karboxylových skupin, budou se tyto reaktivní skupiny párovat s bazickými (lysin, arginin) na povrchu reakčního partnera, v tomto případě CYP [35]. V této práci bylo ověřováno tvrzení, že za tuto interakci jsou odpovědné aminokyselinové zbytky Arg-422, Lys-433 a Arg-434 (v případě cytochromu P450 2B4) na povrchu cytochromu P450. U jednotlivých cytochromů P450 bylo zjištěno následující:

- Interakce P450 1A2 s CPR je zprostředkována díky Lys-455 a Arg-456. Arg-422 u P450 2B4 nemá u 1A2 v alignmentu protějšek.

- V interakci P450 1B1 s CPR jsou zapojeny AMK zbytky Lys-454, Lys-467, Arg-468.
- Interakce P450 2A6 s CPR je zprostředkována AMK zbytky Lys-425, Lys-436, Arg-437.
- Za interakci P450 2B4 s CPR jsou odpovědné Arg-422, Lys-433 a Arg-434.
- Lys-422, Lys-433 a Arg-434 se účastní interakce P450 2B6 a CPR.
- Stejně aminokyseliny, avšak s jinými sekvenčními pozicemi, se zapojují do interakce mezi P450 2C8 a CPR. Jsou to Lys-421, Lys-432, Arg-433.
- Tyto aminokyselinové zbytky se stejnými sekvenčními pozicemi se účastní interakce P450 2C9 a CPR. Jde tedy o Lys-421, Lys-432 a Arg-433.
- Interakce mezi P450 2E1 a CPR je s největší pravděpodobností zprostředkována Lys-434 a Arg-435. Tyr-423, který byl po porovnání sekvencí na místě Arg-422 cytochromu P450 2B4, se této interakce rozhodně účastnit nemůže. Bylo ověřeno, že místo tohoto tyrosinu se bude do interakce s největší pravděpodobností zapojovat Lys-422 (u P450 2E1).

Informace výše byly ověřeny dvojím způsobem – po získání těchto jednotlivých AMK zbytků srovnáním sekvencí byla ještě měřena vzdálenost mezi AMK zbytky, přičemž se očekávalo, že tato vzdálenost bude velmi podobná vzdálenostem naměřeným pro P450 2B4. Tato domněnka se nakonec potvrdila.

Kromě tohoto bylo díky měření vzdáleností zjištěno, že tyto tři aminokyselinové zbytky spolu tvoří přibližně rovnoramenný trojúhelník, přičemž vzdálenost dvou ramen je 19-22 Å, třetí strana měří zhruba 3-4 Å. Toto zjištění bylo dále využito pro vyhodnocení interakce cytochromu P450 3A4 s cytochrom P450 reduktasou.

Pro již zmíněný cytochrom P450 3A4 je situace problematictější. Za jeho interakci s cytochrom P450 je nejspíš zodpovědný Arg-440, který odpovídá Arg-434 u cytochromu P450 2B4. Arg-422 odpovídal Asp-428, Lys-433 pak Pro-439. Kyselina asparagová ani prolin se nemohou interakce s reduktasou účastnit, neboť nejsou bazickými aminokyselinami.

Na základě předchozích zjištění je však velmi nepravděpodobné, že by se interakce účastnil pouze aminokyselinový zbytek Arg-440 – u ostatních zkoumaných cytochromů

P450 se výměny elektronu s reduktasou nejspíše účastní ještě další AMK zbytky, které odpovídají Arg-422 a Lys-433 u P450 2B4. Na základě předchozích výsledků, kdy byly měřeny vzdálenosti mezi třemi zkoumanými aminokyselinovými zbytky, byly tedy vytipovány další bazické AMK zbytky, které by za interakci mohly být odpovědné. Vzdálenosti 3-4 Å od Arg-440 u P450 3A4 odpovídají Arg-105, Arg-130 a Arg-375. O těchto aminokyselinových zbytcích bylo zjištěno následující:

- Arg-105 (P450 3A4) odpovídá Lys-100 (P450 2B4). Je velmi nepravděpodobné, že by se tento AMK zbytek účastnil interakce s cytochrom P450 reduktasou, nebyl nalezen žádný článek, ve kterém by tato domněnka byla vyslovena.
- Arg-130 (P450 3A4) odpovídá Arg-125 (P450 2B4). Aminokyselinový zbytek Arg-125 u cytochrom P450 2B4 se může účastnit interakce s reakčním partnerem cytochromu P450, avšak tímto partnerem není cytochrom P450 reduktasa, ale cytochrom b_5 [69], [70].
- Arg-375 (P450 3A4) odpovídá His-369 (P450 2B4). Tento aminokyselinový zbytek se pravděpodobně interakce s cytochrom P450 reduktasou účastnit nebude, nejedná se o silně bazickou aminokyselinu.

U zjišťování, která z bazických AMK by mohla být protějškem Arg-422 u P450 2B4, už byla situace obtížnější – a to protože tato aminokyselina byla od Arg-440 vzdálena 19-22 Å. Seznam všech aminokyselinových zbytků, které by se mohly účastnit interakce s cytochrom P450 reduktasou, je v tabulce 8 na str. 53:

Tab. 8: Bazické aminokyselinové zbytky ve vzdálenosti 19-22 Å od Arg-440 u cytochromu P450 3A4.

pdb kód	P450	bazické AMK vzdálené od 19 Å do 22 Å od Arg-440
1TQN	3A4	Lys-70, Lys-141, Lys-143, Lys-209, Arg-243, Lys-257, Arg-250, Lys-424, Arg-403, Lys-453,
1W0E	3A4	Lys-70, Lys-143, Lys-173, Lys-209, Arg-243, Arg-250, Lys-257, Arg-403, Lys-424, Lys-453
1W0F	3A4	Lys-70, Lys-141, Lys-143, Lys-173, Lys-209, Arg-243, Arg-250, Lys-257, Arg-403, Lys-453,
1W0G	3A4	Lys-70, Lys-141, Lys-143, Lys-173, Lys-209, Arg-243, Arg-250, Arg-403, Lys-424, Arg-453,
2J0D	3A4	<u>1.řetězec (A):</u> Lys-70, Lys-143, Arg-212, Arg-243, Arg-250, Arg-403, Lys-424, Lys-453 <u>2.řetězec (B):</u> Lys-70, Lys-141, Lys-143, Lys-173, Lys-209, Arg-243, Arg-250, Lys-254, Arg-424, Arg-403, Lys-453
3NXU	3A4	<u>1.řetězec (A):</u> Lys-143, Lys-173, Lys-209, Arg-212, Arg-250, Arg-260, Arg-268, Arg-403, Lys-424, Lys-453 <u>2.řetězec (B):</u> Lys-141, Lys-173, Lys-209, Arg-212, Arg-250, Lys-257, Lys-330, Arg-403, Arg-418

6. Závěr

Výsledky analýzy torzních úhlů vinylů v pozici 2 a 4 cytochromů P450 potvrdily, že vinylové postranní řetězce jsou zapojeny do interakce hem-protein. Pro torzní úhly vinylů savčích cytochromů P450 v pozici 2 bylo až na výjimky typické rozmezí hodnot od -120° do 150° . Pro vinyly v pozici 4 byly hodnoty torzních úhlů až na výjimky soustředěny do rozmezí od -30° do 180° .

V případě NO-synthas se hodnoty torzních úhlů vinylů v pozici 2 pohybovaly v rozmezí hodnot od -30° do 90° . Pro vinyly v pozici 4 bylo typické rozmezí hodnot torzních úhlů ještě užší. Tyto hodnoty se pohybovaly od -150° do 120° .

Je tedy patrné, že zatímco u cytochromů P450 byly torzní úhly vinylů v pozici 2 konformačně značně omezenější, v pozici 4 pak flexibilnější. NO-synthasy vykazovaly hodnoty torzních úhlů ve velmi úzkých intervalech pro vinyly v obou pozicích, možné orientace vinylů jsou tedy značně omezeny.

Druhá část práce se zabývala interakcemi mezi cytochromem P450 a cytochrom P450 reduktasou. Ve většině případů jsou do této interakce zapojeny tři aminokyseliny – buď dva lysiny a arginin, nebo dva argininy a lysin. U cytochromu P450 3A4 nebylo zpočátku jasné, které tři aminokyseliny jsou do interakce s cytochrom P450 reduktasou zapojeny. Zjistilo se, že se jí s velkou pravděpodobností účastní Arg-440. Další aminokyselinové zbytky, které za tuto interakci mohou být odpovědné, jsou uvedeny v souhrnných tabulkách v předchozím textu.

Seznam použité literatury

- [1] Knejzlík, Z.; Káš, J.; Ruml, T.: Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace; Chem. Listy **94**, 913-918, 2000.
- [2] Stiborová, M.; Hudeček, J.; Páca, J.: Enzymové systémy biotransformující fenolické látky; Bul.l Čs. Spol. Biochem. Mol. Biol. **28**, 57, 2000.
- [3] Stiborová, M.: Xenobiochemie, přednáška na PřF UK, katedra biochemie (2010)
- [4] Stiborová, M.; Hudeček, J.; Hodek, P.; Frei, E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví; Chem. listy **93**, 229-237, 1999.
- [5]
http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2011/MB_cgi?mode=&term=Mixed+Function+Oxygenases&field=entry#TreeD08.811.682.690.708 k 22.7.2011
- [6] Sheweita, S. A.: Drug-metabolizing enzymes: Mechanisms and functions; Curr. Drug Metab. **1**, 107-132, 2000.
- [7] WWW stránky Matta Traylor, University of California, Berkeley dostupné z <http://www.cchem.berkeley.edu/clarkgrp/GroupMembersPages/AlumniPages/MattTraylor.html> k 14.7.2012
- [8] BRENDA – enzyme database dostupné z <http://www.brenda-enzymes.info/> k 20.7.2012
- [9] Lewis, D. F. V.: Cytochromes P450 – Structure, function and mechanism. Taylor & Francis Ltd., 1996.
- [10] Garfinkel, D.: Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions; Arch. Biochem. Biophys. **77**, 493-509, 1958.
- [11] Klingenberg, M.: Pigment of rat liver microsomes; Arch. Biochem. Biophys. **75**, 376-386, 1958.
- [12] Omura, T.; Sato, R.: A new cytochrome in Liver Microsome; J. Biol. Chem. **237**, 1375-1376, 1962.
- [13] Groves, J. T.: Models and Mechanisms of Cytochrome P450 Action v knize Cytochrome P450, Structure, Mechanism and Biochemistry, Third edition (P. R. Ortiz de Montellano, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005)
- [14] WWW stránky zaměřené na nomenklaturu enzymů dostupné z <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> k 28.7.2012

- [15] Metalloprotein Database and Browser dostupné z <http://metallo.scripps.edu/> k 19.7.2011
- [16] Poulos, T. L., Finzel B. C., Howard, A. J.: High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam; *J. Mol. Biol.* **195**, 687-700, 1987.
- [17] Ravichandran, K. G.; Boddupalli, S. S.; Hasermann, C. A.; Peterson, J. A.; Diesenhofer, J.: Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's; *Science* **261**, 731-736, 1993.
- [18] Scherlis, D.A, Martí, M.A., Ordejón, P., Estrin, D.A.: Environment effects on chemical reactivity of heme proteins; *Int. J. Quantum Chem.* **90**, 1505 – 1514, 2002.
- [19] Anzenbacher, P., Dawson, J. H., Kitagawa, T.: Towards a unified concept of oxygen activation by heme enzymes: the role of the proximal ligand; *J. Mol. Struct.* **274**, 149-158, 1989.
- [20] Anzenbacher, P., Hudeček, J., Stiborová, M., Larroque, C., Lange, R., Heibel, G., Hildebrandt, P. v knize *Cytochrome P450. Biochemistry and biophysics.* (Archakov, A. I., Bachmanova, G. I.), INCO-TNC, Moskva, 1992.
- [21] Hudeček, J., Baumruk, V., Anzenbacher, P., Munro, A. W.: Catalytically self-sufficient P450 CYP102 (Cytochrome P450 BM-3): Resonance Raman spectral characterization of the heme domain and of the holoenzyme; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 811-815, 1998.
- [22] Stiborová, M.; Hudeček, J.; Páca, J. Jr.; Martínek, V.; Páca, J.: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí; *Chem. Listy* **98**, 876-890, 2004.
- [23] Rowland, P.; Blaney, F. E.; Smyth, M. G.; Jones, J. J.; Leydon, V. R.; Oxbrow, A. K.; Lewis, C. J.; Tennant, M. G.; Modi, S.; Eggleston, D. S.; Chenery, R. J.; Bridges, A. M.: Crystal structure of human cytochrome P450 2D6; *J. Biol. Chem.* **281**, 7614-7622, 2006.
- [24] Poulos, T. L.; Johnson, E. F.: Structures of Cytochrome P450 Enzymes v knize *Cytochrome P450, Structure, Mechanism and Biochemistry*, Third edition (P. R. Ortiz de Montellano, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005)
- [25] Nelson, D. R.: Cytochrome P450 Nomenclature v knize *Cytochrome P450 Protocols: Second Edition* (Phillips, I. R.; Shephard, E. A.; Humana Press Inc., 2004)
- [26] Guengerich, F. P.: Human Cytochrome P450 Enzymes v knize *Cytochrome P450, Structure, Mechanism and Biochemistry*, Third edition (P. R. Ortiz de Montellano, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005)

- [27] Hannemann, F.; Bichet, A.; Ewen, K. M.; Bernhardt, R.: Cytochrome P450 systems – biological variation of elektron transport chaos; *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 330-344, 2007.
- [28] Shimizu, H.; Park, S. – Y.; Lee, D. – S.; Shoun, H.; Shiro, Y.: Crystal structures of cytochrome P450nor and its mutants (Ser286 → Val, Thr) in the ferric resting state at cryogenic temperature: a comparative analysis with monooxygenase cytochrome P450s; *J. Inorg. Biochem.* **81**, 191-205, 2000.
- [29] Laursen, T.; Jensen, K.; Møller, B. L.: Conformational changes of the NADPH-dependent cytochrome P450 reductase in the course of electron transfer to cytochromes P450; *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 132-138, 2011.
- [30] Guengerich, F. P.: Reduction of cytochrome b5 by NADPH-cytochrome P450 reductase; *Arch. Biochem. Biophys.* **440**, 204–211, 2005.
- [31] Paine, M. J. I.; Scrutton, N. S.; Munro, A. W.; Gutierrez, A.; Roberts, G. C. K.; Wolf, C. R.: Electron transfer partners of cytochrome P450 v knize Cytochrome P450, Structure, Mechanism and Biochemistry, Third edition (P. R. Ortiz de Montellano, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005)
- [32] Hamdane, D.; Xia, Ch.; Im, S.–C.; Zhang, H.; Kim, J.-J. P.; Waskell, L.: Structure and fiction of an NADPH-Cytochrome P450 oxidoreductase in an open conformation capable of reducing cytochrome P450; *J. Biol. Chem.* **284**, 11374-11384, 2009.
- [33] Poulos, T. L.; Raman, C. S.; Li, H.: NO news is good news; *Structure* **6**, 255-258, 1998.
- [34] Im, S. – C.; Waskell, L.: The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b₅; *Arch. Biochem. Biophys.* **507**, 144-153, 2011.
- [35] Nadler, S.G.; Strobel, H.W.: Role of electrostatic interactions in the reaction of NADHP-cytochrome P450 reductase with cytochromes P450; *Arch. Biochem. Biophys.* **261**, 418-429, 1988.
- [36] Nisimoto, Y.: Localization of cytochrome c-binding domain on NADPH-cytochrome P-450 reductase; *J. Biol. Chem.* **261**, 14232-14239, 1986.
- [37] Hasemann, C. A.; Kurumbail, R. G.; Boddupalli, S. S.; Peterson, J. A.; Deisenhofer, J.: Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures; *Structure* **3**, 41-62, 1995.

- [38] WWW stránky Todda D. Portera, Ph.D. dostupné z <http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/> k 17.7.2012
- [39] Nadler, S. G.; Strobel, H. W.: Identification and characterization of an NADPH-cytochrome P450 reductase derived peptide involved in binding to cytochrome P450; Arch. Biochem. Biophys. **290**, 277-284, 1991.
- [40] Shimizu, T.; Tateishi, T.; Hatano, M.; Fujii-Kuriyama, Y.: Probing the Role of Lysines and Arginines in the Catalytic Function of Cytochrome P450 by Site-directed Mutagenesis; J. Biol. Chem. **266**, 3372-3375, 1991.
- [41] Shen, S.; Strobel, H. W.: The role of cytochrome P450 lysine residues in the interaction between cytochrome P450IA1 and NADPH-cytochrome P450 reductase; Arch. Biochem. Biophys. **294**, 83-90, 1992.
- [42] Shen, S.; Strobel, H. W.: Role of lysine and arginine residues of cytochrome P450 in the interaction between cytochrome P4502B1 and NADPH-cytochrome P450 reductase; Arch. Biochem. Biophys. **304**, 257-265, 1993.
- [43] Bridges, A.; Gruenke, L.; Chang, Y. – T.; Vakser, I. A.; Loew, G.; Waskell, L.: Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase; J. Biol. Chem. **273**, 17036-17049, 1998.
- [44] Enoch, H. G.; Strittmatter, P.: Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase; J. Biol. Chem. **254**, 8976-8981, 1979.
- [45] Sanborn, R. C.; Williams, C. M.: The cytochrome system in the *Cecropia* silkworm, with special reference to the properties of a new component; J. Gen. Physiol. **33**, 579-588, 1950.
- [46] Hildebrandt, A.; Estabrook, R.W.: Evidence for the participation of cytochrome b5 in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions; Arch. Biochem. Biophys. **143**, 66-79, 1971.
- [47] Yamazaki, H.; Nakamura, M.; Komatsu, T.; Ohyama, K.; Hatanaka, N.; Asahi, S. et al: Roles of NADPH-P450 reductase and apo- and holo-cytochrome b5 on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of *Escherichia coli*; Protein Expr. Purif. **24**, 329-337, 2002.
- [48] Zhang, H.; Myshkin, E.; Waskell, L.: Role of cytochrome b5 in catalysis by cytochrome P450 2B4; Biochem. Biophys. Res. Commun. **338**, 499-506, 338.
- [49] Poulos, T.L.: Structural biology of hem monooxygenases; Bioch. And Bioph. Res. Comm. **338**, 337 - 345, 2005.

- [50] WWW stránky Prof. RNDr. Václava Hampla, DrSc, dostupné z <http://physiology.lf2.cuni.cz/hampl/> k 13.7.2012
- [51] Moncada, S.; Higgs, E. A.: The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology; *Br. J. Pharmacol.* **147**, S193-S201, 2006.
- [52] Feng, Ch.: Mechanism of nitric oxide synthase regulation: Electron transfer and interdomain interactions; *Coordin. Chem. Rev.* **256**, 393-411, 2012.
- [53] Sasaki, M.; Gonzales-Zulueta, M.; Huang, H.; Herring, W. J.; Ahn, S.; Ginty, D. D.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M.: Dynamic regulation of neuronal NO synthase transcription by calcium influx through a CREB family transcription factor-dependent mechanism; *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* **97**, 8617-8622, 2000.
- [54] Nakata, S.; Tsutsui, M.; Shimokawa, H.; Tamura, M.; Tasaki, H.; Morishita, T.; Suda, O.; Ueno, S.; Toyohira Y.; Nakashima, Y.; Yanagihara, N.: Vascular neuronal NO synthase is selectively upregulated by platelet-derived growth factor: Involvement of the MEK/ERK pathway; *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2502-2508, 2005.
- [55] Colonna, S.; Gaggero, N.; Richelmi, C.; Pasta, P.: Recent biotechnological developments in the use of peroxidases; *Trends Biotechnol.* **17**, 163-168, 1999.
- [56] van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A.: Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspect; *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 554-564, 2000.
- [57] Hudeček, J.; Hodek, P.; Anzenbacherová, E.; Anzenbacher, P.: Structural analysis of cytochromes P450 shows differences in flexibility of heme 2- and 4-vinyls; *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 413-419, 2007.
- [58] ExPASy enzyme database dostupné z <http://enzyme.expasy.org/> k 14.7.2012
- [59] Shelnut, J. A.; Song X. – Z.; Ma, J. – G.; Jia, S. – L.; Jentzen, W.; Medforth, C. J.: Nonplanar porphyrins and their significance in proteins; *Chem. Soc. Rev.* **27**, 31-41, 1998.
- [60] Majerová, K.: Interakce hem-proteiny v cytochromech P450, diplomová práce, 2010.
- [61] Lee, K. B.; Jun, E.; La Mar, G. N.; Rezzano, I.; Pandey, R. K.; Smith K. M.; Walker, F. A.; Buttlare, D. H.: Influence of heme vinyl- and carboxylate-protein contacts on structure and redox properties of bovine cytochrome b₅; *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 3576-3583, 1991.
- [62] Funk, W. D.; Lo, T. P.; Mauk M. R.; Brayer, G. D.; MacGillivray, T. A.; Mauk, A. G.: Mutagenic, electrochemical, and crystallographic investigation of the cytochrome b₅

oxidation-reduction equilibrium: involvement of asparagine-57, serine-64 and heme propionate-7; *Biochemistry* **29**, 5500-5508, 1990.

[63] Anzenbacher, P., Šípál, Z.; Hudeček, J.: On the redox potential of cytochrome P-450; *Stud. Biophys.* **73**, 147-148, 1978.

[64] Guallar, V.; Olsen, B: The role of the heme propionates in heme biochemistry; *J. Inorg. Biochem.* **100**, 755-760, 2006.

[65] Marzocchi, M. P.; Smulevich, G.: Relationship between heme vinyl conformation and the protein matrix in peroxidases; *J. Raman Spectrosc.* **34**, 725-736, 2003.

[66] Databáze Protein Data Bank, dostupná z <http://www.rcsb.org/pdb> k 14.7.2012

[67] Databáze cytochromů P450 dostupná z <http://bioinformatics.charite.de/supercyp/> k 16.6.2012

[68] Šulc, M.; Pavlásková, K.; Ječmen, T.; Novák, P.; Hodek, O; Hudeček, J.: The chemical cross-linking and mass spectrometry – promising method for the mapping of interaction between membráně proteins (cytochrome b5 and P450 2B4); připraveno k publikaci.

[69] Omata, Y.; Sakamoto, H.; Robinson, R. C., Pincus, M. R.; Friedman, F. K: Interaction between Cytochrome P-450 2B1 and Cytochrome b5 – inhibition by synthetic peptides indicates a role for P450 residues Lys-122 and Arg-125; *Biochem. Biophys. Res. Co.* **201**, 1090-1095, 1994.

[70] Omata, T.; Robinson, R. C.; Gelbon, H. V.; Pincus, M. R.; Friedman, F. K.: Specificity of the Cytochrome P-450 interaction with Cytochrom b5; *Febs. Lett.* **346**, 241-245, 1994.

[71] Krieger E: Yasara, verze 11.9.18.; *Proteins* **47**, 393-402, 1993-2011.

Příloha č.1

Skript pro tvorbu grafů pro vyhodnocení hodnot torzních úhlů.

```
lineColor = ['- ',barva];
dotColor = ['. ',barva];

for i = 1:length(deg_input)
if deg_input(i) < 0
deg_input(i) = 360 + deg_input(i);
else
deg_input(i) = deg_input(i);
end
end
rad_input = (pi/180) .*deg_input;
figure(1),set(0,'ShowHiddenHandles','on');

for i=1:length(rad_input)

l = polar([rad_input(i) rad_input(i)],[0 1],lineColor);
set(l,'LineWidth',2)

hold on;

h = polar(rad_input(i),1,dotColor);

set(h,'MarkerSize',20);
end
legend(h,{legenda});

b = findobj(gcf,'string','210')
set(b,'string','-150')
b = findobj(gcf,'string','240')
set(b,'string','-120')
b = findobj(gcf,'string','270')
set(b,'string','-90')
b = findobj(gcf,'string','300')
set(b,'string','-60')
b = findobj(gcf,'string','330')
set(b,'string','-30')

b2 = copyobj(b,gcf);
set(b2,'Position',[50 50])
```