

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Bc. Martin Culka

Modelování interakcí cytochromů P450 s flavodoxinem
Interaction of Cytochromes P450 with Flavodoxin: a theoretical study

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Václava Martínka, Ph.D., a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne _____

Bc. Martin Culka

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za odborné vedení a ochotu k diskusi během celého procesu vypracovávání této diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Petru Jeřábkovi, Ph.D. za poskytnutí parametrů silového pole a vzorových konfiguračních souborů a také za cenné rady během zadávání a vyhodnocování simulací. Můj dík patří také MetaCentru a CERIT-SC za zpřístupnění výpočetní kapacity v rámci programů LM2010005 a 1.05/3.2.00/08.0144.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své přítelkyni za podporu a pochopení během vypracovávání této práce a svým rodičům za morální a finanční zázemí během celého studia na vysoké škole.

Abstrakt

Cytochromy P450 jsou různorodá skupina hemových enzymů vyskytujících se u většiny organismů na Zemi. U lidí zasahují např. do metabolismu cizorodých látek, bakterie jsou schopné díky nim metabolizovat různé hydrofobní substráty. Obecnou reakcí katalyzovanou cytochromy P450 je monooxygenace, tedy vnesení jednoho atomu z molekuly kyslíku do substrátu a redukce druhého za vzniku vody. Pro redukci kyslíku je třeba dodávat elektrony, jako donor elektronů u eukaryot obvykle slouží NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa či cytochrom b_5 , u bakterií však donorem elektronů bývají malé FeS proteiny a flavoproteiny. Již dříve bylo ukázáno, že bakteriální donor elektronů flavodoxin je schopen dodávat elektrony některým lidským cytochromům P450 *in vitro*.

V této práci jsem se snažil ověřit hypotézu, že flavodoxin je zodpovědný za redukci vybraných lidských (1A2, 2A6, 2A13, 2C9, 2C19, 3A4) a bakteriálních (101A1 a 176A1) cytochromů P450 heterologně exprimovaných v buňkách *Escherichia coli*. Ke studiu byly použity techniky molekulového modelování.

Byla navržena sada možných orientací komplexu jednotlivých cytochromů P450 s flavodoxinem metodou řízeného „docking“ a následně byla ověřena stabilita těchto komplexů řízenou disociací. Byly vybrány nejstabilnější orientace pro každý cytochrom P450, ty byly dále optimalizovány molekulovou dynamikou, přičemž byla sledována vzdálenost redoxních center (hemu a FMN). Práce vynaložená na řízenou disociaci a vzdálenost redoxních center v optimalizovaných nejstabilnějších komplexech byly následně korelovány s publikovaným procentem redukovaného cytochromu P450 stanoveném v bakteriích *in vivo*.

Bylo zjištěno, že pro lidské cytochromy P450 vstupní hypotéza platí a flavodoxin je pravděpodobně zodpovědný za jejich redukci v *Escherichia coli*, zatímco u bakteriálních cytochromů P450 se hypotéza nepotvrdila.

Klíčová slova: cytochromy P450, flavodoxin, protein-protein interakce, počítačové modelování, docking, molekulová dynamika

Abstract

Cytochromes P450 are diverse group of heme enzymes found in most species on Earth. In humans they are involved in metabolism of foreign compounds or steroids, bacteria employ cytochromes P450 for utilization of various hydrophobic substrates. General reaction catalyzed by cytochromes P450 is monooxygenation, when one atom of oxygen molecule is introduced into the substrate, while the other is reduced producing water. NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase or cytochrome b_5 usually serves as an electron donor providing electrons needed for activation of oxygen in eukaryotic organisms, in bacteria small FeS proteins or flavoproteins are these electron donors. It was shown earlier that bacterial electron donor flavodoxin could also interact with human cytochromes P450 *in vitro*.

This thesis employs molecular modeling techniques to support a hypothesis that flavodoxin is responsible for reduction of human (1A2, 2A6, 2A13, 2C9, 2C19, 3A4) and bacterial (101A1 a 176A1) cytochromes P450 heterologously expressed in *Escherichia coli*.

An initial guess of possible mutual orientations of cytochrome P450 and flavodoxin was predicted using information-driven protein-protein docking. The stability of these complexes was examined by directed dissociation method. The most stable orientation for each cytochrome P450 was further optimized using molecular dynamics and the distance between redox centers (heme and FMN) was monitored. Two sets of calculated parameters (i) the work done by the external force driving the directed dissociation of protein-protein complex and (ii) the distance between redox centers in optimized complex were correlated with percentage content of reduced cytochrome P450 measured in bacteria *in vivo*.

It was found that for human cytochromes P450 the input hypothesis was correct and flavodoxin is probably responsible for their reduction in *Escherichia coli*, while in case of studied bacterial cytochromes P450 the hypothesis was not confirmed. (In Czech)

Keywords: cytochromes P450, flavodoxin, protein-protein interactions, computer-aided modeling, docking, molecular dynamics

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Cytochromy P450	2
1.1.1	Nomenklatura cytochromů P450	3
1.1.2	Struktura cytochromů P450	3
1.1.3	Reakční mechanismus cytochromu P450	5
1.1.4	Redoxní partneři cytochromu P450	7
1.2	Bakteriální cytochromy P450	9
1.2.1	Cytochrom P450 101A1	10
1.2.2	Cytochrom P450 176A1	10
1.3	Lidské cytochromy P450	11
1.3.1	Cytochrom P450 1A2	12
1.3.2	Cytochrom P450 2A6	13
1.3.3	Cytochrom P450 2A13	14
1.3.4	Cytochrom P450 2C9	14
1.3.5	Cytochrom P450 2C19	15
1.3.6	Cytochrom P450 3A4	15
1.4	Flavodoxiny	16
1.4.1	Výskyt a funkce flavodoxinů	16
1.4.2	Sekvence a struktura flavodoxinů	17
1.4.3	Flavodoxin jako součást redoxních systémů v <i>Escherichia coli</i>	18
1.4.4	Flavodoxin a cytochromy P450	19
1.5	Molekulové modelování	20
1.5.1	Kvantová mechanika a molekulová mechanika	20
1.5.2	Modely rozpouštědla	22
1.5.3	Energetická minimalizace struktury	23
1.5.4	Molekulová dynamika	24
1.5.5	Řízená molekulová dynamika	25
1.5.6	Simulace interakce biomolekul s ligandy a mezi sebou	25
2	Cíle práce	27

3	Metody	28
3.1	Použité programy	28
3.2	Počáteční struktury proteinů	28
3.3	Homologní modelování struktur proteinů	29
3.4	Návrh proteinových komplexů technikou flexibilního „docking“	29
3.5	Silové pole pro MM	30
3.6	Molekulová dynamika v explicitním rozpouštědle	30
3.7	Molekulová dynamika v implicitním rozpouštědle	31
3.8	MD se změnou rozpouštědla – optimalizace homologních modelů	32
3.9	Řízená molekulová dynamika	32
3.10	Korelační analýza	33
3.11	Výpočet a vizualizace elektrostatického potenciálu	34
4	Výsledky	35
4.1	Experimentální data	35
4.2	Návrh komplexů cytochrom P450 – flavodoxin	35
4.3	Řízená disociace komplexů pomocí SMD	37
4.4	Stabilita komplexů během MD v explicitním rozpouštědle	42
4.5	Struktury nejstabilnějších komplexů	45
4.6	Mapy elektrostatického potenciálu	47
5	Diskuse	52
6	Závěr	58
7	Seznam použité literatury	60

Seznam zkratek

Å Ångström = 10^{-10} m

Adx adrenodoxin

Cdx cindoxin

C. braakii *Citrobacter braakii*

CPR NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa

CYP Cytochrom P450

DNA deoxyribonukleová kyselina

E.coli *Escherichia coli*

ER endoplasmatické retikulum

FAD flavinadenindinukleotid

FdR ferredoxin(flavodoxin):NADP⁺ oxidoreduktasa

Fdx ferredoxin

Fld flavodoxin

FMN flavinmononukleotid

MD molekulová dynamika

MFO Mixed Function Oxidase – oxidasa se smíšenou funkcí

MM molekulová mechanika

NAD(P)H nikotinamiddinukleotid (fosfát)

NNK 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon

P. putida *Pseudomonas putida*

PDB Proteinová databanka (www.pdb.org)

PdR putidaredoxin reduktasa

Pdx putidaredoxin

QM kvantová mechanika

RMSD angl. „root mean square deviation“, odmocnina střední kvadratické odchylky

SMD steered molecular dynamics – řízená molekulová dynamika

Dále byly v textu použity standardní zkratky aminokyselin.

1 Úvod

Živé organismy byly vystaveny škodlivým chemickým látkám již od pradávna – je to součástí tzv. chemické „války“ rostlin s živočichy, jakožto i bojů mezi mikroorganismy. Zatímco vyšší živočichové se utkávají spíše ve fyzické rovině, mikroorganismům a rostlinám nezbyvá než bojovat s nepřáteli chemicky, tedy produkcí takových látek, které jsou pro ně samotné přinejmenším výrazně méně toxické než pro jejich nepřátele. S nástupem průmyslové éry začaly do životního prostředí pronikat nové cizorodé látky ve formě toxického odpadu, umělých hnojiv a pesticidů používaných v zemědělství či léčiv používaných v humánní a veterinární medicíně. Jelikož se tyto převážně hydrofobní látky objevily pro přírodu relativně nedávno, nejsou vždy odstraňovány v rámci běžných samočisticích procesů a mohou se hromadit v životním prostředí. Spolu s vdechovaným vzduchem, znečištěnou vodou a potravou je pak přijímáme i my. Mezi nejnebezpečnější chemické polutanty patří polycyklické aromatické uhlovodíky a jejich deriváty – nitrosloučeniny a aminy [1]. V odborné literatuře bývá cizorodá látka nalézající se v organismu, která by se tam běžně neměla vyskytovat (popřípadě se tam vyskytuje v mnohem vyšší koncentraci, než je obvyklé) označována jako xenobiotikum.

Řada organismů si již dávno vyvinula systém, jak xenobiotika detoxifikovat v reakci na produkci jedů během již výše zmíněné chemické války. U živočichů, kde tento proces probíhá převážně v játrech, v první fázi dochází k zavedení či odmaskování reaktivních skupin pomocí redoxních a hydrolytických reakcí (tzv. derivatizace xenobiotika). Xenobiotikum je dále konjugováno s polární látkou (nejčastěji s kyselinou glukuronovou, sulfátem nebo glutathionem), což má za cíl zvýšit jeho hydrofilitu a usnadnit tak jeho vyloučení z organismu [2]. V některých případech ovšem derivatizace xenobiotika vede ke vzniku reaktivních sloučenin spontánně reagujících s deoxyribonukleovou kyselinou (DNA), což v konečném důsledku může vést k vývoji nádorových onemocnění [3]. Další významnou skupinou xenobiotik dostávajících se do lidského organismu jsou léčiva, u kterých je třeba s detoxifikačními procesy počítat při studiu lékových interakcí a předvídání jejich farmakokinetiky [4]. Krom toho jsou některé mikroorganismy schopny používat polutanty jako zdroj uhlíku, čehož se vědci snaží využít k čištění kontaminovaného prostředí v procesu zvaném bioremediace [5].

Mezi nejvýznamnější redoxní derivatizační reakce patří hydroxylace, za kterou je

u vyšších organismů z velké části zodpovědný MFO (angl. „mixed function oxidase“) systém [6], jenž se nachází na cytosolární straně membrány endoplasmatického retikula a je tvořen cytochromy P450, jejich reduktasou (NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou), popřípadě i cytochromem b_5 a NADPH:cytochrom b_5 oxidoreduktasou [7].

Se zvyšujícím se výkonem počítačů začínají být pro studium biochemické problematiky stále častěji používané také metody teoretické chemie, například tzv. „docking“ nebo molekulová dynamika. Tato práce takových metod využívá ke studiu interakcí cytochromů P450 s malým bakteriálním donorem elektronů flavodoxinem.

1.1 Cytochromy P450

Monooxygenasy zvané cytochromy P450 (EC 1.14.x.x) byly objeveny v padesátých letech dvacátého století v mikrosomech z potkaních jater [8]. Název, který vznikl na základě spektrální podobnosti s přenašeči elektronů – cytochromy, z písmena „P“ pro pigment a charakteristického absorpčního maxima po vazbě oxidu uhelnatého při 450 nm, se později ukázal poněkud zavádějící, v novější literatuře bývají tyto proteiny označovány jako enzymy P450 nebo zkratkou CYP. V průběhu let byly tyto enzymy objeveny ve všech doménách života od bakterií po člověka a také u virů [9], jak přehledně ilustruje tabulka 1.

Tabulka 1: Popsané cytochromy P450 k březnu 2010, upraveno dle [9].

Typ organismu	Počet cytochromů P450
Živočichové	4088*
Rostliny	4267
Houby	2784**
Protista	247
Bakterie	1042
Archea	26
Viry***	2

* dalších víc než 1000 cytochromů P450 dosud nepojmenováno

** databáze „Fungal Cytochrome P450 Database“ obsahuje dalších 4050 nepojmenovaných cytochromů P450

*** viry nebývají někdy považovány za živé organismy

Z evolučního hlediska se cytochromy P450 nejspíše objevily už na počátku éry života na Zemi u anaerobních bakterií před asi 3,5 miliardami let, kdy se objevily první stopy

kyslíku a cytochromy P450 mohly původně sloužit k jeho detoxifikaci [10].

1.1.1 Nomenklatura cytochromů P450

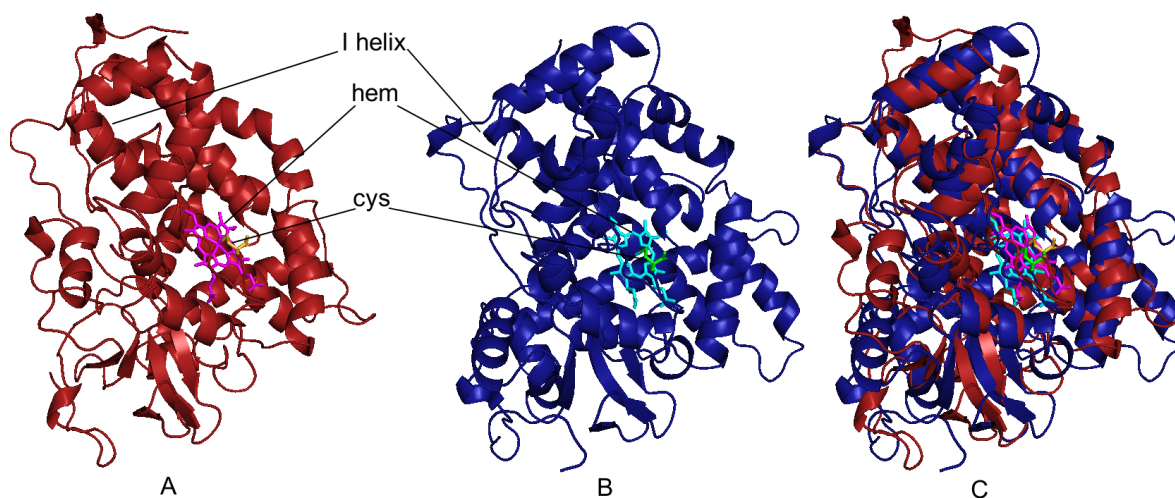
Z počátku byly cytochromy P450 pojmenovávány nesystematicky, každá laboratoř měla svůj systém zkratk a někdy existovalo i více označení pro stejný protein. S rozrůstajícím se počtem nově objevených cytochromů P450 vznikla potřeba je lépe třídit, a tak roku 1987 vznikla Komise pro standardizovanou nomenklaturu eukaryotických cytochromů P450, která vydala první doporučení k sjednocení nomenklatury [11]. Původně vycházela nová verze tohoto doporučení každé dva roky, v roce 1995 pak vznikla webová stránka, kde je možné dodnes vyhledat nejaktuálnější nomenklaturu [12].

Současná sjednocená nomenklatura dělí superrodinu cytochromů P450 do rodin a podrodin na základě identity v aminokyselinové sekvenci a přiřazuje každému zástupci superrodiny zkratku podle následujících pravidel [11]:

- z názvu „cytochrom P450“ vznikne zkratka CYP,
- následuje arabská číslice označující rodinu, kde je mezi zástupci homologie aminokyselinové sekvence vyšší než 40 % (např. CYP1),
- následuje velké písmeno označující podrodinu, kde je mezi zástupci homologie aminokyselinové sekvence vyšší než 55 % (např. CYP1A),
- zkratku ukončuje arabská číslice označující pořadí konkrétního proteinu v jeho podrodině (např. CYP1A2).

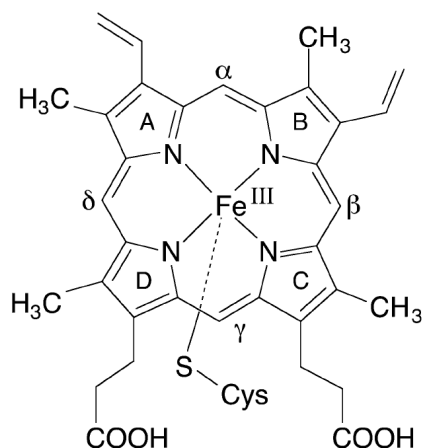
1.1.2 Struktura cytochromů P450

Ač sekvenční homologie mezi jednotlivými rodinami není velká, vykazují všechny dosud rozřešené struktury cytochromů P450 určitou podobnost (srovnání struktur bakteriálního a lidského cytochromu P450 se sekvenční identitou 20,3 % je vidět na obrázku 1). Ústředním prvkem je prosthetická skupina hemu, která je k apoproteinu vázána pomocí konzervovaného deprotonovaného cysteinu. Ve středu hemu je čtyřmi dusíky (ekvatoriálními ligandy) koordinováno železo, pátým (axiálním) ligandem je zmíněný thiolát cysteinu (proto se cytochromy P450 řadí mezi hem-thiolátové enzymy) [13] (viz obr. 2).



Obrázek 1: Struktura bakteriálního solubního CYP101A1 (**A**, PDB ID 2CPP) a lidského membránového CYP2A6 (**B**, PDB ID 1Z10, membránová kotva nezobrazena) s vyznačenými charakteristickými elementy. Srovnání obou struktur (**C**).

Tato poněkud neobvyklá koordinace železa způsobuje posun absorpčního maxima Soretova pásu redukovaného hemu v komplexu s CO k charakteristickým 450 nm [14].



Obrázek 2: Prosthetická skupina hemu vyskytující se u cytochromu P450 se znázorněným pátým ligandem železa – cysteinem. Převzato z [13].

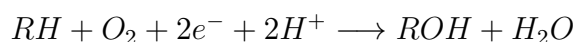
Sekundární struktura dominuje α -helix, kde nejvýznamnější označovaný jako I helix tvoří jakousi páteř celého proteinu. I helix je uprostřed v blízkosti železa hemu zalomený v důsledku vodíkové vazby hydroxyly konzervovaného threoninu na karbonylový uhlík hlavního řetězce [15], což by mohlo být zodpovědné za správnou vazbu molekuly kyslíku jako axiálního ligandu na distální (opačnou než kde se váže cystein) stranu hemu [16]. Distální strana proteinu je pak méně konzervovaná mezi rodinami a podrodinami,

neboť je zodpovědná za rozpoznání a vazbu substrátu, který může být napříč rodinami značně odlišný [15]. Celkově má pak cytochrom P450 tvar trojbokého hranolu, jak je možné vidět na obrázku 1. Cytochromy P450 z vyšších organismů jsou membránové proteiny s asi 25 aminokyselin dlouhou membránovou kotvou na N-konci, jejíž struktura nebyla dosud experimentálně zcela objasněna. Podle nejnovějších teoretických modelů se pravděpodobně jedná o jednoduchý transmembránový helix a navíc je i globulární doména částečně zanořena v membráně [17, 18].

Jako první byla roku 1985 pomocí rentgenové krystalografie rozřešena struktura rozpustného CYP101A1 (dříve P450cam) z bakterie *Pseudomonas putida*, který má za substrát kafr [19]. Druhá byla publikována v roce 1993 struktura rozpustného CYP102A1 (dříve P450-BM3) z bakterie *Bacillus megaterium* podílejícího se na metabolismu mastných kyselin [20]. První struktura lidského cytochromu P450 byla publikována v roce 2003 a jednalo se o mikrosomální membránový CYP2C9, který je mimo jiné zodpovědný za biotransformaci antikoagulantu warfarinu [21]. Dnes je v proteinové databance PDB (www.pdb.org) deponováno přes 350 struktur cytochromů P450 získaných převážně rentgenovou krystalografií, z toho přes 80 lidských, nicméně často jde o varianty jednoho proteinu s různými substráty či inhibitory.

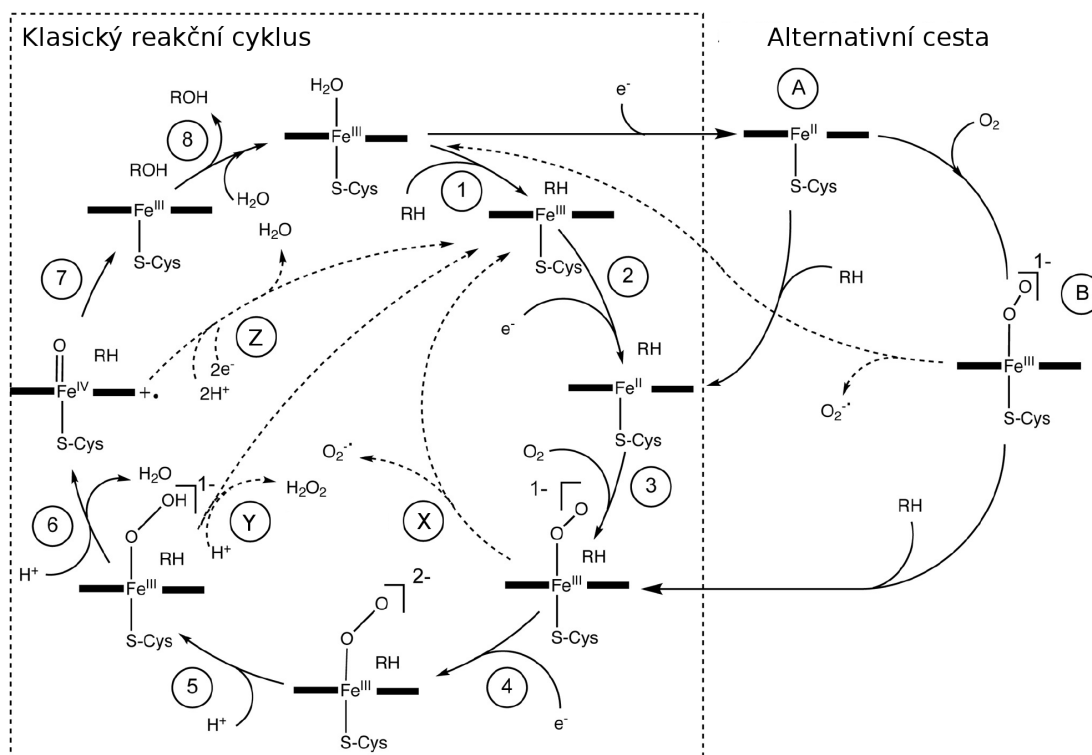
1.1.3 Reakční mechanismus cytochromu P450

Cytochrom P450 jakožto monooxygenasa štěpí molekulu kyslíku, přičemž jeden atom je redukován na molekulu vody a druhý je vnesen do molekuly zpravidla hydrofobního substrátu [13]. Celý proces lze shrnout rovnicí:



Základní reakční cyklus se sestává z následujících kroků (viz obr. 3) [22]:

- V klidovém stavu je železo hemu v oxidačním stavu III v nízkospinové formě, šestým ligandem je voda.
- Po navázání substrátu do aktivního centra (**1**) dojde k odstoupení vody a přechodu železa do vysokospinového stavu.
- Vysokospinové železo má pozitivnější redukční potenciál, a proto může snáz dojít k jeho redukci na ferro formu (**2**). Spinový přechod ovšem není nutnou součástí reakčního cyklu. V tomto kroku může docházet k vazbě oxidu uhelnatého.



Obrázek 3: Reakční cyklus cytochromu P450 s alternativní cestou, kde probíhá redukce železa i bez přítomnosti substrátu. Reakční centrum je reprezentováno železem hemu a jeho axiálními ligandy. Popis jednotlivých kroků v textu. Upraveno podle [23].

- V dalším kroku se váže molekula kyslíku jako šestý ligand a vzniká oxo-ferri komplex (**3**).
- Následně dochází opět k redukci za vzniku peroxo-ferri formy (**4**), která je protonována na hydroperoxo-ferri formu (**5**).
- Kyslík vzdálenější od železa je podruhé protonován a následuje hydrolytické rozštěpení vazby mezi kyslíky, což zapříčiní odštěpení molekuly vody a vznik oxo-ferryl radikálu zvaného „sloučenina I“ (**6**).
- Reaktivní sloučenina I napadá substrát a dochází tak k jeho hydroxylaci (**7**).
- Nakonec je produkt uvolněn a jako šestý ligand se váže molekula vody za obnovení klidového stavu (**8**).

V průběhu reakčního cyklu může docházet k nežádoucím vedlejším reakcím, které vedou ke vzniku reaktivních forem kyslíku a neproduktivnímu zacyklení (znázorněny

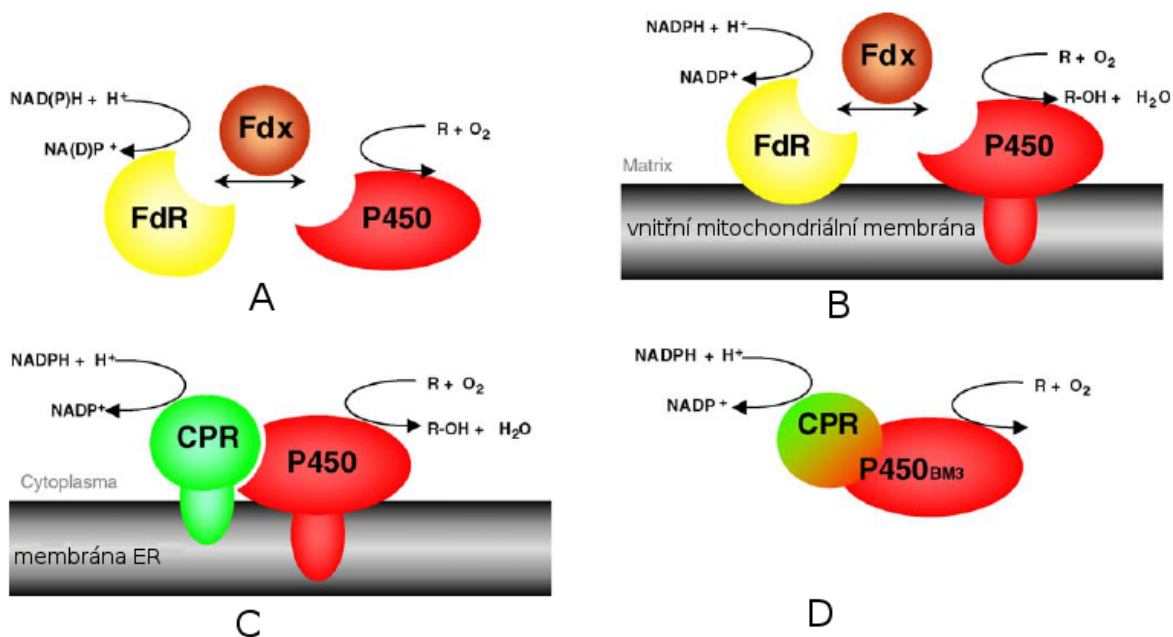
čárkovane uprostred cyklu na obrázku 3). Oxo-ferri forma se může rozpadnout za uvolnění superoxidového radikálu a návratu do vysokospinového ferri stavu (**X**). U hydroperoxo-ferri formy může být protonován atom kyslíku bližší k železu a může tak dojít k odštěpení peroxidu vodíku a návratu do vysokospinového ferri stavu (**Y**). Konečně může být sloučenina I protonována a dát vzniku druhé molekuly vody při návratu k vysokospinové ferri formě (**Z**). [24]

Klasické pojetí reakčního cyklu, který byl odvozen na bakteriálních CYP101A1 a CYP102A1 nemusí být ale zcela platné pro všechny cytochromy P450, konkrétně předpoklad, že k první redukci ferri formy na ferro formu bez přítomnosti substrátu prakticky nedochází, a že spinový stav má zásadní vliv na kinetiku první redukce. Pravděpodobně totiž dochází v různé míře u jednotlivých cytochromů P450 vedle klasické cesty také k redukci železa bez vazby substrátu (obr. 3 krok **A**), případně ještě k vazbě molekuly kyslíku a až poté k vazbě substrátu do aktivního centra (**B**) [25]. Opět zde může také docházet k produkci superoxidového radikálu a neproduktivnímu zacyklení. Částečná redukce železa v hemu u vybraných cytochromů P450 byla za nepřítomnosti substrátu pozorována jak *in vitro*, tak *in vivo* [23, 25].

1.1.4 Redoxní partneři cytochromu P450

Aby mohl reakční cyklus popsáný v předchozí kapitole fungovat, je potřeba ve dvou krocích dodávat elektrony pro redukci (viz obr. 3 krok **2** a **4**). V závislosti na organismu a také lokalizaci cytochromu P450 v buňce existuje několik základních cest, jak se elektrony dostávají do jeho reakčního centra. Na počátku je vždy redukováný nikotinamidnukleotid resp. jeho fosfát (NADH resp. NADPH) představující zásobu redukčních ekvivalentů v buňce, který předává dva elektrony NAD(P)H dependentní reductase (případně doméně fúzní reductasy) obsahující flavinadeninidnukleotid (FAD) [26]. Podle dalšího článku řetězu, který dopravuje elektrony od této reductasy k cytochromu P450 se dají MFO systémy rozdělit do dvou tříd: do třídy I spadají bakteriální a mitochondriální systémy, kde je za transport zodpovědný FeS protein, do třídy II potom mikrosomální proteiny, kde je cytochrom P450 redukován FMN (flavinmononukleotid) doménou fúzní reductasy.

V bakteriálním systému (obr. 4 A) rozpustná NAD(P)H-dependentní ferredoxin reductasa (Fdr) interaguje s rozpustným [2Fe-2S] ferredoxinem (Fdx), jenž pak jako člu-



Obrázek 4: Varianty redoxního systému cytochromu P450. **A:** bakteriální systém, **B:** mitochondriální systém, **C:** mikrosomální systém, **D:** flavocytochrom CYP102A1 (P450-BM3). Upraveno podle [26].

nek po jednom předává elektrony cytochromu P450. Interakce bakteriálního cytochromu P450 s příslušným ferredoxinem je obvykle velmi specifická [27]. V mitochondriích (obr. 4 B) se celý systém nachází na vnitřní mitochondriální membráně směrem do matrix. S membránou asociující andrenodoxin reduktasa (AdR) předává elektrony rozpustnému [2Fe-2S] proteinu andrenodoxinu (Adx), který slouží jako přenašeč elektronů mezi ní a cytochromem P450 ukotveným v membráně [28].

Mikrosomální systém (obr. 4 C) se nachází na membráně endoplasmatického retikula (ER) směrem do cytoplasmy. Za přenos elektronů z NADPH je zde zodpovědná multidoménová v membráně kotvená NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CPR), jejíž FAD doména je funkčně i strukturně podobná FdR. Elektrony v rámci reduktasy putují po jednom k FMN doméně podobné flavodoxinu, která po konformační změně interaguje s cytochromem P450 rovněž ukotveným v membráně [29]. Na rozdíl od bakteriálních systémů bylo prokázáno, že jedna CPR dokáže dodávat elektrony různým mikrosomálním cytochromům P450 [27]. Součástí mikrosomálního systému může být v membráně kotvený cytochrom b₅ s NADPH:cytochrom b₅ oxidoreduktasou, jehož efekt není ještě z celá pochopen. Předpokládá se, že může být zodpovědný za dodání druhého elektronu (viz obr. 3 str. 6 krok 4) a tím může, pokud je jeho koncentrace

vzhledem k CPR nízká, urychlit tvorbu produktu. Pokud je ovšem jeho koncentrace příliš vysoká, zamezuje vazbě CPR při první redukci ferri formy na ferro formu a tím inhibuje celý cyklus [30].

Zvláštním případem je bakteriální CYP102A1, který představuje spojení cytochromu P450 a jeho reductasy do jednoho fúzního rozpustného flavocytochromu (obr. 4 D). Jeho reductasová doména obsahuje FAD a FMN a je podobná mikrosomální CPR, stejně jako cytochromová doména je spíše podobná eukaryotním cytochromům P450 [31]. CYP102A1 je jen jedním z důkazů, že redoxní systém cytochromů P450 se nedá tak snadno dělit do dvou tříd. Dále to potvrzuje například nedávno objevený bakteriální rozpustný CYP176A1, u kterého elektrony z FdR přenáší místo ferredoxinu rozpustný flavoprotein cindoxin obsahující FMN [32].

1.2 Bakteriální cytochromy P450

Zprvu se mělo za to, že bakteriální cytochromy P450 jsou specializované na využití cizorodných látek jakožto zdroje uhlíku a energie, a že jsou kódovány hlavně plasmidovou DNA. Postupně se však ukazuje, že jsou kódovány i na bakteriálních chromozomech a jejich výskyt u bakterií je celkem běžný [33]. Zatímco u *Escherichia coli* cytochromy P450 zcela chybí, například *Mycobacterium tuberculosis* jich kóduje 20 [34] nebo *Streptomyces coelicolor* 18 [35]. Bakteriální cytochromy P450 se podílí na metabolismu řady hydrofobních látek, ať již jde o aromáty nebo o mastné kyseliny či dokonce lineární uhlovodíky [36]. Může se jednat jak o děje katabolické s cílem získání uhlíku a energie, tak o anabolické, například syntézu sfingolipidů [37] (některé příklady metabolismů uvádí tabulka 2).

Z lékařského hlediska je zajímavé studium bakteriálních cytochromů P450 jakožto cílů terapeutického zásahu, například CYP121A1 z *Mycobacterium tuberculosis* může být inhibován azolovými léčivy [38]. Dále mohou být bakteriální cytochromy P450 pro svou účast v metabolismu polutantů zajímavé z hlediska bioremediace, jak bylo naznačeno již v úvodu této práce. Bakterie *Rhodococcus sp.* izolované z půdy po desítky let využívané k vojenskému výcviku jsou schopny degradovat výbušninu hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin a využívat ji jako zdroj dusíku. Fúzní flavocytochrom P450 177A1 zodpovědný za tuto degradaci byl upraven a pracuje se vytvoření geneticky

Tabulka 2: Příklady metabolických drah, kterých se účastní některé bakteriální cytochrom P450. Převzato z [36].

Rodina CYP	Katalyzovaná reakce
101	5-exo hydroxylace kafru
102	ω -2 hydroxylace mastných kyselin
105	oxidace sulfonylmočoviny
106	oxidace mastných kyselin a steroidů
107	biosyntéza erythromycinu
108	4-methyl hydroxylace α -terpineolu
113	12-hydroxylace erythromycinu
154	biosyntéza tylosinu a další funkce

modifikovaných rostlin exprimujících tento enzym [39].

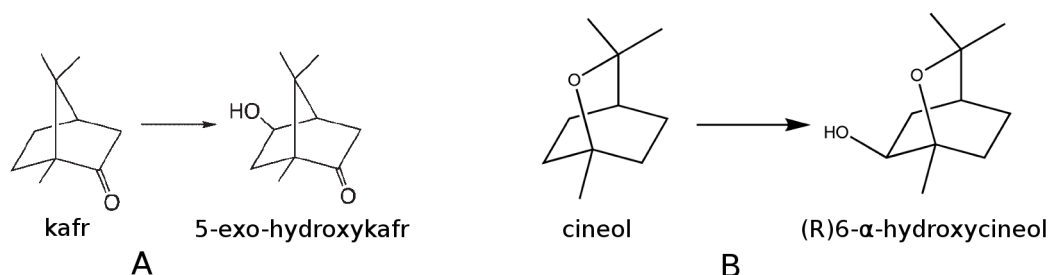
1.2.1 Cytochrom P450 101A1

Rozpustný CYP101A1 (dříve P450cam, kafr-5-monooxygenasa, EC 1.14.15.1) je pravděpodobně nejvíce prozkoumaný cytochrom P450 vůbec. Vyskytuje se u *Pseudomonas putida*, což je gram-negativní tyčinkovitá bakterie žijící v půdě. Přírodním substrátem CYP101A1 je kafr (angl. „camphor“, odtud P450cam), který je hydroxylován na 5-exo-hydroxykafr [40] (schéma na obr. 5 A). Upravené enzymy jsou ovšem schopny hydroxylovat deriváty benzenu [41] či polycyklické aromatické uhlovodíky [42]. Redoxní systém CYP101A1 je modelový bakteriální systém (viz podkapitola 1.1.4) – elektrony potřebné k redukci získává z NADH prostřednictvím putidaredoxinu (Pdx, FeS proteinu typu ferredoxinu) a putidaredoxin reduktasy (PdR). Úloha Pdx spočívá především v dodání druhého elektronu (viz obr. 3 str. 6 krok 4), zatímco první elektron k redukci Fe^{III} na Fe^{II} může dodat jakýkoliv donor elektronů s dostatečným redukčním potenciálem [43]. Struktura CYP101A1 byla první rozřešenou strukturou cytochromu P450 a dnes existuje řada různých mutantních a jinak pozměněných variant [19, 44].

1.2.2 Cytochrom P450 176A1

Rozpustný CYP176A1 (také P450cin, 1,8-cineol-2-endo-monooxygenasa, EC 1.14.13.156) byl objeven před jedenácti lety u *Citrobacter braakii*, což je půdní gram-negativní tyčinkovitá bakterie žijící v půdě pod eukalypty. *C. braakii* je schopna využívat 1,8-cineol (monoterpen podobný kafru obsažený v eukalyptových listech) jako jediný zdroj uh-

líku [45]. CYP176A1 katalyzuje hydroxylaci uhlíku hlavního kruhu, jak je vidět na obrázku 5 B. Redoxní systém je v zásadě bakteriálního typu, ale místo ferredoxinu přenáší elektrony od FdR k cytochromu P450 FMN obsahující flavodoxin zvaný cindoxin (Cdx), který by mohl být podobný FMN vázící doméně eukaryotní CPR [32]. Struktura CYP176A1 byla rozřešena rentgenovou krystalografií [46,47] a ukazuje se, že celý systém by mohl být jakýmsi přechodem od bakteriálního k mikrosomálnímu systému, protože kinetika přenosu elektronů je bližší mikrosomálnímu systému, zatímco strukturně je CYP176A1 bližší bakteriálnímu CYP101A1 [48].



Obrázek 5: Reakce katalyzované bakteriálními cytochromy P450 101A1 (A) a 176A1 (B). Upraveno podle [40,46].

1.3 Lidské cytochromy P450

V lidském genomu se nachází 57 funkčních genů pro cytochromy P450 a dále 58 pseudogenů (inaktivovaných a již nefunkčních genů). Většina z lidských cytochromů P450 se nachází na cytosolární straně membrány ER, avšak 7 je lokalizováno na vnitřní mitochondriální membráně [12]. Největší množství lidských CYP je exprimováno v jaterních buňkách, nicméně v menší míře jsou přítomny také v ledvinách, střevech, plicích, kůži a dokonce v mozku [49]. Substrátová a částečně i reakční specifita cytochromů P450 není vysoká, díky čemuž se podílí na metabolismu xenobiotik, sterolů, mastných kyselin a dalších [50], funkce některých z nich však nebyla dosud objasněna a bývají označovány jako sirotci (angl. „orphans“). Rozdělení lidských cytochromů P450 podle metabolismů uvádí tabulka 3.

Odhaduje se, že za metabolismus léčiv jsou z 95 % zodpovědné CYP3A4, 2C9, 2C19, 2D6 a 1A2, což usnadňuje studium farmakokinetiky a předpovídání lékových interakcí. Na aktivaci karcinogenů se podílí především CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2A13,

Tabulka 3: Rozdělení lidských cytochromů P450 podle typu metabolismu, na kterém se podílí. Převzato z [50].

Steroly	Xenobiotika	Mastné kyseliny	Eikosanoidy	Vitamíny	Neznámý
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	2S1
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1	2B6		8A1	26C1	3A43
11B1	2C8			27B1	4A22
11B2	2C9				4F11
17A1	2C18				4F22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4X1
27A1	2E1				4Z1
39A1	2F1				20A1
46A1	3A4				27C1
51A1	3A5				
	3A7				

2E1 3A4 a možná 2W1 [51]. V lidské populaci je třeba počítat s polymorfismy u jednotlivých cytochromů P450, a proto se tyto stávají předměty genetických studií s cílem předepisovat léky „na míru“ [52].

1.3.1 Cytochrom P450 1A2

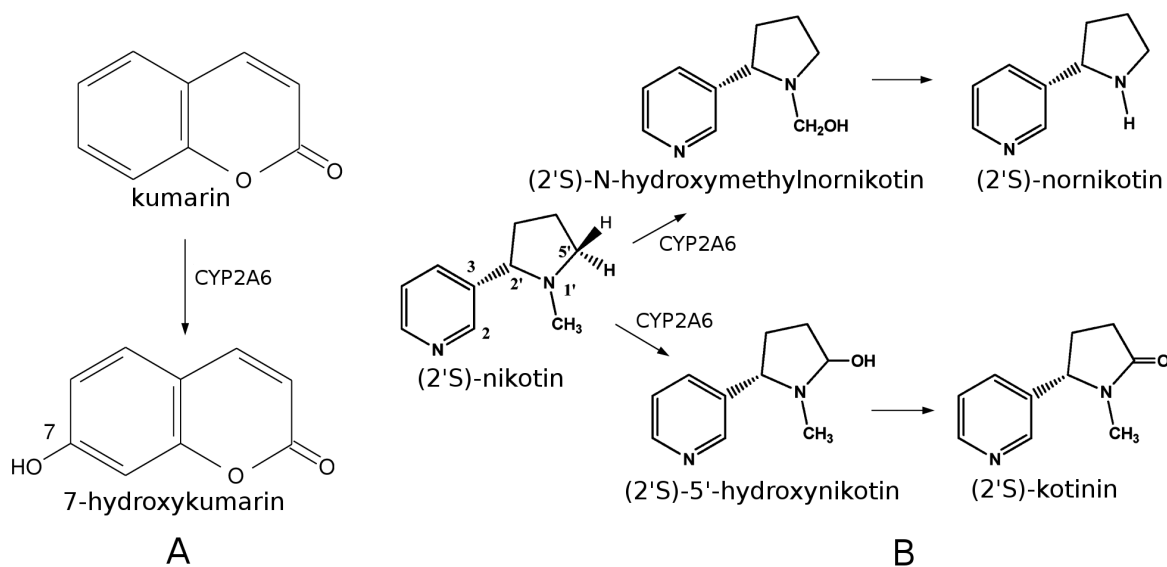
CYP1A2 se vyskytuje převážně v ER v jaterní tkáni [53], byl nalezen ale i v plicích [54], mozku [55], prostatě či gastrointestinálním traktu [56]. Jeho exprese může být indukována N-heterocyklickými aminy obsaženými v cigaretovém kouři nebo grilovaném mase [57], dále například kofeinem [58].

Krom endogenních substrátů estradiolu a ethynyl estradiolu [59] zasahuje CYP1A2 také do metabolismu řady léčiv (například antipsychotika klozapinu [60] nebo antidepresiva klomipraminu [61]) a také již zmíněného kofeinu a karcinogenních aromatických a heterocyklických aminů. Mezi jeho inhibitory patří například 2-ethynylpyren nebo α -naftoflavon [62].

Struktura lidského CYP1A2 v komplexu s α -naftoflavonem byla vyřešena pomocí rentgenové krystalografie [63].

1.3.2 Cytochrom P450 2A6

Mikrosomální CYP2A6 (kumarin-7-hydroxylasa, nikotin-C-oxidasa) je exprimován hlavně v jaterních buňkách [64], vyskytuje se ale i v monocytech a makrofázích [65] nebo astrocytech v mozku [66]. Jeho první popsany substrát je rostlinný toxin kumarin, který se i používá pro stanovení aktivity tohoto enzymu [67] (katalyzovaná reakce viz obr. 6 A). Nejstudovanějším substrátem je nicméně nikotin obsažený v tabáku, který CYP2A6 metabolisuje na kotinin, z menší části může vznikat i nornikotin, jenž je dále přeměňován na karcinogenní produkty [68] (schéma viz obr. 6 B). Dalším karcinogenem z tabákového kouře metabolisovaným CYP2A6 je derivát nikotinu 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) [69]. Nikotin slouží také jako induktor CYP2A6 a tím zvyšuje míru biotransformace ostatních karcinogenů vdechovaných v cigaretovém kouři. Dalším induktorem je přes složitější dráhu oxidačního stresu také ethanol, který indukuje expresi CYP2A6 v monocytech [64]. Tato souvislost vede k zajímavým závěrům ohledně vztahu mezi závislostí na alkoholu a na tabáku. Oxidační stres vzniklý metabolickou přeměnou nikotinu může také v makrofázích podporovat množení viru HIV a tak zhoršovat průběh onemocnění AIDS [66].



Obrázek 6: Reakce katalyzované CYP2A6 – 7-hydroxylace kumarinu (A) a dvě varianty přeměny nikotinu, kde je CYP2A6 zodpovědný vždy za první krok (B). Upraveno podle [67, 68].

Z léčiv metabolisuje CYP2A6 například anestetikum halothan [70] nebo antikon-

vulzivum (lék proti epilepsii) kyselinu valproovou [71]. Z endogenních substrátů potom oxiduje bilirubin na biliverdin [72]. Mezi inhibitory patří méně specifický pilokarpin [73] nebo specifičtější tranylcypromin [74], dále aktivitu CYP2A6 snižuje grapefruitová šťáva [75]. Inhibitory CYP2A6 by mohly také sloužit jako léky proti závislosti na tabáku. V proteinové databance (pdb.org) bylo v době sepisování práce deponováno 10 krystalových struktur CYP2A6 s různými substráty a inhibitory (struktura CYP2A6 s kumarinem [76] je na obrázku 1 str. 4).

1.3.3 Cytochrom P450 2A13

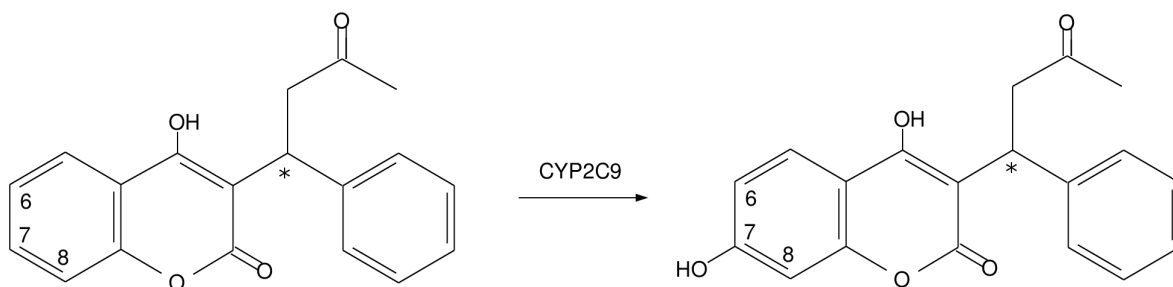
CYP2A13 se vyskytuje především v tkáních dýchacího traktu (plíce, nosohltan, průdušky) [77], ale také třeba v α -ostrůvcích pankreatické tkáně [78]. Díky blízké příbuznosti s CYP2A6 (94% sekvenční identita) metabolizuje CYP2A13 i podobné substráty jako je nikotin nebo NNK, při jehož aktivaci je až 500x efektivnější než CYP2A6. A protože se vyskytuje hlavně v dýchacím traktu předpokládá se, že je hlavním aktivátorem karcinogenů z tabákového kouře způsobujících rakovinu plic [79]. Dále je CYP2A13 zodpovědný za metabolismus polutantů vyskytujících se ve znečištěném vzduchu např. naftalenu, styrenu a toluenu [80]. Inhibitory CYP2A13 většinou také sdílí s CYP2A6.

V proteinové databance bylo v době psaní této práce deponováno 5 krystalových struktur CYP2A13 s různými inhibitory a substráty.

1.3.4 Cytochrom P450 2C9

CYP2C9 vyskytující se převážně v mikrosomech jaterních buněk (kde tvoří až 18 % celkového množství CYP) patří mezi nejdůležitější cytochromy P450 zodpovědné za metabolismus léčiv [81]. Jeho nejprozkoumanějším substrátem je antikoagulant warfarin, u něhož CYP2C9 provádí 7-hydroxylaci jeho S formy (viz obr. 7), přičemž R forma má spíše inhibiční efekt [82]. Dále je zodpovědný kupříkladu za metabolismus ibuprofenu [83] a dlouhé řady dalších běžně užívaných léčiv. Z karcinogenů aktivuje spolu s dalšími CYP dibenzo[a,l]pyren, ze kterého vznikají jeho silně karcinogenní 11,12-diol-13,14-epoxydy [84]. Z endogenních látek zasahuje CYP2C9 do metabolismu kyseliny arachidonové, 5-hydroxytryptaminu a kyseliny linolové [85].

CYP2C9 je inhibován celou plejiádou látek, velmi silně třeba antitykotikem fluko-



Obrázek 7: 7-hydroxylace (S)-warfarinu katalyzovaná CYP2C9. Hvězdička označuje asymetrický uhlík.

nazolem [86] nebo amentoflavonem z jinanu dvoulaločného či třezalky [87]. Nedávno se ukázalo, že i látky obsažené v marihuanovém kouři (kanabidiol, kanabiol a Δ^9 -tetrahydrokanabinol) mohou mít na tento CYP inhibiční efekt [88].

Ač byla struktura CYP2C9 první rozřešenou strukturou lidského cytochromu P450, dosud byla publikována pouze jedna další krystalová struktura tohoto proteinu [89].

1.3.5 Cytochrom P450 2C19

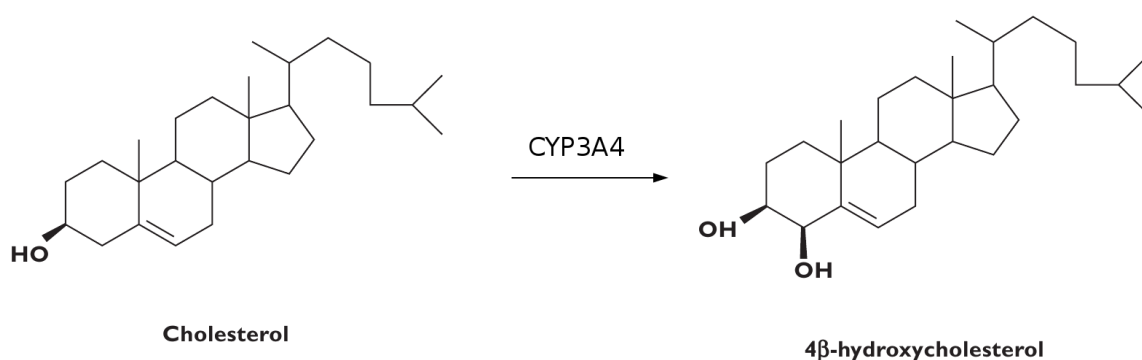
CYP2C19 je blízký příbuzný CYP2C9 (sekvenční identita 91 %), což znamená, že s ním sdílí řadu substrátů a inhibitorů, nicméně často s rozdílnou afinitou. Je exprimován hlavně v játrech a ve střevech [90]. Podílí se na metabolismu léčiv jako omeprazol (inhibitor protonových pump), diazepam (anxiolytikum) nebo antikoagulantu fenobarbitalu [91], z endogenních substrátů pak na metabolismu testosteronu a progesteronu [92]. Dalším významným substrátem je (S)-mefenytin, jehož 4'-hydroxylace se používá k radiometrickému stanovení aktivity CYP2C19 při vývoji nových léčiv [93]. Mezi silné inhibitory patří například antidepresivum fluvoxamin [94].

Na konci roku 2012 byla publikována první krystalová struktura CYP2C19 [95].

1.3.6 Cytochrom P450 3A4

Nejdůležitějším cytochromem P450 podílejícím se na metabolismu xenobiotik je bezpochyby CYP3A4. Je nejzastoupenějším cytochromem P450 na membránách ER lidských hepatocytů (při indukci představuje až 60 % z celkového množství CYP) a podílí se na metabolismu skoro poloviny používaných léčiv [96]. Zatímco mnoho léčiv je podáváno ve formě prekursorů, které počítají s metabolickou aktivací CYP3A4, některá

léčiva, například antibiotikum erythromycin, antivirotikum ritonavir nebo antidepresivum midazolam, jsou jeho silnými inhibitory [97]. Izotopově značený erythromycin se také používá ke stanovení aktivity CYP3A4 *in vivo* [98]. Z karcinogenních xenobiotik je CYP3A4 zodpovědný za aktivaci aflatoxinu B1 produkovaném plísněmi rodu *Aspergillus* [99]. CYP3A4 se podílí i na metabolismu endogenních substrátů jako jsou steroidní hormony testosteron, progesteron nebo 17- β -estradiol [100], dále potom provádí 4- β -hydroxylaci cholesterolu (obr. 8), který díky své vysoké koncentraci v jaterní tkáni může inhibovat biotransformaci léčiv [101]. 4- β -hydroxycholesterol může také sloužit jako endogenní marker enzymové aktivity CYP3A4 [102].



Obrázek 8: 4- β -hydroxylace cholesterolu katalyzovaná CYP3A4. Upraveno podle [102].

Kromě již zmíněných inhibitorů z řad léčiv jsou z hlediska farmakokinetiky a prevence rakoviny zajímavé také ty obsažené v potravě, jako je podobně jako u CYP2A6 bergamottin z grapefruitové šťávy [103] nebo jako u CYP2C9 amentoflavon z třezalky [86]. Dále je CYP3A4 inhibován látkami obsaženými v rajčatové šťávě [104].

Strukturně se CYP3A4 od ostatních lidských cytochromů P450 se známou strukturou liší širokou kavitou pro substrát, což vysvětluje jeho neobyčejně širokou substrátovou variabilitu [105]. V PDB databázi bylo v době sepisování práce deponováno 8 struktur CYP3A4.

1.4 Flavodoxiny

1.4.1 Výskyt a funkce flavodoxinů

Flavodoxiny (Fld) jsou malé rozpustné přenašeče elektronů vyskytující se u bakterií a nižších eukaryot, které obsahují jeden nekovalentně vázaný kofaktor FMN jakožto re-

doxni prostheticou skupinu. Poprvé byly popsány v šedesátých letech minulého století u sinic [106] a u bakterie *Clostridium* [107], kde dokáží při nízké koncentraci železa v prostředí nahradit FeS protein ferredoxin při redukci NADP^+ během fotosyntézy resp. při redukci N_2 .

Postupem času bylo objeveno mnoho dalších enzymových systémů, kde se na přenosu elektronů podílí. Flavodoxin u *Bacillus subtilis* dodává elektrony pro syntézu biotinu CYP107H1 (P450 BioI) a biotinsynthase [108] a pro syntézu NO NO-synthase [109]. U bakterie *Azobacter vinelandii* se flavodoxin podílí na redukci nitrátu [110]. *Escherichia coli* využívá flavodoxin jako zdroj elektronů např. pro methioninsynthasu [111] nebo ribonukleotidreduktasu [112]. Bakterie zodpovědná za vznik žaludečních vředů *Helicobacter pylori* používá flavodoxin jako přenašeč elektronů vzniklých oxidační dekarboxylací pyruvátu k dalším enzymovým komplexům redukujícím NADP^+ na NADPH. Jelikož je flavodoxin pro *H. pylori* esenciální, a protože zároveň není přítomný v lidských buňkách, představuje zajímavý cíl terapeutického zásahu [113].

1.4.2 Sekvence a struktura flavodoxinů

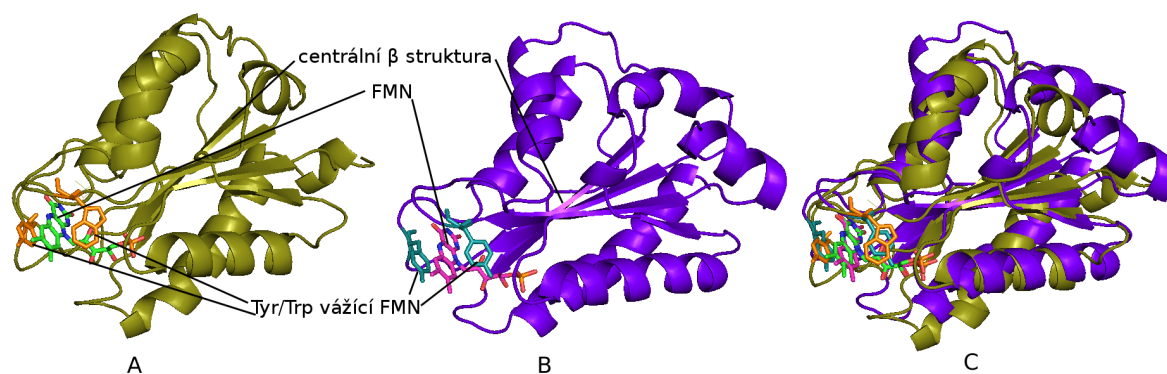
Sekvence flavodoxinů má obvykle 140 až 180 aminokyselin. Podle sekvenčního a strukturního srovnání se dají rozdělit do skupin na krátkořetězcové (např. z *Desulfovibrio vulgaris*) a dlouhořetězcové (např. z *E. coli* nebo *H. pylori*), které se liší dvacetiami-aminokyselinovou smyčkou, jenž by mohla hrát roli při interakci Fld s redoxními partnery [114]. Sekvenční identita mezi flavodoxiny z různých organismů je obvykle pod 50 %, v rámci zmíněných skupin jsou si zástupci Fld podobnější než mezi nimi [115].

Strukturně jsou si flavodoxiny velmi blízké, celý protein má oválný tvar, kde uvnitř je β -list obklopený α -helixy, na povrchu jsou hlavně kyselé aminokyselinové zbytky (struktura flavodoxinu z *E. coli* je na obr. 9 A). Za vazbu FMN jsou zodpovědné konzervované aminokyselinové postranní řetězce v oblasti aromatického isoalloxazinového kruhu (tyrosin a tryptofan) a v oblasti fosfátu (threoniny a amidy hlavního řetězce tvořící soustavu vodíkových vazeb). FMN se váže do již složeného apoproteinu a za jeho rozpoznání jsou zodpovědné hlavně zmíněné aromatické aminokyseliny, jak prokázaly studie mutantů [116, 117]. FMN je, ač nekovalentně, vázán velmi pevně a jeho vazba stabilizuje terciální strukturu flavodoxinu [118].

Kromě vazby redoxních partnerů spočívá úloha apoproteinu ve stabilizaci semi-

chinonového stavu FMN oproti redukovanému hydrochinonovému stavu, za kterou je zodpovědný konzervovaný tyrosin. Tato stabilizace podporuje přenos elektronů na redoxní partnery. Semichinonový stav je ale stabilizován i oproti plně oxidovanému stavu vodíkovou vazbou s hlavním řetězcem. FMN ve flavodoxinu během přenosu elektronů přechází hlavně mezi hydrochinonovým a semichinonovým stavem. [115].

I když se flavodoxiny u vyšších eukaryot nevyskytují, zdá se pravděpodobné, že se z nich vyvinuly FMN domény (nebo také flavodoxinu podobné domény, angl. „flavodoxin-like domains“) složitějších vícedoménových eukaryotních proteinů jako je CPR, NO-synthasa nebo reduktasa methioninsynthasy, které jsou flavodoxinu strukturně velmi blízké [119, 120] (strukturní srovnání Fld z *E. coli* s FMN doménou lidské CPR, mezi nimiž je sekvenční identita pouze 18 % je na obr. 9).



Obrázek 9: Struktura flavodoxinu z *E. coli* (A, PDB ID 1AG9) a FMN vázící domény lidské CPR (B, PDB ID 1B1C) s vyznačenými důležitými strukturními prvky. Srovnání obou struktur (C).

1.4.3 Flavodoxin jako součást redoxních systémů v *Escherichia coli*

V bakterii *Escherichia coli* je flavodoxin součástí enzymových systémů methioninsynthasy, ribonukleotidreduktasy, pyruvát-formiátlyasy a biotinsynthasy [121]. Elektrony z buněčné zásoby redukčních ekvivalentů uchovávaných především ve formě NADPH se přenáší na FAD obsahující ferredoxin(flavodoxin):NADP⁺ oxidoreduktasu (FdR), která redukuje FMN flavodoxinu [122]. Rozpustný Fld poté interaguje s výše jmenovanými enzymy a po jednom předává elektrony jejich redoxním centrům. Dalším přenašečem elektronů figurujícím v těchto systémech je FeS protein ferredoxin (Fd), který jednak může flavodoxin do určité míry v jeho úloze zastoupit, na druhou stranu by ale mohl

sloužit jako primární zdroj elektronů pro Fld, protože Fd dokáže *in vitro* redukovat Fld dokonce s vyšší rychlostí než FdR, a protože koncentrace Fd v buňce je mnohem vyšší než koncentrace FdR [121]. Alternativním zdrojem elektronů pro redukcí Fld (a také Fd) by mohla být pyruvát: ferredoxin oxidoreduktasa [123].

1.4.4 Flavodoxin a cytochromy P450

Ukazuje se, že systém flavodoxin reduktasa – flavodoxin může sloužit také jako zdroj elektronů pro cytochromy P450. V předchozích kapitolách již byl popsán CYP176A1 a CYP107H1, jejichž přirozeným redoxním partnerem je flavodoxin. Dalším takovým by mohl být alespoň podle *in vitro* studie CYP152A2 z bakterie *Clostridium acetobutylicum* [124] nebo CYP109B1 z *Bacillus subtilis* [125]. Krom toho je flavodoxinový motiv přítomen ve fúzních proteinech, jako je již dříve zmíněný bakteriální flavocytochrom P450 102A1 a také eukaryotní CPR.

Flavodoxin z *E. coli* váže řadu eukaryotních mikrosomálních cytochromů P450, tudíž by systém rozpustných proteinů flavodoxin reduktasa – flavodoxin mohl sloužit jako primární zdroj elektronů pro lidské CYP heterologně exprimované v této bakterii [126]. Při heterologní expresi lidského mikrosomálního CYP17A1 v *E. coli* byla *in vivo* pozorována katalytická aktivita vůči jeho přirozeným substrátům, ačkoliv nebyla koexprimována lidská CPR a *E. coli* systém cytochromů P450 přirozeně neobsahuje. Následně bylo *in vitro* prokázáno, že dodávání elektronů pro CYP17A1 je schopen právě flavodoxin a jeho reduktasa [127]. Další studie prokázaly, že systém FdR-Fld (a také FdR-Fd) dokáže dodávat elektrony lidským mikrosomálním cytochromům P450 1A2 a 3A4 [128, 129]. U všech uvedených příkladů byla katalytická aktivita hybridních systémů (FdR-Fld-CYP) nižší v porovnání s přirozeným systémem (CPR-CYP).

Na základě faktu, že přenos elektronů ve fúzním CYP102A1 je efektivnější než v případě rozdělených systémů byly také studovány umělé rozpustné fúzní proteiny složené z lidského mikrosomálního cytochromu P450 (bez membránové kotvy), flavodoxinu a flavodoxin reduktasy, případně flavoproteinové domény CYP102A1 [130]. Navíc v těchto systémech není třeba používat jako zdroj elektronů NADPH, fúzní systém CYP-Fld lze imobilisovat na povrch elektrod (samotný CYP nestačí, protože hem je příliš hluboko v proteinu). Takto byl studován například lidský CYP3A4 fúzovaný s Fld z *Desulfovibrio vulgaris* a flavoproteinovou doménou z CYP102A1 [131] nebo

lidský CYP2E1 s toutéž doménou [132]. Umělé fúzní systémy cytochromů P450 mají biotechnologické a bioanalytické aplikace.

1.5 Molekulové modelování

Techniky molekulového modelování mají za cíl simulovat co možná nejdělejší určité vlastnosti (elektrostatické či dynamické chování) chemických látek na počítači (*in silico*) v mikroskopickém měřítku, přičemž jde vždy o implementaci určitého zjednodušeného fyzikálního modelu atomů a molekul. Zejména u látek zajímavých pro biochemiky – makromolekul proteinů a DNA – je třeba se uchýlit ke značným aproximacím, neboť i výkon současných počítačů je omezený a výsledky simulace je žádoucí obdržet v přijatelném čase.

1.5.1 Kvantová mechanika a molekulová mechanika

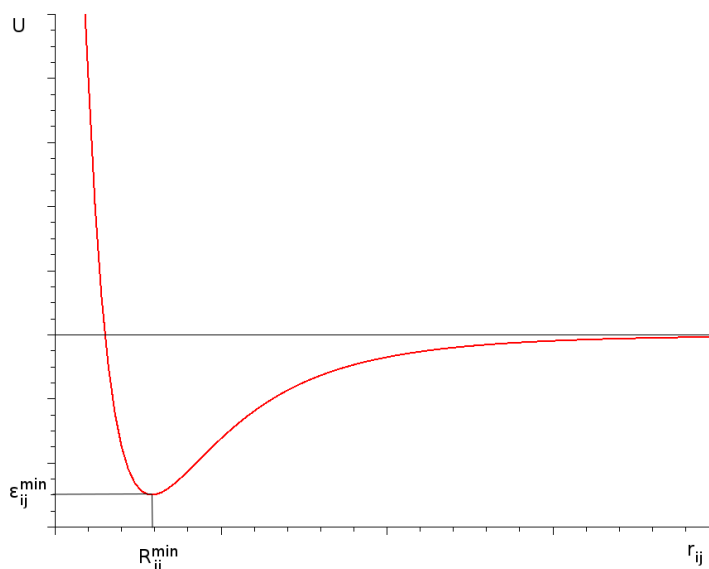
Kvantově-mechanické (QM) modely se snaží explicitně popsat chování elektronového obalu atomů, který je zodpovědný za jejich chemické vlastnosti. Existují dva základní přístupy: *ab initio* a semi-empirický. První z nich vychází čistě z elektronových konfigurací a spočívá v řešení Schrödingerovy rovnice, druhý se omezuje na interakce valenčních elektronů. Oba přístupy jsou vzhledem k výpočetní náročnosti aplikovatelné jen na nízkomolekulární látky, tudíž jsou pro biochemii zajímavé pouze okrajově, vždy lze simulovat jen malou část cílové biomolekuly. [133]

Molekulová mechanika (MM) se naproti tomu snaží aplikovat výpočetně poměrně nenáročné principy klasické fyziky na atomy a molekuly. Atomy jsou vnímány jako nabitě kuličky o různém poloměru a tvrdosti podle typu atomu, které jsou spojeny pružinami představující vazby, vazebné úhly a torzní úhly. Nevazebné interakce (van der Waalsovy a elektrostatické) jsou popsány pomocí jednoduchých vztahů. Aby takový model mohl fungovat, je třeba nadefinovat řadu empirických parametrů jako jsou van der Waalsovy poloměry atomů, konstanty tuhosti „pružin“, délky vazeb, velikosti vazebných a torzních úhlů a parciální náboje jednotlivých atomů. Soubor empirických parametrů pro všechny sloučeniny v simulaci je označován jako silové pole (angl. „force field“). Potenciální energii pro určitý atom lze v jednom z běžně používaných silových polí – poli CHARMM – vyjádřit tímto vztahem (vynechány dva ne vždy zahrnované

korekční členy) [134]:

$$\begin{aligned}
 U(\vec{R}) = & \sum_{\text{vazby}} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{úhly}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torze}} K_\varphi(1 + \cos(n\varphi - \delta)) \\
 & + \sum_{\substack{\text{nepravé} \\ \text{torze}}} K_\omega(\omega - \omega_0)^2 + \sum_{\text{nevazebné} \\ \text{páry}} \left\{ \underbrace{\varepsilon_{ij}^{\min} \left[\left(\frac{R_{ij}^{\min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}^{\min}}{r_{ij}} \right)^6 \right]}_{\text{Lennardův-Jonesův} \\ \text{potenciál}} + \underbrace{\frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon r_{ij}}}_{\text{Coulombův} \\ \text{zákon}} \right\} \quad (1)
 \end{aligned}$$

kde b symbolizuje délku vazby, θ velikost vazebného úhlu, φ velikost torzního úhlu, ω velikost nepravého torzního úhlu, symboly s indexem 0 jsou rovnovážné hodnoty daných parametrů a K jsou konstanty tuhosti. Van der Waalsovy interakce jsou reprezentovány Lennardovým-Jonesovým potenciálem (průběh okolo energetického minima a vysvětlení symbolů na obr. 10), elektrostatické interakce popisuje Coulombův zákon, kde q_i a q_j jsou náboje interagujících atomů, r_{ij} jejich vzdálenost a $\varepsilon_0\varepsilon$ je permitivita prostředí.



Obrázek 10: Průběh Lennardova-Jonesova potenciálu v blízkosti energetického minima (optimální vzdálenosti daných dvou atomů).

Je třeba zmínit, že MM přístup nebere vůbec v potaz možné přesuny elementárních částic, tudíž zanedbává jakékoli acidobazické nebo redoxní reakce v systému. Určitým

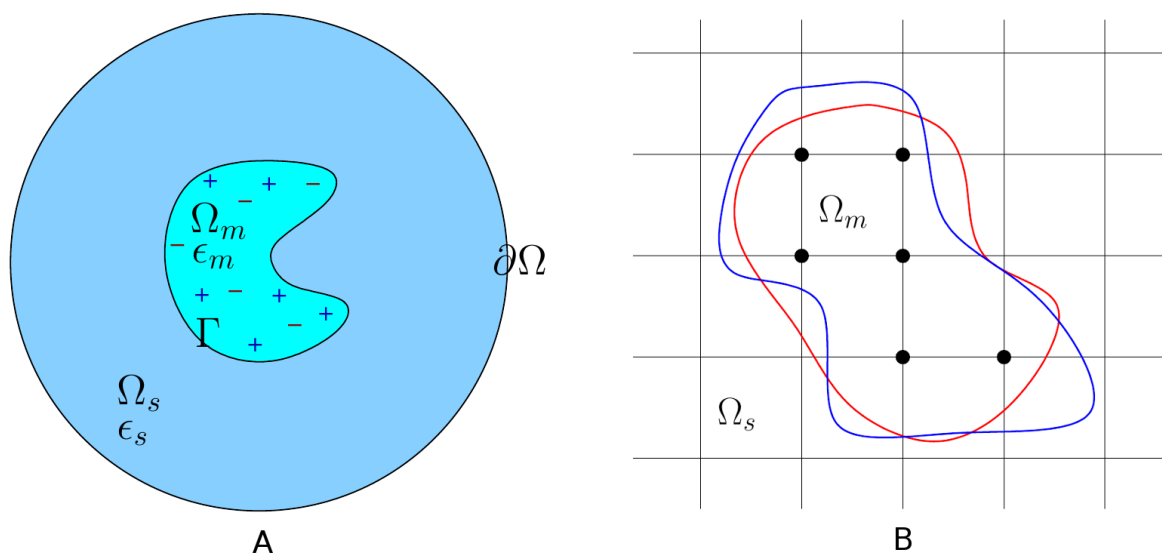
kompromisem je hybridní QM/MM přístup, který se hodí například pro studium mechanismů enzymové katalýzy [135]. Reakční centrum a substrát jsou simulovány pomocí QM, zbytek proteinu a rozpouštědlo tvořící pozadí pak pomocí výpočetně rychlejší MM [136].

1.5.2 Modely rozpouštědla

V MM (ale i v QM) obvykle nechceme simulovat systém skládající se pouze ze zkoumaných molekul (umístěných ve vakuu), ale abychom se přiblížili více realitě, potřebujeme simulovat i příslušné rozpouštědlo, kterým je v případě biomolekul takřka výhradně voda.

Jednou z možností jak reprezentovat vodu v MM je simulovat přímo jednotlivé její molekuly (tzv. explicitní rozpouštědlo). V tomto případě se na počátku simulace kolem biomolekuly rozmístí 5–10 Å široká vrstva molekul vody, s nimiž se pracuje stejně jako s ostatními prvky simulace. Do roztoku lze stejným způsobem přidat i další částice, např. ionty rozpuštěné soli. Jelikož však s počtem atomů vzrůstá i náročnost simulace, byly zavedeny tzv. „periodické boxy“, které umožňují simulovat nekonečné rozpouštědlo při zachování nízkých nároků na výpočetní výkon. Princip spočívá v obklopení simulovaného systému (ve tvaru krychle či kvádru) jeho identickými kopiemi, v nichž probíhají identické děje [137].

Druhou možností jak simulovat určité vlastnosti rozpouštědla obklopujícího molekulu je jednotlivé molekuly rozpouštědla nahradit kontinuem neboli implicitním rozpouštědlem. U Poisson-Boltzmannova modelu simulujeme pouze elektrostatické vlastnosti rozpouštědla, kde simulovaná molekula představuje prostředí s nízkou dielektrickou konstantou, zatímco její okolí s vysokou (obr. 11) [138]. Při znalosti parciálních nábojů jednotlivých atomů lze Poissonův-Boltzmannův model použít k výpočtu mapy elektrostatického potenciálu okolo např. proteinu nebo výpočtu vazebných energií [139]. Rychlejší aproximací Poisson-Boltzmannova modelu je zobecněný Bornův model (angl. „generalized Born“) vhodný pro simulace dynamiky biomolekul (viz dále) [140].

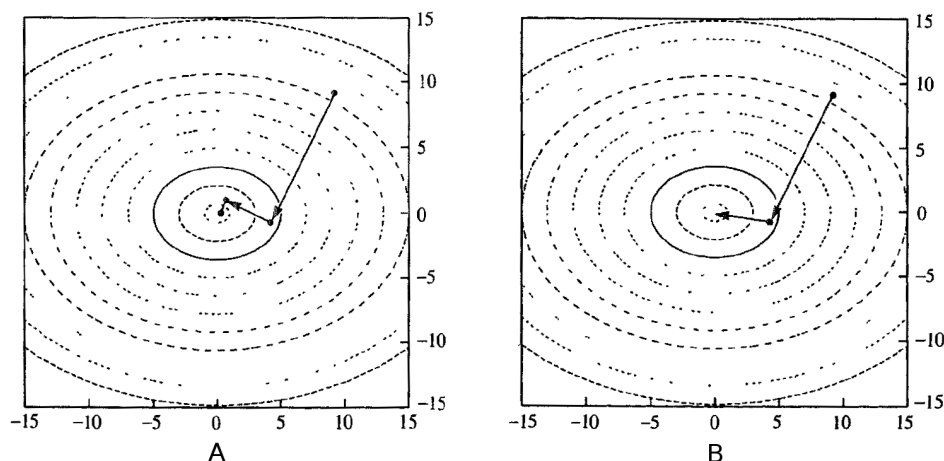


Obrázek 11: Schematické znázornění Poissonova-Boltzmannova modelu implicitního rozpouštědla (**A**) a numerické řešení pomocí rozdělení systému na body mřížky (**B**). Ω_m představuje oblast molekuly s dielektrickou konstantou ϵ_m , Ω_s a ϵ_s oblast rozpouštědla, $\partial\Omega$ je hranice simulované oblasti, Γ je povrch molekuly. Upraveno podle [138].

1.5.3 Energetická minimalizace struktury

Výchozí struktury pro simulace (např. krystalové struktury proteinů obklopené pravidelně rozmístěnými molekulami vody) nebývají v optimální konformaci. Pro další simulace je vhodné dostat strukturu do stabilního stavu, kdy má minimální celkovou energii v daném molekulově-mechanickém silovém poli, čehož docílíme nalezením minima multidimenzionální energetické funkce (rovnice (1)).

Ač existují i nederivační metody, většina používaných minimalizačních metod je založena na výpočtu prvních, případně druhých derivací energetické funkce a iterativním hledání minima. Metoda tzv. nejprudšího sestupu (angl. „steepest descent“) pohybuje strukturou vždy ve směru nejzápornějšího energetického gradientu a kolmo na předchozí směr (obr. 12 A), což může u ostrého minima vést k oscilacím. Metoda tzv. konjugovaného gradientu (angl. „conjugated gradient“) bere v potaz všechny předchozí kroky a mnohdy vede rychleji k cíli (obr. 12 B). Metody používající druhé derivace jsou výpočetně náročnější a navíc aplikovatelné pouze v blízkosti minima. [133]



Obrázek 12: Ilustrace minimalizačního algoritmu nejprudšího sestupu (**A**) a konjugovaného gradientu (**B**) na příkladu dvoudimenzionální funkce $x^2 + 2y^2$. Upraveno podle [133].

1.5.4 Molekulová dynamika

Molekulová dynamika (MD) se snaží simulovat experimentálně obtížně pozorovatelné dynamické chování molekul zpravidla v roztoku, tedy reálný pohyb v prostředí molekulově-mechanického silového pole (viz kapitola 1.5.1). Každému atomu je navíc oproti statické MM přiřazena hmotnost a rychlost, která je úměrná teplotě a je aplikován Newtonův pohybový zákon:

$$\frac{d^2x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i} \quad (2)$$

popisující pohyb částice o hmotnosti m_i podél jedné souřadnice x_i , kde F_{x_i} je síla působící na částici v tomto směru. Na základě tohoto vztahu lze zapsat diferenciální rovnici pro celý systém, kterou je následně třeba integrovat, abychom získali polohy a rychlosti všech částic v závislosti na čase, čehož je na počítači dosaženo metodami numerické integrace [141].

Pro provedení MD simulace potřebujeme výchozí strukturu biomolekuly získanou např. rentgenostrukturní analýzou, kterou je v případě použití explicitního rozpouštědla potřeba doplnit o molekuly vody tak, aby šel nadefinovat periodický box (viz kapitola 1.5.2). Poté je třeba provést minimalizaci výchozí struktury (případně molekul rozpouštědla), aby simulace začínala pokud možno ze stabilního stavu (viz kapitola 1.5.3). Pak jsou všem atomům přiděleny rychlosti pseudonáhodným algoritmem a následuje tzv. ekvilibrační fáze, během které je třeba systém šetrně „ohřát“ na požadovanou simulační teplotu (postupným zvyšováním teploty a odebráním pohybových

omezení proloženým minimalizacemi). Jakmile se ustálí průběh celkové energie systému (součet kinetické a potenciální energie), může se zahájit vlastní produkční fáze MD, během které sledujeme trajektorie atomů, energii systému a další parametry [142].

1.5.5 Řízená molekulová dynamika

Pro pozorování asociačních a disociačních reakcí nebo skládání a rozkládání struktury biomolekul často klasická MD nedostačuje, protože v časovém rámci MD (nanosekundy) je malá pravděpodobnost, že dojde k jevu, který chceme pozorovat. Proto byl zaveden systém tzv. řízené molekulové dynamiky (angl. „steered molecular dynamics“, SMD), během které je na část atomů v simulaci aplikována síla v určitém směru. Pro popis probíhajícího děje pak buď při konstantní rychlosti tažení sledujeme množství vynaložené práce v čase, případně změnu rychlosti pohybu v čase při aplikované konstantní síle tažení. Přípravná fáze je obvykle stejná jako u klasické MD, v produkční fázi je část systému zafixována a na jinou část je aplikována síla. [143, 144]

1.5.6 Simulace interakce biomolekul s ligandy a mezi sebou

Protože experimentální určování struktury biomolekul je zdlouhavý a nákladný proces, byly vyvinuty postupy anglicky zvané „docking“, tedy techniky spojování již známých struktur proteinů, nukleových kyselin a nízkomolekulárních ligandů do komplexů. Jedná se o zjednodušenou MD (či SMD) ve vakuu nebo implicitním rozpouštědle, která si klade za cíl navrhnout co nejvíce možných komplexů a podle určitých kritérií (tzv. skóre) najít ten nejlepší.

Tvorba komplexů protein-ligand je kromě studia substrátové specifity enzymů zajímavá především pro návrh nových léčiv ve formě specifických aktivátorů nebo inhibitorů endogenních či parazitických enzymů a receptorů [145]. Obvykle se vytvářejí komplexy jednoho proteinu s knihovnou ligandů s cílem najít mezi nimi ten, který se bude nejlépe vázat do aktivního místa. Ligand je většinou plně konformačně flexibilní, zatímco protein pro zjednodušení bývá zcela rigidní. Nově se zavádí i určitá flexibilita do molekuly proteinu, např. je umožněna rotace postranních řetězců aminokyselin v aktivním místě [146].

Při předpovídání komplexů protein-protein (případně protein-nukleová kyselina) se

celý problém stává výpočetně náročnějším a je třeba vypracovat systém aproximací, který umožní v reálném čase prozkoumat stovky možných konformací. Nejjednodušší je „docking“ rigidních těles, kdy jeden protein je obvykle statický a druhý kolem něj vykonává rotační a translační pohyb, přičemž uvnitř proteinů neprobíhají žádné pohyby (natahování a ohýbání vazeb). Interakce mezi nimi je vyhodnocována čistě na základě elektrostatických a van der Waalsových interakcí (komplementarity povrchů). Pokud je proteinům umožněna flexibilita, obvykle tomu stejně předchází rigidní fáze následovaná uvolněním postranních řetězců aminokyselin v kontaktu [147].

Pro urychlení a zpřesnění předpovídání proteinových komplexů je možné proces omezit na základě experimentálně (nebo sekvenčním srovnáním) získaných dat např. ve formě aminokyselinových zbytků, která mají být v kontaktu. Jedním z programů aplikujících tento přístup je HADDOCK, který umožňuje definovat aktivní (v kontaktu) a pasivní (poblíž aktivních) aminokyselinové zbytky. V poslední fázi také umožňuje flexibilitu nejen postranních řetězců, ale i hlavního řetězce, což dovolí do určité míry prozkoumat i vzájemné přizpůsobení interagujících partnerů [148].

2 Cíle práce

Širším cílem předkládané práce bylo ověřit nově zaváděnou metodiku počítačové predikce protein-protein komplexů a to na modelu komplexů lidských cytochromů P450. Proteinovým partnerem interagujícím s cytochromy P450 byl malý bakteriální flavoprotein – flavodoxin. Primárním cílem bylo ověřit teorii, že by flavodoxin mohl být zodpovědný za redukci savčích CYP produkovaných v bakteriální buňce během heterologní exprese. Dílčími cíli pak bylo připravit a ekvilibrovat vstupní struktury pro všechny participující proteiny, navrhnout sérii potenciálních struktur heterodimerů flavodoxinu s jednotlivými CYP metodou protein-protein „docking“, vybrat nejstabilnější komplexy pomocí metod molekulové dynamiky a následně je zoptimalizovat a strukturně porovnat. Nakonec pak získaná data ohledně energetiky a struktury komplexů korelovat s experimentálními výsledky popisujícími efektivitu redukce studovaných CYP v bakteriální buňce.

3 Metody

3.1 Použité programy

V tabulce 4 jsou vyjmenovány programy použité pro počítačové simulace molekul v této práci. Kromě nich byla použita řada nástrojů ze standardní výbavy systému Linux jako jsou nástroje pro zpracování textu (např. sed, awk, grep), skriptovací jazyk příkazového řádku bash a skriptovací jazyk Perl. Pro tvorbu grafů byly použity nástroje Grace a QtiPlot, pro tabulkové zpracování dat pak LibreOffice Calc.

Tabulka 4: Programy použité pro počítačové simulace v této práci.

Program	Verze	Citace	Použití
APBS	1.3	[149]	výpočet mapy elektrostatického potenciálu
Gaussian	09	[150]	<i>ab initio</i> QM
lsq	–	[151]	lineární regrese dle Yorcka
NAMD	2.9	[152]	MD, SMD
pdb2pqr	1.8	[153, 154]	příprava vstupů pro APBS
PyMol	1.5.0.1	[155]	vizualizace molekul
Solvate	1.0	[156]	solvatace struktury proteinů
VMD	1.9.1	[157]	vizualizace molekul, příprava vstupů pro MD

3.2 Počáteční struktury proteinů

Struktury proteinů ve formě 3D souřadnic ve formátu pdb byly získány z volně přístupné proteinové databanky (www.pdb.org). Všechny struktury byly rozřešeny rentgenovou krystalografií, další údaje shrnuje tabulka 5. Struktury všech lidských CYP neobsahují souřadnice pro N-koncovou membránovou kotvu, navíc CYP1A2 a CYP3A4 mají i C-koncovou delecii, u CYP3A4 také chybí souřadnice aminokyselin 282 – 285, u CYP2C19 pak 132 – 141. Strukturám bakteriálních CYP101A1 a CYP176A1 chybí souřadnice aminokyselin na N i C konci, flavodoxinu chybí první methionin. U CYP3A4 byl chybějící úsek doplněn technikou homologního modelování (viz kap. 3.3), u struktury CYP2C19 byla chybějící smyčka doplněna podle sousedního (jinak méně vhodného) řetězce C. Koncové delecce nebyly modelovány u žádné ze struktur. Dále byly ze struktur odebrány všechny nízkomolekulární látky kromě kofaktorů a ligandů v aktivním centru.

Tabulka 5: Údaje o strukturách proteinů použitých pro počítačové simulace v této práci.

Protein	Organismus	PDB ID (řetězec)	Rozlišení [Å]	Substrát / inhibitor
CYP1A2	člověk	2HI4 (A)	1,95	α -naftoflavon
CYP2A6	člověk	1Z10 (C)	1,90	kumarin
CYP2A13	člověk	2P85 (A)	2,35	indol
CYP2C9	člověk	1OG5 (B)	2,55	(S)-warfarin
CYP2C19	člověk	4GQS (D)	2,87	*
CYP3A4	člověk	1TQN (A)	2,05	–
CYP101A1	<i>P. putida</i>	2CPP (A)	1,63	kafr
CYP176A1	<i>C. braakii</i>	4FB2 (B)	1,37	–
flavodoxin	<i>E. coli</i>	1AG9 (A)	1,80	–

* (4-hydroxy-3,5-dimethylfenyl)(2-methyl-1-benzofuran-3-yl)methanon

3.3 Homologní modelování struktur proteinů

Pro tvorbu homologních modelů struktur proteinů byl použit server SWISS-MODEL [158] v automatickém režimu, kde byla zadána aminokyselinová sekvence cílového proteinu získaná z volně přístupné databáze UniProt (www.uniprot.org) a případně PDB ID struktury, která měla být použita jako vzor. Výsledná struktura byla stažena ve formátu pdb, případně byly doplněny ligandy ze vzorové struktury a bylo sjednoceno ID řetězce a čísla atomů a molekul.

3.4 Návrh proteinových komplexů technikou flexibilního „docking“

Pro návrh možných komplexů cytochromu P450 a flavodoxinu byl použit program HADDOCK dostupný přes webové rozhraní (haddock.chem.uu.nl) [159] v expertním režimu. Struktury proteinů byly vloženy v pdb formátu, přičemž byly odstraněny molekuly vody. Jako aktivní byl u cytochromu P450 nastaven konzervovaný, železo koordinující cystein, pasivní zbytky byly zvoleny automaticky. U flavodoxinu byl jako aktivní nastaven Y94, jako pasivní pak W57 a FMN. Pokud vykazovala daná struktura N nebo C delecí, byl příslušný konec nastaven jako nenabitý. Počet struktur pro rigidní „docking“ byl nastaven na 3000, počet struktur pro semi-flexibilní vytrídění byl nastaven na 400. Všechny ostatní parametry byly ponechány na přednastavených hodnotách. Výsledné struktury byly uspořádány do klastrů, ve kterých byl parametr RMSD (angl.

„root mean square deviation“, odmocnina střední kvadratické odchylky) menší než 7,5 a minimální počet struktur v klastru byl 4. Z každého klastru byl vybrán zástupce s nejlepším skóre a dále analyzován v programu PyMol.

3.5 Silové pole pro MM

Molekulárně-mechanické simulace byly prováděny v silovém poli CHARMM (verze 27) obsahujícím v této práci použité parametry pro standardní aminokyseliny, vodu a ionty [160]. Parametry pro molekulu hemu, α -naftoflavonu a hem-thiolátovou vazbu byly vytvořeny Mgr. Petrem Jeřábkem, Ph.D.

Pro ostatní molekuly substrátů CYP a také pro FMN bylo třeba vytvořit nové soubory parametrů, a proto byla provedena *ab initio* QM optimalizace struktury příslušné molekuly (nebo její části) v programu Gaussian algoritmem Hartree-Fock za použití báze 6-31+G(d) v implicitní vodě a byly vypočteny parciální náboje atomů optimalizované struktury algoritmem ESP. Posléze byly jednotlivým atomům v nově parametrizovaných molekulách přiřazeny atomové typy na základě podobnosti s již definovanými molekulami v silovém poli. Chybějící délky vazeb a velikosti vazebných a torzních úhlů byly doplněny podle struktury optimalizované QM. Dále byly definovány nepravé torze pro udržení planarity aromatických molekul. Vibrační konstanty byly zvoleny na základě srovnání s podobnými vazbami a úhly v silovém poli. Silové pole pro FMN bylo vytvořeno na základě dříve publikovaných parametrů [161], přičemž parciální náboje isoalloxazinového kruhu byly upraveny podle výše zmíněného QM výpočtu a koncový fosfát byl protonován na kyslíku O1P na základě srovnání chování různě protonovaných variant FMN během MD flavodoxinu.

3.6 Molekulová dynamika v explicitním rozpouštědle

U proteinových komplexů navržených programem HADDOCK byly rekonstruovány atomy vodíku, ion Fe^{3+} a byla navracena krystalová voda z původních struktur interagujících proteinů. Na základě predikce serverem WHATIF [162] a vizuální kontroly byly v pdb souboru nastaveny protonační stavy histidinů a dále byly kofaktory a voda přejmenovány v souladu s názvy v MM silovém poli. Následně byl pomocí rozšíření „AutoPSF“ programu VMD vytvořen soubor ve formátu psf obsahující parciální ná-

boje atomů na základě parametrů silového pole. Poté byl použit program Solvate, který doplnil chybějící molekuly vody do dutin a v okruhu 3 Å okolo proteinu. Pak byly přidány další molekuly vody pomocí VMD (rozšíření „Solvate“) ve formě kvádrů tak, aby na každou stranu od struktury proteinu dosahovala tloušťka vrstvy vody aspoň 10 Å. Rozměry kvádrů byly v rozmezí cca. 50x55x55–100x110x125 Å, velikost simulovaného systému obvykle přesahovala 100 000 atomů. V takto vytvořeném explicitním rozpouštědle byly některé molekuly vody nahrazeny ionty draslíku a chloru rozšířením VMD „Autoionize“ tak, aby byl neutralizován náboj proteinu a celková koncentrace KCl v roztoku byla 0,15 mol.dm⁻³. Výsledkem byly soubory ve formátu pdb a psf, které sloužily jako vstupní struktura pro MD.

Struktura proteinu s rozpouštědlem byla podrobena ekvilibračnímu protokolu uvedenému v tabulce 6 při teplotě 310 K a standardním tlaku užitím programu NAMD. Byl definován periodický box na základě rozměrů krychle rozpouštědla zvětšených o 1 Å v každém směru. Ostatní parametry byly ponechány na standardních hodnotách. Během ekvibrace byly zaznamenávány trajektorie atomů ve formátu dcd.

Tabulka 6: Ekvilibrační protokol pro MD v explicitním rozpouštědle.

č.	Krok [fs]	Minimalizace [kroky]	Dynamika [ps]	Fixované / brzděné*
1	0,1	1000	0,5	protein, kofaktory (f)
2	1	–	50	protein, kofaktory (f)
3	1	1000	50	protein, kofaktory (b)
4	1	1000	50	hlavní řetězec (b)**
5	1	1000	200	–
6	2	–	100	–

* na brzděné atomy byla aplikována brzdící práce 1 kcal.mol⁻¹ oproti předchozí minimalizované struktuře.

** byly brzděny pouze těžké atomy hlavního řetězce.

V produkční fázi byla prováděna 1–20 ns dlouhá MD simulace se stejnými parametry jako ve fázi 6 ekvibrace, trajektorie byly zaznamenávány každých 1000 kroků pro další analýzu v programu VMD.

3.7 Molekulová dynamika v implicitním rozpouštědle

Příprava struktur proteinů byla analogická s přípravou pro MD explicitním rozpouštědlem s vynecháním všech kroků zahrnujícím molekuly vody a iontů, případně byly

molekuly krystalové vody odstraněny.

Ekvilibrace byla provedena podle protokolu v tabulce 7 při teplotě 310 K v implicitním rozpouštědle užitím programu NAMD. Byl použit zobecněný Bornův model, kde dielektrická konstanta rozpouštědla byla nastavena na 74,1 a iontová síla na $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$.

Tabulka 7: Ekvilibrační protokol pro MD v implicitním rozpouštědle.

č.	Krok [fs]	Minimalizace [kroky]	Dynamika [ps]	Brzděné atomy*
1	1	1000	5	vše
2	1	1000	100	hlavní řetězec**

* na brzděné atomy byla aplikována brzdící práce 1 kcal.mol^{-1} oproti předchozí minimalizované struktuře.

** byly bržděny pouze těžké atomy hlavního řetězce.

3.8 MD se změnou rozpouštědla – optimalizace homologních modelů

Pro optimalizaci struktur homologních modelů byl navržen kombinovaný protokol MD. Do modelové struktury byla doplněna voda ze struktury templátu a byly rekonstruovány vodíky v programu VMD. Jako fixované byly definovány těžké atomy hlavního řetězce proteinu, kofaktorů a kyslíky vody. Následovalo 1000 kroků minimalizace a 200 ps MD s 1 fs krokem v implicitním rozpouštědle za analogických podmínek jako v kapitole 3.7. Struktura byla po této optimalizaci poloh postranních řetězců podrobena solvataci a ekvilibračnímu protokolu v explicitním rozpouštědle následovanému 4 ns dlouhou produkční fází (viz kap. 3.6).

3.9 Řízená molekulová dynamika

Pro řízenou molekulovou dynamiku (SMD) byla struktura komplexu cytochrom P450 – flavodoxin orientována tak, aby osa y byla kolmá na tu stranu CYP, kam se váží redoxní partneri (proximální strana hemu) a podrobena ekvibraci popsané v kapitole 3.7. Během SMD provedené programem NAMD byly fixovány C_{α} uhlíky CYP a uhlíky hemu příp. substrátu. Na C_{α} uhlíky Fld byla aplikována brzdící práce $0,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ve směru osy x a z . C_{α} uhlíky Fld a dusík N10 FMN byly taženy podél osy y směrem

od CYP konstantní rychlostní $20 \text{ \AA} \cdot \text{ns}^{-1}$ do vzdálenosti 25 \AA . Každých 20 kroků byla zaznamenána síla potřebná k udržení konstantní rychlosti, která byla poté přepočtena na práci dodanou pro odtažení flavodoxinu do dané vzdálenosti dle vztahu:

$$W = \sum_{\text{kroky}} \frac{-Fv n}{69,479} \quad (3)$$

kde F je aplikovaná síla, v je rychlost tažení v \AA na krok MD, n je počet MD kroků na výpis aplikované síly, ve jmenovateli je převodní konstanta. Od takto vypočtené práce bylo dále odečteno pozadí – lineární regrese průměrné práce (provedeny tři nezávislé běhy) potřebné k tažení samotného flavodoxinu rozpouštědlem. Každých 500 kroků byly zaznamenávány trajektorie atomů ve formátu `dcd`, které byly analyzovány v programu VMD.

3.10 Korelační analýza

Pro sledování vztahu mezi stupněm redukce CYP heterologně exprimovaných v bakteriích a jejich interakcí s bakteriálním flavoproteinem (flavodoxinem) byla použita metoda vážené regrese dle Yorka [163], která bere v úvahu směrodatnou odchylku nejen v souřadnici y , ale také x . Korelační koeficient byl určen na základě vzorce pro vážený korelační koeficient:

$$R = \frac{\sum w_i (x_i - \bar{x}_w)(y_i - \bar{y}_w)}{\sqrt{\sum w_i (x_i - \bar{x}_w)^2} \sqrt{\sum w_i (y_i - \bar{y}_w)^2}} \quad (4)$$

kde x_i a y_i představují souřadnice korelovaných bodů, \bar{x}_w a \bar{y}_w jejich vážené průměry a w_i jejich váhy, které byly určeny stejným vztahem jako při Yorkově vážené regresi:

$$w = \frac{1}{a^2 \sigma_x^2 + \sigma_y^2} \quad (5)$$

kde σ_x a σ_y jsou odchylky v souřadnici x resp. y , a je odhad směrnice regresní přímky (na začátku Yorkovy regrese určený metodou nejmenších čtverců bez uvažování odchylek a upravovaný iterativně, při výpočtu R použita výsledná směrnice Yorkovy regrese).

Hladina významnosti P byla určena dvouvýběrovým t-testem.

3.11 Výpočet a vizualizace elektrostatického potenciálu

Struktura pro výpočet elektrostatického potenciálu užitím Poissonova-Boltzmannova modelu implicitního rozpouštědla byla pomocí programu pdb2pqr konvertována do pqr formátu, který obsahuje parciální náboje a van der Waalovy poloměry všech atomů (obojí bylo vzato z používaného MM silového pole). Program pdb2pqr zároveň generoval vstupy pro APBS, které byly modifikovány – byla ponechána pouze část výpočtu s rozdílnou dielektrickou konstantou proteinu a rozpouštědla, teplota byla nastavena na 310 K a byly přidány ionty s nábojem ± 1 (reprezentující KCl) v koncentraci $0,15 \text{ mol.dm}^{-3}$. Následně byla pomocí programu APBS vypočtena mapa elektrostatického potenciálu v formátu dx, která byla později vizualizována v programu VMD formou isokontury na hladině $\pm 2kT/e$.

4 Výsledky

4.1 Experimentální data

Výsledky simulací byly srovnávány s experimentálními daty čerpanými z literatury [23] (data v tabulce 8). Jedná se procento redukováného cytochromu P450 v intaktních buňkách *E. coli*, které nesly rekombinantní plasmid s genem pro daný CYP, ovšem jejich přirozený redoxní partner nebyl koexprimován. Procento redukce bylo vypočteno vztahem koncentrace redukováného CYP za normálních podmínek k jeho koncentraci po přidání externího redukčního činidla. Koncentrace redukované formy CYP byla stanovena diferenční spektroskopií Fe^{2+} -CO vs. Fe^{2+} .

Lidské cytochromy P450 se dají dle dat v tabulce 8 rozdělit na dvě hlavní skupiny: ty které jsou z podstatné části redukovány ($> 80\%$ redukováno, CYP1A2, 2A6, 2A13 a 2C19) a ty spíše neredukované ($< 33\%$ redukováno, CYP2C9 a 3A4). U zahrnutých bakteriálních CYP je pak CYP101A1 spíše redukován a CYP176A1 spíše neredukován. Uvedená experimentální data jsou ve většině případů zatížena větší chybou (někdy až $\pm 20\%$).

Tabulka 8: Procento redukováného CYP v intaktních buňkách *E. coli*. Data čerpána z [23].

CYP	procento redukce
1A2	86 ± 11
2A6	92 ± 20
2A13	104 ± 4
2C9	33 ± 9
2C19	96 ± 20
3A4	18 ± 10
101A1	80 ± 2
176A1	20 ± 4

4.2 Návrh komplexů cytochrom P450 – flavodoxin

Komplexy cytochrom P450 – flavodoxin byly získány ze struktur partnerů technikou řízeného „docking“ pomocí programu HADDOCK. Krystalová struktura CYP2C19 byla publikována až v závěru vypracovávání této práce, a proto jsou zde uvedeny i výsledky pro komplexy homologního modelu CYP2C19 vytvořeného podle v této práci

použité struktury CYP2C9. Model byl před použitím optimalizován MD se změnou rozpouštědla. Údaje o 2–4 klastrech komplexů pro každý CYP s nejlepším skóre, největším kontaktním povrchem a nejmenší vzdáleností redoxních center (vzdálenost nejbližších těžkých atomů hemu resp. síry cysteinu a FMN) vybraných pro další studium uvádí tabulka 9.

Tabulka 9: Vybrané nejlepší komplexy CYP-Fld navržené programem HADDOCK.

CYP	Klastr	HADDOCK skóre [kcal.mol ⁻¹]	Kontaktní povrch* [Å ²]	Vzdálenost redoxních center** [Å]
1A2	1	-79 ± 6	1550 ± 160	12,4
	2	-140 ± 5	1980 ± 160	13,0
	3	-147 ± 4	2140 ± 110	9,5
	4	-152 ± 3	2140 ± 80	8,9
2A6	1	-118 ± 2	1730 ± 40	8,5
	2	-111 ± 7	2010 ± 320	13,1
2A13	1	-144 ± 4	2090 ± 50	9,5
	2	-111 ± 9	1580 ± 220	9,1
	3	-101 ± 5	1680 ± 80	10,8
2C9	1	-143 ± 11	2190 ± 60	10,3
	2	-120 ± 7	1570 ± 150	16,6
2C19 krystal	1	-150 ± 6	2330 ± 100	6,5
	2	-163 ± 7	2310 ± 90	9,4
	3	-131 ± 7	1850 ± 40	14,2
2C19 model	1	-55 ± 4	1490 ± 40	12,7
	2	-51 ± 10	1550 ± 60	12,9
	3	-71 ± 5	2010 ± 80	6,5
3A4	1	-114 ± 4	1630 ± 150	11,8
	2	-152 ± 9	2070 ± 130	11,1
101A1	1	-113 ± 11	1890 ± 50	9,8
	2	-67 ± 3	1260 ± 80	10,6
	3	-69 ± 13	1380 ± 180	10,2
176A1	1	-142 ± 5	1990 ± 90	16,5
	2	-97 ± 7	1460 ± 30	13,0

* angl. „buried surface area“

** vzdálenost nejbližších těžkých atomů hemu (příp. cysteinové síry) CYP a FMN flavodoxinu

Jsou patrné značné rozdíly v HADDOCK skóre mezi jednotlivými CYP, nicméně pouze na základě tohoto parametru nelze dle předchozích zkušeností v naší skupině přímo usuzovat, který CYP tvoří nejstabilnější komplex s Fld ani která orientace je v rámci jednoho CYP nejstabilnější. Zajímavější informaci dává vzdálenost redoxních

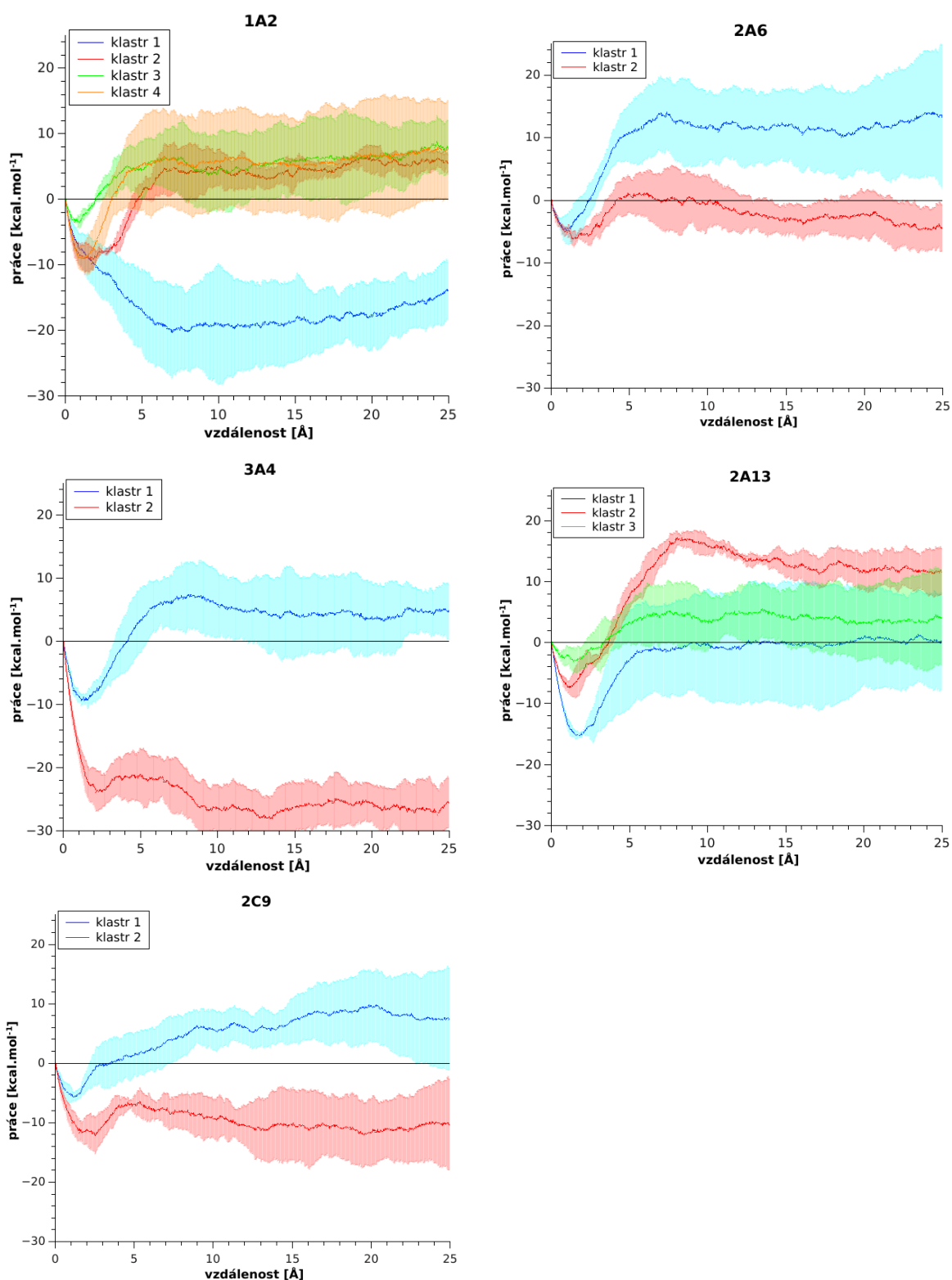
center, ač je taktéž poněkud zkreslená, jak se ukázalo dále v této práci. Proto byly uvedené komplexy podrobeny studiu stability rigorosnějšími technikami molekulové dynamiky, pro které byla z každého z uvedených klastrů vybrána reprezentativní struktura s nejlepším skóre.

4.3 Řízená disociace komplexů pomocí SMD

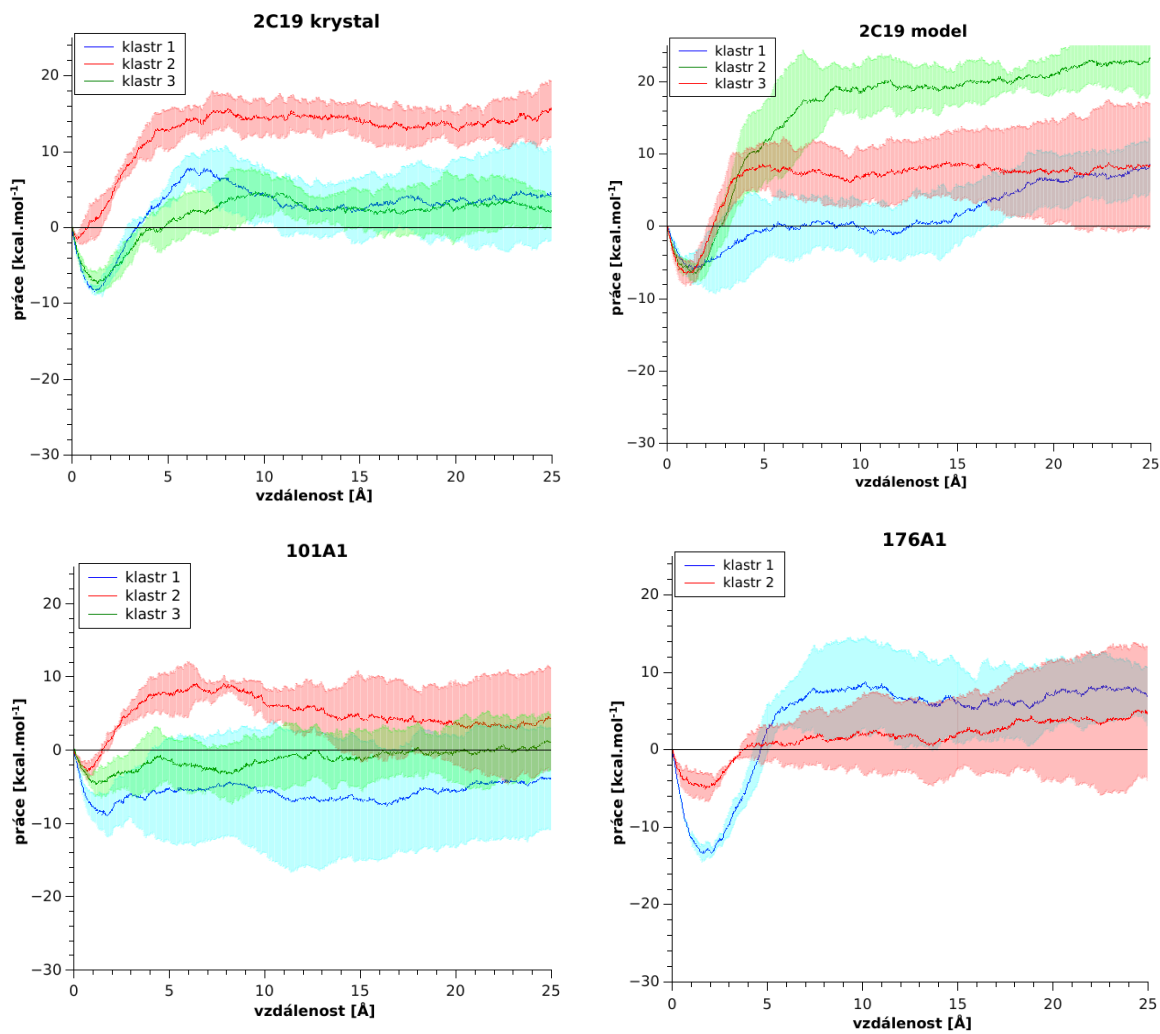
Výše vybrané 2–4 nejlepší komplexy s flavodoxinem pro každý cytochrom P450 byly za účelem detailnějšího studia stability podrobeny řízené disociaci užitím techniky SMD v implicitním rozpouštědle. Fld byl odtahován konstantní rychlostí od CYP do vzdálenosti 25 Å a byla měřena vynaložená práce. Pro každý komplex byly provedeny 3–4 paralelní běhy, z nichž byla vypočtena závislost průměrné vynaložené práce na vzdálenosti odtahovaných partnerů a po odečtení pozadí (linearizovaný průběh tažení samotného Fld rozpouštědlem) vynesena včetně směrodatné odchylky do grafů zvlášť pro každý CYP (obr. 13 a 14 str. 38 a 39). Na většině grafů jde vynaložená práce nejprve do záporných hodnot (samovolná optimalizace komplexu), dosahuje minima při odtahování o 1–3 Å, odkud začíná práce narůstat. U zcela nestabilních komplexů (CYP1A2 klastr 1 a CYP3A4 klastr 2) pokračuje samovolná disociace dále. Přibližně nad 10 Å se vynaložená práce již výrazně nemění.

Celková průměrná práce potřebná k disociaci daného komplexu byla tedy určena odečtením minima této závislosti od průměrné hodnoty práce v konstantní části grafu, za kterou byl považován úsek 10–20 Å (tabulka 10 str. 40), přičemž pokud byl celkový trend vynakládané práce klesající, nebylo minimum odečítáno. Ve většině případů šlo na základě práce vynaložené na jeho roztržení vybrat nejstabilnější klastr pro každý CYP, který byl studován dále. U CYP1A2 byl vzhledem k blízkým hodnotám disociačních prací v dalším kroku studován i druhý nejstabilnější klastr v pořadí (klastr 2).

Celková vynaložená práce pro nejstabilnější komplex každého z cytochromů P450 s flavodoxinem (tj. s nejvyšší disociační prací, tabulka 10 str. 40 tučně zvýrazněné) byla korelována s experimentálně zjištěným procentem redukovaného CYP při heterologní expresi v intaktních buňkách *E. coli* (tabulka 8 str. 35) pomocí lineární regrese dle Yorka, která bere v úvahu odchylku obou veličin, jenž je u obou významná. Lineární regrese pro různé skupiny CYP byly vyneseny do grafů včetně korelačních koeficientů,



Obrázek 13: Grafy závislosti průměrné práce vynaložené na tažení Fld od příslušného CYP konstantní rychlostí na vzdálenosti odtažení. Světle zvýrazněné zóny představují směrodatnou odchylku.



Obrázek 14: Grafy závislosti průměrné práce vynaložené na tažení Fld od příslušného CYP konstantní rychlostí na vzdálenosti odtažení (2. část). Světle zvýrazněné zóny představují směrodatnou odchylku.

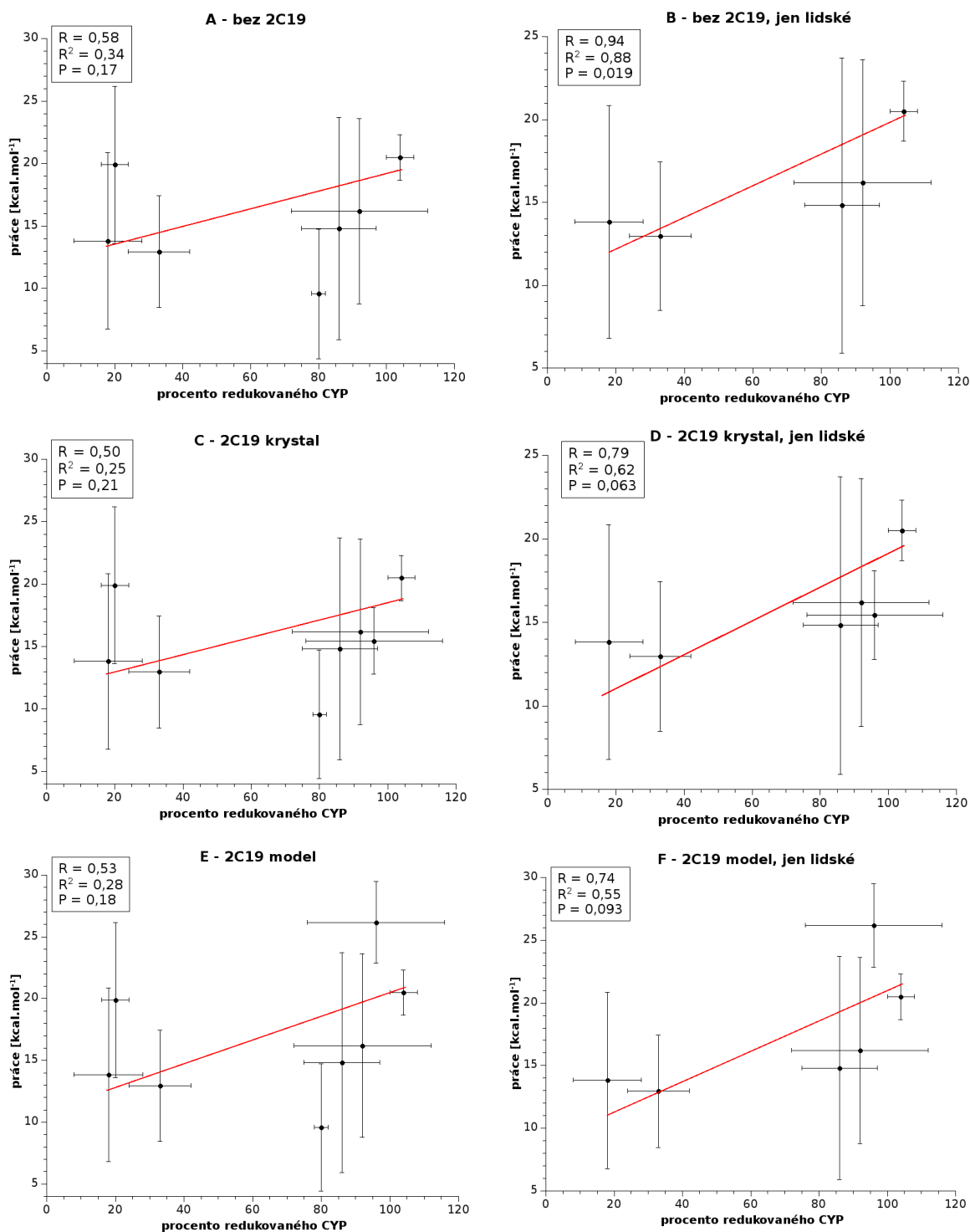
Tabulka 10: Průměrné práce potřebné k roztržení jednotlivých komplexů CYP-Fld. Tučně je zvýrazněn nejstabilnější komplex pro každý CYP.

CYP	klastr	minimum [kcal.mol ⁻¹]	konstantní úsek* [kcal.mol ⁻¹]	celková práce [kcal.mol ⁻¹]
1A2	1	0,0	-5,9	-19 ± 7
	2	-9,1	4,4	13 ± 2
	3	-3,4	5,7	9 ± 7
	4	-9,1	5,7	15 ± 9
2A6	1	-4,7	11,5	16 ± 7
	2	-6,1	-2,4	4 ± 3
2A13	1	-15,0	-0,3	15 ± 11
	2	-7,2	13,3	20 ± 2
	3	-2,9	4,2	7 ± 6
2C9	1	-5,7	7,2	13 ± 4
	2	-11,6	-10,6	1 ± 6
2C19 krystal	1	-8,2	3,0	11 ± 5
	2	-1,4	14,0	15 ± 3
	3	-7,2	2,7	10 ± 3
2C19 model	1	-5,8	2,2	8 ± 5
	2	-6,3	7,9	14 ± 6
	3	-6,4	19,8	26 ± 3
3A4	1	-9,3	4,5	14 ± 7
	2	0,0	-26,3	-26 ± 4
101A1	1	-10,0	-6,4	4 ± 10
	2	-2,8	4,7	10 ± 5
	3	-4,8	-0,7	2 ± 4
176A1	1	-13,4	6,5	20 ± 6
	2	-4,8	2,3	7 ± 7

* průměrná hodnota práce ve vzdálenosti odtažení 10–20 Å

koeficientů determinace a hladin významnosti určených z korelačních koeficientů dvou-
výběrovým t-testem (obrázek 15).

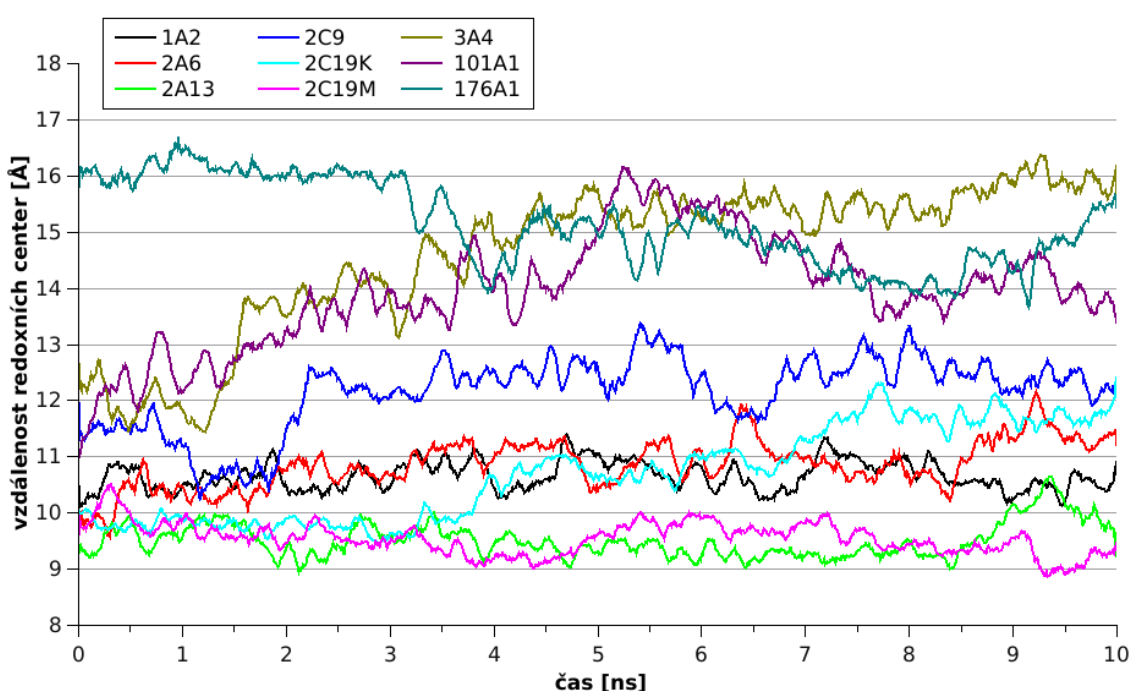
Při zahrnutí bakteriálních CYP (obr. 15 **A**, **C** a **E**) nelze pozorovat žádnou signifikantní souvislost ($P > 0,1$, tedy je více než 10% šance, že souvislost je jen náhodná, navíc $R \approx 0,5$). Při uvažování pouze lidských CYP pozorujeme signifikantní korelaci ($P = 0,02$) pouze v případě lidských CYP1A2, 2A6, 2A13, 2C9 a 3A4 (obr. 15 **B**). Krystal (obr. 15 **D**) nebo model (obr. 15 **F**) CYP2C19 korelaci oslabují (dochází ke zvýšení P na 0,06 resp. 0,09 a snížení R na 0,8–0,7).



Obrázek 15: Korelace práce potřebné k roztržení nejstabilnějších komplexů CYP-Fld (viz tabulka 10 str. 40 tučně zvýrazněné) s experimentálně určeným procentem redukovaného CYP při heterologní expresi v *E. coli* (viz tabulka 8 str. 35). V grafech je uveden korelační koeficient R , koeficient determinace R^2 a hladina významnosti P určená z R dvouvýběrovým t -testem. V grafu **A** jsou korelována data pro lidské CYP1A2, 2A6, 2A13, 2C9 a 3A4 a bakteriální 101A1 a 176A1. V grafu **B** pak jen data pro zmíněné lidské CYP. V grafech **C** a **D** je navíc zahrnut nejstabilnější komplex krystalu CYP2C19, v grafech **E** a **F** pak modelu CYP2C19.

4.4 Stabilita komplexů během MD v explicitním rozpouštědle

Z komplexů cytochrom P450 – flavodoxin byl pro každý CYP vybrán jeden, na jehož disociaci musela být vynaložena nejvyšší práce během tažení konstantní rychlostí (tabulka 10 str. 40 tučně zvýrazněné) a ten byl podroben dalšímu zkoumání stability v realitě bližším explicitním rozpouštědle. Byl sledován vývoj vzdálenosti redoxních center během 10 ns MD v explicitní vodě, přičemž byla sledována vždy vzdálenost nejblížejších atomů konjugovaného systému hemu (resp. koordinující síry cysteinu) a FMN určených po ekvilibrační fázi MD (viz tabulka 11). Závislost vzdálenosti redoxních center na čase simulace byla vynesena do grafu (obrázek 16).



Obrázek 16: Vývoj vzdálenosti redoxních center cytochromů P450 a flavodoxinu (konkrétní atomy viz tabulka 11) během 10 ns MD nejstabilnějších komplexů (viz. tabulka 10 str. 40) v explicitním rozpouštědle (vodě). U CYP2C19 je zobrazen jak nejstabilnější komplex pro krystalovou strukturu (K), tak pro optimalizovaný homologní model (M).

U většiny CYP lze pozorovat mírný nárůst vzdálenosti přibližně o 1 Å, u CYP3A4 a 101A1 pak výraznější nárůst o 3–4 Å. U CYP176A1 po cca 4 ns dochází k poklesu, nicméně v závěru se vzdálenost redoxních center opět vrací na původní poměrně vysokou hodnotu. Vzhledem k blízkým hodnotám disociační práce dvou nejstabilnějších komplexů u CYP1A2 byl proveden výpočet také pro jeho druhý nejstabilnější komplex (klastr 2), přičemž byl pozorován prudký nárůst vzdálenosti redoxních center až na

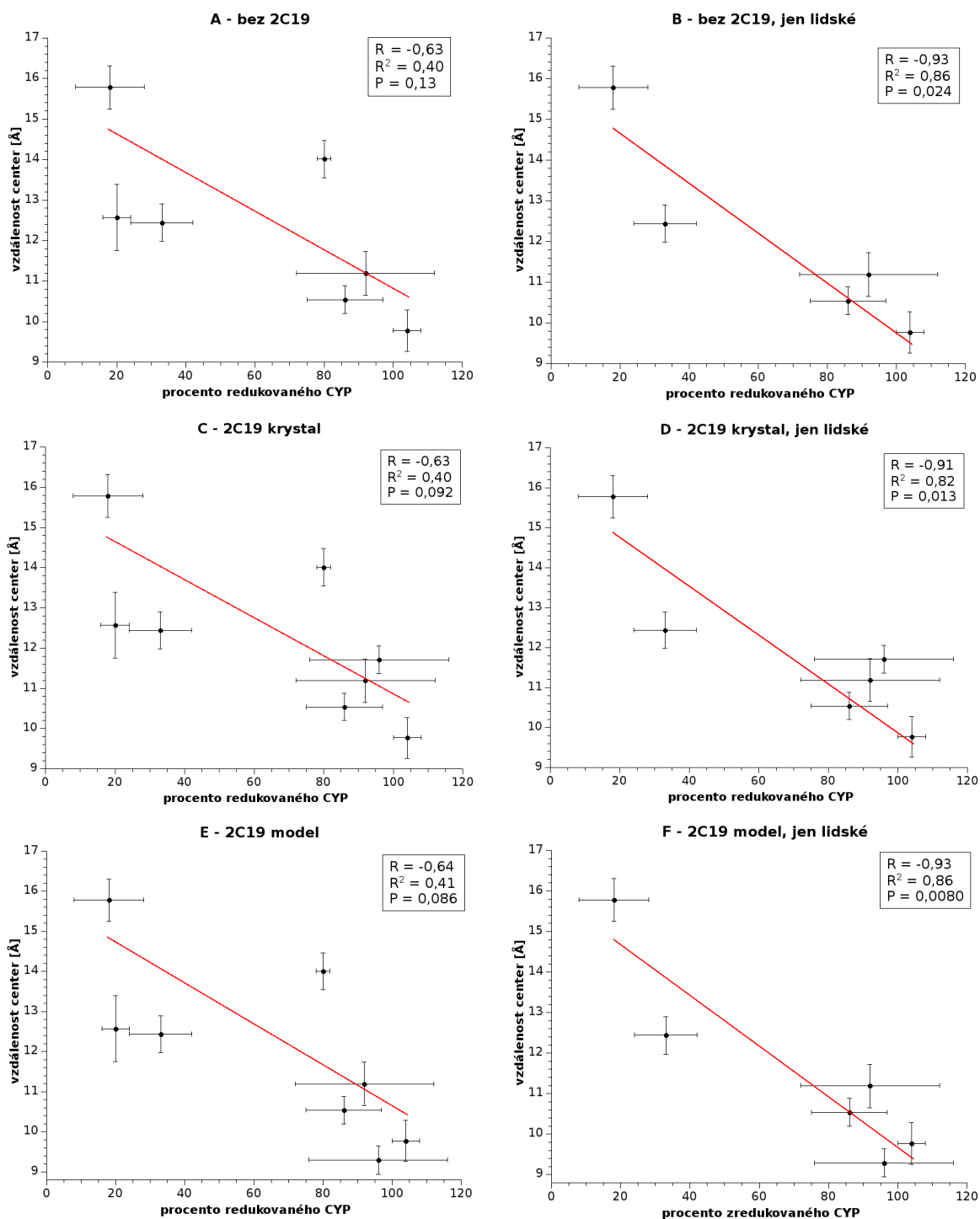
cca. 19 Å (data nejsou uvedena), což potvrdilo jeho nižší stabilitu a tento komplex dále nebyl sledován. Vzdálenost redoxních center v optimalizovaném komplexu byla určena z průměrných hodnot během posledních 20 % MD simulace (tabulka 11).

Tabulka 11: Tabulka průměrných vzdáleností redoxních center optimalizovaných komplexů CYP-Fld.

CYP	Reprezentující atomy (hem – FMN)	Průměrná vzdálenost [Å]
1A2	S (Cys) – C7M	10,5 ± 0,3
2A6	S (Cys) – C7M	11,2 ± 0,5
2A13	S (Cys) – C7M	9,8 ± 0,5
2C9	S (Cys) – C7M	12,4 ± 0,5
2C19K	S (Cys) – C7M	11,7 ± 0,4
2C19M	S (Cys) – C7M	9,3 ± 0,4
3A4	S (Cys) – C7M	15,8 ± 0,5
101A1	S (Cys) – C8M	14,0 ± 0,5
176A1	S (Cys) – C7M	14,6 ± 0,6

Průměrná vzdálenost redoxních center byla korelována s experimentálně zjištěným procentem redukováného CYP při heterologní expresi v intaktních buňkách *E. coli* (tabulka 8 str. 35) pomocí lineární regrese dle Yorka zohledňující chybu hodnot na obou osách. Lineární regrese pro různé skupiny CYP (ve shodě s kapitolou 4.3) byly vyneseny do grafů včetně korelačních koeficientů, koeficientů determinace a hladin významnosti určených z korelačních koeficientů dvouvýběrovým t-testem (obrázek 17).

Při zahrnutí bakteriálních CYP (obr. 17 **A**, **C** a **E**) nepozorujeme signifikantní souvislost ($P > 0,05$, tedy je více než 5% šance, že se jedná jen o náhodnou souvislost a $R \approx -0,6$). Naopak ve všech případech uvažující pouze lidské CYP (obr. 17 **B**, **D** a **F**) lišící se nezahrnutím či zahrnutím různých modelů CYP2C19 pozorujeme silnou a signifikantní korelaci ($P = 0,008-0,02$, $R \approx -0,9$).

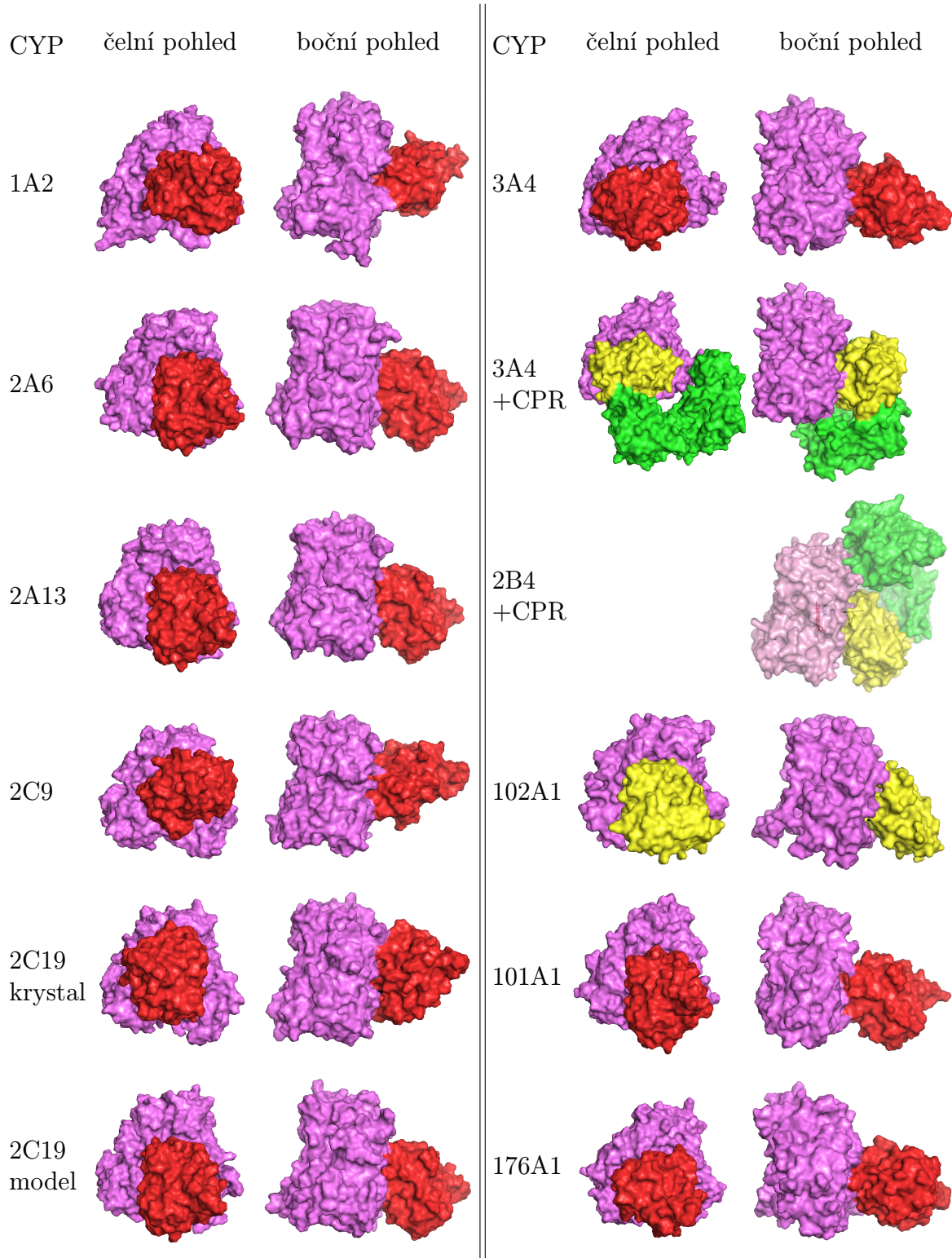


Obrázek 17: Korelace průměrné vzdálenosti redoxních center u vybraných nejstabilnějších komplexů po optimalizaci MD v explicitní vodě (8.–10. ns MD, viz tabulka 11 str. 43) s experimentálně určeným procentem redukovaného CYP při heterologní expresi v *E. coli* (viz tabulka 8 str. 35). V grafech je uveden korelační koeficient R , koeficient determinace R^2 a hladina významnosti P určená z R dvouvýběrovým t -testem. V grafu **A** jsou korelována data pro lidské CYP1A2, 2A6, 2A13, 2C9 a 3A4 a bakteriální 101A1 a 176A1. V grafu **B** pak data jen pro zmíněné lidské CYP. V grafech **C** a **D** je navíc zahrnut nejstabilnější komplex krystalu CYP2C19, v grafech **E** a **F** pak modelu CYP2C19.

4.5 Struktury nejstabilnějších komplexů

Struktura nejstabilnějšího komplexu s Fld pro každý CYP byla vizualizována formou van der Waalsova povrchu v programu PyMol a byly vytvořeny snímky čelního (směrem na proximální stranu CYP) a bočního pohledu (o 90° otočený podle svislé osy) na každý komplex (obrázek 18), přičemž cytochromy P450 byly na základě strukturní podobnosti srovnány do stejné pozice. Během 10 ns dlouhé MD v explicitním rozpouštědle se u všech zmíněných komplexů změnila pozice interagujících partnerů jen nepatrně (data nezobrazena). Mezi Fld a FMN podjednotkami evolučně pokročilejších reduktas cytochromů P450 existuje značná strukturní podobnost (kapitola 1.4.2), a proto byly pro porovnání orientací stejným způsobem vytvořeny snímky komplexu CYP3A4 s lidskou CPR (struktura modelu komplexu byla převzata z literatury [164]) a hemové a FMN podjednotky fúzního CYP102A1 (krystalová struktura, PDB ID 1BVY). Krom toho byl do obr. 18 zařazen boční pohled na model komplexu králíčího CYP2B4 s CPR převzatý z literatury [29] (vlastní 3D souřadnice bohužel nebyly publikovány).

Na obrázku 18 lze pozorovat dvě skupiny CYP tvořící nejstabilnější komplex s Fld v podobné orientaci – skupina CYP1A2 a 2C9 a skupina CYP2A6, 2A13 a 2C19 model, přičemž druhá jmenovaná orientace je blízká orientaci podjednotek v krystalu fúzního CYP102A1 a orientaci FMN domény CPR v převzatém modelu komplexu CYP2B4-CPR. U dalších výraznou podobnost již nelze pozorovat.



Obrázek 18: Struktury nejstabilnějších komplexů CYP-Fld získaných v této práci vizualizované formou van der Waalsova povrchu v čelním a bočním pohledu. Dále je zde zobrazena převzatá struktura komplexu CYP-CPR [164], hemová a FMN doména CYP102A1 (PDB ID 1BVY) a převzatý boční pohled na komplex CYP2B4-CPR [29]. CYP je zobrazen fialově, Fld červeně, FMN doména CPR resp. CYP102A1 žlutě.

4.6 Mapy elektrostatického potenciálu

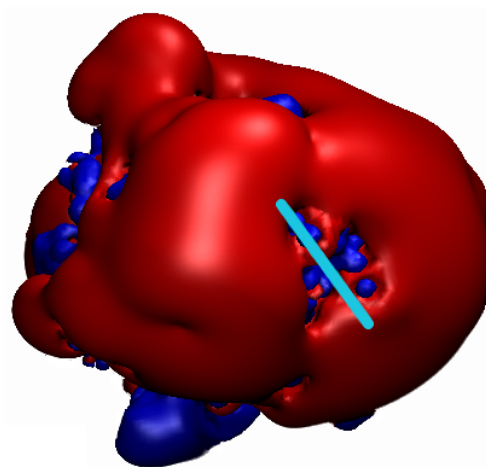
Elektrostatické vlastnosti v této práci studovaných proteinů byly charakterizovány jejich celkovým nábojem (tabulka 12, uvažovány byly pouze aminokyseliny vyskytující se ve struktuře). Lidské CYP jsou celkově neutrální až pozitivně nabitě, zatímco bakteriální CYP a flavodoxin negativně nabitě. Celkový náboj CYP nekoreluje ani s experimentálně zjištěným procentem redukovaného CYP, ani s charakteristikami komplexů CYP-Fld vypočtenými v této práci.

Proto byla pro přesnější a názornější ilustraci elektrostatických sil působících mezi cytochromy P450 a flavodoxinem vypočtena mapa elektrostatického potenciálu pro jejich vstupní struktury. Dále byla tato mapa vypočtena pro všechny CYP po optimalizaci 10 ns MD v explicitní vodě v jejich nejstabilnějším komplexu s Fld. Elektrostatický potenciál byl vizualizován formou isokontury (flavodoxin viz obr. 19, cytochromy P450 obr. 20, 21 a 22). Zatímco elektrostatický povrch flavodoxinu poblíž FMN je podle očekávání negativně nabitý, u všech CYP včetně bakteriálních pozorujeme na proximální straně zřetelnou, byť různě intenzivní oblast pozitivního náboje.

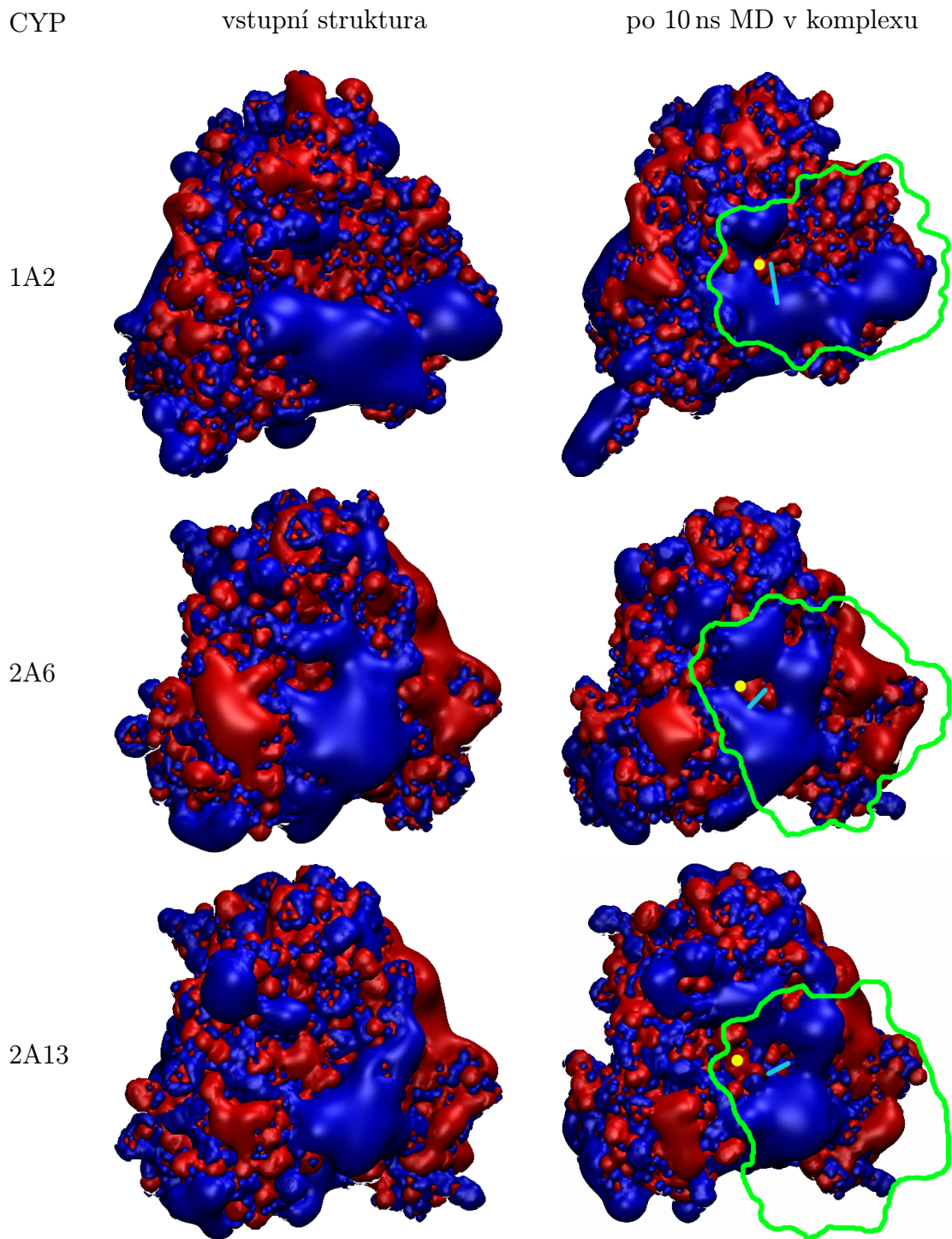
V pravé části obr. 20–22 pozorujeme indukované přizpůsobení cytochromu P450 vazbě na flavodoxin. Je patrné rozestoupení nabitých aminokyselinových zbytků před hydrofobním isoaloxazinovým kruhem FMN a přeskupení a někdy zvýraznění oblastí pozitivního potenciálu okolo negativně nabitě čelní strany Fld. Nejmarkantnější přizpůsobení lze pozorovat u původně nevýrazně pozitivně nabitě proximální strany CYP3A4.

Tabulka 12: Celkový náboj struktur proteinů použitých pro simulace v této práci, uvažovány stejné protonační stavy histidinů jako během MD.

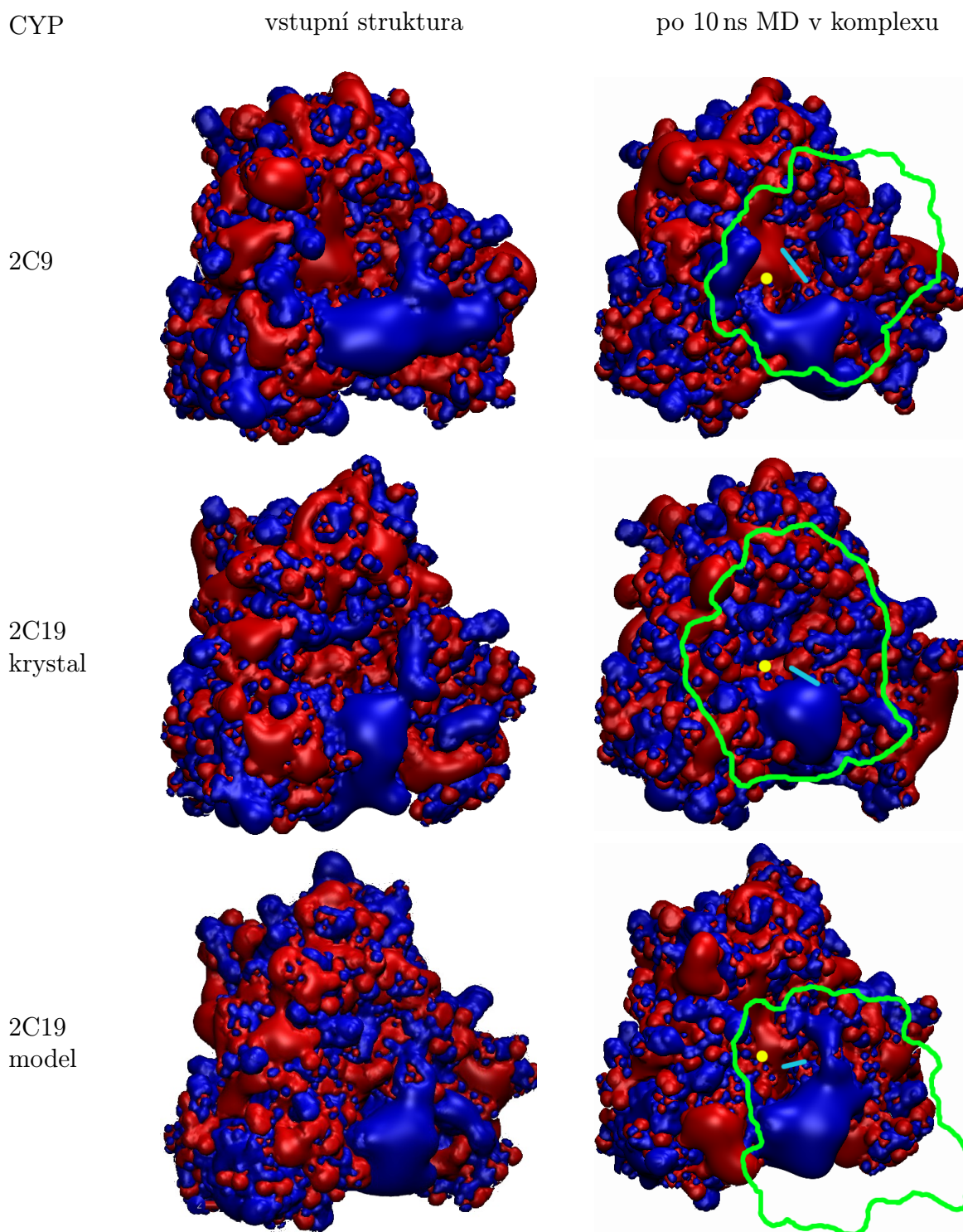
Protein	Celkový náboj
CYP1A2	11
CYP2A6	7
CYP2A13	8
CYP2C9	2
CYP2C19	0
CYP3A4	6
CYP101A1	-15
CYP176A1	-14
flavodoxin	-22



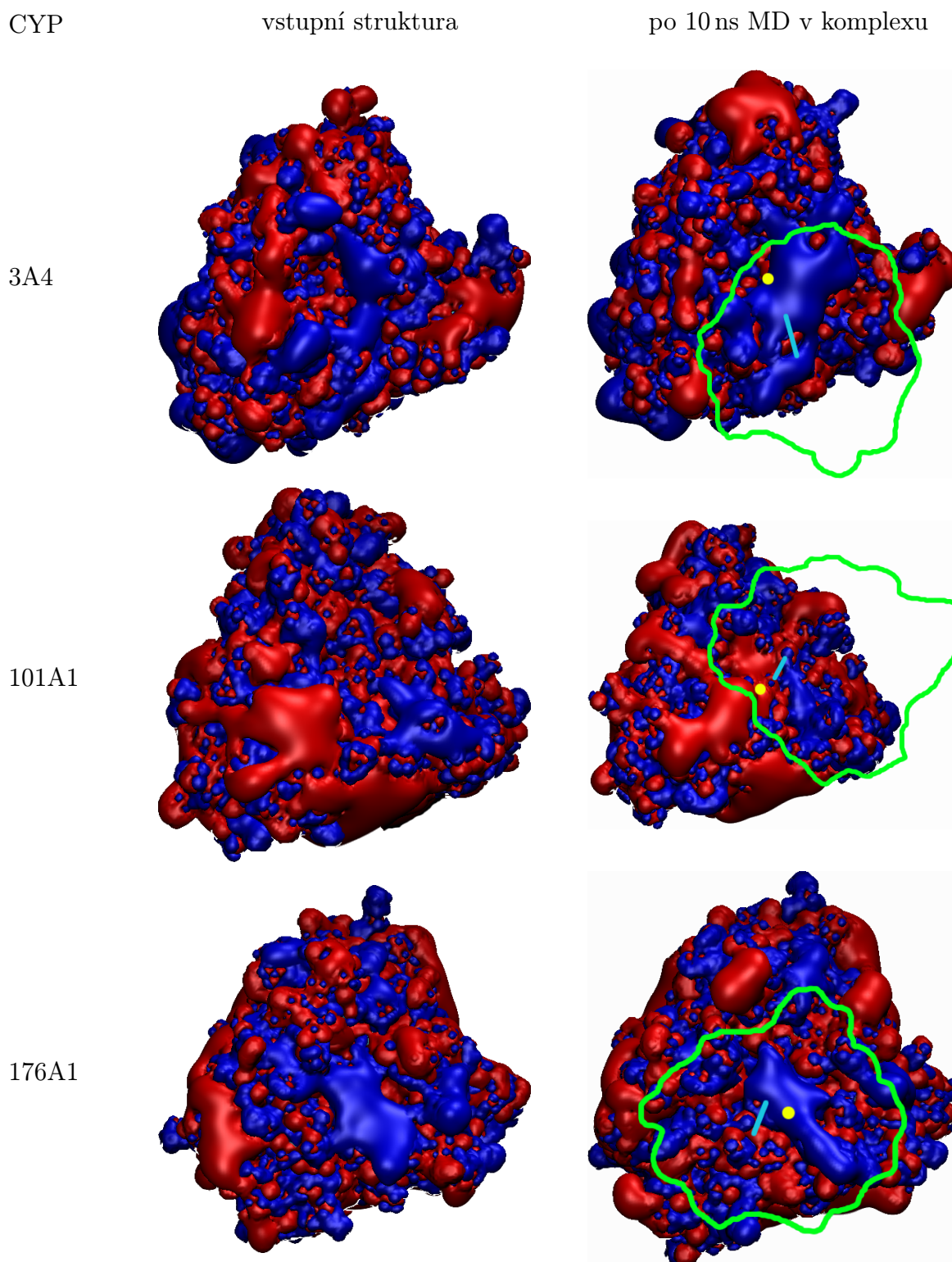
Obrázek 19: Mapa elektrostatického potenciálu flavodoxinu v pohledu na stranu, která se váže na CYP. Modrá barva znázorňuje pozitivní elektrostatický potenciál, červená negativní. Světle modrou čarou je naznačena pozice FMN.



Obrázek 20: Mapa elektrostatického potenciálu CYP1A2, 2A6 a 2A13 pro jejich vstupní struktury a struktury po 10 ns MD komplexu s Fld v explicitní vodě reprezentovaná isokonturou na hladině $\pm 2kT/e$. Modrá barva znázorňuje pozitivní elektrostatický potenciál, červená negativní. Zeleně je naznačen obrys flavodoxinu, světle modrá čára reprezentuje pozici FMN a žlutá tečka polohu železa v hemu CYP.



Obrázek 21: Mapa elektrostatického potenciálu CYP2C9 a 2C19 krystalu i modelu pro jejich vstupní struktury a struktury po 10 ns MD komplexu s Fld v explicitní vodě reprezentovaná isokonturou na hladině $\pm 2kT/e$. Modrá barva znázorňuje pozitivní elektrostatický potenciál, červená negativní. Zeleně je naznačen obrys flavodoxinu, světle modrá čára reprezentuje pozici FMN a žlutá tečka polohu železa v hemu CYP.



Obrázek 22: Mapa elektrostatického potenciálu CYP3A4, 101A1 a 176A1 pro jejich vstupní struktury a struktury po 10 ns MD komplexu s Fld v explicitní vodě reprezentovaná isokonturou na hladině $\pm 2kT/e$. Modrá barva znázorňuje pozitivní elektrostatický potenciál, červená negativní. Zeleně je naznačen obrys flavodoxinu, světle modrá čára reprezentuje pozici FMN a žlutá tečka polohu železa v hemu CYP.

5 Diskuse

V průběhu této práce byly navrženy možné komplexy lidských isoform cytochromů P450 1A2, 2A6, 2A13, 2C9, 2C19 a 3A4 a bakteriálních isoform 101A1 a 176A1 s přenašečem elektronů z *Escherichia coli* flavodoxinem. Pro CYP2C19 byly použity dvě vstupní struktury – homologní model (vysoce homologní CYP2C9 použit jako templát) a teprve v průběhu vypracovávání práce publikovaná krystalová struktura. Postupně byly vybrány nejpravděpodobnější vzájemné orientace, které byly analyzovány a míra jejich stability a vzdálenost redoxních center byly korelovány s experimentálními daty.

Program HADDOCK použitý k predikci možných orientací řadí všechny navržené komplexy podle parametru HADDOCK skóre, ve kterém se odráží elektrostatické a van der Waalsovy síly působící v komplexu, ale také míra splnění vstupních požadavků pro interagující aminokyselinové zbytky [148], což může vést ke zkreslení skóre v případě jejich nesprávné volby. Velmi podobné konformace sdružuje do klastrů, které jsou reprezentovány strukturou s nejlepším skóre. Pro stabilitu komplexu je dále důležitý velký kontaktní povrch a pro efektivní přenos elektronů pak vzdálenost redoxních center pod 14 Å, přičemž čím menší je jejich vzdálenost, tím efektivnější je přenos [165]. Na základě těchto parametrů byly pro další studium vybrány 2–4 varianty komplexů pro každý CYP.

Během řízené disociace těchto komplexů technikou SMD došlo ve většině případů zprvu k optimalizaci pozice interagujících partnerů, což se projevilo jako úbytek vynaložené práce. Po odtažení o 1–3 Å začala práce krom zcela nestabilních komplexů prudce narůstat, až se při odtažení nad 10 Å ustálila na konstantní hodnotě (viz obr. 13 a 14 str. 38 a 39). Jelikož nad vzdálenost atomů 10 Å přestávají při MD působit nevazebné interakce (tzv. „cutoff“), dá se zde ustálení vývoje práce očekávat. Jako celková práce reprezentující míru stability komplexu pak byl (vyjma zcela nestabilních komplexů) vzat rozdíl minima grafu a konstantního úseku.

Při srovnání dat v tabulce 9 str. 36 a 10 str. 40 je patrné, že čistě na základě výsledků z programu HADDOCK nelze posuzovat stabilitu komplexů. Například potenciálně nejlepší komplex u CYP3A4 (klastr 2) se během SMD ukázal jako zcela nestabilní tj. práce vynaložená k odtažení Fld byla záporná. To by mohlo být přičteno na vrub zjednodušením používaným během procesu „docking“, např. absence expli-

citního rozpouštědla a velmi krátká doba optimalizace komplexu. Některé potenciálně nejlepší komplexy se ukázaly být méně stabilní než by se dalo usoudit z HADDOCK skóre (klastr 2 u CYP2A6, klastr 1 u CYP2A13, klastr 1 u CYP2C19 krystalu a klastr 1 u CYP101A1), nicméně zde lze tento rozpor ve výsledcích přičíst také vysoké směrodatné odchylce skóre a/nebo vynaložené práce.

Komplexy vykazující nejvyšší disociační práci pro každý CYP byly dále optimalizovány molekulovou dynamikou v explicitním rozpouštědle (vodě), které představuje dokonalejší model prostředí v okolí proteinu než výpočetně podstatně méně náročný implicitní model vody. Vzdálenosti redoxních center vybraných nejstabilnějších komplexů CYP-Fld jsou až na komplex CYP176A1-Fld po optimalizaci v explicitní vodě vyšší než u vstupních struktur těchto komplexů (srovnání tabulky 9 str. 36 a 11 str. 43), podobně jako při řízené disociaci se interagující partneři vzdálí o 1–4 Å. Tento jev ukazuje na nadměrné přiblížení interagujících proteinů programem HADDOCK v důsledku snahy dostat nadefinované aktivní zbytky do kontaktu. U většiny sledovaných komplexů CYP-Fld vzdálenost redoxních center roste pouze mírně. Výraznější změna je pozorovatelná pouze u CYP3A4, 101A1 a 176A1 (obrázek 16 str. 42), což ukazuje v případě zvětšování vzdálenosti na nižší stabilitu komplexů CYP3A4 a 101A1. Jedině u CYP176A1 se vzdálenost snižuje, což koreluje s vysokou stabilitou tohoto komplexu zjištěnou během řízené disociace.

Získaná data je třeba považovat za relativní údaje (zejména v případě disociačních prací systematicky nadhodnocených kvůli významné ireverzibilní složce v celkové práci), a proto bylo nezbytné k vyvození opodstatněných závěrů získané hodnoty korelovat s dostupnými experimentálními daty – procentem redukováného cytochromu P450 *in vivo* při heterologní expresi v buňkách *E. coli*. Korelační analýzou jsem se snažil potvrdit hypotézu, že za redukci studovaných isoformů CYP je v bakteriálním systému v nepřítomnosti jeho přirozeného redoxního partnera zodpovědný flavodoxin, a že podíl redukováného CYP souvisí se stabilitou komplexu CYP-Fld a vzdáleností mezi redoxními centry (hem-FMN).

Mezi *in silico* stanovenou pevností nejstabilnějšího komplexu CYP-Fld reprezentovanou celkovou prací vynaloženou na jeho disociaci a experimentálně určeným procentem redukováného CYP nebyla při zahrnutí pěti až šesti eukaryotických a dvou bakteriálních CYP prokázána souvislost (obr. 15 **A**, **C** a **E** str. 41). Avšak v případě

skupiny lidských CYP1A2, 2A6, 2A13, 2C9 a 3A4 (obr. 15 **B**) byla pozorována signifikantní korelace na hladině významnosti $P < 0,05$. Je tedy pravděpodobné, že v případě jmenovaných lidských CYP existuje souvislost mezi celkovou prací vynaloženou na disociaci komplexu CYP-Fld a experimentálně určeným procentem redukovaného CYP, což u těchto lidských CYP podporuje představu Fld jako hlavního redoxního partnera v expresním systému *E. coli*. Z výsledné hodnoty $P = 0,02$ také plyne, že existuje asi dvouprocentní pravděpodobnost, že by pozorovaná souvislost byla jen náhodná. Přidání krystalové struktury či homologního modelu CYP2C19 (obr. 15 **D** resp. **F**) ke zmíněné skupině lidských CYP korelaci mírně zhoršuje (P se dostává nad hranici signifikance 0,05), což vnáší pochybnosti ohledně správnosti vstupní hypotézy, ale také ohledně kvality obou struktur CYP2C19 (viz diskuse níže).

Mezi vzdáleností redoxních center v optimalizovaném nejstabilnějším komplexu a procentem redukovaného CYP při heterologní expresi je taktéž pozorovatelná souvislost pouze při nezahrnutí bakteriálních CYP. Pro všechny varianty, kde jsou zahrnuty pouze lidské CYP (obr. 17 str. 44 **B,D,F**), lze pozorovat signifikantní korelaci na hladině významnosti $P = 0,008 - 0,02$. Takto prokázaná souvislost dále podporuje hypotézu, že za redukci lidských CYP v expresním systému *E. coli* je zodpovědný právě Fld, přičemž míra redukce souvisí nepřímo se vzdáleností redoxních center (čemuž odpovídá pozorovaný záporný korelační koeficient). Tento fakt také odpovídá v literatuře popsanému vztahu mezi vzdáleností redoxních center a rychlostí přenosu elektronů [165].

Je zřejmé, že bakteriální cytochromy P450 zcela nezapadají do vstupní hypotézy provedených korelací, tedy že je za redukci heterologně exprimovaných CYP zodpovědný především Fld a že je pro redukci klíčový stabilní komplex CYP-Fld s co nejnižší vzdáleností redoxních center. U CYP101A1, který tvoří neočekávaně nestabilní komplexy, si to lze vysvětlovat odlišností jeho redoxního systému od ostatních studovaných CYP, neboť jeho přirozeným partnerem na rozdíl od ostatních studovaných proteinů není flavoprotein, ale FeS protein putidaredoxin, a tudíž by za poměrně vysoké procento redukovaného CYP101A1 při heterologní expresi v *E. coli* (80 %) mohl být zodpovědný jemu podobnější ferredoxin. CYP176A1 sice v přirozeném systému interaguje s flavoproteinem (cindoxinem), flavodoxin se na něj dle zde prezentovaných výsledků váže silně, ale tento komplex vykazuje i po optimalizaci poměrně velkou vzdálenost redoxních center (kolem 15 Å). Přenos elektronů tak probíhá mnohem pomaleji

a flavodoxin by pak mohl vzhledem k poměrně vysoké stabilitě tohoto komplexu celý proces dokonce inhibovat.

Na stabilitu výsledného komplexu má samozřejmě také vliv kvalita vstupních dat, v tomto případě především struktura jednotlivých CYP. Vliv rozdílné kvality vstupní struktury CYP lze pozorovat na případu modelů pro CYP2C19, kde byl použit jak homologní model (založený na vysoce příbuzném CYP2C9), tak koordináty zjištěné experimentálně. Stability jejich nejlepších komplexů se dosti liší, $26 \pm 3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (model) a $15 \pm 3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (krystal), stejně jako vzdálenosti redoxních center v optimalizované struktuře, $9,3 \pm 0,4 \text{ \AA}$ (model) a $11,7 \pm 0,4 \text{ \AA}$ (krystal). Zařazení jednoho či druhého výsledku má přesto na celkovou korelaci podobný vliv (obr. 15 str. 41 resp. obr. 17 str. 44 **C,D,E,F**). Horší stabilitu komplexu vycházejícího z krystalové struktury CYP2C19 by mohl vysvětlit fakt, že použitá struktura má nižší rozlišení ($2,87 \text{ \AA}$) a na rozdíl od všech ostatních CYP zahrnutých ve studii vykazovala četné krystalografické kontakty v části, kam se váže CPR (resp. Fld), tudíž nemusí zcela odpovídat reálné konformaci monomeru CYP2C19 v roztoku. Na strukturu homologního modelu je i přes její poměrně dlouhou optimalizaci v explicitním rozpouštědle třeba nahlížet jako na potenciálně méně přesnou reprezentaci reálného proteinu. Problémem homologních modelů často bývá jejich tendence se až příliš blížit struktuře templátu. V přípravě použitého modelu CYP2C19 je ovšem dobrým signálem to, že vykazuje velmi vysokou stabilitu komplexu s flavodoxinem, zatímco templát (CYP2C9) tvoří jen málo stabilní komplex. Model CYP2C19 pravděpodobně tímto nedostatkem příliš netrpí.

Popsaným procesem vybrané nejstabilnější komplexy CYP-Fld byly strukturně porovnány jednak mezi sebou, ale také s publikovanými modely savčích komplexů CYP-CPR, jakožto i s krystalovou strukturou hemové a FMN domény fúzního flavocytochromu CYP102A1, jenž slouží jako model pro interakci savčích CYP s CPR [166] (viz obr. 18 str. 46). V případě CYP2A6, 2A13 a homologního modelu 2C19 se flavodoxin nachází v takové orientaci vzhledem k CYP, která je blízká pozici FMN domény cytochrom P450 reduktasy u dříve publikovaného modelu komplexu králičího CYP2B4-CPR, a také pozici FMN domény vůči hemové doméně u fúzního flavocytochromu CYP102A1. Zmíněné CYP vykazují nejvyšší experimentálně určené procento redukce a také v této práci zjištěnou vysokou stabilitu komplexů s Fld a dostatečně nízkou vzdálenost redoxních center v těchto komplexech. Vzhledem k adaptaci savčích CYP

na interakci se stejnou CPR [27] a podobnosti FMN domény CPR s Fld (viz kapitola 1.4.2) výskyt podobné orientace těchto redoxních partnerů vůči CYP dále podporuje hypotézu, že je to právě Fld, který redukuje lidské CYP při heterologní expresi. Jedná se ovšem pouze o další z podpůrných faktů, rozdílná orientace Fld oproti CPR ještě neznamena, že redukce neprobíhá stejně efektivně, pokud je vzdálenost center dostatečně malá a komplex dostatečně pevný.

U savčích komplexů CYP-CPR se diskutovaná orientace dá očekávat, protože oba partneři jsou ukotvení v membráně svým N-koncem, přičemž membránová kotva přímo navazuje na FMN doménu CPR a membrána se při pohledech jako na obrázku 18 nachází pod komplexem [167]. Vzhledem k tomuto faktu se jeví zde zobrazený model CYP3A4-CPR převzatý z literatury jako nepravděpodobný, protože FAD doména CPR by se nacházela v membráně. Dotyčná studie [164] se pozicí membrány vůbec nezabývá, navíc byl použit méně robustní software pro „docking“ než např. HADDOCK použitý v této práci. Zmíněná struktura komplexu CYP3A4-CPR je zde tedy uvedena spíše pro úplnost.

Struktury nejlepších komplexů CYP-Fld byly dále zkoumány z hlediska elektrostatických interakcí, které hrají významnou roli při formování protein-proteinových komplexů. Základní používaná elektrostatická charakteristika proteinu – jeho celkový náboj – poskytuje však jen omezenou informaci, a proto je vhodné prozkoumat podrobněji rozložení tohoto náboje na povrchu proteinu, což lze provést výpočtem mapy elektrostatického potenciálu na základě parciálních nábojů a např. Poisson-Boltzmannova modelu implicitního rozpouštědla.

Z obrázku 19 str. 48 je patrné, že povrch flavodoxinu v blízkosti FMN je silně negativně nabitý, což odpovídá obecné charakteristice flavodoxinů jakožto negativně nabitých proteinů [115]; flavodoxin z *E. coli* má celkový náboj -22 . Z toho se dá usuzovat, že Fld bude ochotněji asociovat a tvořit stabilní komplexy s takovými CYP, jejichž proximální strana je výrazně pozitivně nabitá. Z porovnání mapy elektrostatického potenciálu na proximální straně CYP (obr. 20–22 str. 49–51) s jeho celkovým nábojem (tab. 12 str. 48) je jasné, že při studiu proteinových komplexů je celkový náboj nedostačující charakteristikou. Nejmarkantněji je to vidět u bakteriálního CYP176A1, jehož celkový náboj je -14 , zatímco elektrostatický potenciál na jeho proximální straně obsahuje (byť slabší) pozitivní oblast podobně jako celkově pozitivně nabitě lidské CYP.

Při porovnání elektrostatických potenciálů s výsledky pro řízenou disociaci nicméně nelze pozorovat jednoznačnou souvislost, snad kromě CYP101A1, jehož komplex vykazuje celkově nejnižší disociační práci a zároveň elektrostatický potenciál na proximální straně jeho vstupní struktury obsahuje nejméně pozitivních oblastí.

Při srovnání map elektrostatických potenciálů vstupních a v komplexu optimalizovaných struktur CYP lze pozorovat flavodoxinem indukované přizpůsobení, kdy se pozitivně nabitě zbytky CYP zodpovědné za kladný elektrostatický potenciál dostanou více na povrch, rozestoupí se před hydrofobní částí Fld vážící FMN a vytvoří solné můstky se záporně nabitými aminokyselinovými zbytky Fld. Nejmarkantnější je tato změna u CYP3A4, což může vysvětlovat docela stabilní komplex přes málo výrazné pozitivně nabitě oblasti u vstupní struktury.

Prezentovaná zjištění pro lidské cytochromy P450 jsou v souladu s experimentálně pozorovanou interakcí některých isoform CYP s flavodoxinem (viz kapitola 1.4.4). Předkládaná studie ukazuje směr pro možné experimentální studie interakcí lidských CYP s flavodoxinem, kde je vhodné cílit na CYP1A2, 2A6 a 2A13 vykazující nejvyšší podíl redukované formy při heterologní expresi a nejstabilnější komplexy s nejmenší vzdáleností redoxních center (vyvozovat závěry o CYP2C19 je vzhledem k nedokonalým a rozporuplným strukturním datům problematické). Flavodoxin z *E. coli* by šel využít k vytvoření kolony pro purifikaci zmíněných lidských CYP afinitní chromatografií (jak již bylo ověřeno dříve u CYP17A1 a 21A2 [168]), nebo pro tvorbu fúzních rozpustných flavocytochromů s biotechnologickými aplikacemi (jak bylo například otestováno na komplexu Fld z *Desulfovibrio vulgaris* a hemové domény CYP102A1 [169]).

6 Závěr

V předkládané práci byla ověřena a rozšířena metodika pro *in silico* predikce protein-proteinových komplexů na případu interakce lidských a bakteriálních cytochromů P450 (CYP) s nepřirozeným redoxním partnerem (flavodoxinem z bakterie *Escherichia coli*, Fld). Srovnáním s experimentálními daty bylo ukázáno, že za redukci lidských isoform cytochromů P450 může být při heterologní expresi v *E. coli* zodpovědný flavodoxin, naopak u zkoumaných bakteriálních CYP se tato hypotéza neprokázala. Dílčí výsledky této práce lze shrnout následovně:

- Pro každý ze studovaných CYP (lidské isoformy 1A2, 2A6, 2A13, 2C9, 2C19, 3A4 a bakteriální isoformy 101A1, 176A1) byla navržena sada možných komplexů s flavodoxinem.
- Pomocí techniky řízené molekulové dynamiky (SMD) byla porovnána stabilita navržených komplexů. Na základě práce potřebné k odtažení partnerů konstantní rychlostí do vzdálenosti 25 Å byl vybrán nejstabilnější komplex pro každou isoformu CYP.
- Nejstabilnější komplex pro každý CYP byl optimalizován molekulovou dynamikou v explicitním rozpouštědle a byla určena průměrná vzdálenost redoxních center obou proteinů v optimalizovaném komplexu, která vypovídá o rychlosti redukce v tomto systému.
- Práce potřebná k roztržení nejstabilnějších komplexů a průměrná vzdálenost redoxních center po optimalizaci těchto komplexů byly korelovány s experimentálně určeným podílem redukovaného CYP v intaktních buňkách *E. coli* při heterologní expresi (data z literatury). Pro lidské CYP1A2, 2A6, 2A13, 2C9 a 3A4 byla zjištěna v obou případech silná a signifikantní souvislost na hladině $P < 0,05$. Zahrnutí strukturně problematických forem CYP2C19 tento korelační vztah oslabilo, nicméně byla pozorována korelační tendence ($P = 0,008 - 0,09$), při zahrnutí bakteriálních CYP nebyla pozorována žádná signifikantní souvislost.
- Strukturním srovnáním byla zjištěna podobná orientace Fld vzhledem k CYP u komplexů isoformy 2A6, 2A13 a homologního modelu 2C19, která je blízká ori-

entaci FMN domény savčí reduktasy vůči CYP a také FMN podjednotky fúzního CYP102A1 vůči jeho hemové podjednotce.

- Elektrostatické charakteristiky interagujících partnerů byly zkoumány na mapách elektrostatického potenciálu. V některých případech byla pozorována určitá souvislost mezi mírou pozitivního potenciálu na čelní straně CYP a silou interakce s negativně nabitým Fld. Dále bylo pozorováno mírné indukované přizpůsobení cytochromů P450 v optimalizovaných komplexech.

Předkládaná práce kromě toho, že ověřuje použitelnost zaváděné metodiky pro predikci transientních protein-protein interakcí, také navrhuje CYP1A2, 2A6 a 2A13 jako cílové proteiny pro experimentální studie jejich interakcí s flavodoxinem, použití Fld při purifikaci těchto CYP afinitní chromatografií a tvorbu fúzních proteinů s biotechnologickým využitím.

7 Seznam použité literatury

- [1] Stiborová, M., Hudeček, J., Páca Jr., J., Martínek, V., Páca, J. Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy*, 98(10):876–890, 2004.
- [2] Testa, B., Pedretti, A., Vistoli, G. Foundation review: Reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Drug Discov. Today*, 17(11-12):549–560, 2012.
- [3] Rendic, S., Guengerich, F. P. Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chem. Res. Toxicol.*, 25(7):1316–1383, 2012.
- [4] Casey, G. Metabolism and excretion: eliminating drugs from the body. *Nurs. N. Z.*, 18(7):20–24, 2012.
- [5] Lovley, D. R. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 1(1):35–44, 2003.
- [6] Testa, B. Drug metabolism for the perplexed medicinal chemist. *Chem. Biodivers.*, 6(11):2055–2070, 2009.
- [7] Gan, L., von Moltke, L. L., Trepanier, L. A., Harmatz, J. S., Greenblatt, D. J., Court, M. H. Role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome-b5/NADH-b5 reductase in variability of CYP3A activity in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, 37(1):90–96, 2009.
- [8] Klingenberg, M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 75(2):376–386, 1958.
- [9] Nelson, D. R. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochim. Biophys. Acta*, 1814(1):14–18, 2011.
- [10] Lewis, D. F., Watson, E., Lake, B. G. Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutat. Res.*, 410(3):245–270, 1998.
- [11] Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., Levin, W. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA*, 6(1):1–11, 1987.
- [12] Nelson, D. R. The cytochrome p450 homepage. *Hum. Genomics*, 4(1):59–65, 2009.
- [13] Meunier, B., de Visser, S. P., Shaik, S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chem. Rev.*, 104(9):3947–3980, 2004.
- [14] Watanabe, T., Horie, S. Studies on p-450. x. on the coordination structure of hemo-protein p-450. *J. Biochem.*, 79(4):829–840, 1976.

- [15] Pochapsky, T. C., Kazanis, S., Dang, M. Conformational plasticity and structure/function relationships in cytochromes P450. *Antioxid. Redox Signal.*, 13(8):1273–1296, 2010.
- [16] Poulos, T. L. Structural biology of p450-oxy complexes. *Drug Metab. Rev.*, 39(2-3):557–566, 2007.
- [17] Cojocaru, V., Balali-Mood, K., Sansom, M. S. P., Wade, R. C. Structure and dynamics of the membrane-bound cytochrome p450 2C9. *PLoS Comput. Biol.*, 7(8), 2011.
- [18] Denisov, I. G., Shih, A. Y., Sligar, S. G. Structural differences between soluble and membrane bound cytochrome p450s. *J. Inorg. Biochem.*, 108:150–158, 2012.
- [19] Poulos, T. L., Finzel, B. C., Gunsalus, I. C., Wagner, G. C., Kraut, J. The 2.6-Å crystal structure of pseudomonas putida cytochrome p-450. *J. Biol. Chem.*, 260(30):16122–16130, 1985.
- [20] Ravichandran, K. G., Boddupalli, S. S., Hasermann, C. A., Peterson, J. A., Deisenhofer, J. Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science*, 261(5122):731–736, 1993.
- [21] Williams, P. A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H. C., Matak Vinković, D., Jhoti, H. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature*, 424(6947):464–468, 2003.
- [22] Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., Schlichting, I. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem. Rev.*, 105(6):2253–2277, 2005.
- [23] Johnston, W. A., Hunter, D. J. B., Noble, C. J., Hanson, G. R., Stok, J. E., Hayes, M. A., De Voss, J. J., Gillam, E. M. J. Cytochrome P450 is present in both ferrous and ferric forms in the resting state within intact escherichia coli and hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 286(47):40750–40759, 2011.
- [24] Hrycay, E. G., Bandiera, S. M. The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.*, 522(2):71–89, 2012.
- [25] Guengerich, F. P., Johnson, W. W. Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems. *Biochemistry*, 36(48):14741–14750, 1997.
- [26] Bernhardt, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.*, 124(1):128–145, 2006.
- [27] Yang, W., Bell, S. G., Wang, H., Zhou, W., Hoskins, N., Dale, A., Bartlam, M., Wong, L., Rao, Z. Molecular characterization of a class I P450 electron transfer system from novosphingobium aromaticivorans DSM12444. *J. Biol. Chem.*, 285(35):27372–27384, 2010.

- [28] Strushkevich, N., MacKenzie, F., Cherkesova, T., Grabovec, I., Usanov, S., Park, H. Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108(25):10139–10143, 2011.
- [29] Hamdane, D., Xia, C., Im, S., Zhang, H., Kim, J. P., Waskell, L. Structure and function of an NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in an open conformation capable of reducing cytochrome P450. *J. Biol. Chem.*, 284(17):11374–11384, 2009.
- [30] Dürr, U. H. N., Waskell, L., Ramamoorthy, A. The cytochromes P450 and b5 and their reductases—promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768(12):3235–3259, 2007.
- [31] Munro, A. W., Daff, S., Coggins, J. R., Lindsay, J. G., Chapman, S. K. Probing electron transfer in flavocytochrome P-450 BM3 and its component domains. *Eur. J. Biochem.*, 239(2):403–409, 1996.
- [32] Hawkes, D. B., Slessor, K. E., Bernhardt, P. V., De Voss, J. J. Cloning, expression and purification of cindoxin, an unusual fmn-containing cytochrome p450 redox partner. *Chembiochem*, 11(8):1107–1114, 2010.
- [33] Omura, T. Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *J. Biochem.*, 147(3):297–306, 2010.
- [34] McLean, K. J., Clift, D., Lewis, D. G., Sabri, M., Balding, P. R., Sutcliffe, M. J., Leys, D., Munro, A. W. The preponderance of P450s in the mycobacterium tuberculosis genome. *Trends Microbiol.*, 14(5):220–228, 2006.
- [35] Lamb, D. C., Skaug, T., Song, H.-L., Jackson, C. J., Podust, L. M., Waterman, M. R., Kell, D. B., Kelly, D. E., Kelly, S. L. The cytochrome P450 complement (CYPome) of streptomyces coelicolor a3(2). *J. Biol. Chem.*, 277(27):24000–24005, 2002.
- [36] Lewis, D. F. V., Wiseman, A. A selective review of bacterial forms of cytochrome p450 enzymes - review. *Enzyme Microb. Technol.*, 36(4):377–384, 2005.
- [37] Van Bogaert, I. N. A., Groeneboer, S., Saerens, K., Soetaert, W. The role of cytochrome P450 monooxygenases in microbial fatty acid metabolism. *FEBS J.*, 278(2):206–221, 2011.
- [38] McLean, K. J., Marshall, K. R., Richmond, A., Hunter, I. S., Fowler, K., Kieser, T., Gurcha, S. S., Besra, G. S., Munro, A. W. Azole antifungals are potent inhibitors of cytochrome P450 mono-oxygenases and bacterial growth in mycobacteria and streptomycetes. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 148(Pt 10):2937–2949, 2002.
- [39] Rylott, E. L., Jackson, R. G., Sabbadin, F., Seth-Smith, H. M. B., Edwards, J., Chong, C. S., Strand, S. E., Grogan, G., Bruce, N. C. The explosive-degrading cytochrome P450 XplA: biochemistry, structural features and prospects for bioremediation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1814(1):230–236, 2011.

- [40] Ryan, J. D., Clark, D. S. P450cam biocatalysis in surfactant-stabilized two-phase emulsions. *Biotechnol. Bioeng.*, 99(6):1311–1319, 2008.
- [41] Fruetel, J., Collins, J., Camper, D., Loew, G., Demontellano, P. Calculated and experimental absolute stereochemistry of the styrene and beta-methylstyrene epoxides formed by cytochrome-p450(cam). *J. Am. Chem. Soc.*, 114(18):6987–6993, 1992.
- [42] Harford-Cross, C. F., Carmichael, A. B., Allan, F. K., England, P. A., Rouch, D. A., Wong, L. L. Protein engineering of cytochrome p450(cam) (CYP101) for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Protein Eng.*, 13(2):121–128, 2000.
- [43] Sevrioukova, I. F., Poulos, T. L. Structural biology of redox partner interactions in p450cam monooxygenase: a fresh look at an old system. *Arch. Biochem. Biophys.*, 507(1):66–74, 2011.
- [44] Lee, Y.-T., Wilson, R. F., Rupniewski, I., Goodin, D. B. P450cam visits an open conformation in the absence of substrate. *Biochemistry*, 49(16):3412–3419, 2010.
- [45] Hawkes, D. B., Adams, G. W., Burlingame, A. L., Ortiz de Montellano, P. R., De Voss, J. J. Cytochrome P450(cin) (CYP176A), isolation, expression, and characterization. *J. Biol. Chem.*, 277(31):27725–27732, 2002.
- [46] Madrona, Y., Tripathi, S., Li, H., Poulos, T. L. Crystal structures of substrate-free and nitrosyl cytochrome P450cin: implications for O(2) activation. *Biochemistry*, 51(33):6623–6631, 2012.
- [47] Meharena, Y. T., Li, H., Hawkes, D. B., Pearson, A. G., De Voss, J., Poulos, T. L. Crystal structure of P450cin in a complex with its substrate, 1,8-cineole, a close structural homologue to d-camphor, the substrate for P450cam. *Biochemistry*, 43(29):9487–9494, 2004.
- [48] Kimmich, N., Das, A., Sevrioukova, I., Meharena, Y., Sligar, S. G., Poulos, T. L. Electron transfer between cytochrome p450cin and its FMN-containing redox partner, cindoxin. *J. Biol. Chem.*, 282(37):27006–27011, 2007.
- [49] Dutheil, F., Beaune, P., Lorient, M.-A. Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie*, 90(3):426–436, 2008.
- [50] Guengerich, F. P., Wu, Z.-L., Bartleson, C. J. Function of human cytochrome p450s: characterization of the orphans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338(1):465–469, 2005.
- [51] Guengerich, F. P. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.*, 21(1):70–83, 2008.
- [52] Seripa, D., Pilotto, A., Panza, F., Matera, M. G., Pilotto, A. Pharmacogenetics of cytochrome P450 (CYP) in the elderly. *Ageing Res. Rev.*, 9(4):457–474, 2010.

- [53] Turesky, R. J., Constable, A., Richoz, J., Varga, N., Markovic, J., Martin, M. V., Guengerich, F. P. Activation of heterocyclic aromatic amines by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2. *Chem. Res. Toxicol.*, 11(8):925–936, 1998.
- [54] Bernauer, U., Heinrich-Hirsch, B., Tönnies, M., Peter-Matthias, W., Gundert-Remy, U. Characterisation of the xenobiotic-metabolizing cytochrome p450 expression pattern in human lung tissue by immunochemical and activity determination. *Toxicol. Lett.*, 164(3):278–288, 2006.
- [55] Strobel, H. W., Kawashima, H., Geng, J., Sequeira, D., Bergh, A., Hodgson, A. V., Wang, H., Shen, S. Expression of multiple forms of brain cytochrome p450. *Toxicol. Lett.*, 82-83:639–643, 1995.
- [56] Pavek, P., Dvorak, Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome p450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr. Drug Metab.*, 9(2):129–143, 2008.
- [57] Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okey, A. B., Gonzalez, F. J. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem.*, 279(23):23847–23850, 2004.
- [58] Singh, S., Singh, K., Gupta, S. P., Patel, D. K., Singh, V. K., Singh, R. K., Singh, M. P. Effect of caffeine on the expression of cytochrome p450 1A2, adenosine a(2A) receptor and dopamine transporter in control and 1-methyl 4-phenyl 1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine treated mouse striatum. *Brain Res.*, 1283:115–126, 2009.
- [59] Ball, S. E., Forrester, L. M., Wolf, C. R., Back, D. J. Differences in the cytochrome P-450 isoenzymes involved in the 2-hydroxylation of oestradiol and 17 alpha-ethinyloestradiol. relative activities of rat and human liver enzymes. *Biochem. J.*, 267(1):221–226, 1990.
- [60] Pirmohamed, M., Williams, D., Madden, S., Templeton, E., Park, B. K. Metabolism and bioactivation of clozapine by human liver in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 272(3):984–990, 1995.
- [61] Bertschy, G., Vandael, S., Vandael, B., Allers, G., Volmat, R. Fluvoxamine-tricyclic antidepressant interaction. an accidental finding. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 40(1):119–120, 1991.
- [62] Shimada, T., Yamazaki, H., Foroozesh, M., Hopkins, N. E., Alworth, W. L., Guengerich, F. P. Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Chem. Res. Toxicol.*, 11(9):1048–1056, 1998.
- [63] Sansen, S., Yano, J. K., Reynald, R. L., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D., Johnson, E. F. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *J. Biol. Chem.*, 282(19):14348–14355, 2007.

- [64] Jin, M., Kumar, A., Kumar, S. Ethanol-mediated regulation of cytochrome p450 2A6 expression in monocytes: Role of oxidative stress-mediated PKC/MEK/Nrf2 pathway. *PLoS One*, 7(4), 2012.
- [65] Jin, M., Arya, P., Patel, K., Singh, B., Silverstein, P. S., Bhat, H. K., Kumar, A., Kumar, S. Effect of alcohol on drug efflux protein and drug metabolic enzymes in u937 macrophages. *Alcoholism (NY)*, 35(1):132–139, 2011.
- [66] Ande, A., Earla, R., Jin, M., Silverstein, P. S., Mitra, A. K., Kumar, A., Kumar, S. An LC-MS/MS method for concurrent determination of nicotine metabolites and the role of CYP2A6 in nicotine metabolite-mediated oxidative stress in SVGA astrocytes. *Drug Alcohol Depend*, 125(1-2):49–59, 2012.
- [67] Yun, C. H., Kim, K. H., Calcutt, M. W., Guengerich, F. P. Kinetic analysis of oxidation of coumarins by human cytochrome p450 2A6. *J. Biol. Chem.*, 280(13):12279–12291, 2005.
- [68] Kwiecien, R. A., Le Questel, J.-Y., Lebreton, J., Delaforge, M., Andre, F., Pihan, E., Roussel, A., Fournial, A., Paneth, P., Robins, R. J. Cytochrome p450-catalyzed degradation of nicotine: Fundamental parameters determining hydroxylation by cytochrome p450 2A6 at the 5'-carbon or the n-methyl carbon. *J. Phys. Chem. B*, 116(27):7827–7840, 2012.
- [69] Derby, K. S., Cuthrell, K., Caberto, C., Carmella, S. G., Franke, A. A., Hecht, S. S., Murphy, S. E., Le Marchand, L. Nicotine metabolism in three Ethnic/Racial groups with different risks of lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 17(12):3526–3535, 2008.
- [70] Spracklin, D. K., Thummel, K. E., Kharasch, E. D. Human reductive halothane metabolism in vitro is catalyzed by cytochrome p450 2A6 and 3A4. *Drug Metab. Dispos.*, 24(9):976–983, 1996.
- [71] Kiang, T. K. L., Ho, P. C., Anari, M. R., Tong, V., Abbott, F. S., Chang, T. K. H. Contribution of CYP2C9, CYP2A6, and CYP2B6 to valproic acid metabolism in hepatic microsomes from individuals with the CYP2C9*1/*1 genotype. *Toxicol. Sci.*, 94(2):261–271, 2006.
- [72] Abu-Bakar, A., Arthur, D. M., Wikman, A. S., Rahnasto, M., Juvonen, R. O., Vepsäläinen, J., Raunio, H., Ng, J. C., Lang, M. A. Metabolism of bilirubin by human cytochrome p450 2A6. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 261(1):50–58, 2012.
- [73] DeVore, N. M., Meneely, K. M., Bart, A. G., Stephens, E. S., Battaile, K. P., Scott, E. E. Structural comparison of cytochromes p450 2A6, 2A13, and 2E1 with pilocarpine. *FEBS J.*, 279(9):1621–1631, 2012.
- [74] Taavitsainen, P., Juvonen, R., Pelkonen, O. In vitro inhibition of cytochrome p450 enzymes in human liver microsomes by a potent CYP2A6 inhibitor, trans-2-phenylcyclopropylamine (tranlycypromine), and its nonamine analog, cyclopropylbenzene. *Drug Metab. Dispos.*, 29(3):217–222, 2001.

- [75] Hukkanen, J., Jacob, P., Benowitz, N. L. Effect of grapefruit juice on cytochrome p450 2A6 and nicotine renal clearance. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 80(5):522–530, 2006.
- [76] Yano, J. K., Hsu, M.-H., Griffin, K. J., Stout, C. D., Johnson, E. F. Structures of human microsomal cytochrome p450 2A6 complexed with coumarin and methoxsalen. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12(9):822–823, 2005.
- [77] Su, T., Bao, Z. P., Zhang, Q. Y., Smith, T. J., Hong, J. Y., Ding, X. X. Human cytochrome p450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.*, 60(18):5074–5079, 2000.
- [78] Guo, Y., Zhu, L.-R., Lu, G., Wang, H., Hong, J.-Y. Selective expression of CYP2A13 in human pancreatic alpha-islet cells. *Drug Metab. Dispos.*, 40(10):1878–1882, 2012.
- [79] Wong, H. L., Zhang, X. L., Zhang, Q. Y., Gu, J., Ding, X. X., Hecht, S. S., Murphy, S. E. Metabolic activation of the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-(3-pyridyl)-1-butanone by cytochrome P450 2A13 in human fetal nasal microsomes. *Chem. Res. Toxicol.*, 18(6):913–918, 2005.
- [80] Fukami, T., Katoh, M., Yamazaki, H., Yokoi, T., Nakajima, M. Human cytochrome p450 2A13 efficiently metabolizes chemicals in air pollutants: Naphthalene, styrene, and toluene. *Chem. Res. Toxicol.*, 21(3):720–725, 2008.
- [81] Mo, S.-L., Zhou, Z.-W., Yang, L.-P., Wei, M. Q., Zhou, S.-F. New insights into the structural features and functional relevance of human cytochrome p450 2C9. part i. *Curr. Drug Metab.*, 10(10):1075–1126, 2009.
- [82] Zhang, Z. Y., Kerr, J., Wexler, R. S., Li, H. Y., Robinson, A. J., Harlow, P. P., Kaminsky, L. S. Warfarin analog inhibition of human CYP2C9-catalyzed s-warfarin 7-hydroxylation. *Thromb. Res.*, 88(4):389–398, 1997.
- [83] Berka, K., Hendrychova, T., Anzenbacher, P., Otyepka, M. Membrane position of ibuprofen agrees with suggested access path entrance to cytochrome p450 2C9 active site. *J. Phys. Chem. A*, 115(41):11248–11255, 2011.
- [84] Shou, M., Krausz, K. W., Gonzalez, F. J., Gelboin, H. V. Metabolic activation of the potent carcinogen dibenzo[a,l]pyrene by human recombinant cytochromes p450, lung and liver microsomes. *Carcinogenesis*, 17(11):2429–2433, 1996.
- [85] Rettie, A. E., Jones, J. P. Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45:477–494, 2005.
- [86] Niwa, T., Shiraga, T., Takagi, A. Effect of antifungal drugs on cytochrome p450 (CYP) 2C9, CYP2C19, and CYP3A4 activities in human liver microsomes. *Biol. Pharm. Bull.*, 28(9):1805–1808, 2005.
- [87] Kimura, Y., Ito, H., Ohnishi, R., Hatano, T. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome p450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem. Toxicol.*, 48(1):429–435, 2010.

- [88] Yamaori, S., Koeda, K., Kushihara, M., Hada, Y., Yamamoto, I., Watanabe, K. Comparison in the in vitro inhibitory effects of major phytocannabinoids and polycyclic aromatic hydrocarbons contained in marijuana smoke on cytochrome p450 2C9 activity. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27(3):294–300, 2012.
- [89] Wester, M. R., Yano, J. K., Schoch, G. A., Yang, C., Griffin, K. J., Stout, C. D., Johnson, E. F. The structure of human cytochrome p450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 279(34):35630–35637, 2004.
- [90] Foti, R. S., Rock, D. A., Han, X., Flowers, R. A., Wienkers, L. C., Wahlstrom, J. L. Ligand-based design of a potent and selective inhibitor of cytochrome p450 2C19. *J. Med. Chem.*, 55(3):1205–1214, 2012.
- [91] Foti, R. S., Wahlstrom, J. L. CYP2C19 inhibition: the impact of substrate probe selection on in vitro inhibition profiles. *Drug Metab. Dispos.*, 36(3):523–528, 2008.
- [92] Yamazaki, H., Shimada, T. Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes p450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 346(1):161–169, 1997.
- [93] Di Marco, A., Cellucci, A., Chaudhary, A., Fonsi, M., Laufer, R. High-throughput radiometric CYP2C19 inhibition assay using tritiated (S)-mephenytoin. *Drug Metab. Dispos.*, 35(10):1737–1743, 2007.
- [94] Yasui-Furukori, N., Takahata, T., Nakagami, T., Yoshiya, G., Inoue, Y., Kaneko, S., Tateishi, T. Different inhibitory effect of fluvoxamine on omeprazole metabolism between CYP2C19 genotypes. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 57(4):487–494, 2004.
- [95] Reynald, R. L., Sansen, S., Stout, C. D., Johnson, E. F. Structural characterization of human cytochrome p450 2C19: ACTIVE SITE DIFFERENCES BETWEEN p450s 2C8, 2C9, AND 2C19. *J. Biol. Chem.*, 287(53):44581–44591, 2012.
- [96] Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. Cytochromes p450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58(5-6):737–747, 2001.
- [97] Zhou, S., Chan, E., Lim, L. Y., Boelsterli, U. A., Li, S. C., Wang, J., Zhang, Q., Huang, M., Xu, A. Therapeutic drugs that behave as mechanism-based inhibitors of cytochrome P450 3A4. *Curr. Drug Metab.*, 5(5):415–442, 2004.
- [98] Sugiyama, E., Kikuchi, A., Inada, M., Sato, H. The use of C-13-Erythromycin as an in vivo probe to evaluate CYP3A-mediated drug interactions in rats. *J. Pharm. Sci.*, 100(9):3995–4005, 2011.
- [99] Ueng, Y. F., Shimada, T., Yamazaki, H., Guengerich, F. P. Oxidation of aflatoxin b1 by bacterial recombinant human cytochrome p450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.*, 8(2):218–225, 1995.
- [100] Waxman, D. J., Attisano, C., Guengerich, F. P., Lapenson, D. P. Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6

- beta-hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 263(2):424–436, 1988.
- [101] Shinkyō, R., Guengerich, F. P. Inhibition of human cytochrome P450 3A4 by cholesterol. *J. Biol. Chem.*, 286(21):18426–18433, 2011.
- [102] Diczfalusy, U., Nylén, H., Elander, P., Bertilsson, L. 4 β -hydroxycholesterol, an endogenous marker of CYP3A4/5 activity in humans. *Br J Clin Pharmacol*, 71(2):183–189, 2011.
- [103] Messer, A., Raquet, N., Lohr, C., Schrenk, D. Major furocoumarins in grapefruit juice II: phototoxicity, photogenotoxicity, and inhibitory potency vs. cytochrome p450 3A4 activity. *Food Chem. Toxicol.*, 50(3-4):756–760, 2012.
- [104] Sunaga, K., Ohkawa, K., Nakamura, K., Ohkubo, A., Harada, S., Tsuda, T. Mechanism-based inhibition of recombinant human cytochrome P450 3A4 by tomato juice extract. *Biol. Pharm. Bull.*, 35(3):329–334, 2012.
- [105] Williams, P. A., Cosme, J., Vinkovic, D. M., Ward, A., Angove, H. C., Day, P. J., Vorrhein, C., Tickle, I. J., Jhoti, H. Crystal structures of human cytochrome p450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science*, 305(5684):683–686, 2004.
- [106] Smillie, R. M. Isolation of two proteins with chloroplast ferredoxin activity from a blue-green alga. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 20(5):621–629, 1965.
- [107] Knight, E. J., D’Eustachio, A. J., Hardy, R. W. Flavodoxin: a flavoprotein with ferredoxin activity from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 113(3):626–628, 1966.
- [108] Lawson, R. J., von Wachenfeldt, C., Haq, I., Perkins, J., Munro, A. W. Expression and characterization of the two flavodoxin proteins of *Bacillus subtilis*, YkuN and YkuP: biophysical properties and interactions with cytochrome p450 BioI. *Biochemistry*, 43(39):12390–12409, 2004.
- [109] Wang, Z.-Q., Lawson, R. J., Buddha, M. R., Wei, C.-C., Crane, B. R., Munro, A. W., Stuehr, D. J. Bacterial flavodoxins support nitric oxide production by *Bacillus subtilis* nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 282(4):2196–2202, 2007.
- [110] Gangeswaran, R., Eady, R. R. Flavodoxin 1 of *Azotobacter vinelandii*: characterization and role in electron donation to purified assimilatory nitrate reductase. *Biochem. J.*, 317 (Pt 1):103–108, 1996.
- [111] Hall, D. A., Jordan-Starck, T. C., Loo, R. O., Ludwig, M. L., Matthews, R. G. Interaction of flavodoxin with cobalamin-dependent methionine synthase. *Biochemistry*, 39(35):10711–10719, 2000.
- [112] Mulliez, E., Padovani, D., Atta, M., Alcouffe, C., Fontecave, M. Activation of class III ribonucleotide reductase by flavodoxin: a protein radical-driven electron transfer to the iron-sulfur center. *Biochemistry*, 40(12):3730–3736, 2001.

- [113] Cremades, N., Velázquez-Campoy, A., Martínez-Júlvez, M., Neira, J. L., Pérez-Dorado, I., Hermoso, J., Jiménez, P., Lanas, A., Hoffman, P. S., Sancho, J. Discovery of specific flavodoxin inhibitors as potential therapeutic agents against helicobacter pylori infection. *ACS Chem. Biol.*, 4(11):928–938, 2009.
- [114] López-Llano, J., Maldonado, S., Bueno, M., Lostao, A., Angeles-Jiménez, M., Lillo, M. P., Sancho, J. The long and short flavodoxins: I. the role of the differentiating loop in apoflavodoxin structure and FMN binding. *J. Biol. Chem.*, 279(45):47177–47183, 2004.
- [115] Sancho, J. Flavodoxins: sequence, folding, binding, function and beyond. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63(7-8):855–864, 2006.
- [116] Lostao, A., Daoudi, F., Irún, M. P., Ramon, A., Fernández-Cabrera, C., Romero, A., Sancho, J. How FMN binds to anabaena apoflavodoxin: a hydrophobic encounter at an open binding site. *J. Biol. Chem.*, 278(26):24053–24061, 2003.
- [117] Muralidhara, B. K., Chen, M., Ma, J., Wittung-Stafshede, P. Effect of inorganic phosphate on FMN binding and loop flexibility in desulfovibrio desulfuricans apoflavodoxin. *J. Mol. Biol.*, 349(1):87–97, 2005.
- [118] Campos, L. A., Sancho, J. Native-specific stabilization of flavodoxin by the FMN cofactor: structural and thermodynamical explanation. *Proteins*, 63(3):581–594, 2006.
- [119] Garcin, E. D., Bruns, C. M., Lloyd, S. J., Hosfield, D. J., Tiso, M., Gachhui, R., Stuehr, D. J., Tainer, J. A., Getzoff, E. D. Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 279(36):37918–37927, 2004.
- [120] Leclerc, D., Wilson, A., Dumas, R., Gafuik, C., Song, D., Watkins, D., Heng, H. H., Rommens, J. M., Scherer, S. W., Rosenblatt, D. S., Gravel, R. A. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(6):3059–3064, 1998.
- [121] Wan, J. T., Jarrett, J. T. Electron acceptor specificity of ferredoxin (flavodoxin):NADP⁺ oxidoreductase from escherichia coli. *Arch. Biochem. Biophys.*, 406(1):116–126, 2002.
- [122] Hall, D. A., Vander Kooi, C. W., Stasik, C. N., Stevens, S. Y., Zuiderweg, E. R., Matthews, R. G. Mapping the interactions between flavodoxin and its physiological partners flavodoxin reductase and cobalamin-dependent methionine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(17):9521–9526, 2001.
- [123] Blaschkowski, H. P., Neuer, G., Ludwig-Festl, M., Knappe, J. Routes of flavodoxin and ferredoxin reduction in escherichia coli. CoA-acylating pyruvate: flavodoxin and NADPH: flavodoxin oxidoreductases participating in the activation of pyruvate formate-lyase. *Eur. J. Biochem.*, 123(3):563–569, 1982.

- [124] Malca, S. H., Girhard, M., Schuster, S., Dürre, P., Urlacher, V. B. Expression, purification and characterization of two clostridium acetobutylicum flavodoxins: potential electron transfer partners for CYP152A2. *Biochim. Biophys. Acta*, 1814(1):257–264, 2011.
- [125] Girhard, M., Klaus, T., Khatri, Y., Bernhardt, R., Urlacher, V. B. Characterization of the versatile monooxygenase CYP109B1 from bacillus subtilis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87(2):595–607, 2010.
- [126] Jenkins, C. M., Waterman, M. R. Flavodoxin as a model for the p450-interacting domain of NADPH cytochrome p450 reductase. *Drug Metab. Rev.*, 31(1):195–203, 1999.
- [127] Jenkins, C. M., Waterman, M. R. Flavodoxin and NADPH-flavodoxin reductase from escherichia coli support bovine cytochrome P450c17 hydroxylase activities. *J. Biol. Chem.*, 269(44):27401–27408, 1994.
- [128] Dong, M. S., Yamazaki, H., Guo, Z. Y., Guengerich, F. P. Recombinant human cytochrome P450 1A2 and an n-terminal-truncated form: Construction, purification, aggregation properties, and interactions with Flavodoxin, Ferredoxin, and NADPH-cytochrome p450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 327(1):11–19, 1996.
- [129] Yamazaki, H., Ueng, Y. F., Shimada, T., Guengerich, F. P. Roles of divalent metal ions in oxidations catalyzed by recombinant cytochrome p450 3A4 and replacement of NADPH-cytochrome p450 reductase with other flavoproteins, ferredoxin, and oxygen surrogates. *Biochemistry*, 34(26):8380–8389, 1995.
- [130] Munro, A. W., Girvan, H. M., McLean, K. J. Cytochrome p450-redox partner fusion enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1770(3):345–359, 2007.
- [131] Dodhia, V. R., Sassone, C., Fantuzzi, A., Di Nardo, G., Sadeghi, S. J., Gilardi, G. Modulating the coupling efficiency of human cytochrome P450 CYP3A4 at electrode surfaces through protein engineering. *Electrochem. Commun.*, 10(11):1744–1747, 2008.
- [132] Gilardi, G., Meharena, Y. T., Tsotsou, G. E., Sadeghi, S. J., Fairhead, M., Giannini, S. Molecular lego: design of molecular assemblies of P450 enzymes for nanobiotechnology. *Biosens Bioelectron*, 17(1-2):133–145, 2002.
- [133] Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Pearson Education, Harlow, second edition, 2001.
- [134] Brooks, B. R., Brooks, C. L., Mackerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caffisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoseck, M., Im, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R. W., Post, C. B., Pu, J. Z., Schaefer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D. M., Karplus, M. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.*, 30(10):1545–1614, 2009.

- [135] Warshel, A., Levitt, M. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J. Mol. Biol.*, 103(2):227–249, 1976.
- [136] Bakowies, D., Thiel, W. Hybrid models for combined quantum mechanical and molecular mechanical approaches. *J. Phys. Chem.*, 100(25):10580–10594, 1996.
- [137] de Souza, O. N., Ornstein, R. L. Effect of periodic box size on aqueous molecular dynamics simulation of a DNA dodecamer with particle-mesh ewald method. *Biophys. J.*, 72(6):2395–2397, 1997.
- [138] Lu, B. Z., Zhou, Y. C., Holst, M. J., McCammon, J. A. Recent progress in numerical methods for the poisson-boltzmann equation in biophysical applications. *Commun. Comput. Phys.*, 3(5):973–1009, 2008.
- [139] Lu, B., McCammon, J. A. Improved boundary element methods for poisson-boltzmann electrostatic potential and force calculations. *J. Chem. Theory Comput.*, 3(3):1134–1142, 2007.
- [140] Onufriev, A., Case, D. A., Bashford, D. Effective born radii in the generalized born approximation: The importance of being perfect. *J. Comput. Chem.*, 23(14):1297–1304, 2002.
- [141] Rapaport, D. C. *The art of molecular dynamics simulation*. Cambridge University Press, Cambridge, UK ; New York, NY, 2nd edition, 2004.
- [142] Schlick, T. *Molecular modeling and simulation an interdisciplinary guide*. Springer, New York, 2002.
- [143] Xu, Y. C., Shen, J. H., Luo, X. M., Shen, X., Chen, K. X., Jiang, H. L. Steered molecular dynamics simulations of protein-ligand interactions. *Sci. China Ser. B-Chem.*, 47(5):355–366, 2004.
- [144] Genchev, G. Z., Kaellberg, M., Guersoy, G., Mittal, A., Dubey, L., Perisic, O., Feng, G., Langlois, R., Lu, H. Mechanical signaling on the single protein level studied using steered molecular dynamics. *Cell Biochem. Biophys.*, 55(3):141–152, 2009.
- [145] Lengauer, T., Rarey, M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 6(3):402–406, 1996.
- [146] Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., Goodsell, D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.*, 28(6):1145–1152, 2007.
- [147] Gabb, H. A., Jackson, R. M., Sternberg, M. J. E. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *J. Mol. Biol.*, 272(1):106–120, 1997.
- [148] Dominguez, C., Boelens, R., Bonvin, A. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(7):1731–1737, 2003.

- [149] Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(18):10037–10041, 2001.
- [150] Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, Jr., J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., Fox, D. J. Gaussian 09 Revision C.01. Gaussian Inc. Wallingford CT 2009.
- [151] Straight lines and regression. <http://home.online.no/~wsaa/stat/lsg.html>. [přístup 19.3.2013].
- [152] Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.*, 26(16):1781–1802, 2005.
- [153] Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., Baker, N. A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of poisson-boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.*, 32(Web Server issue):W665–667, 2004.
- [154] Dolinsky, T. J., Czodrowski, P., Li, H., Nielsen, J. E., Jensen, J. H., Klebe, G., Baker, N. A. PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res.*, 35(Web Server issue):W522–525, 2007.
- [155] Schrödinger, LLC. The PyMOL molecular graphics system, version 1.5.0.1. 2010.
- [156] Grubmüller, H. Solvate, version 1.0. München: Ludwig-Maximilians-Universität München, 1996.
- [157] Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.*, 14(1):33–38, 27–28, 1996.
- [158] Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2):195–201, 2006.
- [159] de Vries, S. J., van Dijk, M., Bonvin, A. M. J. J. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nat. Protoc.*, 5(5):883–897, 2010.

- [160] Mackerell, Alexander D, J., Feig, M., Brooks, Charles L, r. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.*, 25(11):1400–1415, 2004.
- [161] Freddolino, P. L., Dittrich, M., Schulten, K. Dynamic switching mechanisms in LOV1 and LOV2 domains of plant phototropins. *Biophys. J.*, 91(10):3630–3639, 2006.
- [162] Rodriguez, R., Chinae, G., Lopez, N., Pons, T., Vriend, G. Homology modeling, model and software evaluation: three related resources. *Bioinformatics*, 14(6):523–528, 1998.
- [163] York, D. Least-squares fitting of a straight line. *Can. J. Phys.*, 44(5):1079–1086, 1966.
- [164] Lin, H.-l., Kenaan, C., Zhang, H., Hollenberg, P. F. Reaction of human cytochrome p450 3A4 with peroxyxynitrite: Nitrotyrosine formation on the proximal side impairs its interaction with NADPH-Cytochrome p450 reductase. *Chem. Res. Toxicol.*, 25(12):2642–2653, 2012.
- [165] Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., Dutton, P. L. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature*, 402(6757):47–52, 1999.
- [166] Munro, A. W., Leys, D. G., McLean, K. J., Marshall, K. R., Ost, T. W. B., Daff, S., Miles, C. S., Chapman, S. K., Lysek, D. A., Moser, C. C., Page, C. C., Dutton, P. L. P450 BM3: the very model of a modern flavocytochrome. *Trends Biochem. Sci.*, 27(5):250–257, 2002.
- [167] Im, S.-C., Waskell, L. The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5). *Arch. Biochem. Biophys.*, 507(1):144–153, 2011.
- [168] Jenkins, C. M., Pikuleva, I., Kagawa, N., Waterman, M. R. Escherichia coli flavodoxin sepharose as an affinity resin for cytochromes p450 and use to identify a putative cytochrome p450c17 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase interaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 347(1):93–102, 1997.
- [169] Fantuzzi, A., Mehareenna, Y. T., Briscoe, P. B., Sassone, C., Borgia, B., Gilardi, G. Improving catalytic properties of p450 BM3 haem domain electrodes by molecular lego. *Chem. Commun. (Camb.)*, (12):1289–1291, 2006.

