

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biochemie



Diplomová práce

Interakce hem - protein v cytochromech P450

Heme - protein interactions in cytochromes P450

Vypracovala:

Majerová Kristýna

Vedoucí diplomové práce:

Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala na katedře biochemie PřF UK samostatně pod vedením mého školitele Prof. RNDr. Jiřího Hudečka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

.....

Úvodem bych ráda poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Jiří Hudečkovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady.

Obsah

Seznam zkratek.....	6
Abstrakt.....	7
Úvod.....	9
1. Literární přehled.....	10
1.1 Mikrosomální monooxygenasový systém.....	10
1.2 Cytochromy P450.....	10
1.2.1 Evoluce cytochromů P450.....	11
1.2.2 Funkce cytochromů P450.....	12
1.2.3 Mechanismus katalýzy cytochromy P450.....	13
1.2.4 Reakce cytochromů P450.....	15
1.2.5 Nomenklatura a klasifikace.....	15
1.2.6 Struktura.....	17
1.2.7 Regulace a polymorfismus.....	19
1.3 Přehled cytochromů P450.....	21
1.3.1 Savčí cytochromy P450.....	21
1.3.2 Rostlinné cytochromy P450.....	24
1.4 Porfyriny.....	25
1.4.1 Interakce hem - protein v cytochromech P450.....	28
2. Použité metody.....	31
2.1 Orientace vinylových postranních řetězců hemu.....	31
2.2 Analýza okolí postranních řetězců hemu.....	34
2.3 Analýza disociačních konstant a elektrostatických interakcí.....	34
2.4 Odchyly hemu od planarity.....	34
3. Výsledky.....	36
3.1 Orientace vinylových postranních řetězců hemu.....	36
3.2 Analýza okolí postranních řetězců hemu.....	40

3.3 Analýza disociačních konstant a elektrostatických interakcí.....	42
3.4 Odchyly hemu od planarity.....	44
4. Diskuse.....	47
5. Závěr.....	50
6. Přehled použité literatury.....	51

Seznam zkratek

AMK	aminokyselina
CYP	cytochromy P450
dom	typ vibračního modu (z angl. doming)
MFO	system se smíšenou funkcí oxidas (z angl. mixed function oxidase)
NSD	dekompozice na normální koordináty (z angl. normal- coordinate structural decomposition)
P450	cytochromy P450
PDB	proteinová databáze (z angl. Protein Data Bank)
pro	typ vibračního modu (z angl. pyrrole propellering)
ruf	typ vibračního modu (z angl. ruffling)
sad	typ vibračního modu (z angl. saddling)
SRS	místo rozpoznávající substrát (z angl. substrate recognition site)
wav	typ vibračního modu (z angl. waving)

Abstrakt

Cytochromy P450 (CYP) jsou významné enzymy podílející se na biotransformaci xenobiotik oxidačními reakcemi. Bližší poznání okolí hemu a detailní znalost interakce hem- protein jsou důležité pro pochopení funkce těchto enzymů.

Na základě dostupných krystalografických dat byla provedena analýza orientace vinylových postranních řetězců hemu, lokalizace aminokyselinových zbytků v blízkosti postranních řetězců (vinyly a propionátů), analýza disociačních konstant a Coulombických interakcí u těchto zbytků a byly zkoumány odchylky hemu od planarity.

Z distribuce hodnot torzních úhlů u vinyly v pozici 2 a v pozici 4 vyplývá, že vinyly v pozici 2 jsou u většiny zkoumaných forem konformačně omezenější a jejich torzní úhly spadají do užšího intervalu ve srovnání s vinyly v pozici 4. Srovnání různých forem CYP přitom ukazuje, že preferované intervaly torzních úhlů se liší. Distribuce konformací vinylové skupiny tedy odráží spíše vliv apoproteinu než nějakou vnitřní tendenci hemu jako takového. Z analýzy mimorovinných deformací hemu vyplývá, že u CYP2B4 a CYP3A4 se nejvíce uplatňuje tzv. sedlová deformace (sad).

Výsledky poukazují na velkou variabilitu P450, na vliv interakce hem- protein na strukturu a funkci enzymu.

Abstract:

Cytochromes P450 (CYP) are monooxygenases participating reactions of the Phase I in xenobiotic biotransformations. Better and more detailed knowledge of heme - protein interaction is crucial for understanding of function of these enzymes; in particular, of their regulation.

We analyzed orientations of both heme vinyl side-chains in all X-ray structures of CYP enzymes available in the PDB data bank. For two mammalian forms, CYP 2A4 and 3A4, a more detailed analysis of the heme contacts with the apoprotein was performed, based on identification of the amino acid side chains in the vicinity. In addition to spatial information, dissociation constants and Coulombic interaction of polar residues in proximity to the heme were calculated using the PropKA web server. Deviations of the heme from planarity in both forms of P450 was investigated using the normal coordinate analysis (NSD server).

Distribution of torsion angles of vinyls in position 2 and 4 of the heme shows that the side-chain at position 2 is conformationally more restricted in most P450 forms studied. Comparison of all forms shows that the range of attainable values of torsional angles is very wide, practically unrestricted, and that the actual conformations of the heme moiety are probably determined more by the interaction with the protein, than by any internal restrictions of the heme itself. The observed variability likely reflects the diversity of CYP enzyme group. Contacts of the heme in CYP 2B4 and in 3A4 differ considerably, their common feature observed is the Arg:propionate electrostatic interaction. However, in detail also this interaction is different in both forms. Heme vinyls interact exclusively with nonpolar residues of the apoprotein. The normal coordinate analysis of the out-of-plane heme deformations reveals, that in both forms the most prominent mode is the saddling (sad) mode. The amplitude of the deformation in the published structures, however, differs significantly.

The results point to the great variability of P450 enzymes and indicate the influence of heme - protein interaction on the structure and function of the heme.

(In Czech)

Úvod

V dnešním rychle se rozvíjejícím světě je člověk vystaven mnoha cizorodým látkám, xenobiotikům. S těmito látkami člověk buď přichází do styku sám a vědomě, například požíváním různých léčiv či je jimi nedobrovolně obklopen z vnějšího okolí a to třeba sloučeninami využívanými v průmyslu nebo v zemědělství. Tyto sloučeniny mohou různými způsoby ovlivňovat náš zdravotní stav. Pozitivně- například v případě zmíněných léčiv či negativně- u sloučenin, které jsou pro organismus potenciálně toxické. Proto je důležité vědět, jak se po vstupu do organismu mění na neaktivní nebo naopak biologicky účinné formy.

Tématem této práce jsou cytochromy P450, což jsou významné enzymy podílející se na biotransformaci cizorodých látek oxidačními reakcemi. Znalost detailů interakce mezi těmito enzymy a substrátem nám může pomoci pochopit specifitu jednotlivých forem a mechanismus jejich působení. Tato diplomová práce se věnuje zejména otázce, jak se realizuje přenos informace, který je důležitý s ohledem na možnost regulace aktivity enzymu P450.

Cílem předkládané diplomové práce bylo z tohoto pohledu analyzovat data o cytochomech P450, dostupná v databázi PDB, a to ze tří hledisek:

1. Porovnat distribuci hodnot torzních úhlů vinylového postranního řetězce hemu a to jak s ohledem na možné rozdíly mezi vinyly v pozicích 2 a 4, tak z hlediska eventuálních rozdílů mezi formami P450.
2. Pro význačné savčí mikrosomální formy, CYP 2B4 a CYP 3A4, provést důkladnější analýzu okolí hemu s ohledem na potenciální kontakty mezi hemem a apoproteinem.
3. Pro tyto dvě formy analyzovat rozsah neplanárních deformací hemu.

1. Literární přehled

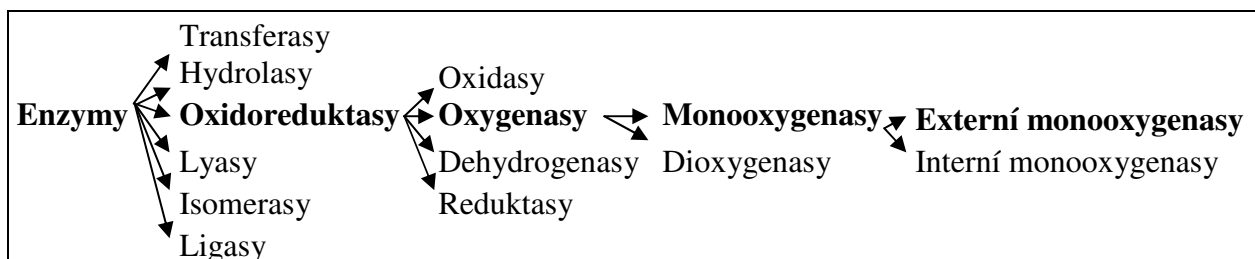
1.1 Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO)

Jaterní mikrosomální monooxygenasový systém patří mezi nejdůležitější enzymové systémy podílející se na detoxikaci xenobiotik. [1] Tento systém katalyzuje zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly hydrofobního substrátu, přičemž druhý atom kyslíku je redukován na vodu. [2] Klíčovým enzymem je cytochrom P450, jenž v systému funguje jako terminální oxidasa [3], další složkou je NADPH:CYP reduktasa, která zde slouží jako dělič elektronového páru a poté dodává elektrony cytochromům P450 [2] a v neposlední řadě biologická membrána. Fakultativně se účastní cytochrom b_5 a NADH: cytochrom b_5 reduktasa. [4]

1.2 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (označované také CYP či P450) patří mezi hemoproteiny. V enzymovém katalogu mají zařazení EC 1.14.14.1. Tyto hemové proteiny byly objeveny Garfinkelem a Klingenbergem (1958). Svůj název získaly podle netypických spektrálních vlastností, jejich redukováná forma komplexu s oxidem uhelnatým vykazuje absorpční maximum Soretova pásu při 450 nm. Obecně hemoproteiny mají Soretův pás v rozmezí 380-420 nm. Cytochromy jsou hemoproteiny, P značí pigment a 450 absorpční maximum. [5] Tyto proteiny se podílejí na biotransformaci xenobiotik, biosyntéze steroidních hormonů, metabolismu polynenasycených mastných kyselin (jako např. prostaglandinů), aktivaci vitaminů A a D na biologicky aktivní hormony, syntéze sekundárních metabolitů v rostlinách. [6] Zařazení CYP do enzymových podskupin je znázorněno na obr. 1. Cytochromy P450 jsou velmi rozšířené, nacházíme je od bakterií až po člověka [7] P450 se v těle vyskytují nejvíce v játrech, kde jsou lokalizovány v hladkém endoplazmatickém

retikulu, ale jsou přítomné i v ledvinách, nadledvinkách, tenkém střevě, mozku či kůži. [3], [5]



Obr. 1 Zařazení cytochromů P450 do enzymových skupin (převzato z [7])

1.2.1 Evoluce cytochromů P450

Cytochromy P450 řadíme mezi velmi staré hemoproteiny, starší než např. hemoglobin. [3] Jsou to enzymy, které prošly divergentní evolucí. Před více než 1,5 miliardami let se z jednoho genu archebakterií vyvinulo veliké množství odlišných genů kódujících P450. Prehistorické mikroorganismy nejspíše využívaly cytochromy P450 k hydroxylaci organických látek, které byly využívány jako zdroj energie. I v nynější době jsou mikroorganismy, které takto fungují. Například forma CYP101 (P450cam) zavedením hydroxylové skupiny do skeletu kafru zahajuje jeho metabolismus. S vývojem mnohobuněčnosti začaly tyto enzymy plnit další funkce. Účinkovaly v metabolismu xenobiotik, v biosyntéze (mastných kyselin, barviv květů, vit. D a dalších). S tím souvisí vznik složitějšího systému cytochromů P450 a vznik multiplicity P450, kdy každý vyšší organismus je vybaven několika formami tohoto enzymu. S vývojem živočišné říše souvisí i další, nově vzniklá funkce P450. A to funkce v procesu detoxikace cizorodých látek. Před 800 miliony let se extrémně zmnožily formy CYP a to právě z důvodu adaptace pro účely detoxikace a urychlení eliminace sloučenin z rostlin (fytoxiny, fytoalexiny) z organismu živočichů. Ještě extrémnější zmnožení forem P450 nastalo v období, kdy člověk začal syntetizovat do té doby neexistující sloučeniny a ty se dostaly do životního prostředí. [3]

1.2.2 Funkce cytochromů P450

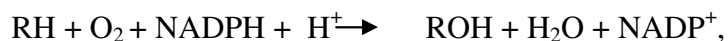
Proces, kdy se jedna látka mění na jinou, se nazývá biotransformace. Ta je členěna na detoxikaci (snížení toxicity sloučenin) a aktivaci (zvýšení toxicity) xenobiotik. Biotransformace je důležitá, aby nedocházelo k bioakumulaci cizorodých látek ve tkáních. [3], [8]

Biotransformace v živočišných organismech má dvě fáze. První fáze se označuje jako derivatizační a pro tuto fázi jsou zásadní cytochromy P450. Při ní dochází k zabudování reaktivních skupin do původně nereaktivních a to vede ke vzniku polárních produktů a může nastat druhá fáze biotransformace- konjugace. Při konjugaci dochází k navázání endogenních molekul na reaktivní skupiny metabolitů zavedených do molekuly v první fázi. Tím se molekula stane ještě více polární a usnadní se její eliminace z buněk a exkrece z organismu. [8] P450 mají obrovský význam v metabolismu léčiv. Jednak z důvodu vylučování xenobiotik z organismu a za druhé zvýšení farmakologické aktivity. [3] Důležitou funkcí P450 v metabolismu léčiv jsou oxidace léčiv katalyzované právě cytochromy P450 na jejich aktivní formy (využití u genové terapie u chemoterapie). Míra toxicity xenobiotik (léčiva, pesticidy, karcinogeny a jiné toxické látky) závisí na metabolismu sloučeniny a dávce xenobiotika. [9]

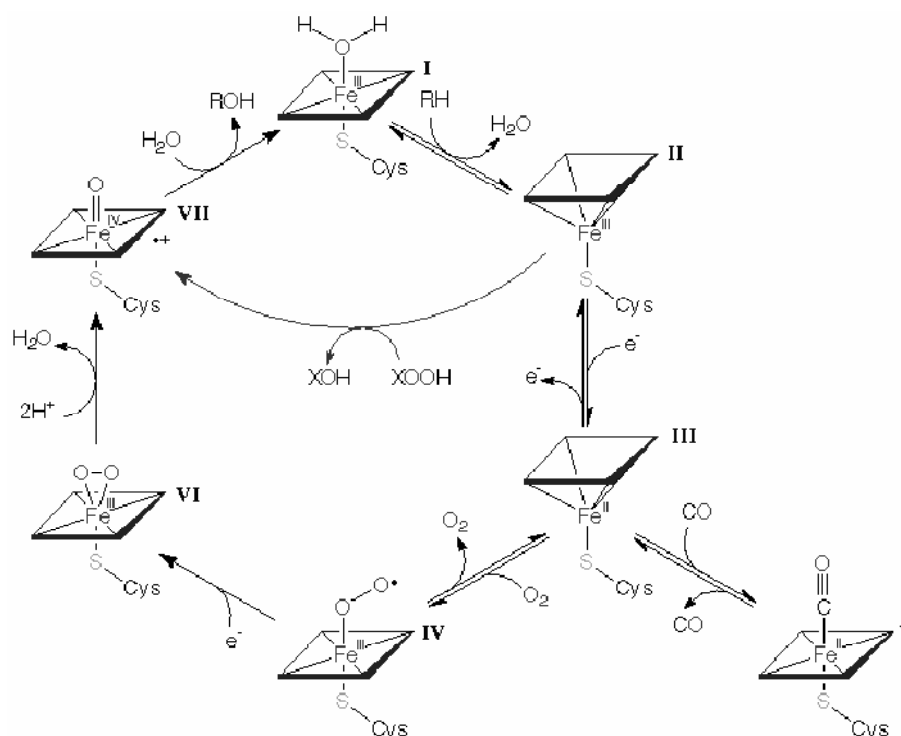
Při biotransformaci xenobiotik v rostlinách se konjugáty ukládají do různých částí rostliny, převážně vakuol. Významnou funkcí P450 u rostlin je účast v detoxikaci herbicidů, dále se rostlinné cytochromy P450 uplatňují při biosyntéze sekundárních metabolitů (terpeny, alkaloidy, ligniny, pigmenty a další). [8]

1.2.3 Mechanismus katalýzy cytochromy P450

Obecně lze monooxygenasovou reakci katalyzovanou cytochromy P450 vyjádřit touto rovnicí:



kde RH značí substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce. Tento mechanismus je vyobrazen na obr.2 a skládá se z následujících sedmi reakcí. [10]



Obr. 2 Reakční cyklus cytochromu P450 (převzato z [10])

1. reakce: Substrát se váže na oxidovanou formu (ferri forma, Fe^{3+} , “resting state”) enzymu, ale neváže se přímo na hem. Mění se konformace molekuly- Fe v hemu se z hexakoordinované formy (nízkospinový stav) mění do formy pentakoordinované (vysokospinový stav). Konformační změna se projeví i změnou spektra cytochromu P450, a to posunem absorpčního pásu hemu.

2. reakce: Dochází k přenosu elektronu z NADPH: cytochrom P450 reductasy, čímž se hemové železo redukuje na ferro formu (Fe^{2+}) a zůstává ve vysokospinovém stavu.

3. reakce: Na ion železa se váže biatomická molekula kyslíku a utvoří se ternární komplex CYP – O₂ – substrát.

4. reakce: Tato fáze aktivace molekuly kyslíku je klíčová a dosud úplně nevyjasněná. Jedním možným vysvětlením je, že tento ternární komplex přechází na ferri-superoxidový komplex (Fe je v nízkospinové formě) a ten je pak redukován NADPH: cytochrom P450 reduktasou (či NADH: cytochrom b reduktasou) za vzniku ferro-superoxidového komplexu.

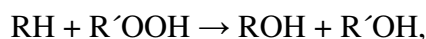
5. reakce: Nyní je rozštěpena biatomická molekula kyslíku, z níž jeden atom zůstane vázán na iontu Fe hemu (vzniká tím ferrioxenový komplex) a druhý atom kyslíku je redukován, přijímá dva protony a uvolní se voda.

6. reakce: Z molekuly substrátu se odštěpí vodíkový atom a vzniká radikál substrátu a hydroxylovaný radikál vázaný na ion železa hemu.

7. reakce: Uvolňuje se hydroxylovaná forma substrátu a cytochrom P450 v nativním stavu.
[10]

Peroxidasová aktivita

Cytochromy P450 mohou pro oxidativní reakce mimo kyslíku využívat také peroxidy, peroxykyseliny či hydroperoxydy. Tyto sloučeniny jsou pak donorem atomu kyslíku. Sumární rovnice peroxidasové aktivity je:



kde RH značí substrát, R'OOH je hydroperoxid, ROH je hydroxylovaný produkt a R'OH je alkohol, který vznikl redukcí hydroperoxidu. Aktivovaná forma P450 je stejná jako u předchozího mechanismu. [10]

1.2.4 Reakce katalyzované cytochromy P450

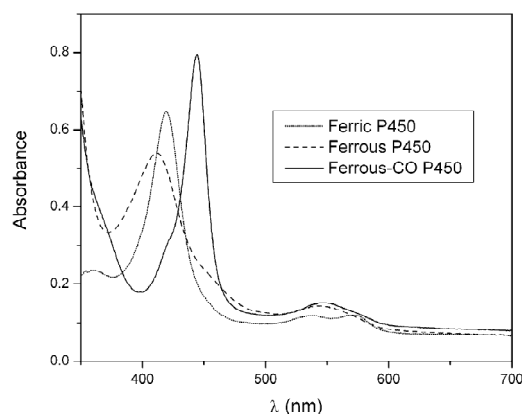
Cytochromy P450 katalyzují více jak dvacet reakcí. Jedná se o velice různorodou škálu reakcí, jako například hydroxylace, N- O- a S- dealkylace, sulfoxidace, epoxidace, deaminace, dehalogenace, peroxygenace, izomerace či přesmyk. Rovněž přehled substrátů je velice rozmanitý. Jsou zde zahrnuty lipidy, jako mastné kyseliny, steroidy, prostaglandiny či retinoidy, dále rostlinné látky a látky mikroorganismů jako například antibiotika, dále průmyslově vyráběná xenobiotika, jako léčiva či pesticidy. [11], [12]

Zde je přehled nejběžnějších reakcí katalyzovaných P450:

- 1) Hydroxylace- Nejjednodušším případem hydroxylace je tvorba alkoholů (např. ze steroidů či alkanů). Jedná se o detoxikační reakce, ale také o bioaktivace.
- 2) Oxygenace- Jedná se o oxygenaci heteroatomů, jako například N, S, P či I.
- 3) Dealkylace- Má mechanismus podobný hydroxylačním reakcím.
- 4) Epoxidace- Produkty epoxidace jsou nestálé a reagují s nukleofilními skupinami v makromolekulách. [11]

1.2.5 Nomenklatura a klasifikace

Vzhledem k velkému počtu forem P450 vznikla potřeba jejich klasifikace. Jednotlivé formy jsou do genetických rodin a podrodin podle míry homologie jejich primární struktury. Do jedné rodiny patří cytochromy P450, u kterých je homologie větší než 40 % a do podrodin větší než 60 %. [3] V současnosti je známo 11294 forem v 977 rodinách (většina z nich je bakteriálního původu) a 2519 podrodinách všech cytochromů P450. [14] Jak již bylo zmíněno cytochromy P450 mají zkratku CYP (CYtochrome, P jako pigment a 450 je absorpční spektrum při komplexu s CO, obr.3), Rodina se označuje číslem, podrodina písmenem a jednotlivé izoenzymy číslem za písmenem podrodiny (např. CYP3A4). [3]

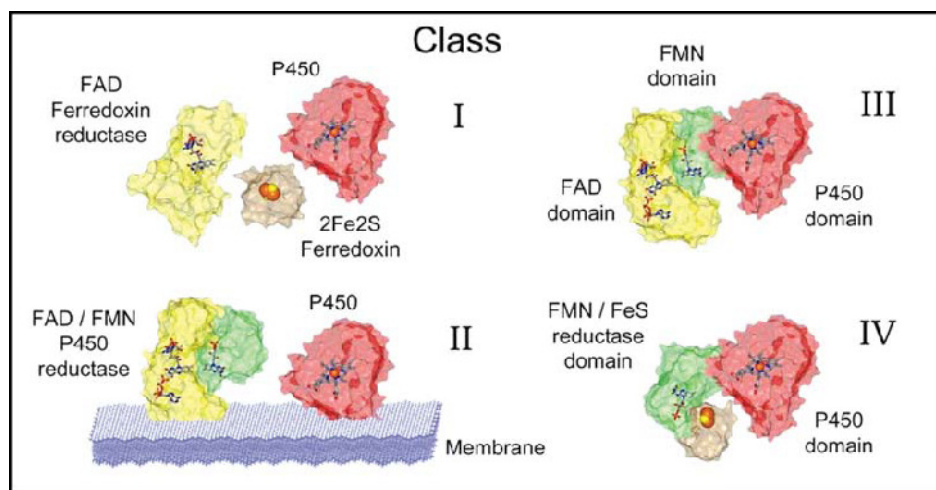


Obr. 3 Typické absorpční spektrum cytochromu P450 102 (převzato z [7])

Další možnou klasifikací těchto enzymů je klasifikace do čtyř tříd I- IV, znázorněno na obr. 4. Mitochondriální a bakteriální P450 patří do třídy I. Jedná se o tří-složkový systém zahrnující P450, ferredoxin a NADH dependentní, FAD obsahující ferredoxin reduktasu. P450 třídy I (resp. B- typu) přijímají elektrony z ferredoxinu (FeS protein), který je redukován reduktasou obsahující FAD (NADH- či NADPH-dependentní). Do této třídy spadá skupina CYP101 (P450cam)- kafrové hydroxylasy izolované z *Pseudomonas putida*. Tato skupina dále zahrnuje mitochondriální P450 z dřevě nadledvinek, které metabolizují steroidy. [13]

Mezi nejvíce prostudované enzymy z třídy II (resp. E- typ) patří mikrosomální jaterní enzymy. Ty jsou redukovány NADPH- cytochrom P450 reduktasou (FAD/FMN). Podílí se na aktivaci karcinogenů a metabolismu mnoha léčiv. [13]

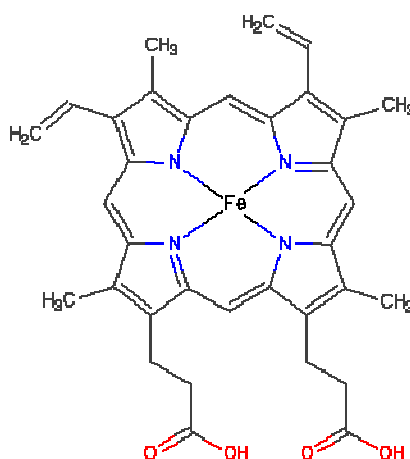
P450 BM3, izolované z *Bacillus megaterium*, spadá do třídy III. Obsahuje stejné komponenty jako třída II, tedy P450 a NADPH- dependentní diflavinreduktasu, ale je rozpustný. Poslední třída enzymů P450, třída IV, byla objevena v *Rhodococcus*. Je to jednosložkový systém obsahující NADPH- dependentní, FMN- obsahující reduktasu a ferredoxin v hemové doméně. [15]



Obr.4 Klasifikace cytochromů P450 (převzato z [15])

1.2.6 Struktura

Cytochromy P450 patří mezi hemoproteiny, jejichž prostetickou skupinou je protoporfyrin IX, hem typu b (obr.5). Tento typ hemu dále obsahují také cytochrom b, hemoglobin, myoglobin, nitroforin, katalasy, NO synthasa či některé peroxidasy.



Obr. 5 Hem b

Tato prostetická skupina je hluboko zanořená v proteinové globuli. [16], [17] Struktura protoporfyrinu IX je dobře prozkoumána. Skládá se ze čtyř pyrolových kruhů, které jsou propojeny methinovými skupinami. Typ porfyrinu určují postranní řetězce.

Protoporfyrin IX obsahuje jako postranní řetězce: methyl, vinyl a zbytky propionové kyseliny. [18] Porfyrinový skelet je na apoprotein vázán hydrofobními silami a prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu, která se nachází v aktivním centru enzymu a po čtyřech atomech dusíku z porfyrinového skeletu je pátým ligandem železa v hemu, šesté místo (2. axiální ligand) zůstává volné, v nativním stavu je obsazeno molekulou vody. [3] Cytochromy P450 existují díky přechodnému charakteru ve dvou spinových formách- nízkospinové a vysokospinové. Nízkospinová forma (spin $1/2$) má charakteristické maximum při 418 nm, Soretův pás. Ion železa je zde hexakoordinovaný, ion tedy interaguje ještě s jedním ligandem, atomem kyslíku z molekuly vody či může interagovat například s $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$ skupinou postranních řetězců aminokyselin apoproteinu. Ion železa je prakticky v rovině porfyrinového skeletu. U vysokospinové formy je ion železa většinou pentakoordinovaný (spin $5/2$) a všechny jeho valenční elektrony jsou nespárované. Ion železa se nachází mimo rovinu porfyrinového skeletu díky thiolátové skupině. Vysokospinová forma vykazuje maximum Soretova pásu při 390 nm. V klidovém stavu jsou oba tyto stavy v rovnováze. Ale při vazbě substrátu do vazebného místa dochází k posunu poměru ve prospěch vysokospinové formy, protože šestý ligand je vytlačen. V absorpčním spektru se toto projeví nárůstem absorbance při 390 nm a poklesem při 418 nm, toto spektrum se nazývá jako substrátové. Jelikož šestým ligandem hemového železa může být i substrát nebo nepřeměňovaná látka vázající se do aktivního centra enzymu, může docházet k poklesu absorbance při 390 nm a nárůstu při 418 nm až na 460 nm, to je potom spektrum ligandové. [19]

Prostorová struktura P450

První tří-dimenzionální struktura byla zjištěna u bakteriálního cytochromu P450 1A1 (P450cam) (Poulos, 1987). Cytochromy P450 jsou složeny z 12 helixů označených písmeny A – L. Vnitřní struktura je tvořena 4- α -svazkem, složeným ze tří paralelních helixů (D, L a I) a jednoho antiparalelního (E). Helixy I a L interagují z hemem, hem je umístěn právě mezi těmito dvěma helixy. Dlouhý helix I formuje stěnu hemové kapsy. Helixy B, C, F a G tvoří komplex se substrátem (obr. 6). [19]

Variabilita struktur P450 a flexibilita jejich aktivních míst umožňuje vázat různě velké substráty na různé cytochromy P450 s různou specifitou. Srovnávací analýzou sekvencí P450 bylo definováno šest oblastí rozpoznávajících substrát (SRS z angl. substrate recognition site). SRS1 je oblast B helixu, SRS 2,3,4 a 6 jsou části F, G, I a K helixů a SRS 5 je $\alpha 4$. Obecně tyto SRS předurčují substrátovou specifitu a bod mutace. [19]



Obr. 6 Typická prostorová struktura cytochromu P450 (převzato z [20])

1.2.7 Regulace a polymorfismus

Cytochromy P450 jsou schopné indukce. Tato schopnost se vyvinula jako obranný mechanismus organismů před škodlivými látkami z vnějšího prostředí. Kontrola exprese P450 má čtyři úrovně [35]: transkripci, stabilizaci mRNA, translaci a posttranslaci. Fázi, jak ovlivnit množství exprimovaných cytochromů P450, představuje stabilizace mRNA. Existují jisté proteiny, které selektivně váží mRNA, a tak ji stabilizují. Při posttranslačních úpravách lze modulovat citlivost enzymu k proteolytickému štěpení. Další možnou úpravou je fosforylace serinových zbytků, vedoucí k destabilizaci řetězce. Opačnou stránkou k indukci je regulace snižující hladinu cytochromů P450. Tu mohou zprostředkovat látky, které u jiných forem mají vlastnosti indukční (např. 2C11 a

polyaromatické uhlovodíky). Podstatou tohoto mechanismu je snížení množství mRNA. Další možností je snížení hladiny CYP způsobené interferony či určitou nemocí, při které se obsah interferonů v krvi zvyšuje. To má přímý vliv na stav pacienta, protože v důsledku toho dochází k snížení metabolismu podávaných léčiv. Reaktivní chemikálie působící na molekulu P450 mohou způsobovat snížení aktivity P450.

Jsou tři základní děje, jež vedou k inhibici:

- a) Destrukce hemu alkylací dusíku v pyrolovém jádře, kdy následuje ztráta železa a odstranění porfyrinového derivátu z proteinu.
- b) Jestliže při tvorbě reaktivních elektrofilů dojde k interakci intermediátu s apoproteinem.
- c) Destrukce hemu a jeho následná reakce s proteinem. [35]

Dalším faktorem, který ovlivňuje aktivitu jednotlivých forem je genetická výbava organismu. Mutace v genech mohou vést k expresi enzymů se zrušenou, sníženou či zvýšenou aktivitou. Všechny cytochromy P450, metabolizující cizorodé látky, vykazují genetický polymorfismus. [35] Vrozené změny DNA v kódující či regulační části genů mohou vést buď k absenci některé formy, ke změně inducibility či k utvoření formy P450 s pozmeněnou katalytickou aktivitou. U genů, které kódují enzymy P450 s klíčovou fyziologickou funkcí může mít přítomnost defektní alely velmi špatné následky, zatímco u genů kódujících enzymy přeměňující xenobiotika nemívá výskyt defektní alely tak přímé patologické důsledky, ale může vést ke zvýšení citlivosti vůči škodlivým účinkům některých xenobiotik či léčiv. U některých lidí je přeměna takového léčiva rychlá- rychlí metabolizátoři (extensive metabolisers), u dalších může dojít k předávkování i běžným množstvím podaného léčiva, protože přeměna probíhá pomalu- pomalí metabolizátoři (poor metabolisers). [35] Prototypem výzkumu v této oblasti je forma 2D6. U které je známo více jak 70 alel. Pro P450 alely se používá takováto nomenklatura: *1, *2, *3, ... [7] Současný stav je na: <http://www.imm.ki.se/Cypalleles/>. [36]

1.3 Přehled cytochromů P450

1.3.1 Savčí cytochromy P450

Rodina CYP1 se skládá ze dvou podrodin, CYP1A a CYP1B podrodiny. Podrodina CYP1A má dva členy CYP1A1 a CYP1A2, [7] které mají ze 70% identickou sekvenci. Obě podrodiny mají velkou úlohu v aktivaci karcinogenů [21], celá CYP1A podrodina se účastní oxidativního metabolismu exogenních látek. Typickým příkladem substrátu je benzo(a)pyren a acetanilid. [21] cDNA a geny těchto zástupců byly izolovány z rozličných druhů.

Podrodina 2A zahrnuje dvanáct forem. CYP2A1, CYP2A2 a CYP2A3 byly nalezeny v potkanech, CYP2A4, CYP2A5 a CYP2A12 v myších, CYP2A6 a CYP2A7 u člověka, CYP2A8 a CYP2A9 v křečcích a CYP2A10 a CYP2A11 u králíka. Členové podrodiny CYP2A nalezené u hlodavců se liší oproti lidskému CYP2A6 svou katalytickou aktivitou, indukci a inhibicí.

Podrodina CYP2B je spojena s fenobarbitalovým typem indukce u hlodavců. Podílí se na metabolismu endogenních sloučenin [22], [23] a exogenních substrátů, na aktivaci xenobiotik do toxických a genotoxických forem. Její formy jsou exprimovány v játrech, dále v žaludku, mozku a ledvinách. [25] Formy 2B1 a 2B2 se liší pouze v třinácti aminokyselinách, mají vysoký stupeň homologie- 98%. [24]

Lidské formy CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19 patří do CYP2C podrodiny. CYP2C8, CYP2C9 a CYP2C19 se vyskytují v játrech, zatímco CYP2C18 v pokožce. CYP2C9 a CYP2C18 se v 92% shodují v aminokyselinové struktuře a účastní se metabolismu léčiv. [26] U této rodiny se projevuje výrazný genetický polymorfismus. Na rozdíl od zbývajících členů CYP2C podrodiny není CYP2C18 inducibilní. CYP2C19 je známý díky svému polymorfismu, pomalými metabolizátory je 3-5% kavkazské populace, cca 20% asijské populace a na ostrovech v Pacifiku se jedná až o 75%. Mezi důsledky polymorfismu u této formy počítáme nevolnost (omeprazol) a zvýšenou sedaci (diazepam). [27] Do podrodiny CYP2E patří pouze jedna forma a to CYP2E1.

Enzymy spadající do CYP3A podrodiny se účastní metabolismu xenobiotik. [21] Tato rodina se jeví jako nejdůležitější, protože se účastní jak biotransformačních procesů xenobiotik, ale i endogenních substrátů. Cytochromy, které do této podrodiny řadíme jsou CYP3A4, CYP3A5 a CYP3A7. CYP3A7 je fetální formou CYP3A4. Tato forma se vyskytuje v placentě. Tato rodina má velmi širokou substrátovou specifitu, což naznačuje, že CYP3A se vyvinula v průběhu evoluce z toho důvodu, aby chránila živé organismy před škodlivými látkami z vnějšího prostředí, které se do organismu dostávají potravou. [27]

Rodina CYP4 má celkem 6 podrodin- CYP4A, CYP4B, CYP4C, CYP4D, CYP4E a CYP4F podrodinu. Z těchto podrodin byla ale pouze CYP4A rozsáhle prostudována. Formy, které řadíme do CYP4, můžeme nalézt jak u savců, tak i například u švábů či octomilek. Tato rodina se podílí na metabolismu endogenních sloučenin (mastné kyseliny, prostaglandiny atd.). [25]

Formy cytochromů P450 nacházející se v lidském těle můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří izoenzymy obsažené v játrech, jsou to 1A2, 2A6, 2D6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2E1 a 3A4. Do druhé skupiny můžeme zařadit izoenzymy přítomné v jiných tkáních, jako například ledviny, plíce, mozek, střeva, prostata či děloha, CYP 1A1, 2B6, 2E1 a 3A4. [3]

První skupina (jaterní enzymy):

CYP1A2 je typickým jaterním enzymem, je exprimován pouze v játrech. [7] Jeho podíl v játrech je 15%. Aktivuje prokarcinogeny (toxické látky, toxická léčiva, enviromentální polutanty). Jeho induktory jsou cigaretový kouř, grilované jídlo, léčiva (např. omeprazol). Má velmi širokou substrátovou specifitu. Substráty je velká skupina karcinogenů (aromatické a heterocyklické aminy), kofein a další látky. [3] Zvýšená aktivita této formy ovlivňuje výskyt nádorů, a to jak počet, tak i růst. Jedná se o nádory plic, prsu či kůže. [27]

CYP2A6 aktivuje prokarcinogeny, má významný genetický polyformismus. Má roli v oxidaci nikotinu. Jeho specifickou reakcí je kumarin 7-hydroxylace, která slouží v diagnostice. Substráty je právě nikotin, kumarin či nitrosamin, azidothymidin. Inhibitorem je methoxsalen. V játrech tvoří asi 5% z celkových CYP. [3] Je spojen

s rakovinou jater, jeho zvýšená exprese je spojována s chronickým zánětem a cirhousou jater. [7]

Ačkoli obsah **CYP2D6** je v játrech malý (5% z celk. P450), význam této formy je velký. Podílí se na metabolismu klinicky používaných léčiv, 2D6 metabolizuje až 20-25% z nich. [29], [32] Mezi jeho substráty patří antidepresiva, neuroleptika či β - blokátory. Inhibitorem může být například methadon, chinidin. [32] V roce 2002 bylo popsáno 75 alelických variant CYP2D6, z nichž některé vyvolávají ztrátu aktivity enzymu. [27]

CYP2C8 je exprimován v játrech a dále také v ledvinách, mozku, děloze či vaječnících. Jeho substrátem je taxol. Aktivuje karcinogenní benzo(a)pyren. [3] **CYP2C9** stejně jako P450 CYP2C8 aktivuje benzo(a)pyren. Je jedním z hlavních P450 podílejících se na metabolismu léčiv (warfarin, phenytoin). Inhibitorem je sulfafenazol. Jeho hladina rychle roste v prvním měsíci po narození, poté se s věkem nemění. Jeho obsah v játrech je kolem 20% . [3] Některé sloučeniny v těle jsou touto formou oxidovány, jako linoleová kyselina (epoxidace) či vitamin A (4- hydroxylace).

V játrech se množství **CYP2C19** pohybuje kolem 5%. Metabolizuje léčiva jako omeprazol, citalopram či diazepam. Jeho inhibitor je flukonazol a mezi induktory patří barbituráty či rifampicin. [3], [5]

CYP2E1 je hlavní součástí mikrosomálního systému oxidace ethanolu. Metabolizuje sloučeniny s malou molekulovou hmotností (ethanol, anestetika, rozpouštědla). [28] Metabolizuje například ethanol, dále acetaldehyd, akrylamid, benzen, butanol, diethylether, pyridin a další. Jeho substráty jsou často také jeho induktory, jako právě ethanol. Je také indukován hladověním. Jeho inhibitorem je disulfiram. Aktivuje karcinogeny, převážně nitrosaminy. V játrech je ho kolem 10% z celkového množství CYP. [3], [33] CYP2E1 je zodpovědný za tvorbu hepatotoxických metabolitů. Lidé pravidelně konzumující alkohol mají až trojnásobně větší obsah tohoto enzymu v játrech a mají rychlejší biotransformaci léčiv. [27]

CYP3A4 (je společně s CYP3A5) nejvíce zastoupeným enzymem v játrech [29], [30], [31] kolem 30%. Dále se nachází také v ledvinách a střevech. Podílí se na metabolismu antibiotik (rifampicin, ketoconazol, erythromycin, cyklosporin), organofosfátových pesticidů, endogenních sloučenin (testosteron). Inhibitorem je gestoden. [34]

Druhá skupina (enzymy dalších tkání):

CYP1A1 gen má 7 exonů a CYP1A1 je velmi podobný P450 CYP1A2, mají 70% homologii v aminokyselinách, také aktivuje prokarcinogeny a katalyzuje stejné reakce. [7] Tento enzym se nachází např. v žaludku, prostatě, pankreatu, tlustém střevě, děloze, placentě, krevních buňkách (lymfocyty, monocyty). Je přítomen i v játrech, ale pouze v plodu. Je indukován u kuřáků. Existuje hypotéza, že prostřednictvím výskytu CYP1A1 v organismu se dá identifikovat rakovina žaludku či plic. [3]

CYP2B6 se nachází v játrech a v žaludku a to v nízkém množství, kolem 0,2 %. Podílí se na oxidaci polutantů životního prostředí, aktivaci některých karcinogenů, metabolizuje protinádorová léčiva (cyklofosfamid). [3]

CYP2E1 a **CYP3A4**, tyto dvě formy lze zařadit jak do jaterních enzymů, tak i do této skupiny, protože se nachází i v jiných tkáních. Podrobněji jsou posány v předchozím textu.

1.3.2 Rostlinné cytochromy P450

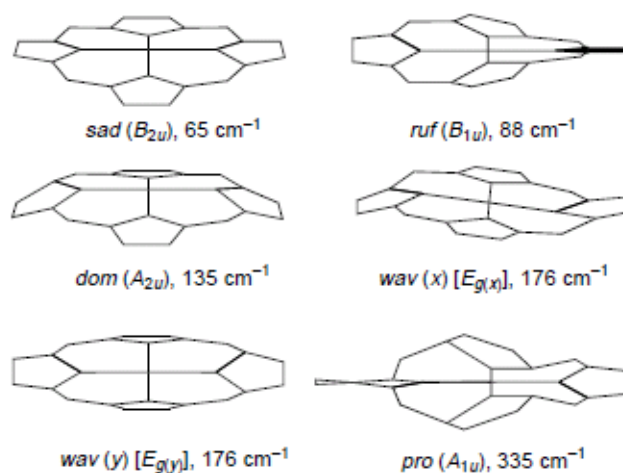
Rostliny jsou organismy, které se musí přizpůsobovat nepříznivým klimatickým vnějším podmínkám a bránit se proti útokům různých býložravců a jiných škůdců. Pro svoji ochranu mají tyto schopnosti: umí přesměrovat svůj celkový metabolismus, vybudovat fyzické bariéry, produkovat chemikálie, které je činí jedovatými a komunikovat s okolním prostředím. Rostliny jsou schopné syntetizovat uhlíkaté sloučeniny a syntetizují řadu dalších přírodních produktů. V posledních letech se ukazuje, že pro většinu biosyntetických drah odpovědných za syntézu přírodních látek jsou zajímavé právě P450. Jedná se o syntézy například alkaloidů či izoflavonoidů. Mezi rodiny rostlinných cytochromů P450 patří: 51, 71-99, 701-727 a 736. [7]

1.4 Porfyriny

Porfyriny řadíme mezi tetrapyroly. Odvozeniny tetrapyrolu jsou obsaženy v mnoha sloučeninách- v hemu, ve fotosyntetických proteinech (chlorofyl, feofytin) a v dalších sloučeninách jako je například vitamin B12. Biologická funkce tetrapyrolů je velmi rozmanitá, od transportu kyslíku (hemoglobiny), úschovy kyslíku (myoglobiny), přeměna sluneční energie na chemickou (fotosyntetická reakční centra), přenos elektronů (cytochromy) a další enzymové reakce (peroxidasy, P450, methylreduktasy, methyltransferasy). [37]

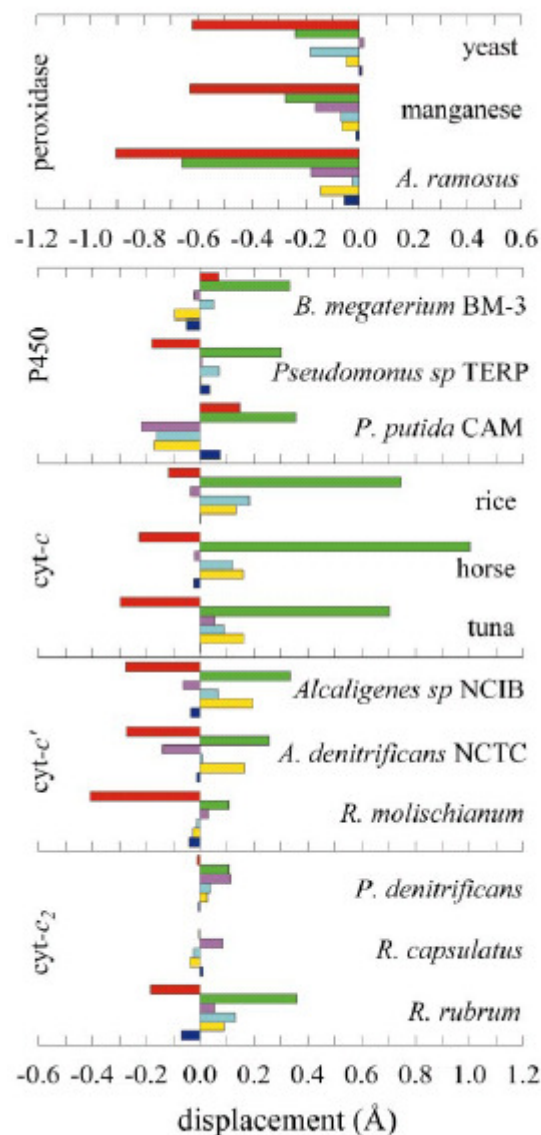
Vzhledem ke svému významu jsou hemové proteiny jedním z nejstudovanějších systémů v biochemii. Důležitou otázkou je role proteinu v modulaci možností porfyriu z hlediska jeho biologických funkcí. Velkým význam má prostor obklopující aktivní místo hemu. Další zajímavou otázkou je interakce hemu a proteinu či přítomnost aminokyselinových řetězců v sousedství aktivního místa.

Porfyrin má 72 vibračních módů, 58 rovinných a 14 mimorovinných. Vlivem obklopujícího apoproteinu dochází k indukci deformací v hemu, izolovaný samotný hem je v roztoku planární. O tuto problematiku se zajímá Shelnut a spol. Analýza krystalografických struktur ukázala, že hemové proteiny mají mimorovinnou konformaci hemu. Typické vibrační módy porfyriu jsou na obr.7. Jedná se o módy *sad* (z angl. saddling), *ruf* (z angl. ruffling), *dom* (z angl. doming), *wav* (z angl. waving) a *pro* (z angl. pyrrole propeller). [37]



Obr. 7 Vibrační módy porfyriu (převzato z [37])

Tato pokřivení na obrázku jsou jednoduché symetrické deformace, v proteinech se často vyskytují spíše komplikované asymetrické deformace. Právě hemoproteiny jsou typickým příkladem nonplanarity. [37] Nejvíce se vyskytuje v cytochromech c [38] a peroxidasách. Obr. 8 ukazuje srovnání struktur hemu v různých proteinech. Tato konformace hemu může mít význam v jeho biologické funkci. S použitím NSD metody (normal-coordinate structural decomposition)- rozklad na normální koordináty, se provádí charakterizace a kvantifikace pokřivení hemu. [37], [39] Možným významem tohoto pokřivení je, že toto pokřivení hemu ovlivňuje významné fyzikální vlastnosti (např. redoxní potenciál, energii či afinitu k ligandu). Právě nejvíce studovaným jevem tohoto pokřivení je efekt na redoxní potenciál. Bylo zjištěno, že porfyriny s mimorovinnou konformací jsou jednodušeji oxidovány a hůře redukovány než porfyriny s planární konformací. Další studie ukázala, že některé porfyriny s planární konformací nebyly chirální, ale v mimorovinné konformaci se staly chirálními. Změnou konformace porfyrinu se mění zásaditost atomů dusíků z porfyrinu. [37]



Obr. 8 NSD výsledky pro několik typů hemoproteinů (peroxidasa, cytochrom P450, cytochrom c, cytochrom c', cytochrom c₂). Vždy jsou vyobrazeny výsledky hemů tří různých druhů. Legenda barev: červená- sad, zelená- ruf, azurová- wav (x), žlutá (wav (y), modrá- pro. Podrobnosti ke shlednutí na [38]. (převzato z [37])

Role hemu v proteinech může být pasivní či aktivní. Pasivní roli vykonává hem např. u globinů, kde slouží jako nosič iontu železa a kyslíku. Aktivní roli má např. u peroxidas. [40]

1.4.1 Interakce hem – protein v cytochromech P450

Poznání tří-dimenzionální struktury cytochromů P450 je důležité a to z toho důvodu, že znalostí detailů interakce mezi enzymem a substrátem může pomoci pochopit specifitu jednotlivých forem a mechanismus působení cytochromů P450, který zahrnuje způsob vazby substrátu, elektronový přenos z NADPH-P450 reduktasy a redukce železa hemu a vazbu molekuly kyslíku a jeho aktivaci. Dlouhou dobu se výzkum prováděl na prokaryotních cytochromech P450, nejčastěji P450cam, protože jdou snadněji krystalizovat než mikrosomální P450. V posledních letech ale byla vyřešena prostorová struktura mnoha dalších forem cytochromu P450, a to jak forem se substrátem, inhibitorem, nebo bez nich. Přesto poznání nových struktur neřeší stále všechny problémy. Krystalografická analýza vychází obvykle z geneticky upravených molekul (chimér). Proto není mnoho otázek (dynamika interakce enzym- substrát, efekty flexibility enzymů) stále kompletně rozluštěno. Používají se zde proto experimentální metody, které mohou na tyto otázky podat ucelenou odpověď. Jsou to spektroskopické metody jako (absorpce, fluorescence a Ramanova spektroskopie) a chemické modifikace (cross-linking, fotoafinitní značení). [41]

Z hlediska regulace enzymové aktivity, převážně kvůli schopnosti navázat kyslík a pro modulaci redoxního potenciálu, je zajímavou otázkou, jak probíhá komunikace mezi proteinem a hemem. [42]

Existují různé možnosti, jak hem může interagovat s proteinem, jenž ho obklopuje.

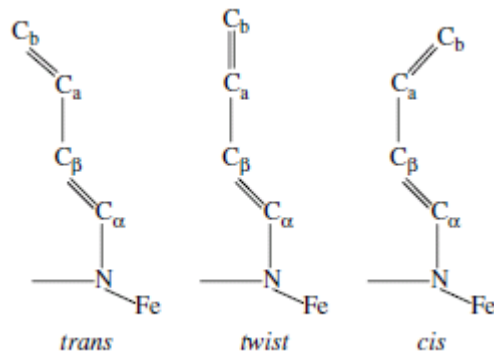
- Přímý vliv elektronové hustoty axiálního ligandu. [43]
- Ovlivnění separace nábojů (a tím ovlivnění redoxního potenciálu) změnou permitivity okolí iontu železa z porfyrinu. Tento mechanismus je dobře znám u cytochromů c. [44] U cytochromů P450 je navržen jako jedno z vysvětlení specifických vlastností. Je realizován například přibližováním či vzdalováním hydrofobních řetězců.
- „Mechanický“ vliv hemoproteinu na polohu iontu železa v rovině hemu. Tento mechanismus je velmi dobře propracován, jelikož je typickým příkladem u alosterie hemoglobinu. [45], [46]

- Deformace hemu vlivem apoproteinů. Vzhledem k pevnosti skeletu u cytochromů P450, tak se jedná o deformace mimorovinné. Ty výrazně ovlivňují rozsah konjugace („aromaticky“) superkruhu a tím i redoxní a vazebné vlastnosti. Tomuto mechanismu se v poslední době věnuje zvýšená pozornost, a to díky nárůstu počtu vyřešených prostorových struktur s dostatečným rozlišením. Tímto mechanismem se zabývá Shelnett a spol. (kapitola 1.4) [37], [39]
- Pomocí postranních řetězců hemu- methylů, vinylů a propionátů. Mezi zajímavé možnosti řadíme právě vinyly a propionáty. Propionáty jsou předmětem studie již dávno, jsou to řetězce nabitě, takže zprostředkovávají vazebné propojení hemu s apoproteinem často. V poslední době jsou z hlediska možné komunikace s obklopujícím proteinem často diskutovány vinylové postranní řetězce. Je u nich možnost konjugace (mají nenasycenou vazbu) s aromatickým systémem hemu.[42]

Důležitá aktivní role hemu je právě díky jeho postranním řetězcům, propionátům. Existuje mnoho studií ukazujících, že propionáty mají aktivní roli v regulaci přenosu elektronu na iont železa a ovlivňují biochemické vlastnosti hemu. [47] Oblíbeným systémem pro objasňování struktury, funkce a dynamiky v hemových proteinech je myoglobin. Zdá se, že propionátové řetězce jsou jedním ze základních faktorů přispívajících k inkorporaci hemu a orientaci u hemových proteinů. [48] Slouží jako ukotvující elektrostatické body, které pomáhají udržet hem na místě. [40], [49]

Jak již bylo zmíněno, existuje možnost, že právě vinylové řetězce jsou mediátory v interakci hem – protein. [53]

Pro vinylové skupiny existují tři možné orientace: cis, trans a twist, viz. obr. 9. Jedná se o šesti atomový řetězec $C_b=C_a(\text{vinyl})-C_\beta=C_\alpha(\text{pyrol})-N_{\text{pyr}}-\text{Fe}$.



Obr. 9 Orientace vinylových řetězců (převzato z [50])

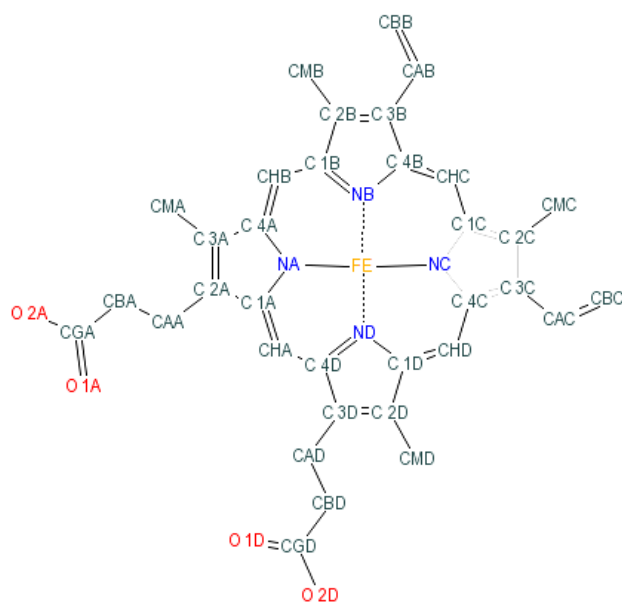
Atomy C_a (C_b) z vinylových řetězců interagují s obklopujícími atomy různými mechanismy:

- Van der Waalsovy síly mezi C_a a/nebo C_b a CH skupinou zbytku alifatického postranního řetězce (3,5 – 4,1 Å)
- Slabé elektronové Π - Π interakce, interakce mezi Π elektrony vinylu C_a a C_b a atomy síry, kyslíku, uhlíku (3,8- 4,3 Å)
- Vzdálenost mezi C_a (C_b) a obklopujícími atomy (≤3,3 Å) [50]

2. Použité metody

2.1 Orientace vinylových postranních řetězců hemu

Pomocí programu RasTop ver. 2.2 byly analyzovány torzní úhly ($C\alpha C\beta-CaCb$) u vinylových postranních řetězců hemu u různých forem cytochromů P450. Torzní úhly vinylů v pozici 2 byly definovány pro následující řadu atomů C4B-C3B-CAB-CBB a v pozici 4 pro C4C-C3C-CAC-CBC, viz obr 10.



Obr.10 Hem typu b (převzato z [42])

Krystalografická data cytochromů P450 byla stažena z Protein Data Bank. [51] Byly prozkoumány formy cytochromů P450, které uvádí následující tabulka 1. V případě, že molekula krystalizovala jako oligomer, byly zkoumány všechny řetězce. Celkem bylo analyzováno 406 řetězců.

Tab. 1 Přehled analyzovaných struktur

P450	PDB kód	P450	PDB kód	P450	PDB kód
P450 _{cam}	1AKD	P450 _{cam}	3FWJ	P450 _{BM-3}	3KX5
P450 _{cam}	1CP4	P450 _{cam}	3L61	P450 105A1	2ZBX
P450 _{cam}	1DZ4	P450 _{cam}	3L62	P450 105A1	2ZBY
P450 _{cam}	1DZ6	P450 _{cam}	3L63	P450 105A1	2ZBZ
P450 _{cam}	1DZ8	P450 _{cam}	4CP4	P450 105D1	3ABB
P450 _{cam}	1DZ9	P450 _{cam}	4CPP	P450 105P1	3ABA
P450 _{cam}	1GJM	P450 _{cam}	5CP4	P450 107	1JIN
P450 _{cam}	1K20	P450 _{cam}	5CPP	P450 107	1JIP
P450 _{cam}	1LWL	P450 _{cam}	6CP4	P450 107	1OXA
P450 _{cam}	1O76	P450 _{cam}	6CPP	P450 107A1	1EGY
P450 _{cam}	1PHA	P450 _{cam}	7CPP	P450 107A1	1EUP
P450 _{cam}	1PHB	P450 _{cam}	8CPP	P450 107A1	1JIN
P450 _{cam}	1PHC	P450 _{BM-3}	1BU7	P450 107A1	1JIO
P450 _{cam}	1PHD	P450 _{BM-3}	1BVY	P450 107A1	1JIP
P450 _{cam}	1PHE	P450 _{BM-3}	1FAG	P450 107A1	1Z8O
P450 _{cam}	1PHF	P450 _{BM-3}	1FAH	P450 107A1	1Z8P
P450 _{cam}	1PHG	P450 _{BM-3}	1JME	P450 107L1	2C7X
P450 _{cam}	1QMQ	P450 _{BM-3}	1JPZ	P450 107L1	2VZM
P450 _{cam}	1T85	P450 _{BM-3}	1POV	P450 107L1	2VZ7
P450 _{cam}	1T86	P450 _{BM-3}	1POW	P450 107L1	2WHW
P450 _{cam}	1T87	P450 _{BM-3}	1POX	P450 107L1	2WI9
P450 _{cam}	1T88	P450 _{BM-3}	1SMI	P450 113A1	2JJN
P450 _{cam}	1UYU	P450 _{BM-3}	1SMJ	P450 113A1	2WIO
P450 _{cam}	2A1M	P450 _{BM-3}	1YQO	P450 119	1F4T
P450 _{cam}	2A1N	P450 _{BM-3}	1ZOA	P450 119	1F4U
P450 _{cam}	2A1O	P450 _{BM-3}	1ZO4	P450 119	1IO7
P450 _{cam}	2CP4	P450 _{BM-3}	1ZO9	P450 119	1IO8
P450 _{cam}	2CPP	P450 _{BM-3}	2BMH	P450 119	1IO9
P450 _{cam}	2FE6	P450 _{BM-3}	2HPD	P450 120A1	2VE3
P450 _{cam}	2FER	P450 _{BM-3}	2IJ2	P450 120A1	2VE4
P450 _{cam}	2H7Q	P450 _{BM-3}	2IJ3	P450 121	1N4G
P450 _{cam}	2QBL	P450 _{BM-3}	2J1M	P450 121	1N40
P450 _{cam}	2QBM	P450 _{BM-3}	2JYS	P450 121	2IJ5
P450 _{cam}	2QBN	P450 _{BM-3}	2NNB	P450 121	2IJ7
P450 _{cam}	2QBO	P450 _{BM-3}	3BEN	P450 121	3CXV
P450 _{cam}	2ZUH	P450 _{BM-3}	3CBD	P450 121	3CY0
P450 _{cam}	2ZUI	P450 _{BM-3}	3DGI	P450 121	3CY1
P450 _{cam}	2ZUJ	P450 _{BM-3}	3EKB	P450 121	3G5F
P450 _{cam}	3CP4	P450 _{BM-3}	3EKD	P450 121	3G5H
P450 _{cam}	3CPP	P450 _{BM-3}	3HF2	P450 124	2WM4
P450 _{cam}	3FWF	P450 _{BM-3}	3KX3	P450 124	2WM5
P450 _{cam}	3FWG	P450 _{BM-3}	3KX4	P450 125	3IVY

Tab. 1 Pokračování

P450	PDB kód		P450	PDB kód		P450	PDB kód
P450 125	3IW0		P450 2C9	1OG5		P450 55A1	1F25
P450 125	3IW1		P450 2C9	1R9O		P450 55A1	1F26
P450 125	3IW2		P450 2D6	2F9Q		P450 55A1	1GED
P450 152A1	1IZO		P450 2E1	3GPH		P450 55A1	1GEI
P450 120A1	2ZQJ		P450 2E1	3KOH		P450 55A1	1GEJ
P450 152A2	2ZQX		P450 2E1	3LC4		P450 55A1	1GEK
P450 154A1	2DKK		P450 2R1	3C6G		P450 55A1	1GEM
P450 154C1	1GWI		P450 24A1	3K9V		P450 55A1	1JFB
P450 158A1	2DKK		P450 24A1	3K9Y		P450 55A1	1JFC
P450 158A2	1S1F		P450 3A4	1TQN		P450 55A1	1ROM
P450 158A2	1SE6		P450 3A4	1W0E		P450 55A1	1ULW
P450 158A2	1T93		P450 3A4	1W0F		P450 55A1	1XQD
P450 158A2	2D09		P450 3A4	1W0G		P450 7A1	3DAX
P450 158A2	2D0E		P450 3A4	2JOD		P450 74A	2RCH
P450 170A1	3EL3		P450 3A4	2VOM		P450 74A	2RCL
P450 175	1N97		P450 46A1	2Q9F		P450 74A	2RCM
P450 2A6	1ZIO		P450 46A1	2Q9G		P450 74A	3C6G
P450 2A6	1ZI1		P450 51	1E9X		P450 74A	3DSI
P450 2A6	2FDU		P450 51	1EA1		P450 74A	3DSJ
P450 2A6	2FDV		P450 51	1H5Z		P450 74A	3DSK
P450 2A6	2FDW		P450 51	1U13		P450 74A2	3DAM
P450 2A6	2FDY		P450 51	1X8V		P450 74A2	3DAN
P450 2A6	2PG5		P450 51	2BZ9		P450 74A2	3DBM
P450 2A6	2PG6		P450 51	2VK4		P450 oxyB	1PKF
P450 2A6	2PG7		P450 51	2WUZ		P450 oxyB	1Q5D
P450 2A6	3EBS		P450 51	2WV2		P450 oxyB	1Q5E
P450 2B4	1PO5		P450 51	2WX2		P450 oxyB	1LFK
P450 2B4	1SUO		P450 51	3GW9		P450 oxyB	1LG9
P450 2B4	2BDM		P450 51	3G1Q		P450 oxyB	1LGF
P450 2B4	2Q6N		P450 51	3JUS		P450 oxyC	1UED
P450 2B4	3G93		P450 51	3JUV		P450 termof	1UE8
P450 2B6	3IBD		P450 51	3KHM		P450 termof	2RFB
P450 2C5	1DT6		P450 51	3KIO		P450 termac	2RFC
P450 2C5	1N6B		P450 51	3KSW		P450 terp	1CPT
P450 2C5	1NRG		P450 51	3LD6			
P450 2C8	1GEI		P450 55A1	1CL6			
P450 2C8	1PQ2		P450 55A1	1CMJ			
P450 2C8	2NNH		P450 55A1	1CMN			
P450 2C8	2NNI		P450 55A1	1EHE			
P450 2C8	2NNJ		P450 55A1	1EHF			
P450 2C8	2VN0		P450 55A1	1EHG			
P450 2C9	1OG2		P450 55A1	1F24			

2.2 Analýza okolí postranních řetězců hemu

Tato analýza byla provedena opět pomocí programu RasTop ver. 2.2. Bylo zkoumáno okolí postranních řetězců hemu, konkrétně řetězců vinylových a propionátových. Byly lokalizovány zbytky aminokyselin v blízkosti zmíněných postranních řetězců (do 6 Å). Analýza byla provedena pro typické savčí formy cytochromů P450 CYP2B4 a CYP3A4. U CYP2B4 se jednalo o struktury mající PDB kód: 1PO5, 1SUO a 2BDM, u CYP3A4 struktury s PDB kódem: 1TQN a 1WOF. Krystalografická data cytochromů P450 byla stažena opět z Protein Data Bank.

2.3 Analýza disociačních konstant a elektrostatických interakcí

S využitím programu PROPKA ver. 2 (<http://propka.ki.ku.dk>) [52] byly ve webové verzi vypočteny hodnoty pK_A a analyzovány elektrostatické (coulombické) interakce u nabitých aminokyselinových zbytků (v našem případě lysinu a argininu) nacházejících se v těsné blízkosti (vzdálenost do 6 Å) postranních řetězců hemu (propionátů). Tato analýza byla provedena u stejných struktur jako v případě b).

2.4 Odchytky hemu od planarity

V programu NSD - normal-coordinate structural decomposition [39], [54] byly analyzovány deformační odchytky hemu opět u formy CYP2B4 a CYP3A4. Jednalo se o mimorovinné mody označené sad (z angl. saddling), ruf (z angl. ruffling), dom (z angl. doming), wav (z angl. waving) a pro (z angl. pyrrole propellering). Typický výstup z NSD programu je na obr. 11.

MSD result generated from file untitled.pdb at Thu Jun 27 08:40:37 MDT 2002

Summary of the NSD (in A):

basis	Dip	dip	B2g	B1g	Eu(x)	Eu(y)	A1g	A2g
min.	0.1323	0.0275	0.0019	-0.0561	-0.0416	-0.1109	0.0134	-0.0120
ext.	0.1562	0.0225	0.0012	-0.0548	-0.0416	-0.1115	0.0131	-0.0120
			-0.0117	0.0302	-0.0371	0.0448	0.0032	0.0491
			0.0447	0.0139	0.0152	-0.0073	0.0284	0.0022
			-0.0119	0.0023	0.0366	0.0014	0.0135	-0.0133
			-0.0022	0.0043	-0.0002	-0.0290	-0.0374	-0.0071
			-0.0001	0.0075	0.0072	0.0112	-0.0825	
					0.0025	-0.0009		
					0.0034	-0.0035		
					0.0092	0.0034		
					-0.0029	-0.0179		
					0.0011	-0.0086		
comp.	0.1989	0.0000	0.0478	0.0655	0.0699	0.1255	0.0976	0.0529

basis	Doop	doop	B2u	B1u	A2u	Eg(x)	Eg(y)	Alu
min.	0.3260	0.0196	0.0641	0.1037	-0.1236	0.1480	0.2257	0.0577
ext.	0.3381	0.0131	0.0643	0.1037	-0.1231	0.1502	0.2227	0.0577
			-0.0149	0.0114	-0.0112	0.0566	-0.0641	0.0189
			0.0352	-0.0235	0.0223	0.0158	0.0139	
						-0.0420	-0.0017	
						0.0157	-0.0296	
comp.	0.3464	0.0000	0.0751	0.1069	0.1261	0.1654	0.2366	0.0608

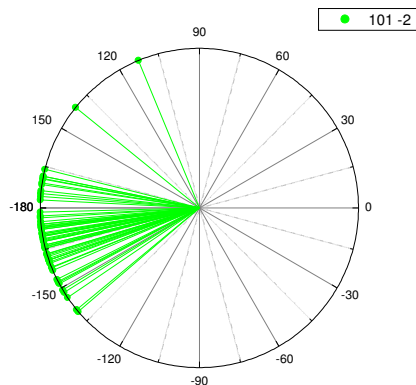
Obr. 11 Příklad výstupu programu pro analýzu NSD (převzato z [54])

3. Výsledky

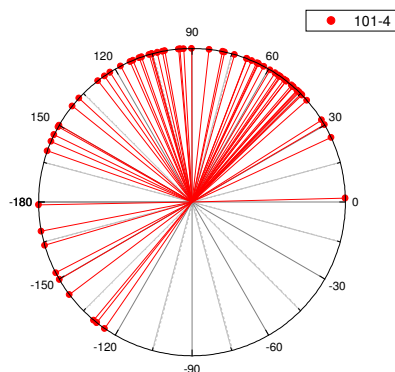
3.1 Orientace vinylových postranních řetězců hemu

Distribuce hodnot torzních úhlů

První proměřovanou skupinou byla forma CYP101, tedy jedna z forem, kde je známo velké množství prostorových struktur. Rozložení hodnot torzních úhlů vinylových řetězců hemu v pozici 2 a 4 je znázorněno na obr. 12 a 13. Každá čára znázorňuje jednu hodnotu torzního úhlu. Porovnáním obr. 12 a 13 je vidět, že distribuce hodnot u vinylů v pozici 2 je méně rozprostřená než v pozici 4. V pozici 2 byly hodnoty soustředěné mezi -145° a 175° . Mimo interval se vyskytly hodnoty 141° (PDB kód 1PHC) a $112,5^\circ$ (PDB kód 3CP4), kde je navázán adamantan. U hodnot v pozici 4 byl interval nejčastějších hodnot mezi 45° a 120° .



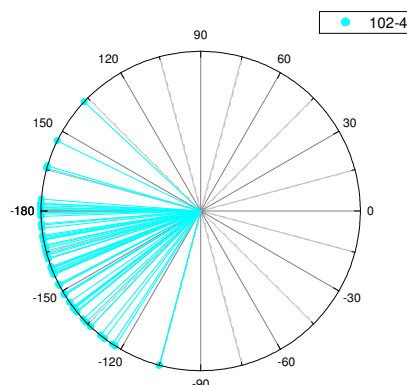
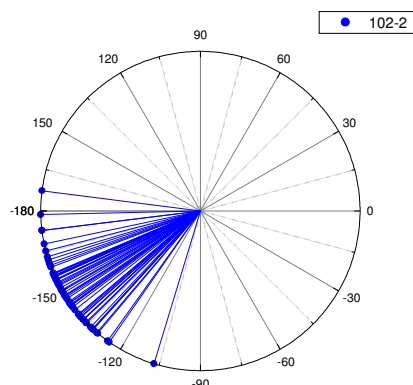
Obr. 12 Hodnoty torzních úhlů pro CYP101 (2-vinyly)



Obr. 13 Hodnoty torzních úhlů pro CYP101 (4-vinyly)

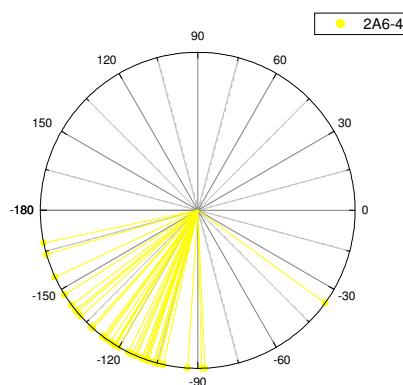
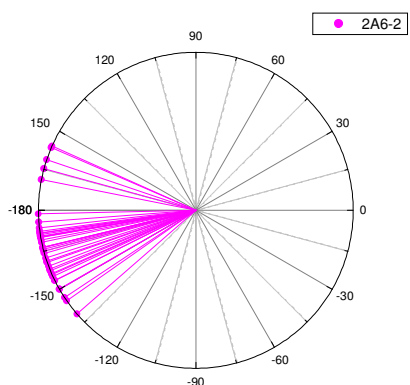
Na obrázku 14 a 15 je znázorněna distribuce úhlů pro CYP102 v pozicích 2 a 4. Stejně jako u formy 101 jsou u pozice 2 hodnoty v menším intervalu než u pozice 4. Ale u CYP102 ten rozdíl není tak veliký jako u CYP101. V pozicích 2 i 4 jsou hodnoty úhlů přibližně mezi -120° a -170° . V pozici 2 jsou mírně odchýlené dvě hodnoty: $172,7^\circ$ (PDB kód 2HPD) a $-106,9^\circ$ (PDB kód 3CBD). V pozici 4 jsou to: -105° (PDB kód 2BMH), $136,9^\circ$

(PDB kód 2HPD), 153,9° (PDB kód 2IJ3), 163,6° (PDB kód 1SMJ) a 164,5° (PDB kód 2J1M).



Obr. 14 Hodnoty torzních úhlů pro CYP102 (2-vinyly) Obr. 15 Hodnoty torzních úhlů pro CYP102 (4-vinyly)

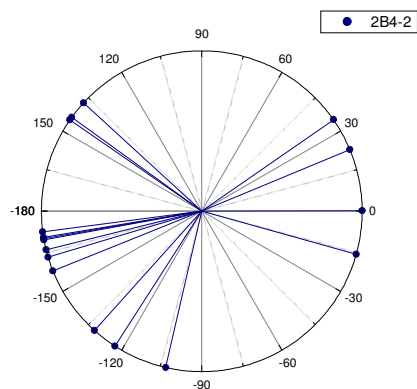
Intervaly hodnot torzních úhlů pro zástupce savčích cytochromů formy CYP2A6 jsou vidět na obrázku 16 a 17. V pozici 2 jsou nejčetnější hodnoty v rozmezí -180° až -150°. V pozici 4 -115° až -140°. Zde je jedna hodnota velmi odlehlá: -35,9° (PDB kód 3EBS).



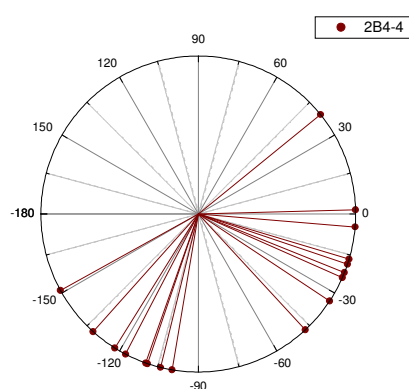
Obr. 16 Hodnoty torzních úhlů pro CYP2A6 (2-vinyly) Obr. 17 Hodnoty torzních úhlů pro CYP2A6 (4-vinyly)

Pro další savčí cytochrom P450, CYP2B4, je situace jiná než v předešlých případech (obr. 18 a 19). Hodnoty torzních úhlů u vinylových řetězců v obou pozicích jsou rozprostřené ve větším intervalu než u jiných forem. Hodnoty úhlů v pozici 2 jsou dokonce ještě ve větším rozmezí než v pozici 4. V pozici 2 jsou odlehlé hodnoty: -15,6°; 0,2°;

34,8° (PDB kód 3G93), zde bylo ale rozlišení 3,2 Å a 22,6° (PDB kód 3G5N). V pozici 4: 39° (PDB kód 1PO5).

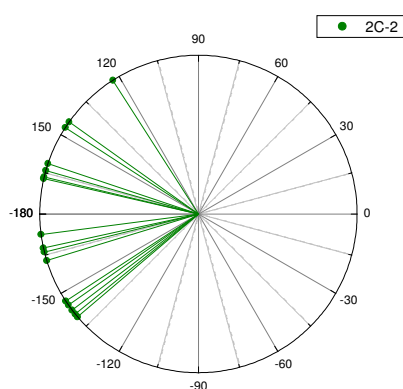


Obr. 18 Hodnoty torzních úhlů pro CYP2B4 (2-vinyly)

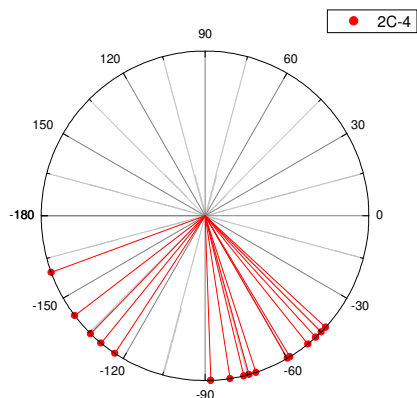


Obr. 19 Hodnoty torzních úhlů pro CYP2B4 (4-vinyly)

Na obrázcích 20 a 21 jsou vidět výsledky pro CYP2C podrodinu, konkrétně pro zástupce CYP2C5, CYP2C8 a CYP2C9. Intervaly hodnot u obou vinylů jsou přibližně stejně rozsáhlé. V pozici 2 jsou mimo nejčtenější interval hodnot tyto formy: CYP2C5: 147° (PDB kód 1DT6) a 2C8- 122,6° (PDB kód 1PQ2); 144,6° (PDB kód 2NNI). V pozici 4 tyto: CYP2C5: -129,4° (PDB kód 1NRG), -159,9° (PDB kód 1NGB) a CYP2C8: -123,4° (PDB kód 1GEI), -142,7° (PDB kód 2NNH).



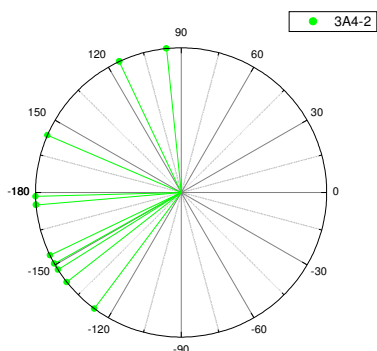
Obr. 20 Hodnoty torzních úhlů pro CYP2C (2-vinyly)



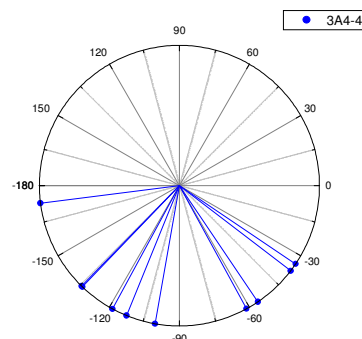
Obr. 21 Hodnoty torzních úhlů pro CYP2C (4-vinyly)

Hodnoty nejvíce zastoupené formy v játrech, CYP3A4, jsou na obrázcích 22 a 23. Rozpětí hodnot je v pozicích 2 a 4 přibližně stejné. U obou pozic je však toto rozpětí

poměrně široké. V pozici 4 je odchýlená hodnota $-172,8^\circ$ (PDB kód 2VOM), kde je ale rozlišení $3,8 \text{ \AA}$.

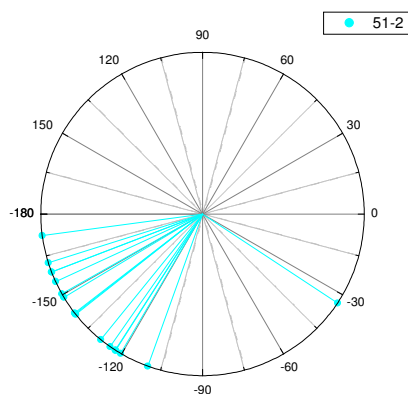


Obr. 22 Hodnoty torzních úhlů pro CYP3A4 (2-vinyly)

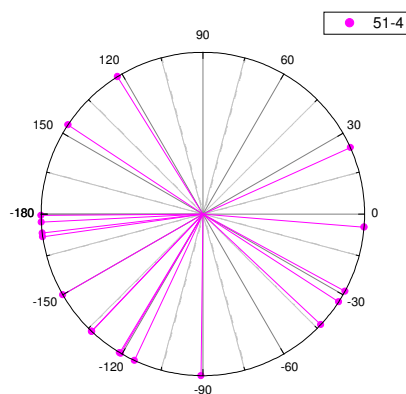


Obr. 23 Hodnoty torzních úhlů pro CYP3A4 (4-vinyly)

U CYP51 je interval úhlů v pozici 2 daleko méně rozprostřený než u hodnot v pozici 4, viz. obr. 24 a 25. V pozici 2 je jediná odlehlá hodnota a to: $-33,4^\circ$ (PDB kód 2X2N) s inhibitorem posakonazolem a rozptyl nejčastějších hodnot je mezi -120° a -165° . V pozici 4 jsou hodnoty rozprostřené po celé škále.

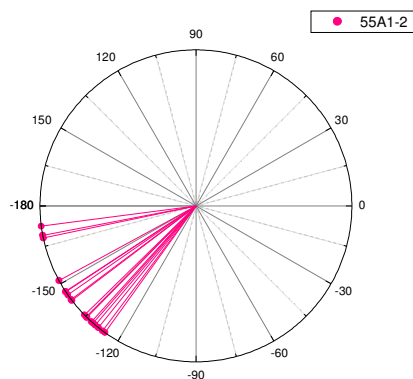


Obr. 24 Hodnoty torzních úhlů pro CYP51 (2-vinyly)

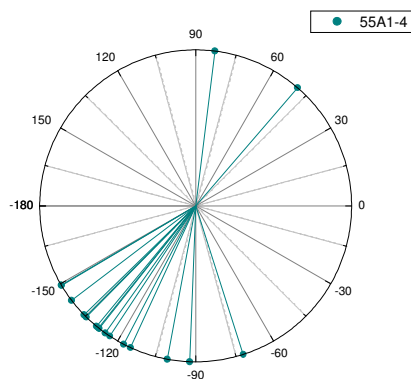


Obr. 25 Hodnoty torzních úhlů pro CYP51 (4-vinyly)

U formy CYP55A1 (obr. 26 a 27) jsou v pozici 2 hodnoty v poměrně úzkém intervalu, jak je vidět na obrázku č. 16. V pozici 4 jsou dvě velmi vychýlené hodnoty: $49,2^\circ$ (PDB kód 1GEK) a $82,9^\circ$ (PDB kód 1GEM), v obou případech je substrátem isokyanát.

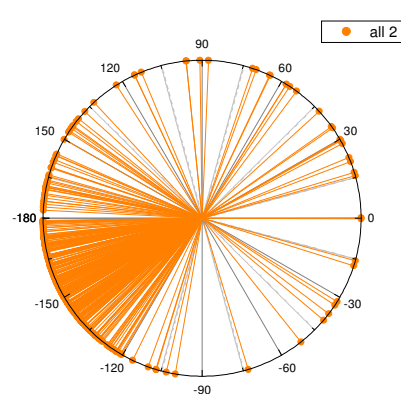


Obr. 26 Hodnoty torzních úhlů pro CYP55A1 (2-vinyly)

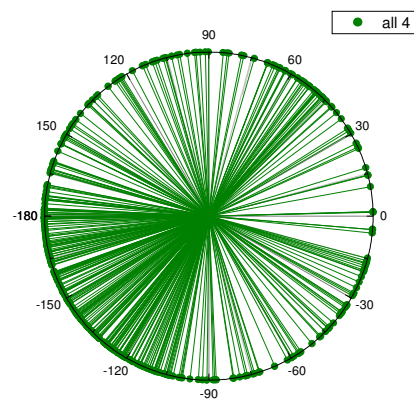


Obr. 27 Hodnoty torzních úhlů pro CYP55A1 (4-vinyly)

Na obrázcích č. 28 a č. 29 je souhrn všech forem cytochromů P450. Je zde vidět, že v pozici 2 jsou hodnoty torzních úhlů vinylových řetězců orientované více do intervalu -120° až -180°. Zatímco v pozici 4 jsou hodnoty rozšířené v celé škále hodnot.



Obr. 28 Hodnoty torzních úhlů pro CYP (2-vinyly)



Obr. 29 Hodnoty torzních úhlů pro CYP (4-vinyly)

3.2 Analýza okolí postranních řetězců hemu

V tabulce 2 jsou uvedeny zbytky aminokyselin a jejich sekvenční pozice, které se nacházejí v blízkém okolí hemu, v tomto případě konkrétně ve vzdálenosti do 6 Å od vinylových řetězců. Zde se jedná o struktury formy CYP2B4- 1PO5, 2BDM a 1SUO a formy CYP3A4- 1TQN a 1WOF. Všechny zmíněné struktury mají jeden řetězec. V blízkém

okolí vinylů se u obou forem nachází Ala, Ile, Leu a Thr. U formy CYP2B4 se ve všech třech strukturách nachází Gln, který ale není u formy CYP3A4. Naopak Val je přítomen pouze u formy 3A4. Gly a Met se nachází u všech struktur mimo 1PO5. Phe je u obou struktur u 3A4, u CYP2B4 je přítomen pouze u struktury 2BDM. Ser se vyskytuje pouze u struktury 1PO5. Trp ve třech sekvenčních pozicích se nachází pouze u 2BDM.

Tab. 2 Přehled aminokyselinových zbytků v blízkosti vinylových řetězců u forem CYP2B4 (PDB kódy: 1PO5, 2BDM, 1SUO) a CYP3A4 (PDB kódy: 1TQN, 1WOF)

AMK	2B4- 1PO5	2B4- 2BDM	2B4- 1SUO	3A4- 1TQN	3A4- 1WOF
Ala	298, 442	442	442	305, 448	305, 448
Asn					
Asp					
Arg					
Cys					
Gln	357	357	357		
Glu					
Gly		438	299, 438	444	306, 444
His					
Ile	179, 441	441	179, 182, 441	369, 443	369, 443
Leu	362, 295, 446	362, 437, 446	295, 437, 446	364, 449	364
Lys					
Met		132	132	452	452
Phe		296		302	302
Pro					
Ser	294				
Thr	302, 303, 306	302, 303, 306	302, 303, 306	309, 310	309, 310
Trp		362, 437, 447			
Tyr					
Val				313	313

Aminokyseliny s jejich sekvenčními pozicemi, které se vyskytují v blízkosti (opět do 6 Å) propionátových řetězců u forem CYP2B4 (1PO5, 2BDM a 1SUO) a CYP3A4 (1TQN a 1WOF) jsou uvedeny v tabulce 3. U obou forem ve všech strukturách jsou přítomny tyto aminokyseliny: Arg, Ile, Leu, Phe, Pro a Ser. U obou struktur formy CYP3A4 se vyskytují Asn, Glu a Gly, které u formy 2B4 v blízkosti propionátů nejsou.

U CYP2B4 je naopak přítomen Val a to ve všech třech strukturách, dále pak Lys, ale pouze u struktur 2BDM a 1SUO. Nejvíce zastoupenými aminokyselinami u 2B4 a 3A4 jsou Arg a Leu.

Tab.3 Přehled aminokyselinových zbytků v blízkosti propionátů u forem CYP2B4 (PDB kódy: 1PO5, 2BDM, 1SUO) a CYP3A4 (PDB kódy: 1TQN, 1WOF)

AMK	2B4- 1PO5	2B4- 2BDM	2B4- 1SUO	3A4- 1TQN	3A4- 1WOF
Ala					
Asn				441	441
Asp					
Arg	98, 133, 434	98, 125, 434	434	105, 130, 375, 440	105, 130, 375, 440
Cys					
Gln					
Glu				374	374
Gly				436	436
His					
Ile	435	114, 435	435	118	118
Leu	88, 129, 431, 488	88, 392, 431, 437	88, 431, 437	94, 373	373
Lys		433	433		
Met					
Phe	429	429	429	435	435
Pro	368	368	368	439	439
Ser	430	430	430	119, 437	119, 437
Thr					
Trp					
Tyr					
Val	367	113, 367	367		

3.3 Analýza disociačních konstant a elektrostatických interakcí

V tabulkách 4-8 jsou uvedeny hodnoty pK_A a coulombických interakcí pro nabitě aminokyselinové zbytky nacházející se ve vzdálenosti do 6 Å od postranních řetězců hemu, vinylů a propionátů. V našem případě se jednalo o Arg a Lys v blízkosti propionátů. Opět se jedná o formy CYP2B4 (1PO5, 2BDM, 1SUO) a CYP3A4 (1TQN a 1WOF). U

formy CYP2B4 struktury 1PO5 se jedná pouze o Arg, u struktur 2BDM a 1SUO o Arg a Lys. U všech tří struktur formy CYP2B4 je rozmezí pK_A 10,43 až 13,57. Maximální rozdíl u Arg stejné sekvenční pozice byl 3,23. U této formy nejsou coulombické interakce u všech aminokyselin. U formy CYP3A4 se jednalo jen o Arg, u obou struktur o stejné sekvenční pozice. Rozmezí pK_A zde je 9,31 až 12,78. U Arg stejné sekvenční pozice byl maximální rozdíl 0,34. U všech Arg jsou coulombické interakce, a to s Arg, Cys či s atomem uhlíku na propionátovém řetězci.

Tab. 4-8 Přehled pK_A a coulombických interakcí pro formy CYP2B4 a CYP3A4 (PDB kódy: 1PO5, 2BDM, 1SUO, 1TQN a 1W0F)

Tab. 4

2B4- 1PO5	pK_A	coulombické interakce
Arg 98	13,57	2,4 hem CGD
Arg 133	12,29	
Arg 434	13,09	2,36 Glu 439

Tab. 5

2B4- 2BDM	pK_A	coulombické interakce
Arg 98	10,74	-0,06 Arg 434
Arg 125	11,85	
Arg 434	13,57	
Lys 433	10,43	0,64 hem CGA; 2,4 hem CGD

Tab. 6

2B4- 1SUO	pK_A	coulombické interakce
Arg 434	10,89	2,37 hem CGD
Lys 433	10,43	

Tab. 7

3A4- 1TQN	pK_A	coulombické interakce
Arg 105	9,31	-1,36 Arg 375; -1,79 Arg 440; 1,86 hem CGA; 2,17 hem CGD
Arg 130	11,66	1,85 hem CGD
Arg 375	12,44	0,78 cys 98; 2,4 hem CGA
Arg 440	11,19	-0,04 Arg 375; 2,4 hem CGD

Tab. 8

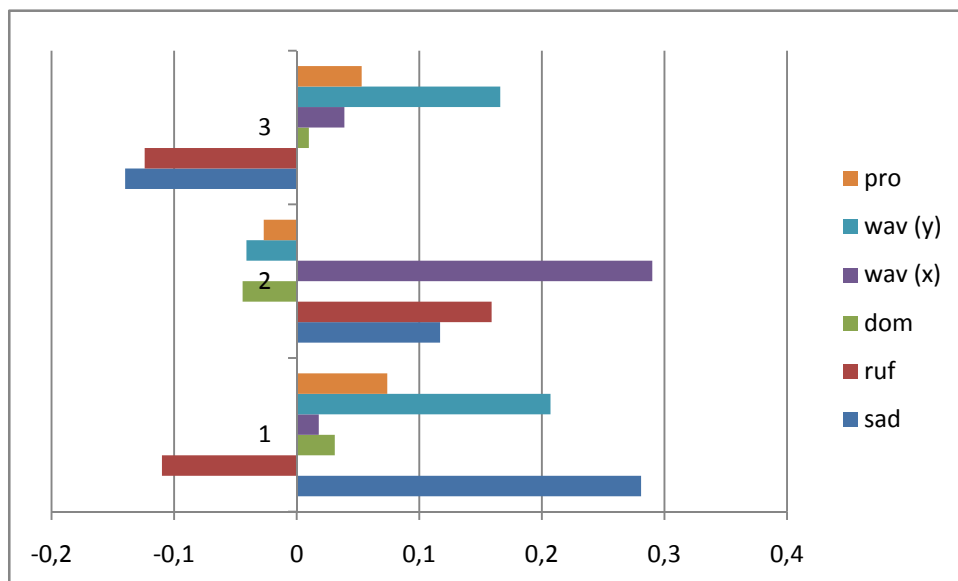
3A4- 1W0F	pK_A	coulombické interakce
Arg 105	9,35	-1,36 Arg 375; -1,93 Arg 440; 1,79 hem CGA; 2,31 hem CGD
Arg 130	11,46	1,53 hem CGD
Arg 375	12,78	0,94 cys 98; 2,4 hem CGA
Arg 440	10,98	-0,28 Arg 375; 2,27 hem CGD

3.4 Deformační odchylky hemu

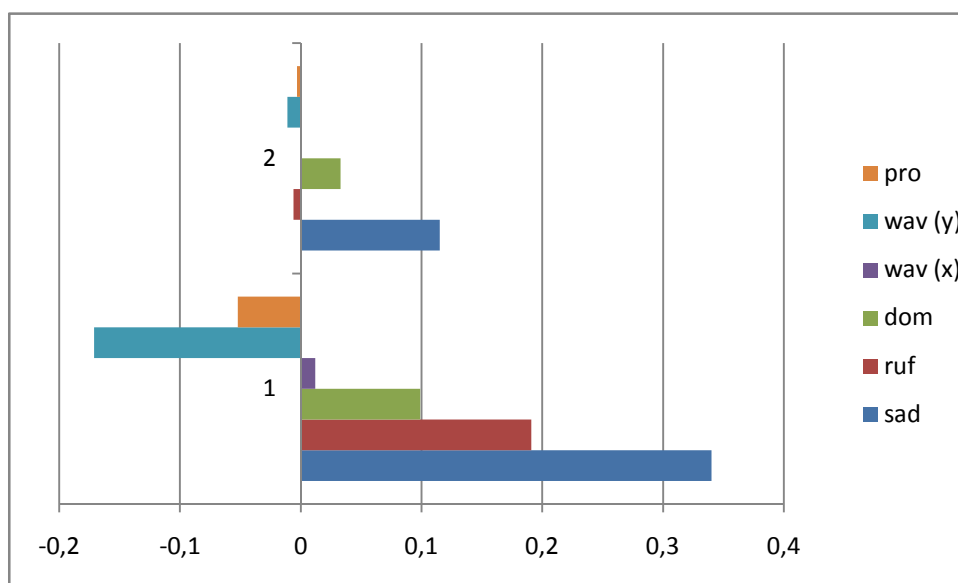
V tabulce 9 jsou uvedeny hodnoty mimorovinné deformace hemu u různých forem cytochromů P450 v jednotkách Å, tak jak je poskytuje program NSD. Tučně jsou zvýrazněné savčí formy CYP2B4 a CYP3A4, analyzovány jsou stejné struktury jako v případě b) a c). Tyto struktury byly dopočteny pomocí programu NSD. Jednalo se o deformační mody sad (z angl. saddling), ruf (z angl. ruffling), dom (z angl. doming), wav (z angl. waving) a pro (z angl. pyrrole propellering). Na obrázku 30 je uveden graf NSD výsledků pro formu CYP2B4, na obrázku 31 pro formu CYP3A4. U struktury 1P05 převládá konformace sad, výrazně jsou zastoupeny ještě wav(y) a ruf. U 1SUO převládá wav(x), dále pak ruf a sad. U 2BDM wav(y), sad a ruf. U formy 3A4 struktur 1TQN a 1W0F převládá konformace sad. U 1TQN jsou dále výrazně zastoupeny ruf a wav(x), u 1W0F mají ostatní konformace malé odchylky.

Tab. 9 Mírorovinné odchylky u hemu v cytochromech P450 (v Å)

Protein	PDB kód	Hem	D _{oop}	δ _{oop}	sad	ruf	dom	wav (x)	wav (y)	pro
P450 _{cam}	1akd		0,573	0,02	0,267	0,465	0,112	0,101	0,065	0,027
P450 _{cam}	1cp4		0,513	0,04	0,222	0,303	-0,166	0,111	-0,106	0,09
P450 _{BM-3}	1fag	A	0,546	0,021	-0,432	0,254	0,079	-0,062	-0,133	-0,045
		B	0,57	0,022	-0,472	0,258	0,099	-0,06	-0,07	-0,025
		C	0,555	0,022	-0,442	0,255	0,046	-0,146	-0,092	-0,027
		D	0,581	0,014	-0,5	0,245	0,102	-0,085	-0,052	-0,027
P450 _{BM-3}	1fah	A	0,37	0,011	-0,034	0,341	0,014	0,045	-0,107	-0,03
		B	0,002	0	0	0	0	0	0	0
P450 _{cam}	1noo		0,558	0,026	0,358	0,395	-0,04	0,004	-0,039	0,035
P450 _{cam}	1pha		0,345	0,019	0,246	0,194	-0,035	0,005	-0,065	0,049
P450 _{cam}	1phb		0,507	0,034	0,337	0,219	0,088	-0,065	-0,124	0,083
P450 _{cam}	1phc		0,535	0,029	0,148	0,355	-0,219	-0,161	-0,172	0,074
P450 _{cam}	1phd		0,387	0,032	0,242	0,211	-0,083	-0,07	-0,045	0,046
P450 _{cam}	1phe		0,646	0,033	0,128	0,539	-0,174	0,073	-0,179	0,065
P450 _{cam}	1phf		0,417	0,035	0,27	0,114	-0,035	-0,061	-0,155	0,095
P450 _{cam}	1phg		0,345	0,023	0,24	0,106	-0,118	-0,023	-0,038	0,127
P450 2B4	1po5		0,51	0,056	0,281	-0,11	0,031	0,018	0,207	0,074
P450 2B4	1suo		0,408	0,03	0,117	0,159	-0,044	0,29	-0,041	-0,027
P450 3A4	1tqn		0,531	0,047	0,34	0,191	0,099	0,012	-0,171	-0,052
P450 3A4	1wof		0,122	0,002	0,115	-0,006	0,033	0,001	-0,011	-0,003
P450 2B4	2bdm		0,339	0,038	-0,14	-0,124	0,01	0,039	0,166	0,053
P450 _{BM-3}	2bmh	A	0,375	0,017	0,069	0,335	-0,021	0,052	-0,095	-0,051
		B	0,543	0,022	-0,206	0,478	-0,032	0,019	0,06	-0,027
P450 _{cam}	2cp4		0,615	0,031	0,034	0,399	-0,336	-0,133	-0,183	0,124
P450 _{cam}	2cpp		0,556	0,023	0,306	0,379	-0,143	0,008	-0,128	0,123
P450 _{BM-3}	2hpd	A	0,42	0,032	0,023	0,307	-0,021	-0,021	-0,177	0,057
		B	0,229	0,02	-0,063	0,14	-0,027	0,014	-0,058	-0,087
P450 _{cam}	3cp4		1,084	0,031	0,118	0,977	-0,376	-0,152	-0,04	-0,035
P450 _{cam}	3cpp		0,708	0,025	0,38	0,534	0,147	-0,07	0,146	0,018
P450 _{cam}	4cp4		0,663	0,032	0,347	0,508	-0,061	-0,011	-0,108	0,055
P450 _{cam}	4cpp		0,453	0,03	0,229	0,279	-0,18	-0,054	-0,067	0,065
P450 _{cam}	5cpp		0,479	0,024	0,236	0,304	-0,134	-0,1	-0,166	0,051
P450 _{cam}	6cpp		0,673	0,031	0,191	0,568	-0,182	0,032	-0,125	0,112
P450 _{cam}	7cpp		1,226	0,042	0,242	-0,943	-0,558	-0,374	-0,173	-0,054
P450 _{cam}	8cpp		0,541	0,025	0,303	0,385	-0,101	-0,019	-0,054	0,126



Obr. 30 NSD výsledky pro formu CYP2B4, 1- 1PO5, 2- 1SUO, 3- 2BDM



Obr. 31 NSD výsledky pro formu CYP3A4, 1- 1TQN, 2- 1WOF

4. Diskuse

Z analýzy hodnot torzních úhlů vinylových postranních řetězců u různých forem P450 je patrné, že vinyly v pozici 2 jsou u většiny zkoumaných forem konformačně omezenější a jejich torzní úhly spadají do užšího intervalu ve srovnání s vinyly v pozici 4, kde jsou vinylové postranní řetězce více flexibilní.

V pozici 2 jsou to nejčastěji hodnoty mezi -120° a -180° , zatímco v pozici 4 jsou tyto hodnoty rozprostřeny méně rovnoměrně. Vyjímkou je forma cytochromu P450 CYP2B4, kde hodnoty v pozici 2 mají menší rozptyl než v pozici 4, což může být způsobeno tím, že mezi odlehlé hodnoty v pozici 2 patří struktura 3G93, která má ale rozlišení 3,2 Å.

Z analýzy hodnot torzních úhlů vinylových řetězců v pozici 2 a 4 vyplývá, že jednotlivé formy cytochromů P450 se od sebe dosti odlišují, což by mohlo mít význam pro jejich vlastnosti.

Srovnání různých forem CYP přitom ukazuje, že preferované intervaly torzních úhlů se liší. Distribuce konformací vinylové skupiny tedy odráží spíše vliv apoproteinu než nějakou vnitřní tendenci hemu jako takového.

Podle studie Findsena, Bociana a Birgeho by se v okolí [54] 0° , 180° a 70° neměly vyskytovat naměřené hodnoty, jelikož zde je enegetické maximum. Ale jak je možné vidět na obrázcích 29 a 30, tak v těchto hodnotách torzních úhlů se formy cytochromů P450 vyskytují. Jsou možné tři zdůvodnění: 1) vliv neplanarity hemu- resp. okolí hemu, 2) chyba nedostatečného rozlišení strukturních dat, 3) rentgenová struktura ukazuje tzv. „zamrzlou“ konformaci.

Při analýze blízkého (do 6 Å od postranních řetězců hemu) okolí hemu byly u všech tří zkoumaných struktur (1PO5, 2BDM, 1SUO) formy CYP2B4 nalezeny tyto zbytky aminokyselin: Thr 302, 303, 306, Leu 446, Ala 442, Gln 357 (vinyly), Arg 434, Ile 435, Leu 88 a 431, Phe 429, Pro 368, Ser 430 a Val 367 (propionáty).

Pro obě struktury (1TQN, 1WOF) formy 3A4 to byly následující aminokyselinové zbytky: Ala 305 a 448, Gly 444, Ile 369 a 443, Leu 364, Met 452, Phe 302, Thr 309 a 310, Val 313 (vinyly), Asn 441, Arg 105, 130, 375, 440, Glu 374, Gly 436, Ile 118, Leu 373, Phe 435, Pro 439, Ser 119 a 437 (propionáty).

Je vidět, že v okolí vinylových postranních řetězců se nachází, jak se dalo očekávat, nepolární zbytky aminokyselin. V oblasti propionátů se podle očekávání vyskytují nabitě aminokyselinové zbytky Arg.

Při porovnání struktur forem CYP2B4 vyšlo najevo, že v blízkosti hemu se u každé struktury nachází jiné aminokyselinové zbytky, což může mít za důsledek jiné polohy vinylových řetězců. Dále zde může mít vliv struktura 1PO5, která má tzv. otevřenou konformaci. [42]

Forma CYP3A4 má více stejných aminokyselinových zbytků (stejně sekvenční pozice) u jejích dvou zkoumaných struktur než je tomu u formy CYP2B4 a jejích struktur. Nejspíše je to dané variabilitou zkoumaných struktur, 2BDM a 1SUO jsou struktury s inhibitory (2BDM- BF a 1SUO- CPI) a 1PO5 je již zmíněná tzv. otevřená konformace. U CYP3A4 se dá diskutovat o větším zapojení hemu v interakci s proteinem, a to díky čtyřem nabitým aminokyselinovým zbytkům Arg.

V oblasti propionátů se u formy CYP3A4, u obou struktur 1TQN a 1WOF, nacházejí jako nabitě aminokyseliny pouze Arg se sekvenčními pozicemi 105, 130, 375, 440. Hodnoty pK_A jsou u aminokyselin se stejnou sekvenční pozicí téměř stejné hodnoty, maximální rozdíl zde činí 0,34. Zatímco u formy CYP2B4 jsou mezi Arg se stejnou pozicí rozdíly větší, maximální rozdíl činí 3,23. U této formy se u struktury 2BDM a 1SUO jako nabitá aminokyselina nachází i Lys 433. U těchto struktur má Lys stejnou hodnotu pK_A .

U formy CYP2B4 je u struktury 1PO5 u Arg 98 a struktury 2BDM u Arg 434 vysoké pK_A (13,57), zatímco u CYP3A4 je u struktur 1TQN a 1WOF u Arg105 pK_A nižší (9,31 a 9,35). Což koresponduje s tím, že hodnota pK_A klesá s přítomností interagujících zásaditých zbytků. Právě u CYP3A4 Arg 105 interaguje s Arg 375 a 440.

Coulombické interakce aminokyselinových zbytků s propionáty se nacházejí u 2B4 struktury 1PO5 s Arg 98, u 2BDM s Lys 433 a u 1SUO s Arg 434. U formy 3A4 u obou struktur jsou coulombické interakce mezi propionáty a aminokyselinou u Arg 105, 130, 375 a 440, to potvrzuje naši domněnku o větším zapojení hemu u formy CYP3A4.

U CYP2B4 Arg 98 reaguje s propionátem u jedné struktury (1PO5), ale u druhé (2BDM) interaguje s Arg 434. U CYP3A4 u obou struktur ale Arg stejné sekvenční pozice interagují se stejnými partnery. Opět se ukazuje odlišnost struktur formy CYP2B4.

Z NSD analýzy vyplývá, že u savčích cytochromů P450 CYP2B4 a CYP3A4 se nejvíce uplatňuje tzv. sedlová deformace (sad). U obou struktur formy CYP3A4 převažuje právě sedlová deformace. U CYP2B4 u 1SUO a 2BDM převažujete waving typ, tedy vlnitý typ. U 1PO5 je to ale opět sedlový typ. U formy CYP3A4 je u struktury 1TQN daleko větší mimorovinná deformace než je tomu u struktury 1W0F. U formy CYP2B4 není tak viditelný rozdíl mezi třemi strukturami. Existují domněnky, že mimorovinná deformace může mít vliv na funkci enzymu. Další hypotézou je, že typ neplanární deformace na funkci enzymu vliv nemá, ale že odráží terciární strukturu proteinu. [37]

5. Závěr

Tato práce byla věnovaná bližšímu poznání okolí hemu v cytochromech P450 a to z důvodu lepšího porozumění interakci hemu a obklopujícího proteinu.

- 1) Byla provedena analýza orientace vinylových postranních řetězců hemu v dostupných strukturách cytochromů P450.

Pro savčí formy CYP 2B4 a 3A4:

- 2) Byly zjištěny aminokyselinové zbytky v blízkosti postranních řetězců hemu- vinylů a propionátů.
- 3) Pro tyto zbytky byly spočteny pomocí programu PropKA disociační konstanty a energie coulombických interakcí s hemem a dalšími skupinami v proteinu.
- 4) Byly pomocí programu NSD spočteny odchylky hemu od planarity (příspěvky jednotlivých deformačních modů).

Z dosažených výsledků vyplývají značné rozdíly mezi jednotlivými formami cytochromů P450 (v této práci zejména savčích forem CYP2B4 a CYP3A4). Z toho je patrná velká flexibilita a různorodá funkčnost těchto enzymů.

6. Seznam použité literatury

- [1] Miwa, G.T., West, S.B., Lu A.Y. H.: J. Biol. Chem. 253, 1921-1929 (1978)
- [2] Gut, I., Souček, P., Hodek, P.: Prac.Lek. 1, 15-20 (1992)
- [3] Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: Chem.Listy 93, 229-237 (1999)
- [4] Stiborová, M.: Xenobiochemie, přednáška na PřF UK, katedra biochemie (2009)
- [5] Lewis, D. F. V.: v knize Guide to cytochrome P450. Structure & fiction, 215 (2001)
- [6] Estabrook, R., W.: J. Pharmacol. Exp. Ter. 1461-1473 (2003)
- [7] Ortiz de Montellano, P. R.: v knize Cytochrome P450- Structure, mechanism, and biochemistry (3rd ed.), 689, Kluwer Academic /Plenum Publishers, New York (2005)
- [8] Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M.: Chem.Listy 95, 212- 222 (2001)
- [9] Guengerich, F., P.: Chem. Res. Toxicol 14, 611-650 (2001)
- [10] Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J., Martínek, V.: Chem. Listy 98, 876-890 (2004)
- [11] Coon, M.J., Vatsis, K.P., Peng, H-M.: Inter. Cong. Ser. 1233 487-493 (2002)
- [12] Bernhardt, R.: J. Biotechnol. 124, 128-145 (2006)
- [13] Hudeček, J., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P., Munro, A. W., Hildebrandt, P.: Arch. Biochem. Biophys. 383, 70-78 (2000)
- [14] <http://drnelson.utmen.edu/CytochromeP450.html> (k 25.8.2010)
- [15] Anderson, J. L. R., Chapman, J. K.: Dalton Trans, 13-24 (2005)
- [16] Phillips, I. R., Shephard, E. A.: v knize Cytochrome P450 protocols 107 (1998)
- [17] Denisov, I. G., Frank, D. J., Sligar, S. G.: Pharmacol. Ther. 124, 151-167 (2009)
- [18] Granick, S., Gilder, H.: J. Gen. Physiol., 1-13 (1946)
- [19] Meunier, B., de Visser, S. P., Shaik, S.: Chem. Rev. 104, 3947-3980 (2004)

- [20] Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., Schlichting, I.: *Chem. Rev.* 105, 2253-2277 (2005)
- [21] Lechner, M. C.: v knize Cytochrome P450. *Biochemistry, biophysics, and molecular biology* (1994)
- [22] Zhao, Y., Halpert, J. R.: *Biochim. biophys. Acta* 1770, 402-412 (2007)
- [23] Reed, J. R., Hollenberg, P. F.: *J. Inorg. Biochem.* 93, 152-160 (2003)
- [24] Sridar, Ch., Harleton, E., Hollenberg, P. F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 386-393 (2005)
- [25] Ioannides, C.: v knize Cytochrome P450: metabolic and toxicological aspects (1996)
- [26] Busse, D., Cosme, J., Beaune, P., Kroemer, H.K., Eichelbaum, M.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 353, 116-121 (1995)
- [27] <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/enzymaticky-system-cytochromu-p450-170727> (k 26.8.2010)
- [28] Anzenbacherová, E., Hudeček, J., Murgida, D., Hildebrandt, P., Marchal, S., Lange, R., Anzenbacher, P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 477-482 (2005)
- [29] Otyepka, M., Skopalík, J., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P.: *Biochim. biophys. Acta* 1770, 376-389 (2007)
- [30] Scott, E. E., Halpert, J. R. : *Trends Biochem. Sci.* 30, 5-7 (2005)
- [31] Yano, J. K., Wester, M. R., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D., Johnson, E. F. : *J. Biol. Chem.* 279, 38091-38094 (2004)
- [32] Ingelman- Sundberg, M.: *Pharmacogenomics J.* 5, 6-13 (2005)
- [33] Lee, S. S. T., Buters, J. T. M., Pineau, T., Fernandez- Salguero, P., Gonzales, F. J.: *J. Biol. Chem.* 271, 12063-12067 (1996)
- [34] Dai, D., Tang, J., Rose, R., Hodgson, E., Bienstock, R. J., Mohrenweiser, H. W., Goldstein, J. A.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 825-831 (2001)
- [35] Řemínek, R.: *Bakalářská práce, PřF, Masarykova univerzita Brno* (2006)
- [36] <http://www.imm.ki.se/Cypalleles/> (k 26.8 2010)
- [37] Shelnutt, J. A., Song, X-Z., Ma, J-G., Jia, S-L., Jentzen, W., Medforth, C. J.: *Chem. Soc. Rev.* 27, 31-41 (1998)

- [38] Jentzen, W., Ma, J-g., Shelnutt, J. A.: *Bioph. J.* 74, 753-763 (1998)
- [39] Shelnutt, J. A.: Sandia report, 1-30 (1997)
- [40] Poulos, T. L.: *Nat. Prod. Rep.* 24, 504-510 (2007)
- [41] Šulc, M., Hudeček, J., Stiborová, M., Hodek, P.: *Neuroendocrinol. Lett.* 29, 101-106 (2008)
- [42] Hudeček, J., Hodek, P., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P.: *Biochim. biophys. Acta* 1770, 413-419 (2007)
- [43] Anzenbacher, P., Dawson, J. H., Kitagawa, T.: *J. Mol. Str.* 214, 149-158 (1989)
- [44] Anzenbacher, P., Šípál, Z., Hudeček, J.: *Stud. Biophys.* 73, 147-148 (1978)
- [45] Perutz, M. F.: *Nature* 273, 495-499 (1972)
- [46] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L.: v knize *Biochemistry* (6th edition) W.H. Freeman and Co., New York (2007)
- [47] Guallar, V., Olsen, B.: *J. Inorg. Biochem.* 100, 755-760 (2006)
- [48] Belogortseva, N., Rubio, M., Terrell, W., Mikšovská, J.: *J. Inorg. Biochem.* 101, 977-986 (2007)
- [49] Hayashi, T., Matsuo, T., Hitomi, Y., Okawa, K., Suzuki, A., Shiro, Y., Iizuka, T., Hisaeda, Y., Ogoshi, H.: *J. Inorg. Biochem.* 91, 94-100 (2002)
- [50] Marzocchi, M. P., Smulevich, G.: *J. Raman. Spectrosc.* 34, 725-734 (2003)
- [51] <http://www.rcsb.org/pdb> (k 26.8.2010)
- [52] Li, H., Robertson, A. D., Jensen, J. H.: *Proteins*, 765-783 (2008)
- [53] De Vito, V. L., Cai, M-Z., Asher, S. A., Kehres, L. A., Smith, K. M.: *J. Phys. Chem.* 96, 6917- 6922 (1992)
- [54] http://jasheln.unm.edu/jasheln/content/nsd/nsd_oop_lookup.asp (k 26.8.2010)
- [55] Findsen, L. A., Bocian, D. F., Birge, R. R.: *J. Chem. Phys.* 88, 7588-7598 (1988)

