

Přírodovědecká Fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra Biochemie



Bakalářská práce

PŘÍSTUPOVÉ CESTY K AKTIVNÍMU MÍSTU CYTOCHROMŮ
P450

Školitel: Doc. RNDr. Petr Hodek, CSc.

2006

Lenka Maršáková

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za zadání zajímavého tématu, cenné rady, odborné vedení a profesionální přístup při vypracovávání této bakalářské práce.

Dále děkuji Kamile za pomoc při grafických úpravách této práce.

V neposlední řadě děkuji všem blízkým za to, že při mně celou dobu mého studia stáli.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Petra Hodka, CSc. a veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala.

V Praze dne 24. srpna 2006

.....*Maršáková*.....

Lenka Maršáková

OBSAH

Seznam zkratk	6
1. Cíl práce	7
2. Úvod	8
2.1. Cytochromy P450	8
2.1.1. Objev a lokalizace cytochromů P450	8
2.1.2. Funkce cytochromů P450	8
2.1.3. Klasifikace CYP	9
2.1.4. Struktura CYP.....	9
2.1.5. Význam studia cytochromů P450	11
3. Reakční partneři CYP	12
3.1. Postavení CYP v MFO	12
3.2. Reakční partneři CYP a jejich interakce.....	12
3.3. Rozdělení monooxygenas se smíšenou funkcí	13
3.4. Mechanismus přenosu redukčních ekvivalentů.....	16
4. Reakční mechanismus CYP	17
5. Metody zkoumání struktury CYP	20
5.1. Spektrální metody	20
5.2. Rentgenová krystalografie	20
5.3. Chemické modifikační metody.....	23
5.3.1. Afinitní značení.....	23
5.3.2. Fotoafinitní značení	23
5.4. Epitopové mapování	24
5.5. Cílená mutageneze	25
5.6. Homologní modelování	25
5.7. Nukleární magnetická resonance (NMR)	26
5.8. Hmotnostní spektrometrie.....	27
6. Membránová topologie	28

6.1.	Membrána a její složky.....	28
6.2.	Membránová topologie.....	29
7.	Aktivní místo CYP.....	36
7.1.	Lokalizace aktivního místa.....	36
7.2.	Konservovanost aktivního místa.....	36
7.3.	Vazba substrátu.....	37
8.	Přístupové kanály k aktivním místům cytochromů P450.....	39
8.1.	Význam a problematika studia.....	39
8.2.	Metody mapování přístupových kanálů.....	40
8.3.	Důležitá hlediska při mapování přístupových kanálů.....	41
8.4.	Klasifikace a charakterizace potenciálních přístupových kanálů CYP	42
8.5.	Výskyt potenciálních kanálů mezi CYP.....	48
8.5.1.	Srovnání mechanismů průchodu substrátů CYP101, CYP107A1 a CYP102A1 2a cestou.....	49
8.5.2.	Problematika mapování přístupových kanálů mikrosomálních CYP.....	51
8.5.3.	Krystalové struktury CYP2B4.....	53
9.	Problematika studia přístupových kanálů CYP a budoucnost	62
10.	Seznam literatury	64

SEZNAM ZKRATEK

Ala	alanin
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
CO	oxid uhelnatý
CPI	inhibitor („4-(4-chlorophenyl) imidazol“)
CYP	cytochrom(y) P450
Cys	cystein
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid,
Glu	kyselina glutamová
Ile	isoleucin
Leu	leucin
Lys	lysin
MFO	monooxygenasový systém se smíšenou funkcí („Mixed Function Oxidase“)
NAD ⁺ (NADH)	oxidovaný (redukovaný) nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺ (NADPH)	oxidovaný (redukovaný) nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NMR	Nukleární magnetická resonance
NO	oxid dusnatý
OPM	databáze membránových proteinů („Orientations of Proteins in Membranes“)
PDB	proteinová databanka („Protein Data Bank“)
Phe	fenylalanin
Pro	prolin
ROH(RH)	oxidovaný(redukovaný substrát)
Thr	threonin
Val	valin
XOOH	peroxysloučenina
SRS	oblast CYP rozpoznávána substráty („Substrate Recognition Site“)

1. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je představit problematiku studia struktury cytochromů P450 prostřednictvím membránové topologie, s hlavním důrazem na mapování substrátových přístupových cest k aktivnímu centru cytochromů P450.

2. Úvod

2.1. Cytochromy P450

2.1.1. Objev a lokalizace cytochromů P450

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1.) tvoří rozsáhlou rodinu hem-thiolátových enzymů, které byly objeveny v roce 1958 G. R. Williamsem a M. Klingenbergem [Klingenberg, 1958]. Název cytochromy P450 (CYP) dostaly tyto enzymy díky schopnosti komplexu jejich redukovaných forem s CO absorbovat světlo o vlnové délce 450 nm. Jelikož tyto cytochromy P450 nepatří mezi klasické cytochromy, vyskytující se v dýchacím řetězci, je jejich pojmenování vlastně nepřesné.

CYP byly nalezeny v mnoha organismech od prokaryotických po většinu organismů eukaryotických jako součást multienzymového systému monooxygenas se smíšenou funkcí - MFO (z angl. „mixed function oxidase“). V prokaryotických organismech se vyskytují cytochromy P450 jako rozpustné cytosolární proteiny, zatímco v eukaryotických buňkách jsou vázány do membrán hladkého endoplazmatického retikula (ER) nebo mitochondrií [Spatzenegger a Jaeger, 1995].

2.1.2. Funkce cytochromů P450

CYP se účastní metabolismu široké škály exogenních (např. léčiv, potravních aditiv, polutantů životního prostředí a karcinogenů) i endogenních látek (např. žlučových kyselin, steroidních hormonů, lipidů, oxidu dusnatého, tromboxanů, prostacyklinů a vitamínu D₃) [Guengerich, 1991].

Klíčovou roli hrají cytochromy P450 v první fázi metabolismu cizorodých látek (xenobiotik), které se po začlenění atomu kyslíku (stejně jako všechny ostatní substráty těchto enzymů) stávají polárnějšími. Buď touto reakcí nebo po další metabolické přeměně mohou být xenobiotika vyloučeny z organismu (detoxikovány), aniž by došlo k jejich nevhodné bioakumulaci [Guengerich, 1990; Chromá a spol., 2001]. Kromě prospěšné detoxikační funkce zprostředkovávají tyto enzymy také nebezpečné aktivační reakce. Těmito reakcemi mohou být přeměňována „pro-léčiva“ na biologicky aktivní formy, ale také některé „pro-mutageny“ a „pro-karcinogeny“ na ultimativní mutageny a karcinogeny [Stiborová a spol., 1999].

Mikrosomální CYP mají především detoxikační roli. Vyskytují se nejvíce v mikrosomech jater, ledvin, plic a gastrointestinálního traktu. Mikrosomy jsou partikule vzniklé uzavřením útržků membrány ER při jeho dezintegraci v průběhu homogenace tkáně při jejich přípravě. Mitochondriální CYP účastníci se syntézy endogenních látek (zejména steroidů) se nejvíce vyskytují v kůře nadledvin [Stiborová a spol., 1999].

2.1.3. Klasifikace CYP

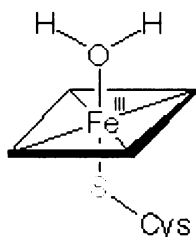
Podle homologie aminokyselinové sekvence (primární struktury) řadíme cytochromy P450 do genetických rodin a podrodin. Jednotlivé cytochromy kódované různými geny se nazývají isoformy. V současné době je známo kolem 6000 isoform, které jsou rozděleny do 711 rodin. Z nichž pouze 99 rodin je živočišných. [<http://drnelson.utmem.edu/P450.stats.2006.htm>]. Například v lidském genomu bylo nalezeno 57 isoform. Daná rodina sdružuje isoformy, které obsahují více než 40% homologie v primární struktuře. Podrodina zahrnuje isoformy CYP s více než 55% homologií aminokyselinové sekvence. Rodina je značena prvním číslem za zkratkou P450 (CYP), následuje podrodina charakterizovaná velkým písmenem. Daná isoforma je značena dalším číslem za písmenem podrodiny. Například isoforma cytochromu P450 3A4 patří do rodiny 3 a podrodiny A [Ortiz de Montellano 2005].

2.1.4. Struktura CYP

Molekula CYP se skládá z apoproteinu a prostetické (hemové) skupiny. Bílkovinná část proteinu je obvykle tvořena 490–520 aminokyselinami. V této části se nacházejí charakteristické domény, zodpovědné za vazbu hemu s reduktasou a substrátu [Ortiz de Montellano, 2005]. Hem je vázán na apoprotein koordinačně-kovalentní vazbou, iontovými a hydrofobními vazbami. Základem hemu je porfyrinový skelet, který je vázán čtyřmi koordinačně-kovalentními vazbami na hemové železo do skeletu protoporfyrinu IX [Loew a Harris, 2000]. V přirozeném stavu (bez substrátu) je centrální atom železa ve ferri formě (Fe^{III}) (obrázek 1).

CYP se od klasických cytochromů, nalezených například v dýchacím řetězci, liší navázáním hemové skupiny na apoprotein. Nejsprávněji vystihuje CYP název hem-thiolátový protein, jelikož hem není vázán na apoprotein přes imidazolový zbytek histidinu (jako u klasických cytochromů), ale prostřednictvím thiolátové síry cysteinu. Thiolátová

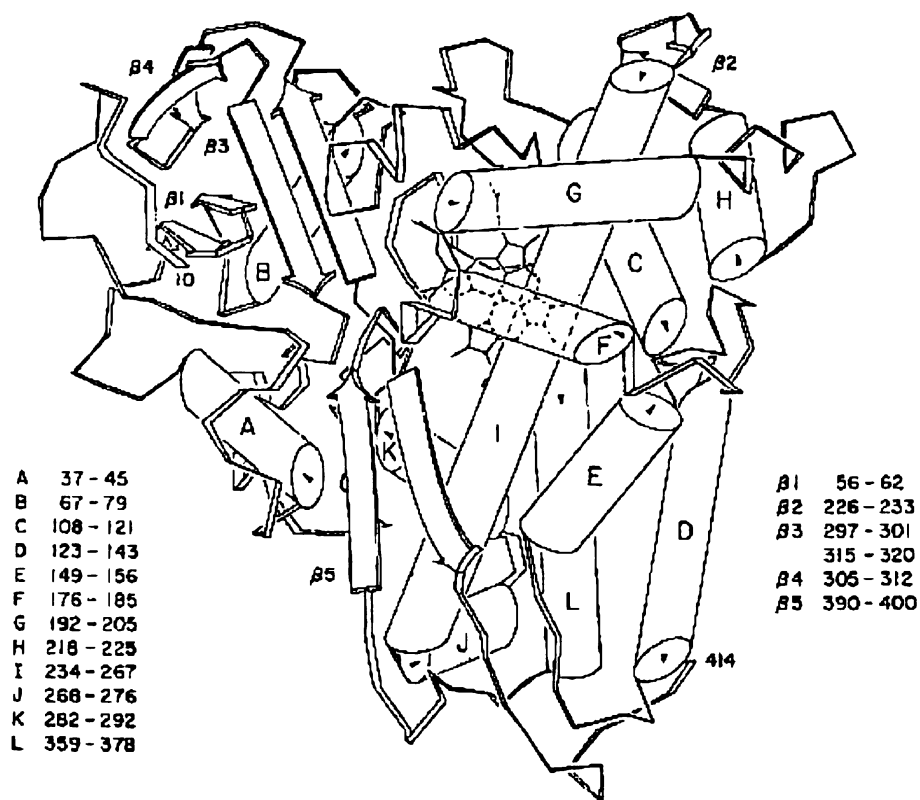
síra cysteinu je tedy pátým ligandem hemového železa, který stabilizuje konformaci aktivního místa a může se také účastnit reakcí jako nukleofil. Toto uspořádání aktivního místa umožňuje výjimečné chování cytochromů P450 ve srovnání s ostatními hemoproteiny (odlišné spektrální a katalytické vlastnosti). Šestým ligandem železa je atom kyslíku z molekuly vody (hydroxylu nebo karboxylové skupiny postranního řetězce apoproteinu). Atom (molekula) kyslíku je navázán na hemové železo v trans poloze oproti thiolátové síře cysteinu [Ortiz de Montellano, 2005], jak je znázorněno na obrázku 1.



Obrázek 1: Schéma uspořádání ligandů hemového železa CYP v přirozeném stavu

Legenda: $\text{-OH}_2\text{-}$ (šestý ligand hemového železa), atom kyslíku molekuly vody; Fe - atom železa vázaný 4 koordinačně-kovalentními vazbami do porfyrinového skeletu (4 ligandy jsou atomy dusíku pyrolových jader), který je zde naznačen lichoběžníkem; -S-Cys (pátý ligand hemového železa), thiolátová síra cysteinu převzato z [http://metallo.scripps.edu/PROMISE/Cys_haem_H2O.gif]

Cytochromy P450 řadíme mezi globulární proteiny, jejichž struktura je tvořena různými typy sekundárních struktur. Úseky s pravidelnou strukturou (β - skládaný list a α -helixy) jsou spojeny oblastmi bez pravidelné struktury (ohyby). Prokaryotické i savčí cytochromy P450 se vyznačují shodným počtem základních motivů sekundární struktury polypeptidového řetězce, které se mezi CYP vyznačují značně podobným prostorovým uspořádáním (poskládání sekundárních struktur). Polypeptidový řetězec je tvořen dvanácti helixy A-L (helixy vyskytující se mezi zmíněnými helixy jsou označeny apostrofou, např. helix vyskytující se mezi F a G helixem se nazývá F' helix) a čtyřmi β -strukturami 1-4 [Ortiz de Montellano, 2005]. Pro představu uspořádání sekundárních motivů CYP poslouží obrázek 2.



Obrázek 2: Schéma krystalové struktury cytochromu P450 (CYP101)

Legenda: helixy jsou znázorněny jako válce, β -struktury jako šipky a ohyby dvojitou čarou; jednotlivé sekundární struktury jsou popsány a vymezeny aminokyselinovou sekvencí
převzato z [Poulos a spol., 1987]

2.1.5. Význam studia cytochromů P450

Cytochromy P450, jako enzymy metabolizující široké spektrum látek, jsou v popředí vědeckého zájmu. Je patrné, že studium struktury cytochromů P450 je zásadní pro porozumění a případné ovlivnění metabolismu celé řady významných látek. Především pochopení mechanismu účinku a odhalení strukturních oblastí cytochromů P450 zodpovědných za jejich substrátovou specifitu, lze využít k předpovědi osudu mnoha látek v organismu a navržení modulátorů (inhibitory, aktivátory) jejich aktivity [Kubíčková a Hodek, 2001].

3. Reakční partneři CYP

3.1. Postavení CYP v MFO

Vedle cytochromů P450 obsahuje enzymový systém monooxygenas se smíšenou funkcí další strukturně a funkčně odlišné proteiny (reakční partneři) zajišťující především transport redukčních ekvivalentů. CYP v tomto systému hraje roli terminální oxidasy, tedy posledního článku MFO, který začleňuje atom kyslíku do substrátu [Hlavica a spol., 2003]. Nezbytnou složkou pro správnou funkci MFO systému jsou i membránové lipidy (viz. kapitola 6) [Backes a Kelley, 2003].

3.2. Reakční partneři CYP a jejich interakce

Reakční cyklus cytochromů P450 je závislý na dodání 2 elektronů 2 protonů. Elektrony CYP dostává od reakčních partnerů, bez kterých by nebyly schopné vykonávat katalytickou funkci. Všechny složky monooxygenas svou vzájemnou interakcí spoluvytvářejí reakční řetězec, jehož podstatou jsou oxidoredukční (redoxní) reakce.

Dalším důležitým enzymem systému kromě CYP je NAD(P)H: cytochrom P450 oxidoreduktasa, která přijímá elektrony z primárního donoru koenzymu NAD(P)H a předává je dále, až na hemové železo CYP. NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasa, prostřednictvím rozdílných redoxních potenciálů svých flavinových domén (FAD/FMN), slouží jako dělič elektronového páru. FAD (flavinadenindinukleotid) a FMN (flavinmononukleotid) domény se vzájemně nepřekrývají, ale jsou v těsném kontaktu, který umožňuje efektivní přenos elektronů. Flavinové koenzymy zprostředkovávají interakci s dalšími složkami MFO. FAD vazebná doména je zodpovědná za vazbu k primárnímu donoru elektronů NADPH. Kladně nabitě aminokyseliny (lysin, arginin) reduktasy reagují se záporně nabitou fosfátovou skupinou NADPH (NADPH: cytochrom P450 reduktasa není schopna reagovat s NADH a tím je zajištěna její selektivita). FMN vazebná doména komunikuje s terminálním akceptorem (cytochromem P450) prostřednictvím svého isoalloxazinového kruhu a předává mu elektrony [Iyanagi, 2005].

V některých mikrosomálních MFO může být NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasa nahrazena cytochromem b_5 a jeho NADH: cytochrom b_5 oxidoreduktasou

(obsahuje jako koenzym pouze FAD). NADH: cytochrom b_5 oxidoreduktasa může nahradit NADPH: reduktasu při přenosu druhého elektronu, který předá cytochromu b_5 .

Cytochrom b_5 je schopný zvyšovat reakční rychlost reakcí katalyzovaných cytochromy P450 [Yamazaki a spol., 2001], jeho celková funkce není zdaleka prozkoumána.

Cytochromy P450 reagují s příslušným donorem elektronů NAD(P)H: cytochrom P450 reduktasou (cytochromem b_5) hlavně prostřednictvím elektrostatických sil. Specifické kladně nabitě aminokyselinové zbytky CYP na povrchu (předpokládá se velký význam lysinu a argininu) reagují se specifickými povrchovými záporně nabitými zbytky reduktasy (většinou aspartát a glutamát). Například CYP101 reaguje prostřednictvím tří argininových a jednoho lysinového zbytku se čtyřmi aminokyselinovými zbytky kyseliny asparagové putidaredoxin-reduktasy (Arg-72...Asp-38, Arg-112...Asp-103, Lys-344..Asp-34, Arg-364..Asp-9). Vedle iontových sil se při interakcích uplatňují i hydrofobní interakce mezi některými nepolárními aminokyselinami (leucin, tryptofan, valin). Předpokládá se že, významnou roli při transportu elektronů v CYP hrají vysoce konservované aromatické aminokyseliny jako tryptofan, tyrosin a fenylalanin [Lewis a Hlavica, 2000].

První přímý experimentální důkaz o interakci mikrosomálního CYP s redoxním partnerem přinesl komplex CYP2E1 - cytochrom b_5 . Jejich asociace je zajištěna dvěma vazbami mezi Lys-428(CYP2E1)...Asp-53(b_5) a Lys-434 (CYP2E1)...Glu-56 (b_5). Tyto části byly zjištěny hmotnostní spektrometrií. Biologický význam těchto iontových párů mezi CYP2E1 - cytochrom b_5 a stimulační efekt cytochromu b_5 byl potvrzen cílenou mutagenezí [Gao, a spol., 2006].

Nejvýznamnějším faktorem zvyšujícím afinitu cytochromů P450 k NAD(P)H reduktase je zřejmě vazba substrátu do aktivního místa. Přítomnost substrátu ovlivňuje i rychlost asociace daných molekul [Backes a Kelley, 2003].

3.3. Rozdělení monooxygenas se smíšenou funkcí

Monooxygenasy lze rozdělit do dvou hlavních tříd (tabulka 1), bakteriální/mitochondriální (třída I), mikrosomální (třída II). Na rozdíl od rozpustných bakteriálních systémů jsou mikrosomální a mitochondriální monooxygenasy vázány na

membránu. Jednotlivé třídy MFO se odlišují lokalizací, počtem a uspořádáním složek (domén) transportních řetězců [Degtyarenko, 1995; Lewis a Hlavica, 2000]. Přehled transportních řetězců, vyskytujících se v jednotlivých třídách cytochromů P450 jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1: Rozdělení monooxygenas a přehled jejich transportních systémů

třída	typ	schéma transportního řetězce
I	bakteriální	NADH → reduktasa (FAD) → Fe-S redoxin → CYP
	mitochondriální	NADPH → reduktasa (FAD) → Fe-S redoxin → CYP
II	mikrosomální	NADPH → reduktasa (FAD,FMN) → CYP
	<i>Bacillus megaterium</i> (CYP102)	NADPH → reduktasa (FAD,FMN) → CYP

Legenda: NAD(P)H - nikotinamidadendinukleotid(fosfát), FAD - flavinadenindinukleotid, FMN - flavinmononukleotid, → ..směr přenosu elektronů;
převzato z publikace [Lewis a Hlavica, 2000]

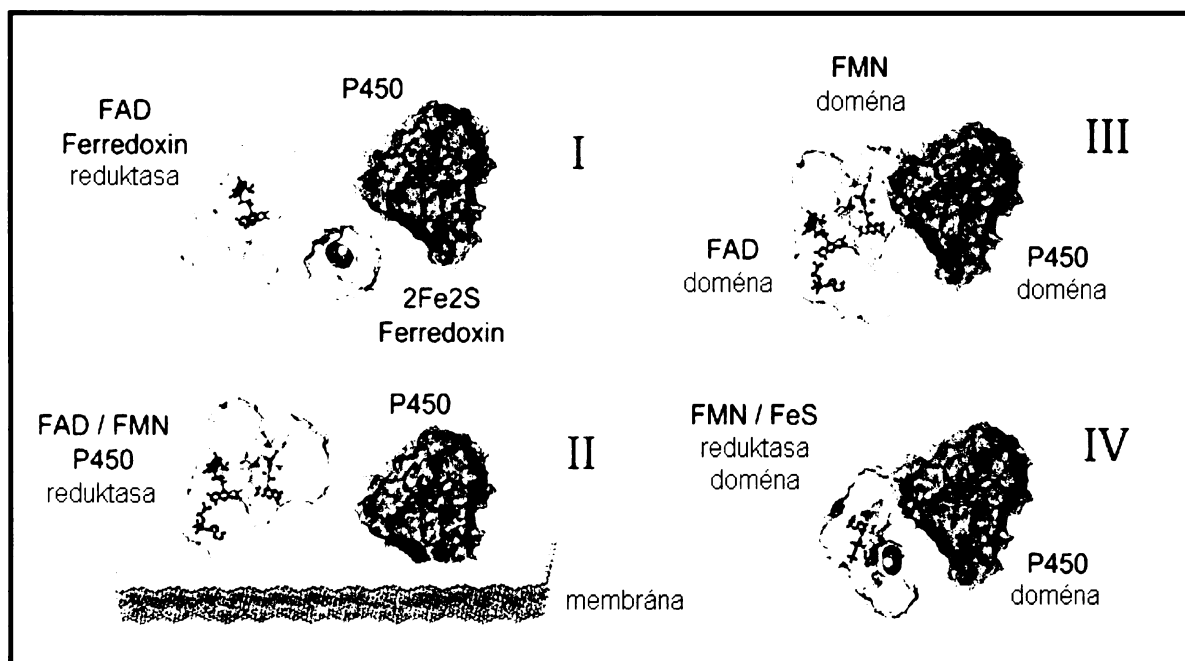
Třidu I lze také označit jako třísložkovou, předání redukováných ekvivalentů na CYP zajišťuje NAD(P)H:cytochrom P450 oxidoreduktasa (obsahující flavinový koenzym FAD) a Fe-S protein (ferredoxin) (obrázek 3, I). Ferredoxin zde hraje úlohu děliče elektronového páru. Elektrony jsou těmito systémy přenášeny z NAD(P)H na třetí, terminální složku transportního systému, cytochrom P450 [Degtyarenko, 1995]. Monooxygenasový systém bakterií (bakteriální typ) se vyskytuje v cytosolu.

Vyjímkou mezi bakteriálními systémy je systém CYP102 z *Bacillus megaterium*, který hydroxyluje řetězce mastných kyselin. Jeho transportní systém je dvousložkový: NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasa obsahující FAD/FMN a příslušný cytochrom P450. Díky tomuto uspořádání patří CYP102 do II třídy. Jeho flavinové domény (FMN/FAD) a cytochrom P450 jsou (narozdíl od klasických zástupců II.třídy) součástí jediného polypeptidového řetězce (obrázek 3, III) [Peterson a spol., 1997].

Monooxygenasy přítomné v mitochondriích řadíme do třídy I, ale můžeme je považovat za přechodný stupeň mezi bakteriálním a mikrosomálním typem monooxygenas. NADPH dependentní oxidoreduktasa je umístěná spolu s daným cytochromem P450 na membráně, čímž se shoduje s mikrosomálním typem. Naopak přítomnost Fe-S proteinu a jednosložkové flavinové domény (FAD) je typické pro bakteriální MFO [Degtyarenko, 1995].

Mikrosomální typ MFO spadá do třídy II, která je tvořena dvěma složkami: membránově vázanou NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasou, jejíž součástí jsou současně koenzymy FAD/FMN a cytochromem P450 (obrázek 3, II) [Degtyarenko, 1995].

V současnosti je znám nový zástupce cytochromů P450 (obrázek 3, IV) *Rhodococcus sp.* Jeho monooxygenasový systém nelze zařadit do výše uvedených tříd, je složen z NADPH reduktasy s FMN flavinovou doménou, ferredoxinu a samozřejmě z cytochromu P450. Tyto složky jsou podobně jako u CYP102 součástí jediného polypeptidického řetězce [Roberts a spol., 2002].



Obrázek 3: Rozdělení monooxygenasových systémů cytochromů P450 a uspořádání jejich domén.

Legenda: I- bakteriální systém; II- mikrosomální systém; III- *Bacillus megaterium* (CYP102); IV- *Rhodococcus*; červě je znázorněn cytochrom P450, žlutě FAD doména, zeleně FMN doména, hnědou barvou je znázorněn FeS protein a modře membrána převzato z [<http://www.chem.ed.ac.uk/chapman/p450.html>]

3.4. Mechanismus přenosu redukčních ekvivalentů

Přenos redukčních ekvivalentů z jednoho redoxního partnera na druhého (tabulka 1, str. 14) probíhá ve směru vyšších hodnot redoxních potenciálů. K požadované redukci terminální složky cytochromu P450 dojde pouze tehdy, pokud bude mít CYP nejvyšší hodnotu redoxního potenciálu mezi složkami MFO. Tuto podmínku splňuje cytochrom P450 pouze s navázaným substrátem v aktivním centru, kdy má CYP vyšší potenciál než jeho reduktasa, a může dojít k požadované reakci. Jako příklad hodnot redoxních potenciálů (E^0) jednotlivých složek transportního řetězce monoxygenasového systému poslouží systém prvního krystalograficky připraveného cytochromu CYP101 (tabulky 1), nalezeného v bakterii *Ps. putida*. Transport elektronů v tomto redoxním řetězci lze vyjádřit schématem: $\text{NADH} \rightarrow \text{FAD-reduktasa} \rightarrow \text{putidaredoxin (Fe-S protein)} \rightarrow \text{cytochrom P450}$. [Lewis a Hlavica, 2000].

Tabulka 2: Přehled redoxních potenciálů složek monoxygenasového systému cytochromu P450 101 z *P. putida*

Složka	E^0 (mV)
NADH	-320
FAD	-290
Putidaredoxin	-240
¹ CYP101	-303
² CYP101	-173
$\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot-}$	-160
$\text{O}_2^{\cdot-}/\text{H}_2\text{O}^{\cdot}$	-100

Legenda: E^0 - redoxní potenciál v milivoltech (mV)

¹) CYP101 bez substrátu

²) CYP101 s navázaným substrátem

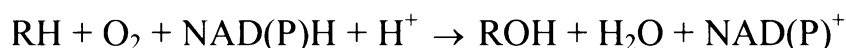
převzato z [Lewis a Hlavica, 2000]

4. Reakční mechanismus CYP

Cytochromy P450 katalyzují především dva typy reakcí:

- 1) hydroxylaci a oxygenaci substrátu, využívající biatomickou molekulu vzdušného kyslíku a koenzymu NAD(P)H⁺ jako donor redukčních ekvivalentů
- 2) hydroxylaci a oxygenaci substrátu, využívající jako zdroj kyslíku peroxysloučeninu (XOOH) [Coon a spol., 1992].

Většina reakcí cytochromů P450 za spolupráce reakčních partnerů lze vyjádřit sumární rovnicí:



RH...substrát

ROH...monooxygenační produkt

NAD(P)H, (NAD⁺(P)⁺)...redukovaný (oxidovaný) koenzym

O₂...molekulární kyslík

Tato sumární reakce probíhá ve vícečlenném (I-VIII) cyklickém sledu (obrázku 4, str. 19) a popisuje reakční mechanismus cytochromu P450.

Hemový atom železa v aktivním centru je v nativním (nízkospinovém) stavu hexakoordinovaný ve ferri (Fe^{III+}) formě. Šestým ligandem je kyslík z molekuly vody nebo interního aminokyselinového zbytku.

Jednotlivé kroky reakčního mechanismu CYP:

I- Po vazbě molekuly substrátu do aktivního místa dochází k vytlačení šestého ligandu, atom železa se dostává do pentakoordinovaného (vysokospinového) stavu. Dochází ke konformační změně molekuly enzymu, která se projeví změnou spektrálních vlastností (posunem absorpčního pásu hemu).

II- Pentakoordinované hemové železo přijímá první elektron a redukuje se na ferro (Fe^{II+}) formu. Primárním donorem elektronu je koenzym NAD(P)H, který elektron předává NAD(P)H reduktase a ta ho předá CYP.

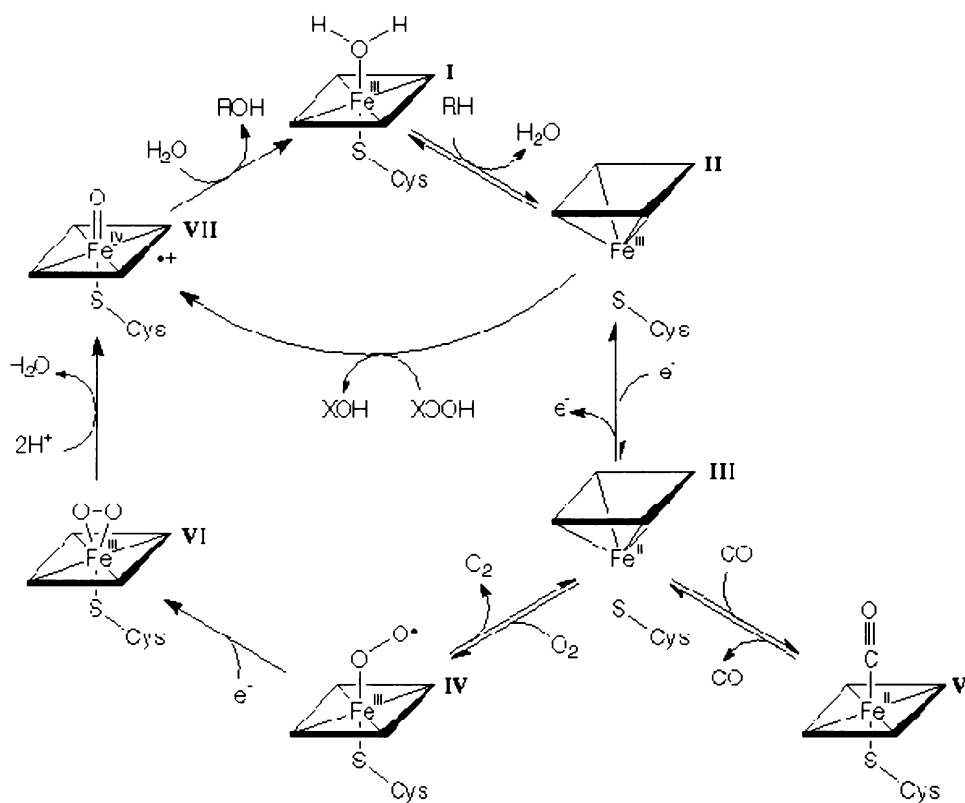
III- Pouze hem ve stavu II je schopen prostřednictvím delokalizace elektronů vázat molekulu kyslíku nebo jiné ligandy (viz. V-stav). Molekula kyslíku se stává šestým ligandem hemového (Fe^{III+}) železa.

V- Alternativní možnost, navázání oxidu uhelnatého CO na hemové železo ve stavu III.

IV- Železo ve ferri formě je opět redukováno NAD(P)H reduktasou případně NADH: cytochrom b_5 reduktasou, dojde opět k delokalizaci elektronů. Vznikne tak aktivovaná forma CYP s biatomicky navázanou molekulou kyslíku. (Pokud není druhý elektron dodán dostatečně rychle, komplex se rozpadne na superoxidový anionradikál, který je dále rozložen superoxiddismutasou na peroxid vodíku.)

VI- Vazba molekuly kyslíku (O-O) se štěpí. Jeden atom kyslíku zůstane vázán na iontu železa v hemu. Vzniká radikál kyslíku, který vytrhne vodíkový atom ze substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylovaného radikálu vázaného na hemové železo. Druhý atom kyslíku přijme dva protony a dojde k redukci na vodu.

VII- Radikál substrátu ($R\bullet$) a hydroxylový radikál ($HO\bullet$) spolu rekombinují za vzniku hydroxylovaného substrátu (produktu) vázaného na hemové železo. Produkt se uvolní z aktivního místa cytochromu P450 a hem se vrací do původního stavu. Proces se tak může opět opakovat [Porter a Coon, 1991; Denisov a spol., 2005].



Obrázek 4: Schéma reakčního cyklu cytochromu P450

Legenda: (I-VII) - jednotlivé kroky reakčního cyklu CYP; Fe^{II(III)} - atom hemového železa v redukované (oxidované) formě; O₂(CO) - molekula kyslíku (oxidu uhelnatého); e⁻(H⁺) -elektron (proton), redukční ekvivalenty; RH (ROH) - substrát (produkt); XOOH(XOH) - peroxysloučenina jako alternativní donor kyslíku

převzato z [http://metallo.scripps.edu/PROMISE/_P450_cycle.gif]

5. Metody zkoumání struktury CYP

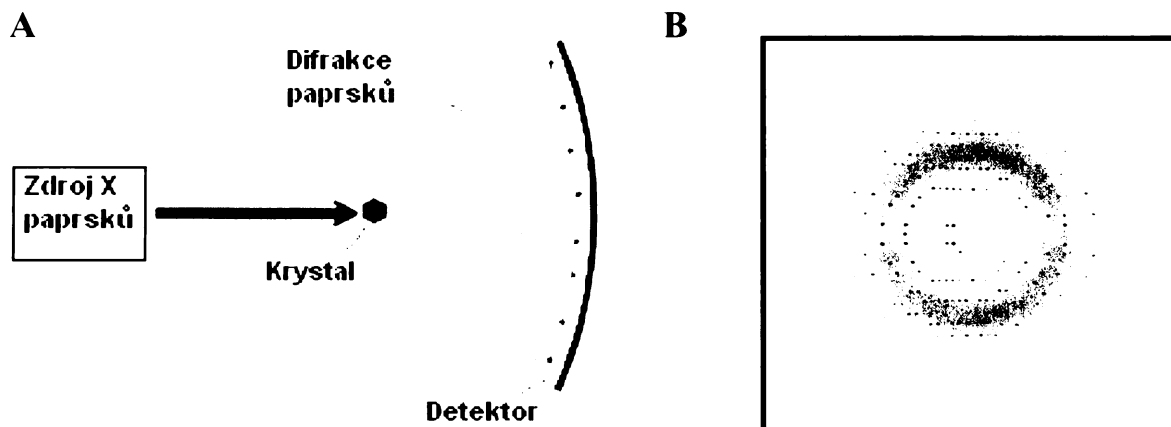
Pokud chceme porozumět funkci cytochromů P450 je nezbytné odhalit jejich strukturu. K determinaci struktury těchto enzymů se často používá kombinace různých metod. Nejčastěji používané metody při studiu struktury cytochromů P450 jsou uvedeny níže.

5.1. Spektrální metody

Princip spektrálních metod spočívá ve využití interakce hmoty a záření. Mezi nejčastěji používané patří fluorescenční techniky, Ramanova spektroskopie, chiroptické metody (cirkulární dichroismus, optická rotační disperze) a nukleární magnetická resonance (viz dále).

5.2. Rentgenová krystalografie

Rentgenová krystalografie si do současnosti udržela místo nejpoužívanější metody ke studiu trojrozměrné struktury biomakromolekul. Zvláště pro proteiny je spolu s NMR nezastupitelnou metodou, která umožňuje poznat jejich detailní strukturu na atomární úrovni. Základním kamenem této fyzikálně-chemické metody je příprava relativně velkého a kvalitního krystalu proteinu, k jehož přípravě je nutný extrémně čistý proteinový vzorek. Připravený krystal je vystaven rentgenovým paprskům (X-paprskům), které při průchodu krystalem interagují s elektrony atomů krystalu a rozptylují se všemi směry. Pokud je uspořádání atomů pravidelné dochází k difrakci. Schéma tohoto děje je zobrazeno na obrázku 5A. Výsledkem jsou různě intenzivní skvrny (difrakční záznam), závislé na intenzitě a na poloze interferujících paprsků (obrázek 5B). Aby došlo ke správné difrakci musí se na dané místo vpravit atom těžkého kovu (např. Hg, U, Pb) tak, aby se nezměnil celkový tvar proteinu .



Obrázek 5: A) Schéma difrakce paprsků po průchodu krystalem, B) Difrakční záznam proteinového krystalu

převzato z

[<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BPOL/5.%20Metody%20urcovani%20prostorove%20struktury%20proteinu.pdf>]

Pomocí počítačových programů se difrakční záznamy (intenzity a polohy skvrn) vyhodnotí a výsledkem jsou informace o hustotě elektronů v různých bodech prostoru zaujímaného molekulou proteinu. Největší hustota elektronů je v místech, kde leží jednotlivé atomy. Spojením míst o stejné elektronové hustotě v určitém rovinném průřezu molekuly se získá “elektronová mapa” této roviny. Narýsováním takových map pro různé roviny a jejich srovnáním do sloupce lze získat obraz vnitřní struktury proteinové globule. Vzniká tak obraz jedné z nejpravděpodobnějších struktur proteinu [Šípál a spol., 1992].

Rentgenová krystalografie má i své nedostatky, které budou blíže popsány v kapitole 7 prostřednictvím krystalových struktur CYP2B4.

Příprava krystalové struktury proteinu vyžaduje jeho izolaci z přirozeného prostředí a obohacení atomem těžkého kovu. Neboť ještě nebyl připraven krystal membránového proteinu, vyžaduje příprava krystalu savčího cytochromu P450 navíc výraznou úpravu aminokyselinové sekvence. Výsledný krystal obsahuje navíc velké množství vody.

I přes všechny nevýhody přináší krystalová rentgenografie velmi přesné informace především o bakteriálních cytochromech, které lze dále využít pro zdokonalení struktur savčích.

První úspěšně vyřešenou krystalovou strukturou CYP byla bakteriální CYP101 [Poulos a spol., 1987], mezi další významné CYP108 [Hasermann a spol., 1994], CYP102

[Ravichandran a spol., 1993], CYP107A1 [Cupp-Vickery a Poulos, 1995], CYP 55A1 [Park a spol., 1997], CYP167A1 [Nagano a spol., 2003] a první krystalová struktura CYP119 získaná z termofilního organismu *Sulfolobus solfataricus* [Yano a spol., 2000].

Bakteriální struktury se vyznačují značnou podobností, která vedla k předpokladu, že mezi všemi CYP je strukturní základ stavby proteinové molekuly shodný. Tohoto předpokladu se využívá v celé řadě metod studia struktury CYP, např. homologní modelování 3D struktur savčích CYP.

3D strukturní data CYP získaná rentgenovou krystalografií jsou uloženy v proteinové databance (Protein Data Bank, PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>), kde tvoří kolem 80 % ze známých proteinových struktur cytochromů P450.

První krystalografická struktura savčího mikrosomálního cytochromu P450 2C5 [Cosme a Johnson, 2000]. byla připravena odstraněním N-koncové membránové kotvy, modifikací některých úseků polypeptidického řetězce, které byly nahrazeny z příbuzného CYP2C3, a expresí v *Escherichia coli*. Tento způsob přípravy krystalu nevyžaduje přítomnost detergentů, které by mohly agregací CYP poškodit krystalovou strukturu enzymu. Takto modifikovaný enzym CYP2C5/3 si v rekonstituovaných systémech kromě své katalytické aktivity zachoval i schopnost asociace s membránou. Proto tato krystalová struktura je vhodná jako templát pro homologní modelování dalších mikrosomálních cytochromů P450 a může pomoci při návrhu struktury modulátorů a předpovědi metabolismu substrátů CYP [Williams a spol., 2000].

V proteinové databance jsou v současné době uloženy i struktury některých reduktas a další struktury savčích CYP (viz. dále). Ačkoli struktury jednotlivých komponent některých monooxygenasových systémů jsou známy, ještě se nepodařilo připravit krystalovou strukturu jejich komplexu.

Následující dosud známé savčí krystalové struktury byly připraveny expresí v *Escherichia coli* bez N- koncové části a částečné úpravy aminokyselinové sekvence: CYP 3A4 [Yano a spol., 2004; Williams a spol., 2004], CYP 2C9 [Williams a spol., 2003; Wester a spol., 2004], CYP 2C8 [Schoch a spol., 2004], CYP 2A6 [Yano a spol., 2005], 2D6 [Rowland a spol., 2006] a 2B4 [Zhao a spol., 2006; Scott a spol., 2004; Scott a spol., 2003].

I přes všechny zmíněné nevýhody představuje rentgenová krystalografie primární nástroj pro porozumění vztahu struktury a funkce cytochromů P450.

5.3. Chemické modifikační metody

Chemické modifikační metody patří mezi nepřímé metody zkoumání struktury používané především ke studiu aktivního místa a membránové topologie cytochromů P450.

Následující metody využívají vzniku kovalentní vazby mezi zkoumanou makromolekulou (CYP) a chemicky reaktivním činidlem.

5.3.1. Afinitní značení

Tato metoda je založena na přirozené afinitě mezi ligandem (např. substrátem) a receptorem (např. enzymem). Jedna z těchto molekul vazebných partnerů je substituována chemicky reaktivní skupinou za vzniku afinitní značky (sondy), která po přidání do reakční směsi vytvoří kovalentní komplex ligand–receptor. Afinitní značení má však některé nedostatky: nízkou chemickou reaktivitu afinitní sondy a vysokou možnost nespecifického značení (interakce sondy v jiných místech než je specifické vazebné místo pro daný ligand) [Kubíčková a Hodek, 2001].

5.3.2. Fotoafinitní značení

Tato metoda je založena na principech afinitního značení se snahou odstranit jeho zmíněné nedostatky. Chemicky reaktivní skupina sondy je z původně inertní skupiny v požadovaném čase fotolyticky aktivována. Fotolýzou dojde k rozpadu fotolabilní skupiny sondy za vzniku reaktivního intermediátu, který umožní tvorbu kovalentní vazby mezi sondou a studovaným receptorem. Pro přípravu fotolabilní sondy se používají především prekursorů karbenů. Výhodou fotolyticky generovaných intermediátů je extrémně krátký poločas života a značná reaktivita s poměrně nízkou selektivitou sondy, což vede ke snížení možnosti nespecifického značení. Použití fotoafinitního značení je vhodné zejména pro:

1) Mapování aktivního centra enzymu CYP. Jako jedna z mála metod umožňuje fotoafinitní značení pohled do struktury hydrofobního vazebného místa (identifikaci významných aminokyselinových zbytků) [Antonovič a spol., 1999].

2) Studium membránové topologie CYP, která lze provádět dvěma způsoby.

První způsob je založen na použití fotolabilních derivátů lipidů nebo jiných hydrofobních fotolabilních sloučenin, které jsou dobře rozpustné v membráně. Po fotolýze jsou reaktivní intermediáty těchto látek schopné označit části proteinu, které interagují s membránou. Určením vzdálenosti mezi hydrofilním koncem a fotolabilní skupinou vhodné sloučeniny lze určit i hloubku zanoření proteinové molekuly do membrány. Fotolabilní sondy musí být schopny efektivní inkorporace do neaktivovaných C-H vazeb postranních alifatických řetězců hydrofobních aminokyselin, které lze předpokládat právě v těchto částech proteinů.

Druhý způsob studování membránové topologie je zaměřen na identifikaci nemembránových (hydrofilních) úseků cytochromů P450. Pro tento způsob se využívá jakákoli hydrofilní fotolabilní sloučenina nevstupující do membrány.

3) Ireverzibilní zablokování aktivního místa enzymu inhibitorem. Komplex inhibitor-enzym může umožnit zachycení struktury enzymu v určitém konformačním stavu, který lze využít pro studium vztahu struktury a funkce tohoto enzymu [Kubíčková a Hodek, 2001].

5.4. Epitopové mapování

Epitopové mapování patří mezi jednu z imunochemických metod. Tato metoda využívá specifické interakce protilátek a antigenu (oblast CYP). Epitopové mapování pomáhá objasnit strukturu savčích CYP, prostřednictvím identifikace aminokyselinových úseků (epitopů) CYP, které (ne)interagují s membránou endoplazmatického retikula. Protilátky ochotně reagují s částmi proteinu exponovanými do cytosolu, slabě s místy v blízkosti membrány, ale nereagují s úseky schovanými v membráně. Touto metodou bohužel nelze rozeznat, zda oblasti CYP tvořící komplex s protilátkami, jsou součástí membrány nebo oblastí sekundárních struktur proteinu neexponovaných do vodného prostředí. Epitopové mapování tedy není nejvhodnější metodou pro studium CYP, protože jejich velká část struktury je chráněna před vodným prostředím uvnitř globule. Epitopové mapování lze použít jako doplňkovou techniku pro ověření (ne)přítomnosti určitých oblastí CYP v membráně či cytosolu [Uvarov a spol., 1994].

5.5. Cílená mutagenese

Pokud se předpokládá, že některý aminokyselinový zbytek v enzymu vykonává specifickou katalytickou funkci, lze tuto funkci pomocí cílené mutagenese ověřit, výměnou (modifikací) aminokyseliny za jinou, která není této funkce schopna. Tato výměna se provádí změnou sekvence basí specifického kodonu v genu (mutací). Mutovaný gen se namnoží přidáním DNA polymerasy, DNA ligasy a deoxyribonukleosidtrifosfátů. Takto připravený mutantní gen se vnese do expresního vektoru (např. *Escherichia coli*) za silný promotor, kde proběhne jeho zvýšená exprese. Takto připravený protein se purifikuje a stanoví se jeho vlastnosti. Cílená mutagenese je velmi cenná metoda, která pomáhá dokazovat či vyvracet význam a funkci aminokyselinových zbytků, zjištěných rentgenostrukturní analýzou, fotoafinitním značením nebo homologním modelováním [Szklarz a Halpert, 1997].

5.6. Homologní modelování

Homologní modelování je počítačová metoda využívaná k predikci 3D struktury proteinů. Modelování je založené na předpokladu, že aminokyselinová sekvence proteinu do určité míry předurčuje sekundární strukturu proteinu. Navíc lze předpokládat, že příbuzné proteiny obsahují shodné (homologní) motivy terciární struktury. Aby vznikl daný model proteinu je tedy nezbytné znát jeho aminokyselinovou sekvenci, která je následně porovnána se sekvencemi známých proteinů a vyhledán vhodný templát. Templáty daného proteinu musí obsahovat co nejvíce sekvenční homologie. Při porovnání sekvencí modelovaného a známých proteinů jsou rozlišeny shodné a odlišné aminokyselinové úseky. Pro odlišné úseky jsou vypočteny pravděpodobnosti výskytu jednotlivých sekundárních motivů. Po vytvoření modelu apoproteinu cytochromu P450 je do dané struktury vnesen hem a je podroben energetické minimalizaci.

Nejčastějšími templáty pro přípravu modelů jsou krystalové struktury bakteriálních CYP101 získána z bakterie *Pseudomonas putida* (prostřednictvím této první struktury byla získána většina dosud známých informací o vztahu funkce a struktury CYP) a CYP102 z *Bacillus megaterium*. CYP102 se vyznačuje velkou podobností (sekvencí, reakčními partnery) s mikrosomálními formami a je proto pro ně vhodnějším templátem než CYP101 [Chang a spol., 1996].

Pro homologní modelování byl vytvořen server Swiss-PDBViewer (<http://www.expasy.org/>).

Strukturní data proteinů uložená v PDB pocházejí ze 2 % z homologního modelování.

Do současné doby je známo pouze málo krystalových struktur membránových CYP a proto je predikce 3D struktur neznámých CYP prostřednictvím homologního modelování velmi cennou technikou. Model cytochromu P450 může být využit k identifikaci aminokyselinových zbytků tvořící aktivní místo enzymu, k navržení specifického inhibitoru nebo může pomoci při mapování přístupového substrátového kanálu k aktivnímu místu CYP.

Samotná predikce nemusí vést k věrohodnému zjištění struktury cytochromů P450. Vždy je třeba model validovat pomocí dalších fyzikálně–chemických a chemických metod.

5.7. Nukleární magnetická resonance (NMR)

Nukleární magnetická resonance (NMR) je metoda založená na interakci magneticky aktivních jader (umístěných v silném magnetickém poli) s elektromagnetickým zářením v oblasti radiových vln. Vlivem vzájemných interakcí jader a molekulového okolí dochází k charakteristickým posunům a štěpení signálů jednotlivých jader, které jsou zaznamenány ve spektru. Spektra dále mohou sloužit ke zpětnému získání struktury sledované molekuly nebo jejích částí.

Kromě informace o prostorovém uspořádání CYP poskytuje NMR spektroskopie ještě jistou informaci o mobilitě jednotlivých částí peptidového řetězce (molekulová dynamika). Další výhodou této metody je možnost zkoumání proteinů v přirozeném prostředí.

V posledním desetiletí došlo k výraznému nárůstu zájmu o studium bílkovin pomocí NMR spektroskopie. V současné době je tato metoda spolehlivě použitelná pro proteiny o velikosti 60kDa. Tato metoda se však stále vyvíjí a v budoucnu bude pravděpodobně schopna poskytovat ještě více informací.

5.8. Hmotnostní spektrometrie

Tato moderní technika je schopná identifikovat jednotlivé proteiny nepřímo a to analýzou peptidů, vzniklých specifickou hydrolýzou příslušných proteinů. K tomuto účelu se nejvíce používá proteolýza trypsinem. Problém identifikace proteinu je tedy redukován na problém identifikace jednotlivých peptidů, respektive jejich molekulových hmotností (metoda peptidového mapování). Soubor molekulových hmotností specificky získaných peptidů je pro daný protein nejlepší identifikací. Pro studium struktury CYP však MS může sloužit pouze ve spolupráci s dalšími metodami, protože udává informaci pouze o primární struktuře.

6. Membránová topologie

6.1. Membrána a její složky

Biologická membrána tvoří bariéru mezi dvěma odlišnými buněčnými kompartmenty, například cytosolem a lumen endoplazmatického retikula. Membrána je tvořena amfipatickou fosfolipidovou dvojvrstvou. Hydrofobní oblasti obou vrstev fosfolipidů jsou orientovány k sobě dovnitř membrány a jsou zcela chráněny před vodným prostředím, zatímco hydrofilní hlavy fosfolipidů se s vodným prostředím stýkají. Fosfolipidy se uvnitř dvojvrstvy pohybují (rotují a vyměňují se sousedními) a tím zajišťují pohyb ostatních složek membrány, například membránovým proteinům. Vzhledem k vlastnostem membrány lze předpokládat, že úseky zanořené do této biologické struktury musí být převážně tvořeny z hydrofobních aminokyselin

Aby mohly být amfipatické proteiny součástí membrány, musí zaujímat takovou strukturu, která minimalizuje jejich polaritu. Části proteinů, které procházejí membránou skutečně zaujímají převážně alfa helikální uspořádání nebo strukturu beta skládaného listu. Oblasti membránových proteinů s převážně hydrofilním charakterem jsou umístěny na povrchu membrány a interagují s hydrofilními hlavami fosfolipidů.

Podle způsobu interakce s membránou dělíme proteiny na periferní (vázány elektrostatickými silami na hydrofilní části specifických integrálních proteinů) a integrální (reagují s membránovými fosfolipidy). Integrální membránové proteiny procházejí celou (transmembránové proteiny) nebo pouze částí fosfolipidové dvojvrstvy. Jak se proteiny ocitly v membráně lze vysvětlit „signální hypotézou, podle které některé proteiny po jejich syntéze obsahují na svém N-konci signální peptid (vedoucí sekvenci), který zprostředkuje jejich zanoření do příslušné membrány.

Tato hypotéza se uvažuje u mikrosomálních CYP, které jsou na rozdíl od bakteriálních forem integrálními proteiny membrány endoplazmatického retikula (ER) a proto je jejich studium struktury velmi omezeno.

6.2. Membránová topologie

Dosud nebyl uspokojivě vyřešen způsob, hloubka a význam zakotvení mikrosomálních cytochromů P450 v biologické membráně. Problematika zakotvení proteinů v membráně je označována jako membránová topologie.

V membráně ER jsou kromě molekuly cytochromu P450 ukotveny i jeho reakční partneri monoxygenasového systému (NADPH: cytochrom P450 reduktasa, NADH: cytochrom b_5 reduktasa, cytochrom b_5). Pro pochopení mechanismu interakce savčích CYP a jeho partnerů je nezbytné objasnit význam fosfolipidové dvouvrstvy v monoxygenasových systémech.

K vysvětlení funkce membrány v MFO slouží hypotéza, podle které se membránově vázané proteinové molekuly pohybují prostřednictvím jejich membránových úseků difuzí v rovině membrány. Difuzní pohyb těchto komponent v membráně umožňuje jejich interakci a vyvolá konformační změny zvyšující afinitu k substrátu. Difuze tedy udává rychlost reakce proteinových komponent uvnitř membrány, která je dána její fluiditou. Jakákoliv změna stavu (složení) membrány se tedy projeví změnou aktivity daných enzymů. Změna ovlivní interakci mezi cytochromem P450 a jeho reduktasou například změnou konformace samotného cytochromu P450. Podle této hypotézy membrána slouží také jako zdroj hydrofobních substrátů vstupujících do aktivního místa [Taniguchi a Pyerin, 1988].

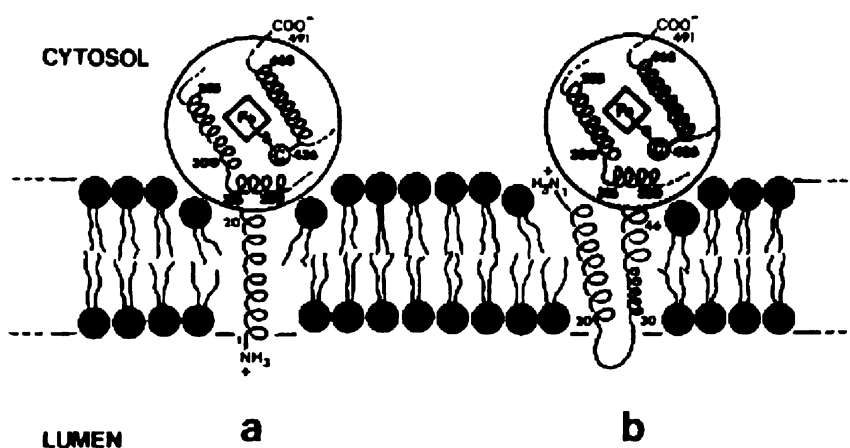
Studiem funkce N-koncových membránových domén se ukázalo, že N-koncová doména NADPH: cytochrom P450 reduktasy má pravděpodobně důležitou roli při transportu elektronů. Po odstranění jejího N-koncového úseku nebyla tato molekula schopna přijímat elektrony z primárního donoru koenzymu NADPH. Odstranění nemělo vliv na přenos elektronů z reduktasy dále. Samotné odstranění N-koncové části u cytochromu P450 naopak zřejmě nemá vliv na zprostředkování interakce s reduktasou a tím ani na přenos elektronů [Backes a Kelley, 2003].

N-koncová sekvence mikrosomálních CYP (30-50 aminokyselin) zaujímá α -helikální strukturu, která slouží jako membránová kotva pro zbytek proteinové molekuly (katalytické domény), umístěné na cytosolární straně membrány. Jakým způsobem je tato helikální oblast v membráně uspořádána není zatím evidentní (viz. dále) N-koncová

membránová a katalytická doména je spojena krátkým hydrofilním úsekem bohatým na prolinové zbytky, který je lokalizován v cytosolu [Ortiz de Montellano, 2005]

Existuje několik hypotes, které popisují jakým způsobem je v membráně N-konec peptidového řetězce zanořen. Jedna z nich předpokládá, že NH_2 - konec polypeptidového řetězce proteinu vyčnívá do lumen endoplazmatického retikula [Furuya a spol., 1989; Szczesna-Skorupa a spol., 1988] a tvoří v membráně transmembránovou kotvu tvořenou jedním α -helixem (obrázek 16a) [Vergeres a spol., 1989 a 1991; Kunz a spol., 1991].

Opačná hypotéza předpokládá, že NH_2 -konec řetězce je situován na cytosolární straně membrány [Bernhardt a spol., 1988] a do membrány endoplazmatického retikula je CYP zakotven pomocí dvou α -helixů (obrázek 16b) [Nelson a Strobel, 1988].



Obrázek 6: Membránová topologie mikrosomálních CYP v membráně ER

Legenda: Dvě představy zakotvení CYP v membráně.

a) tvořena jedním transmembránovým α -helixem, NH_2 konec vyčnívá do lumen ER

b) tvořena dvěma transmembránovými α -helixy, NH_2 konec vyčnívá do cytosolu

převzato z [Brown a Black, 1989].

Několik savčích CYP (účastníci se syntézy sterolů, steroidů a žlučových kyselin) je lokalizováno na vnitřní straně membrány mitochondrií, směřované do matrix. Tyto mitochondriální CYP neobsahují N-koncovou transmembránovou kotvu ve vnitřní mitochondriální membráně a přesto jsou na ni vázány [DuBois a spol., 1981; Ogishima a spol., 1985]. Podobnost mitochondriálních a mikrosomálních struktur CYP vedla k hledání dalších (doplňkových) membránově vázaných částí polypeptidického řetězce.

Tyto části se ukázali býti nespojitými úseky katalytické domény blízko N-konce polypeptidového řetězce, které zajišťují mnohem specifičtější a pevnější orientaci katalytické domény CYP, než by byla dosažena pouze transmembránovou kotvou. Kombinace transmembránové kotvy spolu s doplňkovými membránovými oblastmi zajišťuje správnou orientaci CYP a dovoluje vstup substrátům do aktivního místa a interakci s reduktasou [Williams a spol., 2000].

Polypeptidový řetězec tvořící katalytickou doménu savčích CYP je všeobecně delší než odpovídající oblast bakteriálních forem. Charakteristické vložení je evidentní v oblasti F, G helixů, které jsou pro svou hydrofobní povahu považovány za jednu z doplňkových membránových domén [Williams a spol., 2000, Izumi a spol., 2003, Deng a spol., 2003]. F-G oblast se vyznačuje dalšími krátkými helixy F' a G' (CYP 2C5 a 2B4) nebo jedním dlouhým helixem F' (2C8 a 2C9). Tato oblast spolu s transmembránovou kotvou tvoří hydrofobní povrch blízko N-konce proteinové molekuly, který je nejvýraznějším strukturním rozdílem ve srovnání s bakteriálními cytochromy P450 [Ortiz de Montellano, 2005].

Různé přístupy řešení membránové topologie

Vhodnými metodami pro determinaci hydrofobních oblastí CYP (interagujících s membránou) jsou metody fotoafinitního značení, metoda epitopového mapování a cílená mutagenese (viz. kapitola 4). Tyto metody v kombinaci s rentgenovou krystalografií a homologním modelováním slouží k objasnění membránové topologie.

Pro studium membránových proteinů je vhodné použít různé techniky značení proteinů přímo v prostředí membrány. Jsou-li použity činidla neprostupující membránu, označí se pouze oblasti proteinů vně membrány. Jako modifikační činidla se používají barevné fluorescenční či radioaktivní sloučeniny nesoucí reaktivní skupinu, které mohou a nemusí být maskovány. Tyto sloučeniny se naváží na protein, buď na každou dostupnou aminokyselinu, nebo je-li sama substrátem enzymu, cíleně do aktivního místa. Následně lze na modifikovaný protein nechat působit proteolytická činidla (např. trypsin). Štěpy se separují a následuje určení modifikované aminokyseliny.

Epitopové mapování využívá primární aminokyselinové sekvence a specifických protilátek k identifikaci epitopů CYP exponovaných do cytosolu. Pomocí této metody byla zkoumána například struktura CYP2C5. První částí mapovanou protilátkami (od N-konce)

byl prolin 30, který spolu s dalšími 9 aminokyselinovými zbytky tvořil spojovací část mezi membránovou a katalytickou částí. Tento spojovací region, nacházející se na cytosolární straně membrány, hraje pravděpodobně ochrannou roli před translokací do endoplazmatického retikula. Oblasti, které nebyly rozpoznány protilátkami jsou považovány za hydrofobní a membránové úseky. Pro CYP2C5 byly za hydrofobní označeny oblasti před helixem A (30-45), následující aminokyselinové zbytky helixu A (60-69), oblasti (376-379) β_2 -struktury a úsek mezi helixy F a G helixy na C-konci polypeptidového řetězce (obrázek 7) [Williams a spol., 2000].

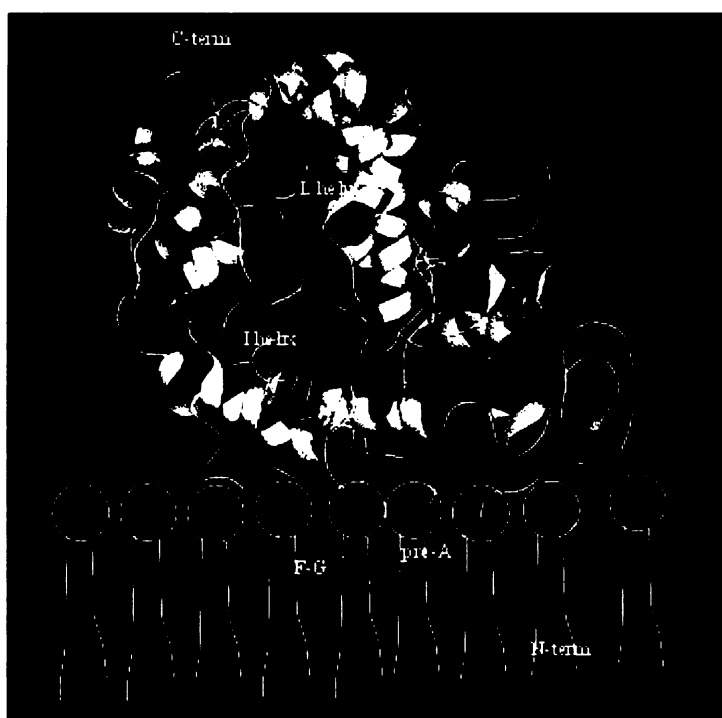


Obrázek 7: Membránová topologie CYP2C5, určená pomocí epitopového mapování převzato z [Williams a spol., 2000].

Homologní modelování a membránová topologie

Kromě výše zmíněných metod může při membránové topologii CYP pomoci metoda homologního modelování. Homologní model struktury CYP2B1 byl primárně vytvořen podle templátu cytochromu CYP102. Chybějící informace o struktuře byly doplněny dalšími bakteriálními a savčími cytochromy P450. V modelu proteinu je patrný dlouhý vystupující hydrofobní úsek proteinu mezi helixy F a G (tzv. F/G smyčka), který je zřejmě zanořen do membrány (obrázek 8). V těsné blízkosti F-G oblasti, před helixem A (pre-A) je patrný další hydrofobní úsek. Kromě těchto dvou membránových domén nelze opomenout existenci N-koncové kotvy, jejíž predikce vzhledem k chybějícímu templátu

nemusí odpovídat skutečnosti. Na obrázku 7 je zobrazena představa membránové interakce homologního modelu CYP2B1, který předpokládá interakci pre-A a F-G oblasti mezi sebou a membránou a vznik hydrofobního kanálu pro vstup substrátu do aktivního místa enzymu. Katalytická část proteinu reaguje s membránou prostřednictvím kladně nabitých aminokyselinových zbytků argininů a lysinů, které reagují s povrchem membrány přes záporně nabitě hlavy fosfolipidů [Dai a spol., 1998].



Obrázek 8: Membránové domény homologního modelu CYP 2B1

Legenda: C-term, N- term je označení pro C a N-konec polypeptidového řetězce; na N- konci řetězce je zobrazena první membránová doména transmembránová kotva; druhá doména F-G oblast a třetí doménou je pre-A region (oblast předcházející A helixu); v blízkosti hemové skupiny (červeně) jsou označeny I a L helixy

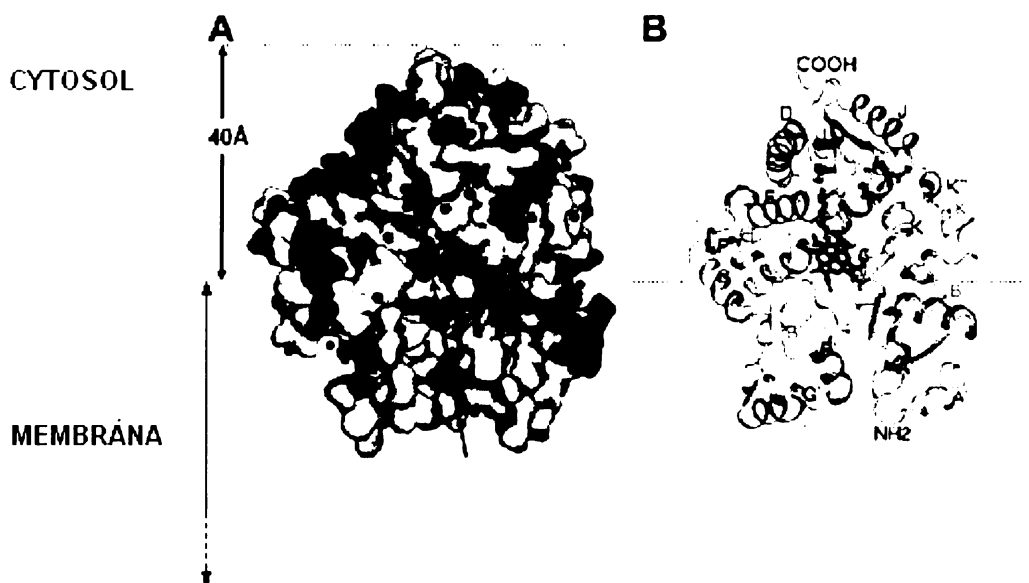
převzato z [Dai a spol., 1998].

Dobrym příkladem rozporu problematiky membránové topologie savčích cytochromů P450 je současná idea membránového zakotvení krystalové struktury CYP2B4.

Krystalová struktura a membránová topologie

Struktura CYP2B4/bifonazol (více kapitola 7) navrhuje, že téměř polovina proteinové molekuly enzymu je zanožena v membráně (obrázek 9). Membránová topologie navržená prostřednictvím krystalové struktury CYP2B4/bifonazol podporuje vstup

substrátů kanálem vedoucím přímo z membrány do aktivního centra enzymu prostřednictvím hluboko zanořeného F' helixu a oblastí před A helixem (40-46) a B'/C smyčky a [Zhao a spol., 2006].



Obrázek 9: Naznačení membránového zakotvení CYP2B4/bifonazol

Legenda: míra zanoření CYP do membrány je naznačena přerušovanou čarou; (A) šedá část znázorňuje polární část membrány a žlutá hydrofobní jádro; žlutě jsou znázorněny hydrofobní aminokyselinové zbytky CYP, bíle polární, červeně negativně nabitě a modře pozitivně nabitě; (B) červeně je znázorněn hem, žlutě je vyznačen F' helix, zprostředkávající vstup substrátů z membrány, směr vstupu substrátů je znázorněn šipkou u obrázku A

převzato z [Zhao, a spol., 2006]

V současné době existuje nová databáze membránových proteinů zaměřená na jejich membránovou topologii, Orientations of Proteins in Membranes (OPM) database (<http://www.opm.phar.umich.edu/>). Způsob zanoření proteinů do membrány byl vypočten na základě znalosti 3D struktury těchto proteinů (PDB). Ukotvení cytochromů P450 v membráně se ve většině případů velmi liší od experimentálně podložených návrhů, jak je patrné z následujícího obrázku 10 pro CYP2B4/bifonazol.

membrána →



Obrázek 10: Membránová topologie CYP2B4/bifonazol

Výsledky mnoha studií membránových CYP (za využití různých metodik) se i přes velké rozdíly v celkovém pojetí, shodují s představou, že F-G oblast komunikuje s membránou a vytváří přístupový kanál pro substráty.

7. Aktivní místo CYP

7.1. Lokalizace aktivního místa

Aktivní místo cytochromu P450 je část enzymu lokalizovaná v dutině proteinové molekuly kompletně izolované od okolního prostředí. V tomto místě dochází k vazbě substrátu a k realizaci katalytické reakce.

Aktivní místo CYP je složeno z katalytické (zprostředkovává katalytickou reakci) a vazebné (zprostředkovává vazbu substrátu) domény. Základním stavebním kamenem katalytické domény je hem (Fe-protoporfyrin IX), vázaný na apoprotein pomocí thiolátové síry cysteinu. K stabilizaci vazby hemu přispívají propionáty porfyrinového skeletu, tvořící vodíkové vazby s postranními řetězci aminokyselin apoproteinu. Atom hemového železa hraje klíčovou roli v reakčním mechanismu CYP, zprostředkovává aktivaci atomu kyslíku a jeho zabudování do molekuly substrátu.

Pro všechny formy CYP je reakční mechanismus v podstatě stejný, nezávislý na lokalizaci a formě života, v kterém existuje. Proto aminokyseliny a další skupiny hrající klíčovou roli v katalyze (katalytická doména) CYP musí být vysoce konservativní. Naopak oblasti zajišťující vazbu substrátu musí být mezi cytochromy P450 variabilní.

7.2. Konservovanost aktivního místa

U jednotlivých isoform CYP bylo v blízkosti hemové skupiny zjištěno podobné prostorové uspořádání polypeptidového řetězce, které je vzhledem celkové malé aminokyselinové homologii mezi jednotlivými isoformami (kolem 20%) velmi překvapivé.

Za nejvíce strukturně konservované úseky jsou považovány α -helixy I a L, které jsou v těsném kontaktu s hemem, mezi méně pak helixy D, E, J a K. Helix I obsahuje v blízkosti hemu vysoce konservovaný threonin, který pravděpodobně slouží k aktivaci molekuly kyslíku v aktivním místě. Threonin však není mezi CYP striktně konservovaný, například ve struktuře CYP107A1 je nahrazen Ala-245. Helix K obsahuje konservovanou oblast Glu-x-x-Arg, která zřejmě stabilizuje jádro proteinu. Helix L obsahuje 100% konservovaný cystein, vázající hemové železo. Konservovanost cysteinu vázající hemové železo na proximální straně je zajištěna pomocí vodíkových vazeb β -smyčkou

předcházející L helixu [Ortiz de Montellano, 2005]. Poslední konservovanou částí je tzv. „meander“ (v krystalových strukturách označena jako „aromatická oblast“), který je lokalizovaný na proximální straně proteinu [Graham a Peterson, 1999].

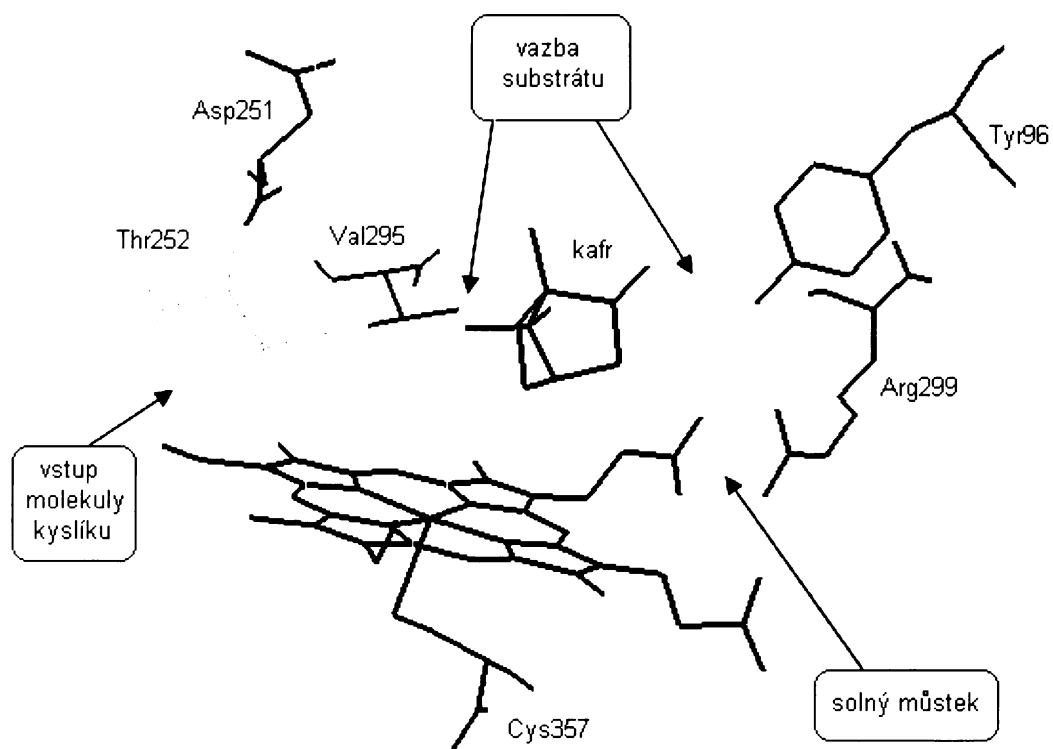
Pro jednotlivé isoformy CYP se motivy konservovaných sekundární struktury liší pouze svoji délkou a konformací a zachovávají tak katalytické schopnosti cytochromů P450.

7.3. Vazba substrátu

Variabilní složkou aktivního místa jednotlivých isoform CYP jsou specifické aminokyselinové zbytky, zprostředkávající navázání substrátu (vazebné domény), které jsou na rozdíl od katalytických domén tvořeny sekvenčně odlišnými (variabilními) úseky bohatými na hydrofobní aminokyseliny [Nelson a spol., 1988]. Četnost výskytu zbytků různých aminokyselin v aktivním místě se značně liší a právě tato heterogenita aminokyselinových zbytků zřejmě zajišťuje substrátovou specifitu jednotlivých isoform cytochromů P450. Vazba substrátu je převážně hydrofobní povahy, stabilizována vodíkovými vazbami.

Mezi variabilní sekundární struktury určující substrátovou specifitu mikrosomálních CYP patří především B' helix [Ortiz de Montellano, 2005], dále $\beta_{1,4}$ -struktura, helixy F, G, B, C a B/C a F/G smyčky. Zástupci CYP obsahují různě dlouhé sekvence, různé uspořádání a chemickou povahu těchto domén. Tato variabilita sekundárních struktur aktivního místa odpovídá typům substrátů, které jsou těmito enzymy oxidovány [Johnson a Stout, 2005].

Na následujícím obrázku 11 jsou znázorněny vazebné a katalytické aminokyselinové zbytky CYP101. Za navázání substrátu (kafru) jsou zodpovědné dva aminokyselinové zbytky Tyr-96 a Val-295. Tyto aminokyseliny vytváří vodíkové vazby se substrátem a pravděpodobně zajišťují jeho správnou orientaci v aktivním místě. V přítomnosti substrátu vchází molekula kyslíku mezi rovinou hemu a Thr-252. Přítomnost substrátu a vstup molekuly vody vytlačuje molekulu vody, která odchází z aktivního místa prostřednictvím rotace argininového zbytku mezi hemovým propionátem tzv. cestou pro rozpouštědlo (viz. kapitola 7) (v nepřítomnosti substrátu je tato oblast stabilizována solným můstkem) [Ortiz de Montellano, 2005].



Obrázek 11: Aktivní místo cytochromu P450 101

Zatím však nebylo zmíněno, jakým způsobem se do aktivního místa dostává substrát a jakým způsobem ho vzniklý produkt opouští. Touto problematikou se zabývá následující kapitola.

8. Přístupové kanály k aktivním místům cytochromů P450

8.1. Význam a problematika studia

Cytochromy P450 si přes adaptaci na různé buněčné prostředí a širokou substrátovou specifitu zachovali společné rysy terciární struktury polypeptidového řetězce. Aktivní místa cytochromů P450 jsou ukrytá uvnitř proteinové globule obvykle kompletně izolované od okolního prostředí [Nelson a Srobel, 1988]. Separace tohoto místa od vnějšího prostředí je zajištěna velmi konservovanými sekundárními oblastmi (viz. kapitola 7). Je tedy nepochybné, že proteinová molekula enzymu musí být schopna vykonat významný pohyb (konformační změnu), kterým by umožnila vstup substrátu do jejího nitra.

Rozeznání substrátu povrhem proteinové molekuly indukuje otevření kanálu a následný průchod substrátu k aktivnímu místu cytochromu P450. Po vstupu substrátu se kanál opět uzavře. Zprostředkování substrátového metabolismu CYP pravděpodobně probíhá ve třech krocích: (1) rozpoznání substrátu oblastmi na povrchu molekuly enzymu; (2) vstup substrátu do skrytého aktivního místa CYP hydrofobním kanálem; (3) správná orientace substrátu v aktivním místě, která umožňuje katalýzu [Scott, a spol., 2002]. Substráty CYP jsou ale velmi rozmanité velikosti, tvaru a polaritě, proto i oblasti CYP zajišťující jejich metabolismus musí být mezi CYP zřejmě odlišné. Jejich nezbytně společnou vlastností však musí být specifita.

O mechanismu otevírání a zavírání těchto kanálů je zatím známo velmi málo, stejně jako zda CYP používají jeden či více druhů kanálů pro vstup substrátů a výstup produktů, jaký druh pohybu a jaká část proteinové molekuly toto vše zajišťuje, jsou-li kanály vedoucí k aktivnímu centru stejné pro všechny cytochromy P450, je pro jednotlivé CYP stejně snadné zpřístupnit tyto průchody a zda používají cytochromy P450 stejný kanál pro různé substráty. Odpověďmi na tyto a další otázky se zabývá tato kapitola.

Identifikace a význam oblastí zodpovědných za metabolismus substrátu se velmi intenzivně zkoumá u cytochromů P450 rodiny 2. Na základě srovnání sekvencí rodiny 2 a CYP101, bylo panem Gotohem identifikováno šest variabilních oblastí zodpovědných za interakci substrátů. Oblasti rozpoznávající strukturu substrátů byly rozděleny do šesti

skupin a označeny jako tzv. SRS (angl. „Substrate Recognition Site“). Mezi tyto oblasti patří helixy A, B, B', F, G a jejich smyčky. Ve smyčkách B/B' a B'/C bylo nalezeno první místo rozpoznávané substráty tzv. SRS-1. Helixy F, G a jejich smyčka tvořící většinou „strop“ aktivního místa obsahují SRS-2 a SRS-3. SRS-4 oblast se vyskytuje na helixu I. SRS-5 je lokalizována na N-konci β_1 -struktury a SRS-6 na struktuře β_4 [Gotoh, 1992]. Strukturní motivy sekundární struktury obsahující zmíněné SRS oblasti jsou schopny konformačních změn, které v závislosti na přítomnosti substrátu umožňují otevření či zavření kanálu.

8.2. Metody mapování přístupových kanálů

Jako první popsala a klasifikovala přístupové cesty k aktivnímu místu cytochromů v roce 2004 Rebecca C. Wade a spol. Přístupové cesty k aktivnímu místu CYP byly popsány jako trajektorie ligandů pomocí počítačové simulační metody molekulární dynamiky. Do aktivního místa se vnesl ligand (substrát, produkt, voda) a po uvedení molekuly enzymu do pohybu se sledovala jeho trajektorie směrem z aktivního místa k povrchu proteinové molekuly a s tím spojené interakce a konformační změny. Výsledné trajektorie ligandů byly rozděleny do třech tříd (1, 2, 3). Třída 2 se navíc dále skládá z pěti podtříd 2 (a,b,c,d,e) [Wade a spol., 2004]. Charakterizace jednotlivých trajektorií je shrnuta v podkapitole 8.4.

Kromě simulačních metod lze potenciální přístupový kanál k aktivnímu místu CYP určit také vizuálním hodnocením krystalové struktury. Známé krystalové struktury CYP obsahují aktivní místo buď zcela izolované od proteinového povrchu (zavřené struktury) nebo jeden (polootevřené) či více přístupových kanálů (široce otevřené). Pro jednotlivé známé krystaly cytochromů P450 jsou v závislosti na přítomnosti ligandu v aktivním místě (substrát, produkt, inhibitor) k dispozici jeden i více zmíněných typů krystalových struktur. Porovnáním více typů krystalových struktur téhož CYP (např. se substrátem a bez něj) lze využít k identifikaci variabilních oblastí struktury proteinu, resp. k identifikaci přístupových kanálů. Bohužel v současné době jsou k dispozici pouze pro dva cytochromy P450 CYP101 a CYP167A1 tři typy krystalových struktur CYP (bez substrátu, v komplexu se substrátem a produktem) [Scott a spol., 2004]. Pouze krystalová struktura CYP101 je známa v plně zavřené a široce otevřené formě. Dosud není jasné, zda zmíněné typy struktur (zavřená, polootevřená a široce otevřená) jsou dostupné pro všechny cytochromy

P450 nebo, zda některé kanály CYP nikdy nejsou úplně zavřené a otevírají se ze široka pouze krátkodobě.

V porovnání s výše uvedenými třídami trajektorií ligandů v simulačních systémech, byly dosud v krystalových strukturách identifikovány pouze cesty 1, 2 (a, c, e) [Wade a spol., 2004].

Další možností mapování přístupových cest CYP představuje dokování jeho aktivního místa například fotoafinitně značenou sondou (viz kapitola 4) a následná identifikace navázané sondy. Pokud je sonda dostatečně dlouhá (dosahuje-li z aktivního místa až k povrchu enzymu), lze jejím prostřednictvím mapovat potenciální přístupový kanál [Antonovič a spol., 1999].

8.3. Důležitá hlediska při mapování přístupových kanálů

Při mapování potenciálních kanálů k aktivnímu místu CYP nelze opomenout různou buněčnou lokalizaci bakteriálních a savčích cytochromů P450 a charakter jejich substrátů. Mikrosomální cytochromy P450 ve srovnání s bakteriálními kromě substrátů a vazebných partnerů interagují navíc s membránou. Lokalizace CYP v hydrofobní membráně má nepostradatelný význam pro zprostředkování katalytické reakce, jako zásobárna hydrofobních substrátů a zajištění správné orientace CYP pro vazbu s redoxním partnerem. Navázání reakčního partnera na proximální straně povrchu CYP, indukuje konformační změnu enzymu, která ovlivní konformaci jeho aktivního místa [Wade a spol., 2005]. Než tedy vůbec dojde k navázání substrátu do aktivního místa prodělá molekula proteinu celou řadu strukturálních změn a pouze jejich správná synchronizace umožní v konečném kroku katalýzu.

CYP vyžadují pro zprostředkování katalytické reakce nejen substrát, ale také molekulu kyslíku a redukční ekvivalenty. V nepřítomnosti substrátu je na hemovém železe v aktivním místě navázaná molekula vody, která je v přítomnosti substrátu nahrazena molekulou kyslíku. Je patrné, že molekula vody a kyslíku musí někudy do aktivního místa přicházet a odcházet. Z tohoto důvodu jsou v následující podkapitole zmíněny nejen potenciální přístupové kanály pro substráty (produkty), ale také pro molekulu vody a kyslíku. Jakým způsobem přicházejí do aktivního místa redukční ekvivalenty, zda také ke svému transportu využívají kanály, není zatím objasněno. Nelze tedy vyloučit, že zjištěné

přístupové cesty pro substráty (produkty) slouží pro transport vody, kyslíku či redukovaných ekvivalentů a naopak.

8.4. Klasifikace a charakterizace potenciálních přístupových kanálů CYP

Z důvodů uvedených v podkapitole 8.3., není překvapivé, že bylo mapováno více různých přístupových kanálů, lišící se v molekule cytochromu P450 svou prostorovou lokalizací. Klasifikace a charakterizace potenciálních přístupových kanálů byla provedena na základě popisu trajektorií ligandů (z aktivního místa k povrchu proteinové molekuly CYP) simulační metodou molekulární dynamiky (obrázek 12) Pro lepší orientaci byly cesty klasifikovány do třech tříd 1-3 a cesty pro vodu (cesta 2 se dále dělí na pět podtříd a-e) [Wade a spol., 2004].

Jednotlivé simulačně mapované trajektorie jsou dále pro lepší představu porovnány s cestami nalezenými v krystalových strukturách cytochromů P450 (tabulka 3).

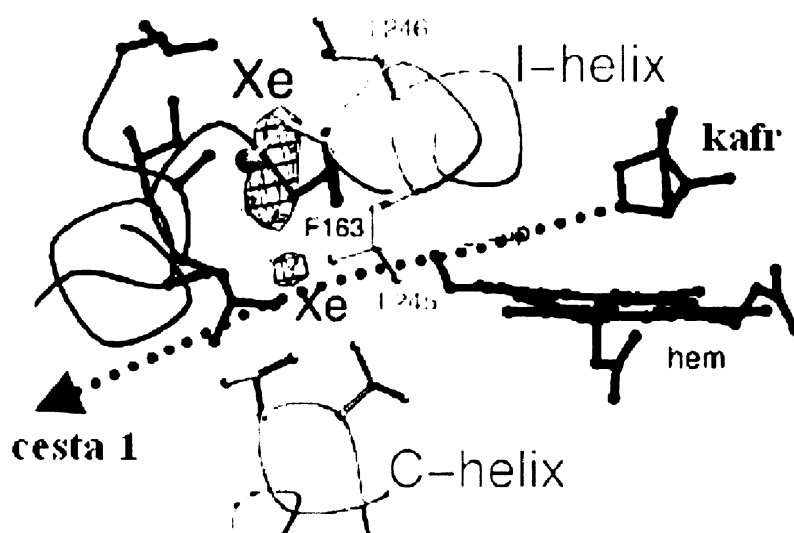


Obrázek 12: Substrátové trajektorie mapované u CYP101 (odpovídající klasifikovaným cestám 1, 2a, 2b, 2c a 3) pomocí simulační metody molekulární dynamiky

Cesta 1

Cesta 1 byla pozorována pouze v krystalové struktuře CYP51, jako malý otvor v povrchu lokalizovaný nedaleko rozsáhlého otvoru cesty 2e (viz. dále). Pomocí simulace byla mapována trajektorie ligandu, jako průchod z aktivní místa enzymu podél helixu I, dále mezi C/C' smyčkou a H nebo L helixem. Trajektorie končila G/H smyčkou a β_2 -strukturou na povrchu enzymu (obrázek 12). Průchod ligandu touto cestou se pro CYP101 ukázal být oproti ostatním trajektoriím 2 a 3 (viz. dále) energeticky nevýhodný. Energetická bariéra této trajektorie spočívá v překonání krátkodobé distorze hemu a průchodu oblastí s malou flexibilitou (I-helix) před oblastí s velkou flexibilitou (C' helix).

Na možný důvod energetické bariéry této cesty, resp. na jinou možnou roli cesty 1, ukazuje současná krystalová struktura CYP101 s navázaným xenonem (PDB kód: 1UYU). Překvapivě byla v této struktuře identifikována dvě vazebná místa pro xenon (mezi cestami 1 a 3 viz. dále), která byla nalezena mezi oblastmi I (Leu-245 a Leu-246 a E helixu (Phe-163)). Vazebná místa vytvářejí hydrofobní dutiny, která oddělují molekulu xenonu, aniž by porušila stavbu aktivního místa jak je vidět na obrázku 13. Tyto místa CYP by mohla být využívána ke skladování a kontrole dodávky kyslíku. Vysoká energetická bariéra cesty 1 by pouze odpovídala na otázku, jak je zajištěno, aby molekula kyslíku byla přednostně do aktivního místa dodávána a ne naopak [Wade a spol., 2004].



Obrázek 13: Cesta 1 v krystalové struktuře CYP101 a lokalizace mapovaných vazebných míst pro xenon

Legenda: Směr výstupu substrátu CYP101 (kafru) cestou 1 je na obrázku znázorněn tečkovaně a šipkou převzato z [Wade a spol., 2004]

Cesta 2

Třída 2 patří mezi nejčastěji identifikované potenciální cesty. Tato třída se dále dělí do pěti podříd a-e. Společným znakem této třídy cest je lokalizace v blízkosti B' helixu/B-C smyčky (obrázek 14). Tato oblast proteinů je mezi jednotlivými cytochromy P450 vysoce sekvenčně a tedy i strukturně variabilní (SRS-1).

2a cesta je lokalizována mezi F/G smyčkou, B' helixem B/C smyčky a β_1 -strukturou (obrázek 14). Jelikož jsou všechny tyto oblasti mezi studovanými CYP vysoce variabilní, není překvapením, že byla tato cesta nalezena u většiny sledovaných cytochromů P450.

Ze všech pozorovaných cest ve struktuře cytochromu P450 byla cesta 2a určena jako energeticky nejvýhodnější. Simulační pokusy u CYP101 dokonce upozorňují i na možný vstup produktů 2a cestou. Vstup substrátů i výstup produktů touto cestou, by mohl být také umožněn u CYP2B4 (1PO5), jehož jedna krystalová struktura je široce otevřená.

2a cesta se nachází s výjimkou CYP51 u všech široce otevřených krystalových struktur. Pro některé polootevřené struktury stejně jako pro uzavřené struktury je tato cesta uzavřena. V těchto strukturách je i přes celkové uzavření struktury cesta 2a znatelná, což by potvrdilo její přítomnost v každém CYP.

U mikrosomálních CYP je ve srovnání s bakteriálními CYP vstup 2a cestou více hydrofobní (kolem F/G smyčky) a předpokládá se jeho zanoření do membrány. Kromě 2a cesty byly u membránově vázaných CYP mapovány i další potenciální cesty a to cesty 2c, 2e a cesta pro rozpouštědlo (viz. dále).

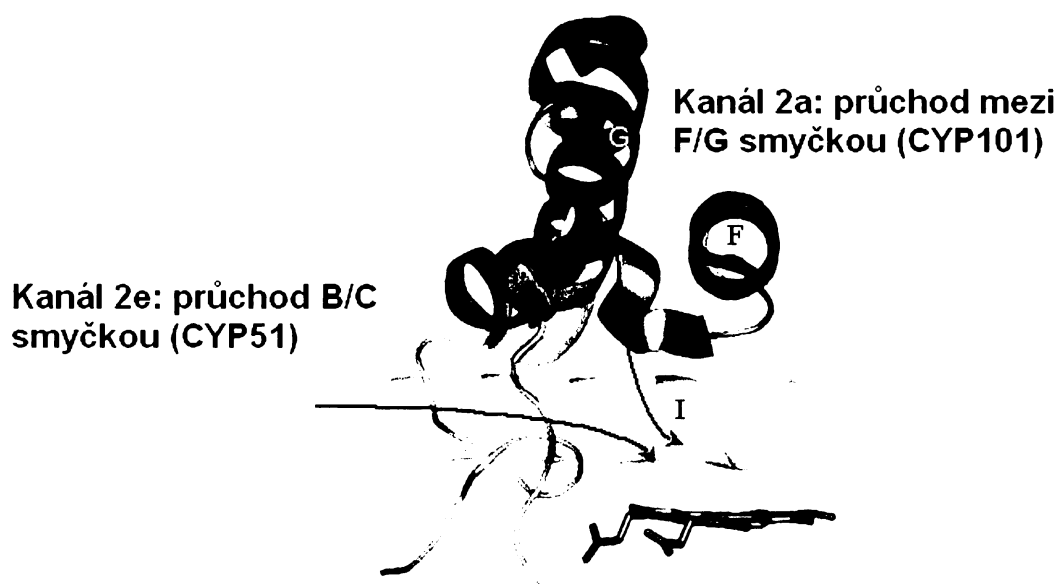
2b cesta byla lokalizována mezi B/B' smyčkou a β_1 , β_3 -strukturou. 2b cesta byla pozorována u CYP101 (obrázek 12) a u CYP107A1. Cesta 2b spolu s cestou 2d (viz dále) patří bohužel mezi nejméně blíže specifikované potenciální cesty k aktivním místům cytochromů P450.

2c cesta byla simulací definována jako trajektorie vedoucí z aktivního místa mezi G, I helixy a B' helixem B/C smyčky. Tato cesta je blíže popsána pro CYP 2C5 (viz. 8.5.2.).

2d cesta byla pozorována u CYP 102A1. Ligand mapovaný simulací procházel mezi N-koncem polypeptidového řetězce a helixem A. V literatuře bohužel není tato cesta blíže specifikována.

2e cesta byla definována jako průchod ligandu B/C smyčkou, podél I helixu až k aktivnímu centru cytochromů P450 (obrázek 14) CYP107A1, CYP51, CYP152A1, CYP2C5, CYP2B4 a CYP167A1. Velikost otvoru B/C smyčky se mezi cytochromy P450 liší, největší je u CYP51. Některé studie připisují význam 2e cestě, jako průchod molekuly vody a velkých substrátů (produktů) [Wade a spol., 2004].

Na následujícím obrázku jsou znázorněny nejčastější variabilní oblasti cytochromů P450 a naznačeny zatím nejlépe popsané přístupové cesty k aktivnímu místu.



Obrázek 14: Znázornění dvou potenciálních přístupových cest k aktivnímu místu CYP

Legenda: B/C smyčka je naznačena jako tenká oranžová smyčka, fialová barva znázorňuje F-G oblast převzato z [Scott a spol., 2002]

Cesta 3

Ligand touto cestou vychází mezi F a G helixy nebo E/F smyčkou. Tato cesta byla pozorována pouze u CYP101 (obrázek 12), ale rychlost průchodu ligandů se ukázala být téměř desetkrát pomalejší než u cesty 2a. Z tohoto důvodu a pro nedostatek informací není cesta 3 blíže specifikována.

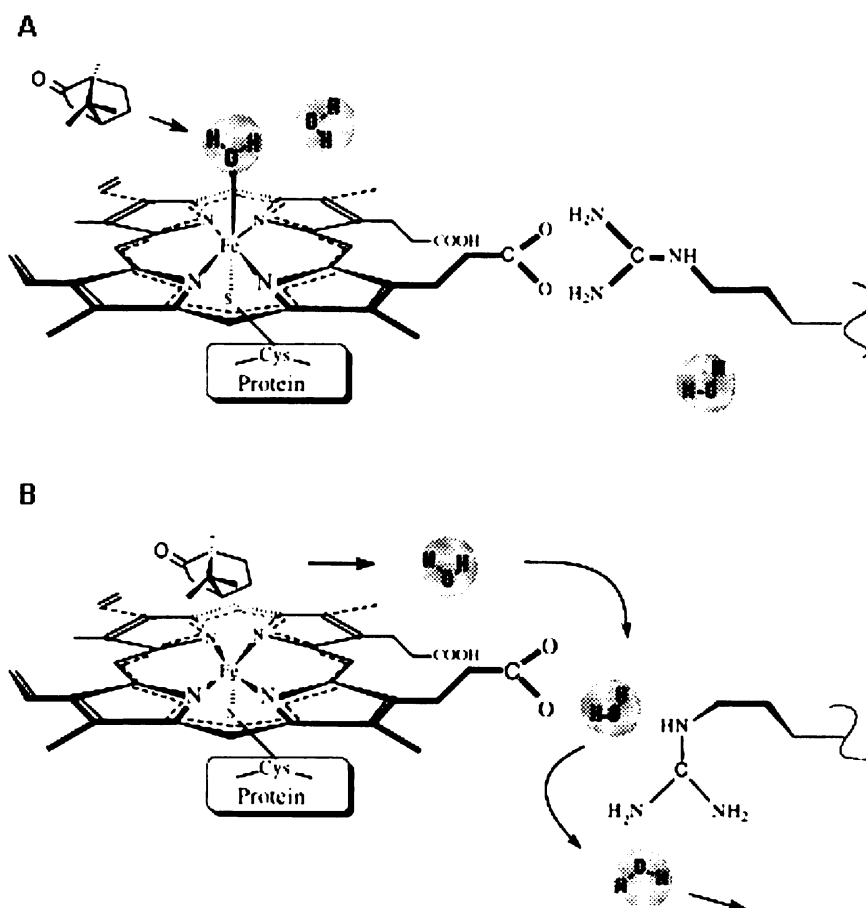
Cesta pro vodu

Pomocí simulace byla cesta pro vodu mapována jako průchod ligandu mezi F,G, I helixy a β_4 - strukturou. Jak již bylo několikrát řečeno, v aktivním centru CYP je bez přítomnosti substrátu navázána molekula vody. Pouze přítomnost substrátu indukuje přenos elektronů z reakčního partnera a vytlačení molekuly vody molekulou kyslíku. K objasnění děje výměny molekuly vody za molekulu kyslíku v aktivním centru CYP a naopak, byl navržen mechanismus. Tento mechanismus objasňuje, kam by molekula vody v přítomnosti substrátu mohla odcházet (nebo naopak po uvolnění produktu do aktivního centra zpět vstupovat) a uvolňovat tak místo molekule kyslíku.

U CYP101 byl pozorován vznik „cesty pro vodu“ (obrázek 15) jako změna konformace Arg-299 (který je za nepřítomnosti substrátu stabilizován solným můstkem s propionátem hemové skupiny).

Není vyloučeno, že touto cestou mohou vstupovat (vystupovat) substráty (produkty) či molekula kyslíku. Vznik cesty pro vodu lze předpokládat pro CYP101, CYP108, CYP102A1, CYP107A1, CYP2C5, CYP119, kde byla molekuly vody v aktivním místě potvrzena [Oprea a spol., 1997].

Některé studie předpokládají, že tato cesta slouží také pro dopravu a kontrolu vstupu protonů, které jsou do aktivního místa dopraveny prostřednictvím systému vodíkových vazeb zahrnující právě molekulu vody. Nicméně mechanismus tohoto děje je dosud objasněn [Ortiz de Montellano, 2005].



Obrázek 15: Mechanismus uvolnění molekuly vody z aktivního místa cytochromu P450

Legenda:

A) „cesta pro vodu“ je zavřená prostřednictvím solného můstku argininu s hemovým propionátem, substrát není přítomen v aktivním centru, molekula vody je vázána na hemové železo naproti Cys,

B) přítomnost substrátu v aktivním centru, rotace argininu a otevření kanálu a odchod molekuly vody touto cestou

převzato z [Oprea a spol., 1997]

Simulačně získané trajektorie jsou vlastně takovým souhrnem potenciálních kanálů, které by mohly být cytochromy P450 schopny otevírat. K objasnění do jaké míry takto definované trajektorie odpovídají skutečným kanálům, by mohly přispět cesty pozorované v krystalových strukturách (viz. tabulka 3).

8.5. Výskyt potenciálních kanálů mezi CYP

Výsledky mapování přístupových cest k aktivnímu místu CYP podporují přítomnost společného kanálu pro cytochromy P450, a to cestu 2a. Předpokládá se, že 2a cesta u některých CYP slouží pro vstup i výstup reaktantů [Lüdemann a spol., 2000; Prasad a spol., 2000]. Transport substrátů i produktů 2a cestou je nejpravděpodobnější pro bakteriální formy (obrázek 17(A), str. 52) [Schleinkofer a spol., 2005].

U mikrosomálních isoform CYP se předpokládá, že ústí 2a cesty reaguje s membránou a zprostředkovává tak vstup hydrofobních substrátů z membrány přímo k aktivnímu místu (obrázek 9, str. 34).

V následující tabulce 3 jsou podle klasifikace zařazeny cesty, vyskytující se v krystalových strukturách několika cytochromů P450. Z tabulky je zřetelné, že v porovnání s počtem simulačně mapovaných trajektorií, je jich v krystalových strukturách minimum pozorováno. Například v krystalové struktuře CYP101 je otevřena pouze cesta 2a, kdežto simulačně bylo identifikováno pět potenciálních cest 1, 2a, 2b, 2c a 3 (obrázek 12).

Tabulka 3: Přehled výskytu otevřených přístupových cest k aktivnímu místu krystalových strukturách cytochromů P450

Cytochrom P450	Rok zveřejnění v PDB	Cesta						cesta pro rozpouštědlo
		1	2a	2b	2c	2d	2e	
CYP101	1987		*					
CYP102A1	1993		*					*
CYP107A1	1995							
CYP108	1994		*					
CYP55A1	1997		*					
CYP167A1	2003		*				*	
CYP119	2000		*					*
CYP2C5	2000		*		*		*	*
CYP2B4	2003		*				*	

převzato z [Wade a spol., 2004]

Jak je zřetelné z předcházející tabulky, cesta 2a je přítomna kromě zavřené krystalové struktury CYP107A1 ve všech zmíněných krystalových strukturách. Na příkladu CYP107A1 je patrné, že samotná rentgenová krystalografie, nemůže v některých případech poskytnout žádné informace o existenci přístupových kanálech k aktivnímu místu. Pokud se však podaří připravit více druhů krystalových struktur (bez i se

substrátem) téhož enzymu, lze jejich porovnáním zjistit důležité konformační změny vyvolané vazbou substrátu do aktivního místa. Přítomnost některých otevřených kanálů vzhledem k podmínkám přípravy krystalových struktur, nemusí však vypovídat o skutečném výskytu kanálů v proteinové molekule.

Vzhledem k častému výskytu cesty 2a v cytochromech P450 bude následovat porovnání mechanismu průchodu substrátu touto cestou pro tři bakteriálních zástupce CYP. Výsledky získané srovnáváním zástupců CYP naznačují, že mechanismus a rozsah otevírání kanálů se mezi zástupci cytochromů P450 liší a je přizpůsoben fyzicko-chemickým vlastnostem substrátu.

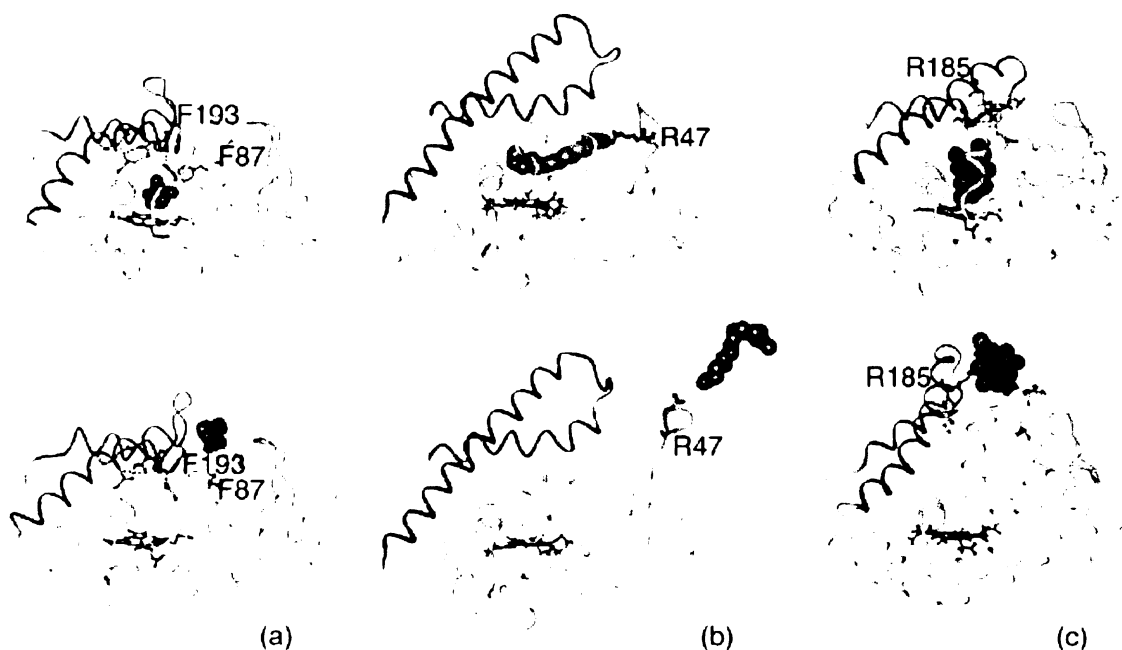
8.5.1. Srovnání mechanismů průchodu substrátů CYP101, CYP107A1 a CYP102A1 2a cestou

Cesta 2a je lokalizována mezi F/G smyčkou, β_1 -strukturou a B' helixem (CYP101, CYP102A1) nebo B/B'smyčkou (CYP107A1). Ačkoli je lokalizace 2a kanálu pro všechny tři proteiny přibližně shodná, mechanismus, jakým substráty opouštějí aktivní centrum se značně liší.

Rigidní, hydrofobní substrát CYP101 (kafr) vyžaduje pro svůj průchod pouze malý pohyb páteří polypeptidového řetězce (C' helixu spolu s konformační změnou F/G smyčky) spojený s mírnou rotací aromatických aminokyselinových zbytků Phe-87, Phe-193 a dočasným přerušením solných můstků mezi aminokyselinovými zbytky Asp-251...Arg-186, Asp-251...Lys178, Asp-97...Lys-197 (obrázek 16(a)).

Na rozdíl od kafru vyžaduje pro svůj průchod 2a cestou makrocyclický polární substrát CYP107A1 (6-deoxyerythronolid B) rozsáhlou konformační změnu. Otevření 2a cesty je zajištěno přerušením čtyř vodíkových vazeb jinak stabilizujících argininový zbytek (Arg-185), lokalizovaný na vnějším povrchu proteinu. Průchod substrátu indukují rotaci argininu a přeuspořádání F/G a B/B'smyčky (obrázek 16 (c)).

CYP102A1 využívá k přepravě substrátu (palmitové kyseliny) také argininový zbytek (Arg-47). Arg-47 je lokalizován na povrchu enzymu a pomáhá ke správnému zorientování záporného náboje substrátu do 2a cesty. Průchod ligandu je ve srovnání s CYP101 spojen s větší konformační změnou F/G smyčky a C', B' helixu (obrázek 16(b)) [Winn a spol., 2002].



Obrázek 16: Simulace výstupu substrátu z aktivního místa 2a cestou pro bakteriální zástupce cytochromů P450 (a) CYP101, (b) CYP102A1, (c) CYP107A1

Legenda: F a G helixy jsou spojeny F/G smyčkou a znázorněny modře; B/B'smyčka a B'helix jsou znázorněny žlutě a β_1 -struktura růžově; substráty(a-kafr, b-palmitová kyselina, c-6-deoxyerythronolid B) jsou znázorněny zelenými kuličkama; významné aminokyselinové zbytky CYP interagující se substráty jsou popsány

převzato z [Winn a spol., 2002]

Ze srovnání tří bakteriálních zástupců CYP je patrné, že celá problematika studia přístupových cest je mnohem složitější než by se dalo očekávat.

Jak bude zmíněno dále, pro některé bakteriální a savčí CYP není 2a cesta tak dominantní jako u výše uvedených zástupců.

Současné výsledky simulačních technik na homologním modelu CYP2B1 podpořené výsledky cílené mutagenese, však navrhují jinou cestu vstupu substrátů do aktivního místa, bez účasti F-G oblasti. V interakci se substráty se projevil velký význam hydrofobních aminokyselinových zbytků (Ile-290, Leu-293, Ser-294, Glu-286) N-koncové části I helixu. Existence těchto interakcí v CYP2B1 podporuje přítomnost podobného substrátového kanálu, který byl nalezen u CYP51 (2e cesta) [Scott, a spol., 2002].

Pro oba tyto cytochromy P450 byla cesta 2e pozorována otevřená současně se zavřenou cestou 2a. Mechanismus průchodu ligandů těmito kanály pravděpodobně

vyžaduje synchronizaci. Naopak u CYP2C5, CYP2B4 (viz. dále) a CYP167A1 byly pozorovány cesty 2a a 2e otevřeny zároveň [Wade a spol., 2004].

Po seznámení s problematikou mapování substrátových přístupových cest k aktivním místům rozpustných bakteriálních CYP, lze vzhledem rozdílné lokalizaci u membránově vázaných isoformů CYP očekávat více odlišné substrátové kanály.

Vysoce hydrofobní substráty savčích CYP přicházejí především z membrány a proto je zřejmé, že identifikace přístupových kanálů úzce souvisí s problematikou membránové topologie (viz.kapitola 6). Není ovšem vyloučeno, že membránové CYP přeměňují hydrofilní substráty, které čerpají z cytosolu. Pokud však u savčích CYP předpokládáme vstup substrátů z membrány, je pravděpodobné, že vzniklé hydrofilnější produkty budou odcházet jinou cestou než vstupují. Samozřejmě nelze vyloučit sorpci stále dosti hydrofobního produktu zpět do membrány.

8.5.2.Problematika mapování přístupových kanálů mikrosomálních CYP

Středem zájmu vědeckého bádání jsou samozřejmě především savčí membránové cytochromy P450, jejichž studium je bohužel ve srovnání s bakteriálními CYP díky membránovým doménám mnohem více omezeno.

Do současné doby bylo připraveno nejvíce savčích krystalových struktur pro CYP rodiny 2. Z tohoto důvodu jsou zástupci této rodiny dobrým cílem studia přístupových substrátových cest k aktivním místům membránově vázaných cytochromů P450. V následující podkapitolách je na základě krystalových struktur objasněna problematika substrátových kanálů pro CYP2C5 a CYP2B4.

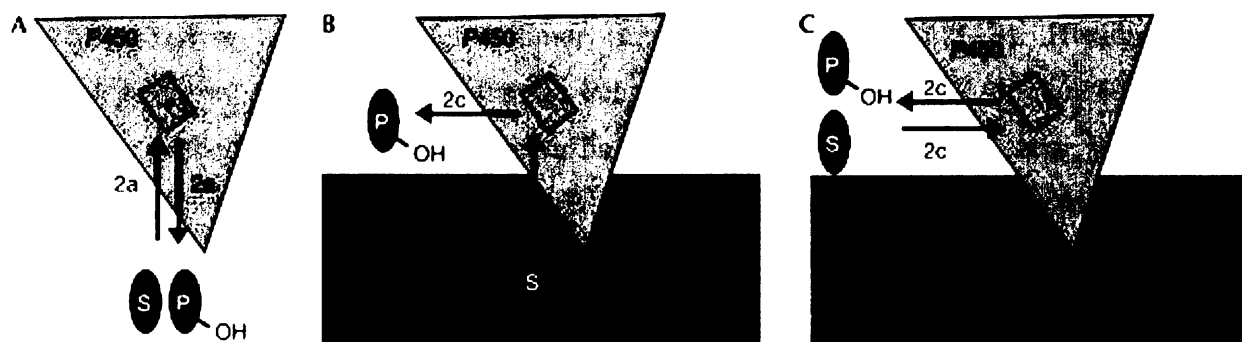
První savčí krystalová struktura CYP, která mohla být středem studia přístupových kanálů byla struktura CYP2C5/2C3. Krystalová struktura CYP byla připravena v komplexu s analogem substrátu (PDB kód:1N6B) [Wester a spol., 2003] a bez něj (PDB kód: 1DT6) [Williams a spol., 2000(49)]. Krystal CYP2C5/2C3 má kromě odstraněné hydrofobní N-koncové sekvence, nahrazeny vnitřní hydrofobní oblastí F/G smyčky hydrofilnějšími sekvencemi příbuzného enzymu CYP2C3. V krystalových strukturách byly simulací identifikovány čtyři potenciální kanály 2a, 2c, 2e a cesta pro rozpouštědlo [Wade a spol., 2004].

Krystalová struktura CYP2C5/2C3 bez substrátu podporuje jako nejpravděpodobnější kanál pro výstup ligandů cestu 2c.

Jelikož předpokládáme interakci CYP2C5 s membránou, byly v závislosti na lokalizaci substrátu navrženy dva možné způsoby průchodu ligandů uvnitř proteinové molekuly CYP (obrázek 17) [Schleinkofer a spol., 2005].

První způsob předpokládá vstup hydrofobních substrátů z membrány k aktivnímu místu cestou 2a a výstup hydrofilního produktu cestou 2c. Druhý způsob umožňuje vstup i výstup hydrofilních reaktantů stejnou cestou 2c. Oba návrhy jsou schématicky znázorněny na obrázku 17 (B, C).

Otevření či zavření 2c cesty je závislé na interakci B/C smyčky a helixu G, stejně jako na plasticitě B/C smyčky. Výstup substrátu cestou 2c vyžaduje přerušování vodíkové vazby mezi postraními řetězci aminokyselin B helixu B/C smyčky (Lys-241 a Val-106), která při otevření této cesty nebyla pozorována [Wester a spol, 2003]. Podobná lokalizace vodíkové vazby a tedy i potenciální kanál, byl pozorován v krystalové struktuře CYP2C8 [Schoch a spol., 2004].



Obrázek 17: Schématické znázornění možných cest vstupu substrátu a výstupu produktu z aktivního místa bakteriálních cytochromů P450 (A) a CYP2C5 (B,C)

Legenda: (A) cesta 2a slouží u bakteriálních CYP ke vstupu i výstupu ligandů; (B) jeden možný způsob uspořádání kanálů v membránovém CYP2C5: hydrofobní substráty vstupují do aktivního místa z membrány 2a cestou, produkty vystupují 2c cestou do cytosolu; (C) druhý možný způsob CYP2C5: hydrofilní substráty vstupují i vystupují do cytosolu cestou 2c; (P) produkt; (S) substrát; aktivní místo je znázorněno oranžovým obdélníkem; P450-cytochrom P450; CYP2C5 reaguje s membránou N-terminální kotvou (není vidět) a oblastí kolem F/G smyčky

převzato z [Schleinkofer a spol., 2005]

V současné době jsou k dispozici v PDB tři krystalové struktury králičího CYP2B4 (1PO5, 1SUO, 2BDM), které jdou dále více popsány jako vhodné objekty mapování problematiky přístupových cest savčích cytochromů P450.

Vzhledem k malému počtu lidských krystalů CYP a velké sekvenční homologii s lidským CYP2B6 je králičí CYP2B4 také vhodným předmětem studia membránové topologie cytochromů P450.

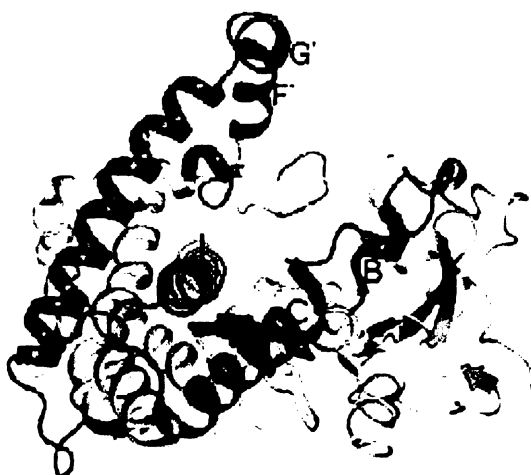
8.5.3. Krystalové struktury CYP2B4

Struktura králičího CYP2B4 patří mezi jednu z nejvíce prozkoumaných struktur mikrosomální CYP. K přípravě krystalové struktury CYP2B4 narozdíl od většiny ostatních membránových CYP, nebylo zapotřebí mutací F/G oblastí, proto je tedy dobrým objektem pro studium membránové topologie. V proteinové databance jsou v současné době k dispozici tři krystalové struktury CYP2B4: jedna bez substrátu (1PO5) a dvě s inhibitory v aktivním centru (1SUO, 2BDM).

Nečekaným objevem při přípravě první krystalové struktury CYP2B4 (1PO5) bylo, že tento enzym krystalizuje jako dimer (molekula A + molekula B). Histidinový aminokyselinový zbytek (His-226) mezi helixy F a G v molekule A se začleňuje do aktivního místa molekuly B, vzniká tak vazba mezi His-226 a hemovým železem. Vazba je symetrická, protože His-226 molekuly B reaguje s Fe molekuly A. Toto uspořádání vyžaduje hluboké zanoření oblasti F', G' helixu jednoho monomeru do široce otevřené oblasti (rozsedlina) druhého monomeru. Dimerizace CYP je způsobena úpravami proteinových molekul před krystalizací a měla by proto být dalším hlediskem při posuzování a interpretaci výsledků krystalových struktur. Příkladem různého chování upravených strukturních oblastí CYP je G' helix, který je v přirozeném prostředí CYP zanořen do membrány, ale v dimeru interaguje s rozsedlinou druhé molekuly [Scott a spol., 2003].

Porovnání následujících tří krystalových struktur a homologního modelu CYP2B4 je zaměřeno na variabilní oblasti vytvářející přístupové substrátové kanály. Tyto oblasti u jednotlivých struktur CYP2B4 vypovídají o velkém rozsahu konformačních změn, jakým jsou CYP metabolizující xenobiotika schopny. Vzhledem k primárnímu zdroji strukturních informací (krystaly), nemusí pozorované konformační změny zdaleka odpovídat skutečnosti.

Krystalová struktura CYP2B4 bez substrátu (PDB kód: 1PO5)



Obrázek 18: Krystalová struktura CYP2B4 bez substrátu (1PO5)

Legenda: variabilní oblasti enzymu jsou zvýrazněny zeleně, hem červeně
převzato z [Zhao a spol., 2006]

První krystalová struktura CYP2B4 byla připravena bez substrátu (PDB kód 1PO5) a je definována jako široce otevřená [Scott a spol., 2003]. Tato široce otevřená struktura CYP2B4 by mohla odpovídat rozsáhlé konformační změně, které jsou CYP metabolizující xenobiotika zřejmě schopny.

Krystalová struktura enzymu se vyznačuje širokou rozsedlinou mezi proteinovým povrchem a hemovým železem. Otevření je primárně tvořeno na jedné straně z F, F', G', G helixy a na straně druhé B'/C smyčkou a helixem C (obrázek 18).

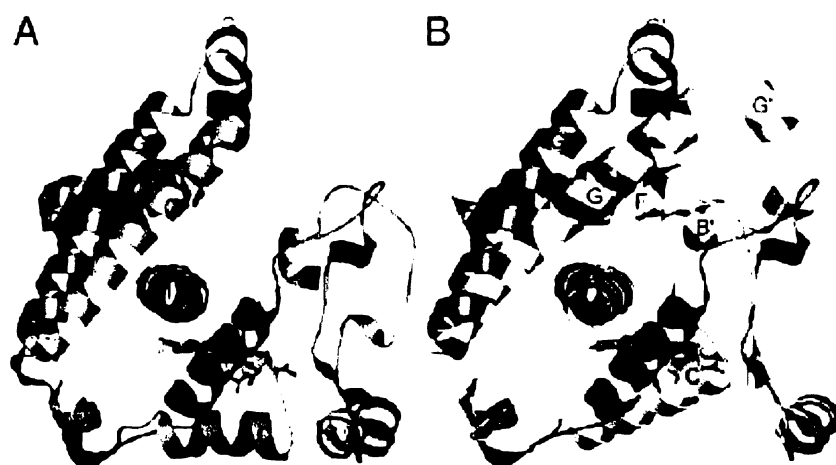
Strukturní uspořádání CYP2B4 (1PO5) se mezi savčími krystalovými strukturami CYP nejvíce podobá CYP2C5/2C3 (1N6B), od které se liší pouze v jednom kvadrantu, obsahujícím právě zmíněnou rozsedlinu. Velmi podobná otevřená struktura, jako u CYP2B4 byla pozorována pro bakteriální CYP 154C1 z *Streptomyces coelicolor* (obrázku 19(A)). U obou těchto struktur daná rozsedlina vznikla disociací vazby mezi oblastmi B' a G helixu. Na rozdíl od bakteriálního CYP, obsahují CYP2C5 a CYP2B4 mezi F a G helixy stejné sekundární motivy (F', G'). Srovnání variabilní oblastí obou savčích CYP je znázorněno na obrázku 19(B).

Oblasti F' a G' helixu CYP2B4 jsou ve srovnání s CYP2C5 více vzdáleny od helixu B' a hemové skupiny. Tyto oblasti v CYP2C5 na rozdíl v CYP2B4 reagují s B' helixem a tvoří „strop“ aktivního místa. Dalšími evidentními rozdíly mezi těmito krystalovými

strukturami je poloha G helixu, který je v CYP2B4 ve větší vzdálenosti od hemu a větší zahnutí I helixu (větší ohyb I helixu než u CYP2B4 byl pozorován pouze u CYP51) [Scott a spol., 2003].

Aktivní místo CYP2C5 je v závislosti na přítomnosti ligandu zcela izolované nebo komunikuje s rozpouštědlem velmi úzkým kanálem. Krystalové struktury CYP2B4 a CYP2C5 proto představují dva extrémní případy otevřené a zavřené struktury. Srovnání CYP2C5 a CYP 2B4 je znázorněno na obrázku 19(B).

Široce otevřená struktura CYP2B4 upozorňuje na velkou pružnost oblastí F-G a B'/C smyčky, které by mohly umožňovat vstup substrátů 2a a 2e cestou.



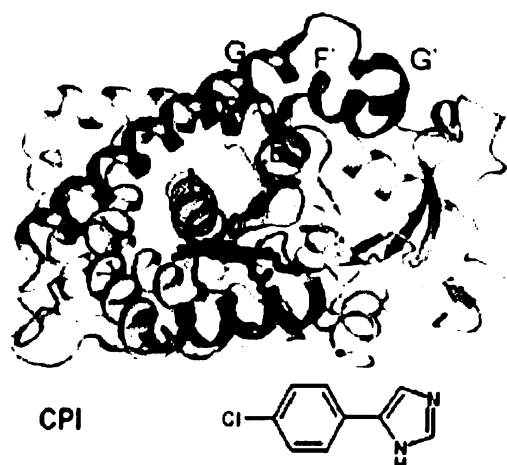
Obrázek 19: Srovnání krystalových struktur CYP2B4: (A) s bakteriálním CYP154C1 (PDB ID 1GWI); (B) s CYP2C5 (1N6B)

Legenda: (A) zelená barva CYP2B4 a modrá struktura CYP154C1 (B) zelená barva CYP2B4 a žlutá CYP2C5; variabilní oblasti helixy B, B', C, D, F, F', G, G'

převzato z [Scott a spol., 2003]

Nicméně výsledky cílené mutagenese rodiny CYP2B, CYP2C5 a bakteriálních CYP podporují existenci uzavřené struktury CYP2B4 (1SUO, 2BDM), která by byla výhodnější pro vazbu redoxního partnera a přeměnu substrátu [Scott a spol., 2003].

Krystalová struktura CYP2B4/CPI (PDB kód: 1SUO)



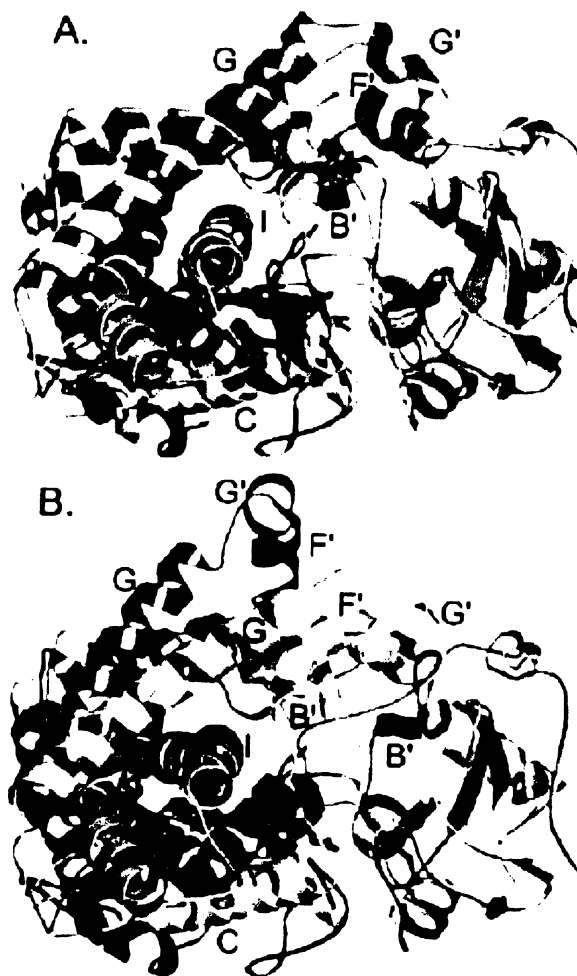
Obrázek 20: Krystalová struktura CYP2B4 (1SUO) a vzorec inhibitoru CPI

Legenda: variabilní oblasti jsou popsány a znázorněny hnědě, inhibitor CPI zeleně a hem červeně; převzato z [Zhao a spol., 2006]

Jelikož dimerizace CYP2B4 znemožňuje zkoumání strukturálních změn při navázání ligandu do jeho aktivního místa, byl His-226 zaměněn tyrosinem. Modifikovaný enzym byl krystalizován v komplexu se specifickým inhibitorem 4-(4-chlorofenyl)imidazol (CPI z angl. „4-(4-chlorophenyl)imidazol“) [Zhao a spol., 2006].

Získaná zavřená krystalová struktura CYP2B4 (1SUO) (obrázek 20) se významně liší od předešlé otevřené struktury CYP2B4 (1PO5). Nejvýraznější změnou mezi zmíněnými strukturami CYP2B4 je lokalizace F-G oblasti. Celkové strukturální uspořádání CYP2B4/CPI je více podobné krystalovým strukturám CYP2C5, CYP2C8 (obrázek 21(A)) a CYP2C9, než předchozí otevřené krystalové struktury CYP2B4.

Inhibitor je v této struktuře těsně navázán do aktivního místa, bez jakékoli známky existence kanálu. F-G oblast CYP2B4/CPI na rozdíl od předešlé struktury CYP2B4 (1PO5), tvoří „strop“ aktivního místa, prostřednictvím interakce s N- koncovou částí B'/C smyčky, N-koncem I helixu a β_4 -struktury. Tyto čtyři zmíněné sekundární motivy struktury tvoří největší rozdíl mezi dvěma zmíněnými krystalovými strukturami CYP2B4 (obrázek 21(B)).



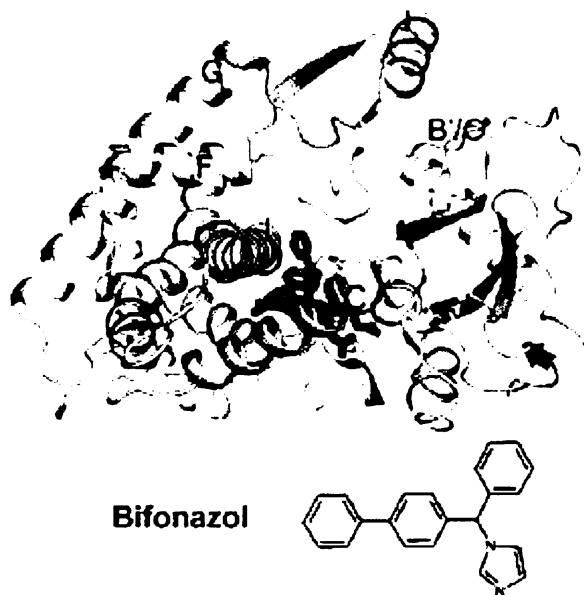
Obrázek 21: Srovnání krystalové struktury komplexu CYP2B4/CPI (žlutá barva): (A) s CYP2C8 (zelená barva), (B) s otevřenou strukturou CYP2B4 (1PO5) (modrá barva);

převzato z [Scott, a spol., 2004]

Tato krystalová struktura je z připravených struktur CYP2B4 nejzavřenější. Uzavření kanálu po navázání inhibitoru do aktivního místa bylo popsáno jako přiblížení B'/C smyčky a N-konce I helixu k inhibitoru a uzavření aktivního místa F-G oblastí [Scott, a spol., 2004].

Strukturní rozdíly mezi otevřenou a zavřenou konformací CYP2B4 částečně vypovídají o schopnosti velké konformační změny CYP metabolizující xenobiotika.

Krystalová struktura CYP2B4/bifonazol (PDB kód: 2BDM)



Obrázek 22: Krystalová struktura CYP2B4/bifonazol (2BDM) a vzorec inhibitoru

Legenda: variabilní oblasti struktury (B'/C, C, F, F', G) jsou popsány a znázorněny žlutě, inhibitor bifonazol zeleně a hem červeně;

převzato z [Zhao a spol., 2006]

Nejnovější a v pořadí třetí krystalová struktura CYP2B4 byla připravena v komplexu inhibitorem bifonazolem (obrázek 22) [Zhao a spol., 2006]. Co se týká otevření krystalové struktury je tato CYP2B4/bifonazol „kompromisem“ mezi ostatními zmíněnými strukturami CYP2B4 (1PO5 a 1SUO). Překvapivě se tato struktura výrazně liší od předcházející struktury připravené také s inhibitorem (1SUO). Částečný důvod většího otevření struktury CYP2B4/bifonazol ve srovnání s krystalovou strukturou CYP2B4/CPI, může být velikost inhibitoru.

Homologní model CYP2B4

Další informace o potenciálních přístupových kanálech CYP2B4 poskytují, kromě zmíněných krystalových struktur, homologní modely. Homologní model CYP2B4 byl připraven na základě krystalografické struktury CYP2C5/2C3 a bakteriálních CYP. Homologní model ve srovnání s krystalovou strukturou CYP2B4 (1PO5), představuje zavřenou strukturu (obrázek 23).

Strukturní oblasti modelu, které odpovídají F, F' a G' helixům v krystalové struktuře, zaujímají oblast bez pravidelné struktury [Hodek a spol., 2004]. Srovnání zavřené struktury homologního modelu a široce otevřené krystalové struktury je znázorněno na následujícím obrázku.



Obrázek 23: Srovnání homologního modelu a krystalové struktury (1PO5) CYP2B4

Legenda: α -helixy jsou znázorněny červeně, β -struktury žlutě a náhodně uspořádaný polypeptidový řetězec zeleně, hem modře
převzato z [Hodek a spol., 2004]

Model CYP2B4 byl validován prostřednictvím metody fotoafinitního značení (viz. kapitola 4). Dlouhá reaktivní sonda se prostřednictvím své aminokupiny ligandově navázala na hemové železo a označila aminokyselinové zbytky Asp-105, Val-477 a Arg-197 (obrázek 24). Arginin 197 interagoval se sondou u povrchu proteinové molekuly enzymu. Sonda svou vhodnou délkou dosahuje z aktivního místa až k povrchu molekuly CYP2B4 a umožnila mapovat potenciální kanál pro substráty. Homologní model potvrdil přítomnost Arg-197, lokalizovaného na povrchu CYP2B4 a tím potvrdil spolehlivost homologního modelu.

Kanál, v kterém byla sonda nalezena, je tvořen hydrofobními aminokyselinovými zbytky (Phe-195, Leu-196, Arg-197, Leu-198, Leu-199) a je téměř kolmý k helixu I. Z jedné strany je tento kanál ohraničen Val-477, lokalizovaným na tzv. " β -hairpin". Hydrofobní oblasti by mohly sloužit k rozeznávání a ke správné orientaci substrátu. Dolní část mapovaného kanálu (Val-477, Phe-297, Ile-101) pravděpodobně k vazbě substrátu.

Klasifikace kanálu CYP2B4 mapovaného prostřednictvím fotoafinitní sondy je vzhledem dlouhé oblasti náhodné struktury homologního modelu těžké. Nejvíce pravděpodobně odpovídá cestě 2a (obrázek 24).

Homologní model CYP se tedy v tomto případě ukázal být velmi spolehlivý.



Obrázek 24: Přístupový kanál CYP2B4 mapovaný prostřednictvím fotoafinitní sondy

Legenda: sonda je znázorněna na pravém obrázku zeleně a interaguje ligandově s hemovým železem a s aminokyselinovými zbytky Asp-105, Arg-197, Val-477
pravý obrázek převzat z [Hodek]

Homologní model je vhodný nejen k identifikaci aminokyselinových zbytků tvořících katalytické místo a přístupový substrátový kanál, ale také k porovnání krystalových struktur a k návrhu specifického inhibitoru.

Zhodnocení jednotlivých struktur a potenciálních přístupových kanálů CYP2B4

Za nejméně vhodnou krystalovou strukturu pro studium mapování kanálů CYP lze považovat CYP2B4 (1PO5), která byla získána jako dimer. Široké otevření této struktury mezi oblastmi F/G a B'/C smyčky by umožňovalo velmi snadný vstup substrátů přímo do aktivního centra a byla by tak narušena substrátová specifita enzymu. Lokalizace tohoto otevření nejvíce odpovídá klasifikované 2a cestě. Tato přístupová cesta je však v rozporu s experimenty cílené mutagenese u dalšího zástupce 2B rodiny CYP2B1. Výsledky této metody překvapivě upřednostňují v interakci se substráty roli I helixu a tedy přístupový

kanál podobný jako byl nalezen u CYP51, tedy 2e. Výsledky cílené mutagenese upozornují na nevýhody krystalových struktur membránových CYP.

Krystalové struktury CYP2B4 s navázanými inhibitory obsahují překvapivě také výrazné strukturní odlišnosti. Ve struktuře 2BDM je mezi F, G helixy pouze helix F', kdežto v krystalové struktuře 1SUO helixy F' a G'. V homologním modelu CYP2B4 je dokonce tato oblast bez pravidelného uspořádání.

Hlavním strukturním rozdílem mezi všemi krystalovými strukturami CYP2B4 jsou oblasti F-G, B'/C smyčky, C helixu a N- koncové části I helixu. Odlišná konformace těchto oblastí proteinové molekuly enzymu podporuje možný průchod substrátů cestou 2a a 2e.

Podle všeho jsou však oblasti F-G helixů a B'/C smyčky savčích CYP zanořeny do membrány a prostřednictvím svých intramolekulárních vazeb umožňují vstup hydrofobních substrátů k aktivnímu místu CYP2B4 (2a nebo 2e cestou), proto musí mít významný vliv na plasticitu těchto oblastí a transport substrátů k aktivnímu místu i dynamický stav membrány. Proto krystalové struktury i homologní model (vytvořen na základě krystalových struktur) nesmí být přeceňován.

9. Problematika studia přístupových kanálů CYP a budoucnost

Cytochromy P450 se účastní kromě metabolismu endogenních látek také detoxikačních reakcí xenobiotik, aktivace léčiv a potenciálně nebezpečných prokarcinogenů. Uvedené příklady dokládají jakou rozmanitou roli hrají cytochromy P450 v lidském zdraví. Abychom mohli porozumět funkci těchto enzymů je nezbytné poznat jejich struktury. V současné době je determinace struktur cytochromů P450 závislá na metodě rentgenové krystalografie, která má jistá omezení znemožňující odhalení celé terciární struktury savčích CYP. Jedna z nevýhod této metody je možnost studia proteinu pouze ve stavu krystalu, nelze tedy zachytit pohyb proteinové molekuly. Spolehlivost získaných informací je tedy závislá na kvalitě připraveného krystalu. Největším omezení při studiu cytochromů P450 je příprava membránového proteinu, který se dosud nepodařil získat. Z tohoto důvodu nelze celkovou 3D strukturu savčích cytochromů P450 popsat.

Aby vůbec mohl být membránový CYP krystalizován, musí se velmi výrazně upravit. Nejdříve je N-koncová aminokyselinová sekvence peptidového řetězce enzymu zkrácena o tzv. transmembránovou kotvu. Odstranění N-koncové domény navíc u některých cytochromů P450 způsobují jejich dimerizaci. V dnešní době se cytochromy P450 připravují především expresí v bakteriích, které vyžadují modifikaci některých aminokyselin enzymu. Pro snadnou izolaci jsou navíc na C-konec peptidového řetězce přidány čtyři histidiny.

Jakákoli změna primární struktury proteinu se samozřejmě musí nějakým způsobem odrazit v jeho terciární struktuře, resp. ve funkci proteinu. Zatím jsou však takto pozměněné krystaly primárním zdrojem informací o trojrozměrné struktuře membránových cytochromů P450. Příkladem, který by mohl varovat před přeceňováním strukturních informací, získaných rentgenovou krystalografií membránových proteinů, jsou výše zmíněné krystalé struktury CYP2B4 (kapitola 8.5.3.).

Studium struktury savčích CYP je tedy velmi závislé na rozpustných bakteriálních cytochomech, které se podařilo krystalizovat a jejich struktura je známa.

I přes velké množství získaných informací o cytochomech P450 stále nemáme odpověď na základní otázky: jakým způsobem jsou savčí CYP zanořeny do membrány, kudy a jakým mechanismem je umožněn vstup (výstup) substrátů (produktů) do skrytého

aktivního místa cytochromů P450. Vstupují substráty cytochromů P450 stejným přístupovým kanálem, kterým produkty odcházejí, používají CYP stejný kanál pro různé substráty?

Právě odhalení míst proteinové molekuly cytochromu P450, které zprostředkovávají rozpoznání substrátu, otevření kanálu a transport substrátu do aktivního místa, může v budoucnosti pomoci při cílené konstrukci léčiv či navržení specifických inhibitorů cytochromů P450.

Problematika mapování přístupových substrátových cest k aktivním místům cytochromů P450, je závislá na kvalitě krystalů proteinů, u kterých se často mylně předpokládá stejné chování proteinu jako v roztoku. Proto determinace oblastí enzymu v krystalové struktuře cytochromu P450, které jsou schopny konformačních změn a tedy i otevření potenciálního přístupového kanálu do nitra CYP, nemusí odpovídat skutečnosti.

Velmi slibnou metodou, která by mohla v budoucnosti odpovědět na všechny výše zmíněné otázky, je nukleární magnetická rezonance. Tato metoda umožňuje zkoumat proteiny v jejich přirozeném prostředí, zachytit jejich molekulární dynamiku a mezimolekulové interakce. Oproti rentgenostrukturní analýze však zatím tato metoda neposkytuje zatím takové přesnosti a rozlišení.

10. Seznam literatury

- Antonovič, L., Hodek, P., Smrček, S., Novák, P., Šulc, M., Strobel, H.: Arch. Biochem. Biophys. 370, 208-215 (1999)
- Backes, W.L., Kelley, R.W.: Pharmacol. Ther. 98, 221-233 (2003)
- Bernhardt, R., Kraft, R., Ruckpaul, K.: Biochem. Int. 17 (6), 1143 (1988)
- Brown, C.A., Black, S.D.: J. Biol. Chem. 264, 4442-4449 (1989)
- Coon, M. J., Ding, X.X., Pernecky, S.J., Vaz, A.D.: FASEB J. 6, 669-673 (1992)
- Cosme, J., Johnson, E. F.: J. Biol. Chem. 275, 2545-2553 (2000)
- Cupp-Vickery, J.R., Poulos, T.L.: Nat. Struct. Biol. 2, 144-153 (1995)
- Dai, R., Pincus, M.R., Friedman, F.K.: J. Protein. Chem. 17, 121-129 (1998)
- Degtyarenko, K.N.: Prot. Eng. 8, 737-747 (1995)
- Deng, H., Wu, J., So, S.P., Ruan, K.H.: Biochemistry 42, 5609-5617 (2003)
- Denisov, I.G., Markis, T.M., Sligar, S.G., Schlichting, I.: Chem. Rev. 105, 2253-2277 (2005)
- DuBois, R.N., Simpson, E.R., Tuckey, J., Lambeth, J.D., Waterman, M.R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1028-1032 (1981)
- Furuya, H., Shimizu, T., Hirano, K., Hatano, M., Fujii-Kuriyama, Y.: Biochemistry 28, 6848 (1989)
- Gao, Q., Doneanu, C.E., Shaffer, S.A., Adman, E.T., Goodlett, D.R., Nelson, S.D.: J. Biol. Chem. 281, 20404-20417 (2006)
- Gotoh, O.: J. Biol. Chem. 267, 83-90 (1992)
- Graham, S.E., Peterson, J.A.: Arch. Biochem. Biophys. 369, 24-29 (1999)
- Guengerich, F.P.: Chem. Res. Toxicol. 3, 363-371 (1990)
- Guengerich, F.P.: J. Biol. Chem. 266, 10019-10022 (1991)
- Hasermann, C.A., Ravichandran, K.G., Peterson, J.A., Deisenhofer, J.: J. Mol. Biol. 236, 1169-1185 (1994)
- Headlam, M.J., Wilce, M.C., Tuckey, R.C.: Biochim. Biophys. Acta 1617, 96-108 (2003)
- Hlavica, P., Schulze, J., Lewis, D.F.V.: J Inorg Biochem 96, 279-297 (2003)
- Hodek, P., Sopko, B., Antonovič, L., Šulc, M., Novák, P.: Gen. Physiol. Biophys. 23, 467-488 (2004)

Hodek, P.: Osobní sdělení

Chang, Y.T., Stiffelman, O.B., Loew, G.H.: *Biochimie* 78, 771-779 (1996)

Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M.: *Chem. Listy* 95, 212-222 (2001)

Iyanagi, T.: *Biochem. Biophys. Res. Com.* 338, 520-528 (2005)

Izumi, S., Kaneko, H., Yamazaki, T., Hirata, T., Kominami, S.: *Biochemistry* 42, 14663-14669 (2003)

Johnson, E.F., Stout, C.D.: *Biochem Biophys Res Commun* 338, 331-336 (2005)

Klingenberg, N.: *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376-386, (1958)

Kubíčková, B., Hodek, P.: *Chem. listy* 95, 359-364 (2001)

Kunz, B.C., Vergeres, G., Winterhalter, K.H., Richter, C.: *Biochim. Biophys. Acta* 1063, 226-234 (1991)

Lewis, D.F.V., Hlavica, P.: *Biochim. Biophys. Acta* 1460, 353-374 (2000)

Loew, G.H., Harris, D.L.: *Chem. Rev.* 100, 407-419 (2000)

Lüdemann, S.K., Lounnas, V., Wade, R.C., *J Mol. Biol.* 303, 797-811 (2000)

Mestres, J.: *Protein* 58, 596-609, (2005)

Nagano, S., Li, H., Shimizu, H., Nishida, C., Ogura, H., Ortiz de Montellano, P.R., Poulos, T.L.: *J.Biol.Chem.* 278, 44886-44893 (2003)

Nelson, D. R., Strobel, H. W.: *Biol. Chem.* 263, 6038-6050 (1988)

Ogishima, T., Okada, Y., Omura, T.: *J. Biochem.* 98, 781-791 (1985)

Oprea, T.I., Hummer, G., García, A.E.: *Biochemistry* 94, 3133-2138 (1997)

Ortiz de Montellano, P.R. (ed), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, (3. ed.), Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York (2005)

Park, S. Y., Shimizu, H., Adachi, S., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nakahara, K., Shoun, H., Obayashi, E., Nakamura, H., Iizuka, T., Shiro, Y.: *Nat. Struct. Biol.* 4, 827-832 (1997)

Peterson, J.A., Sevrioukova, I., Truan, G., Graham-Lorence, E.: *Steroids* 62, 117-123 (1997)

Porter, T.D., Coon, M.J.: *J. Biol. Chem.* 266, 13469-13472 (1991)

Poulos, T.L., Finzel, B.C., Howard, A.J.: *J. Mol. Biol.* 195, 687-700 (1987)

Prasad, S., Mazumdar, S., Mitra, S.: *FEBS Lett.* 477, 157-160 (2000)

Ravichandran, K.G., Boddupalli, S.S., Hasermann, C.A., Peterson, J.A., Deisenhofer, J.: *Science* 261, 731-736 (1993)

- Roberts, G.A., Grogan, G., Greter, A., Flitsch, S.L., Turner, N.J.: *Journal of Bacteriology* 184, 3898-3908 (2002)
- Rowland, P., Blaney, F.E., Smyth, M.G., Jones, J.J., Leydon, V.R., Oxbrow, A.K., Lewis, C.J., Tennant, M.G., Modi, S., Eggleston, D.S., Chenery, R.J., Bridges, A.M.: *J.Biol. Chem.* 281, 7614-7622 (2006)
- Scott, E.E., He, Y.Q., Halpert, J.R.: *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1407-1413 (2002)
- Scott, E.E., Liu, H., He, Y.Q., Li, W., Halpert, J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 423, 266-276 (2004)
- Scott, E.E., White, M.A., He, Y.A., Johnson, E.F., Stout, C.D., Halpert, J.R.: *J. Biol. Chem.* 279, 27294-27301 (2004)
- Scott, E.E., He, Y.A., Wester, M.R., White, M.A., Chin, Ch.C., Halpert, J.R., Johnson, E.F., Stout, C.D.: *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13196-13201 (2003)
- Schleinkofer, K., Sudarko, Winn, P.J., Lüdemann, S.K., Wade, R.C.: *EMBO Reports* 6, 584-589 (2005)
- Schoch, G.A., Yano, J.K., Wester, M.R., Griffin, K.J., Stout, C.D., Johnson, E.F.: *J. Biol. Chem* 279, 9497-9503 (2004)
- Schoch, G.A., Yano, J.K., Wester, M.R., Griffin, K.J., Stout, C.D., Johnson, E.F.: *J. Biol. Chem.* 279, 9497-9503 (2004)
- Spatzenegger, M., Jaeger, W.: *Drug. Metab.* 27, 397-417 (1995)
- Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: *Chem. listy* 93, 229-237 (1999)
- Szczesna-Skorupa, E., Browne, N., Mead, D., Kemper, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 738 (1988)
- Szklarz, G.D., Halpert, J.R.: *Life Sciences* 61, 2507-2520 (1997)
- Šípal, Z., Anzenbacher, P., Peč, P., Pospíšil, J., Růžička, I.: *Biokatalýza, v knize Biochemie, SPNP, ISBN 80-04-21736-2, str.135-208* (1992)
- Taniguchi, H., Pyerin, W.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 114, 335-340 (1988)
- Uvarov, V.Y., Sotnichenko, A.I., Vodovozova, E.L., Molotkovsky, J.G., Kolesanova, E.F., Lyulkin, Y.A., Stier, A., Kruege, V., Archakov, A.I.: *J. Biochem.* 222, 483-489 (1994)
- Vergeres, G., Winterhalter, K.H., Richter, C.: *Biochemistry* 28, 3650-3655 (1989)
- Vergeres, G., Winterhalter, K.H., Richter, C.: *Biochim. Biophys. Acta* 1063, 235-241 (1991)
- Wade, R.C., Motjejunas, D., Schleinkofer, K., Sudarco, Winn, P.J., Banerjee, A., Kariakin, A., Jung, Ch.: *Biochim. Biophys. Acta* 1754, 239-244 (2005)

Wade, R.C., Winn, P.J., Schlichting, I., Sudarko: *J. Inorg. Biochem.* 98, 1175-1182 (2004)

Wester, M.R., Johnson, E.F., Marques-Soares, C., Dansette, P.M., Mansuy, D., Stout, C.D.: *Biochemistry* 42, 6370-6379 (2003)

Wester, M.R.,Yano, J.K., Schoch, G.A., Yang, C., Griffin, K.J., Stout, C.D., Johnson, E.F.: *J.Biol. Chem.* 279, 35630-35637 (2004)

Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E.F., McRee, D.E.: *Mol Cell* 5, 121-131 (2000)

Williams, P.A., Cosme, J., Vinkovic, D.M., Ward, A., Angove, H.C., Day, P.J., Vonnrhein, C., Tickle, I.J., Jhoti, H.: *Science* 305, 683 (2004)

Williams, P.A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H.C., Matak Vinkovic, D., Jhoti, H.: *Nature* 424, 464 (2003)

Winn, P.J., Lüdemann, S.K., Gauges, R., Lounnas, V., Wade, R.C.: *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5361-5366 (2002)

Yamazaki, H., Shimada, T., Martin, M.V., Guengerich, F.P.: *J. Biol. Chem.* 267, 30885 (2001)

Yano, J.K., Hsu, M.H., Griffin, K.J., Stout, C.D., Johnson, E.F. : *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 822-833 (2005)

Yano, J.K., Koo, L.S., Schuller, D.J., Li, H., Ortiz de Montellano, P.R., Poulos, T.L.: *J. Biol. Chem.* 275, 31086-31092 (2000)

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)

Zhao, Y., White, M.A., Muralidhara, B.K., Sun, L., Halpert, J.R., Stout, C.D.: *J. Biol. Chem.* 281, 5973-5981 (2006)

<http://drnelson.utmem.edu/P450.stats.2006.htm>

http://metallo.scripps.edu/PROMISE/Cys_haem_H2O.gif

<http://www.chem.ed.ac.uk/chapman/p450.html>

<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BPOL/5.%20Metody%20urcovani%20prostorove%20struktury%20proteinu.pdf>

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka