

## ABSTRACT

Disertační práce přispěla k poznání funkce dvou typů enzymů participujících na procesech karcinogeneze, DNA polymerázy  $\beta$  (pol  $\beta$ ) a cytochromů P450 (CYP). Pol  $\beta$  je součástí opravného systému DNA „Base Excision Repair“ (BER), kde tento enzym provádí vkládání nového nukleotidu do řetězce DNA na základě párování s bází templátového řetězce. Mutované formy pol  $\beta$  byly nalezeny v 30% lidských tumorů, což ukazuje na její důležitou úlohu v procesu karcinogeneze. V disertační práci byly studována schopnost pol  $\beta$  rozlišovat mezi „správnou“ a „špatnou“ bází v průběhu jejího vkládání do DNA, tzv. „fidelitu“ (přesnost přiřazení „správného“ nukleotidu, v duchu pravidel komplementarity). K tomu byly využity metody počítačového modelování, vhodné pro porovnání energetických rozdílů mezi komplexy obsahující „správnou“ a „špatnou“ bází. Použita byla metoda výpočtu volných energií LRA. Výsledky signalizují, že jeden z hlavních příspěvků k celkové „fidelitě“ pol  $\beta$  spočívá v lepší stabilizaci tranzitního stavu nukleofilní substituce „správné“ báze, oproti „špatné“. Tento rozdíl přispívá 80-ti násobkem k celkové „fidelitě“ tohoto enzymu. Identifikovány byly i strukturální prvky, které jsou důležité pro „fidelitu“ pol  $\beta$  i katalýzu tohoto enzymu. Pro studium sledující vliv mutací na „fidelitu“ pol  $\beta$  byly použity metody FEP a LIE. Výsledky z těchto studií byly korelovány s experimentálními daty pro pol  $\beta$  a šest jejích jednobodových mutantů. Použité metody se však ukázaly jako nevhodné, a proto byly navrženy jejich modifikace, které vedly k návrhu nových metod - FEP/LIE a modifikovaný FEP. „Fidelity“ jednotlivých mutantů, vypočítané těmito metodami, se ve většině případů pohybovaly v rozmezí dané směrodatnou odchylkou od odpovídajících experimentálních hodnot. Uvedené modifikované metody byly rovněž použity pro kvantitativní predikci vlivu nových distálních mutací na „fidelitu“ pol  $\beta$ . CYP patří mezi enzymy skupiny oxidáz se smíšenou funkcí, podílejících se v organismu především na metabolismu nepolárních xenobiotik, včetně řady chemických karcinogenů. Katalytický efekt CYP může být v případě některých substrátů modifikován působením cytochromu  $b_5$  (cyt  $b_5$ ), jehož jedním z úkolů je přenos elektronu potřebného pro aktivaci molekulárního kyslíku. Pro lepší pochopení způsobu, jakým CYP interaguje s cyt  $b_5$  byly použity metody molekulového modelování, flexibilní protein-proteinový „docking“. Biologická relevance modelovaných komplexů byla dále ověřena sledováním jejich stability za použití metody klasické molekulové dynamiky a „Steered Molecular Dynamics“. Získané výsledky napomohly k návrhu struktury binárního komplexu CYP1A2/cyt  $b_5$ , ilustrujícího pravděpodobný způsob, jakým oba proteiny interagují. CYP katalyzují také aktivaci některých xenobiotik, při níž vznikají metabolity s genotoxickým účinkem. Jednou z takovýchto látek je kyselina aristolochová I (AAI). Metoda protein-substrátového „docking“ byla použita pro studium mechanismu aktivace (nitroredukce) tohoto prokarcinogenu, katalyzované CYP rodiny 1. Experimentálně bylo zjištěno, že CYP1B1 je v aktivaci AAI mnohem méně efektivní než CYP1A1/2. Výsledky získané v disertační práci umožnily predikci mechanismu nitroredukce AAI studovanými enzymy. Ten zahrnuje krokový přísun dvou elektronů a dvou protonů, pravděpodobně z hydroxylové skupiny serinu/treoninu jako donoru protonu v binárním komplexu AAI CYP1A1/1A2. CYP1B1 obsahuje místo těchto aminokyselin alanin, který je však, vzhledem k absenci hydroxylové skupiny, v redukci AAI nefunkční.