

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA BIOCHEMIE



DISERTAČNÍ PRÁCE

**TEORETICKÁ STUDIE ENZYMŮ SPOJENÝCH
S PROCESEM KARCINOGENEZE:
DNA POLYMERÁZY β A CYTOCHROMŮ P450**

**THEORETICAL STUDY OF ENZYMES RELATED TO
CARCINOGENESIS:
DNA POLYMERASE β AND CYTOCHROMES P450**

ŠKOLITEL: RNDR. VÁCLAV MARTÍNEK, Ph.D.

PRAHA 2012

MGR. PETR JEŘÁBEK

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....
Mgr. Petr Jeřábek

PROHLÁŠENÍ SPOLUAUTORŮ

Prohlašuji, že Mgr. Petr Jeřábek rozhodujícím způsobem (30-90%) přispěl ke vzniku 4 publikací, které jsou přílohami této disertační práce. Sám provedl většinu výpočtů a významně se podílel na jejich plánování, na interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

V Praze dne

.....
RNDr. Václav Martínek, PhD

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Václavu Martínkovi, PhD za jeho skvělé vedení a za zajištění kvalitního pracovního zázemí. Děkuji také svému odbornému konzultantovi Dr. Janu Floriánovi za možnost podívat se za „velkou louží“ a za četné odborné konzultace. Dále bych chtěl také poděkovat prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za její všestrannou pomoc a za laskavý přístup při vypracování této práce.

Můj velký dík pak patří mojí manželce Alence a mému srdíčku, dcerce Anežce, za jejich obrovskou trpělivost a morální podporu. Rozhodně bych neměl zapomenout poděkovat svým rodičům za podporu v průběhu celého studia.

Práce byla podporována grantovou agenturou České republiky (granty 203/09/0812 303/09/0472 and 305/09/H008), grantovou agenturou Ministerstva školství a tělovýchovy České republiky (granty MSM0021620808, 1M0505 and RP MSMT 14/63), grantovou agenturou Univerzity Karlovy (UNCE204025/2012) a grantovým programem „National Institutes of Health Program Project Grant“ (grant U19CA1050112782).

ABSTRAKT

Disertační práce přispěla k poznání funkce dvou typů enzymů participujících na procesech karcinogeneze, DNA polymerázy β (pol β) a cytochromů P450 (CYP). Pol β 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 β byly nalezeny v 30% lidských tumorů, což ukazuje na její důležitou úlohu v procesu karcinogeneze. V disertační práci byly studována schopnost pol β 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 β 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 strukturní prvky, které jsou důležité pro „fidelitu“ pol β i katalýzu tohoto enzymu. Pro studium sledující vliv mutací na „fidelitu“ pol β byly použity metody FEP a LIE. Výsledky z těchto studií byly korelovány s experimentálními daty pro pol β 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 β . 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.

ABSTRACT

Present doctoral thesis contributed to understanding of mechanistic principles of two enzymes participating on the process of carcinogenesis, DNA polymerase β (pol β) and cytochromes P450 (CYP). Pol β is part of the DNA base-excision repair mechanism (BER). The primary role of pol β in BER mechanism is inserting a new nucleotide into a DNA strand according to Watson-Crick base pairing rules. Approximately 30 % of human tumors express pol β variants. This shows its important role in the process of carcinogenesis. The ability of pol β to discriminate between “right” and “wrong” nucleotide, so called fidelity, during the insertion process, was examined using computational methods. First, the relative free energy calculation method LRA was employed to compare energetic differences between the “right” and “wrong” nucleotide during its insertion into DNA. The results indicated a better stabilization of transition-state of a nucleophilic substitution reaction by pol β in case of the “right” nucleotide compare to the “wrong” nucleotide. This difference resulted in an 80-fold contribution to its fidelity. Structural elements important for fidelity of pol β were also studied. Further, computational methods FEP and LIE were used to examine how mutational forms of pol β influence its fidelity. Results were than correlated with experimental data obtained for six single-point mutants and wild-type of pol β enzyme. Unfortunately, both methods failed in this attempt. Therefore, modifications were suggested to improve their performance leading to development of modified methods – FEP/LIE and “modified” FEP. These methods provided quantitative estimation of fidelity within acceptable margin of errors for most of the tested mutants. FEP/LIE and “modified” FEP were further used for quantitative prediction of an effect of new distal mutations on fidelity of pol β .

Cytochromes P450 (CYP) represents a large group of enzymes metabolizing nonpolar xenobiotics, including certain carcinogenic compounds. The catalytic effect of CYP can be modified by cytochrome b₅ (cyt b₅). Primary role of this enzyme is reduction of CYPs. Method of flexible protein-protein docking was used to examine the way cyt b₅ interact with CYP. Biological relevancy of modeled complexes was further validated by stability evaluation performed using methods of classical molecular dynamics and „Steered Molecular Dynamics“. CYPs also catalyze activation of certain xenobiotics that leads to metabolites with genotoxic properties. One of these compounds is aristolochic acid I (AAI). Method of flexible protein-substrate docking was used to explore possible activation mechanism (nitroreduction) of AAI by CYP family 1. Experimental results showed much lower level of AAI activation by CYP1B1 compare to CYP1A1/2. Current results were used to predict possible mechanism of AAI activation by these enzymes. Suggested mechanism involved stepwise transfer of two electrons and two protons. Potential source of these protons is a hydroxylic group of serine or threonine in the binary complex of AAI/CYP1A1 and CYP1A2, respectively. CYP1B1 contains an alanine residue in this position therefore lacking a possible proton donor for AAI reduction.

[IN CZECH]

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	9
1. ÚVOD.....	12
Vývoj nádorové buňky	12
Zdroje poškození DNA	13
Endogenní zdroje.....	13
Environmentální zdroje poškození DNA	14
DNA polymerázy	15
Oprava poškozené DNA.....	15
Mechanismus „Base Excision Repair“ u savců.....	16
Katalytický mechanismus DNA polymeráz	17
Přesnost replikace („fidelita“) DNA polymeráz.....	19
Lidská DNA polymeráza β , funkce a struktura.....	20
Cytochromy P450.....	25
Katalytický cyklus cytochromů P450.....	25
Struktura cytochromu P450	28
Cytochromy P450 rodina 1	31
Interakce CYP s redoxními partnery	32
Lidský cytochrom b ₅	32
Techniky molekulového modelování.....	34
Klasická molekulová dynamika (MD)	34
„Steered Molecular Dynamics“ (SMD).....	34
Molekulární „Docking“	35
2. Cíle disertační práce	36
3. METODY	37
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
Blok I.....	39
Blok II	49
5. ZÁVĚR.....	61
SEZNAM CITACÍ.....	63
PŘÍLOHA 1	71
PŘÍLOHA 2	97

PŘÍLOHA 3	128
PŘÍLOHA 4	162

SEZNAM ZKRATEK

8-oxoG	7,8-dihydro-8-oxoguanin
Å	ångström
AAI	kyselina aristolochová I
AAN	<i>angl.</i> „Aristolochic Acid Nephropathy“
AER	<i>angl.</i> „Alternative Excision Repair“
AHR	<i>angl.</i> „Aryl Hydrocarbon Receptor“
AP místo	<i>angl.</i> „Apurinic/Apyrimidinic“ místo, místo na DNA s vyštěpenou bází
APBS	<i>angl.</i> „Adaptive Poisson-Boltzmann Solver“
aq	vodný roztok
BDI	benzondiazóniový ion
BEN	<i>angl.</i> „Balkan Endemic Nephropathy“
BER	<i>angl.</i> „Base Excision Repair“
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktáza
CYP	cytochrom P450
cyt b_5	cytochrom b_5
dA-AAI	7-(deoxyadenozin- N^6 -yl)aristolaktam I
dATP	deoxyadenozin-5`-trifosfát
ddCTP	dideoxycytidin-5`-trifosfát
dCTP	deoxycytidin-5`-trifosfát
dG	deoxyguanozin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA ₊₁	DNA řetězec prodloužený o jeden nukleotid
dNTP	deoxyribonukleozid-5`-trifosfát
dRP	deoxyribózamonofosfát
EFER	<i>angl.</i> „Electrostatic Linear Free Energy Response“
eff	přesnost DNA polymerázy β
ER	endoplazmatické retikulum
FAD	flavinadenindinukleotid
FEP	<i>angl.</i> „Free Energy Perturbation“

FEP/LIE	kombinace metod FEP a LIE
Fe-S protein	metaloprotein obsahující komplexy železa s anorganickou sírou a (nebo) zbytky aminokyselin cysteinu
FMN	flavinmononukleotid
GPU	<i>angl.</i> „Graphics Processing Unit“
GS	základní stav reakce
GSA	aktivovaný základní stav nukleofilní substituce katalyzované DNA polymerázou β
HNEJ	<i>angl.</i> „Nonhomologous End Joining“
HR	<i>angl.</i> „Homologous Recombination“
hv	světelné záření
kcal	kilokalorie
k_{cat}	rychlostní konstanta enzymové katalýzy
K_d	disociační konstanta
kDa	kilodalton
k_{pol}	maximální rychlost polymerace DNA polymerázou β
LIE	<i>angl.</i> „Linear Response Approximation“
LRA	<i>angl.</i> „Linear Interaction Energy“
MD	<i>angl.</i> „Molecular Dynamics“
MFO	system oxidáz (oxygenáz) se smíšenou funkcí, <i>angl.</i> „Mixed-Function Oxidases“
MMR	<i>angl.</i> „Mismatch Repair“
mV	milivolt
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NER	<i>angl.</i> „Nucleotide Excision Repair“
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktáza
ns	nanosekunda
O_{lg}	můstkový kyslík mezi P_α a P_β atomem trifosfátové skupiny dNTP
O_{nuc}	deprotonovaná 3'OH skupina ribózy primerové báze
PDB	<i>angl.</i> „Protein Data Bank“
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace H^+ iontů

pK_a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
pol β	DNA polymeráza β
PP _i	pyrofosfát
PTS	pentavalentní tranzitní stav nukleofilní substituce katalyzované DNA polymerázou β
QM/MM	<i>angl.</i> „Quantum Mechanics/Molecular Mechanics“
RCSB	<i>angl.</i> „Research Collaboratory for Structural Bioinformatic“
RMSD	<i>angl.</i> „Root Mean Square Deviation“
ROS	<i>angl.</i> „Reactive Oxygen Species“
SMD	<i>angl.</i> „Steered Molecular Dynamics“
SRS	<i>angl.</i> „Substrate Recognition Site“
TC-NER	<i>angl.</i> „Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair“
TS	tranzitní stav reakce
UV záření	ultrafialové záření
vdW	van der Wallsova energie
WT	<i>angl.</i> „Wild Type“
F	síla
m	hmotnost
<i>a</i>	zrychlení

Značení aminokyselin a nukleotidů je provedeno standardními jednopísmennými zkratkami.

1. ÚVOD

Vývoj nádorové buňky

Vznik nádorové buňky je spojený především se změnou genetické informace somatické buňky. Nádorové buňky se liší od normálních somatických buněk hlavně v tom, že je v nich narušen regulační mechanismus dělení a diferenciaci. Nádorové buňky obvykle vykazují genomovou nestabilitu, neboť akumulují změny v genetické informaci s neobvykle vysokou rychlostí, což vede ke vzniku dalších mutací a epigenetickým změnám, které jsou nutné pro progresi nádorů. Bylo ukázáno, že pro vznik nádorů je potřeba akumulace vzácných mutací a nikoliv pouze jedna mutace (Knudson, 2001). U lidí s dědičným defektem v jednom z některých opravných mechanismů DNA, dochází ke zvýšené akumulaci mutačních změn a následkem toho ke zvýšené pravděpodobnosti vzniku plně vyvinutého nádoru. Příkladem je nemoc zvaná *Xeroderma pigmentosum*, kterou trpí lidé s defektem molekulárního systému, opravující poškození DNA způsobené UV zářením (Cleaver, 1968). Následkem této nemoci dochází ke zvýšenému výskytu rakoviny kůže. Dalším příkladem může být enzym DNA polymeráza β (pol β), který je součástí mechanismu opravující poškozenou DNA. Mutantní formy tohoto enzymu byly nalezeny u 30 % lidských nádorů (Starcevic et al., 2004a). Mutanty pol β s chybnou replikací můžou zvýšit pravděpodobnost výskytu dalších mutací v promoční fázi vývoje nádoru.

Vývoj nádoru je obvykle rozdělen do tří fází – iniciace, promoce a propagace (Alberts et al., 2008).

Iniciace je první fáze nádorového vývoje, ve které dochází k poškození genetické informace, které vede k navození latentní změny v buňce, jež může vést ke vzniku nádoru. K iniciaci může dojít vlivem spontánních mutací uvnitř buňky nebo působením iniciačních faktorů, mezi které patří karcinogenní látky, UV záření, radioaktivní a rentgenové záření nebo jemné pevné částice (azbest, sloučeniny beryllia, aj.). Mnohé látky jsou tzv. prokarcinogeny, ty pro své působení vyžadují metabolickou aktivaci např. prostřednictvím cytochromů P450, které plní v organismu detoxikační úlohu. Příkladem takto aktivovaných karcinogenů je např. benzo[a]pyren, který se vyskytuje v cigaretovém kouři, znečištěném ovzduší a v potravě (Phillips, 1999, 2002), ale patří sem i houbové a rostlinné toxiny, aflatoxin B1 nebo kyselina aristolochová I **příloha 4 (Jeřábek, P. et al. manuscript)**.

V promoční fázi je zárodečný tumor stimulován k růstu. Promotory nádorového bujení jsou látky, které samy o sobě nejsou mutagenní, pouze navozují proliferaci buněk. Tímto procesem dochází k množení původní mutované buňky, čímž se zvyšuje pravděpodobnost výskytu dalších mutací nebo epigenetických změn, které umožňují buňkám nekontrolované dělení (i v nepřítomnosti nádorového promotoru) a mohou se stát v konečném důsledku maligní nádorovou buňkou. Promotorem může být také iniciátor samotný, jehož opakované působení navozuje vznik nádoru. Jedním z nejznámějších promotorů jsou forbolové estery (např. 12-o-tetradekanoylforbol-13-acetát), které jsou umělými aktivátory proteinkinázy C (Armuth and Berenblum, 1972).

Progrese tumoru je fáze, ve které se vyvíjí maligní fenotyp nádoru a začíná proces metastáze. Ta je charakteristická zvýšenou rychlostí růstu nádoru a agresivitou, se kterou nádorová buňka proniká do okolních tkání.

Na základě schopnosti nádorových buněk proliferovat do jiných tkání lze nádory rozdělit na benigní, které se nešíří do okolních tkání a maligní, ty se šíří v organismu a vytvářejí sekundární nádory, tzv. metastázy. Maligní nádory se dále dělí na karcinomy, vznikající z epiteliálních buněk a sarkomy, které vznikají z pojivových nebo podpůrných tkání. Ke vzniku nádorových onemocnění mohou přispívat také některé DNA viry (jako např. papilomaviry), které často nesou geny schopné narušit kontrolní mechanismus dělení buňky. Odhaduje se, že 8-17% nádorů v rámci celosvětové populace jsou způsobeny viry, bakteriemi a parazity (Porta et al., 2011).

Zdroje poškození DNA

Zdroje poškození DNA lze rozdělit na endogenní a environmentální (Friedberg, 2006). Mezi endogenní zdroje patří především oxidační a hydrolytické procesy, ke kterým dochází v důsledku všudypřítomnosti vody a reaktivních forem kyslíku. Environmentální zdroje zahrnují fyzikální a chemické činitele, které často pocházejí z vnějšího prostředí organismu.

Endogenní zdroje

DNA je neustále vystavena působení reaktivních forem kyslíku, čímž dochází ke vzniku spontánních poškození. Všechny čtyři báze, které jsou normálně přítomny v DNA, mohou být oxidovány nebo hydrolyzovány na příslušné produkty, např. cytosin může za pokojové teploty a normálního pH spontánně přecházet deaminací na uracil. Některé produkty oxidace bází mohou při semikonzervativní replikaci DNA, tvořit chybné páry a tak zavést

do DNA sekvence mutace (Lindahl, 1974). Dalším významným poškozením DNA vlivem endogenních zdrojů je štěpení N-glykosidické vazby, čímž dochází ke ztrátě báze a vzniku intaktního cukr-fosfátového řetězce, tzv. „AP místa“. Následkem tohoto poškození může dojít ke zlomu v řetězci DNA (Loeb and Preston, 1986).

Nejvýznamnějším zdrojem spontánních poškození DNA a všech ostatních biomolekul jsou tzv. „Reactive Oxygen Species“ (ROS), které způsobují oxidační stres. Nejvýznamnějším intracelulárním zdrojem ROS jsou chyby při redukci kyslíku na vodu v dýchacím řetězci mitochondrií. Mezi významné extracelulární zdroje patří UV a ionizující záření nebo metabolismus xenobiotik. Konečně mezi zdroje změn v sekvenci DNA patří také chyby, ke kterým dochází při syntéze nebo opravě polynukleotidového řetězce prostřednictvím DNA polymeráz. Jedná se o chybné vložení nukleotidů, kterým vzniká tzv. „mismatch“. DNA obsahující „mismatch“ je ve většině případů opravena, avšak někdy může dojít k její replikaci, čímž dochází k začlenění mutace do genetického materiálu.

Environmentální zdroje poškození DNA

Mezi hlavní environmentální zdroje poškození DNA patří především záření (ionizující nebo UV), alkylační činidla nebo různé polycyklické aromatické látky (Friedberg, 2006).

Ionizující záření může excitovat a ionizovat molekuly, které dále interagují s DNA a způsobují tak poškození bází, vznik dimerů bází nebo jedno- či dvou řetězcové zlomy cukr-fosfátového řetězce. Vlivem UV záření dochází především k tvorbě kovalentních vazeb mezi dvěma pyrimidinovými bázemi. Alkylační činidla jsou elektrofilní látky s afinitou na nukleofilní centra organických makromolekul. Zahrnují širokou škálu chemikálií, mezi které patří také mnohé karcinogeny.

Alkylační činidla mají buď jednu funkční skupinu (monofunkční) nebo dvě funkční skupiny (bifunkční). Bifunkční alkylační činidlo může reagovat se dvěma místy na DNA, čímž dochází k jejich kovalentnímu spojení, tvorba tzv. „cross-linků“. Pokud dojde ke spojení opačných polynukleotidových řetězců, jde o mezi-řetězcové „cross-linky“. V případě, že jsou obě místa na stejném řetězci, mluvíme o vnitro-řetězcovém „cross-linku“. Mezi-řetězcové „cross-linky“ tvoří významnou třídu poškození DNA, neboť při jejich vzniku je zabráněno rozpletení řetězců DNA, což znemožňuje její replikaci a transkripci. U všech čtyř bází DNA byly identifikovány místa s více či méně nukleofilním

charakterem. Příkladem bifunkčních alkylačních činidel je kyselina dusitá, tris(2-chlorethyl)amin (dusíkatý yperit), bis(2-chlorethyl)sulfid (yperit) nebo cisplatina.

Existuje dále celá řada relativně nepolárních molekul, které jsou v podstatě nereaktivní, avšak mohou být metabolicky aktivovány a reagovat tak jako typické alkylační činidlo s nukleofilními centry na DNA. Příkladem těchto látek je aflatoxin B1, Sudan I (Stiborová et al., 1995; Stiborová, 2006), benzo[a]pyren nebo kyselina aristolochová I **příloha 4 (Jeřábek, P. et al. manuscript)**.

DNA polymerázy

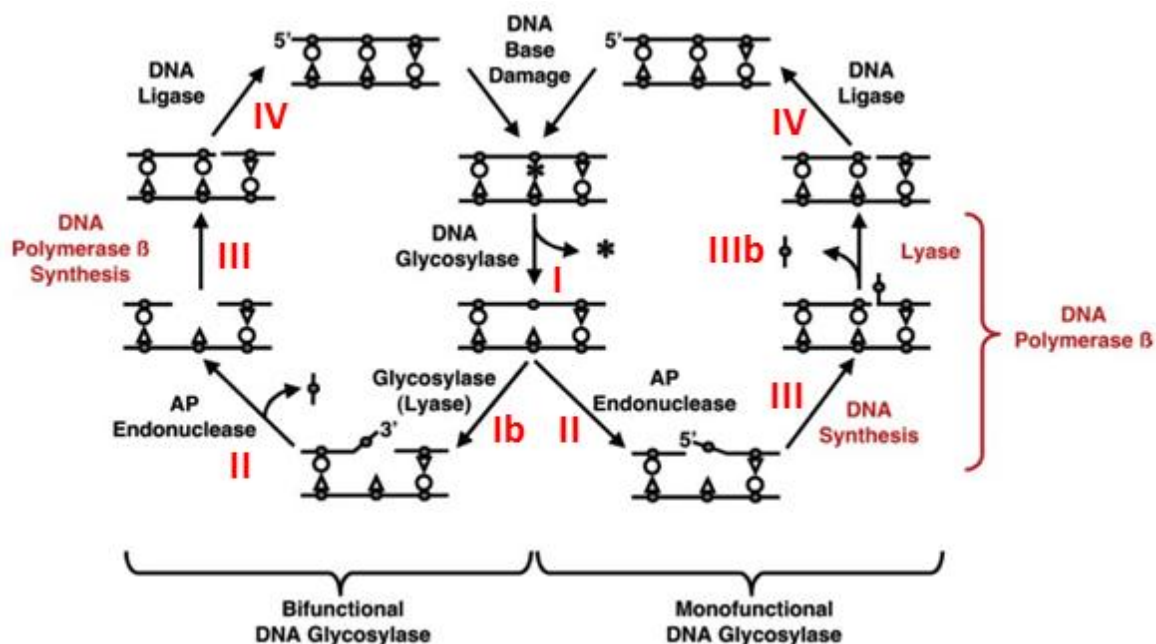
Oprava poškozené DNA

Vzhledem k neustálému poškozování DNA vlivem vnějších a vnitřních faktorů je důležité, aby buňka byla schopna udržela celistvost své genomové DNA. Pro tento účel se v průběhu evoluce vyvinulo široké spektrum opravných mechanismů, které provádí opravu DNA buď opravou poškozené části nebo jejím odstraněním a následnou syntézou chybějícího úseku (Lindahl, 1974). Mezi procesy opravující modifikovanou DNA patří např. demethylace O^6 -methylguanidinu specifickou methyltransferázou (Vaughan et al., 1993). Existují tři hlavní mechanismy založené na principu odstranění poškozené části a syntézy nové DNA, které se v buňce uplatňují. První je tzv. „Base Excision Repair“ (BER), při které dochází k vyštěpení poškozené báze. Tento mechanismus je hlavní pro odstraňování poškození způsobených hydrolýzou, oxidací nebo alkylačními látkami. Druhým je tzv. „Nucleotide Excision Repair“ (NER), při kterém jsou vyštěpeny celé nukleotidy. NER mechanismus je zodpovědný za korekci poškození, které způsobují distorzi helixu DNA, jako jsou např. dipyrimidinové produkty vznikající vlivem UV záření. Třetím nejčastějším mechanismem opravy DNA je tzv. „Mismatch Repair“ (MMR), který specificky vyštěpuje pouze nesprávně spárované báze, které vznikly při nesprávné replikaci DNA a následně unikly korekčnímu mechanismu polymeráz. Dalšími mechanismy, které se uplatňují v buňce, jsou mechanismy tzv. „Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair“, (TC-NER) a tzv. „Alternative Excision Repair“ (AER). Kromě poškození bází dochází také ke štěpení cukr-fosfátové páteře DNA, jehož následkem vznikají jedno- nebo dvou-řetězcové zlomy. Jedno-řetězcové zlomy jsou opravovány enzymy BER mechanismu BER společně s DNA kinázou. K opravám dvoj-řetězcových štěpů DNA řetězců dochází buď tzv. „Homologous Recombination“ (HR) nebo tzv. „NonHomologous End Joining“ (HNEJ). HNEJ modifikuje poškozené konce

DNA a spojuje je k sobě. Tento proces má na rozdíl od HR nízkou „fidelitu“ a dochází při něm k vytváření inzercí a delecí. Naproti tomu HR opravuje DNA procesy spojenými s genetickou rekombinací, které využívají nepoškozenou DNA sesterského chromatidu nebo homologního chromozomu. V případě dvoj-řetězcových zlomů může docházet ke ztrátě či přeskupení genetické informace nebo až k apoptóze buňky.

Mechanismus „Base Excision Repair“ u savců

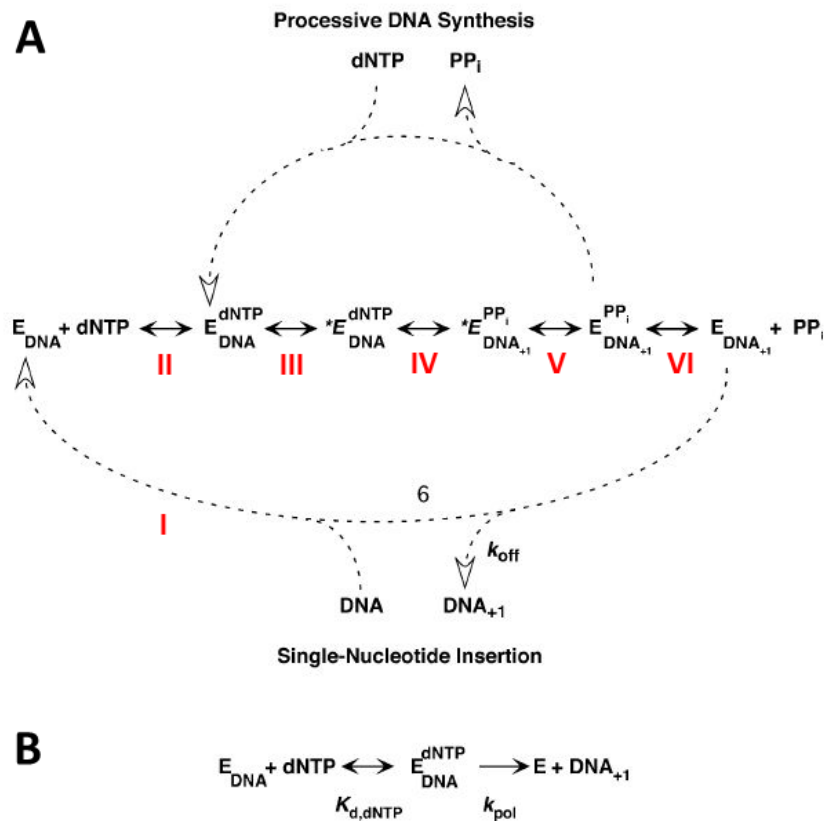
Jedním z hlavních opravných mechanismů poškozené DNA je tzv. mechanismus „Base Excision Repair“ (BER) mechanismus, kterým se odstraňují abazická místa (AP místa) nebo nukleotidy poškozené vlivem ROS, alkylačních látek nebo ionizujícím zářením. AP místa mohou vznikat spontánně (Boiteux and Guillet, 2004) nebo enzymově hydrolytickým štěpením *N*-glykosidické vazby (např. savčí DNA-glykosidázy, 3-methyladenine-DNA-glykosidáza nebo 8-oxoguanin-DNA-glykosidáza). Opravný mechanismus BER se skládá z pěti základních kroků (**Obrázek 1**) (Dianov and Lindahl, 1994; Srivastava et al., 1998). Nejdříve dochází k rozpoznání poškozené DNA a odstranění modifikované báze monofunkčními nebo bifunkčními glykosidázami (Lindahl, 1976), čímž vzniká intaktní AP místo (monofunkční glykosidázy) (Krok I), které se v případě bifunkčních glykosidáz dále štěpí (Krok Ib). Odstranění AP místa je iniciováno AP endonukleázami, které specificky rozpoznávají tato místa v dvoušroubovici DNA a katalyzují hydrolýzu fosfodiesterové vazby na 5'-konci (Krok II). Tím vzniká zlom v cukr-fosfátové páteři (5'-konec, dRP), v případě iniciace opravy bifunkčními glykosidázami dochází k vyštěpení cukr-fosfátové jednotky. V dalším kroku dochází k vyplnění vzniklé mezery správným nukleotidem na 3'-konci enzymem DNA polymerázou β (pol β) (Krok III). V případě iniciace opravy monofunkčními glykosidázami, pol β dále vyštěpí cukr-fosfátovou jednotku (Krok IIIb). Nakonec dochází ke spojení řetězce DNA ligázou I nebo III (Krok IV). Meziprodukty této dráhy jsou cytotoxické nebo vedou ke genomové nestabilitě, proto je potřeba správné a rychlé koordinace jednotlivých kroků. Za různých okolností dochází k použití alternativních mechanismů BER, např. v případě iniciace BER bifunkčními glykosidázami. BER se může uplatňovat také v případě opravy mezer větších než jeden nukleotid tzv. „long-patch“ BER (Frosina et al., 1996; Fortini et al., 1998).



Obrázek 1. Cyklus jedno-nukleotidové „Base Excision Repair“ (BER) opravy. Tento cyklus je iniciován mono- (pravá strana) nebo bifunkčními (levá strana) glykosidázami. Pol β se účastní obou cyklů, avšak pouze v případě iniciace opravy monofunkčními glykosidázami se uplatňuje její dRP lyázová aktivita, převzato z Beard, A.W. & Wilson, S.H. *Chem Rev.* **106**, 361, 2006.

Katalytický mechanismus DNA polymeráz

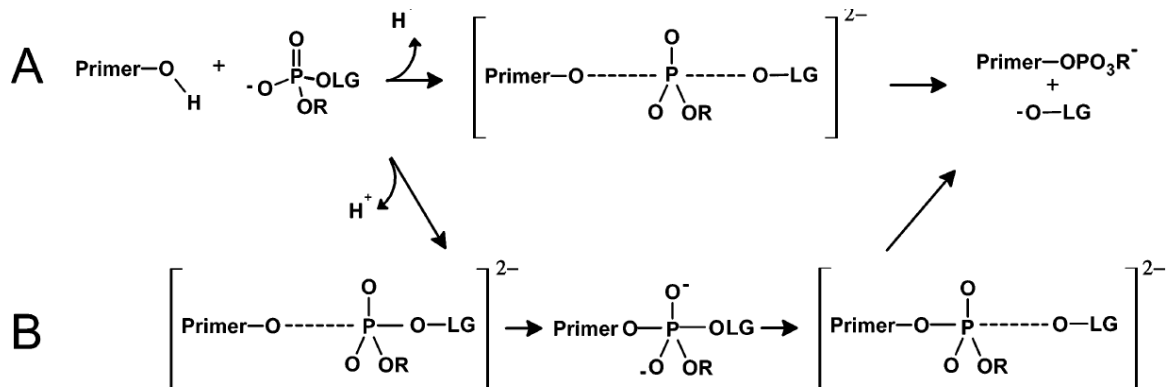
DNA polymerázy neinicují vznik či opravu řetězce, pouze katalyzují vkládání deoxyribonukleotidů na základě báze komplementarity. Navzdory různorodosti procesů, kterých se DNA polymerázy podílejí, se předpokládá, že reakční mechanismus vzniku 3',5'-fosfodiesterové vazby je u všech stejný (**Obrázek 2**) (Beard and Wilson, 2006).



Obrázek 2. Kompletní (A) a zjednodušené (B) obecné schéma syntézy DNA. Hvězdička indikuje konformační změny, ke kterým dochází ve struktuře ternárního komplexu polymerázy, převzato z (Beard and Wilson, 2006).

Nejdříve dochází k vazbě polymerázy na DNA (Krok I). Poté dochází k vazbě nukleosidtrifosfátu, na základě Watson-Crickova párování s bázi templátu (Krok II). Při navázání komplementární báze dochází k rozsáhlým konformačním změnám uvnitř vzniklého komplexu (Krok III). Experimentální měření ukazují, že k těmto strukturním změnám dochází ve většině případů dostatečně rychle, a proto jen v některých případech jsou rychlost limitujícím krokem (Johnson, 1993; Joyce and Benkovic, 2004). V případě pol β se předpokládá, že krokem limitujícím rychlost reakce je nukleofilní substituce (Bakhtina et al., 2005, 2009, 2009). V následujícím kroku (Krok IV) dojde k „nukleotidyl-transferázové reakci“, při které dochází k nukleofilnímu ataku atomu $3'O^-$ na P_α atom navázaného dNTP, průběh této reakce není přesně znám (Sucato et al., 2007) (**Obrázek 3**). Samotná nukleofilní substituce je předcházena deprotonací $3'OH$ skupiny na ribóze primerové báze. Následkem vložení dNTP do DNA opět následují konformační změny, jež usnadňují uvolnění pyrofosfátového produktu (PP_i) (Krok V). Následně dochází k uvolnění produktu DNA_{n+1} , který je prodloužen o jeden nukleotid (Krok VI). V případě „procesivní“

syntézy DNA zůstává tento produkt vázaný na polymerázu a slouží jako substrát pro další cyklus vložení nukleosidtrifosfátu.



Obrázek 3. Schéma „nukleotidyl-transferázové“ reakce katalyzované pol β . Deprotonace 3'OH skupiny primerové báze je následovaná nukleofilním atakem na P_α dNTP. Štěpením $\text{P}_\alpha\text{-O}_{\alpha\beta}$ vazby dochází k eliminaci pyrofosfátu. Není známo, zda-li tato reakce probíhá souběžným (A) nebo krokovým (B) mechanismem. Souběžný model je charakterizován současným vznikem a zánikem vazeb na P_α , k čemuž dochází prostřednictvím jedné, vysoce energetické aktivační bariéry. V průběhu krokového mechanismu se mezi vznikem a štěpením vazby objevují dva pentavalentní intermedie, což je spojeno s existencí dvou oddělených rekčních bariér, převzato z (Sucato et al., 2007).

Přesnost replikace („fidelita“) DNA polymeráz

Přesnost DNA polymeráz je možné kvantifikovat na základě účinnosti, s jakou vkládají „správný“ a „špatný“ nukleotid:

$$(\text{eff}) = k_{\text{pol}}/K_{\text{d,dNTP}}$$

$$\text{fidelita} = \{(\text{eff})_{\text{správná}} + (\text{eff})_{\text{špatná}}\} / (\text{eff})_{\text{špatná}}$$

V průběhu syntézy DNA polymerázami může dojít k několika možným chybám (Kunkel and Bebenek, 2000). Nejčastější chybou je vložení dNTP, který netvoří Watson-Crickův pár. Z kinetického hlediska DNA polymerázy eliminují vložení chybné báze její slabou vazbou do aktivního místa a nízkou rychlostí vložení do DNA řetězce **příloha 1** (Klavaňa, M., Jeřábek, P., Goodman, M.F. and Florián, J. *Biochemistry*. **50**, 7023, 2011). Vložení špatného nukleotidu navíc znesnadňuje další vložení dNTP (Beard et al., 2004). Polymerázy mající exonukleázovou aktivitu jsou schopny špatně vložený nukleotid odstranit samy, zatímco u polymeráz, které nemají tuto schopnost, se zvyšuje

pravděpodobnost disociace z řetězce DNA, čímž umožní přístup enzymu, který má exonukleázovou aktivitu. U BER, se předpokládá, že tímto enzymem je AP endonukleáza. U pol β je pravděpodobnost s jakou dojde k vnesení špatného nukleotidu závislá na druhu chybného páru a na sekvenci v jeho okolí. Průměrně se tento poměr pohybuje okolo jedné chybně vložené báze na 3000 syntetizovaných nukleotidů (Osheroff et al., 1999) a patří tak mezi průměrné polymerázy v rámci polymeráz bez exonukleázové aktivity. Bylo ukázáno, že schopnost polymeráz přesně syntetizovat DNA je přímo úměrná schopnosti vkládat „správný“ nukleotid a nikoliv „špatný“ (Beard et al., 2002).

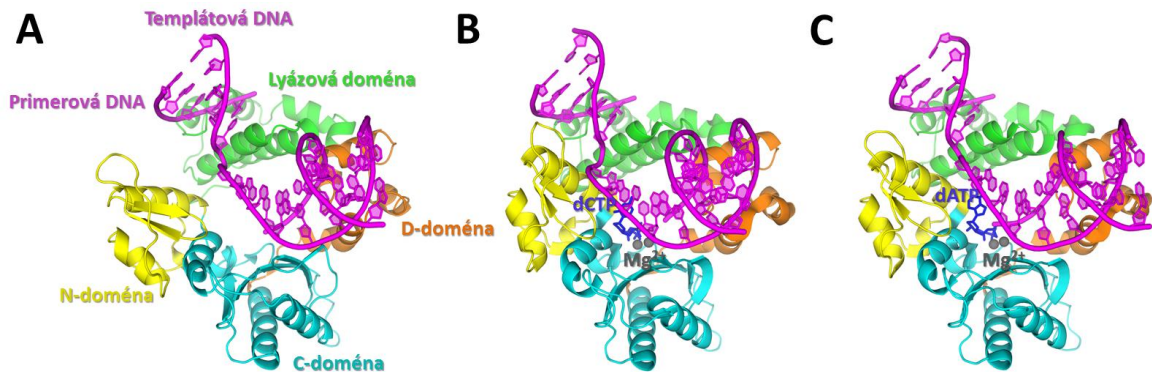
Lidská DNA polymeráza β , funkce a struktura

Lidská DNA polymeráza β (pol β) (~39 kDa) je solubilní protein složený z 335 aminokyselin. Patří mezi polymerázy rodiny X a vzhledem ke své malé velikosti je považována za nejjednodušší ze všech DNA polymeráz. Pol β je esenciální součástí mechanismu BER u savců, který chrání DNA proti trvalému poškození DNA (viz. kapitola „*Base Excision Repair*“ mechanismus). Pol β sice postrádá 3'- a 5'-exonukleázovou aktivitu, avšak má 5'dRP lyázovou a AP lyázovou aktivitu, která umožňuje vyštěpit cukr-fosfátovou jednotku v průběhu cyklu BER, v případě iniciace opravy monofunkčními glykosidázami. Nepřítomnost exonukleázové domény neumožňuje korigovat špatně vložený nukleotid, tuto funkci tak zajišťují jiné enzymy.

Mutantní formy pol β byly nalezeny v 30% lidských tumorů (Starcevic et al., 2004b), což ukazuje na jeho velmi důležitou roli v procesu karcinogeneze. U některých jednobodových mutantů byla zjištěna snížená „fidelita“ v porovnání s divokým typem. Příkladem těchto mutantů jsou K289M a I260M (Lang et al., 2004; Dalal et al., 2008). Jiné varianty, např. pol β obsahující delecí 208-236, interagují s enzymy opravného mechanismu BER, následkem čehož dochází k akumulaci nevyplněných mezer v DNA, které mohou vést k výměně genetické informace mezi sesterskými chromatidy (Sobol et al., 2002). U některých tumorů byla také zjištěna zvýšená exprese pol β (Srivastava et al., 1999). Hladina exprese pol β je nezávislá na buněčné fázi (Zmudzka et al., 1988), avšak je odlišná v jednotlivých tkáních (Wilson, 1990).

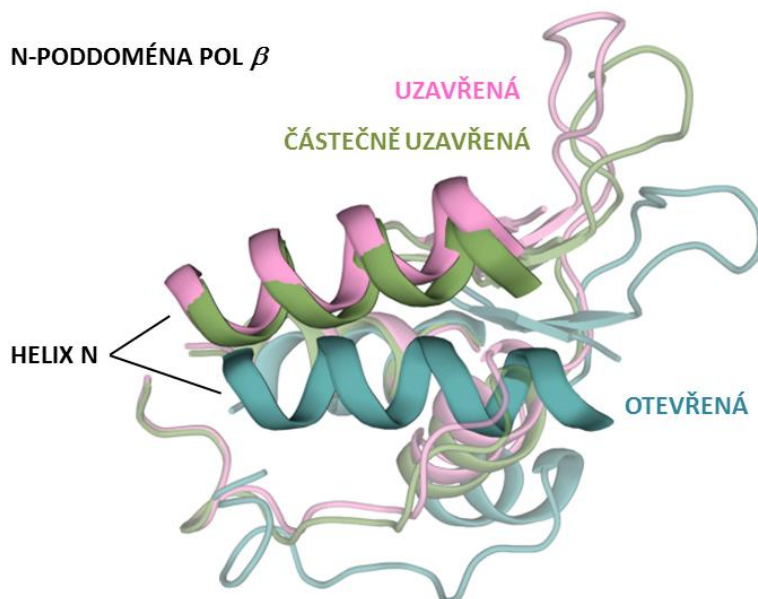
Krystalograficky vyřešené struktury pol β existují pro apoenzym pol β (Sawaya et al., 1994), binární komplex pol β /DNA a binární pol β /dNTP (Sawaya et al., 1997). Také existuje struktura ternárního komplexu pol β /DNA/dNTP, a to jak se „správně“ navázaným

dNTP (Batra et al., 2006), tak s „nesprávně“ navázaným (Batra et al., 2008) (**Obrázek 4**). Existence těchto struktur umožnila studium konformačních změn pol β , ke kterým dochází v průběhu jejího katalytického cyklu.



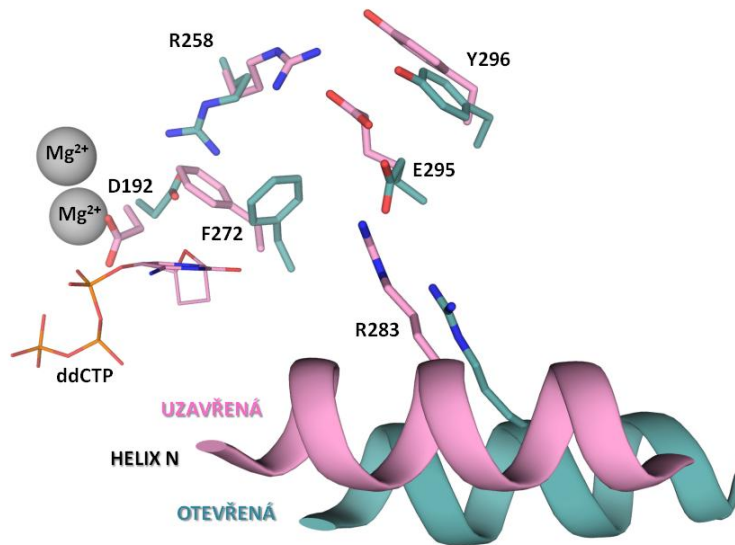
Obrázek 4. Struktura binárního (PDB 1BPX) (A) a ternárního komplexu pol β s dCTP:G (PDB 2FMP) (B) a dATP:G (PDB 3C2M) (C) v aktivním místě. Struktura DNA má fialovou barvu. N-terminální lyázová doména (zelená), D- (oranžová), C- (modrá) a N-poddomény (žlutá) polymerázové domény jsou nazvány v souladu s nomenklaturou DNA polymeráz. Molekula substrátu dCTP a dATP jsou ukázány modrým tyčinkovým modelem. Mg^{2+} ionty jsou zobrazeny šedými kuličkami.

Struktura pol β se skládá z N-koncové dRP lyázové domény (8 kDa, ~80 aminokyselin), která je propojena s C-terminální polymerázovou doménou (31 kDa, ~250 aminokyselin) krátkým segmentem citlivým vůči působení proteáz (Beard and Wilson, 2006) (**Obrázek 4A**). Polymerázová doména se skládá z N-, D- a C-poddomény. N-poddoména váže přicházející dNTP, přičemž po jeho navázání dochází k výrazným změnám v poloze této poddomény. Při navázání „správného“ dNTP se přemístí a blíže interaguje se vznikajícím párem bází, následkem čehož je tento pár v úzkém sevření uvnitř kapsy, která je tvořena polymerázou a dvoušroubovicí DNA. Navázáním „špatného“ dNTP se N-poddoména zavírá pouze částečně, přičemž nedochází ke strukturálním změnám uvnitř ternárního komplexu pol β /DNA/dNTP, které nastávají v případě vazby „správné“ báze. (**Obrázek 5**).



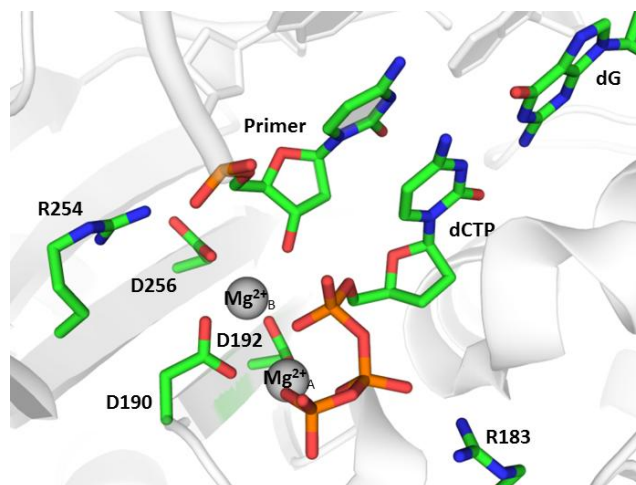
Obrázek 5. Relativní poloha N-poddomény mezi strukturami binárního (otevřená forma, modrá) a ternárních komplexů pol β s dATP:G (částečně uzavřená forma, zelená) a dCTP:G (uzavřená forma, růžová). V případě navázání špatné báze je N-poddoména v částečně uzavřené konformaci, přičemž nedochází k potřebným strukturálním změnám, které nastávají při vazbě správné báze.

Aktivní místo pol β monitoruje stav N-poddomény prostřednictvím změn orientace některých vedlejších řetězců proteinu. V otevřené formě, kdy není dNTP navázaný v aktivním místě, D192 interaguje s R258, přičemž v uzavřené formě ruší tuto interakci F258 a R258 interaguje s E295 a Y296, čímž D192 může plně poskytovat kyslík svého karboxylu pro koordinaci s Mg^{2+} . Tento ion hořčíku aktivuje 3'OH skupiny na primeru a dále tak stabilizuje tranzitní stav „nukleotidyl-transferázové“ reakce (**Obrázek 6**).



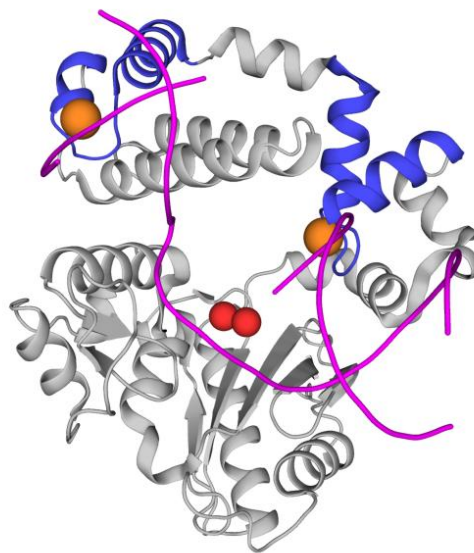
Obrázek 6. Změny v aktivním místě pol β , ke kterým dochází při přechodu N-poddomény z otevřené do uzavřené formy. Poloha N-poddomény ovlivňuje katalytický Mg^{2+} (šedá kulička) prostřednictvím změny v interakci mezi R283 (Helix N N-poddomény) a D192 (koordinuje oba ionty Mg^{2+} v aktivním místě), která je vyvolána změnou v interakci mezi E295 s R283. Tato změna je pozorována mezi otevřenou (růžová) a uzavřenou (modrá) konformací D-poddomény. F272 přechodně ruší interakci mezi D192 a R258, čímž umožňuje R258 interagovat s E295. Nukleotid ddCTP (růžová) v ternární struktuře pol β /DNA/dNTP je znázorněn drátovým modelem.

C-poddoména plní katalytickou funkci. Tato poddoména obsahuje aminokyseliny D190, D192 a D256, které koordinují dva Mg^{2+} ionty, podílející se na „nukleotidyl-transferázové“ reakci. Katalytický Mg^{2+}_A snižuje pK_a 3'OH skupiny primeru, což usnadňuje jeho deprotonaci, která předchází samotné reakci. Strukturní Mg^{2+}_B se podílí na vazbě dNTP koordinací jeho trifosfátové skupiny a také pomáhá při uvolnění PP_i (**Obrázek 7**).



Obrázek 7. Aktivní centrum DNA polymerázy β s navázaným dCTP substrátem.

D-poddoména a lyázová doména vážou dvoušroubovici DNA. Obě obsahují vzor helix-smyčka-helix, který váže jednomocné kovy a interaguje s cukr-fosfátovou páteří jedno- nebo dvouřetězcové DNA (**Obrázek 8**). Tyto dva motivy interagují s jedním z konců naštěpeného řetězce DNA, čímž indukují její ohyb o 90° , kterým dojde k obnažení vznikajícího párů bází. Toto umožňuje polymeráze kontrolovat správné párování bází prostřednictvím interakcí vedlejších řetězců aminokyselinových zbytků Y271, N279 a R283 s atomy O2 u pyrimidinů a N3 u purinů, které se nacházejí v malém žlábkou dvoušroubovice DNA. Dalším výsledkem 90° ohybu je oddálení 3'OH skupiny a 5'dRP od sebe na vzdálenost přibližně 24 Å. Při iniciaci monofunkčními glykosidázami jsou tyto dva konce substrátem pro syntézu DNA (v případě 3'OH konce) a u 5'dRP pro odstranění (lyázovou doménou) a vytvoření tak 5'-fosfátu. dRP lyázová doména se váže se na „downstream“ řetězec DNA a je důležitá při inicializaci opravného mechanismu BER monofunkčními glykosidázami. dRPázová funkce pol β se ukazuje jako krok limitující rychlost, proto rozdílná hladina exprese pol β v buňce ovlivňuje kapacitu opravného mechanismu BER (Srivastava et al., 1998; Sobol et al., 2002).



Obrázek 8. Motiv helix-smyčka-helix (HTH) u D-poddomény a lyázové domény DNA polymerázy β . Tyto dva motivy (modrá) vážou cukr-fosfátovou část štěpeného řetězce DNA (fialová). Na obrázku jsou ukázány ionty Na^+ , které jsou součástí motivu HTH (oranžová kulička) a ionty Mg^{2+} (červená kulička), jež jsou součástí aktivního místa (červená kulička).

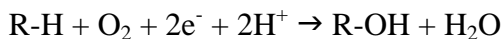
Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou hemo-proteiny tvořící největší rodinu strukturně podobných proteinů. Název těchto cytochromů pochází od vlnové délky 450 nm, při které dochází k silné absorpci světla při vazbě CO na redukováný ion železa v hemu (tzv. Soretův pás) těchto enzymů. Písmeno P značí pigment, neboť hem, který CYP obsahují, jim dodává charakteristickou červenou barvu. Novější nomenklatura zkratk názvů cytochromů P450 začíná kořenovým jménem CYP a dále pokračuje v pořadí rodina:podrodina:gen (např. CYP1A1).

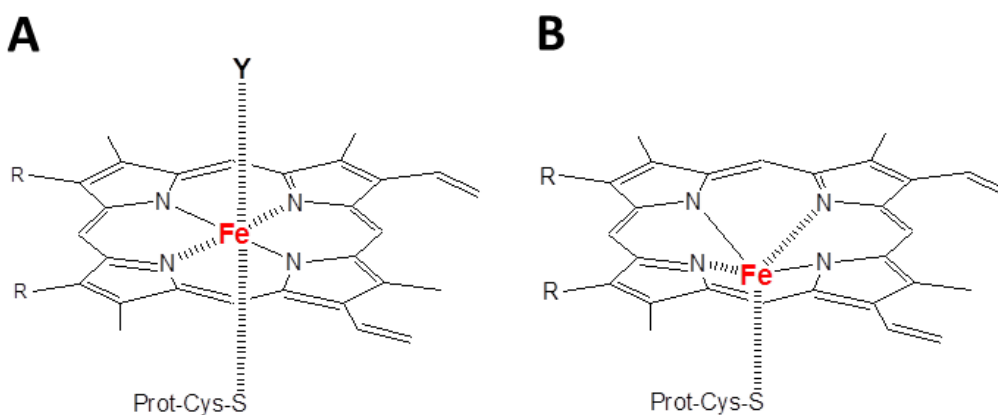
Nejvýznamnější enzymovou reakcí cytochromů P450 je monooxygenace (oxidace na sp^3 -C, sp^2 -C a sp -C, N-oxidace, S-oxidace, O-oxidace, aj.), která se uplatňuje při přeměně nepolárních cizorodých látek (xenobiotik) na polárnější, čímž dojde k usnadnění jejich vyloučení z organismu. Dále fungují také jako reduktázy, oxidázy a hydroperoxidázy (Guengerich, 2001) a **příloha 4** (Jeřábek, P. at al. manuscript). CYP, kromě xenobiotik, metabolizuje řadu endogenních látek, jako jsou steroidy, mastné kyseliny a vitamíny (Montellano and De Voss, 2010). CYP se vyskytují v organizmech všech domén fylogenetického stromu života, od bakterií, archeí a virů až po vyšší rostliny a živočichy (Gotoh, 2012). Savčí CYP jsou membránově vázané proteiny, které se vyskytují převážně v membráně hladkého endoplazmatického retikula (Cribb et al., 2005). Někteří členové rodin 1, 2 a 3 se vyskytují také v mitochondriích (Hanukoglu, 2006). Mitochondriální CYP jsou lokalizovány na vnitřní membráně a orientovány směrem do matrix mitochondrie. Tyto cytochromy katalyzují oxidace sterolů nebo steroidů. Jejich redukce je zprostředkována solubilními proteiny NADPH-adrenodoxinreduktázou a adrenodoxinem. Rostlinné mitochondrie CYP neobsahují. Bakteriální CYP jsou oproti eukaryotickým solubilní proteiny, které jsou obvykle redukovány ferredoxinreduktázou a ferredoxinem. U člověka se CYP nejvíce vyskytují v játrech, ale v menším množství se nacházejí také v ledvinách, plicích, tenkém střevě, kůži, mozku i dalších orgánech (Swanson, 2004).

Katalytický cyklus cytochromů P450

Typickou reakcí, kterou CYP katalyzují je monooxygenace organických substrátů (Denisov et al., 2005), při níž dochází k redukci jednoho atomu molekulárního kyslíku na vodu za současného vnesení jednoho z atomů kyslíku do molekuly substrátu. Jako redukční činidlo zde nepřímou slouží NADPH. Tuto reakci sumarizuje následující rovnice:



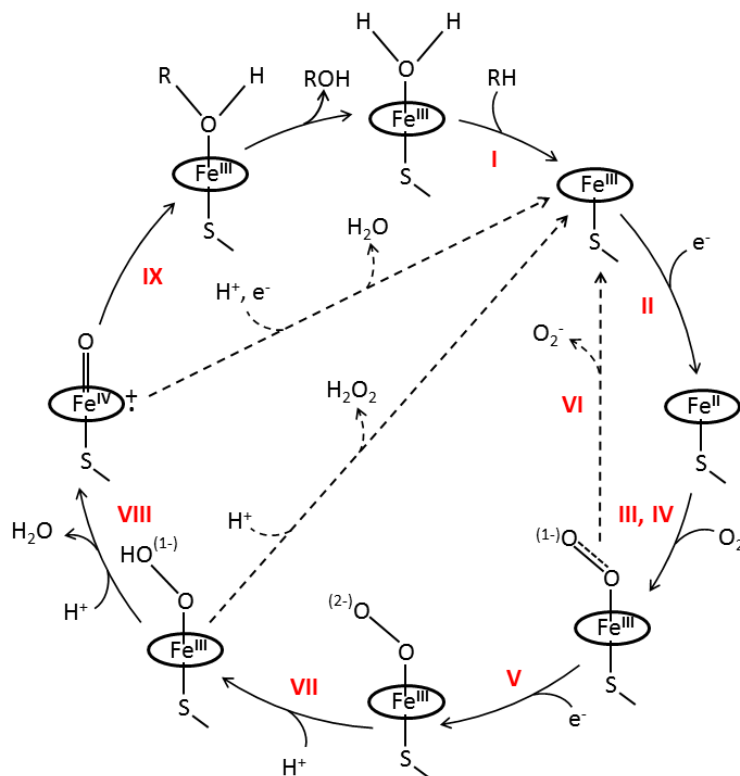
K této redukci dochází postupně, přičemž v jejím průběhu dochází ke vzniku několika meziproductů (**Obrázek 10**). Nejdříve dochází k vazbě substrátu do aktivního místa CYP, kde je kovalentně vázaný kofaktor hemu, který váže Fe^{3+} v základním, neaktivním stavu (nízko-spinová forma) (**Obrázek 9A**). Vazbou substrátu dojde v aktivním místě ke strukturálním změnám, které vedou k vytěsnění molekuly vody koordinované na Fe^{3+} . Výsledkem je přechod Fe^{3+} z nízko-spinové na vysoko-spinovou formu (**Obrázek 9B**), která je vhodnější pro redukci (Krok I).



Obrázek 9. Spinový stav cytochromu P450. (A) Nízko-spinová forma cytochromu P450. Trojmocné železo hemu je hexakoordinované se čtyřmi vazbami na pyrolových dusících hemu, jednou vazbou na thiolové skupině zbytku cysteinového rezidua a jednou vazbou na molekule vody nebo hydroxylové skupině (Y). Redukční potenciál tohoto hemu je cca -360 až 300 mV. (B) Vysoko-spinová forma cytochromu P450. Železo hemu je pentakoordinované se čtyřmi vazbami na pyrolových dusících hemu, jednou vazbou na thiolové skupině zbytku cysteinového rezidua. Železo je vzhledem k velkému průměru vychýleno z roviny porfyrinového kruhu, což znemožňuje vazbu šestého ligandu a snižuje tak jeho koordinaci. Redukční potenciál je cca -175 mV a je tedy vhodnější pro příjem elektronu, převzato z (Testa and Krämer, 2010).

Následně přijímá CYP jeden elektron od flavoproteinu NADPH:cytochrom P450 reduktázy (redukční potenciál -270 mV), která jej získává z molekuly NADPH (redukční potenciál -320 mV) a železo se redukuje na dvojmocnou formu (krok II). Takto redukovaný cytochrom P450 má silnou afinitu k molekule kyslíku (Krok III). V tomto kroku může dojít k vazbě oxidu uhelnatého, který má mnohem větší afinitu k Fe^{2+} než O_2 , a inhibovat tak aktivitu CYP. Vazbou kyslíku na redukované železo primárně vzniká komplex Fe^{2+}/OO , ze kterého následně vlivem silně elektronegativního atomu kyslíku

vzniká $\text{Fe}^{3+}/\text{OO}^-$ (krok IV). Tento komplex je velmi nestabilní a je nutná rychlá redukce druhým elektronem (krok V) jinak dochází k jeho rozpadu za vzniku superoxidového anion radikálu (Krok VI), k čemuž dochází především při slabé vazbě substrátu, v jeho nepřítomnosti nebo u substrátů které mají vysokou afinitu, avšak destabilizují komplex CYP/OO/substrát. U CYP endoplasmatického retikula je donorem druhého elektronu NADPH:cytochrom P450 reduktáza nebo cytochrom b_5 (redukční potenciál +30 mV), jemuž elektron předává NADH:cytochrom b_5 reduktáza (redukční potenciál -290 mV). Ta je sama redukována pomocí NADH (redukční potenciál -320 mV). V následujících dvou krocích dochází k přenosu dvou protonů na atom kyslíků (Krok VII a VIII), který je dál od železa, tzv. distální kyslík. Schopnost CYP zajistit přísun těchto protonů je nutná pro správný průběh reakce. Donorem protonů jsou především molekuly vody, které jsou v aktivním místě stabilizovány systémem vodíkových vazeb, na jejichž tvorbě se podílí především velmi konzervovaný pár aminokyselin obsahující kyselinu a alkohol (Kimata et al., 1995; Vidakovic et al., 1998). Přenosem prvního protonu vzniká $\text{Fe}^{3+}/\text{OOH}^{1-}$, který může dále reagovat třemi způsoby: (i) v případě, že nedojde k přenosu druhého protonu, může být použit jako elektrofilní oxidační činidlo pro epoxidaci některých substrátů (Coon et al., 1998), (ii) dojde k uvolnění peroxidu vodíku a CYP se dostane do základního stavu anebo (iii) dochází k druhé protonaci na distálním vodíku za vzniku molekuly vody a tzv. „Compound I“ (Fe^{4+} -oxo π -kationt radikál). „Compound I“ je vysoko-valenční kyslíkový komplex, ve kterém má železo hemu náboj +IV a atom kyslíku je elektrofilní s šesti elektrony ve vnější slupce (Rittle and Green, 2010; Shaik et al., 2010). Tato velmi reaktivní forma aktivovaného kyslíku s nízkou životností dále zprostředkovává homolytické štěpení vazby C-H, jehož výsledkem je volný uhlíkový radikál a hydroxylový radikál, který je více či méně vázaný na železo. Rekombinací těchto dvou radikálů vzniká hydroxylovaný uhlovodík (Krok IX), přičemž CYP se vrací do výchozího (základního stavu), kde je hexakoordinované Fe^{3+} v nízkospinovém stavu.

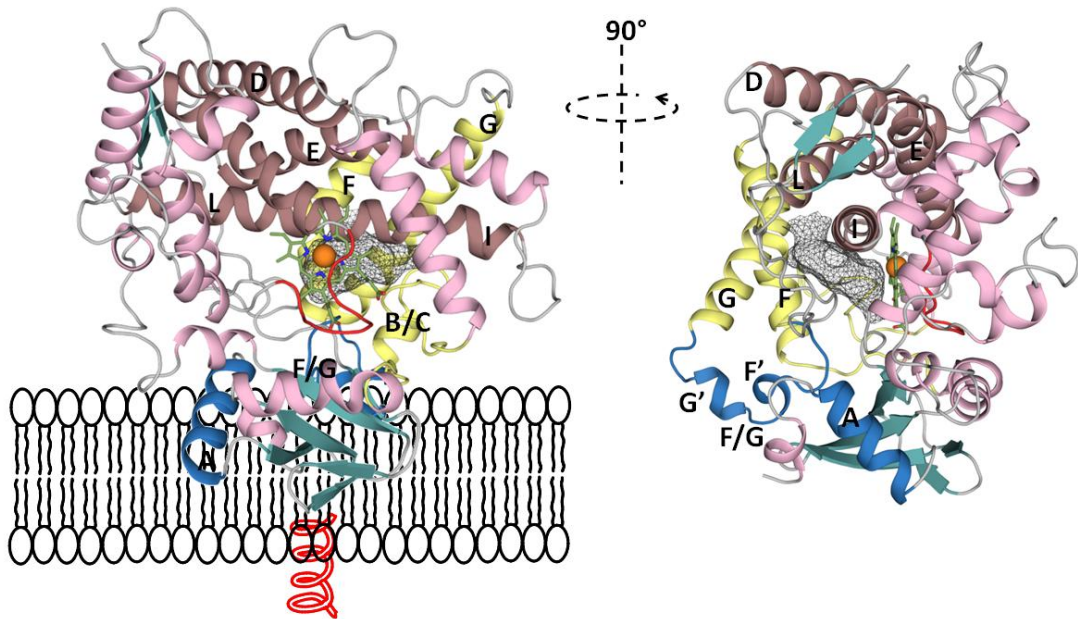


Obrázek 10. Katalytický cyklus monoxygenazové reakce katalyzované cytochromem P450, převzato z (Makris et al., 2010).

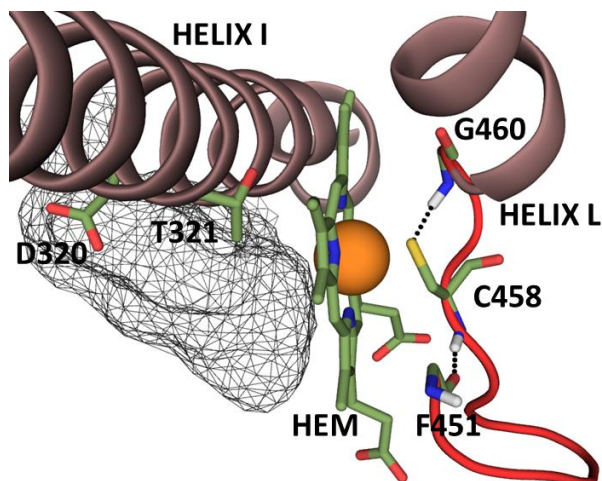
Struktura cytochromu P450

CYP jsou membránově vázané hemoproteiny. Výjimku tvoří prokaryotické CYP, které nejsou vázané na membránu. Navzdory nízké sekvenční identitě celé rodiny CYP (< 20%) (Hasemann et al., 1995) je jejich terciální struktura a topologie podobná, avšak poloha jednotlivých strukturních prvků se liší (Poulos and Johnson, 2010). Terciální struktura CYP sestává ze solubilní C-koncové domény a membránové N-koncové domény (**Obrázek 11**). C-koncová doména obsahuje vysoce konzervované jádro, které je tvořeno čtyřmi helixy (D, E, I a L). CYP obsahují prosthetickou skupinu protoporfyrinu IX s trojmocným železem (hem *b*), která je zaklíněna mezi distálním helixem I a proximálním helixem L (**Obrázek 12**). Železo hemu je koordinované na thiolátovou skupinu cysteinu, který je absolutně konzervovaný u všech CYP. Tento cystein je součástí konzervované smyčky obsahující charakteristickou sekvenci FxxGx(H/R)xCxG, a která je charakteristická pro všechny proteiny s koordinací cystein-železo. Mimo jiné, tato smyčka zajišťuje přítomnost donoru protonu pro vodíkovou vazbu, která se podílí na regulaci redoxního potenciálu železa (Ueyama et al., 1983, 1996), přičemž v její nepřítomnosti je redoxní potenciál CYP příliš nízký na to, aby byl redukován svými redoxními partnery.

Samotný cystein většinou tvoří dvě vodíkové vazby s páteřními amidy sousedních aminokyselin. Dlouhý helix I tvoří stěnu dutiny aktivního místa a obsahuje uprostřed konzervovanou sekvenci (A/G)-Gx(E/D)T. Vysoce konzervovaný threonin společně s kyselinou asparagovou nebo glutamovou jsou esenciální pro stabilizaci molekul vody v aktivním místě, kde zajišťují přísun protonů potřebných pro aktivaci kyslíku na hemu (Kimata et al., 1995; Benson et al., 1997; Vidakovic et al., 1998). Navzdory vysoce konzervované struktuře jsou tyto proteiny schopny vázat a metabolizovat substráty o rozličné velikosti, od etanolu po polypeptidové řetězce antibiotik (Zerbe et al., 2002; Pylypenko et al., 2003). Některé CYP jsou vysoce regio- a stereo- specifické, jiné mají velmi širokou substrátovou specifitu. Rozpoznávání substrátů je zajištěno tzv. „Substrate Recognition Sites“ (SRS) (Gotoh, 1992), což jsou nejméně konzervované části CYP, umístěné převážně ve flexibilních částech proteinu na jeho distální straně. Při navázání substrátu dochází v těchto oblastech k významným strukturním změnám, což ukazuje na tzv. „induced fit“ mechanismus (Pylypenko and Schlichting, 2004). Významným rozdílem mezi prokaryotickými a eukaryotickými CYP je přítomnost polypeptidového řetězce mezi helixem F a G u eukaryot, který je složen z několika kratších helixů (u savčích CYP to jsou helixy F' a G'). Tento region je v blízkosti oblasti, která obsahuje větší množství zbytků prolinu a helixu A. Tyto dvě oblasti tvoří dohromady hydrofobní povrch, který je lokalizovaný v blízkosti N- koncové části CYP a je pravděpodobně zanořen do membrány (Williams et al., 2000; Ozalp et al., 2006). Helixy F a G, F/G smyčka a B/C smyčka patří mezi nejflexibilnější části celého proteinu. Tento region, který je zanořený do membrány, tvoří ústí nejpravděpodobnějšího tunelu pro vstup substrátu a výstup produktu do/z aktivního místa savčích CYP. Hydrofobní substráty tak mají usnadněný vstup do aktivního místa. CYP mají více substrátových/produktových tunelů (Cojocar et al., 2011). Velikost aktivních míst v rámci celé rodiny CYP se značně liší. N-koncová membránová doména se skládá z 30-50 aminokyselin a zahrnuje cílovou sekvenci pro „kotranslační“ zanoření do membrány (Sakaguchi and Omura, 1993). U mitochondriálních CYP je v průběhu transportu signální sekvence odštěpena (Omura and Ito, 1991). Tato doména se pravděpodobně skládá z jednoho dlouhého α -helixu (Black et al., 1994), který prochází celou šířkou membrány. Přítomnost této domény není nutná pro katalytickou aktivitu C-koncové domény (Pernecky et al., 1993).



Obrázek 11. Struktura C-terminální domény lidského CYP1A2. Pohled z proximální strany (vlevo) a boční pohled (vpravo). Konzervované jádro, tvořené čtyřmi helixy (D, E, I a L) je tmavě růžové. Sekvenčně konzervovaná smyčka, obsahující cystein koordinovaný na železo hemu, je ukázána červeně. Oblasti s nejvyšší flexibilitou, zahrnující helix F a G a smyčku B/C, jsou obarveny žlutě. Část C-terminální domény, která je pravděpodobně zanořena do membrány, zahrnující helix A a smyčku F/G, je obarvena modře. F/G smyčka obsahuje dva krátké helixy F' a G'. Smyčka B/C, která je také pravděpodobně v membráně, je zároveň velmi flexibilní, a proto je zde obarvena žlutě. Kofaktor hem je ukázán (zelená) tyčinkovým modelem a železo je znázorněno oranžovou kuličkou. Vazebná substrátová kavita je vizualizována sítivým povrchem. Dále je schematicky ukázána membrána a N-koncová membránově vázaná část CYP (červený helix).



Obrázek 12. Detail aktivního místa lidského CYP1A2, který ukazuje polohu dvou konzervovaných helixů I a L (tmavě růžová), mezi kterými je zaklíněna molekula hemu. Dále je ukázána konzervovaná smyčka (červená), obsahující cystein, který je koordinovaný na železo hemu (oranžová kulička). Vodíkové vazby, které tvoří cystein, jsou ukázány přerušovanou čarou. Konzervovaná rezidua D320 a T321 jsou esenciální pro stabilizaci molekul vody v aktivním místě. Vazebná substrátová kavita je ukázána sítivým povrchem.

Cytochromy P450 rodina 1

CYP1A2

Lidský CYP1A2 (~57 kDa) je membránově vázaný hemoprotein o délce 516 aminokyselin. Výskyt u člověka je vázán čistě na endoplazmatické retikulum jaterních buněk. Je nevýznamnějším členem podrodiny 1A, která se významnou měrou podílí na detoxifikaci xenobiotik a aktivaci karcinogenů. CYP1A2 je inducibilní protein, jehož míra exprese se liší mezi jednotlivci. Struktura induktorů má převážně planární aromatický charakter (Grygiel and Birkett, 1981). Indukce je zprostředkována transkripčním faktorem tzv. „Aryl Hydrocarbon Receptor“ (AHR), který interaguje s ligandem a následně se váže na tzv. „Enhancer Elements“ obklopující geny rodiny CYP1 (Williams et al., 2010). CYP1A2 hraje významnou roli v rozvoji karcinogeneze, neboť aktivuje některé známé prokarcinogeny – aromatické a heterocyklické aminy, polycyklické aromatické uhlovodíky, nitroaromáty, některé N-nitrosaminy, aflatoxin B1 nebo kyselinu aristolochovou I (Eaton et al., 1995; Stiborová et al., 1999). Mezi metabolizované endogenní látky patří především 17β -estradiol a estron a z léčiv to jsou např. paracetamol, antipyrin, kofein, lidokain, melatonin nebo fenacetin. Inhibitory lidské CYP1A2 jsou např. furafylin, fuvoxamin nebo α -naftoflavon (Brøsen, 1995). Aktivní místo CYP1A2 je poměrně úzké a planární, čímž je adaptované pro vazbu planárních molekul typu polycyklických aromatických uhlovodíků (Sansen et al., 2007). Aktivita některých CYP může být modulována jeho redoxním partnerem, mikrozomálním cytochromem b_5 (Morgan and Coon, 1984; Gruenke et al., 1995).

CYP1A1 a CYP1B1

CYP1A1 je, stejně jako CYP1A2, inducibilní protein s expresí regulovanou systémem AHR. CYP 1A1 se vyskytuje především v plicích, ledvinách, gastrointestinálním traktu, kůži, lymfocytech a také v placentě. Na rozdíl od CYP1A2 se téměř nevyskytuje v játrech. Substrátová specifita je u CYP1A1 podobná jako v případě CYP1A2, přičemž také u tohoto cytochromu dochází k aktivaci některých prokarcinogenů jako je Sudan I nebo kyselina aristolochová I. Struktura tohoto proteinu nebyla doposud objasněna, avšak vzhledem k vysoké homologii v sekvenci solubilní domény mezi CYP1A1 a 1A2 (85%) bylo možné získat její poměrně přesný model, který byl využit v naší laboratoři pro studium rozdílné aktivace kyseliny aristolochové cytochromy P450 rodiny 1 **příloha 4** (Jeřábek, P. et al. manuscript).

CYP1B1 se vyskytuje především v ledvinách, srdci, vaječnících, prostatě, děloze a mléčných žlázách. Stejně jako CYP1A1, vyskytuje se velmi málo v játrech. Substrátovou specifitu a schopnost aktivace některých prokarcinogenů má podobnou jako CYP1A1 a 1A2. V případě 1B1 byla zjištěna velmi nízká aktivace kyseliny aristolochové I v porovnání s CYP1A1 a 1A2 (Stiborová et al., 2005).

Interakce CYP s redoxními partnery

CYP potřebují pro svoji oxygenázovou aktivitu krokový přísun dvou elektronů, které získávají z NAD(P)H prostřednictvím jejich redoxních partnerů. Na základě systému přenosu elektronů, které CYP používají se obecně dělí na dvě hlavní skupiny (Paine et al., 2010). Do první skupiny patří bakteriální a mitochondriální CYP a do druhé skupiny mikrozomální CYP. Redukční systém skupiny jedna je dvousložkový a zahrnuje feredoxinreduktázu, která přenáší elektron z NADPH na Fe-S protein feredoxin, který dále redukuje CYP. Mitochondriální CYP jsou redukovány NADPH prostřednictvím řetězce adredoxinu a adrenodoxinreduktázy (Grinberg et al., 2000). Bakteriální CYP jsou redukovány putidaredoxinem a putidaredoxinreduktázou (Poulos et al., 1987). Cytochromy P450 druhé skupiny mohou být redukovány buď NADPH prostřednictvím NADPH:cytochrom P450 reduktázou (CPR) nebo NADH prostřednictvím NADH:cytochrom b_5 reduktázy a cytochromu b_5 (Porter, 2002) a **příloha 3 (Jeřábek, P. et al.)**. CPR přenáší první a druhý elektron potřebný pro aktivaci kyslíku, zatím co cyt b_5 se podílí pouze na přenosu druhého elektronu.

Lidský cytochrom b_5

Lidský cytochrom b_5 (cyt b_5) (~17 kDa) je membránově vázaný hemoprotein obsahující 134 aminokyselin a kofaktor hem, který je lokalizován v ER. Terciální struktura tohoto proteinu se skládá ze solubilní N-koncové domény (**Obrázek 13**) a C-koncové membránové domény. Jeho primárním úkolem je, společně s cytochromem b_5 reduktázou, redukce enzymů desaturáz, které syntetizují nenasycené mastné kyseliny nebo steroly (Vergéres and Waskell, 1995). Rozpustné formy cyt b_5 a cytochrom b_5 reduktázy byly nalezeny v erytrocytech, kde katalyzují redukci methemoglobinu (Hegesh et al., 1986).

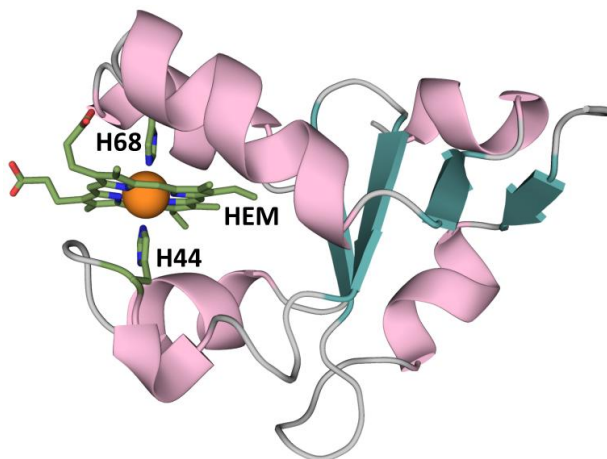
V procesu redukce CYP je cyt b_5 nejdříve redukován NADH:cytochrom b_5 reduktázou, která získává elektron z NADH, přičemž cyt b_5 může být redukován také CPR (Enoch and Strittmatter, 1979). Cyt b_5 se při aktivaci kyslíku podílí pouze na přenosu druhého elektronu (**Obrázek 10, Krok V**), neboť vzhledem k velkému rozdílu redoxních

potenciálů CYP-Fe³⁺ (-300 mV) a cyt b₅ (+25 mV) je přenos prvního elektronu málo pravděpodobný (Guengerich, 1983).

Cyt b₅ je schopen v některých případech modulovat katalytickou aktivitu některých CYP. Tato modulace je závislá na typu substrátu, izoenzymu nebo na experimentálních podmínkách (Morgan and Coon, 1984; Gruenke et al., 1995). Velkou senzitivitu na přítomnost cyt b₅ vykazují např. cytochromy P450 podrodiny 3A (Yamazaki et al., 2002), do které patří mimo jiné CYP3A4, který metabolizuje velkou část léčiv v těle člověka (Voice et al., 1999). Vliv cyt b₅ byl také pozorován v případě barviva Sudan I enzymem CYP1A1, jehož přeměnou vzniká také tzv. „ultimární“ karcinogen BDI (Stiborová et al., 1995; Stiborová, 2006).

Mechanismus, kterým cyt b₅ ovlivňuje aktivitu CYP, není dosud znám. Obecně se předpokládá, že modulační aktivita cyt b₅ spočívá v přenosu druhého elektronu (Rivera et al., 1998; Porter, 2002; Zhang et al., 2007) nebo alosterické vazbě na CYP (Yamazaki et al., 1996, 2001; Porter, 2002). Navzdory značnému úsilí, nebyla doposud získána experimentální struktura binárního komplexu CYP s cyt b₅ (Dürr et al., 2007).

Existují pouze nepřímé důkazy o způsobu interakce CYP s cyt b₅, které vycházejí především ze studia králíčího CYP2B4 pomocí metody tzv. „místně-cílené mutagenese“ (Bridges et al., 1998; Zhang et al., 2005), která spočívá v hledání reziduí, jejichž mutace výrazným způsobem ovlivňuje protein-proteinovou interakci. Další použitou metodou, byl tzv. „cross-linking“ (Sulc et al., submitted), který využívá látek schopných kovalentně spojit karboxylovou a aminovou skupinu povrchových aminokyselin dvou proteinů, jejichž identita je poté ověřena hydrolýzou proteinů a následnou detekcí vzniklých, kovalentně vázaných peptidů, např. metodou hmotnostní spektroskopie. Interakce CYP s cyt b₅ byla také studována metodami výpočetní chemie **příloha 3** (Jeřábek, P. et al.). Výsledky těchto studií ukazují na možný překryv vazebných míst NADPH:P450 oxidoreduktázy a cyt b₅ na proximální straně CYP. Cyt b₅ se pravděpodobně váže konvexní, záporně nabitou, stranou na konkávní stranu CYP, která má bazický charakter.



Obrázek 13. Terciární struktura N-terminální domény lidského cytochromu b_5 . Kofaktor hem a vedlejší řetězce histidinů 44 a 68, které jsou koordinovány na železo, jsou ukázány tyčinkovým modelem; atom železa je zobrazen oranžovou kuličkou.

Techniky molekulového modelování

Klasická molekulová dynamika (MD)

Tato výpočetní metoda se používá pro popis chování atomů a molekul v reálném čase. Trajektorie atomů a molekul je získána numerickým řešením druhého Newtonova pohybového zákona ($F = m \cdot a$), přičemž síly působící mezi částicemi a potenciální energie jsou definovány molekulárně mechanickým silovým polem (Cheatham and Young, 2000; Ponder and Case, 2003). Součástí silového pole je soubor rovnic pro výpočet potenciální energie simulovaného systému. Tyto rovnice se dělí na výpočet nevazebných (elektrostatická a van der Waalsova energie) a vazebných příspěvků. Další součástí silového pole je sada parametrů definující vlastnosti jednotlivých atomů (hmotnost, poloměr a náboj) a rovnovážné hodnoty a silové konstanty pro popis vzdáleností, úhlů a dihedrálních úhlů mezi nimi. Parametry silového pole jsou získány na základě experimentálních měření nebo přesných kvantově-chemických výpočtů. Metodu MD je možné použít pro simulaci chování jak malých molekul, tak pro složité biologické systémy vzájemně interagujících biomolekul.

„Steered Molecular Dynamics“ (SMD)

Tato metoda je odvozená od klasické molekulové dynamiky. SMD urychluje konformační změny molekulových systémů působením vnější síly, která se aplikuje na těžiště vybrané sady atomů v definovaném směru. Tažení těžiště se provádí: (i) konstantní silou, přičemž se měří rychlost pohybu těžiště anebo (ii) konstantní rychlostí, kde se zaznamenává síla

vynaložená na tažení těžiště. SMD je vhodná pro studium disociace protein-proteinových a protein-substrátových komplexů nebo konformačních změn biomolekul. Na základě Jarzynského rovnosti (Jarzynski, 1997) je možné SMD použít také pro výpočet volných energií. Pro tento výpočet je však potřeba provést velké množství výpočtů což je v případě komplexů protein-protein zatím obtížné (Li and Ji, 2012).

Molekulární „Docking“

Metoda molekulárního „docking“ je určena pro predikci vzájemné orientace dvou molekul, obvykle protein-substrát nebo protein-protein, na základě tvarové a nábojové komplementarity. Základní informací pro proces „docking“ je struktura dokovaných molekul a jejich flexibilita. V případě protein-substrátového „docking“ je molekula plně flexibilní, zatímco struktura proteinu je flexibilní jen částečně. Tato flexibilita je většinou omezena na prohledávání rotamerů vedlejších řetězců aminokyselin v místě očekávané vazby ligandu, neboť se zvyšující se flexibilitou proteinu roste prohledávaný konformační prostor a tak i nároky na výpočetní kapacity. V případě protein-proteinového „docking“ některé metody umožňují využití experimentálních dat pro omezení prohledávaného konformačního prostoru (de Vries et al., 2007). Použitím některého z prohledávacích algoritmů dojde k prozkoumání daného konformačního prostoru (Halperin et al., 2002), v průběhu kterého jsou jednotlivé vazebné „módy“ hodnoceny pomocí „skórovací“ funkce a dále seřazeny podle predikovaných vazebných volných energií. Nejčastější využití této metody je pro predikci vazebné orientace molekul substrátů nebo inhibitorů v aktivním centru enzymů. „Docking“ je také možné využít pro hledání vzájemné orientace dvou proteinů.

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo přispět ke studiu reakčních mechanismů dvou enzymů spojených s procesem karcinogeneze použitím metod výpočetní chemie. Konkrétně DNA polymerázy β (pol β) a cytochromů P450 (CYP). V případě pol β byl zvláštní důraz kladen na studium schopnosti tohoto enzymu rozlišovat mezi „správnou“ a „špatnou“ bází v průběhu jejího vkládání do DNA, tzv. „fidelitu“. Jedním cílem bylo použití metod výpočtu volných energií pro predikci vlivu jednobodových distálních mutací na „fidelitu“ pol β . V případě, že stávající metody nebudou pro tento úkol postačující, bude zapotřebí je modifikovat. Druhým hlavním cílem bylo prozkoumat mechanismy nitroredukce zprostředkované jinak typicky oxidujícími enzymy - cytochromy P450. A to konkrétně na příkladu redukce kyseliny aristolochové I. Třetím hlavním cílem pak bylo ověřit možnosti výpočetních možností pro predikci tranzientních protein-protein-interakcí enzymů oxidáz se smíšenou funkcí systému. A to pomocí flexibilního protein-proteinového „docking“, MD a dalších technik od MD odvozených.

3. METODY

Zvládnutí široké palety metod molekulového modelování bylo velmi důležité pro získání originálních výsledků, prezentovaných v předkládané disertační práci a všech publikací, které jsou její součástí. Před použitím každé metody bylo potřebné získat vhodné struktury modelovaných proteinů, které byly buď „staženy“ ze strukturní databáze (RCSB Protein Data Bank) (**Příloha 1, 2, 3 a 4**) a nebo připraveny metodou homologního modelování (**Příloha 3 a 4**). Tyto struktury byly dále upraveny pro potřeby jednotlivých simulací, např. správnou protonací jednotlivých aminokyselin, „*in silico*“ mutagenézí aminokyselin, úpravou N- a C- koncových části proteinů, aj. Pro vizualizaci a editaci molekulových struktur a analýzu simulací molekulové dynamiky byly použity programy PyMol a VMD. Pro samotné výpočty byly použity programové balíky Q (**Příloha 1 a 2**), NAMD (**Příloha 3**), HADDOCK (**Příloha 3**), AutoDock (**Příloha 4**) a APBS (**Příloha 3**).

Pro výpočet katalytické aktivity a „fidelity“ divokého typu DNA polymerázy β (pol β) a jejích mutantů byly použity postupy pro výpočet volných energií jako je „Linear Response Approximation“ (LRA) (**Příloha 1**), „Free Energy Perturbation“ (FEP) (**Příloha 2**) a „Linear Interaction Energy“ (LIE) (**Příloha 2**). Součástí této disertační práce jsou také návrhy nových metod výpočtu volných energií, které se snaží překonávat nedostatky výše uvedených metod. Nově zavedené jsou „Electrostatic Linear Free Energy Response“ (EFER) a hybridní metoda FEP/LIE. Tyto přístupy jsou detailně popsány v publikacích uvedených jako **přílohy 1 a 2**. Metody flexibilního protein-proteinového (**Příloha 3**) a flexibilního protein-ligandového (**Příloha 4**) „docking“ byly použity pro získání struktur, které nebyly vyřešeny experimentálními technikami. Pro studium globální a lokální dynamiky binárních komplexů pol β /DNA (**Příloha 2**), ternárních komplexů pol β /DNA/dNTP (**Příloha 1**) a binárního komplexu cytochromu P450/cytochrom b_5 (**Příloha 3**) byla použita metoda klasické molekulové dynamiky. S cílem porovnání relativní stability skupiny binárních komplexů cytochromu P450/cytochrom b_5 byla použita metoda „Steered Molecular Dynamics“ (SMD) (**Příloha 3**). Elektrostatické potenciály molekul byly počítány řešením Poisson-Boltzmannovy rovnice (APBS) pomocí programu PyMol (**Příloha 1 a 3**).

Předkládaná disertační práce obsahuje také originální výsledky získané experimentálními metodami „místně-cílené mutagenese“, proteinové exprese, purifikace a měření enzymové kinetiky pol β a jejích mutantů (**Příloha 2**).

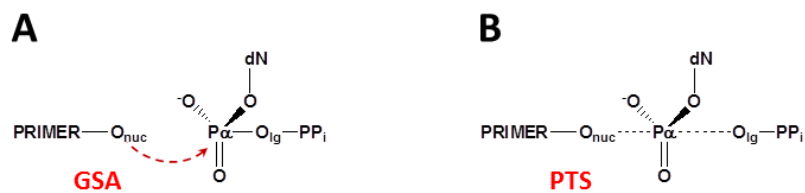
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Předkládaná práce je koncipována jako soubor publikací s původními výsledky, které jsou rozděleny do dvou bloků, jejichž společným tématem je studium enzymů účastnících se procesu karcinogeneze, konkrétně DNA polymerázy β a cytochromů P450. V prvním bloku jsou presentovány výsledky teoretického studia reakčního mechanismu a přesnosti („fidelity“) enzymu DNA polymerázy β a jeho mutantů. Ve druhém bloku jsou shrnuty poznatky ze studia interakce cytochromu P450 1A2 s cytochromem b_5 a aktivačního mechanismu kyseliny aristolochové I cytochromy P450 rodiny 1.

Blok I

Základním opravným mechanismem DNA je tzv. „Base Excision Repair“ (BER), který je obrannou organizmu proti jeho poškození. Porušení tohoto mechanismu může mít za následek vznik nádorového bujení. Součástí opravného systému BER je také DNA polymeráza β (pol β), která má za úkol vložení „správného“ nukleotidu do DNA na základě párování s bází templátového řetězce. Jak ukázaly předchozí studie, krokem limitujícím rychlost katalytického mechanismu pol β je „nukleotidyl-transferázová“ reakce (**Obrázek 3**), přičemž měřením enzymové kinetiky bylo zjištěno, že „špatný“ substrát je vkládán do DNA s velmi nízkou rychlostí. Proto hraje nukleofilní substituce významnou úlohu v mechanismu, který pol β využívá k rozlišení mezi „správným“ a „špatným“ substrátem.

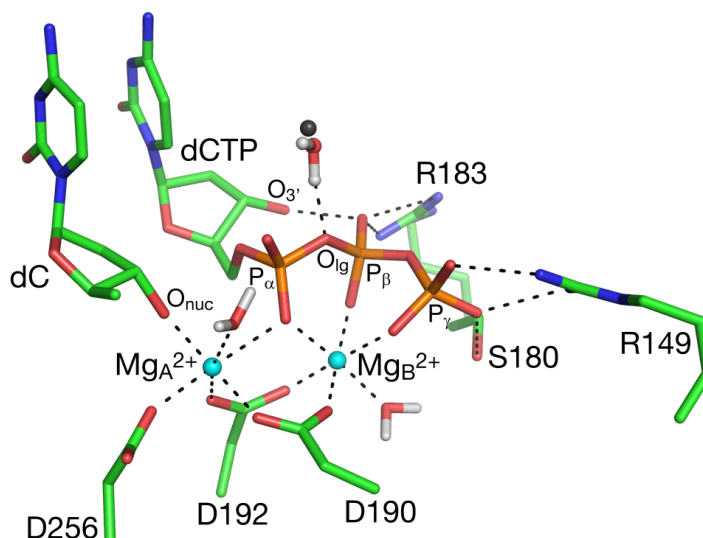
Cílem této části práce bylo objasnění příčiny rozdílných rychlostí nukleofilní substituce substrátu dNTP u „správného“ (dCTP:G) a „špatného“ (dATP:G) páru bází a kvantitativní predikce příspěvku rozdílné reaktivity k celkové „fidelitě“ pol β . Pro tento účel byl navržen tzv. „Electrostatic Linear Free Energy Response“ (EFER) model, kterým byly spočítány rozdíly volných energií mezi základním (GS) a tranzitním stavem (TS) u „správného“ a „špatného“ dNTP. S cílem eliminovat rozdíly mezi základním a tranzitním stavem byl použit aktivovaný tranzitní stav (GSA) a pentavalentní intermediát (PTS) nukleofilní substituce (**Obrázek 14**). Při přechodu ze základního stavu na aktivovaný dochází k deprotonaci 3'OH skupiny primeru. Volná energie této deprotonace je asi jen 3 kcal/mol, tudíž jsou si GS a GSA energeticky velmi podobné, a proto je aproximace použití GSA namísto GS možná. Geometrie PTS připomíná tranzitní stav nukleofilního ataku (**Obrázek 3A**), avšak s atomovými náboji odpovídající plně vyvinutému pentavalentnímu intermediátu. Vzhledem k velmi podobné struktuře „správné“ i „špatné“ báze v základní i tranzitním stavu, byl výpočet relativních volných energií omezen na její elektrostatickou složku.



Obrázek 14. Struktura aktivovaného tranzitního stavu (GSA) (A) a pentavalentního intermediátu (PTS) (B) nukleofilní substituce katalyzované enzymem DNA polymerázou β . Červená šipka ukazuje místo nukleofilního ataku.

Použitím modelu EFER bylo zjištěno, že elektrostatický příspěvek pol β při stabilizaci tranzitního stavu nukleofilní substituce v případě „správné“ báze je 5,3 kcal/mol, zatímco u „špatné“ báze to je pouze 3,1 kcal/mol (**Příloha 1, Tabulka 7S**). Rozdílná schopnost pol β stabilizovat tranzitní stav „správné“ a „špatné“ báze tak přispívá 80-ti násobkem k celkové „fidelitě“ pol β v případě dCTP:G a dATP:G párů bází. Tento výsledek ukazuje, že rozdílná reaktivita obou bází není jediným faktorem, který ovlivňuje „fidelitu“ pol β , neboť experimentální měření ukazují, že frekvence vkládání „špatné“ báze, je asi 1:3000 (Osheroff et al., 1999). Další příspěvky k „fidelitě“ pol β pravděpodobně pocházejí z rozdílné vazby dNTP do aktivního místa a rozdílů v deprotonaci 3'OH skupiny na primeru, ke které dochází před nukleofilní substitucí.

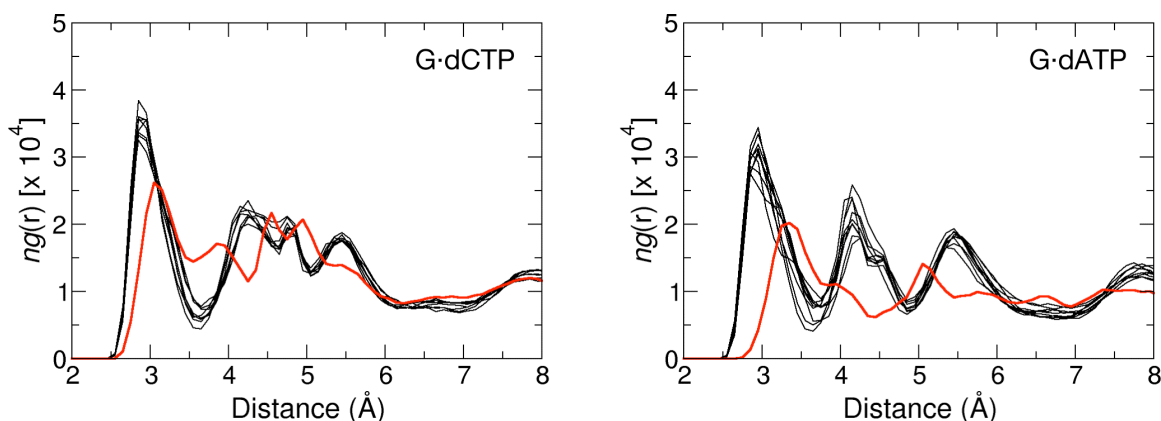
Metoda klasické molekulové dynamiky pak byla použita pro identifikaci strukturních prvků, důležitých pro katalýzu pol β . Těmi byly: vzdálenost mezi O_{nuc} a P_{α} , strukturní molekuly vody v blízkosti O_{ig} , párování bází a vodíková vazba mezi R183 a $O_{1\beta}$ (**Obrázek 15**).



Obrázek 15. „Snapshot“ z MD trajektorie GSA se správným dCTP:G párem bází. Molekula vody, která je nejbližší ke kyslíku odstupujícího pyrofosfátu je znázorněna tyčinkovo-kuličkovým modelem a obarvena červenou/bílou barvou. Molekula vody, která je v přibližně stejné pozici v krystalové struktuře je znázorněna šedou kuličkou. První koordinační sféra Mg^{2+} iontů a vodíkové vazby mezi aminokyselinami aktivního místa a skupinou trifosfátu jsou znázorněny přerušovanou čarou. Vodíkové atomy jsou ukázány pouze u molekul vod z MD, převzato z **přílohy 1** (Klvaňa, M., Jeřábek, P., Goodman, M.F. and Florián, J. *Biochemistry*. **50**, 7023, 2011).

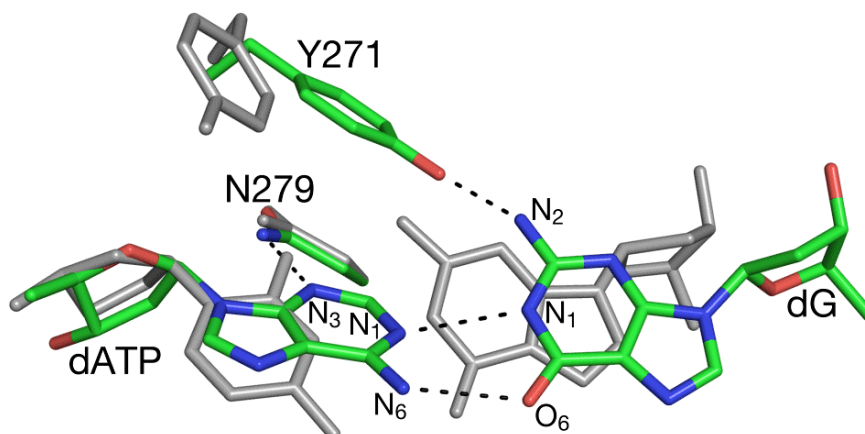
Srovnáním dynamiky „správného“ a „špatného“ páru bází v základním stavu bylo zjištěno, že u „správného“ páru dochází k většímu výskytu konfigurací, ve kterých je vzdálenost mezi O_{nuc} a P_{α} vhodná pro reakci (3,9% u „správného“ a u 0,6% u „špatného“ páru bází). Tento trend, který upřednostňuje reaktivitu „správné“ báze před „špatnou“, je konzistentní s předchozími výpočty (Florián et al., 2003).

Výskyt molekul vody v okolí odstupujícího atomu O_{lg} byl sledován kvůli možnosti přenosu protonu v průběhu reakce. Tato analýza odhalila větší výskyt molekul vody u „správného“ páru, přičemž při přechodu do tranzitního stavu se hustota molekul vody v okolí O_{lg} dále zvyšovala (**Obrázek 16**), avšak pouze malé procento těchto molekul vody je schopno tvořit vodíkovou vazbu s O_{lg} (4,7% v GSA a 0,7% v PTS u správného páru) (**Příloha 1, Tabulka 9S a 10S**). Nedá se tedy předpokládat synchronizovaný přenos protonu a vytváření/štěpení vazby kyslík-fosfor. Tato strukturální voda tedy pravděpodobně hraje úlohu při stabilizaci tranzitního stavu tvorbou vodíkových vazeb s pyrofosfátem. U „špatného“ páru je hustota molekul vody v okolí O_{lg} nižší v porovnání se „správným“ párem, což pravděpodobně vede k nižšímu k_{cat} pro jeho vložení DNA polymerázou β .



Obrázek 16. „Radial Distribution Functions“ (RDF) hydratace O_{1g} atomu v aktivním místě ternárního komplexu pol β /DNA/dNTP, který obsahuje vznikající dCTP:G (vlevo) a dATP:G (vpravo) pár bází. Každý graf reprezentuje relativní hustotu (počet) atomů kyslíku molekul vody, jako funkci jejich vzdálenosti od O_{1g} v GSA (červená) a PTS (černá) komplexech. Citlivost RDF, na malé změny podmínek v průběhu simulací je ukázána pro PTS, porovnáním RDF grafů, které byly získány z 8 paralelních simulací, převzato z **přílohy 1** (Klvaňa, M., **Jeřábek, P.**, Goodman, M.F. and Florián, J. *Biochemistry*. **50**, 7023, 2011).

Významným rozdílem mezi „správným“ a „špatným“ párem bází je jejich rozdílná schopnost tvorby vodíkových vazeb. V průběhu simulace základního a tranzitního stavu „špatného“ páru došlo ke vzniku stabilní vodíkové vazby mezi vodíkem dusíku N_1 substrátu dATP a dusíkem N_1 templátové dG báze (**Obrázek 17**), která nebyla pozorována ve výchozí krystalové struktuře. V simulaci „špatného“ páru byly tak pozorovány dvě stabilní vodíkové vazby. Délka nově vzniklé vodíkové vazby byla u „špatného“ páru v průměru o 0,13 Å kratší v základním stavu než ekvivalentní vodíková vazba u „správného“ páru. V případě „špatného“ páru došlo k prodloužení obou vodíkových vazeb v tranzitním stavu o 0,1 Å oproti základnímu stavu, zatímco u „správného“ páru došlo k prodloužení pouze o 0,02 Å. Získané výsledky ukazují na slabší vazbu „špatného“ substrátu do aktivního místa pol β a na destabilizaci vodíkových vazeb v tranzitním stavu. Tyto výsledky jsou konzistentní s experimentálními měřeními.



Obrázek 17. Porovnání průměrných struktur z molekulové dynamiky pro „správný“ dCTP:G (šedá) a „nesprávný“ dATP:G (zelená) pár bází v aktivovaném základním stavu ternárního komplexu pol β /DNA/dNTP. Vodíkové vazby páru dATP:G jsou ukázány přerušovanou čarou, převzato z **přílohy 1** (Klvaňa, M., **Jeřábek, P.**, Goodman, M.F. and Florián, J. *Biochemistry*. **50**, 7023, 2011).

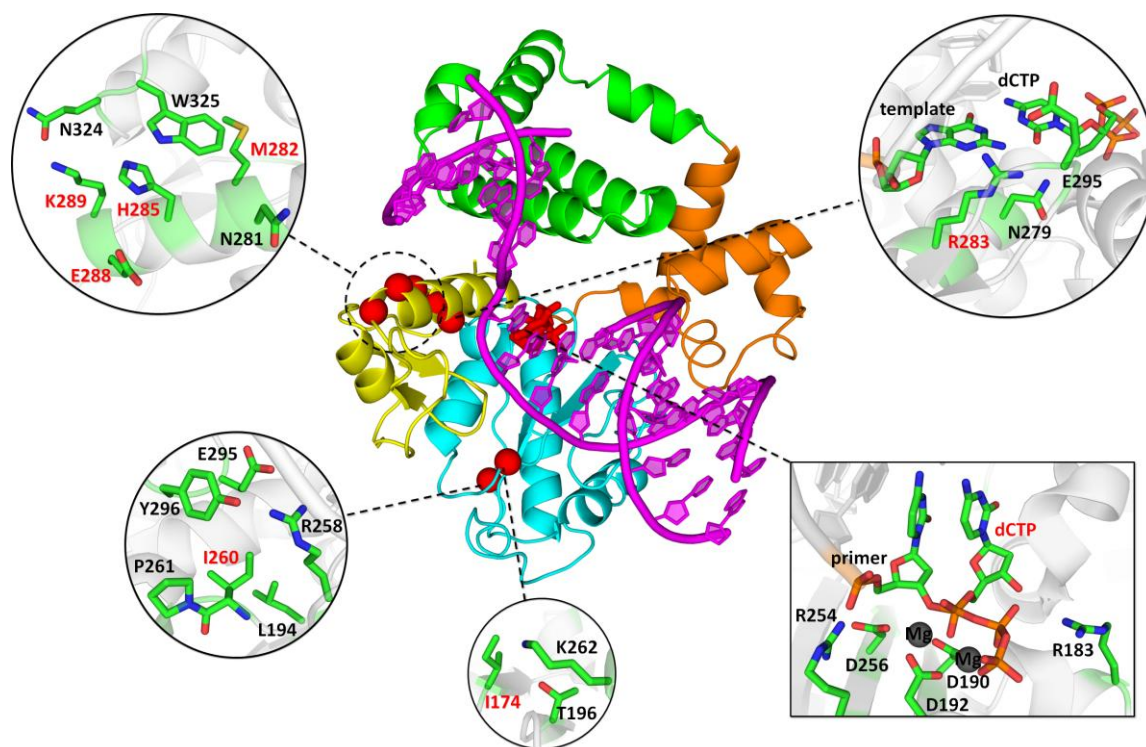
U mutantů pol β byla v předchozích studiích popsána inverzní korelace mezi k_{cat} a frekvencí výskytu intramolekulární vodíkové vazby mezi 3'OH báze a OP_{β} dNTP, tj. mutanti s vyšším k_{cat} mají tuto vodíkovou vazbu slabší (Martínek et al., 2007). Nově byla ukázána souvislost mezi zánikem této intramolekulární vodíkové vazby a vznikem vodíkové vazby mezi NH_2 skupinou R183 a $O_{1\beta}$ dNTP (**Obrázek 15**) a (**Příloha 1, Obrázek 6**), která stabilizuje tranzitní stav. U „správné“ báze dochází ke vzniku této stabilizační vodíkové vazby v tranzitním stavu mnohem častěji než u „špatné“ báze, což má za následek lepší stabilizaci tranzitního stavu a tedy snadnější inzerci do DNA.

Mezi sledované strukturní prvky byla zahrnuta také N-poddoména pol β , která hraje důležitou úlohu při diskriminaci mezi „správným“ a „špatným“ dNTP substrátem. Konformace této poddomény byla celkově méně uzavřená u struktury se „špatným“ párem bází, což je ve shodě s její polohou ve výchozí krystalové struktuře, kde byla překvapivě uzavřená asi z 90% (Batra et al., 2006) (**Obrázek 5**) a (**Příloha 1, Tabulka 8S, Obrázek 5S a 6S**).

Mutantní formy pol β byly zaznamenány až u 30% nádorových onemocnění u člověka. Tato skutečnost má pravděpodobně spojitost s nižší „fidelitou“ některých mutantů pol β , která vede k častějším chybám při opravě DNA a následně pak ke zvýšenému množství mutací, které mohou hrát úlohu v procesu tvorby nádorových buněk. Některé mutanty pol β , asociované s procesem karcinogeneze, obsahují jedno-bodové mutace, které se vyskytují poměrně daleko od aktivního místa enzymu, tzv. distální mutace. Navzdory

jejich vzdálenosti mají však značný vliv na katalytickou aktivitu a „fidelitu“ pol β . „Fidelitu“ mutantů polymeráz je možné vyjádřit poměrem účinností mutované formy a divokého typu ($\Omega = (k_{\text{pol}}/K_{\text{D}})_{\text{mut}} / (k_{\text{pol}}/K_{\text{D}})_{\text{WT}}$).

Pro ověření schopnosti predikce katalytických efektů distálních mutantů byly použity metody výpočetní chemie. Nejdříve byla vybrána sada šesti jednobodových mutantů pol β – I174S, I260Q, M282L, H285D, E288K a K289K (**Obrázek 18**), u kterých byl již dříve popsán negativní vliv na „fidelitu“ této polymerázy (Kosa and Sweasy, 1999; Shah et al., 2001; Lang et al., 2004; Starcevic et al., 2005; Yamtich et al., 2010; Donigan et al., 2012).



Obrázek 18. Pozice mutovaných aminokyselin v ternárním komplexu pol β /DNA/dNTP. Struktura DNA má fialovou barvu. N-terminální lyázová doména (zelená), D- (oranžová), C- (modrá) a N-poddomény (žlutá) polymerázové domény jsou nazvány v souladu s nomenklaturou DNA polymeráz. C_{α} atomy mutovaných reziduí jsou znázorněny červenou kuličkou; substrát dCTP je ukázán červeným tyčinkovým modelem. Vložené rámečky ukazují mutované aminokyseliny a jejich sousedy tyčinkovým modelem (atomy jsou obarveny podle atomových typů: uhlík – zelená; kyslík – červená; dusík – modrá; fosfor – oranžová; hořčík – tmavě šedá), převzato z **přílohy 2** (*Klvaňa, M., *Murphy, D.L., *Jeřábek, P., Goodman, M.F., Warshel, A., Sweasy, J.B. and Florián, J. *Biochemistry*. 2012, *these authors contributed to the paper equally).

Vzhledem k tomu, že se předchozí studie enzymové kinetiky pro jednotlivé mutanty lišili experimentálními podmínkami, jako např. sekvence DNA, byla provedena nová měření

pro všechny vybrané mutanty a divoký typ (WT) lidské pol β . Tato měření byla provedena za stejných podmínek, včetně použití stejné DNA. Tento sourodý soubor kinetických a strukturních dat umožnil eliminovat sekvenci DNA ze seznamu faktorů, které mohou nepříznivě ovlivnit získané hodnoty enzymových aktivit. Výsledky experimentálních měření (**Tabulka 1**) ukázaly, že u všech mutantů došlo ke zvýšení k_{pol} v případě vkládání „správného“ dNTP (2-3x při srovnání s WT).

Tabulka 1. Konstanty enzymové kinetiky pro vložení substrátu dCTP a dATP naproti dG báze templátového řetězce divokým typem DNA polymerázy β a jejími mutanty, převzato z **přílohy 2** (*Klvaňa, M., *Murphy, D.L., *Jeřábek, P., Goodman, M.F., Warshel, A., Sweasy, J.B. and Florián, J. *Biochemistry*. 2012, *these authors contributed to the paper equally).

Varianta	GC			GA			Vliv mutace na fidelitu		
	$k_{\text{pol}} (\text{s}^{-1})$	$K_{\text{d}} (\mu\text{M})$	$k_{\text{pol}}/K_{\text{d}}$ ($\text{s}^{-1}, \text{M}^{-1}$)	$k_{\text{pol}} (\text{s}^{-1})$	$K_{\text{d}} (\mu\text{M})$	$k_{\text{pol}}/K_{\text{d}}$ ($\text{s}^{-1}, \text{M}^{-1}$)	$\log R^{\text{a}}$	$\log B^{\text{b}}$	$\log F^{\text{c}}$
WT	8,9 ± 0,3	1,7 ± 0,3	5,2 × 10 ⁶	0,071 ± 0,008	210 ± 50	340	0,0	0,0	0,0
I260Q	18,0 ± 1,0	12,0 ± 3,0	1,5 × 10 ⁶	0,225 ± 0,009	32 ± 5	7000	-0,2	-1,7	-1,9
H285D	24,0 ± 1,0	4,0 ± 0,9	6,0 × 10 ⁶	0,082 ± 0,009	120 ± 40	683	0,4	-0,6	-0,2
E288K	23,0 ± 1,0	5,0 ± 1,0	4,6 × 10 ⁶	0,110 ± 0,007	110 ± 20	1000	0,2	-0,7	-0,5
K289M	15,6 ± 0,6	3,2 ± 0,7	4,9 × 10 ⁶	0,059 ± 0,007	110 ± 40	540	0,3	-0,6	-0,2
I174S	22,2 ± 0,6	4,5 ± 0,6	4,9 × 10 ⁶	0,190 ± 0,010	80 ± 20	2400	0,0	-0,8	-0,9
M282L	16,4 ± 0,7	10,0 ± 2,0	1,6 × 10 ⁶	0,018 ± 0,001	250 ± 40	72	0,9	-0,7	0,2

^a $\log R = \log[(k_{\text{pol,GC}}/k_{\text{pol,GA}})_{\text{mut}} / (k_{\text{pol,GC}}/k_{\text{pol,GA}})_{\text{wt}}]$. ^b $\log B = -\log[(K_{\text{d,GC}}/K_{\text{d,GA}})_{\text{mut}} / (K_{\text{d,GC}}/K_{\text{d,GA}})_{\text{wt}}]$. ^c $\log F = \log R + \log B = \log [\text{fidelita}_{\text{mut}} / \text{fidelita}_{\text{wt}}]$

Tento nárůst byl však kompenzován slabší vazbou substrátu, tudíž celková katalytická účinnost ($k_{\text{pol}}/K_{\text{d}}$) zůstala nezměněná nebo byla snížena, což odpovídalo nulovým nebo záporným hodnotám $\log \Omega$ (**Tabulka 2**). Naproti tomu v případě „špatného“ dNTP došlo u všech mutantů, kromě M282L, ke zlepšení jeho vazby. U čtyř z těchto mutantů došlo také k nárůstu k_{pol} . Celkově tato měření potvrdila zvýšenou efektivitu při vkládání „špatného“ dNTP substrátu u všech mutantů, kromě M282L. V případě M282L byla pro dřívější měření použita potkaní pol β , což může být příčinou rozdílných výsledků.

Hodnoty $\log \Omega$ mohou být počítány z relativních volných energií mutant *versus* divoký typ v binárním komplexu a tranzitním stavu. (**Příloha 2, Obrázek 2, Rovnice 3 a**

5). Struktura a elektronová hustota tohoto tranzitního stavu byla použita ve studii „fidelity“ divokého typu pol β **příloha 1** (Klavaňa, M., **Jeřábek, P.**, Goodman, M.F. and Florián, J. *Biochemistry*. **50**, 7023, 2011). Pro výpočet těchto volných energií byly použity dvě metody výpočetní chemie - tzv. „Free-Energy Perturbation“ (FEP) a tzv. „Linear Interaction Energy“ (LIE) metody. Bohužel se však standardní formy obou metod neukázaly jako příliš vhodné, neboť výsledkem jejich použití byly příliš nadhodnocené hodnoty $\log \Omega$. Toto nadhodnocení bylo pravděpodobně důsledkem nedostatečné adaptace simulovaných systémů na velké změny celkových nábojů nebo dipólových momentů vedlejších řetězců mutovaných aminokyselin. Z tohoto důvodu bylo nutné zmírnit vliv elektrostatických příspěvků na výpočet volných energií metodami FEP a LIE. Dále dekompozicí volných energií počítané metodou FEP na příspěvek elektrostatický a příspěvek vdW, bylo zjištěno, že příspěvky vdW se značně lišili u některých mutací v porovnání s příspěvky vdW počítanými metodou LIE. Důvodem tohoto rozdílu byla špatná konvergence stérických energií v průběhu výpočtů FEP, proto vdW energie počítané metodou LIE byly považovány za mnohem spolehlivější. Tyto nedostatky obou metod vedly k navržení hybridní metody FEP/LIE, u které byla vdW energie nahrazena odpovídající energií počítanou metodou LIE a dále ke změně ve škálování elektrostatické energie u standardní metody FEP.

Vypočítané hodnoty $\log \Omega$, získané pro vkládání „správného“ a „špatného“ dNTP modifikovanou metodou FEP a FEP/LIE, byly dále porovnány s experimentem (**Tabulka 2**). Navržená metoda FEP/LIE se ukázala být přesnější než samotná modifikovaná metoda FEP. Hodnoty $\log \Omega$, získané pomocí metody FEP/LIE, pro jednotlivé mutanty, se pohybovaly v rozmezí od -0,7 (velmi negativní účinek mutace na účinnost vkládání) do 0,8 (velmi pozitivní efekt mutace). Ve většině případů se tyto hodnoty nacházely v rozmezí dané směrodatnou odchylkou od odpovídajících experimentálních hodnot. Tato směrodatná odchylka byla získána kombinací směrodatných odchylek experimentálních a teoretických hodnot. Největší nesoulad mezi teorií a experimentem se vyskytl v případě vkládání „správného“ dNTP mutantem E288K, u kterého bylo vypočteno 6-ti násobné zvýšení rychlosti, zatímco experimentální měření neukázala prakticky žádnou změnu. Tento mutant představuje extrémní případ, neboť u něj dochází ke změně záporného náboje vedlejšího řetězce na kladný, což vyžaduje velmi přesný výpočet elektrostatické energie. Vypočtené hodnoty $\log \Omega$ vykazují vysokou chybu (0,1 až 1,3), která je

způsobena především pomalou konvergencí výpočtů FEP. Bylo odhadnuto, že desetinásobným prodloužením délky simulací FEP dojde ke snížení této odchylky přibližně na polovinu. Celkově se vypočtené hodnoty více shodují s experimentem v případě „správného“ páru (standardní odchylka 0,9 pro FEP a 0,4 pro FEP/LIE) než u „špatného“ páru (standardní odchylka 1,1 pro FEP a 1,0 pro FEP/LIE). Tento výsledek může ukazovat na existenci rozdílných tranzitních stavů u „správného“ a „špatného“ páru bází. Metody FEP a FEP/LIE byly dále použity pro predikci efektu mutantů R283A a R283L na katalytickou aktivitu pol β . Metody FEP/LIE se ukazují jako vhodný nástroj pro výpočet vlivu vzdálených mutantů, které kromě kvantitativních výpočtu příspěvků volné energie, poskytují také pohled na dynamiku tranzitního stavu.

Tabulka 2. Relativní účinnost vkládání dNTP mutanty DNA polymerázy β , převzato z **přílohy 2** (*Klvaňa, M., *Murphy, D.L., *Jeřábek, P., Goodman, M.F., Warshel, A., Sweasy, J.B. and Florián, J. *Biochemistry*. 2012, *these authors contributed to the paper equally).

Mutant	$\log \Omega$ (GC)				$\log \Omega$ (GA)			
	FEP	FEP/LIE	Experiment		FEP	FEP/LIE	Experiment	
			Tato studie	Ostatní studie			Tato studie	Ostatní studie
I174S	1,1 ± 0,5	0,2 ± 0,3	0,0 ± 0,2	-0,5	0,8 ± 0,4	0,1 ± 0,5	0,8 ± 0,3	0,6
I260Q	0,0 ± 0,1	-0,6 ± 0,3	-0,5 ± 0,2		-1,0 ± 0,7	-0,6 ± 0,6	1,3 ± 0,2	
M282L	0,2 ± 0,6	-0,4 ± 0,5	-0,5 ± 0,2	-0,3	0,1 ± 0,3	-0,1 ± 0,5	-0,7 ± 0,3	0,2
H285D	1,2 ± 0,4	0,1 ± 0,8	0,1 ± 0,2		0,8 ± 0,9	-0,5 ± 0,9	0,3 ± 0,3	
E288K	1,1 ± 0,5	0,8 ± 0,6	-0,1 ± 0,2		0,6 ± 0,9	0,3 ± 0,9	0,5 ± 0,3	
K289M	-0,8 ± 0,1	-0,4 ± 0,4	0,0 ± 0,2	-2,1	-0,9 ± 0,1	-0,7 ± 0,3	0,2 ± 0,4	
R283A	-1,4 ± 0,6	-1,1 ± 1,2		-2,4	0,0 ± 1,2	0,0 ± 1,3		-0,4
R283L	-1,7 ± 0,9	-1,5 ± 1,2			1,5 ± 0,2	1,2 ± 1,0		

Dále byl také studován vliv mutací na dynamiku M-poddomény pol β , která hraje důležitou úlohu při diskriminaci mezi „správným“ a „špatným“ substrátem dNTP. Konformace této poddomény se značně mění při navázání dNTP do aktivního místa. Analýza konformačních změn M-poddomény byla provedena v simulacích binárního komplexu pol β /DNA (otevřená konformace M-poddomény) a ternárního komplexu pol β /DNA/dNTP se „správným“ (uzavřená konformace) a „špatným“ (částečně uzavřená konformace) substrátem v tranzitním stavu (**Obrázek 5**).

V případě mutantů a WT v částečně uzavřené a uzavřené konformaci docházelo pouze k malým pohybům v blízkosti počáteční konformace (**Příloha 2, Tabulka S3**,

Obrázek S6 a S7). Naproti tomu v simulacích v otevřené konformaci byl zaznamenán velký pohyb této poddomény (**Příloha 2, Tabulka S3, Obrázek S4**). Největší flexibilita byla zaznamenána v případě mutace I174S, která se v některých chvílích dostávala téměř do uzavřené konformace, avšak poté se opět vracela zpět. Tento výsledek ukazuje na existenci energeticky náročných změn ve struktuře proteinu, ke kterým dochází těsně před uzavřením N-poddomény. Součástí této změny je pravděpodobně zánik iontového páru R258-D192 a vznik iontového páru R258-E295 a interakce mezi D192 a Mg^{2+} (Sawaya et al., 1997). V případě mutantu I174S, který jevil největší fluktuaci v konformaci M-poddomény byly tyto změny skutečně částečně pozorovány (**Příloha 2, Obrázek S3**). K simulaci úplného uzavření by bylo zapotřebí simulovat mnohem delší časový úsek, než 10 ns, nebo použít jinou metodu molekulového modelování.

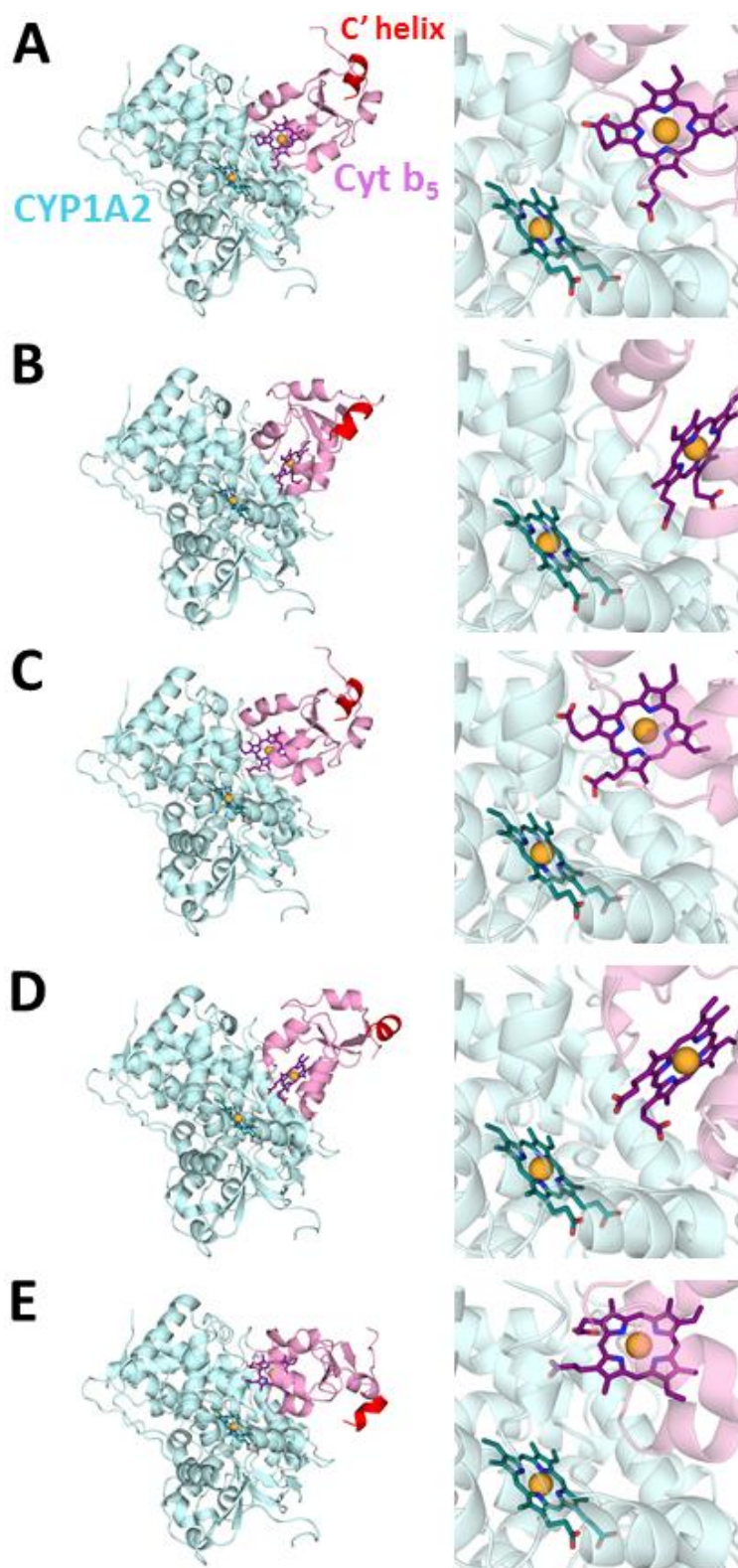
Blok II

Cytochromy P450 (CYP) jsou enzymy, které se účastní metabolismu širokého spektra xenobiotik. V případě některých xenobiotik může docházet, vlivem CYP, k jejich aktivaci, čímž se zvyšuje jejich toxicita pro organismus. Bylo zjištěno, že katalytická aktivita některých CYP může být modulována cytochromem b_5 (cyt b_5). Mechanismus této modulace nebyl doposud zcela objasněn. Objasnění způsobu jakým tyto dva proteinů spolu interagují, by přineslo zásadní posun v této problematice.

Cílem této studie tedy bylo předpovědět strukturu binárního komplexu lidského CYP1A2 s cyt b_5 pomocí metody molekulového modelování. CYP1A2 byl vybrán vzhledem k tomu, že cyt b_5 vykazuje schopnost modulovat jeho aktivitu v případě oxidace Sudanu I (Stiborová, 2006) a ellipticinu (Kotrbová et al., 2011).

V prvním kroku byla použita metoda flexibilního protein-proteinového „docking“ (viz. kapitola „Techniky molekulového modelování“), pro kterou byla použita krystalová struktura C-terminální domény lidského CYP1A2 a homologní model N-terminální domény cyt b_5 . Tento model byl vytvořen na základě struktury vysoce homologního hovězího cyt b_5 , jehož primární sekvence je velmi podobná lidskému cyt b_5 .

Při hledání struktury dvou vzájemně interagujících proteinů je nutné prohledat obrovský konformační prostor, a to je velmi náročné na výpočetní zdroje. Pro omezení tohoto prohledávání na konkrétní oblast, byly použity výsledky z experimentálních studií. Výsledkem „dockovacího“ procesu byla sada pravděpodobných struktur, které byly dále rozděleny do pěti skupin na základě jejich strukturní podobnosti (**Příloha 3, Tabulka S1**). Z každé skupiny byla vybrána struktura s nejmenší vzdáleností mezi hemy obou cytochromů (**Obrázek 19**). Vzdálenost mezi těmito hemy ovlivňuje pravděpodobnost, s jakou může dojít k transferu elektronů z cyt b_5 na CYP1A2, který jej využívá pro oxidaci substrátu.

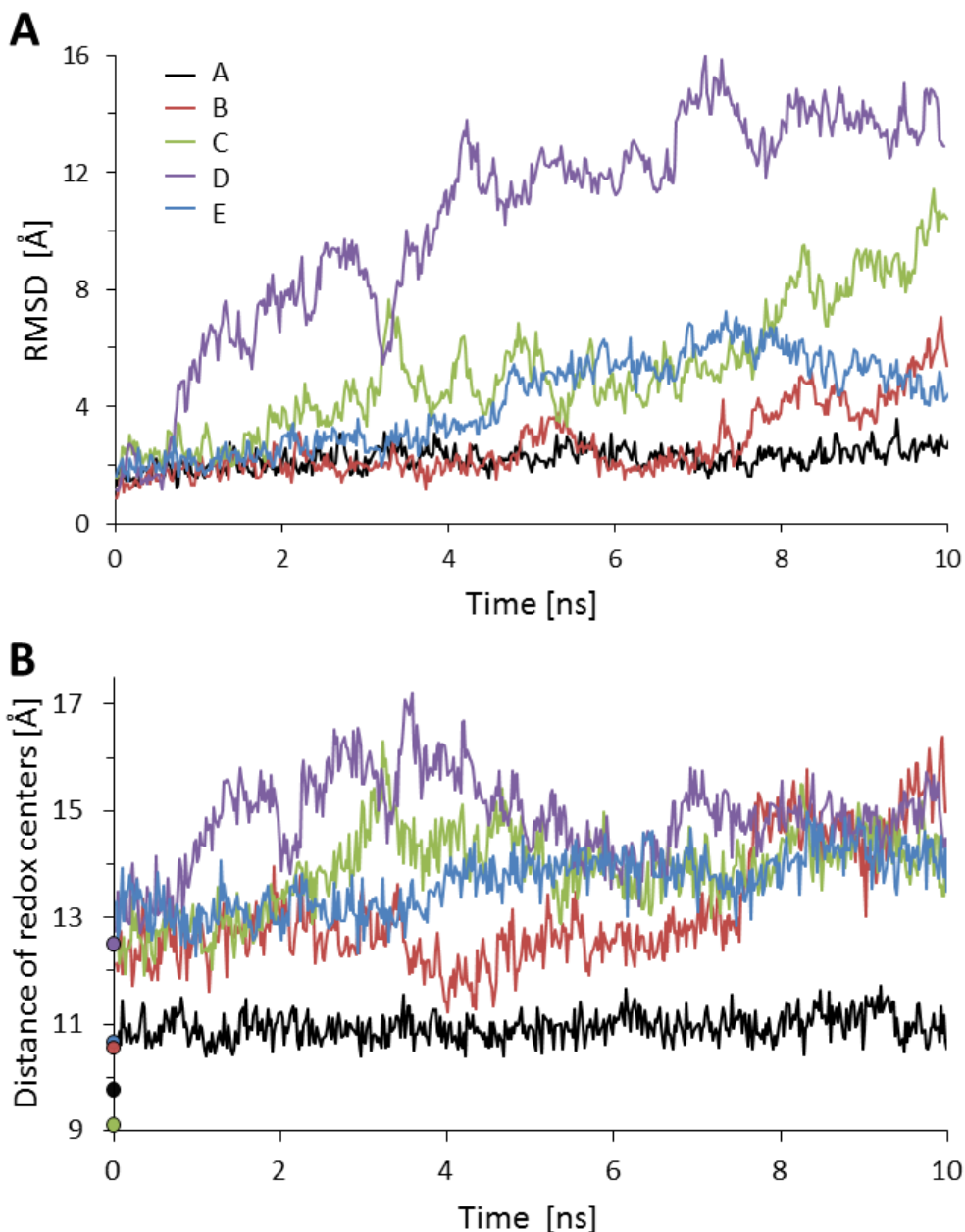


Obrázek 19. Struktury binárních komplexu cytochromu P450 1A2 (růžová) s cytochromem b₅ (modrá), které reprezentují jednotlivé skupiny pravděpodobných struktur, získaných protein-proteinovým „dockingem“. Označení A až E odpovídá označení těchto skupin (**Příloha 3, Tabulka 1**). Struktury proteinů jsou ukázány schématicky (vlevo). Kofaktory (hemy) jsou znázorněny tyčinkovým modelem a atom železa oranžovou kuličkou. Napravo je detail, ukazující vzájemnou orientaci molekul hemu, převzato z **přílohy 3 (Jeřábek, P. et al. manuscript)**.

Vzhledem k omezené možnosti optimalizace geometrie proteinového komplexu, vzniklého v průběhu „dockovacího“ procesu, je možné, že některé komplexy nejsou stabilní, ačkoliv byly hodnoceny danou „dockovací“ metodou jako stabilní. Pro odhalení těchto falešně pozitivních výsledků byla použita metoda klasické molekulové dynamiky (MD) (viz. kapitola „Techniky molekulového modelování“), kterou bylo simulováno chování vybraných komplexů v průběhu 10 ns. Sledováním celkové energie simulovaných systému, bylo ukázáno, že u všech pěti komplexů došlo v průběhu prvních 2 ns ke značné optimalizaci této energie (**Příloha 3, Obrázek 2**). Tento pokles, však v pozvolnějším tempu pokračoval až do konce simulace. Toto ukazuje, že délka simulace nebyla dostatečná pro úplnou optimalizaci.

Sledováním mobility cyt b_5 na povrchu CYP1A2, pomocí měření směrodatné odchylky koordinát (RMSD) cyt b_5 , bylo ukázáno, že komplexy B, C, D a E vykazují vyšší mobilitu, což může indikovat jejich nízkou stabilitu (**Obrázek 20A**). Je pravděpodobné, že by u těchto komplexů, při simulaci delšího časového úseku, docházelo k dalšímu rozpadání, které by skončilo úplnou disociací obou proteinů. Vzdálenost redoxních center proteinů, nezávisle na složení aminokyselin mezi nimi, je důležitá pro přenos elektronu, přičemž vzdálenost do 14 Å se ukazuje jako dostatečná pro rychlý průběh redoxní reakce (Page et al., 1999). U komplexu A, který se ukazuje jako jediný stabilní, se tato vzdálenost pohybuje mezi 10 - 11 Å (**Obrázek 20B**) a umožňuje tak dostatečně rychlý přenos elektronů, zatímco u ostatních se zvyšuje až na 15 Å.

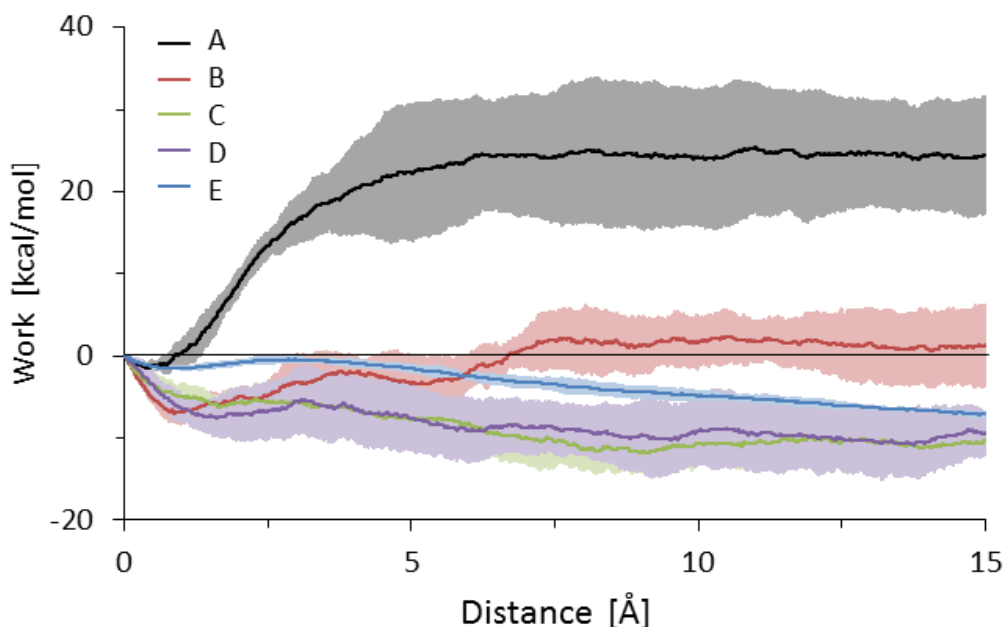
Ke stabilizaci těchto protein-proteinových komplexů významně přispívají také vodíkové vazby a iontové interakce. Počet intermolekulárních vodíkových vazeb mezi CYP1A2 a cyt b_5 , byl monitorován v průběhu MD simulací u všech pěti komplexů (**Příloha 3, Obrázek 4**). Výsledky ukázaly, že přestože počáteční struktury některých komplexů obsahovaly více vodíkových vazeb než stabilní komplex A, docházelo u nich v průběhu simulace k rozpadu. Proto evaluace stability proteinových komplexů čistě na základě počtu vodíkových vazeb nebo iontových párů u statické struktury je nepřesná. Molekulová dynamika je tak velmi důležitým nástrojem pro kontrolu stability proteinových komplexů.



Obrázek 20. Změna RMSD cytochromu b_5 (A) a vzdálenosti redoxních center cytochromu P450 1A2 a cytochromu b_5 (B) v průběhu 10 ns simulace molekulové dynamiky komplexu A (černá), B (červená), C (zelená), D (fialová) a E (modrá). Hodnota RMSD byla počítána pro páteřní atomy cytochromu b_5 , kdy v každém kroku byl proveden strukturální překryv páteřních atomů cytochromu P450 1A2 s počáteční strukturou. Barevné kolečka na vertikální ose ukazují vzdálenost redoxních center u struktur před ekvilibrací, převzato z **přílohy 3 (Jeřábek, P. et al. manuscript)**.

Pro nezávislé hodnocení stability komplexů byla použita metoda „Steered Molecular Dynamics“ (SMD) (viz. kapitola „Techniky molekulového modelování“), kterou byla měřena práce nutná pro separaci cyt b_5 od CYP1A2. Výsledky ukázaly, že pouze v případě komplexu A bylo nutné vynaložit určitou práci pro separaci obou proteinů

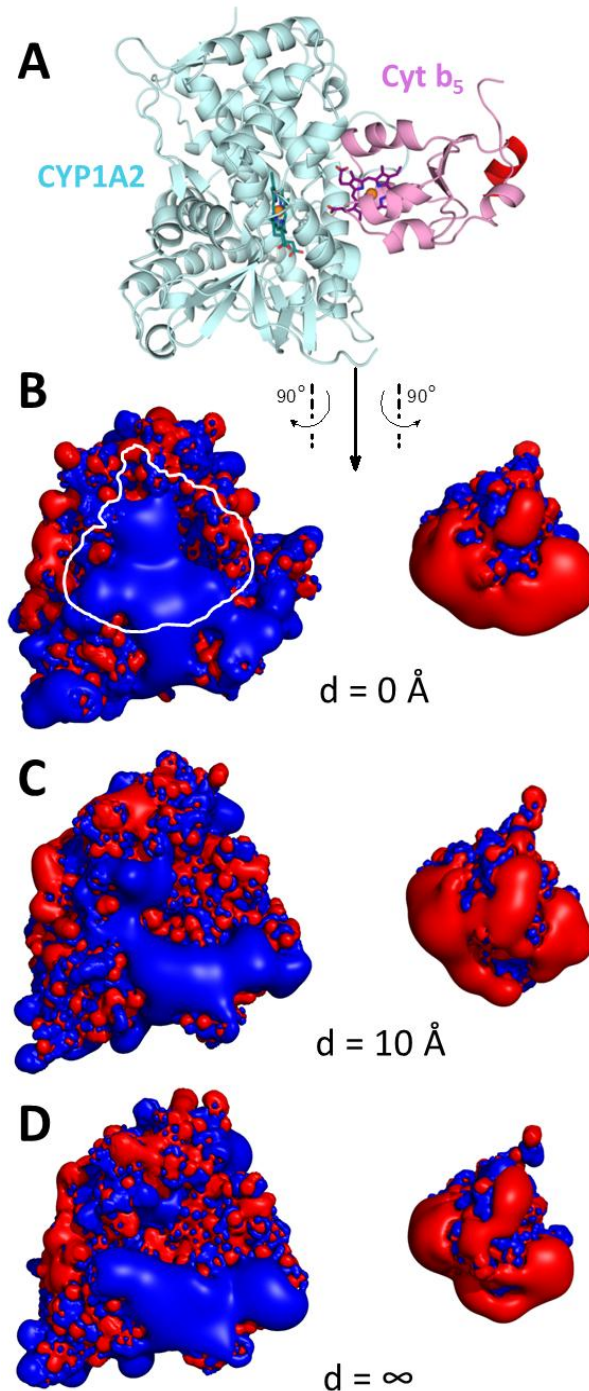
(**Obrázek 21**). V případě komplexů B, C, D a E byla tato práce negativní, což ukazuje na jejich nestabilitu. Paralelním použitím metody SMD, jako nástroje pro testování stability proteinového komplexu, bylo potvrzeno, že komplex A je pravděpodobně jako jediný stabilní.



Obrázek 21. Práce vykonaná při „tažení“ cyt b_5 od CYP1A2 v komplexu A (černá), B (červená), C (zelená), D (fialová) a E (modrá) metodou SMD. Barevná oblast okolo křivek ukazuje standardní odchylku vypočítanou ze tří paralelních simulací.

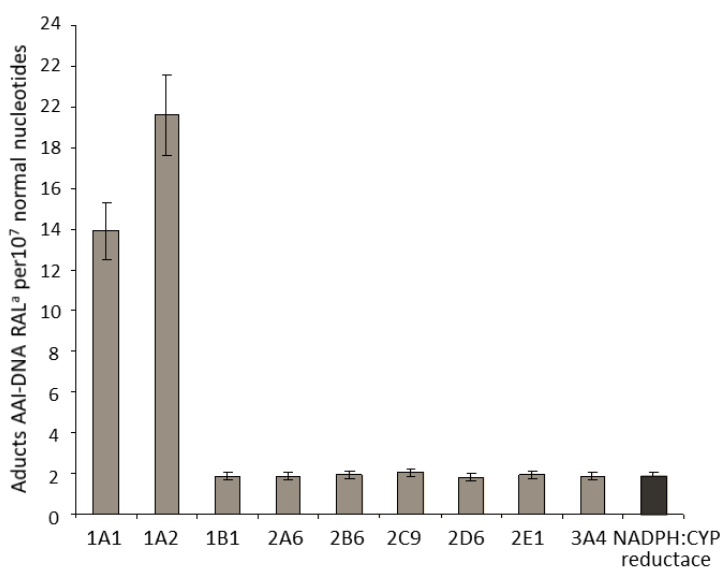
Vzhledem k opačným celkovým nábojům CYP1A2 (+11) a cyt b_5 (-8) bylo pravděpodobné, že elektrostatická energie hraje významnou úlohu v případě interakce těchto dvou proteinů. Z hlediska interakce protein-protein je však klíčové prostorové rozmístění tohoto náboje na povrchu proteinu. Z tohoto důvodu byl proveden výpočet a vizualizace elektrostatického potenciálu pro CYP1A2 a cyt b_5 v krystalové struktuře, komplexu A optimalizovaném 10 ns molekulovou dynamikou a struktuře komplexu A získaného ze simulace SMD, kde byli CYP1A2 a cyt b_5 separováni na vzdálenost 10 Å (**Obrázek 22**). Tyto tři struktury simulují postupné přibližování obou proteinů. Při výpočtech elektrostatických potenciálů nedocházelo ke vzájemnému ovlivňování jednoho proteinu druhým, takže se na obrázku jejich potenciály navzájem neovlivňují. Na základě vizualizace těchto potenciálů lze usoudit na schopnost cyt b_5 měnit strukturu CYP1A2 v průběhu jejich vazby, což je zde demonstrováno zvýšenou bazicitou CYP1A2 v oblasti, kde dochází ke kontaktu s cyt b_5 . U cyt b_5 se rozložení nábojů mezi jednotlivými stavy

příliš neliší, pouze se při přibližování stává v oblasti kontaktu poněkud kyseljším. Jak je vidět z potenciálů počítaných pro krystalové struktury (**Obrázek 22D**) existuje již u nenavázaných proteinů prostorová elektrostatická komplementarita.



Obrázek 22. Změny elektrostatického potenciálu molekul CYP1A2 a cyt b₅, ke kterým docházelo při vzniku binárního komplexu A. Velké modré a červené oblasti indikují akumulaci pozitivního, resp. negativního náboje. Struktura komplexu A, která byla optimalizována 10 ns MD je znázorněna zjednodušeným stuhovým modelem (A); molekuly hemu jsou znázorněny tyčinkovým modelem a atom železa je oranžovou kuličkou. Komplex A byl rozložen a natočen tak, aby byla vidět kontaktní plocha, která je znázorněna elektrostatickými izokonturami ($\pm 2 \text{ kT/e}$) (B). Dále jsou ukázány izokontury částečně disociovaného komplexu A, kde byl cyt b₅ ve vzdálenosti 10 Å od CYP1A2 (C) a izokontury obou proteinů v nekonečné vzdálenosti (D), převzato z **přílohy 3** (Jeřábek, P. et al. manuscript).

CYP1A2, stejně jako řada ostatních CYP, katalyzuje aktivaci některých xenobiotik, při níž vznikají látky s genotoxickým účinkem. Jednou z takovýchto látek je kyselina aristolochová I (AAI), která způsobuje závažná nefropatická a nádorová onemocnění, jako je „Aristolochic Acid Nephropathy“ (AAN) (Schmeiser et al., 1996) a „Balkan Endemic Nephropathy“ (BEN) (Arlt et al., 2007). Bylo ukázáno, že její nitroredukcí některými enzymy vznikají látky, tzv. „ultimativní“ karcinogeny, které tvoří kovalentní adukty s DNA, což může mít také za následek vznik nádorových onemocnění (Schmeiser et al., 1996). Nejčastěji se vyskytující adukt s DNA, u pacientů, je 7-(deoxyadenozin- N^6 -yl)aristolaktam I (**Příloha 4, Obrázek 1**), který způsobuje transverzi AT \rightarrow TA. Mezi nejefektivnější enzymy, katalyzující nitroredukcí AAI, patří NAD(P)H:chinonoxidoreduktáza (NQO1). U člověka je AAI aktivována také jaterním CYP1A2 a v menší míře také CYP1A1 (Stiborová et al., 2005, 2012). Bylo zjištěno, že CYP1B1, navzdory blízké příbuznosti s podrodinou CYP1A, aktivuje AAI jen velmi málo (**Obrázek 23**).

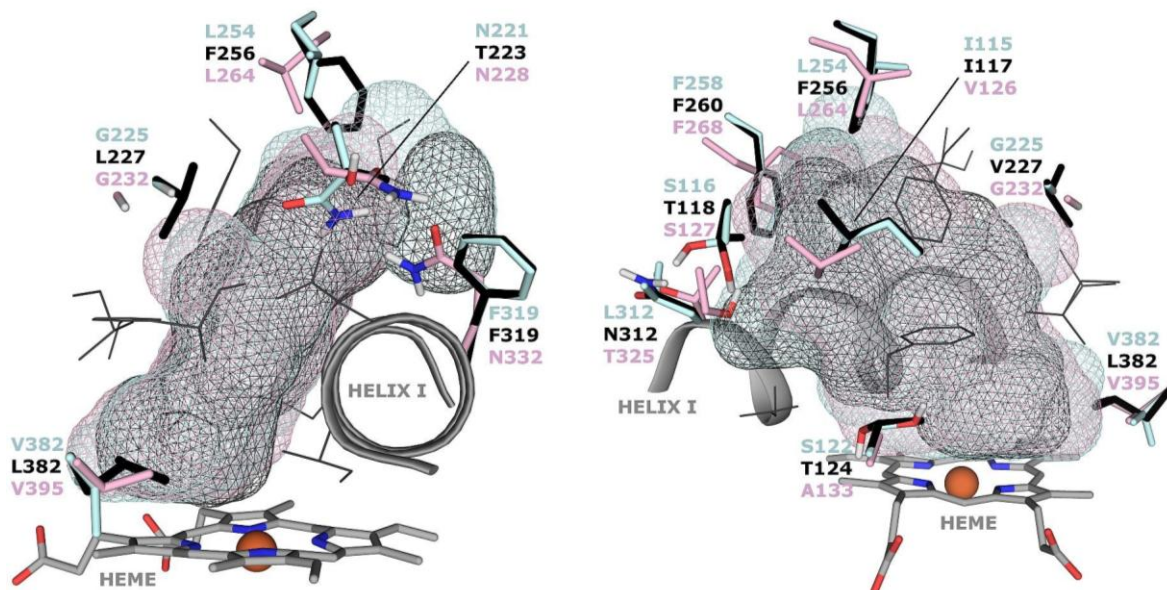


Obrázek 23. Tvorba aduktů kyseliny aristolochové I, aktivované jednotlivými CYP, s DNA, převzato z (Stiborová et al., 2005).

Mechanismus nitroredukce AAI katalyzované CYP nebyl doposud podrobněji prostudován. Přímý přenos hydridového aniontu, který byl navržen v případě redukce nitroreduktázou NQO1 (Martínek et al., 2011; Stiborová et al., 2011) je v tomto případě

málo pravděpodobný vzhledem k absenci vhodného hydridového donoru v aktivním místě CYP.

S cílem navrhnout možný mechanismus nitroredukce AAI CYP1A1/1A2 a nalézt příčinu rozdílů její aktivace v rámci rodiny CYP1, bylo provedeno strukturní porovnání CYP1A1/1A2/1B1 a použita metoda protein-substrátového flexibilního „docking“ (viz. kapitola „Techniky molekulového modelování“). Pro strukturní porovnání, byly z proteinové databáze získány struktury lidského CYP1A2 (PDB 2HI4) a CYP1B1 (PDB 3PM0). V případě CYP1A1 byla struktura získána homologním modelováním, které bylo provedeno na základě vysoce homologní struktury lidského CYP1A2 (72% identita). Toto porovnání ukazuje, že kavity všech třech proteinů velmi podobný tvar (**Obrázek 24**), avšak oblast blíže hemu je v rámci těchto struktur tvarově konzervovanější, než oblast v blízkosti povrchu proteinu. Z pohledu fyzikálně-chemického složení byly detekovány tři hlavní rozdíly mezi jednotlivými kavitami: (i) přítomnost nepolárního rezidua L312/CYP1A1 namísto polárních reziduí N312/CYP1A2 a T325/CYP1B1, (ii) A133/CYP1B1 nahrazuje polární rezidua S122/CYP1A1 a T124/CYP1B1 a (iii) nahrazení hydrofobního rezidua F319/1A1 a F319/1A2 polárním N332/CYP1B1. Tyto změny se pravděpodobně podílejí na odlišné substrátové preferenci jednotlivých enzymů.



Obrázek 24. Strukturní přeložení aktivních míst CYP1A1 (světle modrá), 1A2 (černá) a 1B1 (růžová), pohled z boku (vlevo) a zepředu (vpravo). Vnitřní povrchy kavit pro vazbu substrátu jsou ukázány jako síť. Vedlejší řetězce nekonzervovaných aminokyselin (barva odpovídá barvě povrchu) a molekula hemu (šedý) jsou ukázány tyčinkovým modelem, zatímco ostatní aminokyseliny jsou znázorněny černými linkami; atom železa je znázorněn oranžovou kuličkou. Hlavní rozdíly, ve složení vedlejších řetězců, které má za následek změnu vazebného místa, jsou označeny hvězdičkou, převzato z **přílohy 4** (Jeřábek, P. et al. manuscript).

S cílem prozkoumat mechanismus redukce AAI CYP1A1/1A2 a CYP1B1, byla modelována vazba AAI do jejich aktivního místa použitím flexibilního protein-substrátového „dockingů“. Kofaktor hem ve vstupních strukturách byl v základním stavu, kde je železo v trojmocné formě. Použité krystalové struktury obsahovaly původně jiný substrát (α -naftoflavon), proto byly vedlejší řetězce některých aminokyselin v průběhu „dockovacího“ procesu ponechány flexibilní, což umožnilo adaptaci vazebné kavity na nový substrát.

V případě všech třech CYP byla získána velmi podobná struktura nejstabilnějšího vazebného „módu“ AAI (**Obrázek 25**). Predikované vazebné energie a vzdálenosti molekuly AAI od hemu byly také velmi podobné (**Tabulka 3**). Tento výsledek ukazuje na velmi podobný způsob vazby substrátu AAI do aktivního centra u všech tří CYP. Tento vazebný mód velmi pravděpodobně umožňuje přenos elektronu z aromatického systému hemu na nitroskupinu prostřednictvím karboxylové skupiny a aromatického systému molekuly AAI. Analýzou vodíkových vazeb mezi substrátem a jeho okolím bylo zjištěno, že v případě CYP1A1 je v aktivním centru přítomna unikátní vodíková vazba mezi amino skupinou vedlejšího řetězce aminokyseliny N221 a kyslíkem dioxolanového kruhu

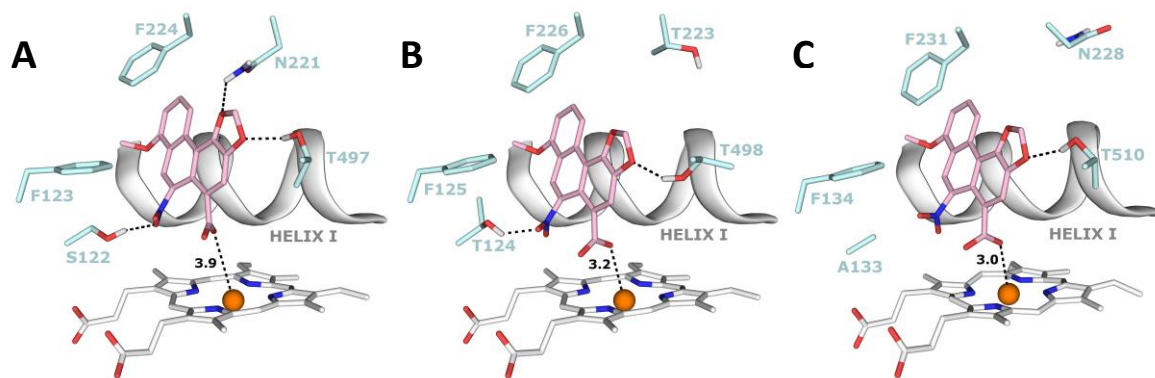
substrátu AAI, jejíž existence má za následek oddálení molekuly AAI od hemu o 0,7 Å. Toto pozorování koreluje s experimentem, který ukazuje, že schopnost CYP1A1 redukovat AAI je přibližně o 30% nižší než v případě CYP1A2 (**Obrázek 23**).

Pokusili jsme se dále vysvětlit propastný rozdíl v aktivaci mezi CYP1A1/2 a strukturně velmi podobného CYP1B1. V případě CYP1A1/1A2 byla zjištěna vodíková vazba mezi hydroxylovou skupinou S122/CYP1A1 (T124/CYP1A2) a nitroskupinou AAI, která u CYP1B1 chybí, neboť na odpovídajícím místě je A133. Hydroxylová skupina S122/CYP1A1 (T124/CYP1A2) může být donorem protonu v mechanismu redukce nitroskupiny, který předpokládá postupný přísun elektronů a protonů. Právě toto zjištění by umožnilo vysvětlit velmi malou redukční aktivitu CYP1B1, která je asi desetkrát menší v porovnání s CYP1A2. Tato domněnka byla dále potvrzena porovnáním krystalografických struktur rodiny CYP2, které vykazují malou redukční aktivitu vůči AAI. Stejně jako v případě CYP1B1, byly také u těchto CYP, v poloze odpovídající A133, nalezeny pouze rezidua hydrofobních aminokyselin (A, I, F a V). Rozdíly v redukci AAI u jednotlivých CYP však mohou mít také jiný původ. Příkladem může být limitovaná vazba substrátu do aktivního místa, které je u studovaných CYP zanořeno hluboko v proteinu a dostupné pouze úzkým tunelem, jenž může být neprostupný pro některé substráty. Potvrzení nebo vyloučení této teorie je však již mimo možnosti flexibilního „docking“.

Tabulka 3. Odhadnutá hodnota volné vazebné energie a vzdálenosti mezi molekulou kyseliny aristolochové I a hemem pro energeticky nejlepší vazebné „módy“, převzato z přílohy 4 (Jeřábek, P. et al. manuscript).

	Volná vazebná energie [kcal/mol]	Vzdálenost COO ⁻ (AAI) – Fe ³⁺ (hem) [Å] ^a
CYP1A1	5,66	3,9
CYP1A2	5,81	3,2
CYP1B1	5,59	3,0

^a Vzdálenost mezi nejbližším atomem kyslíku karboxylové skupiny AAI a atomem železa hemu.



Obrázek 25. Nejlepší vazebné orientace molekuly AAI získané „dockingem“ do aktivních míst CYP1A1 (A), CYP1A2 (B) a CYP1B1 (C). AAI (růžová), hemový kofaktor (šedý) a důležité aminokyseliny aktivního místa (světle modrá) jsou ukázány tyčinkovým modelem. Vodíkové vazby mezi molekulou AAI a aminokyselinami aktivního místa jsou ukázány přerušovanou černou čarou; atom železa je znázorněn oranžovou kuličkou, převzato z přílohy 4 (Jeřábek, P. et al. manuscript).

5. ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce, která je souborem čtyř odborných prací, přispívá k vysvětlení molekulárního mechanismu enzymů spojených s procesem karcinogeneze; „fidelity“ DNA polymerázy β , interakce cytochromu P450 1A2 s cytochromem b_5 a mechanismu nitroredukce karcinogenu kyseliny aristolochové I cytochromy P450 1A1 a 1A2. Nejdůležitější poznatky, kterých bylo v disertační práci dosaženo, jsou shrnuty do následujících bodů:

Blok I (Modelování DNA polymerázy β a jejích mutantů)

- Navržený model EFER je vhodný pro studium katalytického mechanismu DNA polymerázy β (pol β).
- Bylo ukázáno, že k „fidelitě“ pol β velkou měrou přispívá rozdílná schopnost aktivního místa komplexu pol β /DNA stabilizovat tranzitní stav nukleofilní substituce u „správného“ a „špatného páru“, elektrostatickými interakcemi.
- Rozdíl elektrostatických energií mezi „správným“ a „špatným“ dNTP přispívá 80-ti násobkem k celkové „fidelitě“ pol β v případě párů bází dCTP:G a dATP:G.
- Dle očekávání k „fidelitě“ pol β přispívá také horší vazba „špatného“ dNTP do aktivního místa, která je mimo jiné způsobena nižší schopností tvorby vodíkových vazeb s templátovou bází.
- V ternárním komplexu pol β /DNA/dNTP se „správný“ dNTP vyskytuje s vyšší frekvencí v reaktivní konfiguraci, kde je nukleofilní kyslík na ribóze primerové báze blíže k atakovanému atomu fosforu navázaného dNTP, což se částečně podílí na jeho vyšší reaktivitě.
- Přenos protonu, synchronizovaný s nukleofilní substitucí, byl ukázán jako nepravděpodobný, vzhledem k nepřítomnosti vhodného donoru vodíku v okolí substrátu dNTP.
- Navržené metody výpočtu volné energie FEP/LIE a modifikovaný FEP se ukázaly být vhodnější pro hodnocení vlivů vzdálených mutací pol β na „fidelitu“, než testované standardní výpočty FEP a LIE.

- V případě uzavírání N-poddomény pol β dochází k energeticky náročným změnám ve struktuře proteinu, ke kterým dochází těsně před uzavřením nebo otevřením N-poddomény. Tyto změny však nelimitují rychlost, s jakou pol β syntetizuje DNA.

Blok II (Modelování cytochromů P450 1A1, 1A2, 1B1 a cytochromu b₅)

- Metoda flexibilního protein-proteinového „docking“ je vhodná pro počáteční odhad struktury binárního komplexu CYP1A2/cyt b₅, i když některé jí predikované orientace jsou nestabilní. Tato metoda má tedy tendenci poskytnout i falešně pozitivní výsledky.
- Metody klasické MD a SMD jsou vhodné pro porovnání relativní stability několika binárních komplexů CYP1A2 s cyt b₅. Jejich rychlost je v případě akcelerace pomocí GPU přijatelná i pro systémy složené ze dvou proteinů.
- Elektrostatická interakce je pravděpodobně významná pro stabilizaci binárního komplexu CYP1A2 s cyt b₅.
- Cyt b₅ indukuje změny v rozložení náboje na povrchu CYP1A2 v průběhu jejich interakce.
- Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ve vazbě AAI do aktivních center CYP1A1, 1A2 a 1B1, takže rozdíly v efektivitě redukce AAI těmito enzymy spočívá pravděpodobně v jiném kroku než v afinitě k těmto CYP.
- Pro nitroredukcí kyseliny aristolochové I CYP1A1 a 1A2 byl navržen mechanismus, který zahrnuje krokový přísun dvou elektronů a dvou protonů. Jako velmi pravděpodobný donor protonu se ukazuje hydroxylová skupina vedlejšího řetězce serinu a threoninu v binárním komplexu AAI-CYP1A1(1A2), která je lokalizovaná v blízkosti nitroskupiny molekuly AAI.

SEZNAM CITACÍ

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2008. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. Garland Science.
- Arlt, V.M., Stiborová, M., vom Brocke, J., Simões, M.L., Lord, G.M., Nortier, J.L., Hollstein, M., Phillips, D.H., Schmeiser, H.H., 2007. Aristolochic acid mutagenesis: molecular clues to the aetiology of Balkan endemic nephropathy-associated urothelial cancer. *Carcinogenesis* 28, 2253–2261.
- Armuth, V., Berenblum, I., 1972. Systemic promoting action of phorbol in liver and lung carcinogenesis in AKR mice. *Cancer Res.* 32, 2259–2262.
- Bakhtina, M., Lee, S., Wang, Y., Dunlap, C., Lamarche, B., Tsai, M.-D., 2005. Use of viscogens, dNTPalphaS, and rhodium(III) as probes in stopped-flow experiments to obtain new evidence for the mechanism of catalysis by DNA polymerase beta. *Biochemistry* 44, 5177–5187.
- Bakhtina, M., Roettger, M.P., Tsai, M.-D., 2009. Contribution of the reverse rate of the conformational step to polymerase beta fidelity. *Biochemistry* 48, 3197–3208.
- Batra, V.K., Beard, W.A., Shock, D.D., Krahn, J.M., Pedersen, L.C., Wilson, S.H., 2006. Magnesium-induced assembly of a complete DNA polymerase catalytic complex. *Structure* 14, 757–766.
- Batra, V.K., Beard, W.A., Shock, D.D., Pedersen, L.C., Wilson, S.H., 2008. Structures of DNA polymerase beta with active-site mismatches suggest a transient abasic site intermediate during misincorporation. *Mol. Cell* 30, 315–324.
- Beard, W.A., Shock, D.D., Vande Berg, B.J., Wilson, S.H., 2002. Efficiency of correct nucleotide insertion governs DNA polymerase fidelity. *J. Biol. Chem.* 277, 47393–47398.
- Beard, W.A., Shock, D.D., Wilson, S.H., 2004. Influence of DNA structure on DNA polymerase beta active site function: extension of mutagenic DNA intermediates. *J. Biol. Chem.* 279, 31921–31929.
- Beard, W.A., Wilson, S.H., 2006. Structure and mechanism of DNA polymerase Beta. *Chem. Rev.* 106, 361–382.
- Benson, D.E., Suslick, K.S., Sligar, S.G., 1997. Reduced oxy intermediate observed in D251N cytochrome P450cam. *Biochemistry* 36, 5104–5107.
- Black, S.D., Martin, S.T., Smith, C.A., 1994. Membrane topology of liver microsomal cytochrome P450 2B4 determined via monoclonal antibodies directed to the halt-transfer signal. *Biochemistry* 33, 6945–6951.
- Boiteux, S., Guillet, M., 2004. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst.)* 3, 1–12.
- Bridges, A., Gruenke, L., Chang, Y.T., Vakser, I.A., Loew, G., Waskell, L., 1998. Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *J. Biol. Chem.* 273, 17036–17049.
- Brøsen, K., 1995. Drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P450 1A2. *Clin Pharmacokinet* 29 Suppl 1, 20–25.
- Cleaver, J.E., 1968. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* 218, 652–656.
- Cojocar, V., Balali-Mood, K., Sansom, M.S.P., Wade, R.C., 2011. Structure and Dynamics of the Membrane-Bound Cytochrome P450 2C9. *PLoS Comput Biol* 7, e1002152.

- Coon, M.J., Vaz, A.D., McGinnity, D.F., Peng, H.M., 1998. Multiple activated oxygen species in P450 catalysis: contributions To specificity in drug metabolism. *Drug Metab. Dispos.* 26, 1190–1193.
- Cribb, A.E., Peyrou, M., Muruganandan, S., Schneider, L., 2005. The endoplasmic reticulum in xenobiotic toxicity. *Drug Metab. Rev.* 37, 405–442.
- Dalal, S., Starcevic, D., Jaeger, J., Sweasy, J.B., 2008. The I260Q variant of DNA polymerase beta extends mispaired primer termini due to its increased affinity for deoxynucleotide triphosphate substrates. *Biochemistry* 47, 12118–12125.
- de Vries, S.J., van Dijk, A.D.J., Krzeminski, M., van Dijk, M., Thureau, A., Hsu, V., Wassenaar, T., Bonvin, A.M.J.J., 2007. HADDOCK versus HADDOCK: new features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. *Proteins* 69, 726–733.
- Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G., Schlichting, I., 2005. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem. Rev.* 105, 2253–2277.
- Dianov, G., Lindahl, T., 1994. Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway. *Curr. Biol.* 4, 1069–1076.
- Donigan, K.A., Sun, K., Nemeč, A.A., Murphy, D.L., Cong, X., Northrup, V., Zelterman, D., Sweasy, J.B., 2012. Human POLB gene is mutated in high percentage of colorectal tumors. *J. Biol. Chem.* 287, 23830–23839.
- Dürr, U.H.N., Waskell, L., Ramamoorthy, A., 2007. The cytochromes P450 and b5 and their reductases--promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 3235–3259.
- Eaton, D.L., Gallagher, E.P., Bammler, T.K., Kunze, K.L., 1995. Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics* 5, 259–274.
- Enoch, H.G., Strittmatter, P., 1979. Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* 254, 8976–8981.
- Florián, J., Goodman, M.F., Warshel, A., 2003. Computer simulation studies of the fidelity of DNA polymerases. *Biopolymers* 68, 286–299.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Sobol, R.W., Wilson, S.H., Dogliotti, E., 1998. Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry* 37, 3575–3580.
- Friedberg, E.C., 2006. *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd ed. American Society for Microbiology.
- Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L.S., Lane, D.P., Abbondandolo, A., Dogliotti, E., 1996. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 271, 9573–9578.
- Gotoh, O., 1992. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.* 267, 83–90.
- Gotoh, O., 2012. Evolution of cytochrome p450 genes from the viewpoint of genome informatics. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 812–817.
- Grinberg, A.V., Hannemann, F., Schiffler, B., Müller, J., Heinemann, U., Bernhardt, R., 2000. Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins* 40, 590–612.
- Gruenke, L.D., Konopka, K., Cadieu, M., Waskell, L., 1995. The stoichiometry of the cytochrome P-450-catalyzed metabolism of methoxyflurane and benzphetamine in the presence and absence of cytochrome b5. *J. Biol. Chem.* 270, 24707–24718.

- Grygiel, J.J., Birkett, D.J., 1981. Cigarette smoking and theophylline clearance and metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 30, 491–496.
- Guengerich, F.P., 1983. Oxidation-reduction properties of rat liver cytochromes P-450 and NADPH-cytochrome p-450 reductase related to catalysis in reconstituted systems. *Biochemistry* 22, 2811–2820.
- Guengerich, F.P., 2001. Uncommon P450-catalyzed reactions. *Curr. Drug Metab.* 2, 93–115.
- Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., Nussinov, R., 2002. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins* 47, 409–443.
- Hanukoglu, I., 2006. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metab. Rev.* 38, 171–196.
- Hasemann, C.A., Kurumbail, R.G., Boddupalli, S.S., Peterson, J.A., Deisenhofer, J., 1995. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* 3, 41–62.
- Hegesh, E., Hegesh, J., Kaftory, A., 1986. Congenital methemoglobinemia with a deficiency of cytochrome b5. *N. Engl. J. Med.* 314, 757–761.
- Cheatham, T.E., 3rd, Young, M.A., 2000. Molecular dynamics simulation of nucleic acids: successes, limitations, and promise. *Biopolymers* 56, 232–256.
- Jarzynski, C., 1997. Equilibrium free-energy differences from nonequilibrium measurements: A master-equation approach. *Phys. Rev. E* 56, 5018–5035.
- Johnson, K.A., 1993. Conformational coupling in DNA polymerase fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 685–713.
- Joyce, C.M., Benkovic, S.J., 2004. DNA polymerase fidelity: kinetics, structure, and checkpoints. *Biochemistry* 43, 14317–14324.
- Kimata, Y., Shimada, H., Hirose, T., Ishimura, Y., 1995. Role of Thr-252 in cytochrome P450cam: a study with unnatural amino acid mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 96–102.
- Knudson, A.G., 2001. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 157–162.
- Kosa, J.L., Sweasy, J.B., 1999. 3'-Azido-3'-deoxythymidine-resistant mutants of DNA polymerase beta identified by in vivo selection. *J. Biol. Chem.* 274, 3851–3858.
- Kotrbová, V., Mrázová, B., Moserová, M., Martínek, V., Hodek, P., Hudeček, J., Frei, E., Stiborová, M., 2011. Cytochrome b(5) shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy. *Biochem. Pharmacol.* 82, 669–680.
- Kunkel, T.A., Bebenek, K., 2000. DNA replication fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 497–529.
- Lang, T., Maitra, M., Starcevic, D., Li, S.-X., Sweasy, J.B., 2004. A DNA polymerase beta mutant from colon cancer cells induces mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 6074–6079.
- Li, D.-C., Ji, B.-H., 2012. Free energy calculation of single molecular interaction using Jarzynski's identity method: the case of HIV-1 protease inhibitor system. *Acta Mechanica Sinica* 28, 891–903.
- Lindahl, T., 1974. An N-Glycosidase from *Escherichia coli* That Releases Free Uracil from DNA Containing Deaminated Cytosine Residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 3649–3653.
- Lindahl, T., 1976. New class of enzymes acting on damaged DNA. *Nature* 259, 64–66.

- Loeb, L.A., Preston, B.D., 1986. Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu. Rev. Genet.* 20, 201–230.
- Makris, T.M., Denisov, I., Schlichting, I., Sligar, S.G., 2010. Activation of Molecular Oxygen by Cytochrome P450, in: Montellano, P.R.O. de (Ed.), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Springer.
- Martínek, V., Bren, U., Goodman, M.F., Warshel, A., Florián, J., 2007. DNA polymerase beta catalytic efficiency mirrors the Asn279-dCTP H-bonding strength. *FEBS Lett.* 581, 775–780.
- Martínek, V., Kubickova, B., Arlt, V.M., Frei, E., Schmeiser, H.H., Hudecek, J., Stiborova, M., 2011. Comparison of activation of aristolochic acid I and II with NADPH:quinone oxidoreductase, sulphotransferases and N-acetyltransferases. *Neuro Endocrinol. Lett.* 32 Suppl 1, 57–70.
- Montellano, P.R.O. de, De Voss, J.J., 2010. Substrate Oxidation by Cytochrome P450 Enzymes, in: Montellano, P.R.O. de (Ed.), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Springer.
- Morgan, E.T., Coon, M.J., 1984. Effects of cytochrome b5 on cytochrome P-450-catalyzed reactions. Studies with manganese-substituted cytochrome b5. *Drug Metab. Dispos.* 12, 358–364.
- Omura, T., Ito, A., 1991. Biosynthesis and intracellular sorting of mitochondrial forms of cytochrome P450. *Meth. Enzymol.* 206, 75–81.
- Osheroff, W.P., Beard, W.A., Wilson, S.H., Kunkel, T.A., 1999. Base substitution specificity of DNA polymerase beta depends on interactions in the DNA minor groove. *J. Biol. Chem.* 274, 20749–20752.
- Ozalp, C., Szczesna-Skorupa, E., Kemper, B., 2006. Identification of membrane-contacting loops of the catalytic domain of cytochrome P450 2C2 by tryptophan fluorescence scanning. *Biochemistry* 45, 4629–4637.
- Page, C.C., Moser, C.C., Chen, X., Dutton, P.L., 1999. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* 402, 47–52.
- Paine, M.J.I., Scrutton, N.S., Munro, A.W., Gutierrez, A., Roberts, G.C.K., Wolf, R.C., 2010. Electron Transfer Partners of Cytochrome P450, in: Montellano, P.R.O. de (Ed.), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Springer.
- Pernecky, S.J., Larson, J.R., Philpot, R.M., Coon, M.J., 1993. Expression of truncated forms of liver microsomal P450 cytochromes 2B4 and 2E1 in *Escherichia coli*: influence of NH₂-terminal region on localization in cytosol and membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 2651–2655.
- Phillips, D.H., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat. Res.* 443, 139–147.
- Phillips, D.H., 2002. Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis* 23, 1979–2004.
- Ponder, J.W., Case, D.A., 2003. Force fields for protein simulations. *Adv. Protein Chem.* 66, 27–85.
- Porta, C., Riboldi, E., Sica, A., 2011. Mechanisms linking pathogens-associated inflammation and cancer. *Cancer Lett.* 305, 250–262.
- Porter, T.D., 2002. The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16, 311–316.
- Poulos, T.L., Finzel, B.C., Howard, A.J., 1987. High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J. Mol. Biol.* 195, 687–700.

- Poulos, T.T., Johnson, E.F., 2010. Structures of Cytochrome P450 Enzymes, in: Montellano, P.R.O. de (Ed.), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Springer.
- Pylypenko, O., Schlichting, I., 2004. Structural aspects of ligand binding to and electron transfer in bacterial and fungal P450s. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 991–1018.
- Pylypenko, O., Vitali, F., Zerbe, K., Robinson, J.A., Schlichting, I., 2003. Crystal structure of OxyC, a cytochrome P450 implicated in an oxidative C-C coupling reaction during vancomycin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 278, 46727–46733.
- Rittle, J., Green, M.T., 2010. Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics. *Science* 330, 933–937.
- Rivera, M., Seetharaman, R., Girdhar, D., Wirtz, M., Zhang, X., Wang, X., White, S., 1998. The reduction potential of cytochrome b5 is modulated by its exposed heme edge. *Biochemistry* 37, 1485–1494.
- Sakaguchi, M., Omura, T., 1993. Topology and biogenesis of microsomal cytochrome P-450s, in: Ruckpaul, K., Rein, H. (Eds.), *Medicinal Implications in Cytochrome P-450 Catalyzed Biotransformations*. Akademie Verlag.
- Sansen, S., Yano, J.K., Reynald, R.L., Schoch, G.A., Griffin, K.J., Stout, C.D., Johnson, E.F., 2007. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *J. Biol. Chem.* 282, 14348–14355.
- Sawaya, M.R., Pelletier, H., Kumar, A., Wilson, S.H., Kraut, J., 1994. Crystal structure of rat DNA polymerase beta: evidence for a common polymerase mechanism. *Science* 264, 1930–1935.
- Sawaya, M.R., Prasad, R., Wilson, S.H., Kraut, J., Pelletier, H., 1997. Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry* 36, 11205–11215.
- Shah, A.M., Conn, D.A., Li, S.X., Capaldi, A., Jäger, J., Sweasy, J.B., 2001. A DNA polymerase beta mutator mutant with reduced nucleotide discrimination and increased protein stability. *Biochemistry* 40, 11372–11381.
- Shaik, S., Cohen, S., Wang, Y., Chen, H., Kumar, D., Thiel, W., 2010. P450 enzymes: their structure, reactivity, and selectivity-modeled by QM/MM calculations. *Chem. Rev.* 110, 949–1017.
- Schmeiser, H.H., Bieler, C.A., Wiessler, M., van Ypersele de Strihou, C., Cosyns, J.P., 1996. Detection of DNA adducts formed by aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese herbs nephropathy. *Cancer Res.* 56, 2025–2028.
- Sobol, R.W., Watson, D.E., Nakamura, J., Yakes, F.M., Hou, E., Horton, J.K., Ladapo, J., Van Houten, B., Swenberg, J.A., Tindall, K.R., Samson, L.D., Wilson, S.H., 2002. Mutations associated with base excision repair deficiency and methylation-induced genotoxic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6860–6865.
- Srivastava, D.K., Berg, B.J., Prasad, R., Molina, J.T., Beard, W.A., Tomkinson, A.E., Wilson, S.H., 1998. Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J. Biol. Chem.* 273, 21203–21209.
- Srivastava, D.K., Husain, I., Arteaga, C.L., Wilson, S.H., 1999. DNA polymerase beta expression differences in selected human tumors and cell lines. *Carcinogenesis* 20, 1049–1054.
- Starcevic, D., Dalal, S., Sweasy, J., 2005. Hinge residue Ile260 of DNA polymerase beta is important for enzyme activity and fidelity. *Biochemistry* 44, 3775–3784.
- Starcevic, D., Dalal, S., Sweasy, J.B., 2004a. Is there a link between DNA polymerase beta and cancer? *Cell Cycle* 3, 998–1001.

- Starcevic, D., Dalal, S., Sweasy, J.B., 2004b. Is there a link between DNA polymerase beta and cancer? *Cell Cycle* 3, 998–1001.
- Stiborová, M., 2006. Modulation of CYP1A1-mediated oxidation of carcinogenic azo dye Sudan I and its binding to DNA by cytochrome b5. *Neuro Endocrinol. Lett.* 27 Suppl 2, 35–39.
- Stiborová, M., Asfaw, B., Frei, E., Schmeiser, H.H., Wiessler, M., 1995. Benzenediazonium ion derived from Sudan I forms an 8-(phenylazo)guanine adduct in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 489–498.
- Stiborová, M., Frei, E., Hodek, P., Wiessler, M., Schmeiser, H.H., 2005. Human hepatic and renal microsomes, cytochromes P450 1A1/2, NADPH:cytochrome P450 reductase and prostaglandin H synthase mediate the formation of aristolochic acid-DNA adducts found in patients with urothelial cancer. *Int. J. Cancer* 113, 189–197.
- Stiborová, M., Hudeček, Jiří, Hodek, Petr, Frei, Eva, 1999. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické Listy* 93, 229–237.
- Stiborová, M., Levová, K., Bárta, F., Shi, Z., Frei, E., Schmeiser, H.H., Nebert, D.W., Phillips, D.H., Arlt, V.M., 2012. Bioactivation versus detoxication of the urothelial carcinogen aristolochic acid I by human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Toxicol. Sci.* 125, 345–358.
- Stiborová, M., Mareis, J., Frei, E., Arlt, V.M., Martínek, V., Schmeiser, H.H., 2011. The human carcinogen aristolochic acid I is activated to form DNA adducts by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase without the contribution of acetyltransferases or sulfotransferases. *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 448–459.
- Sucato, C.A., Upton, T.G., Kashemirov, B.A., Batra, V.K., Martínek, V., Xiang, Y., Beard, W.A., Pedersen, L.C., Wilson, S.H., McKenna, C.E., Florián, J., Warshel, A., Goodman, M.F., 2007. Modifying the beta,gamma leaving-group bridging oxygen alters nucleotide incorporation efficiency, fidelity, and the catalytic mechanism of DNA polymerase beta. *Biochemistry* 46, 461–471.
- Sulc, M., Jecmen, T., Snajdrova, R., Novak, P., Martine, V., Hodek, P., Stiborova, M., Hudecek, J., submitted. Mapping of interaction between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5; the first evidence of two mutual interactions. *Neuro Endocrinol. Lett.*
- Swanson, H.I., 2004. Cytochrome P450 expression in human keratinocytes: an aryl hydrocarbon receptor perspective. *Chem. Biol. Interact.* 149, 69–79.
- Testa, B., Krämer, S.D., 2010. *The Biochemistry of Drug Metabolism*. Wiley VCH.
- Ueyama, N., Nishikawa, N., Yamada, Y., Okamura, T., Nakamura, A., 1996. Cytochrome P-450 Model (Porphinato)(thiolato)iron(III) Complexes with Single and Double NH \cdots S Hydrogen Bonds at the Thiolate Site. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 12826–12827.
- Ueyama, N., Terakawa, T., Nakata, M., Nakamura, A., 1983. Positive shift of redox potential of [Fe₄S₄(Z-cys-Gly-Ala-OMe)₄]²⁻ in dichloromethane. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 7098–7102.
- Vaughan, P., Lindahl, T., Sedgwick, B., 1993. Induction of the adaptive response of *Escherichia coli* to alkylation damage by the environmental mutagen, methyl chloride. *Mutat. Res.* 293, 249–257.
- Vergères, G., Waskell, L., 1995. Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie* 77, 604–620.
- Vidakovic, M., Sligar, S.G., Li, H., Poulos, T.L., 1998. Understanding the role of the essential Asp251 in cytochrome p450cam using site-directed mutagenesis, crystallography, and kinetic solvent isotope effect. *Biochemistry* 37, 9211–9219.

- Voice, M.W., Zhang, Y., Wolf, C.R., Burchell, B., Friedberg, T., 1999. Effects of human cytochrome b5 on CYP3A4 activity and stability in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 366, 116–124.
- Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E.F., McRee, D.E., 2000. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol. Cell* 5, 121–131.
- Williams, S.N., Dunham, E., Bradfield, C.A., 2010. Induction of Cytochrome P450 Enzymes, in: Montellano, P.R.O. de (Ed.), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Springer.
- Wilson, S.H., 1990. *The Eukaryotic Nucleus: Molecular Biochemistry and Macromolecular Assemblies, Volume II: v. 2*. CRC Press.
- Yamazaki, H., Nakamura, M., Komatsu, T., Ohyama, K., Hatanaka, N., Asahi, S., Shimada, N., Guengerich, F.P., Shimada, T., Nakajima, M., Yokoi, T., 2002. Roles of NADPH-P450 reductase and apo- and holo-cytochrome b5 on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 24, 329–337.
- Yamazaki, H., Nakano, M., Imai, Y., Ueng, Y.F., Guengerich, F.P., Shimada, T., 1996. Roles of cytochrome b5 in the oxidation of testosterone and nifedipine by recombinant cytochrome P450 3A4 and by human liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 325, 174–182.
- Yamazaki, H., Shimada, T., Martin, M.V., Guengerich, F.P., 2001. Stimulation of cytochrome P450 reactions by apo-cytochrome b5: evidence against transfer of heme from cytochrome P450 3A4 to apo-cytochrome b5 or heme oxygenase. *J. Biol. Chem.* 276, 30885–30891.
- Yamitch, J., Starcevic, D., Lauper, J., Smith, E., Shi, I., Rangarajan, S., Jaeger, J., Sweasy, J.B., 2010. Hinge residue I174 is critical for proper dNTP selection by DNA polymerase beta. *Biochemistry* 49, 2326–2334.
- Zerbe, K., Pylypenko, O., Vitali, F., Zhang, W., Rousset, S., Heck, M., Vrijbloed, J.W., Bischoff, D., Bister, B., Süßmuth, R.D., Pelzer, S., Wohlleben, W., Robinson, J.A., Schlichting, I., 2002. Crystal structure of OxyB, a cytochrome P450 implicated in an oxidative phenol coupling reaction during vancomycin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 277, 47476–47485.
- Zhang, H., Im, S.-C., Waskell, L., 2007. Cytochrome b5 increases the rate of product formation by cytochrome P450 2B4 and competes with cytochrome P450 reductase for a binding site on cytochrome P450 2B4. *J. Biol. Chem.* 282, 29766–29776.
- Zhang, H., Myshkin, E., Waskell, L., 2005. Role of cytochrome b5 in catalysis by cytochrome P450 2B4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 499–506.
- Zmudzka, B.Z., Fornace, A., Collins, J., Wilson, S.H., 1988. Characterization of DNA polymerase beta mRNA: cell-cycle and growth response in cultured human cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 9587–9596.

PŘÍLOHY

BLOK I

PŘÍLOHA 1

Klvaňa, M., Jeřábek, P., Goodman, M.F., Florián, J., 2011. **An Abridged Transition State Model To Derive Structure, Dynamics, and Energy Components of DNA Polymerase β Fidelity.** *Biochemistry*. **50**, 7023-7032.

PŘÍLOHA 2

*Klvaňa, M., *Murphy, D.L., *Jeřábek, P., Goodman, M.F., Warshel, A., Sweasy, J.B., Florián, J. 2012. **Catalytic Effects of Mutations of Distant Protein Residues in Human DNA Polymerase β : Theory and Experiment.** *Biochemistry, accepted.*

**these authors contributed to the paper equally*

PŘÍLOHY

BLOK II

PŘÍLOHA 3

Jeřábek, P., Martínek, V., Stiborová, M. Structural insight into protein-protein interactions within the complex of cytochrome P450 1A2 and cytochrome b5, application of computational approaches, *in preparation*.

PŘÍLOHA 4

Jeřábek, P., Martínek, V., Stiborová, M. Theoretical investigation of differences in nitroreduction of aristolochic acid I by cytochromes P450 1A1, 1A2 and 1B1, *submitted.*

