

Středoškolská odborná činnost 2010/2011

Obor 3 – chemie

## **Analýza přístupových cest z/do aktivních míst lidských cytochromů P450**

Autor: Eva Umlaufová  
Gymnázium, Jeseník, Komenského 281  
790 01 Jeseník, 3. ročník  
Olomoucký kraj

Konzultant:  
doc. RNDr. Michal Otyepka, Ph.D.  
PřF UP v Olomouci

**Jeseník 2010**

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem soutěžní práci pod vedením doc. RNDr. Michala Otyepky, Ph.D., vypracovala samostatně a v uvedeném seznamu zveřejnila všechny informační zdroje podle úplného znění zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), jak vyplývá ze změn provedených zákonem č. 81/2005 Sb., zákonem č. 61/2006 Sb., zákonem č. 216/2006 Sb. a zákonem č. 168/2008 Sb.

Jeseník 1. 3. 2011

podpis: .....

Poděkování:

Děkuji panu doc. RNDr. Michalu Otyepkovi, Ph.D., Mgr. Tereze Hendrychové, Mgr. Šárce Bartoňové a PaedDr. Evě Knoppové za cenné rady, ochotu a připomínky při zpracování této práce.

## **Anotace**

Analýza přístupových cest z/do aktivních míst lidských cytochromů P450 spočívá v přesné detekci aminokyselinových zbytků vstupních kanálů a ve zhodnocení jejich funkcí či vzájemné kooperace.

Tato práce předkládá výsledky, data a hypotézy pro rozvoj výzkumu enzymů cytochromů P450 jako metabolizátorů I. fáze biotransformace léčiv i jiných xenobiotik. Zároveň poukazuje na důležitost studia mikroskopického prostředí k pochopení dějů s makroskopickým projevem.

## **Klíčová slova**

Cytochromy P450, přístupové kanály, aminokyselinové zbytky.

## **Abstract**

The analysis of access routes to/from the active sites of human cytochromes P450 lies in the accurate detection of amino acid residues of the input channels and an evaluation of their functions and mutual cooperation.

This paper presents the results, data and hypothesis for development of the research of cytochrome P450 enzymes, which are involved in I. phase metabolism of drugs and other xenobiotics. It also highlights the importance of studying the microscopic environment to understand the phenomena with macroscopic manifestation.

## **Keywords**

Cytochrome P450, access channels, amino acid residues.

# Obsah

Obsah.....	4
Seznam zkratek.....	5
1. Úvod.....	6
2. Názvosloví.....	7
3. Struktura cytochromů P450, jejich kanály.....	7
3.1 Struktura.....	7
3.2 Klasifikace kanálů.....	8
3.3 Mechanismus otevírání kanálů.....	10
4. Metodika.....	11
4.1 CYP1A2.....	13
4.2 CYP2A6.....	13
4.3 CYP2C8.....	13
4.4 CYP2C9.....	13
4.5 CYP2D6.....	13
4.6 CYP3A4.....	13
5. Výsledky.....	14
5.1 Aktivní místa.....	14
5.2 Preference kanálů.....	16
5.3 Elektropolarita nejdůležitějších kanálů.....	17
6. Diskuse.....	31
7. Závěr.....	32
8. Seznam informačních zdrojů.....	33

## 1. Seznam zkratek

ALA	Alanin
ARG	Arginin
ASN	Asparagin
ASP	Asparágová kyselina
CYS	Cystein
GLN	Glutamin
GLU	Glutamová kyselina
GLY	Glycin
HIS	Histidin
ILE	Isoleucin
LEU	Leucin
LYS	Lysin
MET	Methionin
PHE	Fenylalanin
PRO	Prolin
SER	Serin
THR	Threonin
TRP	Tryptofan
TYR	Tyrosin
VAL	Valin
HEM	hem b
HEC	hem c

# 1. Úvod

Cytochromy P450 tvoří „superrodinu“ hemthiolátových biokatalyzátorů. Nomenklaturně se řadí mezi oxidoreduktasy. Ve všech živých organismech můžeme pokaždé najít několik forem (s výjimkou enterobakterií např. *Escherichia coli*). Avšak jejich počet se může dramaticky lišit. Zatímco u bakterií bylo stanoveno maximálně 20 forem cytochromů P450, u člověka jich v současnosti známe 57 a u rostlin se toto číslo pohybuje okolo 300. [1, 2]

Cytochromy P450 představují nejdůležitější systém I. fáze metabolismu látek endogenních (např. steroidy, mastné kyseliny), ale především exogenních nebo-li xenobiotik (např. léky, aditiva, aerosoly). Podílejí se na biotransformaci cca 50 % všech podávaných farmak, jejichž metabolismus je znám. Úkolem I. fáze je přeměna substrátu na polární meziproduct. Ten je v II. fázi metabolizován na hydrofilní derivát a následně vyloučen tělními tekutinami. Oxidace substrátu se odehrává v aktivním místě cytochromu P450, které je pohřbené uvnitř struktury a je přístupné pouze prostřednictvím přístupových cest čili kanálů/ tunelů. Cytochromy P450 jsou lokalizovány na endoplazmatickém retikulu (ER) buněk jater, mozku, plic, ledvin, placenty a střev. [3, 4]

Cytochromy P450 byly objeveny roku 1958 T. Omurou a R. Satem. [5] Lidské cytochromy P450 přitahují zájem vědců právě z toho důvodu, že se významnou měrou podílejí na metabolismu cizorodých látek. Koncem roku 2006 bylo vykrystalizováno sedm savčích forem těchto enzymů (z nich 5 lidských) a zveřejněno v sedmnácti strukturách (z nich 11 lidských). [6]

Detailní analýza struktur cytochromu P450 může pomoci předpovědět, jak se budou léky chovat, ovšem zda se chovají jako substrát, induktor či inhibitor můžeme zjistit pouze z biochemických experimentů. Znalost interakce léčiva s cytochromem P450 lze využít pro regulaci podávání léčiv a posouzení klinicky významných lékových interakcí, které mohou vést k drogové toxicitě, snížení nebo naopak zvýšení farmakologických účinků.

Pro vytvoření analýzy přístupových cest k aktivnímu místu enzymu je třeba popsat jejich strukturní vlastnosti. Strukturními vlastnostmi kanálů se myslí jejich délka, kanálová preference a umístění aminokyselinových zbytků v nich. Získaná data by měla pomoci určit obecné rysy nebo rozdíly mezi jednotlivými formami cytochromů. Toto zhodnocení je cílem mé práce, které by společně se studiem dynamiky enzymů mohlo přispět k pochopení mechanismu funkcí cytochromů P450 hlavně v metabolismu xenobiotik.

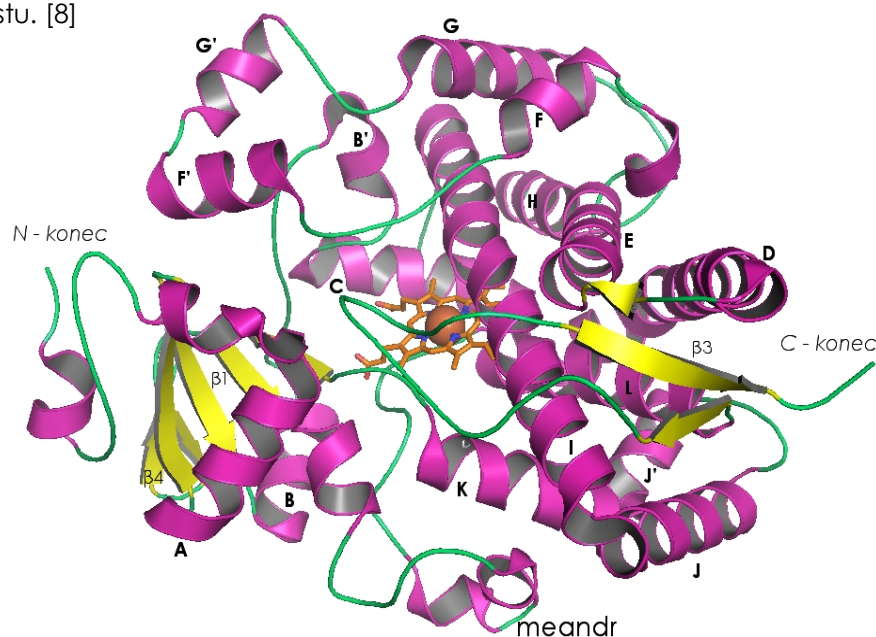
## 2. Názvosloví

Dnes je známo kolem 1000 různých genů pro enzymové formy cytochromů P450. Pro jejich přehlednost jsou na základě podobnosti primárních struktur rozděleny do rodin (kde je sekvenční homologie větší než 40 %) a podrodin (s homologií větší než 60 %). Pro cytochrom P450 se užívá zkratka CYP, za ní následuje číslo označení rodiny (CYP1), potom písmeno podrodiny (CYP1A) a poslední číslo označuje konkrétní gen (CYP1A1). Lidské cytochromy P450 jsou klasifikovány do 17 rodin, ale metabolismu xenobiotik se účastní pouze tři z těchto rodin: CYP1, CYP2, CYP3 (v malé míře též CYP4). [7]

## 3. Struktura cytochromů P450, jejich kanály

### 3.1 Struktura

Chceme-li se zabývat strukturou proteinů, je užitečné rozlišovat různé úrovně organizace. Pořadí aminokyselin v bílkovinném řetězci je *primární strukturou* bílkovin, která podmiňuje jejich biochemickou funkci. Makromolekuly bílkovin mají snahu stabilizovat se vytvářením takových prostorových uspořádání, v nichž by si aminokyselinové zbytky vzájemně nepřekážely. Hovoříme o *sekundární struktuře* bílkovin. Jejimi typickými motivy jsou  $\alpha$ -šroubovice ( $\alpha$ -helixy) a skládané listy  $\beta$ . Molekula bílkoviny získává charakteristický globulární či vláknitý tvar díky způsobu uspořádání sekundární struktury. Jde o tzv. *terciární strukturu*. Je-li protein tvořen více než jedním terciárně strukturovaným řetězcem, celkové uspořádání se označuje jako *kvarterní struktura*. Hluboko v proteinu je uložena prosthetická skupina - kofaktor hem b (protoporfyrin IX, železitý komplex). Počátkem řetězce proteinu je amino-konec (N-konec) a závěrem je karboxylový konec (C-konec).  $\alpha$ -šroubovice cytochromů P450 značíme směrem od N-konce po C-konec abecedně (Obr. 1). Hem se nachází ve vysoce zakonzervované „kapse“, jejímiž částmi jsou šroubovice D, E, J, K, L a nejdelší helix I, který prochází celou konformací jako pomyslná osa. V kontrastu k těmto šroubovicím jsou helixy A, B, F, G a H značně variabilní - u každé jiné formy cytochromu P450 se může měnit jak jejich aminokyselinová sekvence, tak i délka. Ve struktuře se také vyskytují F/G a B/C smyčky. Jejich nízká rigidita jim udává schopnost kontroly přístupu k aktivnímu místu. [8]



**Obr. 1** Abecedně (A – L) pojmenovaný stužkový model cytochromu P450 začínající N-koncem a končící C-koncem. Alfa-šroubovice jsou vyznačeny fialovými skruty a beta-listy žlutými pásy.

## 3. 2 Klasifikace kanálů

Autorem systematizace kanálů je skupina prof. R. C. Wadeové. Jsou to kanály 1, 2, 3, 4, 5 (dnes již méně značené zkratkou PW = z angl. pathways), solvatační a vodní kanál (Obr. 2). [8]

### 3. 2. 1 Kanál PW1

Výstup mezi C, C' helixem a H (nebo L) helixem, uzavírá se u G/H smyčky,  $\beta_2$ -listu.

### 3. 2. 2 Kanál PW2

Třída kanálu PW2 se dále dělí do šesti podtříd: 2a, 2b, 2c, 2ac, 2d, 2f.

Kanál 2a: výstup mezi F/G smyčkou, B/C smyčkou a  $\beta_1$ -listem. (V blízkosti jsou kanály 2d a 2f.)

Kanál 2b: výstup mezi B/C smyčkou a  $\beta_1, \beta_3$ -listem. (Velmi častého výskytu ve strukturách.)

Kanál 2c: výstup mezi G, I helixy a B/C smyčkou.

Kanál 2ac: výstup mezi vrcholem B/C smyčky a G helixem, vmezeřen mezi kanály 2c a 2a.

Kanál 2e: výstup zkrz B/C smyčkou.

Kanál 2d: výstup mezi N-koncem a helixy A, A'.

Kanál 2f: výstup mezi F/G smyčkou a  $\beta_5$ -listem.

### 3. 2. 3 Kanál PW3

Výstup u E/F smyčky a vmezeřen mezi helixy F a G.

### 3. 2. 4 Kanál PW4

Výstup zkrz F/G smyčkou.

### 3. 2. 5 Kanál PW5

Výstup mezi helixy K a K'.

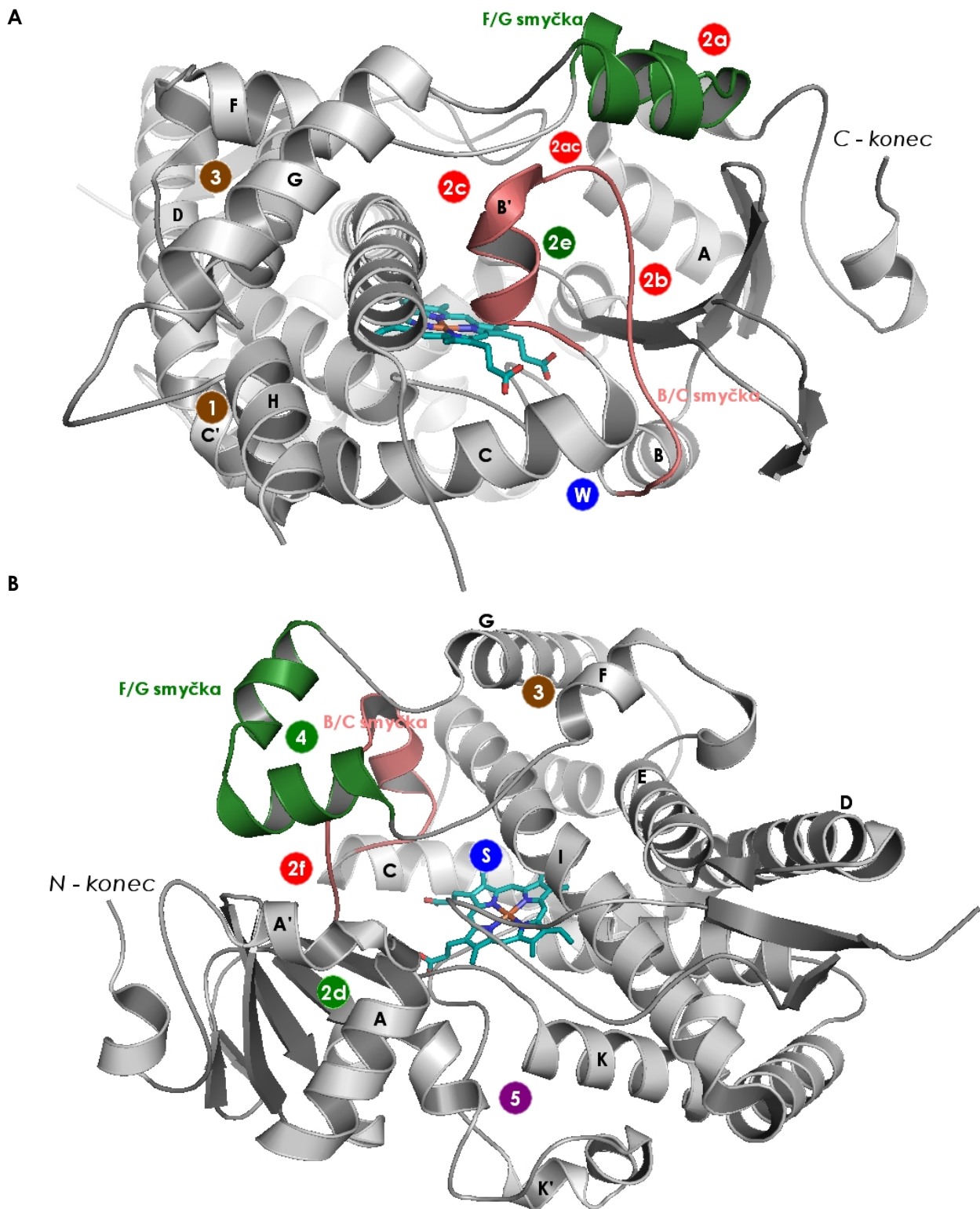
### 3. 2. 6 Kanál S (solvatační)

Výstup mezi E, F, I helixy,  $\beta_5$ -listem. Slouží pro transport molekul vody.

### 3. 2. 7 Kanál W (water = vodní)

Výstup u paty B/C smyčky v blízkosti C-terminu a helixu B. Jeho role není jednoznačná. Existují dvě hypotézy – první o výstupní cestě produktů, druhá o hydrataci aktivního místa. [6]



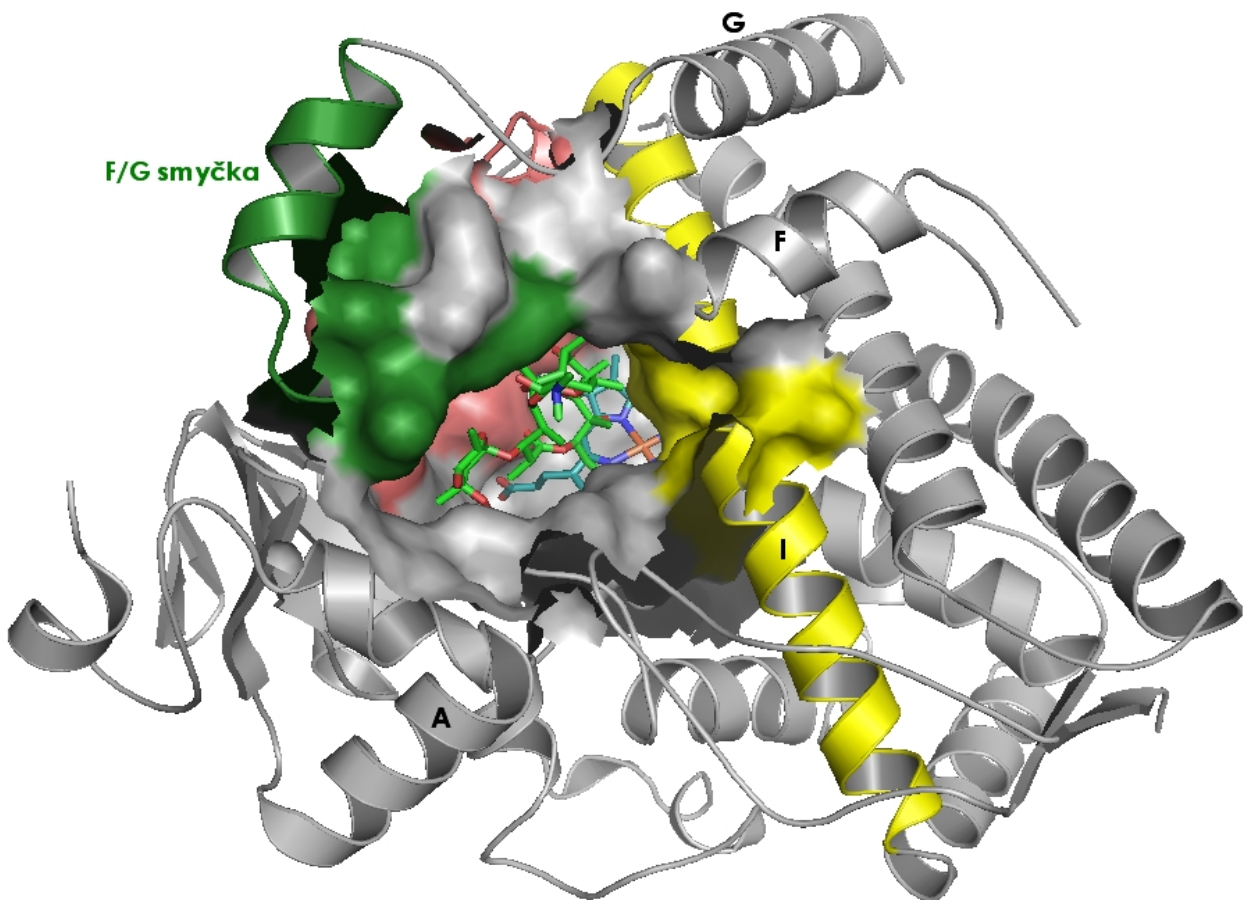


**Obr. 2** Klasifikace kanálů aktivního místa CYP (zde CYP3A4) podle Wadeové. Protein je vyznačen stužkovým modelem šedou barvou. Zelenou je zvýrazněna F/G smyčka a růžovou B/C smyčka. Vstupy kanálů, které korespondují s pozicí na povrchu proteinu jsou ilustrovány barevnými body. Barevnost se řídí podle (i) podobnosti mechanismu otevírání (2c, 2ac, 2a, 2f, 2b – červeně; 2e, 2d, 4 – zeleně; 1, 3 – hnědě), (ii) funkce kanálu [solvatační kanál (S), vodní kanál (W) - modře ], (iii) doby identifikace (nejnověji objevený kanál 5 – fialově). Hemový kofaktor je vyznačen tyčinkovým modelem barvou světlemodrého schématu dle chemických prvků. Pro lepší orientaci v prostoru jsou některé  $\alpha$ -helixy popsány písmeny. Vytvořeno podle literatury. [6]

### 3.3 Mechanismus otevírání kanálů

Jak již bylo zmíněno, v pozici F,G helixů, F/G a B/C smyček, které slouží jako uzávěr kapsy s navázaným substrátem, je vysoká proměnlivost primární struktury. Tyto smyčky patří mezi nejméně rigidní. Proto dochází k otevírání mnoha kanálů (tj. 2a, 2c, 2ac, 2b, 2f, S, 3, 4) (Obr. 3). [6]

S pomocí molekulární dynamiky byl u bakteriálních struktur cytochromů P450 nalezen kanál 2a jako příjemce substrátu. Ten se otevírá díky pohybům F helixu a F/G smyčky popř. G helixu a B/C smyčky. Předpokládá se, že tunel 2a slouží jako přístupová cesta hydrofobních substrátů k hemu i u lidských forem. Konečný produkt by se pak mohl dostat výstupem 2c. [9]

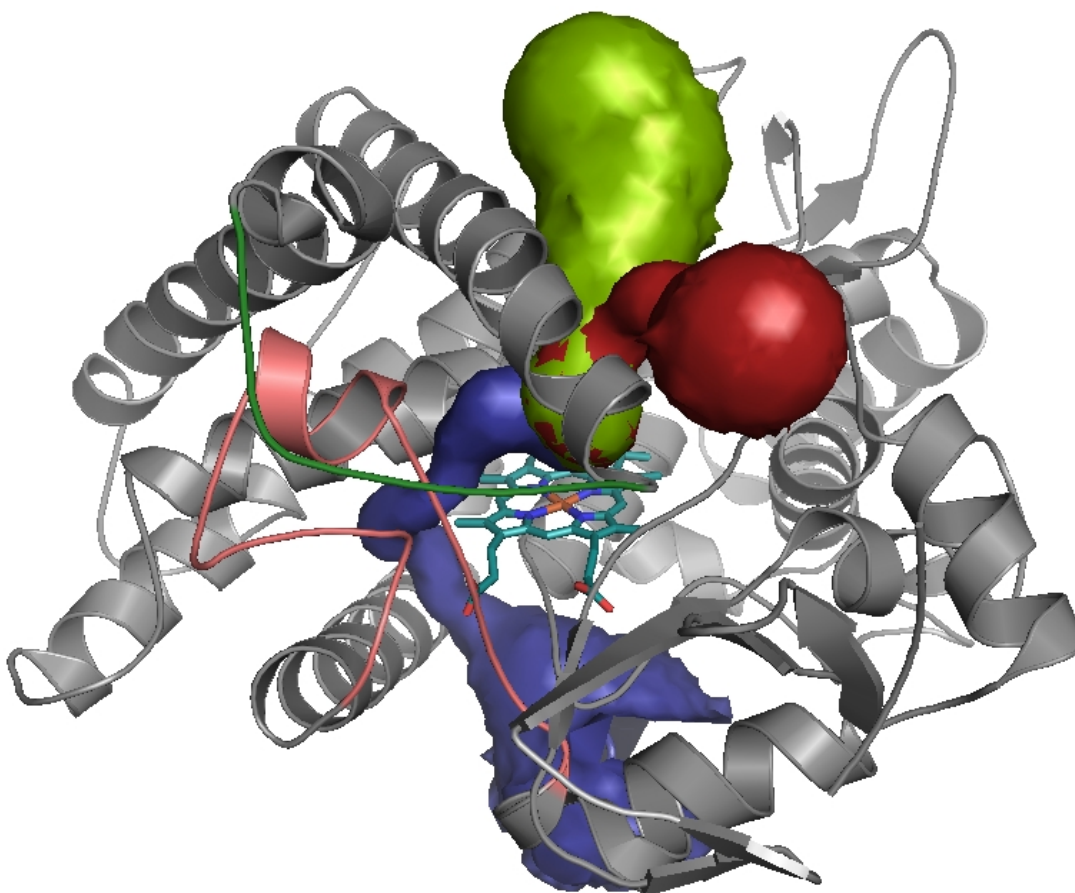


**Obr. 3** Příklad flexibility proteinu. Izoforma lidského cytochromu P450 s navázaným inhibitorem v solvatačním kanálu (CYP3A4 s erythromycinem ilustrovaným tyčinkovým modelem světlezeleného schématu podle chemických prvků). Zelenou barvou je zvýrazněna F/G smyčka, růžovou B/C smyčka. Žlutou je pro snadnou orientaci obarven helix I. Prostor kanálu, kde se nachází inhibitor, je demonstrován povrchovou vrstvou struktury.

## 4. Metodika

Výchozím materiálem pro studium enzymů byla internetová databáze Protein Data Bank (PDB). Z těchto stránek jsem získala 3D struktury forem lidských cytochromů stanovené pomocí monokrystalové rentgenové difrakce.

Dále jsem využila program PyMOL (molekulární grafický systém určený pro středně velké biomolekuly jako jsou proteiny). Software umí generovat vysoce kvalitní ilustrace obsahující grafická vyobrazení molekul a animace. Mimo jiné mi umožnil si přizpůsobit pracovní materiál tj. odstranit přítomné ligandy tak, aby nezakrývaly výsledky pro následující vyhledávání kanálů pomocí pluginu MOLE. Program MOLE vznikl jako společné dílo Národního biomolekulárního výzkumu Masarykovy univerzity v Brně a Katedry fyzikální chemie Univerzity Palackého v Olomouci. Jeho základem je Dijkstrův algoritmus, který prohledává Voroného diagram a zohledňuje vzdálenost k nejbližšímu atomu (Obr. 4). [10]



**Obr. 4** Kanály nalezené programem MOLE a vizualizované v PyMOL. Modrou je zobrazen vodní kanál, červenou PW2f a zelenou solvatační kanál (CYP2D6).

Do přidavného modulu jsem zadala souřadnice dvou vhodných aminokyselin (např. THR 124, ASP 320) a počet požadovaných tunelů (v této práci jsem volila počet dvacet).

Výsledkem hledání se staly kanály seřazené podle geometrické preference. Určování vnitřních aminokyselinových zbytků (dále jen rezidua) bylo provedeno důkladnou vizuální inspekcí. Její výhodou spočívá nejen ve správné detekci přítomnosti reziduí, ale také v posouzení jejich prostorové orientace. Postupným porovnáváním výsledků jsem očekávala nález analogických prvků a vyvození závěrů.

CYP	PDB ID	Ligand	Lokace ligandu	Počet řetězců
1A2	2H14	$\alpha$ -naftoflavon	v PW2c	1
2A6	1Z10	kumarin	aktivní místo	4
2C8	1PQ2	kys. palmitová	mimo aktivní místo	2
2C9	1OG2	-	-	2
2D6	2F9Q	-	-	4
3A4	1TQN	-	-	1
3A4	2J0D	erythromycin	aktivní místo	1

**Tab. 5** V tabulce jsou uvedeny formy lidských CYP, kterými se v práci zabývám. Potom jejich identifikační kódy v PDB databázi, přítomnost ligandů s jejich umístěními a počet řetězců tvořící enzym.

Prvním krokem bylo nutné zaznamenat rezidua v okolí hemu a v dutinách, které sdílí všechny kanály. Celý prostor jsem nazvala aktivním místem. Celkovou topologii můžeme vidět v přiložených schématech (viz přílohy).

Druhý krok zahrnoval porovnání tunelů stejného typu a třetím bodem bylo opětovné ověření PyMOL aplikací.

U enzymů s kvartérní strukturou jsem analyzovala kanály každé podjednotky.

## 4.1 CYP1A2

Tato izoforma je primárně soustředěna z 12.7 % v játrech. Spíše než pro léčiva je enzym důležitý v metabolismu dalších xenobiotik (např. nitrosaminy obsažené v cigaretovém kouři, grilovaném jídle). [11] Struktura 2HI4 (PDB ID) je vykrytalizována s induktorem  $\alpha$ -naftoflavonem.

## 4.2 CYP2A6

CYP2A6 se účastní přeměny 1 % léčiv metabolizovaných cytochromy P450. V zadané struktuře 1Z10 je připoután substrát kumarin. Dalšími významnými jsou nikotin, paracetamol aj.

## 4.3 CYP2C8

PDB databáze nabídla pouze jedinou strukturu tohoto cytochromu, která má kód 1PQ2. Mimo aktivní místo je navázaná palmitová kyselina. Tento enzym metabolizuje méně než 5 % známých léků. Přesto se významně podílí na odbourávání taxolu, jeho substrátem je například ibuprofen.

## 4.4 CYP2C9

Enzymy z této skupiny (v tomto případě 1OG2) jsou významnými zástupci metabolizátorů antikoagulantů a antidepresiv. V klinické praxi často pozorovanou interakcí je inhibice metabolismu S-warfarinu současně podaným s amiodaronem (lékem pro nepravidelný srdeční rytmus a zároveň substrátem CYP3A4). Aminokyselinová sekvence s CYP2C8 je velmi blízká.

## 4.5 CYP2D6

Struktura s kódem 2F9Q je druhým nejvýznamnějším enzymem v metabolismu léčiv. Preferuje substráty, jejichž základ tvoří atom dusíku a planární aromatický kruh. Účastní se proto eliminace karcinogenů a aktivace prokarcinogenů.

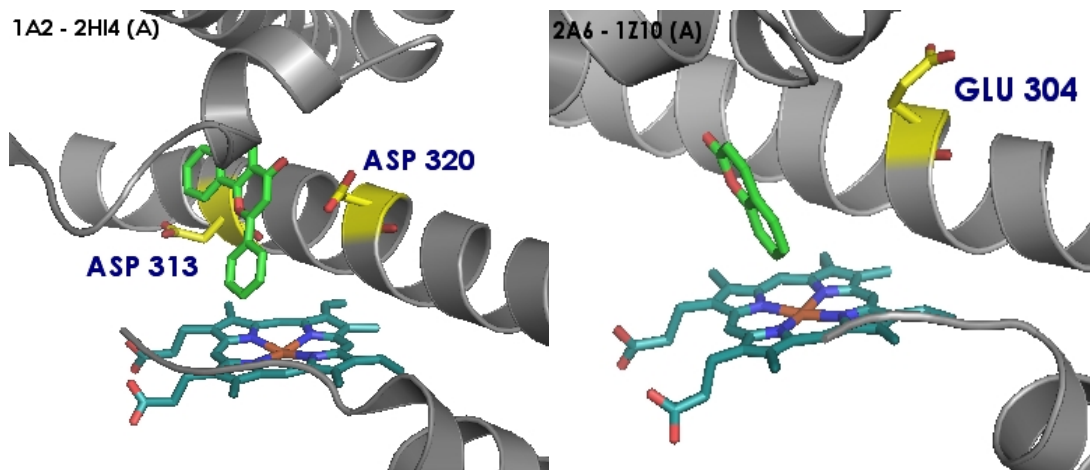
## 4.6 CYP3A4

Nejdůležitější forma cytochromů P450. Vyskytuje se převážně v játrech (30 % jaterních CYP P450) a ve střevě (více než 70 % CYP P450 ve střevní stěně). U ostatních orgánů jejich množství klesá. Metabolizuje více jak 50 % všech léčiv užívaných v humánní medicíně. Jeho všestrannost pro výběr substrátů umožňuje velkou tvárnost enzymu. Zde pracujeme s formami 1TQN a 2J0D. [11, 12]

## 5. Výsledky

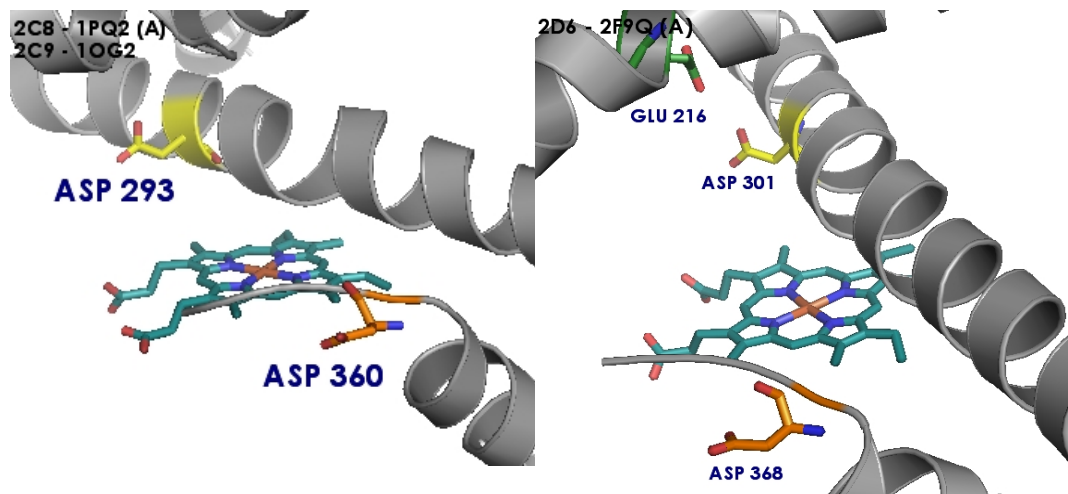
### 5.1 Aktivní místa

Porovnání všech sedmi aktivních míst (pojem definován v metodice) ukázalo podobnosti jak v polaritě elektricky nabitých aminokyselin, tak v jejich prostorovém uspořádání.



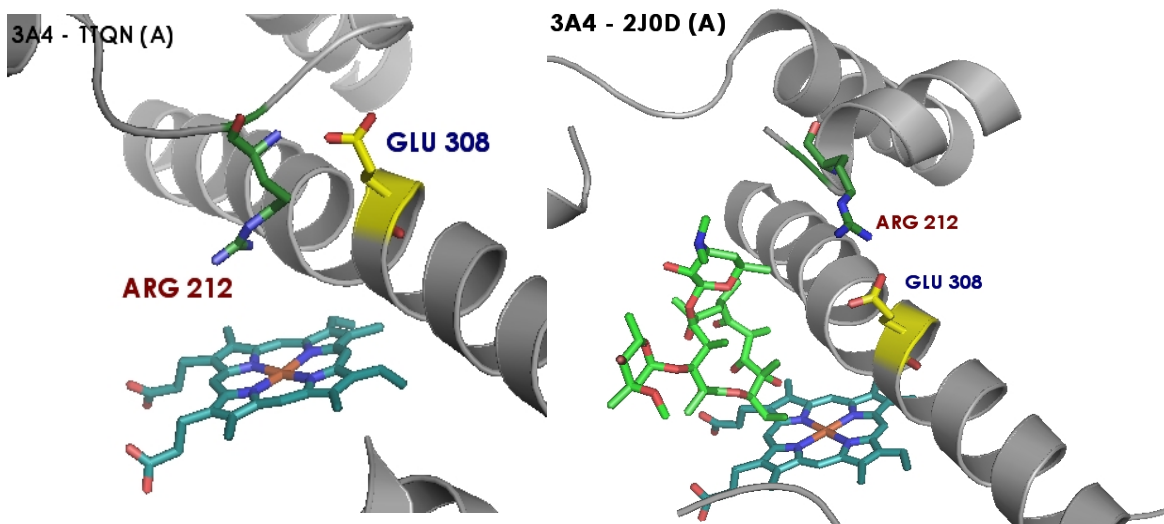
**Obr. 6** Aktivní místa CYP1A2 a CYP2A6.

V CYP1A2 jsou 2 záporně nabitá rezidua upoutaná na helix I. Své funkční skupiny mají orientovány směrem k němu. CYP2A6 má v těsné blízkosti kofaktoru pouze jedno reziduum, které je odvráceno do solvatačního kanálu (Obr. 6).



**Obr. 7** Aktivní místa CYP2C8 (2C9) a CYP2D6.

Aktivní místa cytochromů 2C8 a 2C9 jsou sekvenčně i funkčně identická (Obr. 7). Jejich aminokyselina ASP 293 je analogií ASP 313 u CYP1A2. Cytochrom 2D6 obsahuje další analogické reziduum vyskytující se na helixu K a I. Jedná se o ASP 368 - ASP 360 a ASP 301 - ASP 293.



**Obr. 8** Aktivní místa CYP3A4 (1TQN) a CYP3A4 (2J0D).

Posledními strukturami jsou enzymy podrodiny 3A4. Obě se shodují rezidui i polaritou. Zde můžeme zřetelně vidět práci ARG 212, který vlivem pohybu helixů zaujme polohu antagonisty GLU 308. Ten v obou případech odpovídá ASP 320 (v CYP1A2) a GLU 304 (v CYP2A6) (Obr. 8).

## 5.2 Preference kanálů

1A2	1	2	3	4	5	6	7	8
A	PW3	S	PW2c	W	PW2b	PW1	PW2e	PW2ac

2A6	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	W <sub>1</sub>	S	PW3	PW2c	PW1	PW2e	PW4	W <sub>2</sub>	PW5
B	PW2e	W <sub>1</sub>	PW3	PW2c	PW2f	PW1	PW2d	S	W <sub>2</sub>
C	PW2e	PW4	W <sub>1</sub>	PW2c	PW1	PW3	S	W <sub>2</sub>	
D	PW2e	W <sub>1</sub>	PW3	PW2c	PW1	S	W <sub>2</sub>	PW4	

2D6	1	2	3	4	5	6	7
A	S	PW2f	PW2e	PW2c	PW4		
B	S	PW2e	PW2c	PW4	PW2f	W	
C	S	PW2e	PW2f	PW2c	PW4	W	PW2b
D	S	PW2e	PW2c	PW2f	PW4		

2C8	1	2	3	4	5	6
A	PW2b	PW4	S	PW2c		
B	PW2b	PW2e	S	PW4	PW2c	PW5

2C9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	S	PW2c	PW2f	PW2e	PW2b	PW3	PW4	PW5	
B	S	PW2c	PW2f	PW3	PW2e	PW2b	PW2d	PW4	PW5

3A4 - 1TQN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	PW2b	PW2f	PW4	S	PW2e	PW3	PW2ac	PW2d	PW5	PW1

3A4 - 2J0D	1	2	3	4
A	S	PW2b	PW2e	
B	S	PW2b	PW2e	PW2c

**Obr. 8** Kanálová preference každého monomeru (A, B, C, D).

Většina zkoumaných enzymů upřednostňuje solvatační kanál (kromě CYP2A6, který spíše preferuje kanál vodní), dále to jsou kanály 2b, 2c, 2e a další kanály v přítomnosti flexibilních B/C a F/G smyček např. 4, 3, 2f.

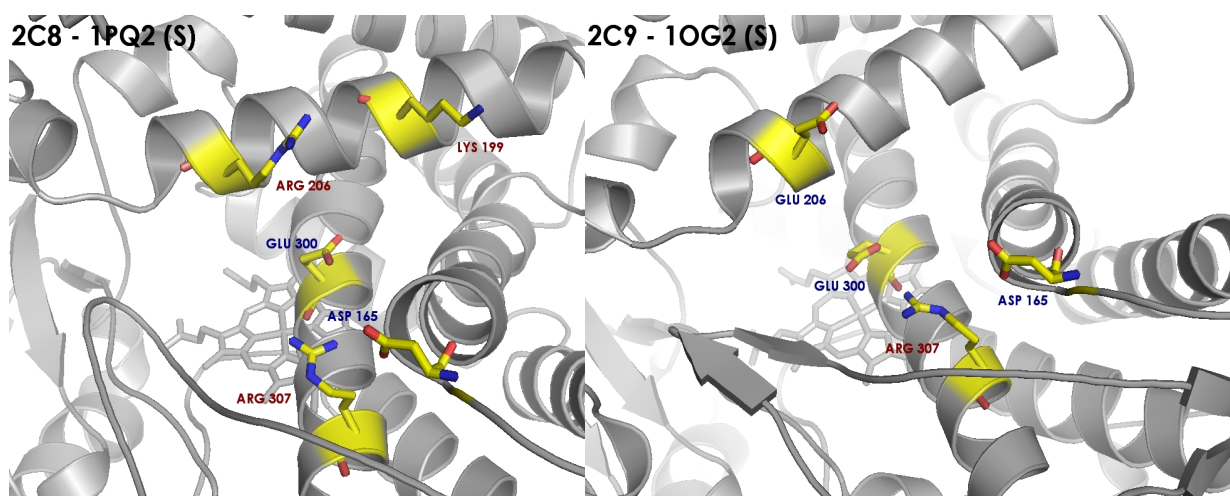


## 5.3 Elektropolarita nejdůležitějších kanálů

Z přiložených schémat si můžeme všimnout, že je enzym ve své vnitřní stavbě značně hydrofobní. Elektricky nabitá rezidua se vyskytují sporadicky. Směrem ven k plášti je patrná gradace polarity.

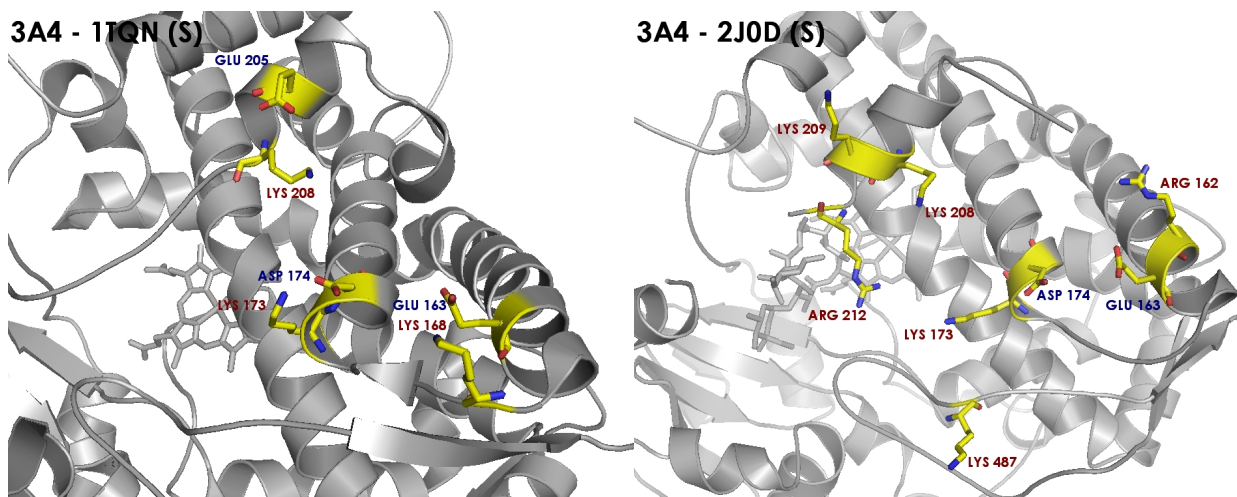
Záměrně jsem se soustředila na porovnání sekvenčně příbuzných CYP, kde je snazší najít jemné rozdíly v analogiích, tj. CYP2C8 a 2C9, CYP3A4 (1TQN a 2J0D). Ačkoliv se některá rezidua číselně shodovala nebo jejich pořadí byla přibližná (viz koncový výčet v tabulkách), jejich orientaci bylo nutné ještě zkontrolovat v prostoru.

### 5.3.1 Solvatační kanály



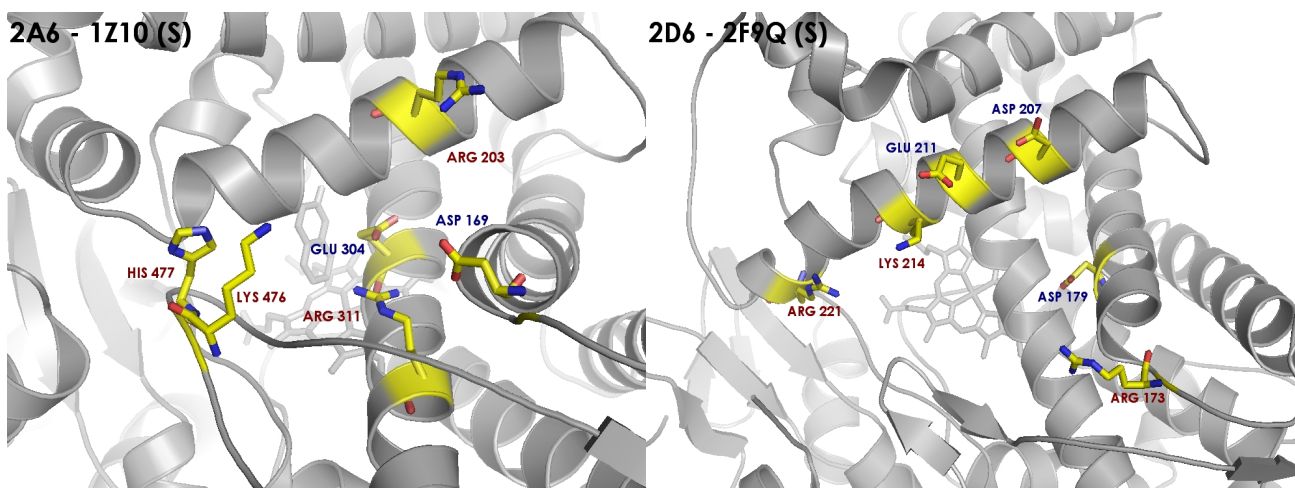
**Obr. 9** Solvatační kanály struktur CYP2C8 a CYP2C9.

CYP2C: identita reziduí GLU 300, ARG 307, ASP 165. Záměna polarity ARG 206 (2C8) a GLU 206 (2C9). LYS 199 je odkloněn od solvatačního výstupu (Obr. 9).



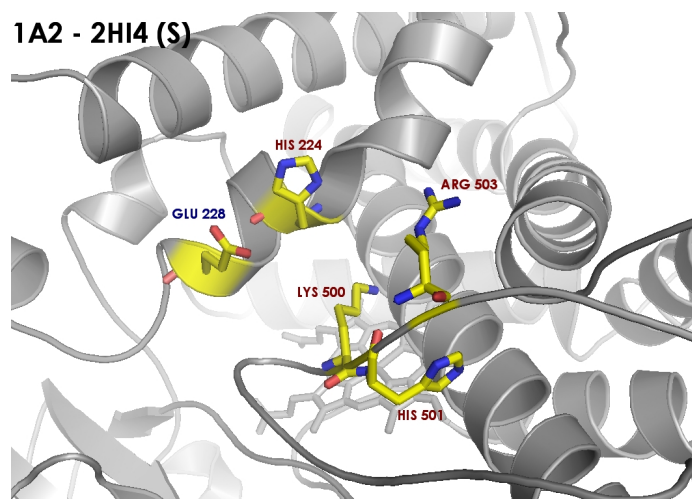
**Obr. 10** Solvatační kanály struktur CYP3A4 (1TQN) a CYP3A4 (2J0D).

CYP3A: Identita ASP 174, LYS 173, GLU 163, LYS 168 (1TQN) – ARG 162 (2J0D) a na helixu F LYS 208. Záměna GLU 205 a LYS 209. LYS 487 (2J0D) tvoří vzdálený okraj kanálu (Obr. 10).



**Obr. 11** Solvatační kanály struktur CYP2A6 a CYP2D6.

CYP2A6: společný kladně nabitý region LYS 476, HIS 477 (resp. ARG 311) s CYP1A2: LYS 500, HIS 501, ARG 503 (Obr. 12). Některá rezidua CYP2A6 korespondují s rezidui ostatních cytochromů: ARG 203 ≈ LYS 208, LYS 209 (2J0D), ARG 206 (2C8); ARG 311 ≈ ARG 307 (2C) (Obr. 11).



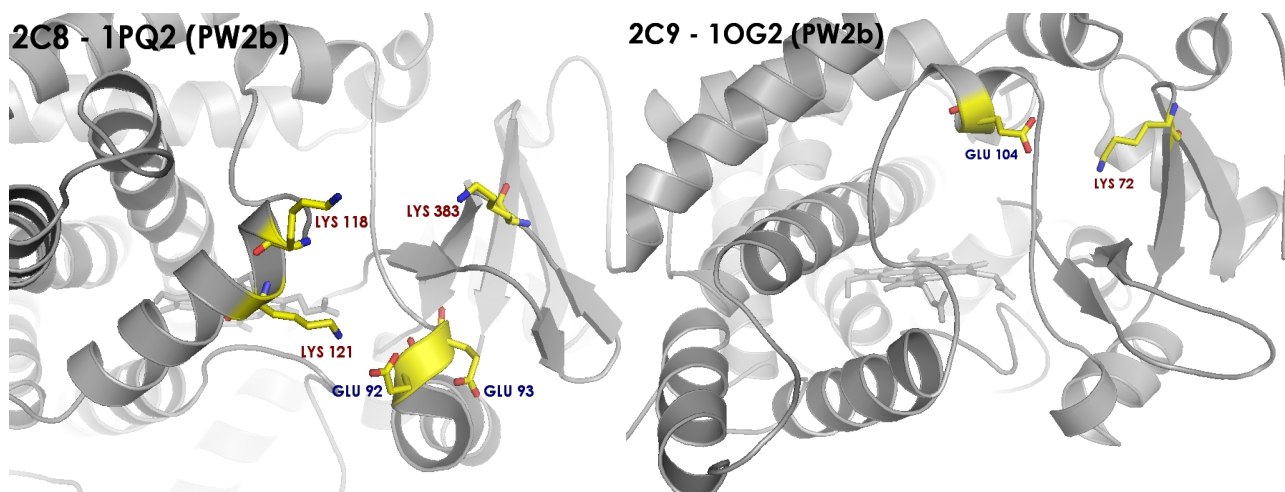
**Obr. 12** Solvatační kanál struktury CYP1A2.

Kromě CYP1A2 se u všech cytochromů objevuje jedno záporně nabitě reziduum u počátku helixu E: 2C8, 2C9 - ASP 165, 3A4 - ASP 174, 2A6 - ASP 169, 2D6 - ASP 179.

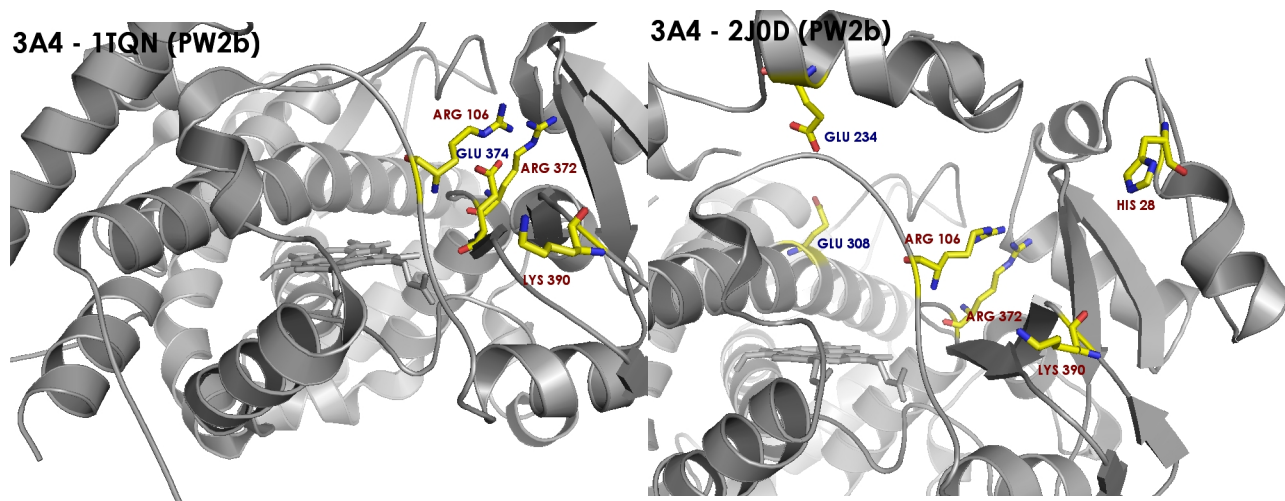
1A2	2A6	2C8	2C9	2D6	3A4 - 1TQN	3A4 - 2JOD
		GLU 300	GLU 300			
HIS 224	ARG 311	LYS 199		ARG 221	LYS 173	LYS 173
LYS 500	LYS 476	ARG 206		LYS 214	ASP 174	ASP 174
ARG 503	HIS 477	ARG 307		ARG 173	LYS 208	LYS 209
HIS 501					GLU 205	LYS 208
GLU 228	GLU 304	GLU 203	GLU 206	ASP 179	LYS 168	ARG 162
	ASP 169	ASP 165	ASP 165	GLU 211	GLU 163	GLU 163
				ASP 207	GLU 308	GLU 486
	ARG 203		ARG 307			ARG 212
						LYS 487

**Tab. 13** Acidobazická rezidua obsažená v solvatačních kanálech. GLU 304 (2A6) a GLU 308 (3A4 - 1TQN) jsem znázornila už v ilustracích aktivních míst, kde je větší pravděpodobnost podobnosti.

### 5. 3. 2 Kanály PW2b

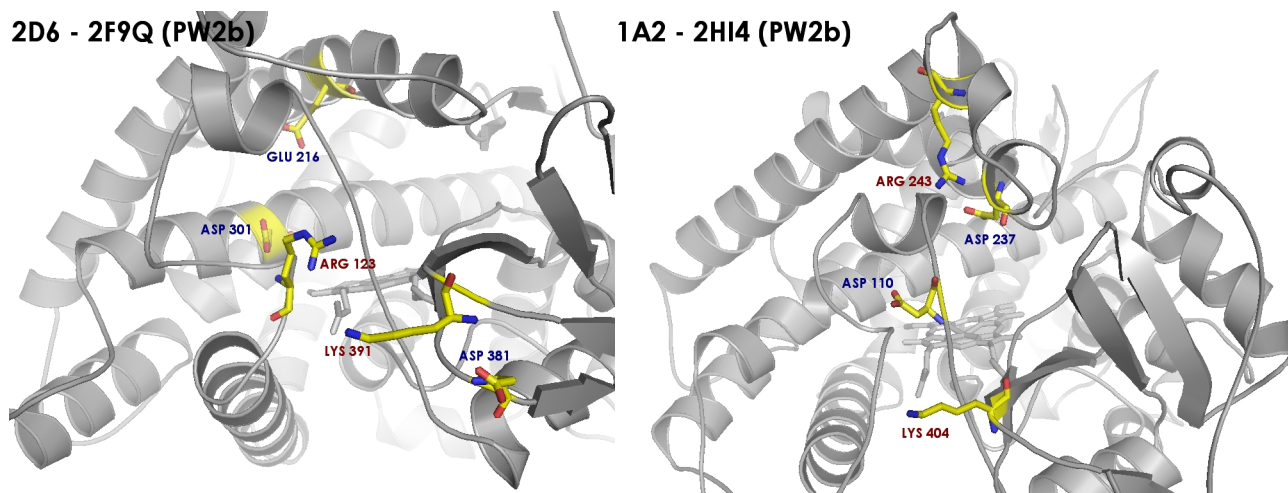


**Obr. 14** Kanály PW2b struktur CYP2C8 a CYP2C9.



**Obr. 15** Kanály PW2b struktur CYP3A4 (1TQN) a CYP3A4 (2J0D).

CYP3A4 – 1TQN: ARG 372, ARG 106, GLU 374 a reziduum aktivního místa ASP 76 tvoří vstupní mechanismus mezi B/C smyčkou a  $\beta_3$ -lístem na bázi protilehlosti elektrických nábojů. Přítomnost argininů se shoduje (Obr. 15).



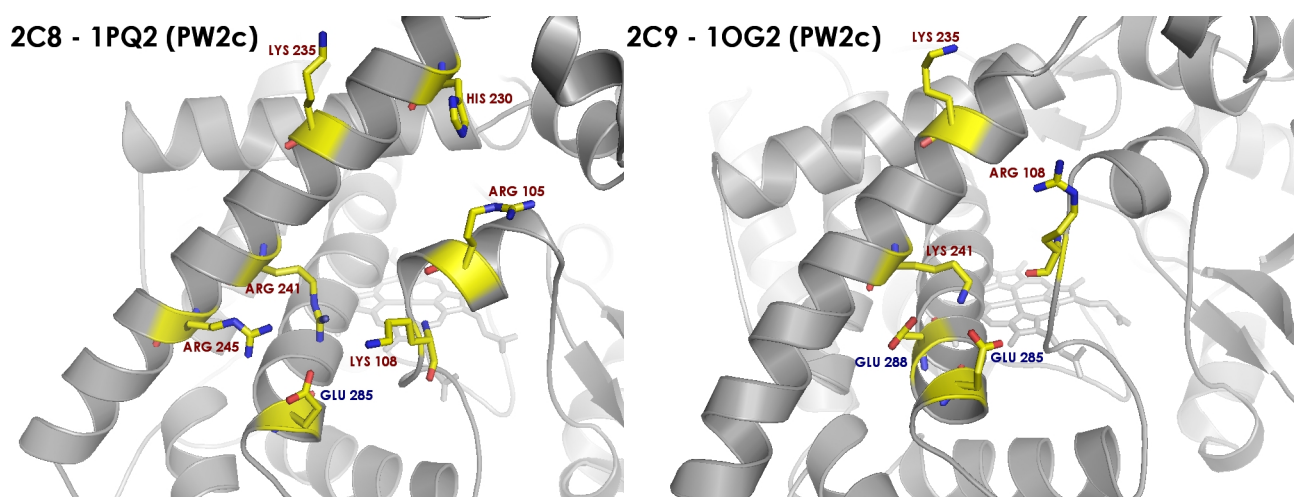
**Obr. 16** Kanály PW2b struktur CYP2D6 a CYP1A2.

Významná orientační shoda: LYS 383 (2C8), LYS 72 (2C9), LYS 390 (1TQN), LYS 390 (2J0D), LYS 391 (2D6), LYS 404 (1A2) (Obr. 14, 15, 16).

1A2	2A6	2C8	2C9	2D6	3A4 - 1TQN	3A4 - 2J0D
ASP 237				ASP 301 GLU 216	GLU 374	
ARG 243		LYS 121 LYS 118	LYS 72	ARG 123	ARG 372 ARG 106	ARG 372 ARG 106
ASP 110		GLU 92 GLU 93	GLU 104	ASP 381		GLU 234
LYS 404		LYS 383		LYS 391	LYS 390	LYS 390 HIS 28

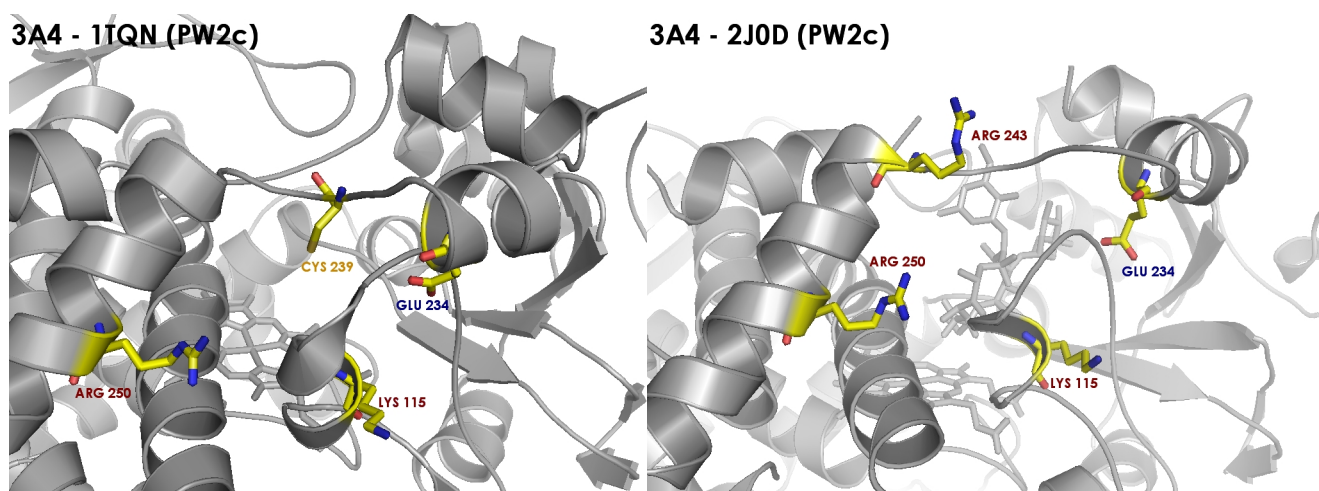
**Tab. 17** Acidobazická rezidua obsažená v kanálech PW2b.

### 5. 3. 3 Kanály PW2c



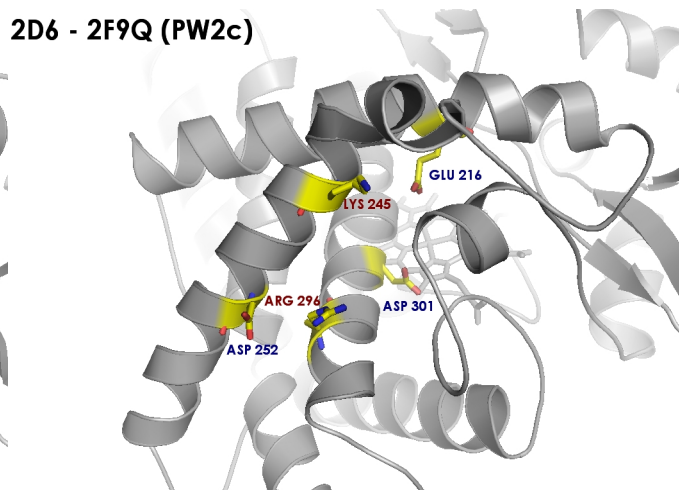
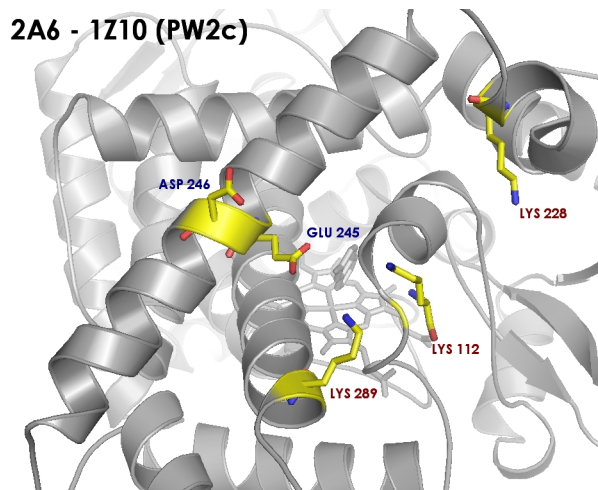
**Obr. 18** Kanály PW2c struktur CYP2C8 a CYP2C9.

U CYP2C8 převažuje kladně nabitá krajina, u CYP2C9 se naopak zdvojnásobil výskyt glutaminů (Obr. 18).

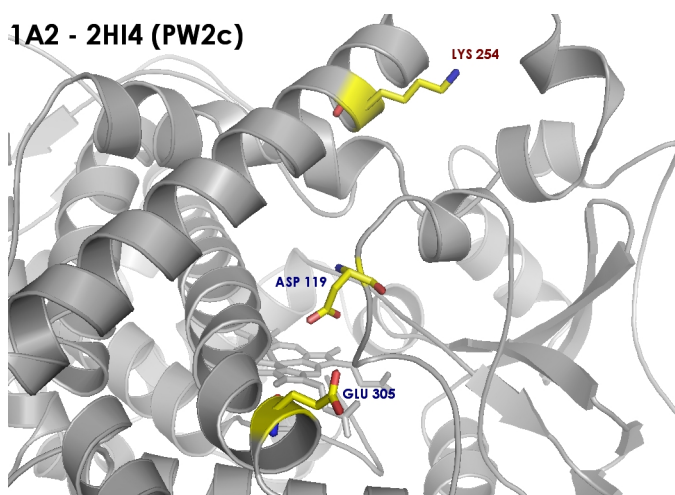


**Obr. 19** Kanály PW2b struktur CYP3A4 (1TQN) a CYP3A4 (2J0D).

Cytochromy 3A4: F/G krajina se liší hydrofilním cysteinem a elektropozitivním argininem 243. Helix G i B/C smyčky tvoří kladně nabitá rezidua podrodin 2C i 3A (Obr. 19).



**Obr. 20** Kanály PW2c struktur CYP2A6 a CYP2D6.



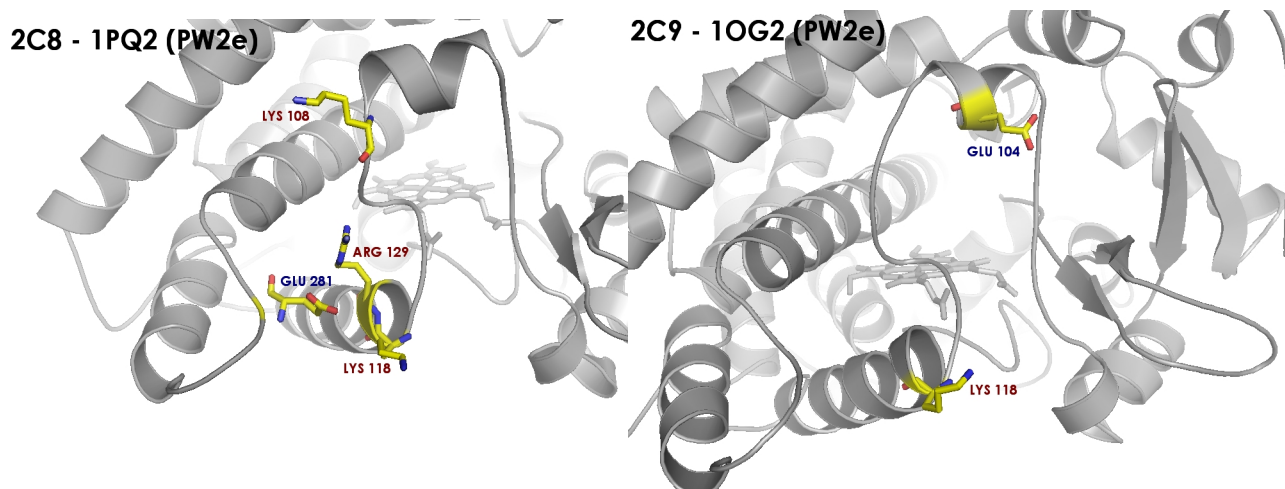
**Obr. 21** Kanál PW2c struktury CYP1A2.

Struktury z obrázků 20, 21 se odlišují vlastnostmi aminokyselin, orientace je málo podobná.

1A2	2A6	2C8	2C9	2D6	3A4 - 1TQN	3A4 - 2J0D
GLU 305	GLU 245			GLU 216	GLU 374	
ASP 119				ASP 301		
LYS 254	LYS 289	ARG 108	LYS 108	LYS 245	LYS 115	LYS 115
	LYS 112	ARG 241	LYS 241	ARG 296	ARG 250	ARG 250
	LYS 228	LYS 235	LYS 235			ARG 243
		HIS 230				
		LYS 245				
	ASP 246	GLU 285	GLU 285	ASP 252	GLU 234	GLU 234
			GLU 288			

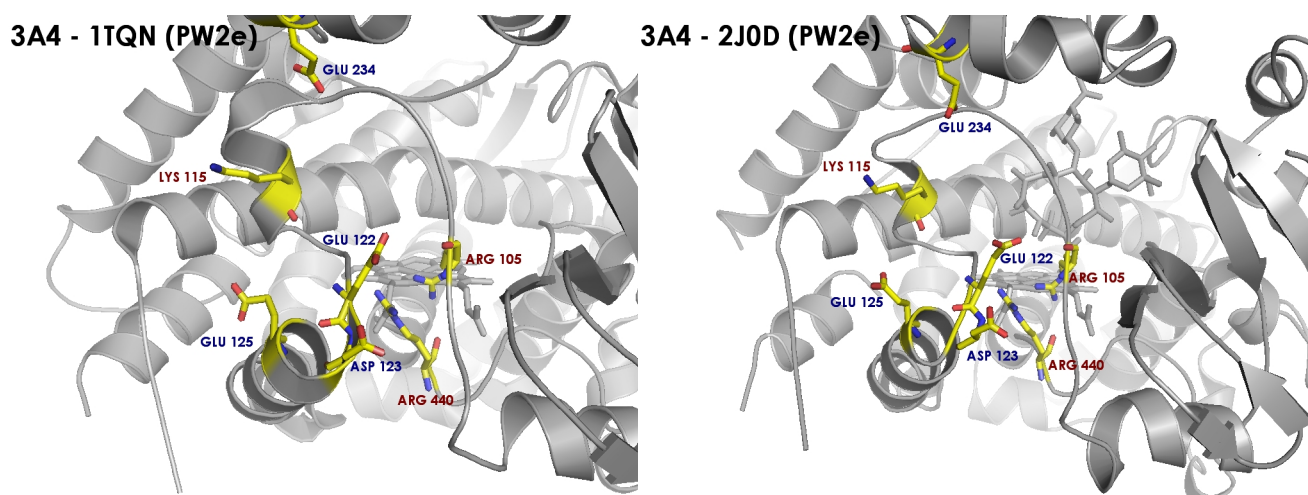
**Tab. 22** Acidobazická rezidua obsažená v kanálech PW2c.

### 5. 3. 4 Kanály PW2e



**Obr. 23** Kanály PW2e struktur CYP2C8 a CYP2C9.

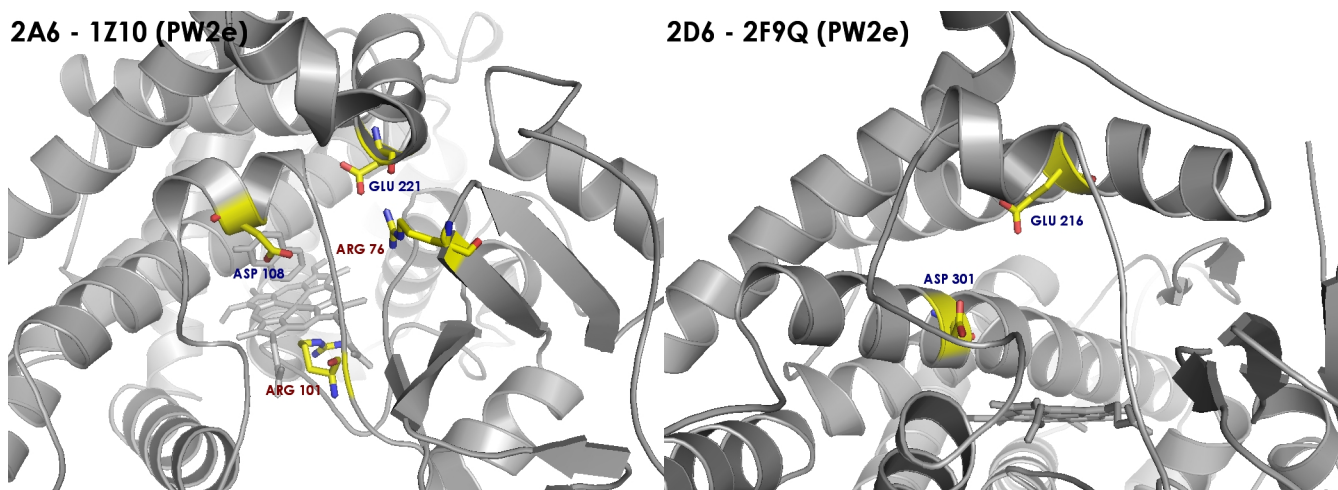
CYP2C: u výstupů kanálů PW2e je jediné shodné reziduum – LYS 118 (Obr. 23).



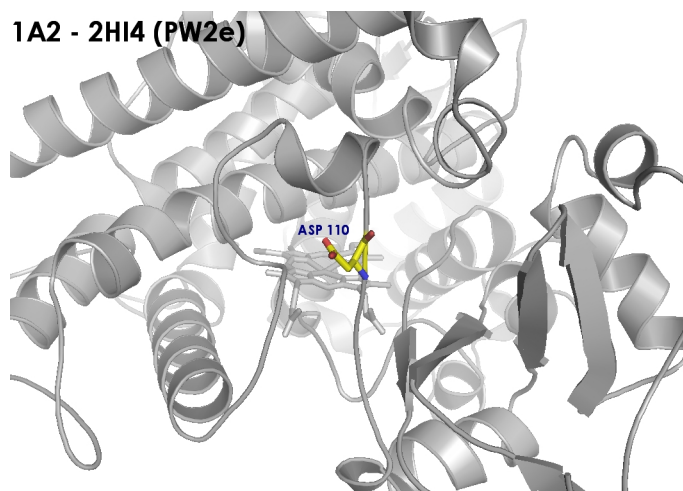
**Obr. 24** Kanály PW2e struktur CYP3A4 (1TQN) a CYP3A4 (2J0D).

Cytochromy 3A4: rezidua jsou v obou strukturách identická. U výstupu je záporně nabitý region. Směrem k hemu je region kladný (Obr. 24).





**Obr. 25** Kanály PW2e struktur CYP2A6 a CYP2D6.



**Obr. 26** Kanál PW2e struktury CYP1A2.

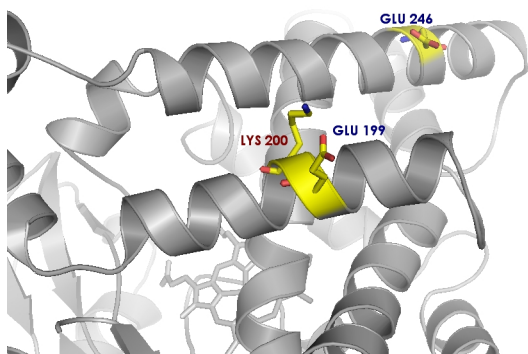
U východu na B/C smyčce se vždy vyskytuje alespoň jedno záporně nabitě reziduum. Tabulkovaná a zároveň neilustrovaná rezidua jsou součástí vzdálenějších okrajů vstupů.

1A2	2A6	2C8	2C9	2D6	3A4 - 1TQN	3A4 - 2J0D
	ARG 101					
ASP 110	GLU 221			GLU 216	GLU 122	GLU 122
	ASP 108			ASP 301	ASP 123	ASP 123
					GLU 125	GLU 125
	ARG 76	LYS 108	LYS 118	ARG 123	ARG 105	ARG 105
	ARG 373	ARG 119			ARG 440	ARG 440
	ARG 123	LYS 118			LYS 115	LYS 115
	LYS 228	GLU 281	GLU 104		GLU 234	GLU 234
	LYS 387					

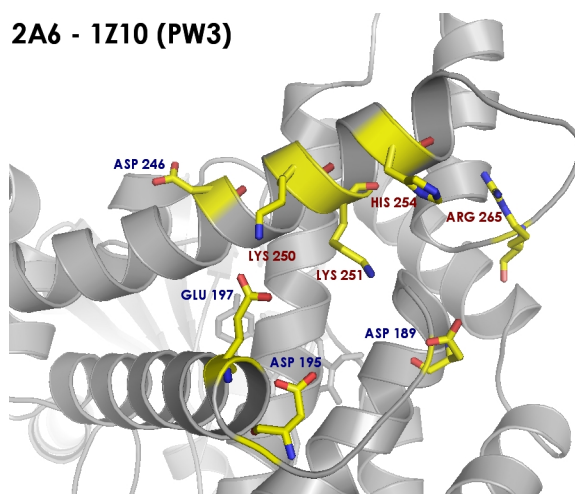
**Tab. 27** Acidobazická rezidua obsažená v kanálech PW2e.

### 5. 3. 6 Kanály PW3

#### 2C9 - 1OG2 (PW3)



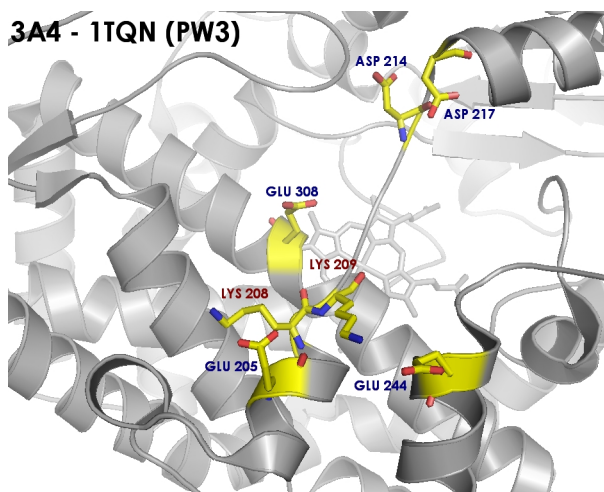
#### 2A6 - 1Z10 (PW3)



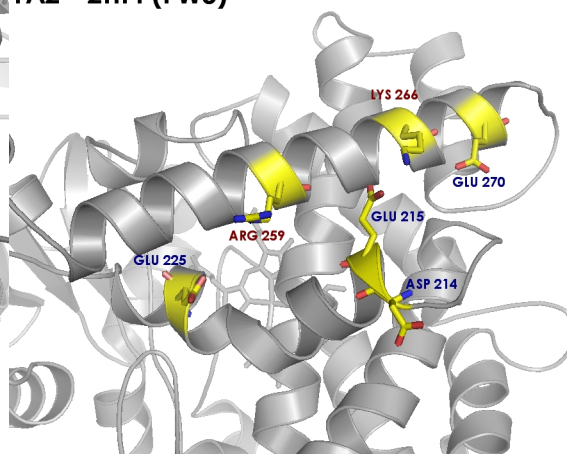
**Obr. 31** Kanály PW3 struktur CYP2C9 a CYP2A6.

CYP2A6: naproti třem kladně nabitým zbytkům z G helixu leží tři záporně nabitá rezidua. U cytochromů 2C9 a 2A6 se objevili jak kanály PW3, tak také PW4 (Obr. 31).

#### 3A4 - 1TQN (PW3)



#### 1A2 - 2H14 (PW3)



**Obr. 32** Kanály PW3 struktur CYP3A4 (1TQN) a CYP1A2.

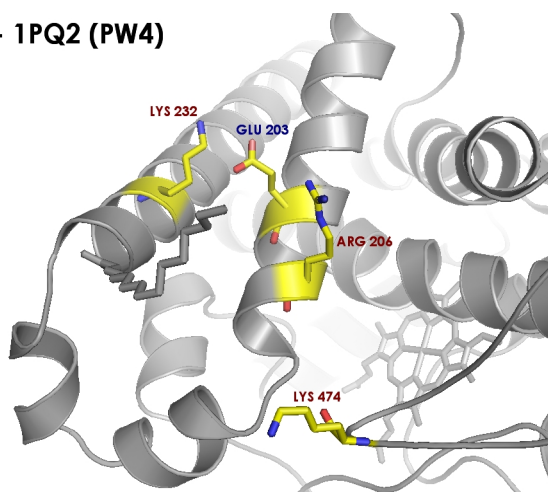
Výskyt spojení F a G helixů prostřednictvím opačně nabitých reziduí. LYS 209 - GLU 244 (3A4); ARG 259 - GLU 225, GLU 215 - LYS 266 (1A2) (Obr. 32).

1A2	2A6	2C8	2C9	2D6	3A4 - 1TQN	3A4 - 2J0D
GLU 270	LYS 251		GLU 246		ASP 217	
LYS 266	HIS 254		GLU 199		ASP 214	
ARG 259	LYS 250		LYS 200		LYS 209	
GLU 225	GLU 197				LYS 208	
GLU 215	ASP 195				GLU 205	
ASP 214	ASP 189				GLU 244	
	ASP 246					
	ARG 265					

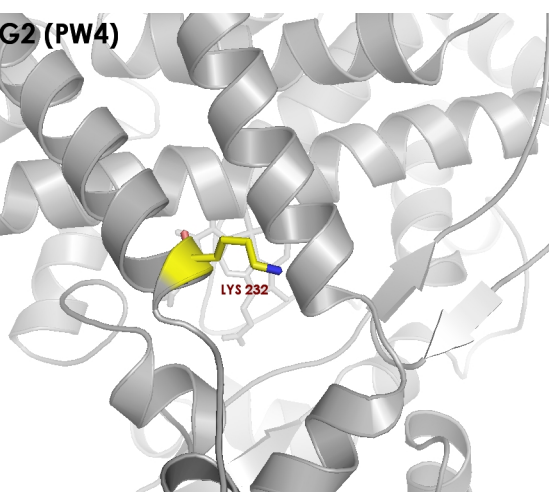
**Tab. 33** Acidobazická rezidua obsažená v kanálech PW3.

### 5. 3. 5 Kanály PW4

**2C8 - 1PQ2 (PW4)**



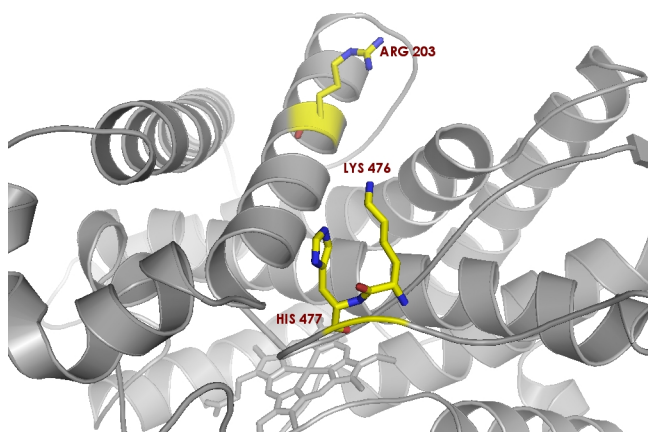
**2C9 - 1OG2 (PW4)**



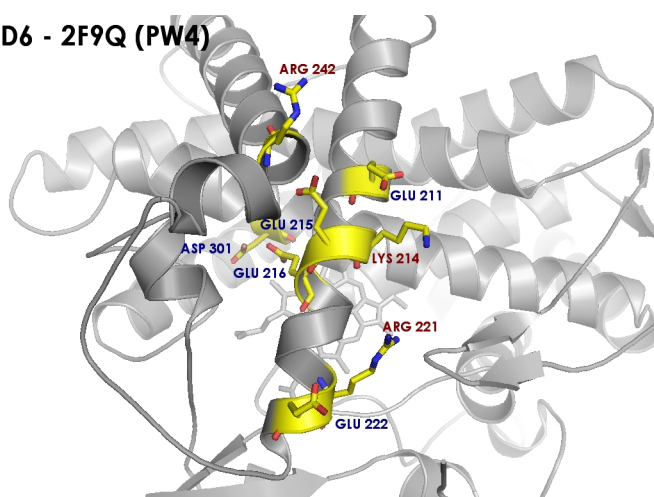
**Obr. 28** Kanály PW4 struktur CYP2C8 a CYP2C9.

CYP2C8: soudržnost F a G helixů zajišťují LYS 232 a úzce protilehlý GLU 203. U CYP2C9 tato soudržnost chybí (Obr. 28).

**2A6 - 1Z10 (PW4)**

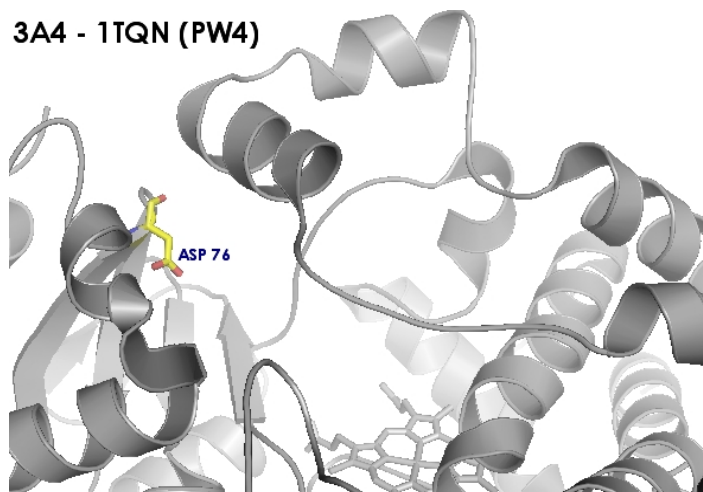


**2D6 - 2F9Q (PW4)**



**Obr. 29** Kanály PW4 struktur CYP2A6 a CYP2D6.

Kanály PW4 u 2. rodiny - analogie na helixu G: LYS 232 (2C8, 2C9), ARG 242 (2D6) (Obr. 28, 29).



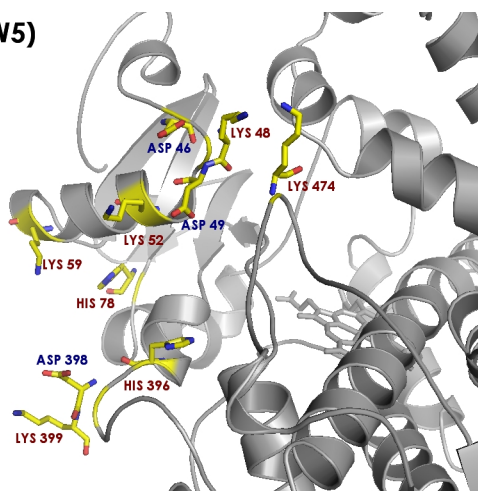
**Obr. 26** Kanál PW4 struktury CYP3A4 (1TQN).

1A2	2A6	2C8	2C9	2D6	3A4 - 1TQN	3A4 - 2J0D
	ARG 203	LYS 232	LYS 232	GLU 216	ASP 76	
	LYS 476		LYS 118	GLU 215		
	HIS 477			ARG 242		
		GLU 203		GLU 211		
		ARG 206		LYS 214		
		LYS 474		ARG 221		
			GLU 104	GLU 222		

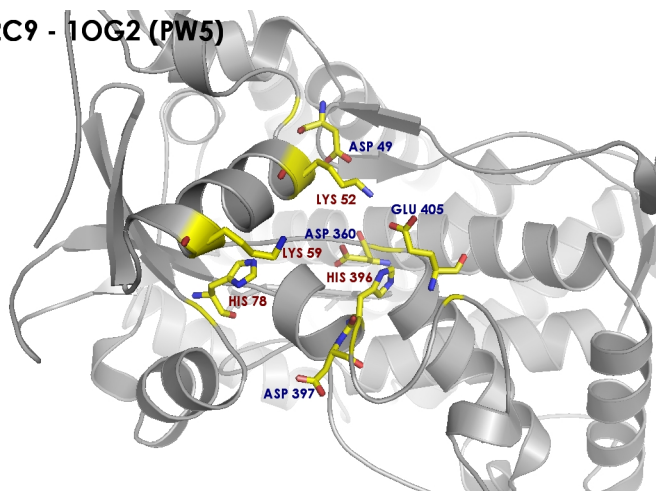
**Tab. 30** Acidobazická rezidua obsažená v kanálech PW4.

### 5. 3. 7 Kanály PW5

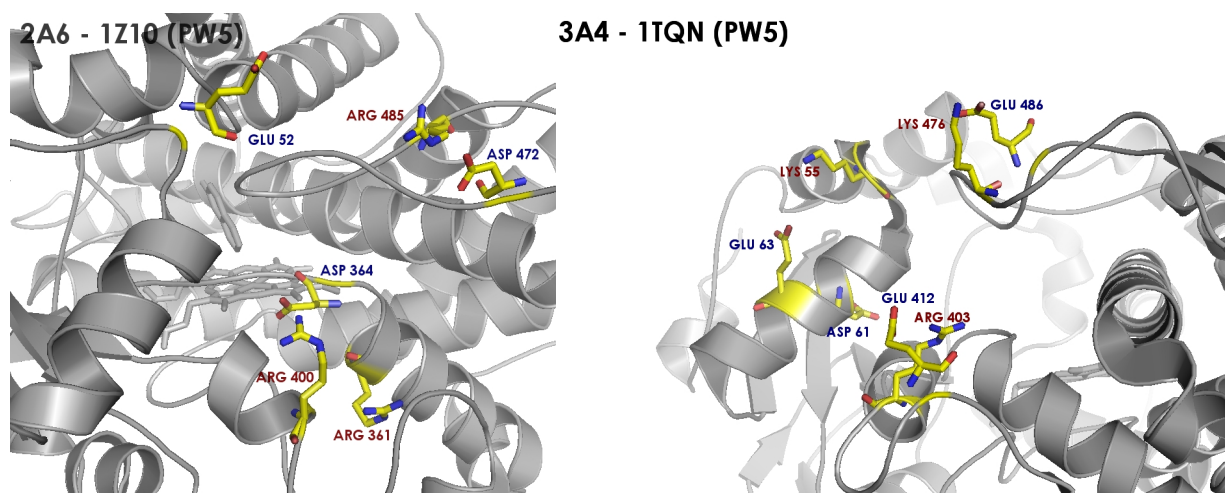
**2C8 - 1PQ2 (PW5)**



**2C9 - 1OG2 (PW5)**



**Obr. 34** Kanály PW5 struktur CYP2C8 a CYP2C9.



**Obr. 34** Kanály PW5 struktur CYP2A6 a CYP3A4 (1TQN).

Kanály PW5 mohou v budoucnu tvořit rozšíření přítomného solvatačního kanálu. Fungují zde i antagonistická rezidua, která spojují smyčku u C-terminu a helix A (Obr. 34).

1A2	2A6	2C8	2C9	2D6	3A4 - 1TQN	3A4 - 2JOD
	ASP 364	HIS 396	ASP 360		ASP 61	
	ARG 361	LYS 52	GLU 405		GLU 63	
	ARG 400	LYS 59	HIS 396		LYS 55	
	GLU 52	HIS 78	LYS 52		ARG 403	
	ARG 485	ASP 49	LYS 59		GLU 412	
	ASP 472	ASP 398	HIS 78		LYS 476	
		LYS 399	ASP 49		GLU 486	
		LYS 48	ASP 397			
		LYS 474				
		ASP 46				

**Tab. 30** Acidobazická rezidua obsažená v kanálech PW5.

## 6. Diskuse

Nejdříve srovnáme data z analýzy aktivních míst cytochromů P450. Všechny zkoumané enzymy mají podle výsledků aktivní místo s maximálně dvěma záporně nabitými aminokyselinovými zbytky. Z pohledu velikosti mají cytochromy 3A4 nejširší aktivní místo.

Z výsledků kanálové preference lze vyčíst, že enzymy upřednostňují kanály regulované helixy F, G s F/G smyčkou.

Polarita přístupových cest by měla napovědět, jak funguje příjem substrátu, nebo-li jak se reagující oblasti molekuly substrátu mění vlivem přítomnosti aminokyselinových zbytků v kanálu. Jedním z cílů bylo zobecnit tunely z hlediska jejich celkového náboje. Ukázalo se, že nejdůležitější kanály vykazovaly přímé analogie elektricky nabitých regionů jen u enzymů stejné podrodiny. U ostatních CYP to byly kombinace nebo jenom částečné podobnosti regionů. Vše plyne z vysoké promiskuity cytochromů P450 k substrátům. Jediným zobecněním zůstává střídání krajín s různou polaritou. Sekvenčně podobné enzymy mají shodné umístění elektricky nabitých regionů stejného náboje.

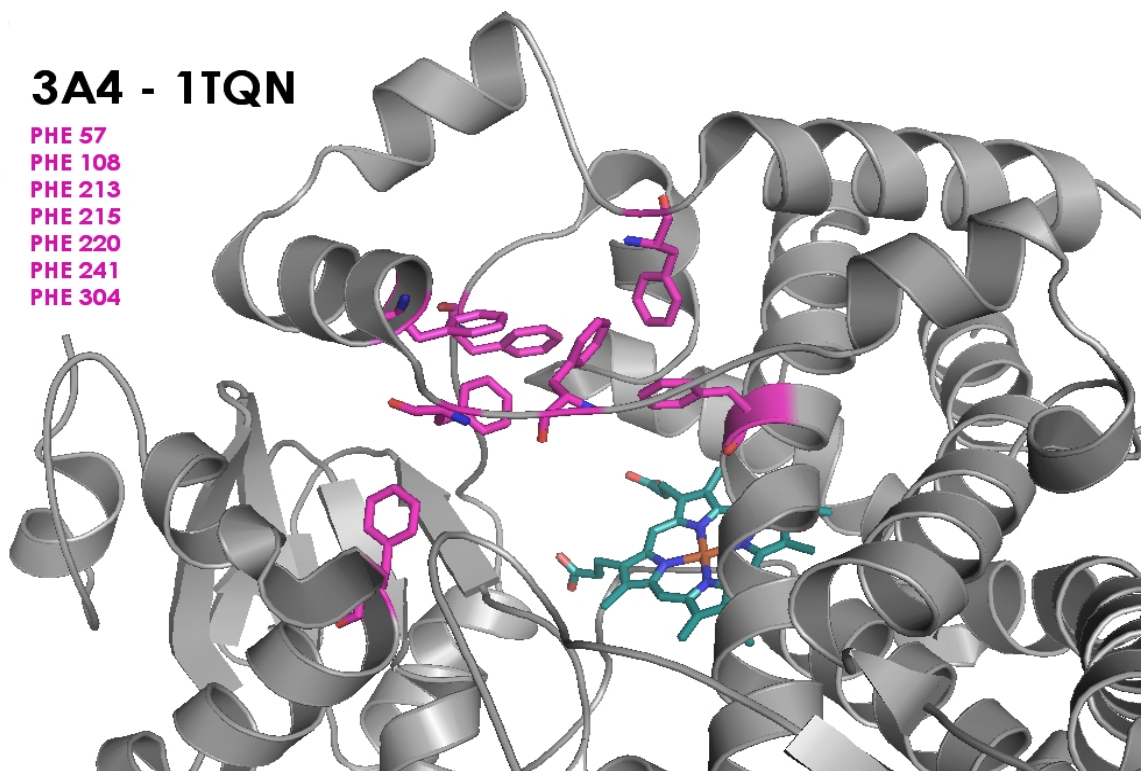
U zadaných cytochromů existují funkční mechanismy. Jde o již zmiňovanou vlastnost enzymu, kdy se jeho hydrofobní části snaží přesunout do nitra proteinu. Dále jde o fenylalaninovou bránu, jejíž funkcí bude pravděpodobně izolace kanálu od aktivního místa (Obr. 35). Nachází se v CYP1A2, 2A6 a ve dvou strukturách 3A4. V důsledku velmi polárního pláště enzymu vznikají u vstupů kanálů spolupracující rezidua opačných nábojů. Předpokládám, že by mohlo jít o vstupní mechanismus, jež se vyskytuje přednostně v kanálech PW5, PW3, někdy také v solvatačních kanálech. Na principu protilehlosti elektricky nabitých reziduí funguje velké množství regionů (neťká se nitra enzymu).

Rozdílná substrátová specifita spočívá v detailních rozdílnostech. Nejmarkantnější změna, která může nastat je výměna kladně nabitých aminokyselin za záporné a naopak. Ve většině jsou obecnostmi všech kanálů střídající se oblasti s různými náboji a využití spolupracujících reziduálních jednotek. Hydrofilní aminokyseliny se vyskytují rovnoměrně v celých strukturách. Svými vodíkovými můstky napomáhají transportu vody, substrátů a soudržnosti konformace.

Chtěla bych zmínit nedávný výzkum z oblasti řízené molekulární dynamiky, kde se z aktivních míst lidských cytochromů rodiny 3A4 (1TQN) odstraňovali produkty temazepamu (TMZ) a testosteronu- $6\beta$ OH (TST-OH) kanálem PW2e. Připomeňme si z kapitoly mechanismu otevírání kanálů domněnku, že důležitost PW2a a PW2c bakteriálních forem CYP P450 je předpokládána i u lidských CYP P450. Studie potvrdila nezanedbatelnou účast tunelu 2a, který označila jako propojení s membránou ER. [8]

U žádné z forem zkoumaných cytochromů jsem nenalezla kanál 2a. V případě mojí práce pouze PW2b přesně odpovídá aminokyselinovým zbytkům kanálu PW2a ze studie TMZ a TST-OH. Ne všechna rezidua, která jsem v kanálech našla, musí být využita při interakcích se substrátem, jak jsem se mohla přesvědčit z porovnání dat studie TMZ a TST-OH a mojí práce. Také se shoduje přístup skrz fenylalaninovou bránu, čímž můžeme doložit funkčnost mechanismu v praxi.

Mojí hypotézou pro hlavní vstup substrátů je cesta skrz kanály 2b, 2c, 2e a pokračování přes kanál S (+ PW2f popř. PW5). Kotvení cytochromu do ER předpokládám u jeho N-konce, kde jsem našla pozitivně nabitě aminokyseliny (Arg, Lys, His), které by mohly interagovat se záporně nabitými hlavičkami fosfolipidů cytoplazmatické membrány ER. Kanály PW3 s PW4 můžeme při interakcích považovat jako jeden tunel. Vodní kanál by eventuálně plnil dvojitou funkci a to výstupní cesty produktů či funkci hydratace aktivního místa.



**Obr. 35** Obrázek nám šedou barvou ukazuje stužkový model cytochromu z rodiny 3A4 (1TQN). Tyčinkovým modelem je modře znázorněn hemový kofaktor. Fialovým tyčinkovým modelem jsou znázorněny fenylalaniny, které tvoří „fenylalaninovou bránu“. Ta se vyskytuje v horní části aktivního místa a reguluje tak otevírání kanálů PW4, PW3.

## 7. Závěr

Úkolem této práce bylo charakterizovat přístupové cesty z/do aktivních míst lidských cytochromů P450 a ze statického pohledu vyvodit velmi podrobné mechanismy účinku enzymu v pojmech strukturní biologie.

Formy enzymů byly podrobně zmapovány vizuální inspekcí a zaznamenány do 2D i 3D ilustrací (viz přílohy).

Analýzou bylo zjištěno, že se v jednotlivých strukturách nejčastěji nachází solvatační kanál, PW2b, PW2c a PW2e. Nejméně časté byly kanály PW2d, PW1 a PW5. Druhy kanálů se odlišují svými vlastnostmi enzym od enzymu, nelze je zobecnit na základě polarity. Ovšem v aktivních místech byla nalezena pouze záporná rezidua. Cytochromy P450 by se mohly kotvit do cytoplazmatické membrány aminokyselinovými zbytky v okolí N-konce a zároveň by při přeměně substrátu využívaly kanálů, které reguluje F/G smyčka. Reálnou představu o enzymatických reakcích nám může poskytnout jen molekulová dynamika.



## 8. Seznam informačních zdrojů

- [1] GONZALEZ F. J., Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1, *Mutation Research* (2005), s. 569.
- [2] ANZENBACHER P., ANZENBACHEROVÁ E., Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics, *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (2001), s. 737–747.
- [3] FLODROVÁ E., Využití molekulárně genetické analýzy genu CYP2D6 a metody detekce [PDF], FN Brno, Oddělení lékařské genetiky, Laboratoř molekulární diagnostiky. [cit. 15. ledna 2010]. Dostupné z URL: <http://www.molekulara.cz/co-vysetrujeme/cytochrom-p450/>.
- [4] OGU Ch. C., MAXA J. L., Drug interactions due to cytochrome P450, *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, (2000), 13, (4), s. 421–423.
- [5] PHILLIPS I. R., SHEPHARD E. A., *Cytochrome P450 protocols: Humana Press* (1998), s. 11–12. ISBN 0-89-603519-0
- [6] COJOCARU V., WINN P. J., WADE R. C., The ins and outs of cytochrome P450s, *Biochim. Biophys. Acta* (2007), 1770, (3), s. 390–401.
- [7] STIBOROVÁ M., Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce karceroostatik nové generace, Sborník z multioborového semináře „Otevřená věda“ z 22. - 29. 10. 2005, Praha, s. 7–9.
- [8] OTYEPKA M., SKOPALÍK J., ANZENBACHEROVÁ E., ANZENBACHER P., What common structural features and variations of mammalian P450s are known to date? *Biochim. Biophys. Acta* (2007), 1770, (3), s. 376–389.
- [9] FISHELOVITCH D., SHAIK S., WOLFSON H. J., NUSSINOV R., Theoretical Characterization of Substrate Access/Exit Channels in the Human Cytochrome P450 3A4 Enzyme: Involvement of Phenylalanine Residues in the Gating Mechanism, *J. Phys. Chem. B* (2009), 113, (39), s. 13018–13025.
- [10] PETŘEK M., KOŠINOVÁ P., KOČA J., OTYEPKA M., MOLE: A Voronoi diagram-based explorer of molecular channels, pores and tunnels: *Structure* (2007), 15, (11), s. 1357–1363.
- [11] JOHNSON M. D., NEWKIRK G., WHITE J. R. Jr., Clinically significant drug interactions, *Postgrad Med* (1999), 105, (2), s. 5–193.
- [12] SMITH G., STUBBINS M. J., HARRIES L. W., WOLF C. R., Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily: *Xenobiotica* (1999), 28, (12), s. 65–1129.