

U n i v e r z i t a P a l a c k é h o v O l o m o u c i

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



## **Dynamika vstupu substrátu do cytochromu P450**

Diplomová práce

|                   |                               |
|-------------------|-------------------------------|
| Autor:            | Bc. Eliška Ryšavá             |
| Studijní program: | B1407 Chemie                  |
| Studijní obor:    | Fyzikální chemie              |
| Forma studia:     | Prezenční                     |
| Vedoucí práce:    | doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D. |
| Konzultant:       | Mgr. Veronika Navrátilová     |
| Akademický rok:   | 2017                          |

P a l a c k ý   U n i v e r s i t y   i n   O l o m o u c

Faculty of Science

Department of Physical Chemistry



## **Dynamics of Substrate Uptake by Cytochrome P450 Enzymes**

Master Thesis

|                  |                               |
|------------------|-------------------------------|
| Author:          | Bc. Eliška Ryšavá             |
| Study programme: | B1407 Chemistry               |
| Study branch:    | Physical Chemistry            |
| Form of study:   | Full-time                     |
| Supervisor:      | doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D. |
| Consultant:      | Mgr. Veronika Navrátilová     |
| Academic year:   | 2017                          |

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího a konzultantky diplomové práce a použila jsem jen uvedené citované zdroje.

V Olomouci dne 3. května 2017

Eliška Ryšavá

Děkuji doc. RNDr. Karlu Berkovi, Ph.D., za odborné vedení diplomové práce. Děkuji za cenné rady a připomínky při zpracování a reprodukci výsledků. Děkuji Mgr. Veronice Navrátilové za ochotnou pomoc a trpělivost při veškerých neodbytných otázkách a celému kolektivu z 3.004, děkuji také projektu IGA\_PrF\_2017\_028. V neposlední řadě také děkuji všem blízkým, kteří mě při psaní i v celém studiu podporovali.

## **Bibliografické údaje**

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Eliška Ryšavá                            |
| Název práce             | Dynamika vstupu substrátu do cytochromu P450 |
| Typ práce               | Diplomová                                    |
| Pracoviště              | Katedra fyzikální chemie                     |
| Vedoucí práce           | doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.                |
| Rok obhajoby práce      | 2017   |

### Abstrakt

Cytochromy P450 hrají důležitou roli v metabolismu xenobiotik a hormonů. Ze strukturního pohledu jde o enzymy se zanořeným aktivním místem, ke kterému substráty přistupují pomocí tunelů. Tyto tunely mohou hrát roli pro selektivitu jednotlivých cytochromů P450, které jsou na jednu stranu vysoce specializované v místě metabolismu jednotlivých látek, ale současně značně promiskuitní, co se výběru substrátů týče. V této práci se zaměřuji na studium mechanismu vstupu cholesterolu do aktivního místa cytochromu P450 11A1 s použitím molekulárních simulací.

Cílem této práce je seznámit čtenáře s metabolismem cholesterolu a ukázat na možné mechanismy vstupu cholesterolu do prvního enzymu na metabolické dráze – mitochondriálního cytochromu P45011A1. Nakonec jsem vstup cholesterolu jakožto modelového substrátu popsala simulačními technikami a poukázala na další možné použití těchto technik.

|               |   |
|---------------|---|
| Klíčová slova | cytochrom P450 11A1, cholesterol, molekulová dynamika |
| Počet stran   | 48  |
| Počet příloh  | 0   |
| Jazyk         | Český   |

## **Bibliographical identification**

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Autor's first name and surname | Bc. Eliška Ryšavá                                       |
| Title                          | Dynamics of Substrate Uptake by Cytochrome P450 Enzymes |
| Type of thesis                 | Master  |
| Department                     | Department of Physical Chemistry                        |
| Supervisor                     | doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.                           |
| The year of presentation       | 2017  |

### **Abstract**

Cytochromes P450 play an important role in the metabolism of xenobiotics and hormones. From a structural point, they are enzymes with an internalized active site, which is accessible for substrates through tunnels. These tunnels may play a role in the selectivity of the individual cytochromes P450, as they are extremely specific about the placement of the substrate metabolism, while at the same time being quite promiscuous with regards to substrate choice. This thesis focuses on the study of the mechanism of entry of cholesterol into the cytochrome P450 11A1 active site, using molecular simulations.

The aim of this thesis is to introduce the reader to the metabolism of cholesterol problematic and to illustrate the possible mechanisms of entry of cholesterol into the first enzyme of the metabolic pathway – mitochondrial cytochrome P450 11A1. In addition, the entry of cholesterol, as a model substrate, was described using simulation techniques, and other potential applications of these techniques were illustrated.

|                      |   |
|----------------------|---|
| Keywords             | Cytochrome P450 11A1, cholesterol, molecular dynamics |
| Number of pages      | 48  |
| Number of appendices | 0   |
| Language             | Czech   |

## Obsah

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....   | 1  |
| 2.     | TEORETICKÁ ČÁST .....   | 2  |
| 2.1.   | Cytochromy P450.....  | 2  |
| 2.1.1. | CYP11A1.....  | 2  |
| 2.1.2. | Struktura CYP11A1 .....   | 3  |
| 2.1.3. | Mechanismus účinku a ovlivnění funkce.....  | 4  |
| 2.1.4. | Kanály.....   | 6  |
| 2.2.   | Membrány .....  | 7  |
| 2.3.   | Cholesterol .....   | 8  |
| 3.     | METODY .....  | 12 |
| 3.1.   | Molekulová mechanika .....  | 12 |
| 3.2.   | Molekulová dynamika.....  | 12 |
| 3.3.   | Nastavení MD simulace .....   | 13 |
| 3.4.   | Dokování do aktivního místa .....   | 14 |
| 3.5.   | Vyhledávání tunelů nástrojem MOLE .....   | 15 |
| 3.6.   | Dokování do tunelů.....   | 15 |
| 3.7.   | Krátké volné simulace pohybu cholesterolu v tunelech.....                                   | 15 |
| 3.8.   | Analyzační nástroje.....  | 15 |
| 4.     | VÝSLEDKY A DISKUZE .....  | 16 |
| 4.1.   | Analýza struktury CYP11A1 a efektů dostupných mutací v rámci jejich<br>strukturní role..... | 16 |
| 4.2.   | Ověření nadokované polohy cholesterolu .....  | 18 |
| 4.3.   | Simulace CYP11A1 bez cholesterolu v aktivním místě .....                                    | 19 |
| 4.4.   | Simulace CYP11A1 s cholesterolem v aktivním místě .....                                     | 20 |
| 4.5.   | Posouzení důležitosti transmembránové kotvy .....   | 22 |
| 4.6.   | Analýza tunelů .....  | 25 |
| 4.7.   | Dokování do tunelů.....   | 26 |
| 4.8.   | Krátké volné simulace pohybu cholesterolu v tunelech.....                                   | 29 |
| 5.     | ZÁVĚR .....   | 34 |
| 6.     | SUMMARY .....   | 35 |
| 7.     | SEZNAM LITERATURY .....   | 36 |
| 8.     | SEZNAM ZKRATEK .....  | 39 |
| 9.     | SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK.....  | 40 |

# 1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Cytochrom P450 11A1 hraje klíčovou roli v metabolismu cholesterolu. Podílí se na prvním kroku biosyntézy steroidních hormonů, který je založen na přeměně cholesterolu v pregnenolon pomocí tří monooxygenázových reakcí. Právě přeměna a vstup cholesterolu do aktivního místa cytochromu P450 11A1 je klíčovým katalytickým krokem pro jeho správné zpracování a zamezení nežádoucímu ukládání cholesterolu v jiných částech lidského těla.

V současné době se velké procento obyvatel České republiky potýká s vysokou hladinou cholesterolu v krevní plazmě, ve které se vyskytuje spolu se svými estery, triacylglyceroly, amfifilními fosfolipidy a bílkovinami ve formě lipoproteinů. V závislosti na rozdílné hustotě závislé na podílu lipidové a bílkovinné složky v lipoproteinech rozlišujeme v souvislosti s cholesterolem LDL (*low density lipoprotein*) a HDL (*high density lipoprotein*).<sup>1</sup> Především dále modifikovaný LDL je zodpovědný za již zmiňované zdravotní potíže vedoucí ke vzniku aterosklerózy (kornatění tepen), pokud není správně regulován prostřednictvím LDL receptoru. Nadbytek cholesterolu potlačuje syntézu těchto LDL receptorů, které poté buňkám chybí. Za zvýšení koncentrace LDL-cholesterolu mohou např. nasycené mastné kyseliny. Naopak HDL pokládáme za částice s antiaterogenními účinky, protože transportují cholesterol z periferních tkání zpět do jater, působí protizánětlivě a zlepšují funkci cév. Zvýšená hladina cholesterolu je tedy základem aterosklerózy a může následně vést až k ischemické chorobě srdeční.<sup>2</sup> Cholesterol je tedy nejen jednou ze stavebních látek buněčných membrán, hormonů a nervů, ale i látkou, která může v případě špatného metabolismu vést k závažným a smrtelným onemocněním.

Cílem mé práce bylo pomocí výpočetních metod simulovat mitochondriální cytochrom P450 11A1 s a bez přítomnosti cholesterolu v aktivním místě a lokalizovat možné mutace na základě dostupných dat. Dále pak analyzovat jednotlivé přístupové cesty tzv. kanály do aktivního místa a provést molekulové dokování cholesterolu umístěného do přístupových cest. V těchto přístupových cestách dále sledovat flexibilitu kanálů simulací cholesterolu v přístupových cestách.



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Cytochromy P450

Cytochromy P450 (zkráceně CYP či P450) řadíme mezi enzymatické proteiny s hemovým kofaktorem. Svě jméno získaly díky objevení bílkovinných pigmentů v mikrosomech, které za přítomnosti NADPH a oxidu uhelnatého vykazovaly charakteristický tzv. Soretův pík při 450 nm.<sup>3</sup>

P450 jsou zodpovědné za metabolismus více než 50% xenobiotik v lidském těle a jsou přítomny prakticky ve všech živých organismech.<sup>4,5</sup> Právě P450 hrají důležitou roli při I. fázi biotransformačních reakcí jako jejich katalyzátory. Katalyzují oxidačně-redukční a peroxidační reakce, při kterých využívají jako oxidační činidlo kyslík, redukčním činidlem a kofaktorem je molekula NADPH. Xenobiotika jsou z těla odstraňována díky zvýšení jejich polariry, k čemuž dochází během oxidačních reakcí.<sup>6</sup> Lipofilní látky se tak stávají hydrofilnějšími.

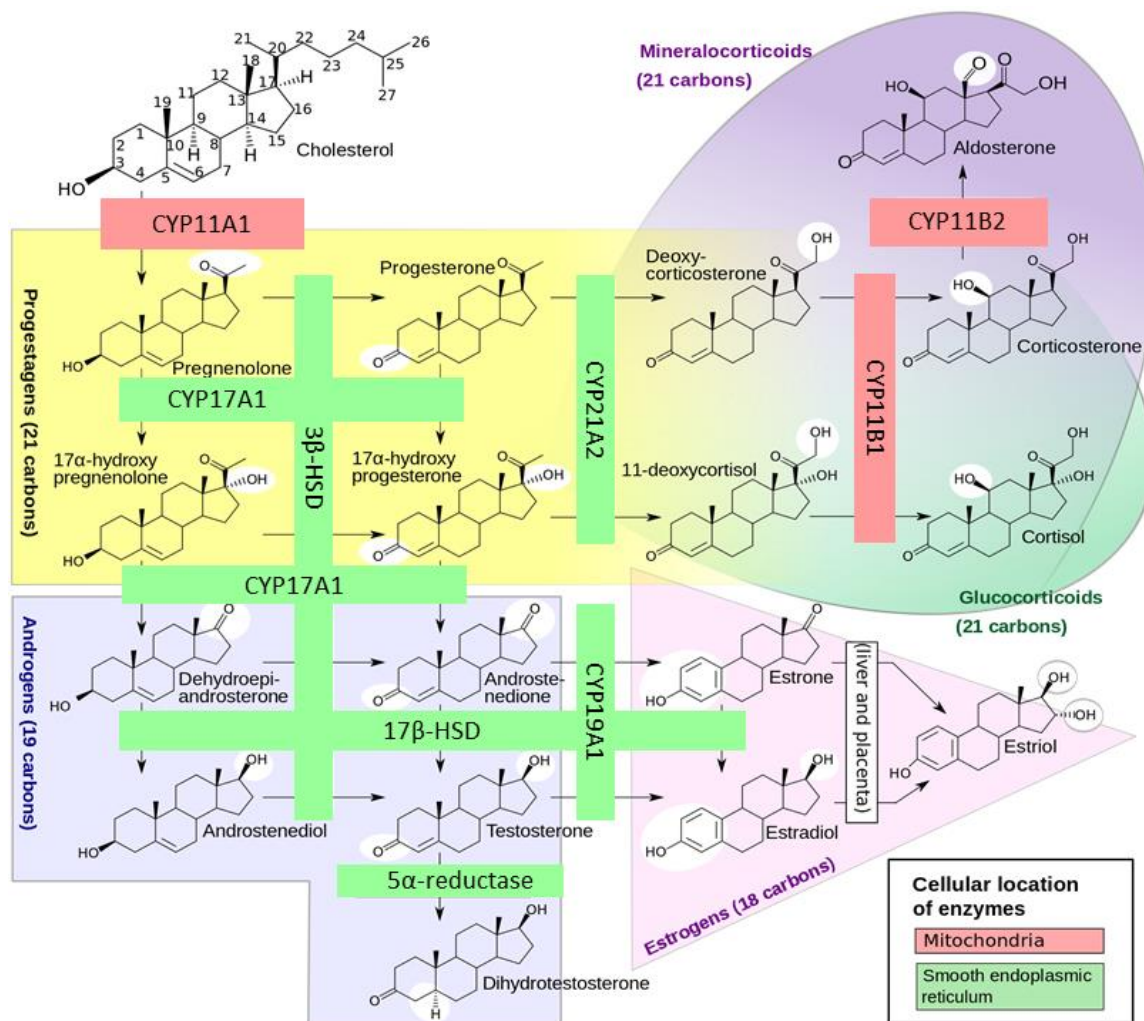
V současné době můžeme v databázi PDB – Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) nalézt struktury již zhruba 1000 enzymů patřících do rodiny cytochromů P450. Pro člověka bylo identifikováno 14 rodin cytochromů P450.<sup>7</sup> Ve své práci se soustřeďuji na mitochondriální cytochrom P450 11A1.

#### 2.1.1. CYP11A1

Cytochrom P450 11A1 známý také jako P450<sub>scc</sub>, CYP11A nebo CYPXIA1 je enzym nacházející se na vnitřní straně mitochondriální membrány a účastní se přeměny cholesterolu na pregnenolon, která je prvním krokem v syntéze steroidních hormonů.<sup>8</sup> Zkratka „scc“ značí „*Side Chain-Cleavage enzyme*“ a ukazuje na místo, kde je cholesterolu odštěpnuta většina vedlejšího řetězce na pozici 17 (obr. 1).

Většina CYP11A1 je situována do kůry nadledvinek a žlutého tělíska. Dalšími místy jsou pak v theca buňkách ve vaječnicích a Leydigových buňkách ve varlatech.<sup>9</sup> V průběhu těhotenství lze zaznamenat výrazné množství CYP11A1 také v placentě.<sup>10</sup> V nízkých množstvích se CYP11A1 nachází také v jiných typech tkání, včetně mozku.<sup>11</sup>

Pomocí imunofluorescenčních metod se specifickými protilátkami bylo prokázáno, že se tento enzym nachází výhradně v mitochondrii, přesněji na její vnitřní membráně směrem k vnitřnímu matrixu.

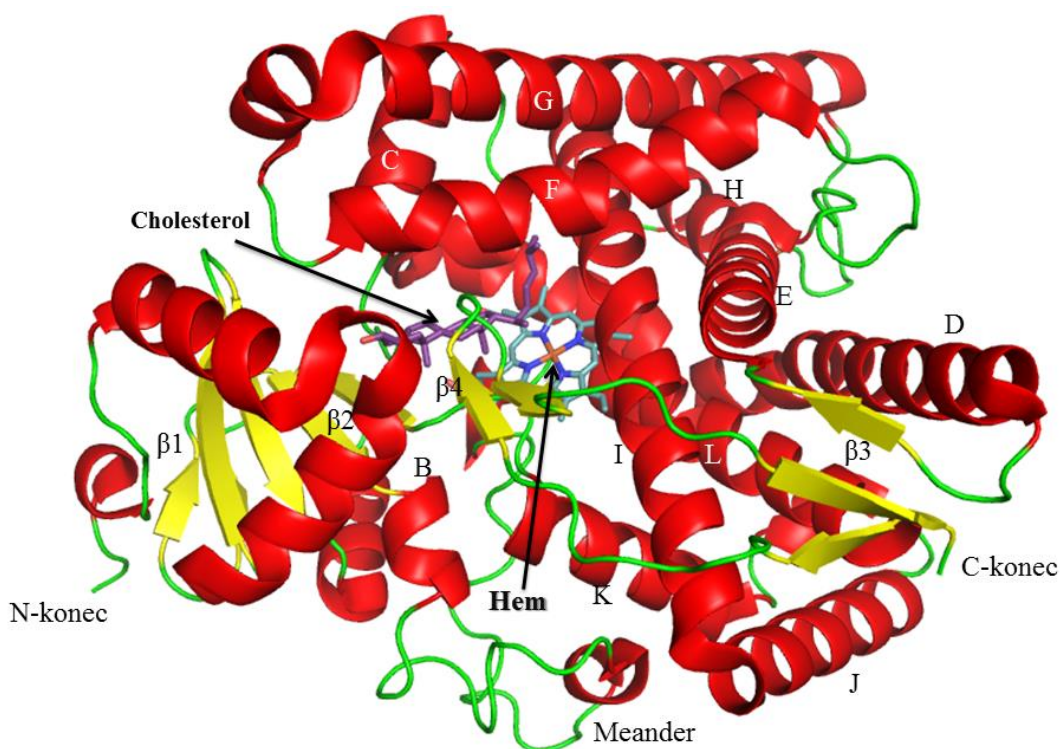


Obr. 1: Metabolismus cholesterolu.

Obrázek byl převzat z ref. <sup>12</sup> a doplněn o názvy genů. V levém horním rohu lze vidět, že CYP11A1 je prvním krokem v metabolismu cholesterolu. Je vidět, že metabolismu steroidů se P450 účastní v hojném počtu.

### 2.1.2. Struktura CYP11A1

Jako u všech proteinů, i u CYP11A1 rozlišujeme N-konec a C-konec řetězce. Dále je struktura polypeptidu tvořena dvanácti  $\alpha$ -helixy (značíme A-L) a čtyřmi  $\beta$ -skládanými listy (značíme  $\beta$ 1-4). Mezi konzervované strukturní prvky pak řadíme cystein s thiolátovou vazbou na hem nebo přenosový protonový systém, který je reprezentován oblastí kolem threoninu a kyseliny glutamové na I-helixu. Tyto aminokyseliny se zapojují do enzymatických reakcí. Proximální strana P450 (definovaná jako ta strana hemu, kterou je navázán na cystein) je natočena do vodného prostředí, distální strana (nad opačnou stranou hemu obsahující kavitu vázající substrát) je spojená s rozhraním membrána-voda.<sup>13</sup> Aktivní místo se nachází na distální straně v blízkosti hemové prostetické skupiny hluboko ve struktuře cytochromu a je zakryváno strukturovanějšími smyčkami – např. dodatečné helixy F' a G'.



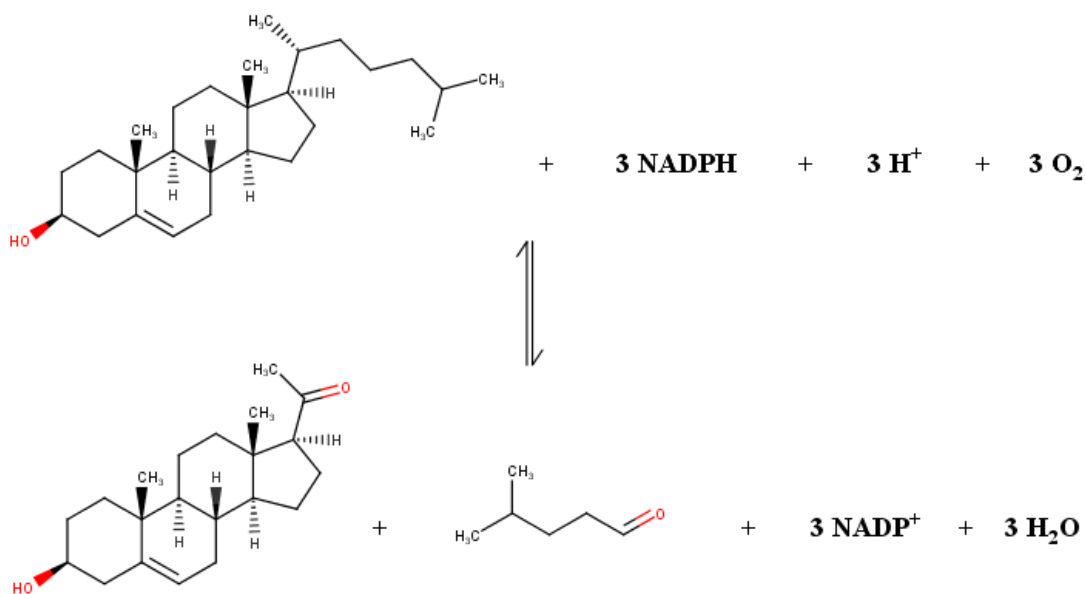
Obr. 2: Struktura CYP11A1 s popsanými sekundárními prvky  
 Struktura je nahlížena z distální strany (PDB ID: 3N9Y), povšimněte si hloubky zanoření hemu.

Od ostatních forem P450 se CYP11A1 liší výraznými změnami v aminokyselinové sekvenci i přesto, že struktura je zachována (obr. 2).<sup>14</sup> Což je potvrzeno i méně než 25% identitou s ostatními cytochromy P450 vázícími cholesterol – CYP7A1, CYP27A1 a CYP46A1, nicméně tyto P450 vážou cholesterol až s nanomolární afinitou.<sup>15</sup>

Funkci cytochromu P450 11A1 lze definovat dvěma způsoby – na základě anotace pomocí enzymové klasifikace (EC), nebo genové ontologie (GO). EC popisuje enzym na základě katalyzované reakce.<sup>16</sup> V našem případě je EC 1.14.15.6 (oxido-redukční reakce s párováním donorů spojená se zabudováním nebo redukcí molekuly kyslíku za přítomnosti redukováného Fe-S proteinu.) GO sjednocuje popis genů a jejich produktů na základě biologických procesů, molekulární funkce či buněčné kompartmentace. CYP11A1 má např. GO 0008386 – cholesterol monooxygenázová aktivita, GO 0055114 – oxidačně-redukční proces, GO 0005506 – navázání iontu železa, GO 0020037 – navázání hemu.

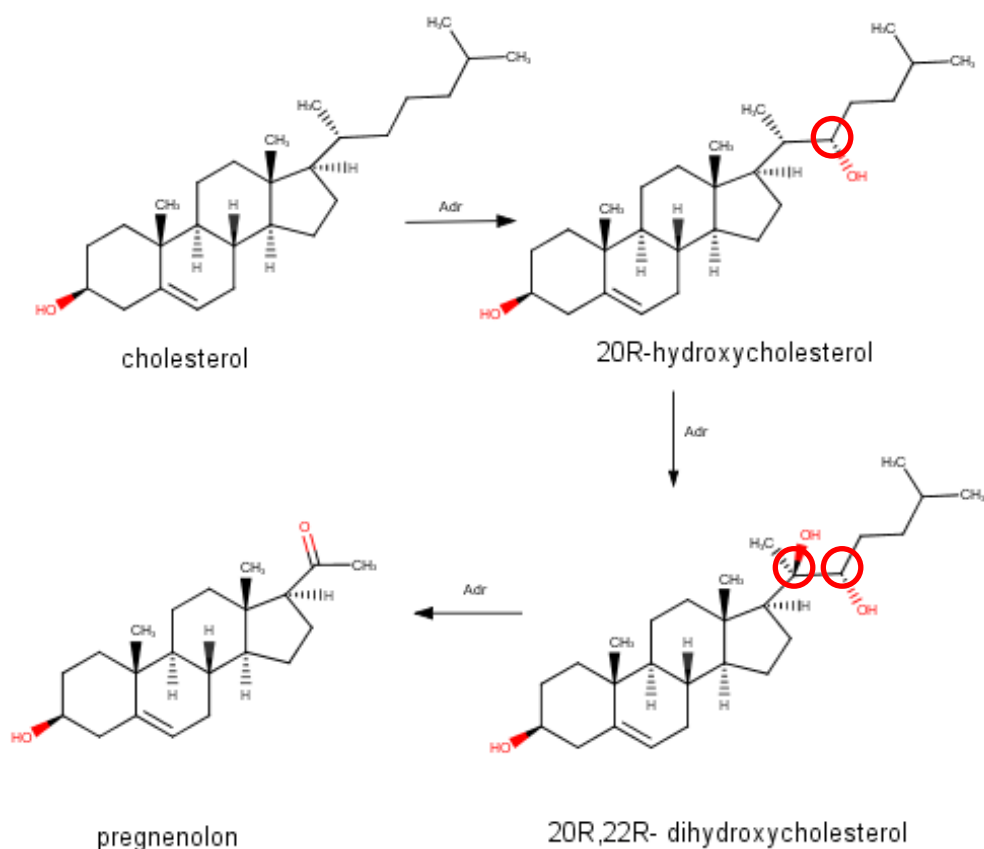
### 2.1.3. Mechanismus účinku a ovlivnění funkce

CYP11A1 katalyzuje reakci (obr. 3), při níž reaguje cholesterol s redukováným NADPH a za přítomnosti kyslíku a odštěpením velké části postranního řetězce vzniká pregnenolon, 4-methylpentanal, oxidovaná forma NADP<sup>+</sup> a voda.<sup>17</sup> Kofaktorem celé této reakce je hem-thiolát nacházející se v aktivním místě cytochromu.



Obr. 3: Souhrnná reakce katalyzovaná pomocí CYP11A1

Pokud se podíváme na reakci podrobněji, zahrnuje tři monooxygenázové reakce (obr. 4) ve kterých postupně vznikají 22R-hydroxycholesterol, 20α,22R-dihydroxycholesterol a nakonec je zrušena vazba mezi uhlíky 20 a 22 a vzniká pregnenolon a 4-methylpentanal.



Obr. 4: Souhrnná rovnice pro vznik pregnenolonu z cholesterolu pomocí 3 monooxygenázových reakcí.

Pregnenolon je rozsáhle využíván jako prekurzor mnoha neurosteroidů a i on sám slouží jako neurosteroid.<sup>18</sup> Z mitochondrie je ve většině případů exportován nebo změněn na jiné sloučeniny (progesteron, testosteron) za pomoci dalších enzymů v endoplazmatickém retikulu.<sup>19</sup>

Množství CYP11A1 proteinu v buňce je řízeno daným hormonálním systémem.<sup>9</sup> Produkce je zvýšena přítomností kortikotropinu (ACTH), naopak snižována pomocí jaderného receptoru DAX1.<sup>20</sup> Jelikož je tedy produkce steroidů katalyzovaná CYP11A1 důležitá pro život, jeho nedostatek je obvykle spojován se smrtí a je známo pouze malé procento přežití.<sup>18</sup>

Mutace v genu CYP11A1 vedou k nedostatku steroidních hormonů. Ve vzácných případech může dojít ke kongenitální adrenální hyperplazii (CAH), či její lipoidní formě (CLAH). K tomuto onemocnění může přispívat i částečné omezení funkce StAR proteinu. Do současné doby bylo zjištěno 7 typů mutací na jedné nebo obou alelách genu s prokázaným efektem.

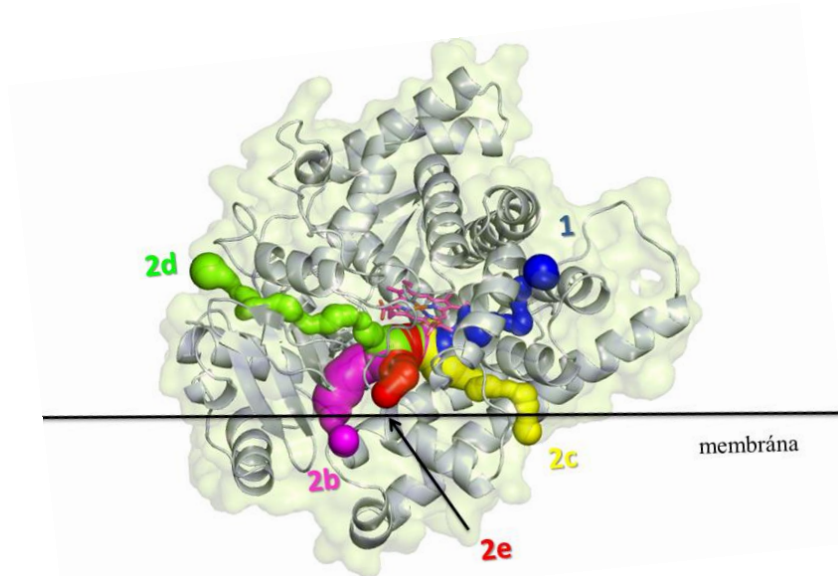
Na rozdíl od mikrosomálních P450 není CYP11A1 membránově kotvený pomocí N-terminálního helixu. Na začátku jeho sekvence je místo N-terminálního transmembránového helixu tzv. mitochondrion – tranzitní peptid pro lokalizaci v mitochondrii, který se odštěpí.<sup>21</sup> S membránou CYP11A1 interaguje za pomoci hydrofobního regionu na FG smyčce.<sup>22</sup>

#### **2.1.4. Kanály**

Pro katalytickou reakci P450 je důležité, aby se substrát a molekulární kyslík navázaly v aktivním místě a také aby produkt mohl opustit protein. Aktivní místo je, jak již bylo zmíněno, u P450 situováno hluboko uvnitř proteinu u hemového kofaktoru na distální straně. Pozice kanálů neboli tunelů (v textu jsou používány oba výrazy) tedy dává informaci, jak se k aktivnímu místu dostat a jak jej poté opustit. Dynamický pohyb proteinu může nicméně ovlivňovat otevírání a zavírání kanálů, které tak nelze vidět v rigidní krystalové struktuře.<sup>23</sup> Změny kanálů jsou ovlivněny jejich polohou, topologií proteinu a také pohybem celého proteinu.<sup>24</sup> Zjištění pozice a topologie sítě kanálů nám především poskytuje užitečný základ pro zkoumání přístupu ligandů a výstupu produktů.

Kanály řadíme podle jejich mechanismu otvírání na kanály vzniklé pohybem sekundárních prvků, kanály vzniklé konformačním pohybem smyčky a na ostatní. Nomenklatura, která bude nadále použita, byla zavedena skupinou prof. Wade.<sup>25</sup> V krystalu CYP11A1 (PDB ID: 3N9Y,<sup>26</sup>) lze vidět kanály (obr. 5) 1, 2b, 2c, 2d a 2e.

U savčích P450 nesmíme opomenout na vliv umístění P450 na lipidových dvojvrstvách, a předpokládáme tedy, že vstupní a výstupní kanály mohou být rozdílné. Substráty mají tendenci být spíše hydrofobní a přicházet z lipidové dvojvrstvy, naopak produkty opouštějící aktivní místo jsou více hydrofilní a odchází směrem do vodného prostředí.<sup>27,28</sup>



Obr. 5: Krystalová struktura cytochromu P450 11A1 (PDBID: 3N9Y) se zvýrazněnými tunely napočítanými pomocí programu MOLE 2.0 se znázorněnou linií hlav membrány.

## 2.2. Membrány

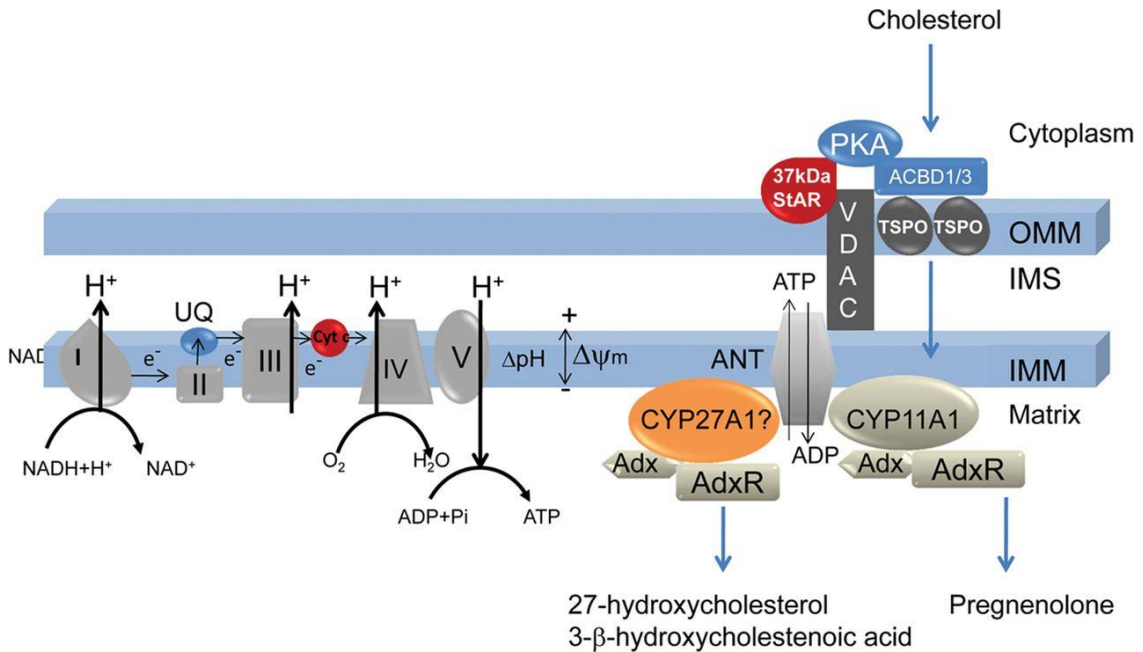
Aby se látka dostala k cílovým strukturám, které se nejčastěji nachází uvnitř buněk, musí proniknout buněčnou membránou. Membrány jsou klíčové především pro látkovou výměnu buňky, ale také pro distribuci biologicky účinných látek (např. léčiv, ale i jiných xenobiotik) a jsou fluidním 2D systémem. Důležité buněčné funkce (biokatalýza, transport iontů, imunitní rozpoznávání cizích struktur) jsou poté zajištěny membránovými proteiny a také sacharidy, které jsou součástí membrán.

Membrány v buňce mají strukturu dvojvrstvy, ve které se uvnitř nachází dlouhé uhlovodíkové řetězce a jsou ohraničeny z obou stran vrstvou nabitých částic. Tyto částice k sobě poutají elektrostatické interakce.<sup>29</sup> Rozlišujeme lipofilní vnitřní část a nabitě „hlavy“, celá molekula je tedy amfifilní. Z chemického hlediska jsou buněčné membrány tvořeny fosfolipidy, podle kterých rozlišujeme několik typů membrán.

V této práci se zaměřuji na CYP11A1, který se nachází na vnitřní mitochondriální membráně. Složení vnitřní mitochondriální membrány bylo zkoumáno na *Saccharomyces cerevisiae* a je následující: 38,4 % fosfatidylcholinu, 24,0 % fosfatidyletanolaminu, 16,2 % fosfatidylinositolu, 3,8 % fosfatidylserinu, 1,5 % fosfatidové kyseliny a 16,1 % kardiolipinu.<sup>30</sup> Vnitřní mitochondriální membrána je také zahrnuta do konečného kroku aerobního dýchání buňky pomocí řetězce z různých proteinů sloužících k elektronovému transportu, kde vytváří negativní náboj podél vnitřní membrány.

Prostor mezi vnější a vnitřní membránou obsahuje také  $H^+$  ionty, které spolu se zmiňovaným negativním nábojem vytváří membránový potenciál a tak podporují výrobu ATP. Ne náhodou se mitochondrii říká „*elektrárna buňky*“. <sup>31</sup> Schématicky lze vidět funkci mitochondriální membrány a na ni navázaných částí na obr. 6.

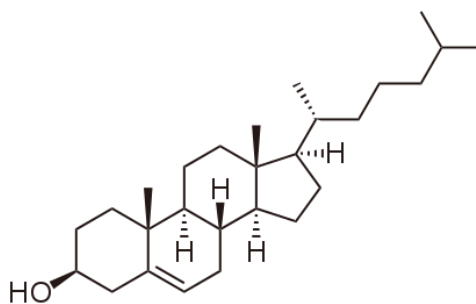
V různých typech membrán najdeme pohromadě více typů P450, které se zde vyskytují bez omezení samotného prostředí membrány, avšak interakcím protein-protein nebrání. Heterogenita membrány může ovlivnit funkci P450 buď zakoncentrováním nebo oddělením proteinů v rámci membránových regionů. <sup>13</sup>



Obr. 6: Schéma mitochondriální membrány s prostupujícím cholesterolem. Elektrony z NADH a  $FADH_2$  jsou přenášeny z komplexu I na II, poté přes ubiquinon (UQ) na komplex III a cytochrom c následně přeneše elektron na komplex IV spolu s redukcí kyslíku na vodu. Tok elektronů je doprovázen přenosem  $H^+$  přes vnitřní mitochondriální membránu a vytvářením elektrochemického potenciálu. Návrat  $H^+$  zpět do matrixu generuje změnu ADP na ATP. Cholesterol je do matrixu mitochondrie dopraven přes tzv. cholesterolový kanál pomocí StAR a metabolizován pomocí CYP11A1 (v komplexu s AdxR a Adx) na pregnenolon. Upraveno dle ref. <sup>32</sup>

### 2.3. Cholesterol

Cholesterol (obr. 7) řadíme mezi velmi důležité organické molekuly se sterolovým kruhem. Cholesterol je biologicky syntetizován v živočišných buňkách, pro které se stal nedílnou součástí membrán, u kterých ovlivňuje jejich prostupnost a fluiditu. Asi 50-70 % jeho celkového denního množství (1000 mg/den) v našem těle je syntetizováno endogenně v endoplasmatickém retikulu a cytosolu. <sup>5</sup> Důležitou roli hraje i v biosyntéze steroidních hormonů, vitamínu D a žlučových kyselin. <sup>9</sup> K jejich syntéze se využívá denně průměrně 40-50 mg cholesterolu. <sup>33</sup>



Obr. 7: Struktura *nat*-cholesterolu.

Struktura cholesterolu obsahuje 8 stereochemických center, existuje tedy 256 stereoizomerů, z nich jsou ale pouze dva biologicky významné. Ve své práci se zaměřuji na přirozeně se vyskytující *nat*-cholesterol (z anglického *natural*).

Přítomnost cholesterolu můžeme dále zjistit i v myelinové pochvě u neuronů, kde ve Schwannových buňkách spolu se sřingomyelinem a cerebrosidem tvořĩ izolacní vrstvu, která má za úkol, právě díky izolaci, přenášet elektrický impuls.<sup>34</sup> Ztráta těchto Schwannových buněk a následná demyelinace je jedním z důvodů autoimunitního onemocnění – roztroušené sklerózy.

Poprvé byl cholesterol identifikován v roce 1769 v pevném stavu ve žlučových kamenech, avšak pojmenován „*cholesterine*“ byl až v roce 1816 francouzským chemikem Michelem Eugènem Chevreulem.<sup>35</sup>

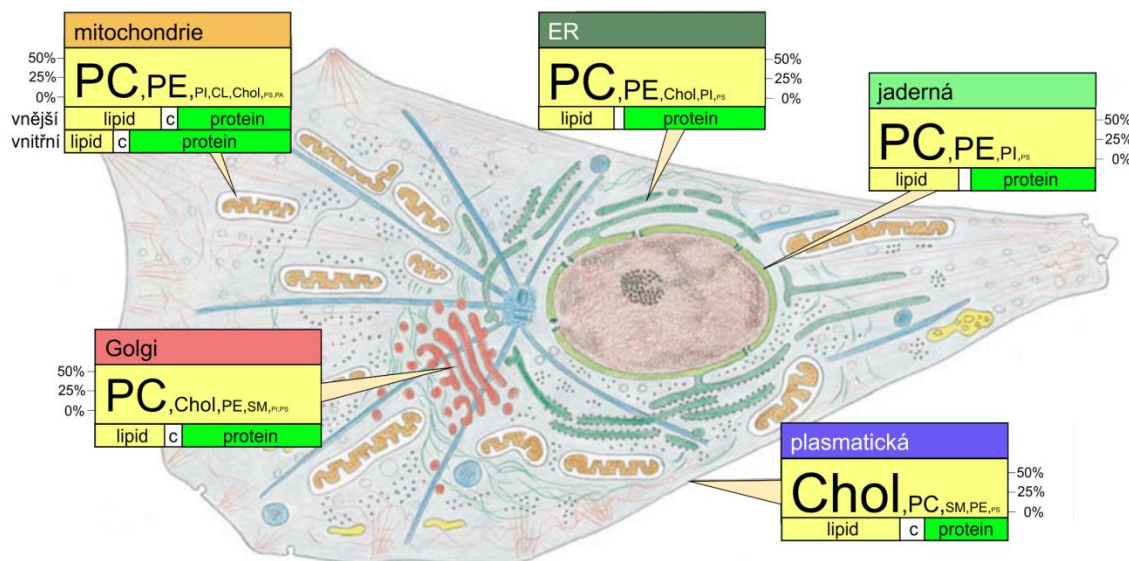
Endogenní syntéza cholesterolu se skládá z velkého množství kroků. Probíhá především v játrech (25-50% z celkové denní produkce v lidském těle), následně ve střevech (15%), nadledvinách a pohlavních orgánech. Základem je acetyl-CoA reagující s acetoacetylem-CoA na 3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA za pomoci HMG-CoA-syntázy. Následně je HMG-CoA redukován na mevalonát nevratnou reakcí za katalýzy HMG-CoA reduktázy. S přispěním ATP a za ztráty molekuly CO<sub>2</sub> proběhne konverze mevalonátu na isopentenyl pyrofosfát, který je dále převeden na skvalen. Z něho je nakonec přes lanosterol syntetizován cholesterol.

Buněčná membrána a především její fluidita je ovlivňována mnoha faktory, z nichž jednou je složení membrány. Příznivým vlivem působí  $\omega$ -3-nenasycené mastné kyseliny, naopak zvýšená koncentrace cholesterolu zhoršuje fluiditu membrány.<sup>29</sup> Na druhou stranu je cholesterol přítomen ve všech buněčných membránách, ovšem je třeba dbát na to, aby jeho obsah nebyl zvýšený. Za transport cholesterolu (a také triacylglycerolů a fosfolipidů) jsou odpovědné lipoproteiny. Na hladinu cholesterolu v krvi a také na poruchy distribuce má vliv především rovnováha navázání cholesterolu na lipoproteiny nízké hustoty (LDL, transport krví do těla) a lipoproteiny vysoké hustoty (HDL, transport do jater a odbourání).<sup>36</sup>



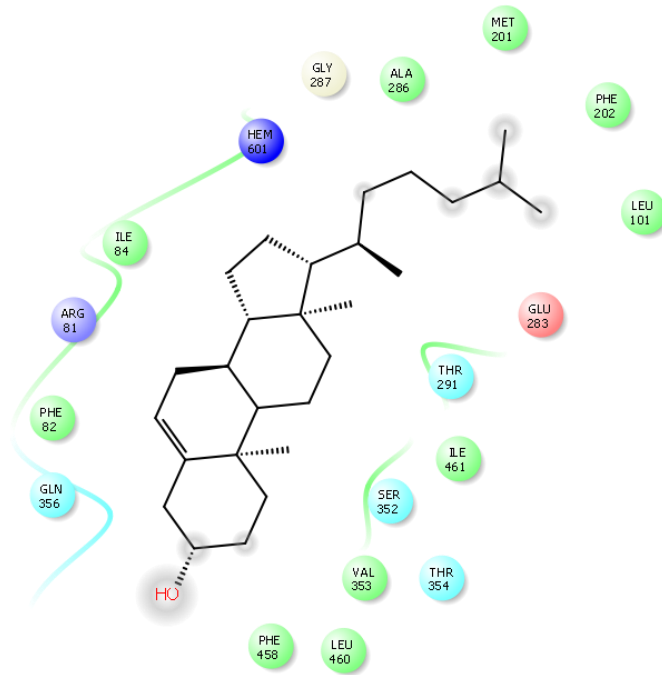
V současné době se výzkumy v souvislosti s cholesterolem zabývají jeho vazbou a ovlivňováním iontových kanálů v GABA<sub>A</sub> receptoru, nikotinovo-acetylcholinovém receptoru nebo ve vnitřním usměrňovači draselného iontového kanálu. Dále je zkoumán jako aktivátor ERR $\alpha$  receptoru.<sup>37</sup>

Cholesterol považujeme také za důležitou součást mnoha membrán, kde má velké zastoupení především v plasmatické a mitochondriální membráně a v membráně Golgiho aparátu (obr. 8).

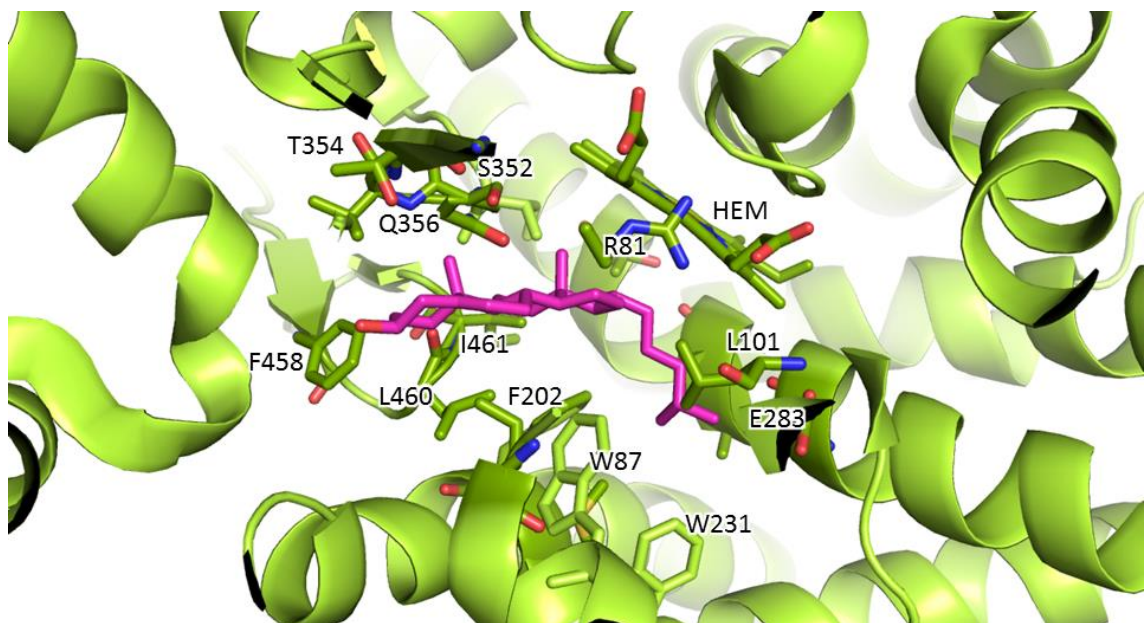


Obr. 8: Schématické složení membrán v eukaryotické buňce podle umístění, kde velikost písma zastupuje molární zastoupení lipidů v dané membráně.<sup>38,39</sup>

Pro přenos cholesterolu z vnější do vnitřní mitochondriální membrány je důležitý steroidogenní akutní regulační protein (StAR), který také ovlivňuje produkci steroidních hormonů, kdy reaguje na chování lidského těla ve stresových situacích. Způsob, jak se cholesterol váže v aktivním místě CYP11A1 je ukázán na obrázcích 9 a 10. V této práci pak zkoumám, jak se do dotyčného místa je schopen dostat.



Obr. 9: Aminokyseliny v okolí cholesterolu do 4 Å v krystalové struktuře CYP11A1. Zeleně znázorněny hydrofobní AMK, tyrkysovou polární AMK, červeně záporně nabitě AMK a fialově kladně nabitě AMK (vytvořeno v programu Maestro od firmy Schrödinger<sup>40</sup>)



Obr. 10: Aminokyseliny v okolí cholesterolu do 4 Å v krystalové struktuře CYP11A1. Aminokyseliny v okolí, hem a cholesterol v reprezentaci *sticks*, protein v reprezentaci *cartoon*. (Vytvořeno v programu PyMOL).

### 3. METODY

Za pomoci počítačových simulací můžeme zkoumat biologické děje na úrovni atomů. Výpočty kvantové mechaniky jsou ovšem velmi náročné a lze je použít pouze pro malý počet atomů v systému, na velký systém, který je zde reprezentován proteinem a membránou je nutné využít tzv. molekulovou mechaniku.

#### 3.1. Molekulová mechanika

Molekulovou mechaniku (MM) řadíme mezi metody, pomocí kterých je možné popsat pohyb atomů i ve větších systémech (>1000 atomů). Tento pohyb popisujeme soustavou rovnic, obsahujících experimentálně získané konstanty a zanedbáváme detailní elektronické vlastnosti atomů. Potenciální energie atomů v systému je funkcí polohy zkoumaných atomů  $E_p = f(R)$ , kde potenciální energii počítáme jako součet příspěvků vazebných (délka vazby, vazebný úhel, pravý a nepravý dihedrální úhel) a nevazebných interakcí (Coulombický potenciál, Lennard-Jonesův potenciál). (rovnice 1)

$$\begin{aligned} E_p &= E_{vazebných} + E_{nevazebných} = \\ &= \sum_{vazby} E_{vazby} + \sum_{úhly} E_{úhly} + \sum_{dihedrály} E_{dihedrály} + \\ &+ \sum_{nepr.dihedrálů} E_{nepr.dihedrály} + \sum_{elst} E_{Coulomb} + \sum_{LJ} E_{LJ} \end{aligned} \quad (1)$$

Tento vztah vyjadřuje tzv. rovnici silového pole, kde provádíme sumace přes všechny parametry pro párové interakce.<sup>41</sup>

#### 3.2. Molekulová dynamika

Pokud přidáme k potenciální energii, popsané pomocí MM, energii kinetickou a aplikujeme je do Newtonových pohybových rovnic, získáme zrychlení a ovlivnění rychlosti daných  $N$  interagujících atomů. (rovnice 2) Síla  $F_i$  je popsána jako záporná derivace potenciálové funkce podle souřadnic.

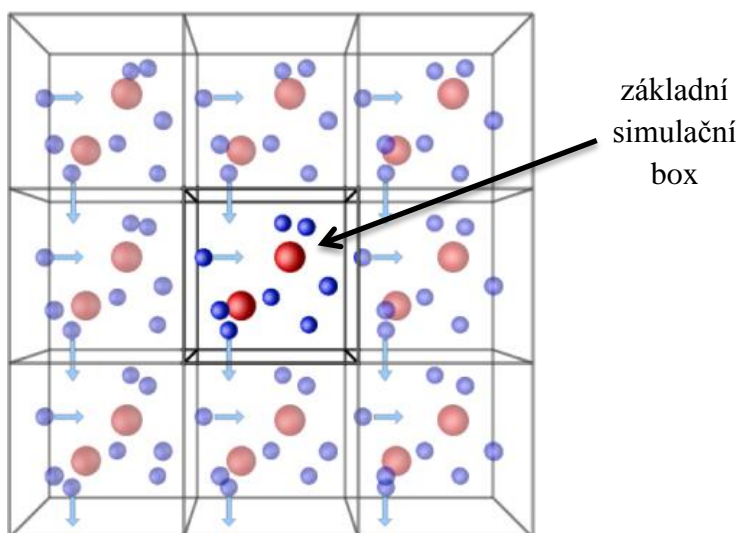
$$F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i} = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} \quad i \in N \quad (2)$$

Tyto rovnice jsou řešeny v nastavených krátkých simulačních krocích, ve kterých jsou podmínky systému považovány za konstantní a které odpovídají nejrychlejším dějům v řádu femtosekund. K výpočtům používám program GROMACS, který využívá tzv. *leap-frog* algoritmus, jenž střídavě vyhodnocuje rychlost a polohu. (rovnice 3 a 4)

$$v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m} F(t) \quad (3)$$

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v(t + \frac{1}{2} \Delta t) \quad (4)$$

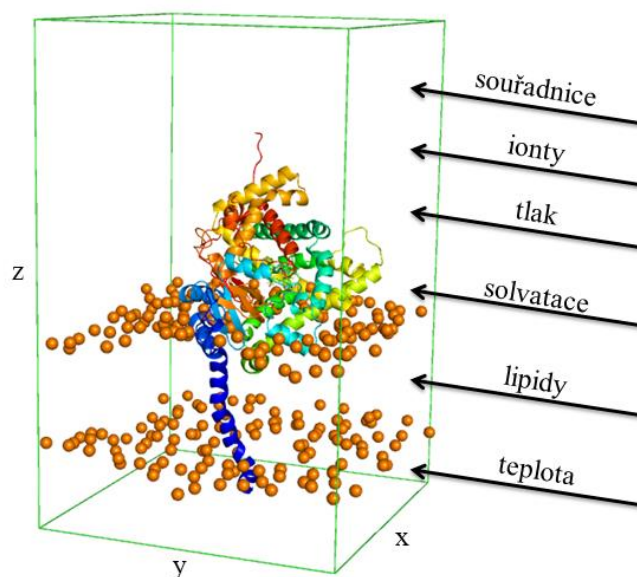
Výsledkem je trajektorie souřadnic atomů v čase, ze které lze zjistit další makroskopické vlastnosti zkoumaného systému. Ve výpočtech ještě využíváme princip periodických okrajových podmínek (obr. 11).



Obr. 11: Schematické zobrazení principu periodických okrajových podmínek. Částice, která se dostává ven z boxu, může volně přecházet do boxu sousedního. Přepřacováno dle <sup>42</sup>

### 3.3. Nastavení MD simulace

Struktura katalytické domény CYP11A1 <sup>26</sup> byla získána z databáze Protein Data Bank (www.rcsb.org) (PDB ID: 3N9Y, chain A). Dále jsem připravila lipidovou dvojvrstvu z čistého dioleýl-fosfatidylcholinu (DOPC), která prošla ekvilibrací a CYP11A1 jsem do ní zanořila pomocí programu `g_membed`<sup>43</sup> z programového balíku GROMACS 4.5.5.<sup>41</sup> CYP11A1 ukotvený do membrány byl následně zasazen do periodického boxu (obr. 12) a solvatován TIP3P modelem vody (~22000).<sup>44</sup> Při konečné úpravě struktury byly přidány ionty  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  odpovídající fyziologické koncentraci 0,150 M NaCl ve vodné fázi. Parametry pro hemový kofaktor byly převzaty z ref. <sup>45</sup>.



Obr. 12: Schematické zobrazení simulačního boxu se základními charakteristikami, které do simulace zadáváme.

Všechny simulace byly realizovány pomocí programového balíku GROMACS 4.5.5.<sup>41</sup> Pro membránu jsme použili silové pole SLipids<sup>46</sup> a pro protein silové pole AMBER ff99SB.<sup>47</sup> Po vložení enzymu do membrány byl celý systém minimalizován metodou „*steepest descent*“, načež následovala 200-500 ns dlouhá molekulárně-dynamická (MD) simulace. Parametry MD simulace byly nastaveny takto: integrační časový krok 2 fs s algoritmem p-LINCS,<sup>48</sup> konstantní teplota 310 K udržovaná a kontrolována Nosé-Hooverovým termostatem<sup>49</sup> každých 0,5 ps; tlak systému byl udržován a kontrolován Parrinello-Rahmanovým barostatem<sup>50</sup> na hodnotě 1 bar s kompresibilitou  $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$  každých 10 ps.

Struktura a pozice cholesterolu byla získána z krystalové struktury CYP11A1, se kterou byl cholesterol společně vykrytalizován.<sup>26</sup> Parametry cholesterolu kompatibilní se silovým polem AMBER ff99SB byly staženy z webové stránky Slipids (<http://www.fos.su.se/~sasha/SLipids/>).<sup>51</sup>

### 3.4. Dokování do aktivního místa

Dalším krokem v analýze bylo molekulové dokování cholesterolu do aktivního místa. Molekulární dokování řadíme mezi metody racionálního návrhu léčiv, při kterém známe strukturu cíle (receptor s aktivním místem) a v tomto případě i ligandu. Touto metodou lze predikovat možnou geometrii zkoumané molekuly v aktivním místě a její interakční energii. Pro vyhodnocení dané geometrie a energie je využívána skórovací funkce.

Tato analýza byla provedena programem AutoDock Vina 1.1.2<sup>52</sup> a slouží pro vyhodnocení správnosti vložení cholesterolu zpět do aktivního místa porovnáním s jeho pozicí v krystalové struktuře.

### 3.5. Vyhledávání tunelů nástrojem MOLE

K analýze tunelů jsem použila nástroj MOLE 2.0 vytvořený MU v Brně ve spolupráci s UP Olomouc.<sup>53</sup> Výpočty jsou založeny na předzpracování struktury proteinu pomocí Voroného diagramu váženého van der Waalsovým poloměry atomů. Následně se rozdělí prohledávaný prostor na několik menších nespojitých částí (tzv. kavitační diagramy) a identifikuje v nich možné startovní a koncové body. Dijkstrův algoritmus poté vyhledává tunely na Voroného mříži mezi startovními a koncovými body. Tak je vytvořena centrální křivka v tunelu definovaná vrcholy z Voroného diagramu.

### 3.6. Dokování do tunelů

Po vypočtení všech dostupných tunelů následovalo dokování do těchto tunelů pomocí AutoDock Vina a příslušného speciálního skriptu využívajícího opět program MOLE 2.0.<sup>53</sup> Výsledkem tohoto dokování byla pozice cholesterolu, která vykazovala nejvyšší vazebnou energii. K vizualizaci výsledků dokování byl využit program PyMOL verze 1.4.1 od společnosti Schrödinger, LLC.<sup>54</sup>

### 3.7. Krátké volné simulace pohybu cholesterolu v tunelech

Výsledky vizualizace jsem následně využila ke zvolení několika pozic cholesterolu v rámci zkoumaných otevřených tunelů. Tyto cholesteroly spolu se strukturou proteinu, DOPC membránou, doplněnou vodou a přidanými Na<sup>+</sup> a Cl<sup>-</sup> ionty byly základem ke krátkým volným simulacím v délce 50 ns. Nastavení pro simulace je principiálně popsáno v předchozích oddílech. V rámci výsledků byly závěry z těchto simulací použity k možnému určení tzv. bodu zlomu v tunelech při cestě cholesterolu do aktivního místa CYP11A1.

### 3.8. Analyzační nástroje

Z balíku GROMACS 4.5.5 byly dále pro analýzu použity tyto nástroje:

- g\_dist umožňuje vypočítat vzdálenost mezi COM dvou skupin jako funkci času
- g\_rmsf umožňuje vypočítat změny fluktuací pozic atomů v rámci trajektorie (root mean square fluctuation)
- g\_rms porovnává dvě struktury z pohledu průměrné změny vzdálenosti příslušných atomů
- g\_sgangle umožňuje vypočítat úhel a vzdálenost mezi dvěma skupinami atomů definovaných v příslušném indexu
- g\_hbond umožňuje vypočítat a analyzovat vodíkové vazby
- g\_mmpbsa umožňuje vypočítat složky vazebné energie pomocí MM-PBSA metody<sup>55</sup> bez entropických podmínek a energetických příspěvků každého rezidua a využívající schéma energetické dekompozice

Kromě nástrojů z balíku GROMACS, jsme použili i analýzy dostupné v programech PyMOL<sup>54</sup> a Maestro.<sup>40</sup>

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

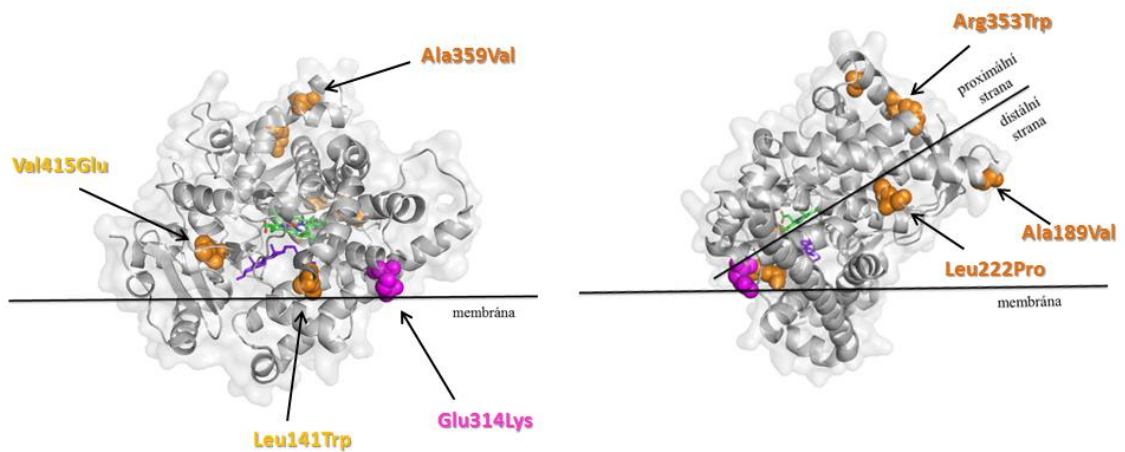
Prvním krokem byla analýza strukturních mutací a ověření orientace cholesterolu při dokování vůči jeho pozici v aktivním místě v krystalu CYP11A1. Následně jsme simulovali CYP11A1 na DOPC membráně bez a s cholesterolem v aktivním místě. Vyzkoušeli jsme také simulovat i CYP11A1 s N-terminálním helixem, abychom viděli, jaký vliv na pozici na membráně má přítomnost transmembránového helixu. V simulovaných systémech jsme následně analyzovali přítomnost kanálů a pomocí molekulového dokování jsme nacházeli startovní místa pro následné simulace vstupu cholesterolu do aktivního místa.

### 4.1. Analýza struktury CYP11A1 a efektů dostupných mutací v rámci jejich strukturní role

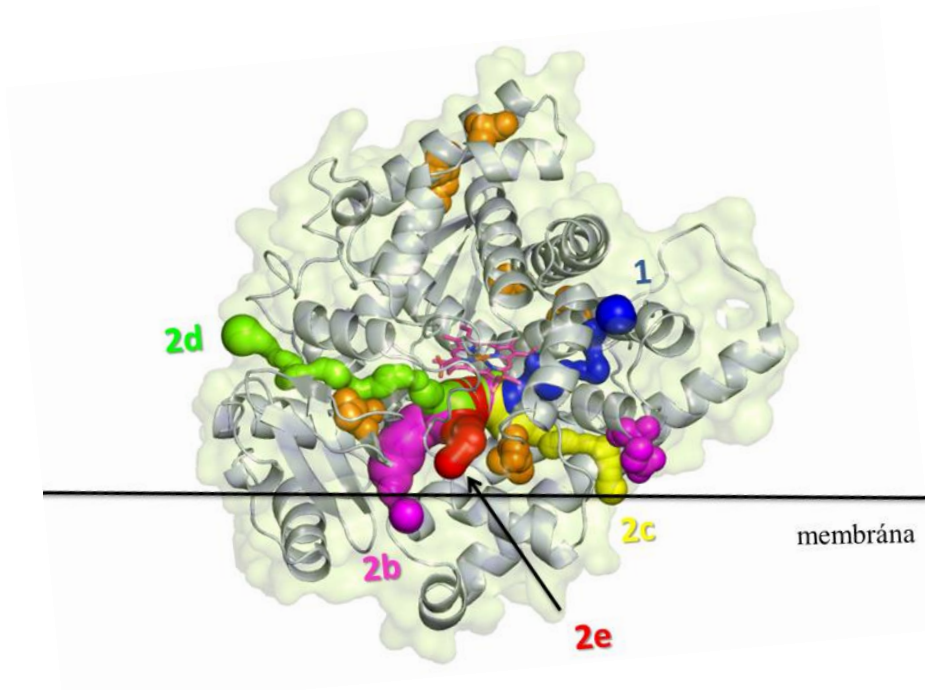
Záměny aminokyselin v sekvenci proteinu mohou vést k nevratnému poškození jeho funkce. Z tohoto důvodu jsem se zaměřila na pozice jednotlivých známých mutací v CYP11A1 (obr. 13). Tato data lze získat v z webu uniprot.org pro všechny typy mutací v lidském těle. Tyto varianty mutací lze rozdělit podle následku mutace na organismus: onemocnění, predikce škodlivosti, predikce benigního onemocnění, mutace nezpůsobující onemocnění.

Příkladem onemocnění způsobeného mutací v CYP11A1 je akutní nadledvinkový nedostatek (acute adrenal insufficiency), což je vzácná vrozená porucha, která se může objevit již v raném dětství. Zvyšuje se aktivita ACTH a plazmatického reninu a nadledvinkové steroidy mají velmi nízkou hladinu, nebo úplně chybí. Pacienti 46,XY mají často zvětšené vnější ženské pohlavní orgány, ale nevykazují výrazné zvětšení nadledvinek typické pro CLAH. Toto onemocnění bylo zjištěno a publikováno již u 6 typů mutací získaných z dokumentů uniprot.org. Jedná se o: A189V, R353W, L141W, L222P, A359V, V415E. Poslední mutací je E314L, kdy ale již nebereme v úvahu vliv na strukturu, jelikož se jedná o polymorfismus.

Dále jsem zkoumala umístění jednotlivých mutací vůči tunelům v krystalu a zanoření do membrány. V tomto ohledu jsou mutace rozmístěny spíše mimo pozice kanálů pozorovaných v krystalové struktuře (PDB ID: 3N9Y, obr. 14). Můžeme tedy předpokládat, že zjištěné mutace ovlivňují spíše přenos elektronu z adrenodoxinu na proximální straně než přístupovou cestu cholesterolu skrze kanály.<sup>56</sup> Mutace v CYP11A1, která inhibuje jeho správnou funkci je navíc často doprovázena také mutací ve StAR proteinu.<sup>57</sup>



Obr. 13: Znárodnění umístění jednotlivých mutací v CYP11A1 (PDBID: 3N9Y) publikovaných na webu UniProt. <sup>58</sup> Fialovou barvou je znázorněna AMK vedoucí k polymorfismu (nemá však vliv na strukturu), oranžovou barvou AMK vedoucí k akutnímu nadledvinkovému nedostatku.

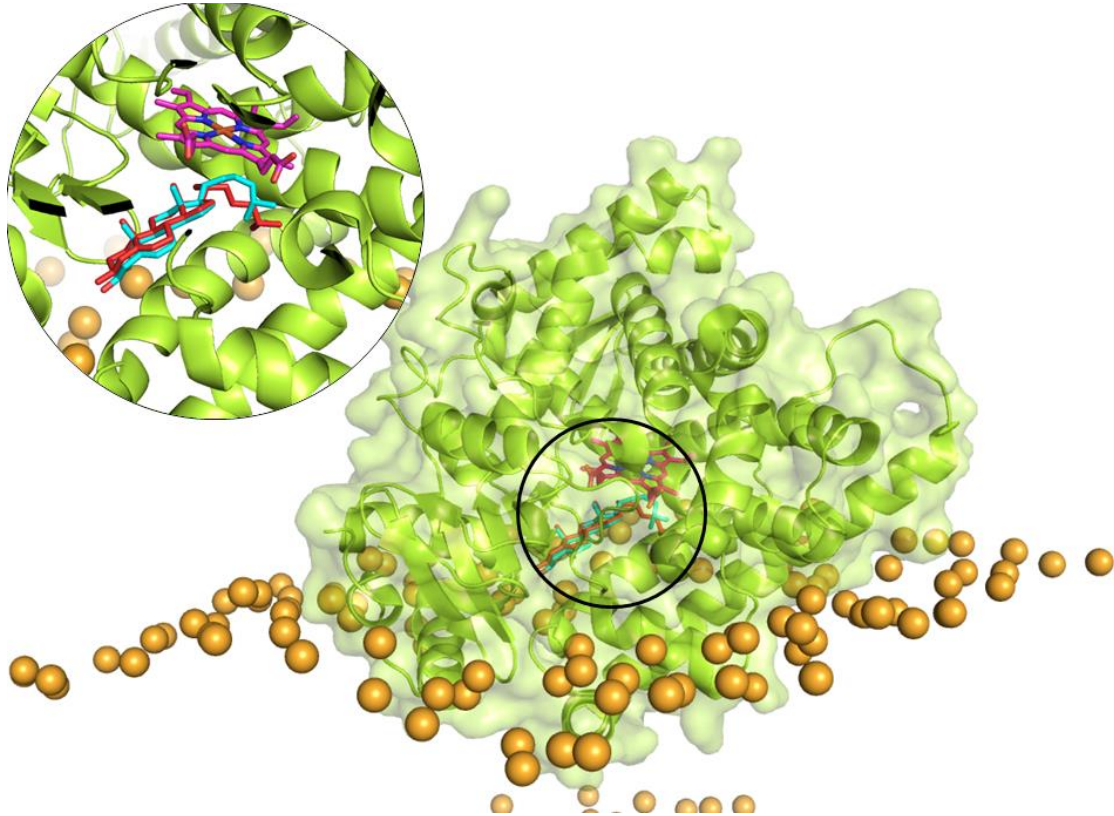


Obr. 14: Krystalová struktura CYP11A1 s hemovým kofaktorem v aktivním místě s tunely vypočítanými pomocí programu MOLE 2.0 s pojmenováním dle <sup>25</sup>. Oranžově jsou vyznačeny mutace aminokyselin s onemocněním, v barvě magenta poté polymorfismus, který ale nevede ke strukturálním změnám. Černá linka vyznačuje pozice hlav molekul DOPC nacházejících se v membráně.



## 4.2. Ověření nadokované polohy cholesterolu

Na základě porovnání vazebných energií získaných z dokování a natočení molekuly cholesterolu, byla nejvýhodnější už první póza s nejvyšší vazebnou energií -11,6 kcal/mol. Natočení molekuly cholesterolu bylo shodné s pozicí, při níž dochází k oxidaci a odštěpení vedlejšího alifatického řetězce. Na obr. 15 lze vidět porovnání krystalové struktury a výsledek dokování do aktivního místa.

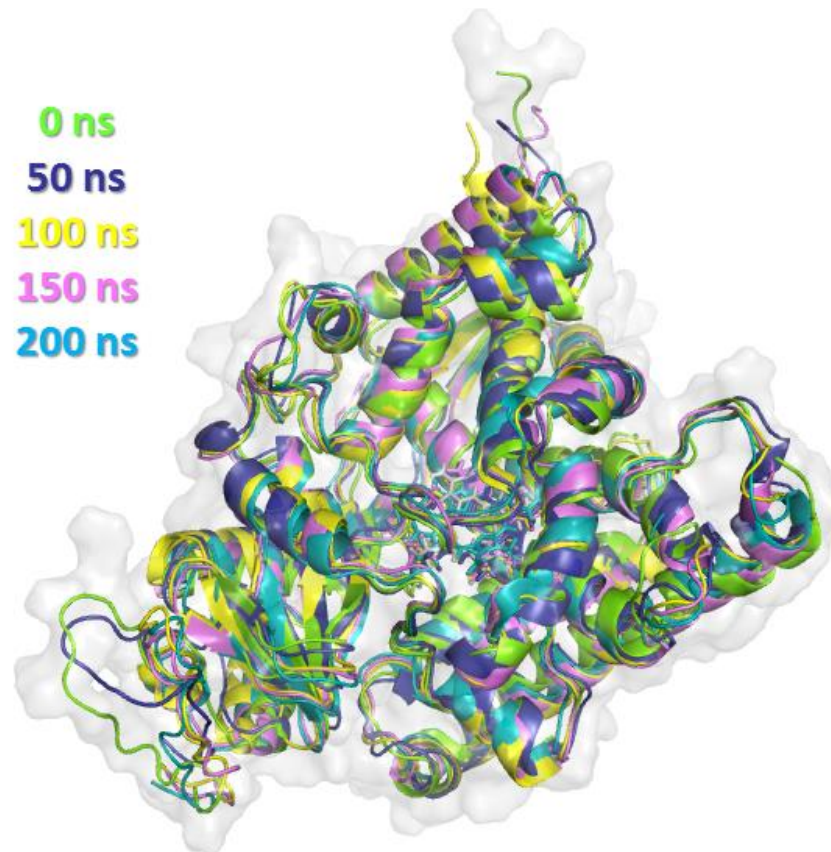


Obr. 15: Poloha cholesterolu v krystalové struktuře CYP11A1 (v reprezentaci *cartoon*) zanořené v DOPC membráně (reprezentace *spheres*). Pozice cholesterolu v krystalu znázorněna červeně, nadokovaná pozice cholesterolu tyrkysově, hem v barvě purpurové. Vytvořeno v programu PyMOL.<sup>54</sup>

Pozice cholesterolu získaná dokováním je v dobré shodě s pozicí cholesterolu v krystalové struktuře CYP11A1 (viz obr. 13). Dokování tedy v případě námi studovaného systému poskytuje poměrně slušné výsledky a může být úspěšně využito v dalších analýzách.

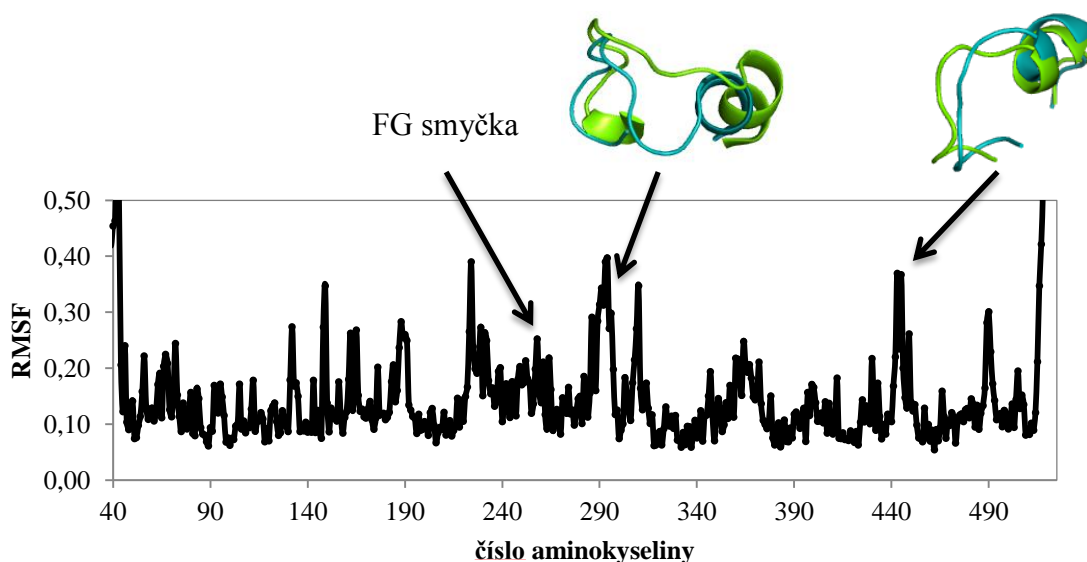
### 4.3. Simulace CYP11A1 bez cholesterolu v aktivním místě

Molekulárně dynamická simulace CYP11A1 zanořeného v DOPC membráně bez přítomnosti cholesterolu (obr. 16) umožňuje pozorovat chování enzymu v průběhu 200 ns. Takto lze sledovat např. změny v sekundární struktuře proteinu, rozdíly v poloze CYP11A1 vůči membráně či otevírání a zavírání přístupových cest do/z aktivního místa.



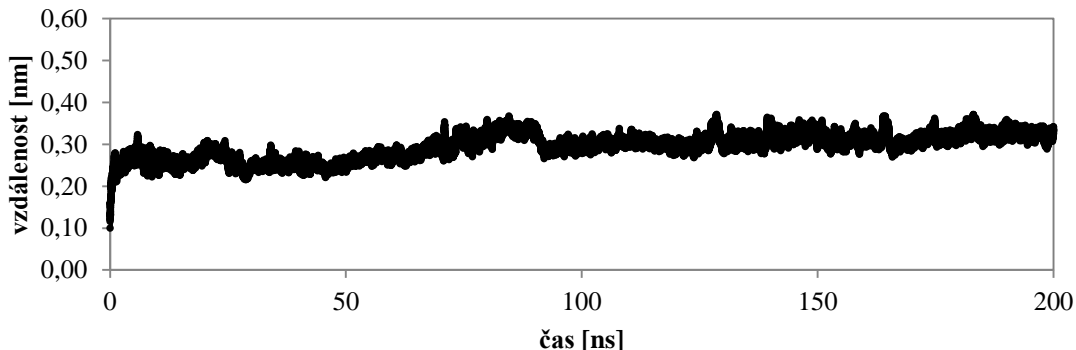
Obr. 16: Porovnání změn ve struktuře CYP11A1 v průběhu 200 ns simulace s doplněnými časovými údaji zobrazené pomocí reprezentace *cartoon* a průhledným povrchem.

Z provedených analýz lze usuzovat pouze na minimální změny v sekundární struktuře CYP11A1. Nejvíce flexibilní jsou smyčky nacházející se na proximální straně CYP11A1, což lze posoudit z výsledků analýzy RMSF (graf 1). Naopak region v oblasti FG smyčky, kterým se protein drží na membráně, je téměř neměnný, což naznačuje vznik stabilní konformace, výhodné pro toto uspořádání proteinu na membráně, což je v souladu s dřívějšími výzkumy.<sup>22,59</sup>



Graf 1: Analýza RMSF (*root mean square fluctuation*) v průběhu celé simulace. Šipkami jsou označeny části struktury, kde dochází k největším fluktuacím především části smyček (v regionu 445 Meandru (FRVEIQHL) a v oblasti 285 na konci I-helixu (GVDTTSMTL)). FG smyčka však výrazné fluktuace nevykazuje.

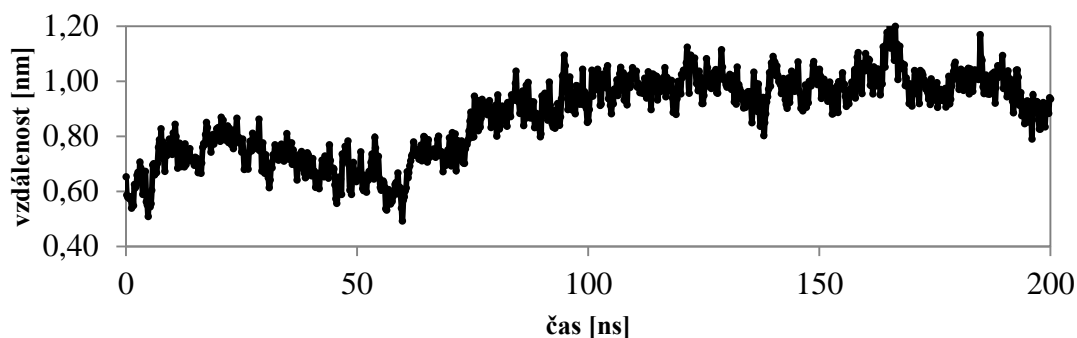
Také analýza RMSD porovnávající krystalovou strukturu s trajektorií získanou z MD simulace, neodhalila výrazné změny (graf 2), které by odpovídaly většímu strukturnímu přeuspořádání proteinu.



Graf 2: Analýza RMSD (*root mean square deviation*) v průběhu celé simulace. Tato analýza ukazuje odlišnosti ve struktuře proteinu vůči krystalu (porovnání pozic Ca atomů).

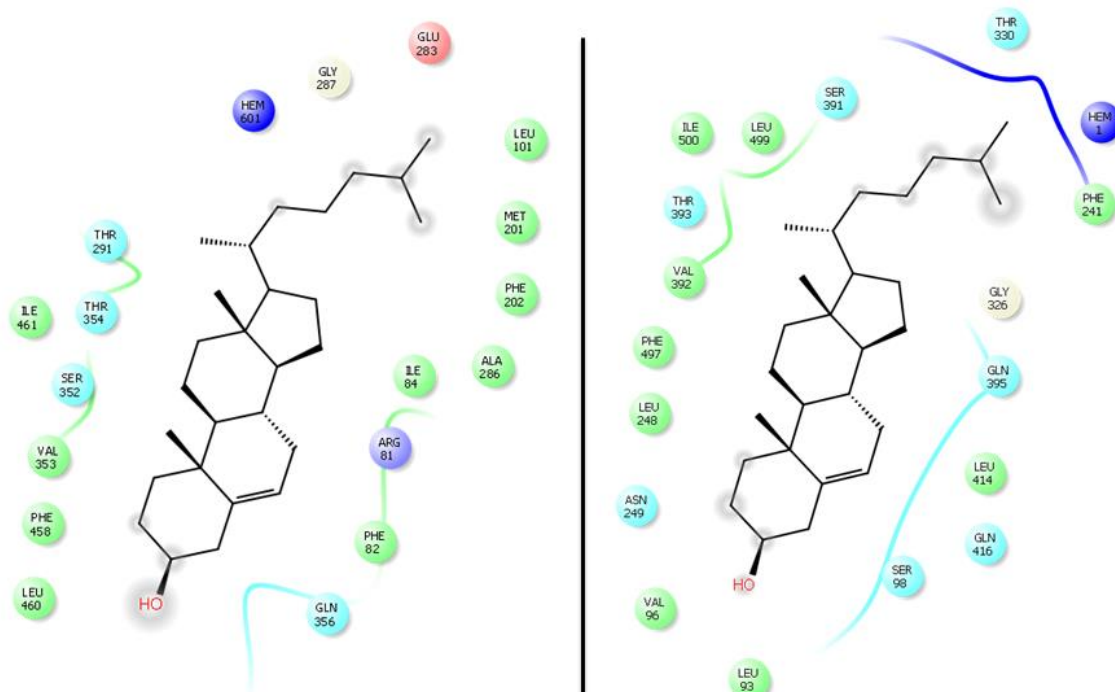
#### 4.4. Simulace CYP11A1 s cholesterolem v aktivním místě

Po simulaci samotného CYP11A1 na membráně byl do aktivního místa následně přidán ligand cholesterol, který byl umístěn na základě pozice cholesterolu v krystalové struktuře (PDBID: 3N9Y). Cílem bylo sledovat možné pohyby cholesterolu v důsledku dynamických změn proteinu v průběhu simulace. Byla zde analyzována především změna polohy cholesterolu vůči hemu (graf 3).



Graf 3: Analýza vzdálenosti mezi cholesterolem a hemem v průběhu 200 ns simulace, která ukazuje mírné vzdálení cholesterolu od hemu po 60 ns simulace, což může být způsobeno větším otevřením kanálu 2b. (podrobněji viz oddíl 4.5. Analýza tunelů)

Pozorované změny v pozici cholesterolu byly způsobeny jemnými změnami sekundární struktury proteinu a zároveň přizpůsobením kavity aktivního místa CYP11A1 přítomné molekule cholesterolu. Provedené analýzy ukazují oddálení cholesterolu od hemového kofaktoru (graf 3, obr. 17), což vede ke změnám ve složení aminokyselin, které s cholesterolem interagují. Na obr. 16 jsou zobrazeny aminokyseliny interagující s molekulou cholesterolu na začátku a po 200 ns MD simulace. V důsledku posunu cholesterolu dochází tedy ke změně rozložení AMK v jeho nejbližším okolí. Oproti startovní struktuře došlo k přerušení interakcí např. s těmito AMK: E283, G287, L101, M201, F82, Q356 a R81. Zároveň však také došlo ke vzniku nových interakcí s jinými AMK: např. G326, S98, N249, F241, T330 a F497.



Obr. 17: Změna rozložení sousedních aminokyselin v okolí cholesterolu do vzdálenosti 4 Å mezi začátkem a koncem simulace (po 200 ns). Polární AMK zobrazeny zeleně, hydrofobní tyrkysově, nabitě červeně a fialově. Vytvořeno v programu Maestro (Schrödinger, Inc.)<sup>40</sup>

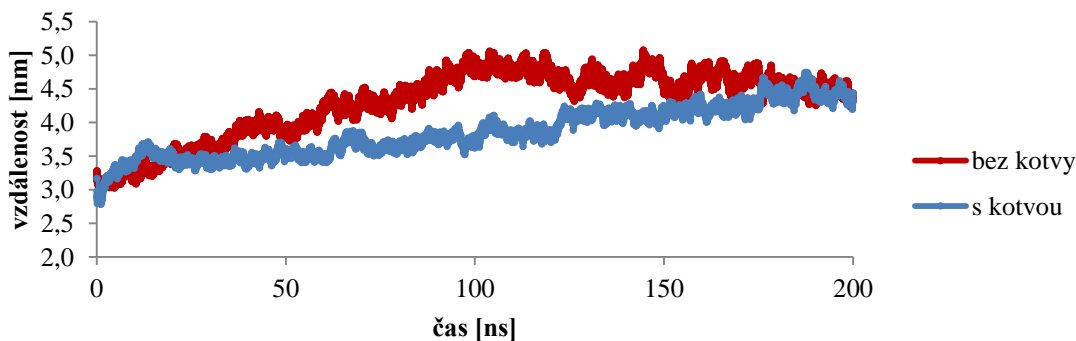
## 4.5. Posouzení důležitosti transmembránové kotvy

Při pohledu na sekvenci cytochromu P450 11A1 lze na počátku zaznamenat úsek 39 aminokyselin, tzv. mitochondrion či signální peptid (obr. 18), který lze přirovnat k transmembránovému helixu u cytochromů P450 na endoplazmatickém retikulu. CYP11A1 tuto kotvu nemá a signální peptid je odštěpen.<sup>21</sup> Jedním z cílů mé práce tedy bylo potvrzení, že CYP11A1 je schopen se na membráně udržet i bez transmembránového helixu. Z tohoto důvodu byly provedeny MD simulace CYP11A1 bez kotvy i s kotvou na DOPC membráně, které byly následně mezi sebou porovnány.

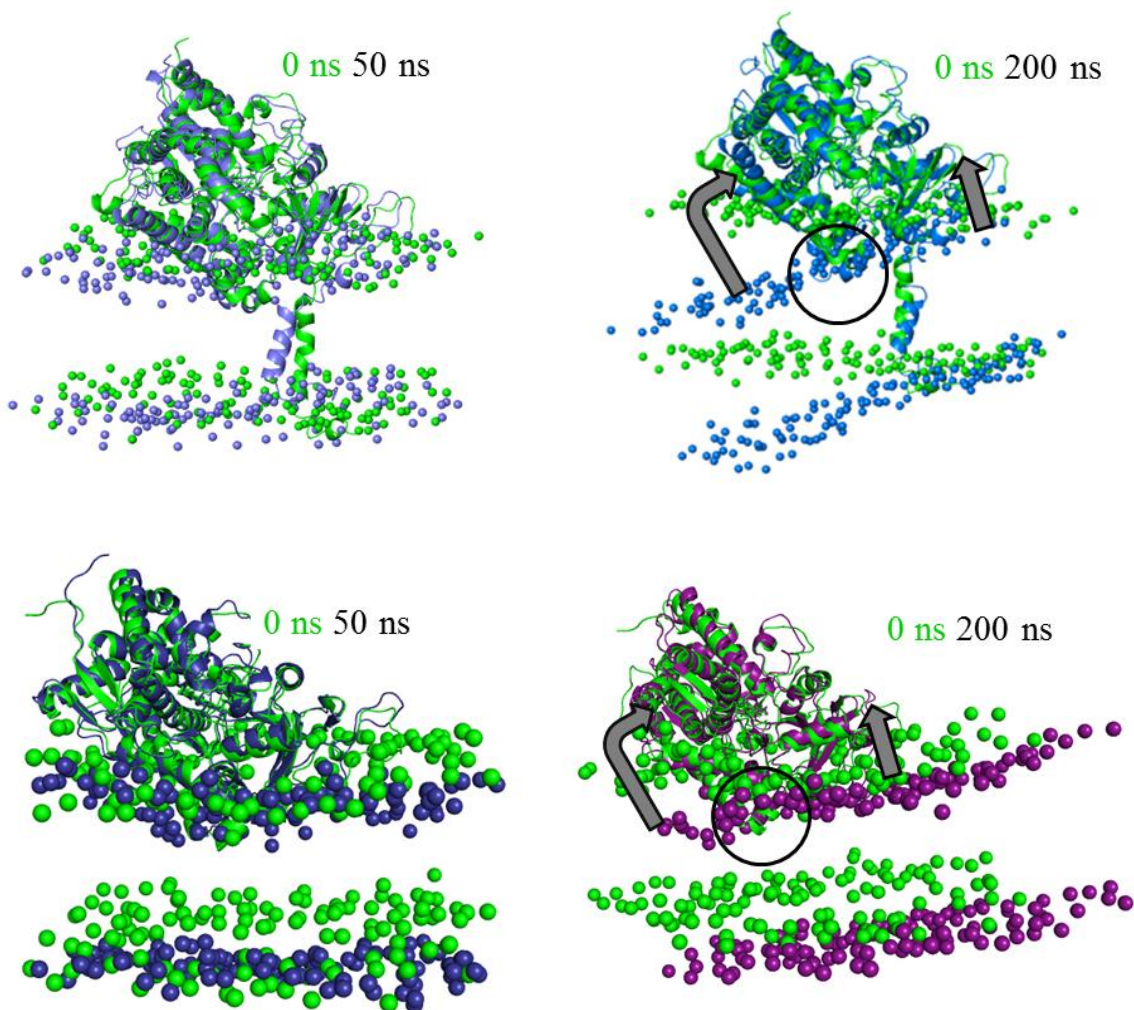
| Molecule processing                 |             |   |   |                |        |
|-------------------------------------|-------------|---|---|----------------|--------|
| Feature key                         | Position(s) | Description   | Actions                                   | Graphical view | Length |
| Transit peptide <sup>1</sup>        | 1 - 39      | Mitochondrion   | <a href="#">Add</a> <a href="#">BLAST</a> |                | 39     |
| Chain <sup>1</sup> (PRO_0000003588) | 40 - 521    | Cholesterol side-chain cleavage enzyme, mitochondrial | <a href="#">Add</a> <a href="#">BLAST</a> |                | 482    |

Obr. 18: Pozice signálního peptidu v sekvenci CYP11A1 dle databáze Uniprot.<sup>58</sup>

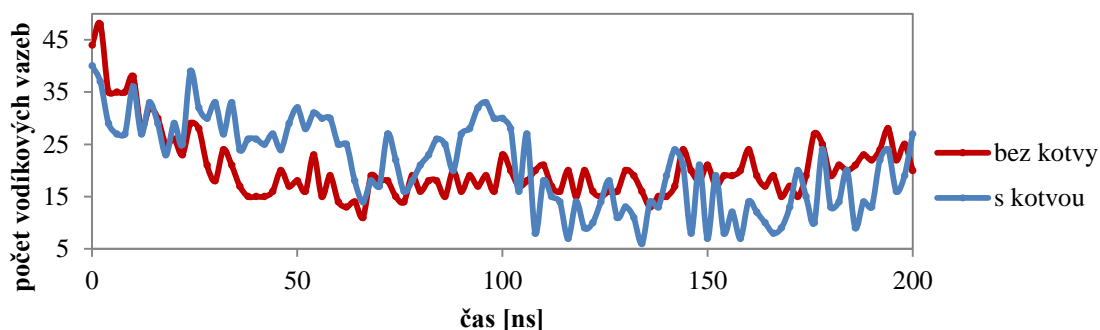
Výsledky naznačují, že v průběhu 200 ns došlo u obou simulací k podobným pohybům CYP11A1 (obr. 19). Postupně se zvyšovala vzdálenost mezi DOPC membránou a proteinem, která však začala ve druhé polovině (zhruba po 100 ns) fluktuovat kolem ustálené hodnoty. Tento pohyb potvrzují výsledky analýzy vzdálenosti protein-membrána získané pomocí nástroje `g_dist` (graf 4). V rámci ustálené pozice CYP-membrána se také ustálil počet vodíkových vazeb mezi proteinem a membránou. (graf 5), kde je zajímavé, že u systému s kotvou dochází k větším fluktuacím.



Graf 4: Analýza vzdáleností mezi CYP11A1 a membránou v průběhu celé simulace. Právě nárůst v průběhu prvních 100 ns ukazuje u obou vzdáleností na odklon spolu se zvednutím proteinu od membrány. V další části simulace tyto vzdálenosti fluktuují kolem konstantní hodnoty, což potvrzují i další analýzy.



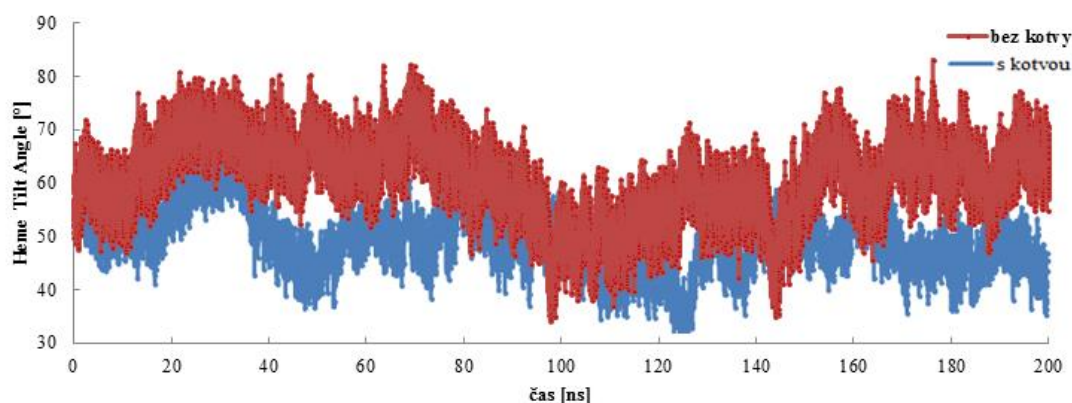
Obr. 19: Průběh simulace s kotvou (horní polovina) a bez kotvy (dolní část), kde zeleně je ve všech případech zobrazena startovní struktura, ostatními barvami pak jednotlivé vybrané úseky v průběhu simulace. Šipkami jsou ukázány sledované pohyby CYP11A1, které ukazují změny mezi pozicí membrány a proteinu. Membrána je zobrazena v reprezentaci *spheres*, protein v reprezentaci *cartoon*.



Graf 5: Analýza počtu vodíkových vazeb v závislosti na čase pomocí nástroje *g\_hbond*. V grafu lze vidět pokles počtu vodíkových vazeb z důvodu odklonu a zvednutí proteinu od membrány.

Společně se zvětšováním vzdálenosti od membrány dochází k nárůstu úhlu svíraného s membránou tzv. skláněcí úhel hemu („heme tilt angle“), a protein se mírně nadzvedává z membrány (graf 6). Tento úhel se po 120 ns již významně nemění a celý protein zůstává s membránou spojen v oblasti FG smyčky, a to jak ve struktuře s transmembránovou kotvou, tak i ve struktuře bez ní.

Při konečném porovnání změn ve struktuře s kotvou a bez kotvy rovněž nedochází k výrazným odchylkám oproti krystalové struktuře (PDB ID: 3N9Y).



Graf 6: Analýza skláněcího úhlu hemu vůči membráně v průběhu celé 200 ns dlouhé simulace.

Skláněcí úhel hemového kofaktoru vůči membráně je větší v simulaci bez kotvy (průměrný úhel posledních 100 ns:  $58,5 \pm 6,83^\circ$ ), než s kotvou ( $40,7 \pm 5,81^\circ$ ). V porovnání s hodnotami skláněcího úhlu ostatních P450 na membráně lze suzovat, že struktura bez kotvy z tohoto pohledu více koreluje s daty mikrosomálních P450 ( $55 - 77^\circ$ ) i přesto, že ty se nacházejí na endoplasmatické membráně a mají i kotvu.<sup>60</sup> Struktura s kotvou naopak představuje pro mitochondriální CYP11A1 nepřírozený helix zanořený do membrány navíc, proto je v tomto případě hodnota diametrálně odlišná od ostatních P450.

Na základě uvedených výsledků lze říci, že mitochondriální CYP11A1 je schopen zaujmout stabilní pozici na membráně, a to i bez přítomnosti transmembránové kotvy. Hlavními interakčními partnery proteinu s membránou jsou pak aminokyseliny v oblasti FG smyčky, které zajišťují dostatečně stabilní kontakt s membránovými lipidy.

## 4.6. Analýza tunelů

Analýzou tunelů vedoucích do aktivního místa CYP11A1 lze predikovat možné cesty cholesterolu do aktivního místa. Ve struktuře zkoumaného proteinu CYP11A1 bylo pomocí speciálního skriptu využívajícího program MOLE 2.0 analyzováno sedm typů kanálů (2af, 2b, 2c, 2d, 2e, S, W) pojmenovaných dle zavedené nomenklatury.<sup>25</sup> Četnost otevírání těchto tunelů byla sledována v pravidelných časových intervalech po 15 ns v rámci 350 ns dlouhé MD simulace (CYP11A1 na DOPC membráně bez cholesterolu v aktivním místě). V tabulce 1 je zaznamenáno, v jakých časech byly otevřeny jednotlivé typy tunelů.

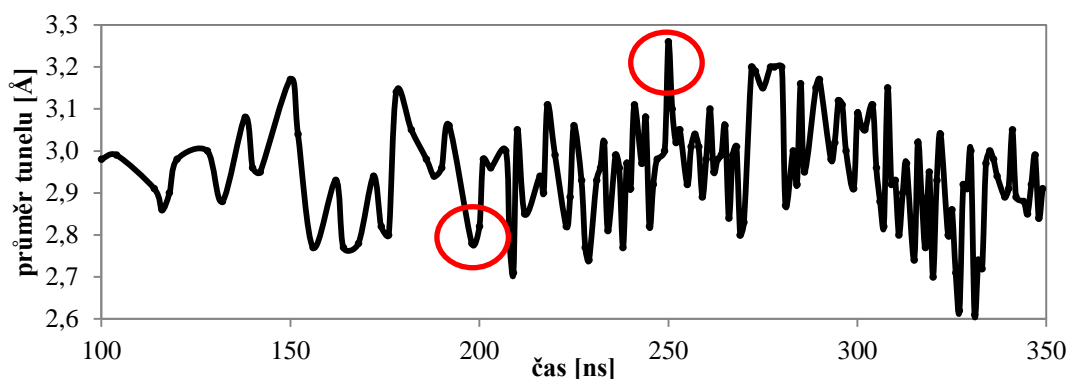
Z této tabulky lze usoudit, že nejčastěji otevřeným vstupním kanálem byl kanál 2b s relativním zastoupením 100%, 2af s relativním zastoupením asi 89% a kanál solventu také se 100% relativním zastoupením, ten se však spíše řadí ke kanálům výstupním. Kanál 2b a 2af se nacházejí na distální straně proteinu, která míří k membráně a zajímají nás tedy v případě vstupu cholesterolu do aktivního místa. Pro tunel 2b jsme porovnali nejužší místo daného tunelu (graf 7), které se z 2,82 Å při 200 ns zvýšil až na 3,26 Å v čase 250 ns. Tunel 4, který prochází FG smyčkou, se v daných simulacích neotevírá, což je s největší pravděpodobností způsobeno větším semknutím FG smyčky, která je jednou z hlavních částí držící CYP11A1 na membráně.

Tabulka 1: Otevírání a zavírání tunelů v průběhu MD simulace. (zelená – otevřený kanál, bílá – zavřený kanál)

| název tunelu | čas [ns] | 0 | 90 | 105 | 120 | 135 | 150 | 165 | 180 | 195 | 210 | 225 | 240 | 255 | 270 | 285 | 300 | 315 | 330 | 345 |  |
|--------------|----------|---|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|              | 2af      |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| <b>2b</b>    |          |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 2c           |          |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 2d           |          |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 2e           |          |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| <b>S</b>     |          |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| W            |          |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

Na základě výsledků dokování, byly následně vybrány struktury představující hraniční pozice cholesterolu v rámci vybraného tunelu 2b. S těmito strukturami byly provedeny dodatečné krátké simulace o délce 50 ns, ukazující chování cholesterolu v těchto hraničních podmínkách.



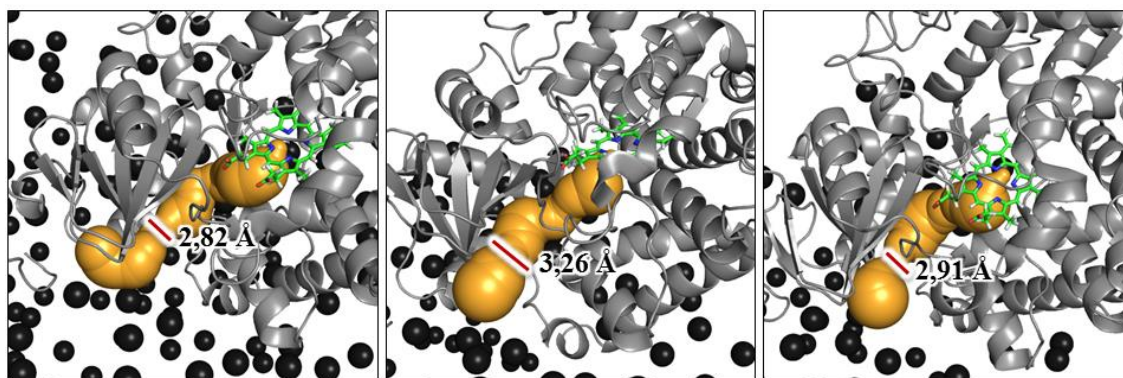


Graf 7: Změna průměru nejužšího místa tunelu 2b (tzv. *bottleneck radius*) v závislosti na čase simulace. Regiony zvýrazněné červeným kruhem ukazují hraniční pozice cholesterolu použité pro další MD simulace.

Zanoření FG smyčky do membrány pravděpodobně napomáhá k otevírání 2af či 2b kanálů, čímž je usnadněn přístup hydrofobních substrátů do zanořeného aktivního místa.

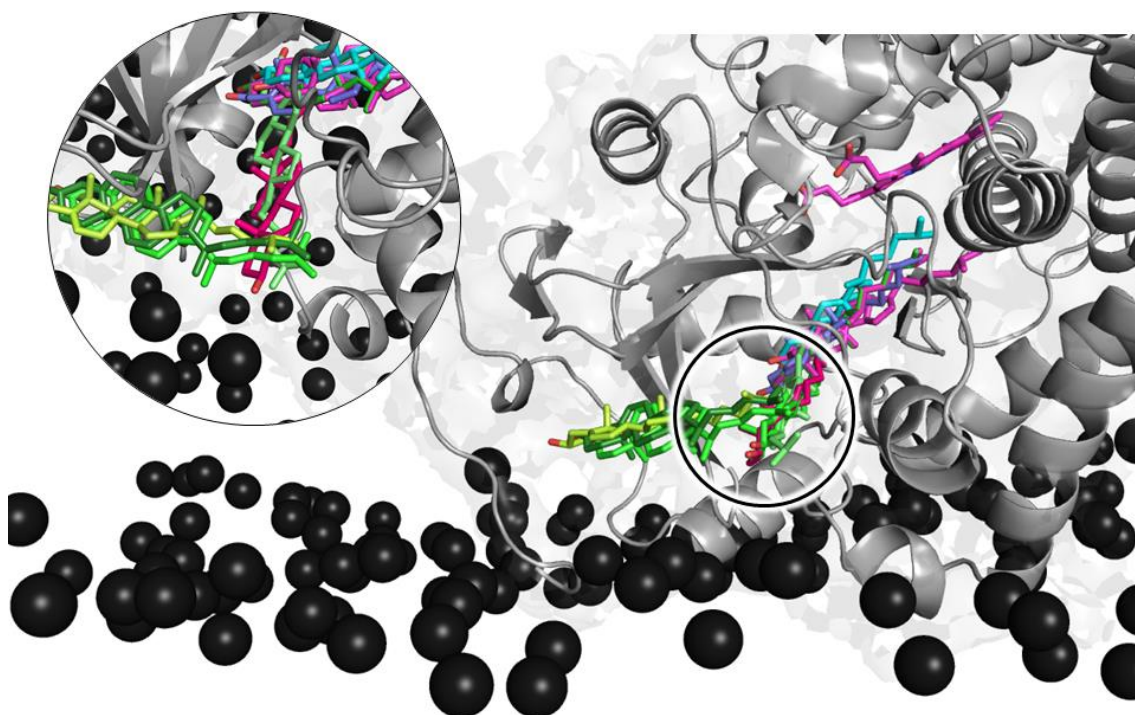
#### 4.7. Dokování do tunelů

Pro další analýzu byl z kanálů nalezených v předchozí analýze vybrán tunel 2b, který vykazoval největší otevření a nejširší průměr tunelu. Do tohoto tunelu byl nadokován cholesterol a následně byly použity pouze pozice ligandu s nejlepší vazebnou energií. Tyto výsledky utvořily cestu ligandu tunelem od aktivního místa až po ústí tunelu a lze porovnat vazebné energie v závislosti na arbitrární vzdálenosti. Na obr. 20 lze vidět porovnání zaškrcení tunelu tzv. *bottleneck* v časech 200, 250 a 300 ns.



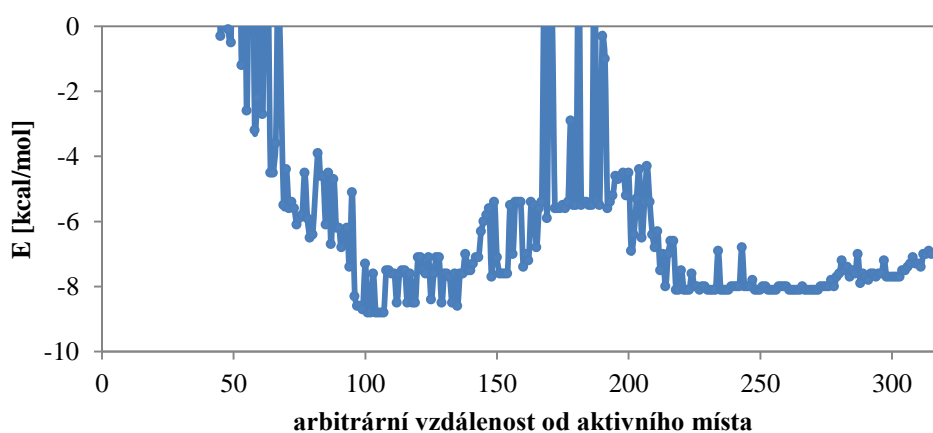
Obr. 20: Porovnání tunelu 2b při 200 ns, při 250 ns a při 300 ns. Na prostředním obrázku lze vidět zvětšení poloměru v *bottlenecku* zkoumaného tunelu při 250 ns. Tunel zobrazen v reprezentaci *spheres*, protein v reprezentaci *cartoon*.

Následně byly vybrány startovací pozice cholesterolu pro spuštění krátkých simulací cholesterolu v rámci tunelu 2b. Struktura v čase 200 ns vykazovala větší zaškrcení hrdla oproti struktuře v 250 ns. Lze vidět, že hlavní skelet cholesterolu touto částí tunelu neprojde, to je umožněno pouze alifatickému řetězci na jeho konci (obr. 21).



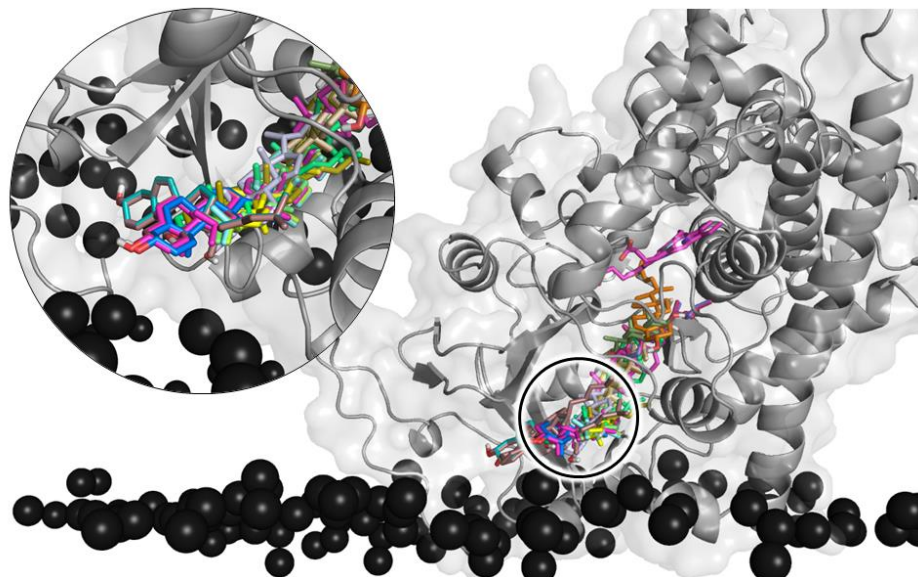
Obr. 21: Tunel 2b s nadokovanými molekulami cholesterolu do struktury při 200 ns. Ve zvětšeném detailu je vidět zaškrčení tunelu, do kterého se přes svou velikost sterolové části cholesterolu nedostal na rozdíl od alifatické části na pozici 17. Protein je zobrazen v reprezentaci *cartoon* s transparentním povrchem, ligand a hem v reprezentaci *sticks* a fosfáty v membráně jako *spheres*.

Afinitu, kterou má cholesterol v různých částech tunelu, vyjadřuje také přibližná vazebná energie dle Autodock Vina (graf 8). Z vývoje této energie lze odvodit umístění hrdla tunelu v úseku 170-190 v arbitrární vzdálenosti. Toto místo brání průchodu celého základního skeletu cholesterolu.



Graf 8: Závislost vazebné energie získané dokováním na arbitrární vzdálenosti od aktivního místa. V oblasti již zmiňovaného zaškrčení (F121, V96, P124, P252) je vazebná energie kladná a lze tak usuzovat na neochotu ligandu setrvávat v tomto místě. Arbitrární vzdáleností myslíme postupnou vzdálenost od aktivního místa až k ústí tunelu, stejně jako je směr dokování do tunelů.

Pro další analýzu tunelů byla dle výše zobrazené tabulky vybrána struktura při 250 ns, která má více otevřený kanál 2b. Do tohoto tunelu byl opět nadokován cholesterol. V již zmiňovaném tunelu 2b lze pozorovat menší zaškrcení a tudíž větší průměr hrdla (obr. 22). V tomto případě se základní skelet cholesterolu do zúženého místa podařilo nadokovat. Jak již bylo zmíněno, tunel 2b byl později zvolen pro další analýzy spojené s použitím krátkých 50 ns simulací.

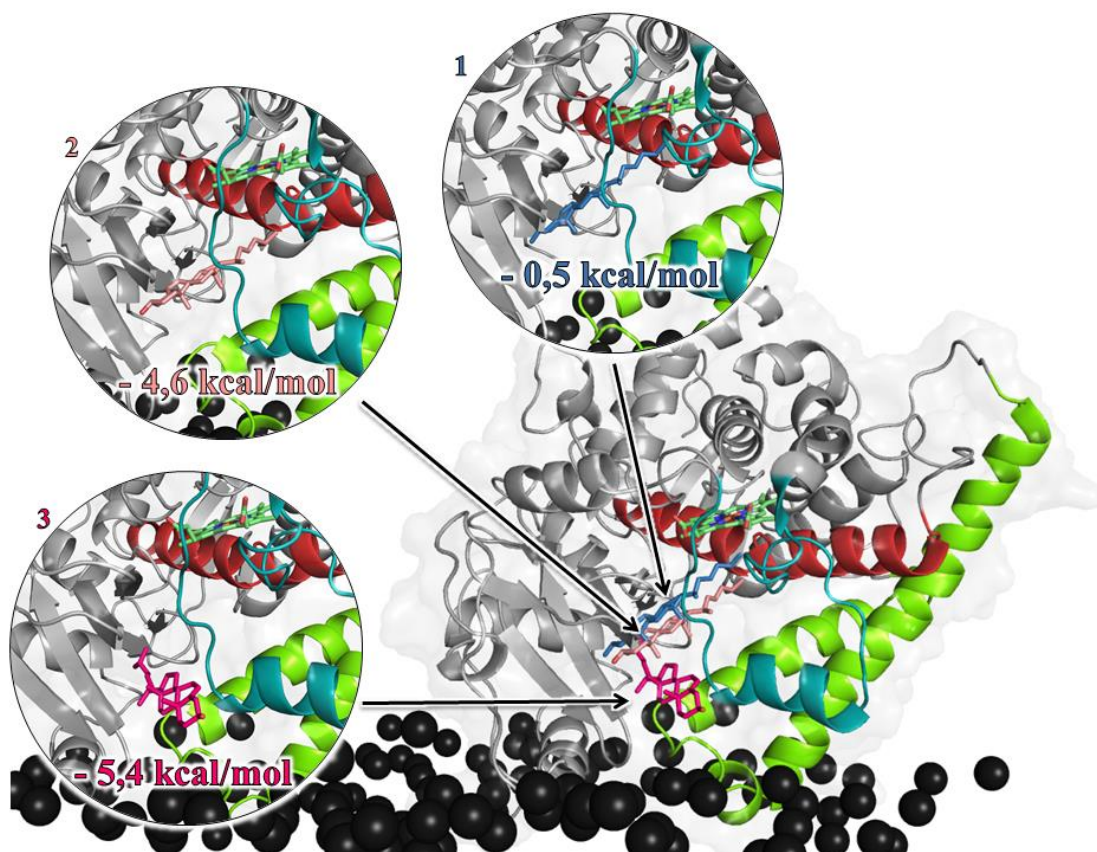


Obr. 22: Tunel 2b s nadokovaným cholesterolem do struktury při 250 ns. Ve výřezu je vidět, že na rozdíl od zaškrcení ve 200 ns, je zde pro cholesterolem více místa. Protein zobrazen v reprezentaci *cartoon* s transparentním povrchem, ligand v reprezentaci *sticks* a hlavy membrány jako *spheres*.

Dokování do tunelu 2b ukázalo, že zaškrcení tunelu a tedy zúžení hrdla vede k neprostopnosti kanálu pro cholesterol a může být důležitým místem, které rozhoduje o přijetí či nepřijetí substrátu. Naopak při druhém dokování do struktury při 250 ns už bylo místo pro vstup zvětšeno a může ukazovat měnící se pozici aminokyselin právě v tomto důležitém místě.

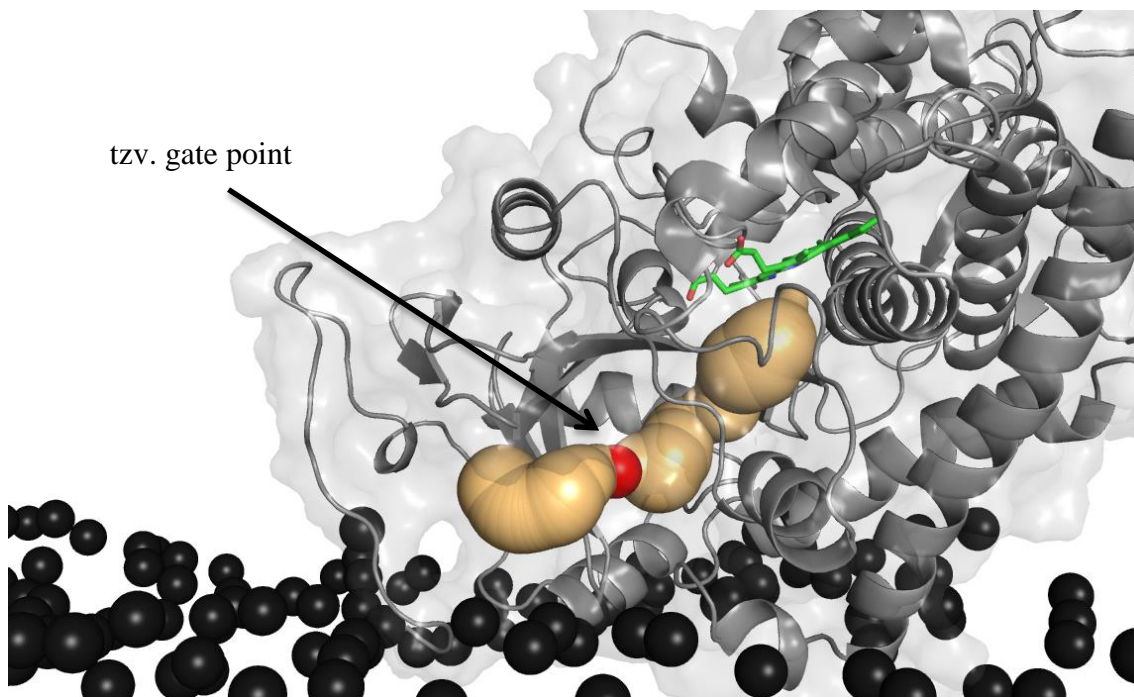
#### 4.8. Krátké volné simulace pohybu cholesterolu v tunelech

V rámci tunelu 2b byly vybrány tři hraniční pozice cholesterolu (tj. pozice představující největší zlomy v tunelu, popsané jako pozice 1, 2 a 3), získané z dokování do tunelu 2b (obr. 23). S těmito pozicemi cholesterolu v CYP11A1 na DOPC membráně byly následně spuštěny krátké simulace dlouhé 50 ns.

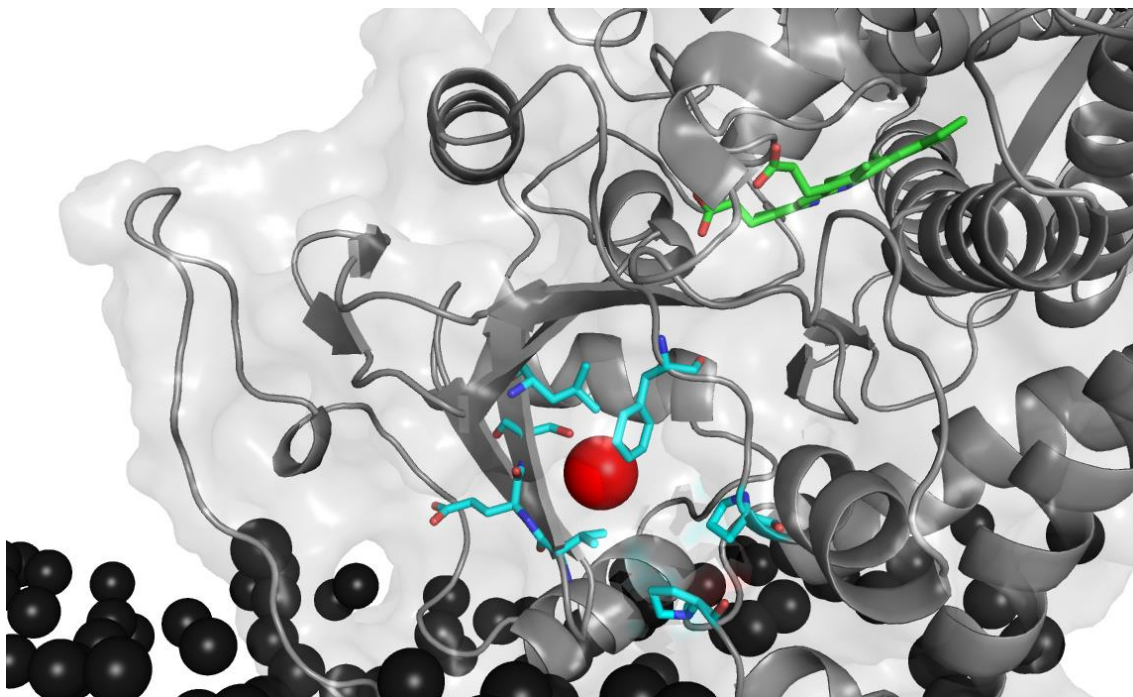


Obr. 23: Výchozí pozice cholesterolu do jednotlivých krátkých simulací v rámci umístění v tunelu 2b se zobrazují s vazebnými energiemi získanými dokováním. Cholesteroly a hem jsou zobrazeny v reprezentaci *sticks*, protein pomocí reprezentace *cartoon* a fosfáty v membráně jako *spheres*. Zeleně je ve struktuře zvýrazněna FG smyčka, tyrkysově BC smyčka a červeně I helix.

Průběh krátkých simulací potvrdil předpoklady vycházející z výsledků dokování do tunelů, a to, že místo, které bude rozhodovat o přijetí či nepřijetí substrátu (gate point), se nachází v blízkosti zaškrcení tunelu 2b (obr. 24). V okolí tohoto bodu se nacházejí aminokyseliny V96, E97, S98, F121 a L414 (obr. 25). Především F121 se svým rigidním aromatickým kruhem ve struktuře může ovlivňovat vstup substrátu do aktivního místa.

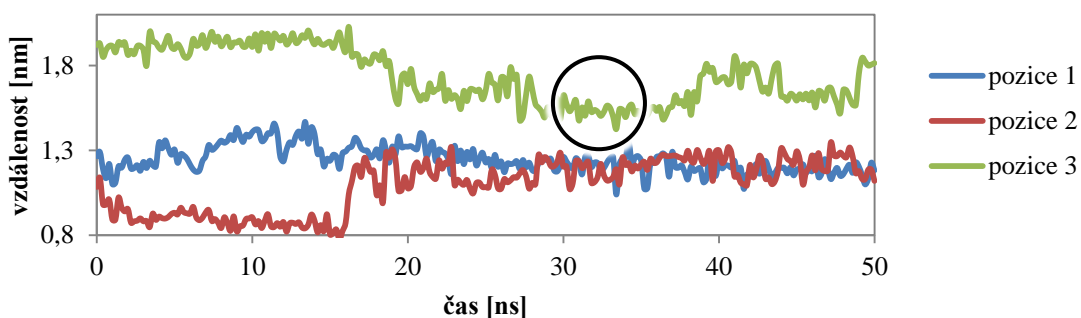


Obr. 24: Vyobrazení tunelu 2b spolu s vyznačením (červeně) pravděpodobného bodu, ve kterém dochází ke zlomu v přijetí či nepřijetí substrátu (cholesterolu) do aktivního místa. Protein zobrazen v reprezentaci *cartoon* s transparentním povrchem, fosfáty v membráně v reprezentaci *spheres* a hem v reprezentaci *sticks*.

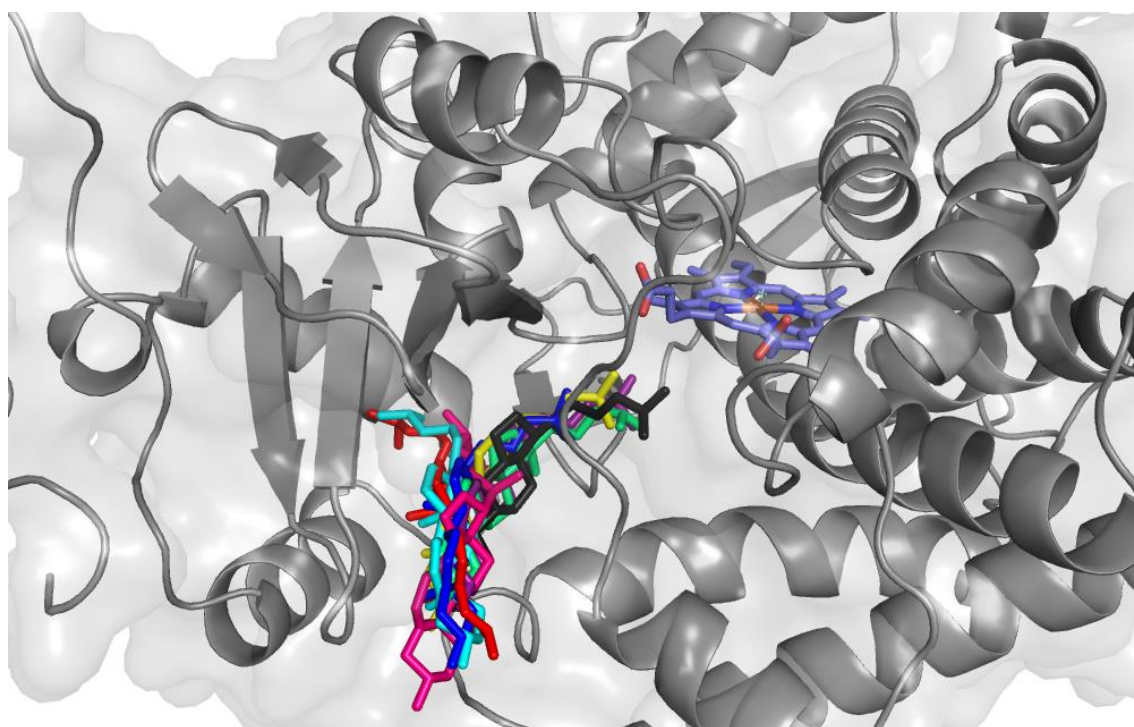


Obr. 25: Zvýraznění aminokyselin nacházejících se ve vzdálenosti do 5 Å od předpokládaného místa zlomu (červeně). Protein zobrazen v reprezentaci *cartoon* s transparentním povrchem, aminokyseliny a hem v reprezentaci *sticks*. Vytvořeno v programu PyMOL.<sup>54</sup>

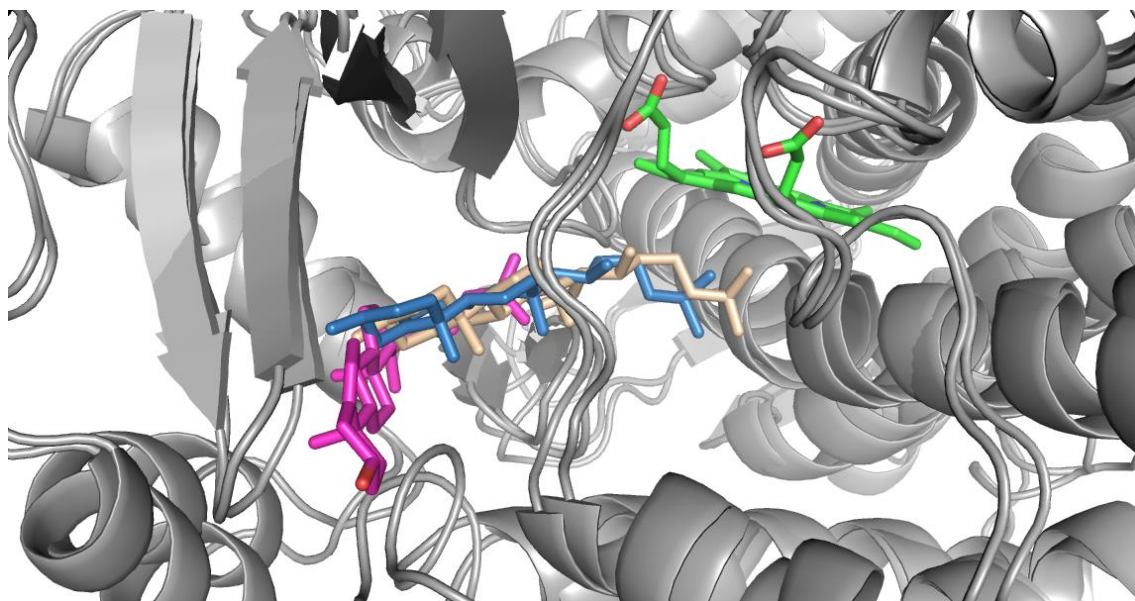
V rámci volných simulací došlo k pokrytí vzdáleností od hemu od 0,8 nm až k 1,9 nm (graf 9), přičemž lze pozorovat jak pohyby do aktivního místa, tak částečně i z něj (při celkové délce tunelu 3,1 nm). Dále se ukazuje, že pozice 1 a 2 začnou po 20 ns konvergovat ke stejné vzdálenosti od hemu (obr. 27). V případě pozice 3 lze vidět výrazné přiblížení směrem k aktivnímu místu oproti startovní struktuře. Zbylé dvě pozice (1 a 2) došly hlouběji do aktivního místa, avšak jejich celkový posun v rámci tunelu nebyl tak výrazný jako u pozice 3 (obr. 26 a 28).



Graf 9: Analýza vzdálenosti cholesterolu od hemu v rámci krátkých simulací. V kruhu vyznačeno místo, kde došlo k největšímu přiblížení cholesterolu v pozici 3 vůči hemu.

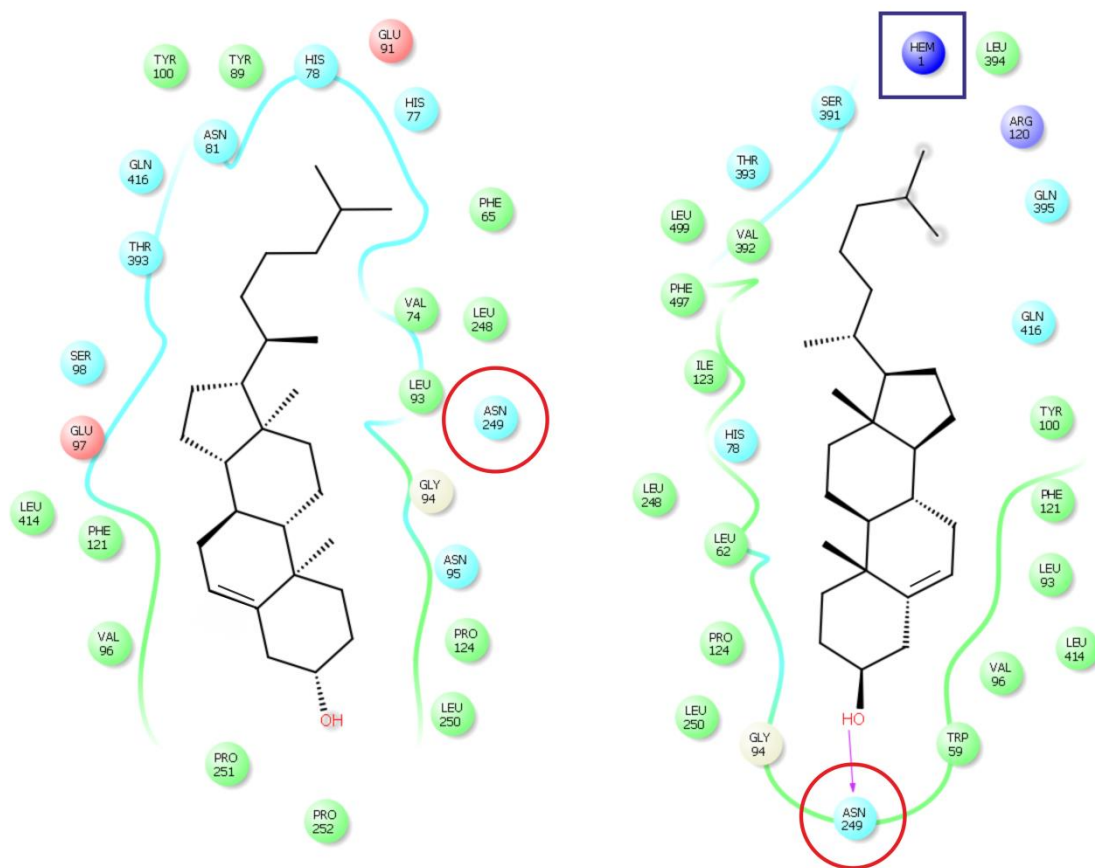


Obr. 26: Znázornění samovolného průchodu cholesterolu tunelem 2b směrem do aktivního místa. Startovní pozice cholesterolu červeně, pozice nejbližší hemu černě. Protein zobrazen v reprezentaci *cartoon*, hem (modře) a cholesterol v reprezentaci *sticks*, fosfáty na membráně jako *spheres*.



Obr. 27: Porovnání koncových poloh cholesterolu po 50 ns simulacích. Protein vyobrazen v reprezentaci *cartoon*, cholesteroly (pozice 1 modře, pozice 2 béžově, pozice 3 fialově) a hem (zeleně) v reprezentaci *sticks*.

V následujícím odstavci se budeme zabývat pouze pozicí 3. V této pozici byl pozorován nejvýraznější pohyb cholesterolu tunelem směrem do aktivního místa, přičemž se značně změnily i okolní aminokyseliny. Velký posun cholesterolu lze pozorovat např. na základě změny jeho pozice vůči N95 (obr. 27) a dále kvůli jeho přiblížení k hemovému kofaktoru. Došlo také k určitému zvětšení průměru zkoumaného tunelu v důsledku konformačních změn způsobených procházejícím cholesterolem. Nutno poznamenat, že posun cholesterolu tunelem směrem do aktivního místa, byl zcela spontánním procesem probíhajícím v časové škále pouze desítek ns, což naznačuje, že zřejmě jedná o proces bez větší energetické bariéry.



Obr. 27: Rozložení aminokyselin v okolí cholesterolu do vzdálenosti 4 Å v čase 0 ns a 31 ns v rámci krátké simulace. Polární AMK zobrazeny - zeleně, hydrofobní - tyrkysově, nabitě - červeně a fialově, hem - tmavě modře v modrém čtverci. Atomy vystavené solventu mají šedý stín. Vytvořeno v programu Maestro od Schrödinger<sup>40</sup>.



## 5. ZÁVĚR

Cytochrom P450 11A1 představuje mitochondriální formu P450, která je základním kamenem metabolismu cholesterolu na další steroidy. Mutace pozorované v tomto P450 mohou způsobovat závažná onemocnění, přičemž podle své lokalizace zřejmě neovlivňují vstup cholesterolu do aktivního místa, ale mohou ovlivnit přenos elektronu od redoxního partnera adrenodoxinu.

V rámci této studie jsem se zaměřila na chování CYP11A1 na membráně, přičemž bylo potvrzeno, že u mitochondriálního typu P450 není potřeba transmembránová kotva, jaká je běžně u jiných nemitochondriálních savčích P450. Hlavní interakci CYP11A1 s membránou tak představuje FG smyčka, která plnohodnotně nahrazuje funkci transmembránové kotvy. Dalším faktorem potvrzujícím správnost modelu bez kotvy je průměrná hodnota tzv. skláněcího úhlu hemu, kdy je tato hodnota blíže experimentálně zjištěné hodnotě CYP3A4 u CYP11A1 bez kotvy na rozdíl od arbitrárního modelu CYP11A1 s kotvou.

Nejvíce otevřeným tunelem byl tunel 2b, jehož průměr se v průběhu simulace měnil. Dále bylo provedeno dokování do tohoto tunelu. Z nadokovaných póz byly vybrány 3 pozice, které byly posléze využity ke spuštění krátkých MD simulací. Ty prokázaly samovolný posun cholesterolu tunelem a jeho přibližování do aktivního místa s hemem.

Výsledky potvrzují, že CYP11A1 je schopen fungovat bez přítomnosti transmembránové kotvy, a že prostup cholesterolu do aktivního místa probíhá samovolně, jak bylo pozorováno v krátkých MD simulacích.

## 6. SUMMARY

Cytochrome P450 11A1 falls into the category of mitochondrial P450 and represents the cornerstone of the metabolism of cholesterol and other steroids. Mutations observed in P450 can cause serious illness; however, their localization does not seem to influence the entry of cholesterol into an active site. On the other hand, they can influence the transfer of electrons from their redox partner adrenodoxin.

This thesis focuses on the behaviour of CYP11A1 on a membrane, while considering the confirmed fact that the mitochondrial P450 does not require a transmembrane anchor, which is common for other mammalian mitochondrial P450 types. The main interaction of CYP11A1 with the membrane is represented by an FG loop, which fully substitutes the function of the transmembrane anchor. Another factor confirming the accuracy of the anchor-less model is the average value of the so called heme tilt angle, as the experimentally acquired value for the anchor-less CYP11A1 is far closer to the heme tilt angle value for CYP3A4 and other microsomal P450, than the experimentally acquired value for the arbitrary model of CYP11A1 with anchor.

The most open tunnel was the 2b tunnel, with an unchanging diameter during simulations. The tunnel was further used for docking. From the multitude of docking positions, three positions were chosen for short MD simulations. They showed a spontaneous movement of cholesterol through the tunnel and its approach towards the heme containing active site.

The results confirm the ability of CYP11A1 to function without the presence of the transmembrane anchor, as well as the spontaneous movement of cholesterol into the active site, as was observed in short MD simulations.

## 7. SEZNAM LITERATURY

1. Poulter, N., Sever, P. & Thom, S. *Cardiovascular Disease: Risk Factors and Intervention*. (Taylor & Francis, 1993).
2. Racek, J. *Klinická biochemie*. (Galén, 2006).
3. Phillips, H., Hopkins, T. J. & States, U. Hepatic Triphosphopyridine Isolation , c Reductase : Studies \*. **237**, (1962).
4. Anzenbacher, P. & Anzenbacherová, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 737–747 (2001).
5. Norlin, M. *Cytochrome P450 Enzymes in the Metabolism of Cholesterol and Cholesterol Derivatives. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy* **241**, (2000).
6. Berka, K., Paloncýová, M., Anzenbacher, P. & Otyepka, M. Behavior of human cytochromes p450 on lipid membranes. *J. Phys. Chem. B* **117**, 11556–64 (2013).
7. Kalvach, Z., Zadák, Z., Jiráček, R., Zavázalová, H. & Sucharda, P. *Geriatric a gerontologie*. (Grada Publishing a.s., 2004).
8. Deng, H.-Z., You, C., Xing, Y., Chen, K.-Y. & Zou, X.-B. A Family-Based Association Study of CYP11A1 and CYP11B1 Gene Polymorphisms With Autism in Chinese Trios. *J. Child Neurol.* **31**, 733–7 (2016).
9. Hanukoglu, I. Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 779–804 (1992).
10. Strauss, J. F. Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol. Reprod.* **54**, 303–311 (1996).
11. Stoffel-Wagner, B. Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur. J. Endocrinol.* **145**, 669–679 (2001).
12. Boron, W. & Boulpaep, E. *Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach*. (2003).
13. Scott, E. E. *et al.* The Role of Protein-Protein and Protein-Membrane Interactions on P450 Function. *Drug Metab. Dispos.* **44**, 576–590 (2016).
14. Mestres, J. Structure conservation in cytochromes P450. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **58**, 596–609 (2005).
15. Pikuleva, I. A. Cholesterol metabolizing cytochromes P450. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 513–520 (2006).
16. Webb, E. *Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992*. (Academic Press, 1992).
17. Bairoch, A. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res.* **28**, 304–305 (2000).
18. Yamazaki, H. *Fifty years of cytochrome P450 Research*. (Springer Japan, 2014).
19. Ramalho-Santos, J. & Amaral, S. Mitochondria and mammalian reproduction. *Mol. Cell. Endocrinol.* **379**, 74–84 (2013).
20. LaVoie, H. A. & King, S. R. Transcriptional Regulation of Steroidogenic Genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp. Biol. Med.* **234**, 880–907 (2009).
21. Fukasawa, Y. *et al.* MitoFates: Improved Prediction of Mitochondrial Targeting Sequences and Their Cleavage Sites. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 1113–1126 (2015).
22. Headlam, M. J., Wilce, M. C. J. & Tuckey, R. C. The F-G loop region of cytochrome P450<sub>scc</sub> (CYP11A1) interacts with the phospholipid membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1617**, 96–108 (2003).
23. Lüdemann, S. K., Lounnas, V. & Wade, R. C. How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450<sub>cam</sub>? 2. Steered molecular dynamics and adiabatic mapping of substrate pathways. *J. Mol. Biol.* **303**, 813–830 (2000).
24. Wade, R. C., Winn, P. J., Schlichting, I. & Sudaroko. A survey of active site access channels in cytochromes P450. *J. Inorg. Biochem.* **98**, 1175–1182 (2004).
25. Cojocar, V., Winn, P. J. & Wade, R. C. The ins and outs of cytochrome P450s. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 390–401 (2007).
26. Mackenzie, F. *et al.* Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 1–6 (2011).

27. Berka, K., Paloncýová, M., Anzenbacher, P. & Otyepka, M. Behavior of Human Cytochromes P450 on Lipid Membranes. *J. Phys. Chem. B* **117**, 11556–11564 (2013).
28. Paloncýová, M., Berka, K. & Otyepka, M. Molecular Insight into Affinities of Drugs and Their Metabolites to Lipid Bilayers. *J. Phys. Chem. B* **117**, 2403–2410 (2013).
29. Kotingová, L., Borská, L. & Fiala, Z. Testování transdermální absorpce chemických látek. *Chem. List.* **539**, (2009).
30. Zinser, E. *et al.* Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **173**, 2026–34 (1991).
31. Alberts, Bruce; Bray, Dennis; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, P. *Základy buněčné biologie*. (Espero Publishing, 2005).
32. Allen, A. M., Taylor, J. M. W. & Graham, A. Mitochondrial (dys)function and regulation of macrophage cholesterol efflux. *Clin. Sci. (Lond)*. **124**, 509–15 (2013).
33. Sabine, J. R. *Cholesterol*. (M. Dekker, 1977).
34. Lüllmann-Rauch, R. *Histologie*. (Grada Publishing a.s., 2012).
35. Chevrel, M. E. Recherches chimiques sur les corps gras, et particulièrement sur leurs combinaisons avec les alcalis. Sixième mémoire. Examen des graisses d'homme, de mouton, de boeuf, de jaguar et d'oie. *Ann. Chim. Phys.* **2**, 339–372 (1816).
36. Medinsky, M. A. & Valentine, J. L. *Toxicokinetics. In Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons*. (McGraw-Hill Professional, 1996).
37. Wei, W. *et al.* Ligand Activation of ERR $\alpha$  by Cholesterol Mediates Statin and Bisphosphonate Effects. *Cell Metab.* **23**, 479–491 (2016).
38. van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124 (2008).
39. Berka, K. Interakce nízkomolekulárních látek s membránami. *Habilitační práce* (2016).
40. Schrödinger, L. Maestro. (2017).
41. Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D. & Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 435–447 (2008).
42. Young, D. *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real World Problems*. (Wiley- interscience, 2001).
43. Wolf, M. G., Hoefling, M., Aponte-Santamaría, C., Grubmüller, H. & Groenhof, G. *g\_membed*: Efficient insertion of a membrane protein into an equilibrated lipid bilayer with minimal perturbation. *J. Comput. Chem.* **31**, 2169–2174 (2010).
44. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**, 10089–10092 (1993).
45. Shahrokh, K., Orendt, A., Yost, G. S. & Cheatham, T. E. Quantum mechanically derived AMBER-compatible heme parameters for various states of the cytochrome P450 catalytic cycle. *J. Comput. Chem.* **33**, 119–133 (2012).
46. Jämbeck, J. P. M. & Lyubartsev, A. P. Derivation and Systematic Validation of a Refined All-Atom Force Field for Phosphatidylcholine Lipids. *J. Phys. Chem. B* **116**, 3164–3179 (2012).
47. Hornak, V. *et al.* Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* **65**, 712–25 (2006).
48. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. & Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* **18**, 1463–1472 (1997).
49. Nosé, S. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *J. Chem. Phys.* **81**, 511–519 (1984).
50. Parrinello, M. & Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **52**, 7182–7190 (1981).
51. Jämbeck, J. P. M. & Lyubartsev, A. P. Another Piece of the Membrane Puzzle: Extending Slipids Further. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 774–784 (2013).
52. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina. *J. Comput. Chem.* **31**, 445–461 (2010).
53. Sehnal, D. *et al.* MOLE 2.0: Advanced approach for analysis of biomacromolecular channels. *J. Cheminform.* **5**, (2013).

54. Schrödinger, L. The PyMOL Molecular Graphics System. (2010).
55. Kumari, R., Kumar, R. & Lynn, A. g\_mmpbsa —A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 1951–1962 (2014).
56. Tajima, T., Fujieda, K., Kouda, N., Nakae, J. & Miller, W. L. Heterozygous mutation in the cholesterol side chain cleavage enzyme (p450scc) gene in a patient with 46,XY sex reversal and adrenal insufficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 3820–5 (2001).
57. Miller, W. L. & Strauss, J. F. Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **69**, 131–41 (1999).
58. Consortium, T. U. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45**, 158–169 (2017).
59. Pikuleva, I. A. Putative F–G loop is involved in association with the membrane in P450scc (P450 11A1). *Mol. Cell. Endocrinol.* **215**, 161–164 (2004).
60. Baylon, J. L., Lenov, I. L., Sligar, S. G. & Tajkhorshid, E. Characterizing the Membrane-Bound State of Cytochrome P450 3A4: Structure, Depth of Insertion, and Orientation. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 8542–8551 (2013).

## 8. SEZNAM ZKRATEK

|                   |   |
|-------------------|---|
| ACTH              | kortikotropin   |
| AMK               | aminokyselina   |
| ATP               | adenosintrifosfát                                     |
| CAH               | kongenitální adrenální hyperplazie                    |
| CLAH              | kongenitální adrenální hyperplazie v lipoidní formě   |
| DAX1              | jaderný receptor kortikotropinu                       |
| DOPC              | 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin        |
| ERR $\alpha$      | Estrogenový alfa receptor                             |
| FAD               | flavinadenindinukleotid                               |
| FMN               | flavinmononukleotid                                   |
| HDL               | <i>high density lipoprotein</i>                       |
| CHL               | cholesterol   |
| LDL               | <i>low density lipoprotein</i>                        |
| MD                | molekulová dynamika                                   |
| MM                | molekulová mechanika                                  |
| NADP <sup>+</sup> | Nikotinamidadenindinukleotidfosfát v oxidované formě  |
| NADPH             | Nikotinamidadenindinukleotidfosfát v redukované formě |
| PDB               | protein data bank (formát zápisu 3D struktury)        |
| StAR              | steroidní akutní regulační protein                    |
| UQ                | ubichinon   |

## 9. SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK

- Obr. 1: Metabolismus cholesterolu.
- Obr. 2: Struktura CYP11A1 s popsanými sekundárními prvky.
- Obr. 3: Souhrnná reakce katalyzovaná pomocí CYP11A1.
- Obr. 4: Souhrnná rovnice pro vznik pregnenolonu z cholesterolu pomocí 3 monooxygenázových reakcí.
- Obr. 5: Krystalová struktura cytochromu P450 11A1 (PDBID: 3N9Y) se zvýrazněnými tunely napočítanými pomocí programu MOLE 2.0 se znázorněnou linií hlav membrány.
- Obr. 6: Schéma mitochondriální membrány s prostupujícím cholesterolem.
- Obr. 7: Struktura *nat*-cholesterolu.
- Obr. 8: Schématické složení membrán v eukaryotické buňce podle umístění, kde velikost písma zastupuje molární zastoupení lipidů v dané membráně.
- Obr. 9: Aminokyseliny v okolí cholesterolu do 4 Å v krystalové struktuře CYP11A1.
- Obr. 10: Aminokyseliny v okolí cholesterolu do 4 Å v krystalové struktuře CYP11A1.
- Obr. 11: Schematické zobrazení principu periodických okrajových podmínek.
- Obr. 12: Schematické zobrazení simulačního boxu se základními charakteristikami, které do simulace zadáváme.
- Obr. 13: Znázornění umístění jednotlivých mutací v CYP11A1 (PDBID: 3N9Y) publikovaných na webu UniProt.
- Obr. 14: Krystalová struktura CYP11A1 s hemovým kofaktorem v aktivním místě s tunely vypočítanými pomocí programu MOLE 2.0 s pojmenováním dle <sup>25</sup>
- Obr. 15: Poloha cholesterolu v krystalové struktuře CYP11A1 (v reprezentaci *cartoon*) zanořené v DOPC membráně (reprezentace *spheres*).
- Obr. 16: Porovnání změn ve struktuře CYP11A1 v průběhu 200 ns simulace.
- Obr. 17: Změna rozložení sousedních aminokyselin v okolí cholesterolu do vzdálenosti 4 Å mezi začátkem a koncem simulace (po 200 ns).
- Obr. 18: Pozice signálního peptidu v sekvenci CYP11A1 dle databáze Uniprot
- Obr. 19: Průběh simulace s kotvou (horní polovina) a bez kotvy (dolní část).
- Obr. 20: Porovnání tunelu 2b při 200 ns, při 250 ns a při 300 ns.
- Obr. 21: Tunel 2b s nadokovanými molekulami cholesterolu do struktury při 200 ns
- Obr. 22: Tunel 2b s nadokovaným cholesterolem do struktury při 250 ns.
- Obr. 23: Výchozí pozice cholesterolu do jednotlivých krátkých simulací v rámci umístění v tunelu 2b se zobrazením vazebných energií získaných dokováním.
- Obr. 24: Vyobrazení tunelu 2b spolu s vyznačením (červeně) pravděpodobného bodu, ve kterém dochází ke zlomu v přijetí či nepřijetí substrátu (cholesterolu) do aktivního místa.
- Obr. 25: Zvýraznění aminokyselin nacházejících se ve vzdálenosti do 5 Å od předpokládaného místa zlomu
- Obr. 26: Znázornění samovolného průchodu cholesterolu tunelem 2b směrem do aktivního místa.
- Obr. 27: Porovnání koncových poloh cholesterolu po 50 ns simulacích.
- Obr. 27: Rozložení aminokyselin v okolí cholesterolu do vzdálenosti 4 Å v čase 0 ns a 31 ns v rámci krátké simulace.
- Graf 1: Analýza RMSF (*root mean square fluctuation*) v průběhu celé simulace.
- Graf 2: Analýza RMSD (*root mean square deviation*) v průběhu celé simulace.

- Graf 3: Analýza vzdálenosti mezi cholesterolem a hemem v průběhu 200 ns simulace.
- Graf 4: Analýza vzdáleností mezi CYP11A1 a membránou v průběhu celé simulace.
- Graf 5: Analýza počtu vodíkových vazeb v závislosti na čase pomocí nástroje g\_hbond.
- Graf 6: Analýza skláněcího úhlu hemu vůči membráně v průběhu celé 200 ns dlouhé simulace.
- Graf 7: Změna průměru nejúžšího místa tunelu 2b (tzv. *bottleneck radius*) v závislosti na čase simulace.
- Graf 8: Závislost vazebné energie získané dokováním na arbitrární vzdálenosti od aktivního místa.
- Graf 9: Analýza vzdálenosti cholesterolu od hemu v rámci krátkých simulací.
- Tabulka 1: Otevírání a zavírání tunelů v průběhu MD simulace.