

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra fyzikální chemie

KLASIFIKACE NIČEHO

ANALÝZA DUTIN V NANOMATERIÁLECH

DIPLOMOVÁ PRÁCE

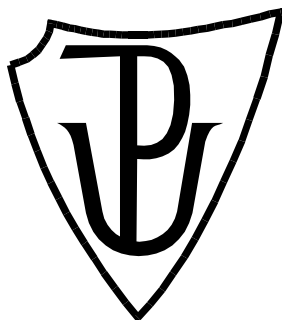
2013

Bc. Veronika Navrátilová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra fyzikální chemie



KLASIFIKACE NIČEHO ANALÝZA DUTIN V NANOMATERIÁLECH

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:	Bc. Veronika Navrátilová
Vedoucí práce:	RNDr. Karel Berka, Ph.D.
Studijní program:	B 1407 Chemie
Studijní obor:	Materiálová chemie
Forma studia:	Prezenční

Olomouc 2013

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Veronika Navrátilová
Název práce	Klasifikace ničeho – Analýza dutin v nanomateriálech
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	RNDr. Karel Berka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Klíčová slova	kavita, kanál, kapsa, pór, cytochromy P450, zeolity
Počet stran	77 str., 14 str. příloh
Počet příloh	1 CD ROM
Jazyk	Český
Abstrakt <p>Prázdné prostory uvnitř nanomateriálů, tedy de facto „nic“, výrazným způsobem ovlivňují chování těchto materiálů. Klasifikace „ničeho“, tedy dutin, kanálů či pórů tak může osvětlit důležité vlastnosti studovaného systému, obzvláště v případě hledání a popisu přístupových cest dopravujících molekuly napříč strukturou. Cílem této práce bylo hledání a klasifikace „ničeho“ ve vybraných nanomateriálech s pomocí programu MOLE 2.0. Pro účely analýzy byly vybrány jak biologické nanostroje – enzymy cytochromy P450, tak i anorganické porézní nanomateriály - zeolity. Byly vybrány dvě rozsáhlé skupiny cytochromů P450, u kterých byly hledány fyzikálně-chemické vlastnosti jejich kanálů a to jednak bakteriální cytochromy P450 CAM a BM3, tak na straně druhé lidské cytochromy P450. BM3 a CAM se lišily obzvláště v počtu nalezených kanálů, přičemž u CAM bylo nalezeno velmi malé množství kanálů oproti BM3. Fyzikálně chemické vlastnosti jsou u těchto bakteriálních cytochromů P450 poměrně variabilní, což lze odůvodnit rozdílností mezi jejich krystalovými strukturami. U lidských cytochromů P450 byla provedena analýza 82 krystalových struktur. Navíc byly mezi sebou porovnány i jednotlivé rodiny cytochromů P450. Jednotlivé rodiny lidských cytochromů P450 ve většině případů preferují pouze některé typy rodin kanálů, přičemž některé cytochromy P450 pak mají jen jeden typ kanálů. Nakonec byly u deseti vybraných struktur zeolitů analyzovány póry. Ty byly zkoumány především z hlediska geometrických vlastností, jako je délka nebo šířka hrdla. U každé struktury zeolitů se vyskytuje několik pórů v poměrně široké škále velikostí, přičemž se jejich vlastnosti odvíjí od strukturního uspořádání daného zeolitu. Program MOLE 2.0 tak umožňuje široké možnosti použití při analýze „ničeho“ uvnitř nano- i biomateriálů.</p>	

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Bc. Veronika Navrátilová
Title	Classification of Nothing – Analysis of Cavities in Nanomaterials
Type of thesis	Master
Department	Department of physical chemistry
Supervisor	RNDr. Karel Berka, Ph.D.
The year of presentation	2013
Keywords	cavity, channel, pocket, pore, cytochromes P450, zeolites
Number of pages	77 p. + 14 p. appendices
Number of appendices	1 CD ROM
Language	Czech
Abstract	<p>Free spaces – “nothing” - inside the nanomaterials significantly affect behavior of these materials. Classification of “nothing”, cavities, channels or pores can elucidate important properties of studied system, especially in case of finding and describing access paths which transport molecules across the structure. The goal of this thesis was classification of “nothing” in chosen nanomaterials with aid of MOLE 2.0 program. Two types of biological nanodevices were chosen for analysis – enzymes cytochromes P450 and inorganic porous materials – zeolites. Two wide groups of cytochromes P450 were chosen for analysis of physico-chemical properties of their channels: (i) bacterial cytochromes P450 CAM and BM3 and (ii) human cytochromes P450. The groups BM3 and CAM differed by number of found channels, whereas in CAM very small number of channels was found in contrary to BM3. Physico-chemical properties are fairly variable in these bacterial cytochromes P450, which can be explained by differences among their X-ray structures. Analysis of 82 X-ray structures of human cytochrome P450 was performed. In addition, particular cytochrome P450 families were compared with each other. Particular families of human cytochromes P450 prefer in most of cases only some types of channels whereas some cytochromes P450 contain only one type of channel. Finally, pores in ten zeolite structures were analyzed. The pores were described mostly with geometrical properties such as length or bottleneck radius. Every structure of zeolites has shown several pores with fairly wide range of sizes. These properties can be derived from structural arrangement of particular zeolite. In sum, MOLE 2.0 program has shown that it enables various usage in the analysis of “nothing” inside of nano- or bionanomaterials.</p>

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

Podpis

Chtěla bych na tomto místě poděkovat vedoucímu své diplomové práce panu RNDr. Karlu Berkovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu a velkou dávku trpělivosti. Také bych ráda poděkovala Mgr. Davidu Sehnalovi z FI MUNI za rady spojené s programem MOLE 2.0 a také dalším pracovníkům katedry fyzikální chemie UP, kteří mi vždy vyšli vstříc. V neposlední řadě děkuji svým rodičům a přátelům za podporu během celého studia.

Obsah

1	Úvod	1
2	Teoretická část	2
2.1	„Nic“	2
3	Metody	10
3.1	Testované systémy	10
3.2	Software pro výpočet „ničeho“	23
3.3	MOLE 2.0	31
3.4	Úprava krystalových struktur cytochromů P450	39
3.5	Úprava struktur zeolitů	39
3.6	Parametry výpočtu	41
4	Výsledky a diskuze	42
4.1	Kanály v systémech P450 CAM a BM3	42
4.2	Lidské cytochromy P450	46
4.3	Zeolity	62
5	Závěry	66
5.1	CAM a BM3	66
5.2	Lidské cytochromy P450	66
5.3	Zeolity	67
5.4	Celkový závěr	68
6	Shrnutí	69
7	Summary	70
8	Seznam použité literatury	71
9	Doplňující materiály	78
10	Přílohy na CD	91

1 Úvod

Klasifikace „ničeho“, ač může znít poněkud zvláštně, se týká hledání a analýzy dutin, pórů a kanálů ve studovaných nanomateriálech. Český název, ač pro někoho možná matoucí, má zcela logický původ v anglickém slově „void“ – česky doslova nicota neboli prázdný prostor. Popis „ničeho“ má značný význam v chemii i biochemii, ať už se týká hledání dutin v biomakromolekulách či v porézních nanomateriálech jako jsou například zeolity. Konkrétním příkladem je pak třeba hledání tunelů v proteinech. Takováto analýza může napomoci k osvětlení, jaké typy látek mohou být kanály dopravovány dovnitř, popřípadě vycházet ven z aktivního místa proteinu. Lokalizace a popis velikosti kavit pak mohou napomoci v odhalení celkové stability studované struktury.

Hlavním nástrojem používaným pro hledání „ničeho“ v této práci byl program MOLE 2.0, který byl vytvořen ve spolupráci mezi týmem pracovníků z Katedry fyzikální chemie Univerzity Palackého v Olomouci a z Masarykovy univerzity v Brně. Z hlediska hledání „ničeho“ je MOLE 2.0 skutečně unikátním softwarem, neboť je schopen vyhledat a analyzovat kavity, tunely a póry v počítačových modelech jednotlivých materiálů a to v časové škále pouhých několika sekund. Proto se stal hlavním nástrojem využívaným v této práci a s jeho pomocí byly provedeny testy potvrzující jeho robustnost a využitelnost pro rozličné typy struktur. Jako testovací soubor bionanomateriálů byly použity enzymy cytochromy P450. Jako zástupci typických anorganických nanomateriálů byly zvoleny zeolity.

Cílem této práce je tedy hledání a klasifikace „ničeho“, tedy kavit, pórů a kanálů ve vybraných strukturách nanomateriálů s využitím softwaru MOLE 2.0. Znalost těchto útvarů vede k pochopení mnoha významných vlastností studovaných struktur. Jde například o posouzení stability studovaného systému, způsob jakým může potenciální substrát vstupovat do aktivního místa, či jak se může být v dané struktuře uchycena molekula ligandu.

2 Teoretická část

2.1 „Nic“

„Nic“ z hlediska chemie nanomateriálů představuje širokou skupinu útvarů. Tato uskupení vyskytující se v různých materiálech se rozdělují do čtyř základních skupin: kapsy (*pockets*), kavity (*cavities*), kanály (*channels*) a póry (*pores*). V následující kapitole bude každému typu věnována zvláštní pozornost.

Nejvíce byl vliv prázdných prostor doposud prozkoumán v proteinech. Například v počátcích studia kavit v proteinech se mělo za to, že jsou tyto prostory vyplněny vakuem, a že se tedy jedná o jakousi anomálii či defekt ve sbalení proteinu [1]. Taktéž byly kavity popisovány jako zcela prázdné tzv. apolární, nedávná studie podle Mathewse [2] však prokázala, že se v těchto kavitách mohou vyskytovat molekuly vody a jejich role rozhodně není nevýznamná. Obecně tedy můžeme říci, že „nic“ ovlivňuje především konformaci a stabilitu studované struktury [3] a že přítomnost a funkce „ničeho“ je silně spjata s přítomností molekul vody. Kavity, póry a tunely, ač mnohdy prostory téměř prázdné, mají navíc i nepostradatelné funkce v biologických systémech. Jak dokazují četné studie (viz dále), role „ničeho“ v nanomateriálech je velmi významná. Přestože ještě nebylo vše ohledně těchto „prázdných“ prostor v rozličných strukturách vysvětleno, nové experimentální techniky a nově vyvíjené výpočetní metody mohou vnést do těchto dosud temných a prázdných oblastí nové světlo.

2.1.1 Kavity

Kavity jsou prostory vyskytující se ve vnitřní části makromolekul. Na rozdíl od kapes, nemají přímý kontakt s molekulárním povrchem. Příkladem kavity je např. kavita aktivního místa proteinů, která je zanořena hluboko v jeho centru [4].

Název kavity pochází z anglického *cavities*, případně *imperfect holes* či *holes* a další možné názvy popisují tento velký soubor útvarů vyskytujících se v nanomateriálech. Přestože jejich pojmenování, obzvláště pak pojem hole (díra) vzbuzuje dojem, že se jedná pouze o jakousi díru uvnitř dané struktury, je tato představa poněkud nepřesná. Kavita v obecném slova smyslu znamená jakousi vyhloubeninu ve vnitřní části makromolekuly, která má alespoň takovou velikost, kterou jsme schopni zaregistrovat.

Kavitu, která není žádným způsobem spojena s molekulárním povrchem, popisuje anglické slovo “void” (nicota, prázdnota). „Nicota“ představuje oblast v proteinu, kde je oblast prázdného prostoru zcela obklopena okolními atomy [7]. Práce Edelsbrunnera a kol. nicméně popisuje kavity jako prostory s jistou, byť omezenou přístupností k povrchu [6].

V závislosti na přítomném ligandu, se mohou kavity značně lišit. Toto se týká především kavit, které tvoří aktivní místo. Klasické vazebné místa pro ligand mohou být popsány jako (i) samostatná kavita, (ii) hluboko zanořená kapsa s jednoduchou geometrií, (iii) zakřivená drážka složená z několika spojených kapes, či (iv) rozvětvená struktura s ligandem navázaným v jedné z větví a krystalografickými molekulami vody vázanými ve větví jiné. Tyto typy kavit se mohou mezi sebou značně lišit svojí velikostí. Popis rozměrů a objemů vnitřních kavit je tudíž nepostradatelným základem pro analýzu aktivních míst a návrh potenciálních substrátů proteinů.

Molekulární rozpoznávání, tedy tvarovou popřípadě chemickou komplementaritu mezi dvěma látkami, je v případě kavit možno porovnávat pomocí změřených objemů kavity i dotyčné látky. Navíc nelze určit přesnou závislost mezi velikostí kavity a celého proteinu, protože nemůžeme jednoznačně říci, že by u větších proteinů byla obecně vazebná kavita automaticky větších rozměrů a naopak. Očekává se, že s rostoucí velikostí proteinu bude narůstat i velikost vnitřních kavit. Toto tvrzení však nelze jednoznačně potvrdit, protože nalezené kavity v různých materiálech vykazovaly značné rozdíly. Příčinou tohoto chování může být rozdílnost ve sbalení proteinů či kvalita dané struktury proteinu daná např. rozlišením, v jakém byla vykrytalizována. Na přítomnost vnitřních kavit má také velký vliv jejich okolí.

2.1.1.1 Vliv vody v kavitách

Molekuly vody jsou nepostradatelnou součástí všech proteinů. Hydratace vnitřních kavit je zprostředkována vstupem molekul vody z okolí proteinu dovnitř této kavity. U kavit, které jsou hydratované, je vyšší pravděpodobnost, že budou mít větší rozměry a navíc i větší množství vodíkových interakcí, čímž se zvýší i počet polárních sousedů této kavity. Proto je možné říci, že pokud bude v proteinu přítomna dostatečně velká kavita s dostatečným počtem vodíkových interakcí, je pravděpodobné, že tato kavita bude zvyšovat stabilitu této struktury [4-5]. Vodíkové vazby molekul vody pak hrají u mnoha struktur významné role. Například u

struktury cytochromu P450 CAM vytváří vodíkové vazby molekul vody jakési „mosty“ spojující sekundární strukturní prvky proteinu [8].

Molekuly vody se mohou vyskytovat ve třech různých formách:

- První formou jsou molekuly vody silně vázané, např. uvnitř proteinu.
- Dalším typem jsou molekuly vody, které interagují s povrchem molekuly daného proteinu.
- Třetí typ pak představují molekuly vody v okolí proteinu (*bulk water*) [9].

K získání dat o pozicích molekul vody uvnitř proteinu se využívá řada experimentálních metod, mezi něž patří: rentgenová a neutronová difrakce, NMR a femtosekundová fluorescence. Pro teoretický výzkum se pak zpravidla používá molekulová dynamika ve formě molekulárně dynamických simulací, které umožňují detailní popis jak atomů studované biomolekuly, tak molekul solventu v jejím okolí [10-11].

2.1.1.2 Mobilní molekuly vody

Pokud bereme v úvahu molekuly vody zanořené ve vnitřních apolárních kavitách, předpokládalo se, že jejich přítomnost bude energeticky značně nevýhodná, jelikož tyto molekuly by zde neměly dostatek vodíkových interakcí. Nicméně i tyto kavity jsou často zaplněny molekulami vody, které však nevytvářejí trvalé vodíkové vazebné interakce. Je to proto, že tyto molekuly se vyskytují uvnitř kavit a neustále se pohybují velkou rychlostí. Z tohoto důvodu nebylo možné je identifikovat běžnými krystalografickými metodami. Průlom v této oblasti nastal až s novou metodou NMR analýzy, která je schopna odhalit i tyto rychle se pohybující molekuly vody. Nově objevené molekuly vody byly označeny jako „mobilní molekuly vody“ [2]. Přestože nelze přesně odhadnout, kolik molekul vody bude daná struktura obsahovat, obecným pravidlem je, že se tento počet odvíjí od strukturních rysů dané molekuly. Tyto zanořené vody jsou se svým okolím propojeny pomocí tzv. polárních klastrů [4-5].

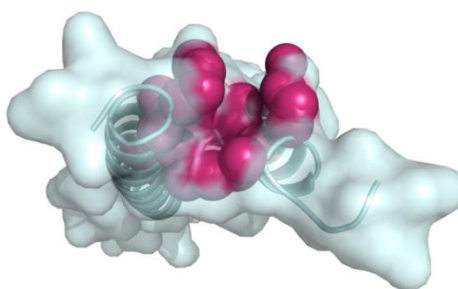
Pohyb mobilních molekul vody je značně ovlivněn také velikostí a tvarem kavity, v níž jsou přítomny. Příkladem tohoto chování je studie kavit ve struktuře T4 lysozymu za přítomnosti vzácných plynů. Protože vzácné plyny nevytváří vodíkové vazby ani jim podobné interakce jsou ideální pro studium obsazenosti kavit. [12]

Je však nutno zmínit, že tyto mobilní molekuly vody jsou značně omezeny ve svém pohybu vlivem vlastností kavity, v níž se nacházejí. Mobilitu těchto molekul je možné popsat pomocí klasických ukazatelů flexibility a strukturní odchylky, jako je B-faktor¹ a RMSD² [2].

2.1.1.3 Příklad výskytu kavity - Coiled coil struktury

Coiled coil je specifický druh sekundárního strukturního motivu proteinů. Vyznačuje se α helikálním uspořádáním a jejich zastoupení v proteinech představuje okolo 10%. Klasická stavba motivu coiled coil představuje dvě a více α -šroubovice, které jsou pravidelně, symetricky uspořádané do tvaru „spleteného lana“ [17]. Specifickým prvkem coiled coil struktur definovaný Crickem je tzv. „knobs into holes“ způsob párování aminokyselin na sousedících α šroubovicích [18]. Dalším strukturním prvkem těchto struktur je pravidelné opakování hydrofobních aminokyselin po stranách každého z helixů, které tvoří pruh se silně apolární povahou. Proto se také označuje jako „stripe“ tedy pruh či proužek. Uspořádání helixů v coiled-coil struktuře může být jak paralelní, tak i anti-paralelní [19]. Coiled coil uspořádání se obvykle vyskytuje ve formě dimeru, nicméně bylo prokázáno, že existují i další polymerní formy, jako jsou trimery, tetramery, pentamery [20-21] či heptamery [23].

Coiled coil motiv je předpokládaným cílem pro léčiva. Proto se hledání těchto motivů v rozličných proteinech věnuje poměrně velká pozornost. V těchto strukturách se totiž typicky utváří hydrofobní kavity, které v sobě mohou léčivo uchytit (Obr. 1). Tyto zanořené kavity se vytváří uvnitř coiled coil struktur díky interakci aminokyselin v N helixu [20-20,22].



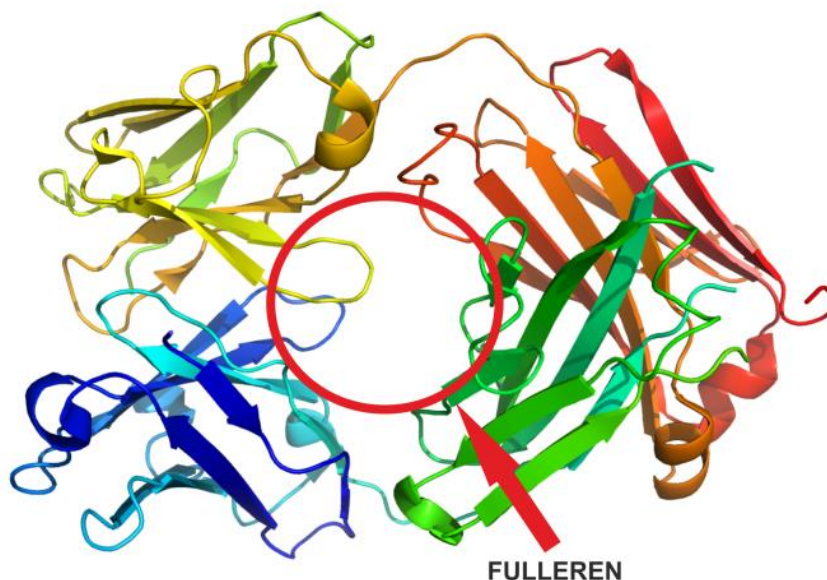
Obrázek 1 Dimerní coiled coil struktura s kavitou, (PDB ID: 1C94). Struktura je v reprezentaci šroubovic s transparentním molekulárním povrchem, kavita je zobrazena jako tmavě červené koule

¹ B-faktor je veličina udávající míru flexibility dané struktury.

² RMSD popisuje strukturní odchylku mezi srovnávanými strukturami.

2.1.1.4 Příklad kavity - Fab fragment antifullerenové protilátky

Jedná se o velice zajímavou strukturu protilátky působící proti fullerenu, která byla připravena Bradenem a kol. [26]. Do kavity protilátky lze umístit fullerén C_{60} (Obr. 2).



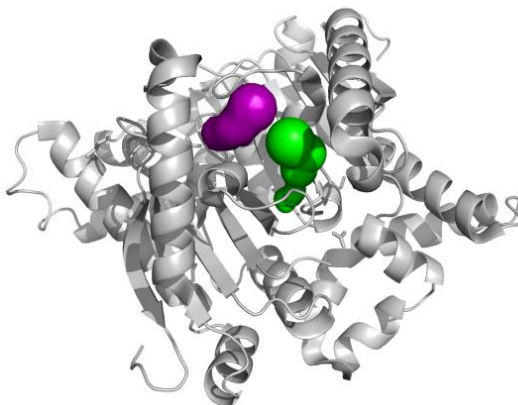
Obrázek 2 Antifullerenová protilátka fab fragment (PDB ID: 1EMT), červeným, kroužkem je naznačeno vazebné místo pro fullerén

2.1.2 Kanály

Tunely případně kanály (či makromolekulární kanály) jsou transportní cesty spojující vnitřní část makromolekuly s jeho povrchem a představují tak jakousi infrastrukturu dopravující molekuly dovnitř i ven. Typicky lze kanál popsat jakožto nejkratší možnou cestu propojující vnitřní část struktury (u proteinů aktivní místo) s jejím povrchem, přičemž tato cesta musí být dostatečně široká, aby byla schopna propustit molekulu o určité velikosti [4]. Specifickým případem kanálů jsou kanály u cytochromů P450, jež se díky podobným pozicím v rámci různých struktur cytochromů dělá dokonce do specifických rodin kanálů

2.1.2.1 Příklady kanálů - Karbonátdehydratáza

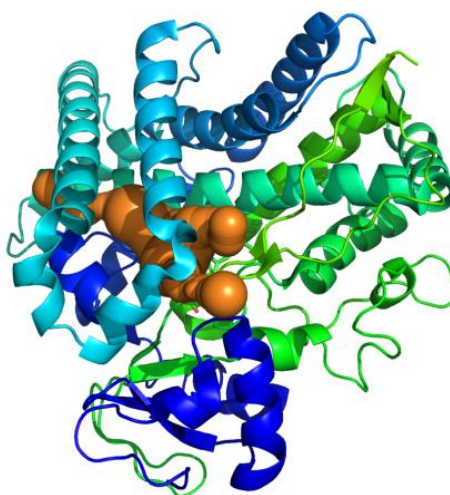
Karbonátdehydratáza je metaloenzym, který se významně podílí na fyziologických procesech spojených s přeměnou sloučenin uhlíku (Obr. 3) [13].



Obrázek 3 Karboanhydráza (struktura PDB ID 3EYX), Struktura je vyobrazena v reprezentaci cartoon, kanály jsou zvýrazněny fialově a zeleně.

2.1.2.2 Příklady kanálů - Cytochromy P450

Specifickým příkladem výskytu kanálů jsou kanály vyskytující se u cytochromů P450 (Obr. 4). Další detaily o těchto kanálech jsou uvedeny v kapitole 3.1.1.2.



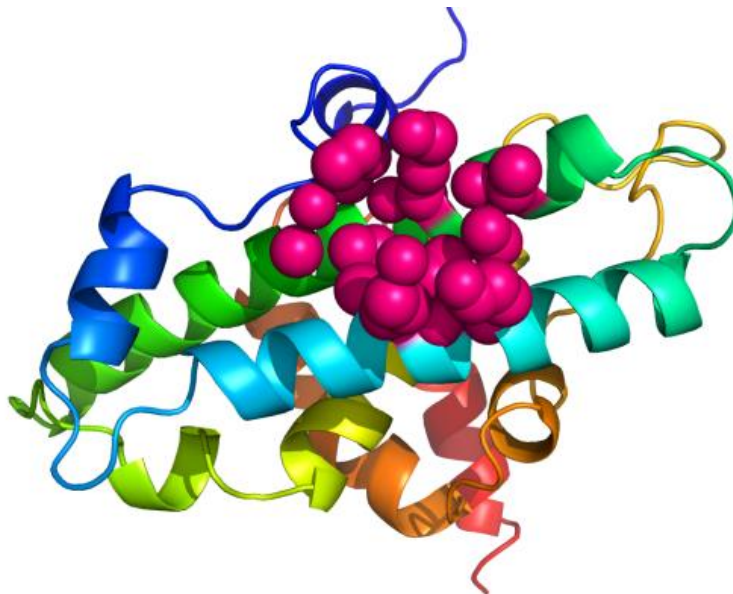
Obrázek 4 Kanály cytochromu P450, (struktura PDB ID 1OG2). Struktura je zobrazena v reprezentaci cartoon, kanály jsou zvýrazněny oranžově.

2.1.3 Kapsy

Hlavní odlišností kapes od kavit je, že se kapsy vyskytují na molekulárním povrchu. Stručně řečeno, kapsy představují mělké vyhloubeniny v povrchu struktury, které zpravidla slouží jako vazebná místa pro molekuly ligandů či jiných látek [4]. Funkce kapes je dosti významná, protože ve svém objemu mohou vázat malé molekuly v orientaci vhodné pro katalytickou aktivitu [15-16].

2.1.3.1 Příklad kapsy - Retinoblastoma

Retinoblastoma (Rb) je nádorový supresor, který, pokud je inaktivován, podílí se na vzniku většiny lidských nádorů. Inaktivace tohoto supresoru lidskými papilomaviry je jednou z nejčastějších příčin vzniku nádorů. Kapsa hraje roli vazebného místa, do něhož se vážou další proteiny, např. je cílem onkogenních virových proteinů, jež způsobují narušení sekvenčního motivu retinoblastomy a tím přispívají k její inaktivaci (Obr. 5) [14].



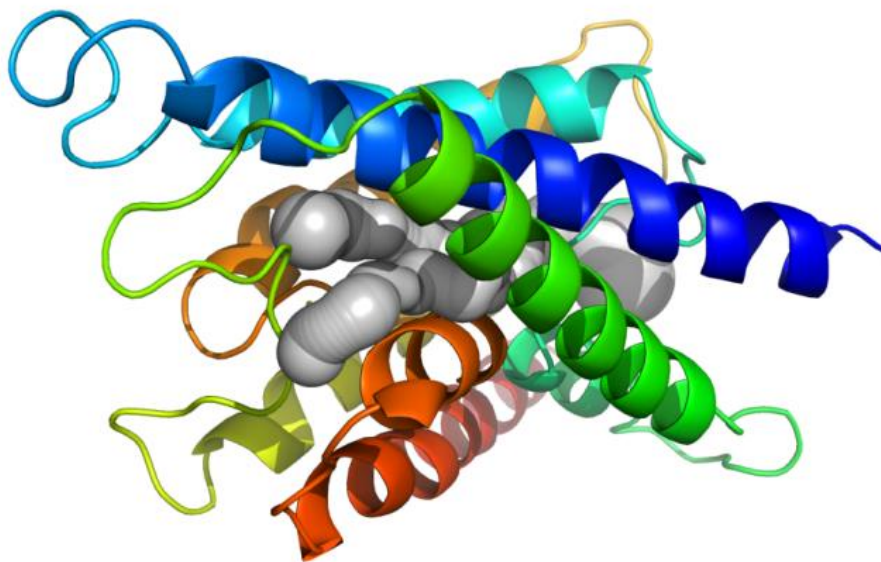
Obrázek 5 Kapsa ve struktuře retinoblastomy s PDB ID 1AD6, struktura je zobrazena v reprezentaci šroubovic, kapsa je zobrazena jako tmavě růžové koule.

2.1.4 Póry

Póry slouží jako transportní dráha, která prochází skrz celou délku molekuly. Pór je tedy typem makromolekulárního kanálu, který začíná na jedné části povrchu molekuly a ústí na konci druhém [4].

2.1.4.1 Příklady pórů - Aquaporiny

Aquaporiny (AQP) jsou malé membránové proteiny zprostředkující přenos kapalin v živých systémech. Tyto kanály slouží k přenosu jak malých molekul vody, tak větších molekul, jako je například glycerol. Podle typu přenášených látek se dělí do dvou základních skupin: *aquaporiny* a *aquaglyceroporiny*. Co se týče charakteru vodních kanálů rodiny aquaporinů, jsou velmi hydrofobní. Studium hydrofobicity aquaporinů bylo odhaleno šest tzv. hydrofobních regionů. Jedná se o malé kanály, jejichž velikost se u savčích forem aquaporinů pohybuje v rozmezí od 26 do 34 kDa [24]. Tyto vodní kanály se dají také popsat jako malé cylindrické póry, jelikož prochází přes celou strukturu aquaporinu, od povrchu na jedné straně, k povrchu na straně druhé (Obr. 6). Teoretický odhad průměru kanálu aquaporinu byl předpovězen na 3,8 Å [25].



Obrázek 6 Aquaporin se dvěma póry (struktura s PDB ID 1FQY).

3 Metody

3.1 Testované systémy

Testované systémy byly vybrány ze zástupců nanomateriálů včetně biomolekul. Pro základní testování byly vybrány cytochromy P450, které díky velkému počtu dostupných krystalových struktur tvoří ideální soubor pro testování. Dále byly vybrány zeolity, jakožto typické mikroporézní materiály.

3.1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450, označované krátce též CYP či P450 tvoří skupinu proteinů majících lví podíl při metabolismu většiny xenobiotik (láky tělu nevlastní, přijímané např. potravou) i endobiotik (látky syntetizované přímo v těle, např. hormony).

Samotný název cytochrom vychází ze dvou řeckých slov *cytos* – buňka a *chromos* – barva [27]. Číslice 450 pak značí přítomnost typického spektrálního píku v oblasti 450 nm. Jedná se o enzymy, jež jsou pro tělo člověka a dalších organismů nepostradatelné. Jejich hlavní činností je detoxikace těla od cizorodých látek, jinak též označovaných jako xenobiotika. Tím však výčet jejich funkcí zdaleka nekončí. Je nutno zmínit také syntetickou funkci cytochromů P450, při níž se podílí na tvorbě mnohých endogenních hormonů pro tělo nepostradatelných. Pokud se ještě vrátíme k samotné detoxikaci organismu, asi neznámějším příkladem je odbourávání alkoholu, kde jedním z účastníků se enzymů, je právě zástupce rodiny cytochromů P450, a to cytochrom P450 2E1 [28].

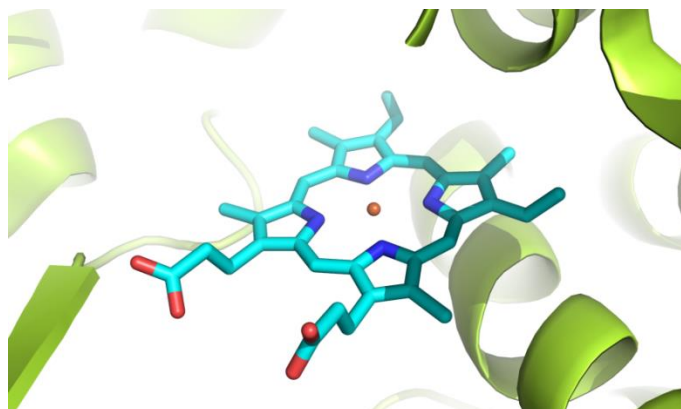
Podle CATH klasifikace [29] se cytochromy P450 řadí mezi proteiny s primárně α -helikální strukturou. CYP se vyznačují se typickou formou sbalení (*fold*), jehož základní prvky jsou u všech CYP shodné, přestože celková shoda mezi sekvencemi může představovat pouze 16% [30]. Charakteristika sbalení CYP byla poprvé popsána v roce 1987 na bakteriálním cytochromu P450cam neboli CYP101 [8].

Velmi důležitým faktem je, že cytochromy P450 při metabolických procesech přeměňují nepolární látky na více polární [31]. Zvýšení polárního charakteru metabolitů vede k snadnějšímu vyloučení toxických látek z těla, čímž CYPy výrazně přispívají k detoxikaci organismu.

Cytochromy P450 mají v dnešní době mnoho využití. Ač stále převažuje na straně medicínské, začíná se objevovat i jejich využití v průmyslových aplikacích, jako je např. použití cytochromů P450 v syntéze barviva pro získání modrých květů růží, tzv. delphinidinové anthocyaniny, jakožto pigment zprostředkujícího vznik modrého zbarvení na těchto květech [32].

3.1.1. Hemový kofaktor

Celé aktivní místo CYPů je uloženo v oblasti s názvem „cys-kapsa“ a je pohřbeno hluboko uvnitř struktury cytochromu [33]. V aktivním místě CYPů se nachází hemový kofaktor, který je zde reprezentován nejčastěji ve formě protoporfyrinu IX neboli hemu-b (Obr. 7). Některé CYP však obsahují hem v různých obměnách, např. lidský CYP 2C9 obsahuje hem-c. Ve středu porfyrinového kruhu je vázán centrální atom železa s oxidačním stavem III, který se ovšem v průběhu katalytického cyklu mění.



Obrázek 7 Hemový kofaktor struktury s PDB ID 1TBG. Atom železa je vyznačen jako červená koule, hemový kofaktor je zobrazen v reprezentaci sticks.

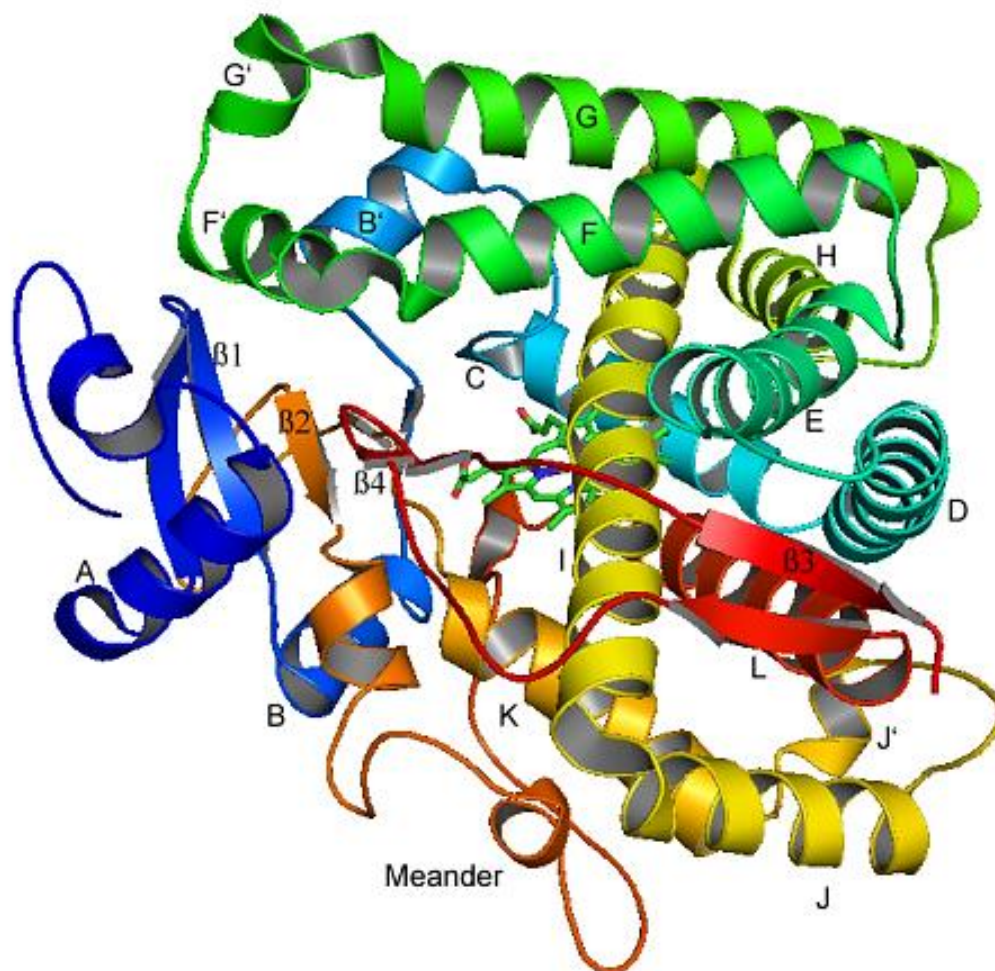
CYP jsou z hlediska reaktivity skupinou oxidoreduktáz (EC 1.14.14.1) v jejichž aktivním místě probíhají mnohé oxidačně-redukční děje jako je například hydroxylace. Bývají také označovány jako monooxygenázy, přičemž toto označení vychází z faktu, že při reakci v aktivním místě je využit právě jeden atom kyslíku na tvorbu produktu. Celý děj vyjadřuje schéma [34]:



Významným faktem je též typická regio a stereoselektivita při těchto oxidačně-redukčních reakcích.

3.1.1.1 Typické strukturní rysy cytochromů P450

Cytochromy P450 se vyznačují tzv. klasickým typem sbalení proteinové struktury, označované v anglické literatuře jako „CYP common fold“. Struktura CYPu se dělí na základní segmenty, které vychází z názvů jednotlivých sekundárních strukturních prvků pojmenovaných v abecedním pořadí od N-konce k C-konci (Obr. 8). Prvním z nich je nejdelší helix struktury, nazvaný I helix. Kolmo k I helixu je pak F/G segment složený z helixů F a G, mezi nimiž je F/G smyčka. U některých CYP se mohou také nacházet přídavné helixy malých rozměrů F' a G'. Posledním segment představuje oblast B/C smyčky, která společně s I helixem a F/G smyčkou rámuje zanořené aktivní místo s hemovým kofaktorem [33].



Obrázek 8 Typické sekundární strukturní prvky cytochromů P450 (převzato z [35]).

3.1.1.2 Rodiny kanálů u cytochromů P450

Enzymová rodina cytochromů P450 se vyznačuje unifikovaným typem proteinového sbalení. Z tohoto důvodu, i kanály nacházené v těchto proteinech, nesou své specifické značení, které se vyskytuje výhradně u těchto enzymů. Pro cytochromy P450 je typický výskyt kanálů v rámci definovaných oblastí. Tyto kanály jsou nejčastěji rámovány určitým uskupením sekundárních strukturních prvků, např. F-G smyčkou, některými helixy, či β skládanými listy. Podle svojí polohy jsou pak tunely řazeny do tzv. rodin (*families*) s danou nomenklaturou [36]. Podle názvosloví dle R.C. Wade [37] dělíme tunely cytochromů P450 do rodin značených arabskými číslicemi. V případě, že skupina obsahuje také podrodiny, se k číslici přidává malé tiskací písmeno značící její typ. Příkladem tohoto názvoslovného řádu je rodina kanálů 2, které se dělí do podrodin 2a, 2b, 2c atd. Jednotlivé rodiny kanálů dle Wade jsou shrnuty níže (Obr. 9).

Rodina 1 – v blízkosti G-H smyčky, $\beta 2$ listu a mezi helixy C' a H nebo L helixy

Rodina 2 a její podrodiny:

2a – mezi $\beta 1$ listem, smyčkami B-C, B-B' nebo F-G a B' helixy

2b – v oblasti $\beta 1$, $\beta 3$ listů a smyčky B-B'

2c – vmezeřen mezi helixy B', G a I a B-C smyčkou

2ac – mezi helixy G a horní částí B-C smyčky nebo helixem B'

2e – prochází skrz B-C smyčku

2f – F/G smyčkou, $\beta 5$ listem, případně mezi F a F' helixem

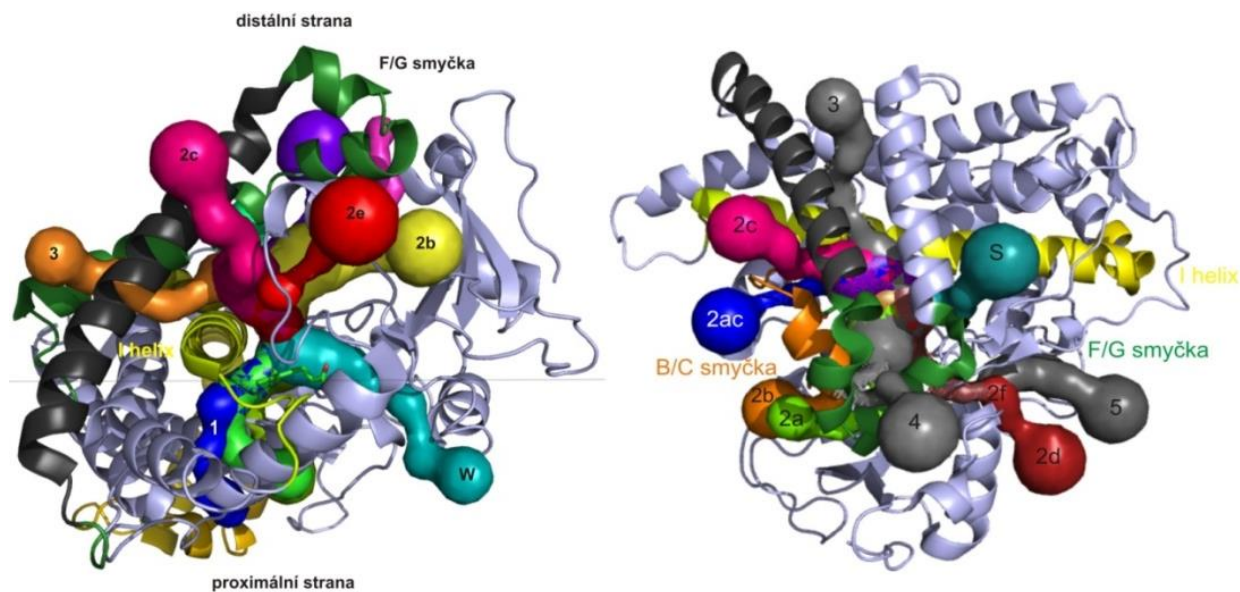
Rodina 3 – nad smyčkou E-F, nebo mezi helixy F a F'

Rodina 4 – prochází skrz F-G smyčkou

Rodina 5 – mezi helixy K a K'

Vodní kanál – mezi helixy B a B-C smyčkou, v blízkosti C-konce proteinu

Kanál solventu – typicky mezi helixy E, F a I, případně $\beta 5$ (pokud se v dané struktuře vyskytuje).



Obrázek 9 Rozložení jednotlivých rodin tunelů v cytochromech P450 (modelová molekula CYP 2C9 (PDB ID: 1OG2), struktura je znázorněna reprezentací cartoon (PyMol [38]), kanály jsou vyznačeny barevně: kanál solventu – tmavě tyrkysová, 3 – oranžová, 4 – šedá, 5 – šedá, 2a – světle zelená, 2f – hnědá, 1 – tmavě modrá, 2e – červená, vodní kanál – světle modrá. (převzato z [35]).

3.1.1.3 Mechanismus otevírání ústí kanálů CYP

Mechanismus otevírání ústí kanálů zajišťuje průchod substrátu kanálem směrem do aktivního místa. Tento pohyb je však omezen některými aminokyselinami, které v závislosti na strukturním uspořádání v jednotlivých krystalových strukturách mohou způsobit i úplné uzavření kanálu. Tento mechanismus však zatím nebylo možné zobecnit, především kvůli značné rozdílnosti uspořádání aminokyselin v různých isoformách cytochromů P450. Nicméně studium tohoto mechanismu u cytochromu P450 3A4 poukázalo na fakt, že se jedná o strukturu značně promiskuitní, což se potvrdilo i při dalších studiích tohoto proteinu [39].

3.1.2 Cytochromy P450 BM3 a P450 CAM

Cytochromy P450 BM3 pocházejí z mikroorganismu *Bacillus megaterium*. Přestože cytochrom P450 BM3 (dále jen BM3) patří mezi první struktury, na jejichž znalosti byly postaveny prvotní studie týkající se cytochromů P450, byla jeho první struktura publikována až v roce 1993. Tento cytochrom je často používán jako vzor pro obecný popis a pochopení mechanismu elektronového transportního systému cytochromů P450 [30].

Pseudomonas putida, druh půdní bakterie, je organismus, v němž byla zaznamenána přítomnost cytochromu P450 CAM. Tento bakteriální cytochrom bývá též označován jako CYP101 [30] a označení CAM vychází z přirozeně obsaženého substrátu kafru (*camphor*) [40]. Cytochromy P450 CAM (dále jen CAM) katalyzují hydroxylaci kafru, jako již zmíněného substrátu. Společně s BM3 tvoří základ pro pochopení obecné struktury a funkce cytochromů P450. Struktura CAM je prototypem základních strukturních prvků cytochromů P450 a jeho aktivní místo je typicky zanořeno uvnitř struktury. Přijetí substrátu je možné pouze za předpokladu strukturních fluktuací molekuly CAM.

Ve studii Lüdemanna a kol. bylo zjištěno, že celkové strukturní fluktuace proteinu jsou přítomností ligandu ve struktuře ovlivněny jen nepatrně. Dále bylo zjištěno, že CAM obsahují tři hlavní přístupové cesty: rodiny 1, 2 (*2a*, *2b*, *2c*) a 3. U BM3 byly nalezeny pouze zástupci rodiny 2 a konkrétní podrodiny 2a a 2d. Rodina 1 u CAM způsobuje částečnou deformaci vinylových skupin hemu.

BM3 vytváří solné můstky s karboxylovou skupinou palmitolejové kyseliny, čímž ovlivňuje orientaci aktivního místa. Hlavní nalezené přístupové cesty byly 2a a 2d. Srovnáním struktury BM3 s ligandem a bez ligandu pomocí strukturní odchylky RMSD bylo zjištěno, že hlavní rozdíly nastávají v oblasti F/G smyčky a G helixu. Menší změny z hlediska RMSD byly zjištěny také v oblasti B/C smyčky a C' helixu, ve smyčce D/E a E helixu.

U CAM je pravděpodobně hlavní přístupovou cestou rodina 2a. Transport substrátů rodinou 2 je zprostředkován malými pohyby hlavního proteinového řetězce a dodatečnou rotací postranních řetězců aromatických aminokyselin. Větší substráty však nejspíše opouští aktivní místo cestou rodiny 1. Rodina 3 je cestou spíše hydrofobního charakteru, protože je umístěna převážně mezi alifatickými aminokyselinami [41].

3.1.3 Lidské cytochromy P450

Lidské cytochromy hrají obrovskou roli v metabolických procesech odehrávajících se v lidském těle. Významně se podílí na metabolismu endogenních hormonů, léčiv, některých toxických látek, polutantů či karcinogenů. Jelikož se většina lidských cytochromů nachází právě v jaterní tkáni, kde se odehrává ústřední krok při metabolickém rozkladu léčiv, jsou cytochromy P450 významnými strukturami rovněž ve farmaceutickém průmyslu. Zde jsou významné také jejich interakce typu lék-lék a potenciální toxicita. Další význačnou funkcí lidských cytochromů P450 je produkce endogenních látek, jakými jsou např. steroidní hormony, či některé vitamíny (A, D). Různé rodiny těchto cytochromů se podílí na procesech, jako: metabolismus eikosanoidů, mastných kyselin či přeměny xenobiotik. Některé lidské cytochromy P450 se nicméně také mohou účastnit vzniku některých onemocnění [30].

Lidské cytochromy je možno rozdělit na základě isoform do 57 rodin. Krystalové struktury se však podařilo získat zatím pouze pro 20 z těchto rodin. Jsou to rodiny: 1A2, 1B1, 2A6, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 2R1, 3A4, 7A1, 8A1, 11A1, 11B2, 17A1, 19A1, 46A1 a 51A1. Většina těchto rodin se nalézá v játrech a účastní se rozličných biochemických pochodů organismu.

Jednou z nejvýznamnějších rodin je cytochrom P450 3A4. Rodina cytochromů P450 3A4 je v lidském organismu bohatě zastoupena. V roce 2005 byla publikována ligandu prostá krystalová struktura nesoucí označení PDB ID 1TQN [42]. V předchozím roce již však byly publikovány další struktury 3A4, které navíc obsahovaly molekuly ligandů. Těmito ligandy byly metyrapon a progesteron [43].

Stejně jako ostatní zástupci CYP i 3A4 se podílí na zpracování endogenních i exogenních sloučenin. CYP 3A4 je zastoupen v jaterní tkáni, přičemž 70% jeho metabolických procesů probíhá v jaterní stěně [44]. Dále se CYP 3A4 také nachází v tenkém střevě [45].

Při těchto procesech může docházet i k četným interakcím. Jako známý příklad zmiňme interakce léčiv s grapefruitovou šťávou, která může zapříčinit dokonce až smrt jedince [46]. Cytochromy P450 3A4 jsou navíc známé také svojí tzv. promiskuitou. Jejich aktivní místa jsou značně flexibilní, a proto umožňují vstup velké škále různě velkých substrátů [47].

3.1.3.1 Zástupci CYP a jejich zastoupení v lidských tkáních

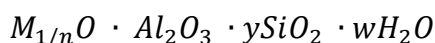
Zastoupení převzato z ref. [30].

- 1A2 je obsažen hlavně v játrech.
- 1B1 je obsažena v játrech a ledvinách, ale také ve velkém množství mimojaterních tkání.
- 2A6 jsou obsaženy v játrech, plicích, a některých mimojaterních tkáních.
- 2A13 se vyskytují v nosní sliznici.
- 2B6 je přítomna v játrech a plicích.
- 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 se vyskytují v játrech.
- 2E1 je cytochrom vyskytující se v játrech, plicích a dokonce i v dalších tkáních.
- Výskyt rodiny 2R1 není dosud znám.
- 3A4 je typický pro játra a tenké střevo.
- 7A1 je typickým jaterním cytochromem.
- 8A1 se vyskytuje v aortě a dalších tkáních.
- 11A1 je přítomen v nadledvinkách a dalších steroidogenních tkáních.
- 11B2 se vyskytuje pouze v nadledvinkách.
- 17A1 a 19A1 jsou přítomny ve steroidogenních tkáních, 19A1 je navíc také v mozku a adipozních tkáních.
- 46A1 se nachází v mozku.
- 51A1 se vyskytují v játrech a varlatech.

3.1.4 Zeolity – porézní nanomateriály

Nanomateriály, jak již samotný název napovídá, jsou látky v rozměrech nanometrů, tedy 10^{-9} m. Různé dutiny, prohlubně a další útvary se vyskytují téměř v každém materiálu. Typickým zástupcem nanomateriálů s dutinami jsou zeolity, jakožto přírodní hlinitokřemičité sloučeniny, jejichž struktura je hustě protkána póry. Tyto póry hrají v jejich struktuře zásadní roli, neboť mnohonásobně zvětšují jejich povrch a činí tak zeolitické struktury vynikajícími sorbenty a katalyzátory.

Zeolity jsou hlinitokřemičité materiály s obsahem prvků z IA a IIA skupin periodického systému prvků. Nejčastějšími prvky jsou tedy sodík, draslík, hořčík a vápník. Obecně lze zeolity popsat empirickým vzorcem [48]:

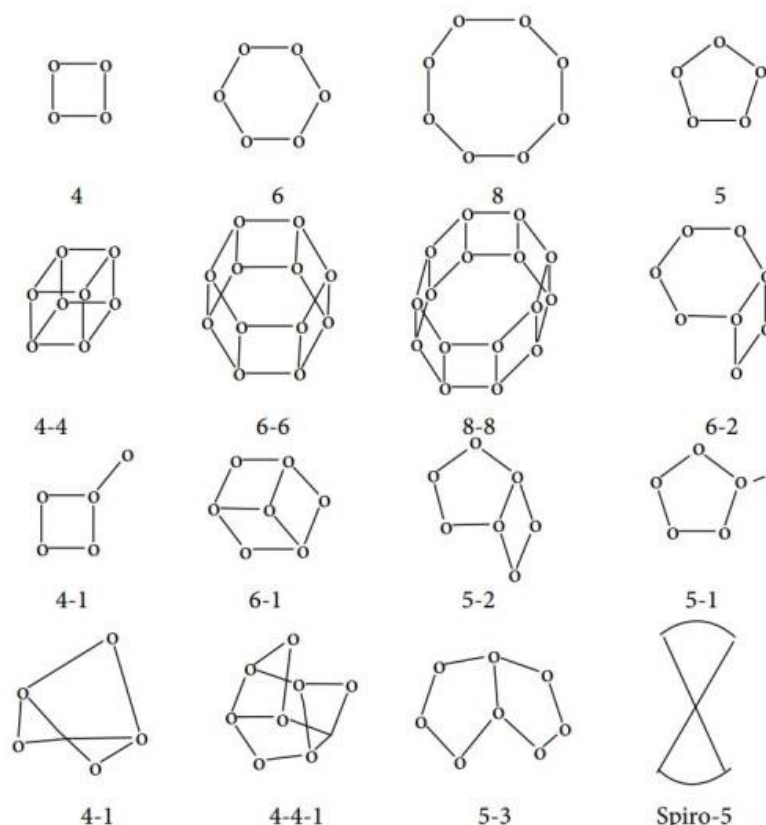


Jedná se o trojrozměrné struktury, které mohou nabývat různého tvaru a geometrie, jež se nejčastěji vyskytují v přírodě v okolí sopek a metamorfovaných skal. Mezi nejznámější popsané struktury zeolitů patří chabazit, mordenit, faujasit či offretit.

Zeolity se nabízí jako slibný materiál pro mnohé aplikace. Jedná se o vlastnosti, jako jsou například: vysoká selektivita, značná specifická kapacita, dále jsou snadno regenerovatelné, a vyznačují se vysokou odolností vůči, chemické, biologické, mechanické či tepelné námaze [49]. Zeolity také díky své mikroporézní struktuře poskytují opravdu velkou plochu povrchu pro potenciální reakce či pro adsorpci.

3.1.4.1 Struktura zeolitů

Základní kostra zeolitu je dána dvěma strukturními jednotkami. Jedná se o tetrahedry $[SiO_4]^{4-}$ a $[AlO_4]^{5-}$. Možnosti kombinací těchto jednotek jsou velmi široké, a proto se pro základní strukturní jednotky používá název sekundární stavební jednotky (*secondary building units* (SBU)).



Obrázek 10 Základní strukturální jednotky zeolitů SBU (převzato z [50]).

Zatímco kostra zeolitu je díky čtyřstěným základním hlinito-křemičitým jednotkám záporně nabitá, síť kanálů a pórů uvnitř struktury se snaží tento záporný náboj kompenzovat, tak že uvnitř svých pórů uzavírají molekuly vody a malé kladně nabitě ionty [51]. Známe 16 těchto sekundárních stavebních jednotek, přičemž každý zeolit lze popsat za pomoci jedné či více jednotek (Obr. 10).

Atomy Al a Si jsou uspořádány jako tetraedry v jednotkách TO_4 , kde T značí buď hliník, nebo hořčík, obecně se tedy označují jako T-atomy. Tyto tetraedry mohou následně vytvářet kruhy s různým počtem Al a Si, a výsledný počet těchto atomů v tetraedrické jednotce silně ovlivňuje velikost mikropórů. Úhly mezi atomy T-O-T mohou být značně flexibilní ($130-180^\circ$), a právě toto je jedna z hlavních příčin strukturální variability zeolitů. Ze základních strukturálních rysů a geometrie je odvozeno celé názvosloví zeolitů. Kompletní názvosloví zeolitů bylo Strukturální komisí mezinárodní asociace zeolitů IZA-SC (*Structure Commission of the International Zeolite Association*) ustaveno v roce 1997 [52].

3.1.4.2 Historie zeolitů

První zmínka o strukturách zeolitů spadá již do roku 1756, kdy byly popsány švédským mineralogem Alexem Fredrikem Cronstedtem [53]. Název zeolit byl odvozen z chování zeolitu v průběhu varu. Pokud je zeolit vařen v kádince s vodou, pak vypadá jako by tančil ve víru bublinek, které vypouští. Takové chování je důsledkem mikroporézní struktury těchto sloučenin, a vylučované bublinky nejsou ničím jiným, než pára vznikající z odpařující se vody obsažené v jejich pórech. Slovo zeolit bylo tedy Cronstedtem odvozeno z řeckého slova pro var - „zein“ a slova „lithos“ - kámen.

V letech 1857 a 1858 byly zjištěny další významné vlastnosti zeolitů. Jednalo se o schopnost rehydratace, přičemž v zeolitech dochází k neustálým cyklům, kdy se střídá dehydratace s rehydratací [54] a následující rok byl popsán ionto-výměnný charakter jejich pórů [55].

Na počátku 20. století začaly mít zeolity první průmyslová využití. Prvním komerčním počínem v oblasti zeolitů bylo jejich použití jako změkčovačů vody v roce 1905. Tyto komerčně vyráběné zeolity dostaly název Permutity [56]. O dva roky později začala firma Henkel vyrábět první prací detergent s názvem Persil. Pojmenování je odvozeno ze dvou hlavních složek, kterými jsou perboritan sodný (*sodium perborate*) a křemičitan sodný (*sodium silicate*). První molekulová síta vyrobená ze zeolitů se objevila v roce 1925 [57].

Mezi jednu z prvních popsaných struktur zeolitů patřil tzv. chabazit. Na této struktuře prováděl New Zélandský chemik Richard Barrer první pokusy v oblasti sorpce plynů na pevné materiály a výsledky zveřejnil v roce 1938. Na základě svých studií pak rozdělil zeolity do tří tříd podle jejich sorpčních vlastností. První skupina, do níž patří chabazit, se vyznačuje schopností rychle absorbovat malé molekuly jako je např. ethan ale i delší uhlovodíky, nicméně u nich je už sorpce podstatně pomalejší. Druhá třída je typická absorpcí malých uhlovodíků, která je však mnohem pomalejší a jejím hlavním zástupcem je mordenit. Třetí třídu zeolitů pak tvoří materiály na bázi mordenitu s obsahem Ca^{2+} kationtů. Tato třída je omezena pouze na absorpci malých molekul jakými jsou kyslík či dusík. Ranné Barrerovy výzkumy spustily vlnu příprav dalších analogů mordenitu a podobných zeolitů, které vedly k výrazným změnám jeho vlastností a tím otevřely bránu dalším možnostem aplikací. Významným výsledkem Barrerových syntéz byla příprava analogu chabazitu ZK-5, který představoval první syntetizovanou strukturu zeolitů, k níž neexistoval přírodní ekvivalent

(všechny syntézy zeolitů do tohoto okamžiku, spočívaly pouze v přípravě struktur podle již existujících přírodních materiálů) [58]. Dalším milníkem v historii zeolitů byla příprava zeolitu A a zeolitu X Miltonem v roce 1950. Tyto zeolity s vysokým obsahem hliníku rychle nabýly průmyslového významu jakožto významné adsorbenty, které se využívají dodnes. Následně v roce 1954 byla syntetizována nová stabilnější struktura podobná zeolitu X, již byl zeolit Y. V návaznosti na tento nový zeolit byl v roce 1957 představen tzv. „ultrastabilní“ zeolit Y, který byl připraven zahříváním zeolitu v inertní atmosféře [59].

Od roku 1956 byly syntetizovány další a další nové struktury zeolitů a jejich průmyslové využití, jakožto odstraňování vody ze zemního plynu, chladících plynů, či uhlovodíkových par. Také se rozvíjelo i jejich použití v rámci molekulových sít. Současně se rovněž rozvíjela snaha o získání zeolitů, jejich vlastnosti by umožňovaly provádět kyselou katalýzu. Prvním z nich byl zeolit s názvem zeolit H-X a účinnost při kyselé katalýze značně převyšovala dosavadní komerčně dostupné katalyzátory. Tento typ zeolitu byl brzy následován dalším analogem zeolitem H-Y, jehož hlavní výhodou oproti podobným strukturám bylo zachování krystalinity i při opakovaných katalýzách.

V roce 1959 byly popsány první zeolity umožňující krakování vodíkem. V dalších letech byly vlastnosti zeolitů dále vylepšovány až k dosažení tzv. „molekulární tvarově-selektivní katalýzy“, která vyšla z předpokladu, že katalýza probíhá uvnitř pórů a je ovlivněna i jejich tvarem [60].

V rámci studia krakovacích procesů s využitím zeolitů byla definována tzv. „superacidita“ zeolitů. Superacidita je jev vznikající vlivem částečného přenosu elektronů z O-H vazby na oxohlinité kationty, přičemž dochází k oslabení této O-H vazby [58].

Od roku 1962 byly zeolity hojně využívány v petrochemickém průmyslu k úpravě ropy. Zeolity se dnes ve velké míře také používají jako složky detergentů pracích prostředků, kde výjimečně nevychází ze svých katalytických vlastností, ale naopak ze svojí iontoměničové povahy. Zeolity na sebe vážou ionty hořčíku a vápníku náhradou za své sodíkové ionty, což má za následek změkčení vody [51].

V roce 1967 se konala první mezinárodní konference chemie zeolitů, kde byla ustavena Mezinárodní komise Zeolitů (International Zeolite Association (IZA)).

V roce 1978 byla vytvořena první edice Atlasu typů zeolitických struktur (*The Atlas of Zeolite Structure Types*) následně přejmenovaný na *The Atlas of Zeolite Framework Types*, který na svém počátku obsahoval 38 struktur a je neustále doplňován o nové struktury zeolitů [61]. Dnes již atlas obsahuje více než 200 struktur zeolitů.

3.1.4.3 Aplikace zeolitů

Velikost a charakter pórů zeolitů silně ovlivňuje jejich vlastnosti, obzvláště pak ty katalytické. Podle velikosti se póry v zeolitech rozdělují na malé (3 až 5 Å), střední (5 až 6 Å) a velké póry (6 až 9 Å), případně extra velké póry (větší než 9 Å) [50]. Porozita těchto materiálů přímo vybízí k jejich využití jakožto molekulárních sít. Póry, které se otevírají na povrchu struktury, mohou přenášet různé látky z vnějšího prostředí dovnitř zeolitu [50].

Velký povrch zeolitů je také ideální pro adsorpci rozličných látek. Lze je použít například k separaci a čištění kapalin a plynů, kde se navíc uplatňuje i selektivita pórů vůči některým látkám. Dále je lze použít jako účinné iontoměniče např. při čištění znečištěných vod [62]. Další je role katalytická, která se uplatňuje obzvláště v průmyslových aplikacích. Zeolity mají z katalytického hlediska optimální vlastnosti, ze kterých vyzdvihneme obzvláště velký počet aktivních míst, velkou reakční plochu, porozitu, či dobrou termickou stabilitu. Zeolity je také možno regenerovat [63].

Vhodnou náhradou atomů v zeolitech, např. náhradou křemíku za hliník, lze upravit jejich hydrofobní či hydrofilní charakter [64]. Tato úprava zeolitů je velice výhodná z hlediska možnosti jejich dalšího využití pro reakce, které vyžadují absenci vody nebo naopak pro ty, pro něž je třeba prostředí hydrofilní.

Zeolitických struktur je také možno využít k tvorbě membrán. Membrány je možno použít k mnoha typům membránových separací, jakými jsou: mikrofiltrace, ultrafiltrace, nanofiltrace či reverzní osmóza. Základními ději při této separaci jsou pak difúze a fyzisorpce. Velmi časté je použití těchto membrán při čištění a úpravě vod např. odstraňování polutantů či snižování obsahu solí [49].

V posledních letech se objevují i nové, typicky nanotechnologické aplikace zeolitů, a to např. v molekulární elektronice, nelineární optické materiály, zeolitické elektrody, kvantové tečky či chemické sensory [65]. Na základě dostupných poznatků se zeolity jeví jako slibný materiál budoucnosti.

3.2 Software pro výpočet „ničeho“

Pro výpočet „ničeho“ v dnešní době existuje mnoho nástrojů. Vyznačují se značnou různorodostí jak už z hlediska podávaných výsledků, tak především použitých algoritmů a jednotlivých kroků výpočtu. Jednotlivé softwarové nástroje se také mohou lišit svojí specifikací k výpočtu, např. je daný program specializován na vyhledávání kavit, jiný je určen ryze pro hledání tunelů apod. Než budou představeny jednotliví zástupci programů, budou nejprve probrány metody výpočtu „ničeho“ a jejich dělení.

3.2.1 Metody výpočtu kanálů, kavit a pórů

Metody pro výpočet ničeho dělíme podle použitého algoritmu do čtyř základních skupin [66]:

- a) *grid-based metody,*
- b) *probe-sphere filling metody,*
- c) *metody založené na alpha shape,*
- d) *slice a optimalizační metody,*
- e) *metody založené na Voroného diagramech.*

Některé metody navíc využívají Dijkstrův algoritmus nejkratší cesty, který doslova prohledává strukturu a hledá nejkratší spojnici od počátečního ke konečnému bodu, který se nachází v konvexní obálce. Nalezená spojnice pak představuje nejkratší cestu mezi dvěma body a tvoří tam výsledný kanál [68].

3.2.1.1 Grid-based metody

Jak již název napovídá, grid-based metody, neboli volně přeloženo „mřížkově založené metody“ využívají pro výpočet sestavení základní 3D mřížky (*grid*), která je obrazem dané struktury, např. proteinu. Body proteinu jsou zde vyneseny do konečně ohraničené mřížky, přičemž vzdálenost vrcholů této mřížky jsou dány nastaveným rozlišením (obvykle 1 Å). Následné kanály se pak vyhledávají na sestavené mřížce pomocí tzv. skórovací funkce. Nevýhodou grid-based metod jsou poměrně velké nároky na výpočetní výkon. Lze říci, že čím složitější struktury touto metodou zpracováváme, tím je použitá mřížka větší a tím bude čas potřebný na průběh výpočtu delší a vzrostou také nároky na operační paměť [68].

Příkladem programu využívajícího tento typ výpočtu je CAVER 1.0 [67]. Program CAVER, publikovaný v roce 2006 je určen převážně k detekci cest spojujících aktivní místo, či jinou zanořenou dutinu, s povrchem struktury, a v tomto ohledu byl prvním softwarem tohoto typu. Daná struktura je v CAVERu převedena do 3D mřížky a povrch je sestaven jako konvexní obálka. Program CAVER je neustále vylepšován a jsou vydávány jeho nové verze [76]. Nicméně již od verze 2.0 byl kvůli zrychlení algoritmu zaměněn grid-based přístup za využití Voroného teselace. Poslední verze CAVER 3.0 byla publikována v roce 2012.

Dalším příkladem programu využívajícího grid-based metody je např. HOLLOW [77],

3.2.1.2 Probe-sphere filling metody

Probe-sphere filling metody jsou založeny na definování tzv. „myšlených koulí“ (*probe-sphere*) na povrchu struktury. O těchto koulích můžeme říci, že zatímco se malé koule vejdou dovnitř kapsy, velké koule už dovnitř neprojdou. Na začátku výpočtu je na povrchu proteinu vytvořena vrstva z těchto vzájemně se překrývajících koulí, přičemž ty mají neměnnou velikost 1,87 Å. Současně s nimi se však na povrchu tvoří také větší koule. Úprava povrchu složeného z překrývajících se koulí probíhá na principu vylučovací metody, kdy platí, že pokud větší koule protíná tu menší, pak je menší z nich odstraněna. Tento proces lze přirovnat k jakémusi „vybroušení“ povrchu do co nejlepšího tvaru, což vystihuje i anglický termín „shaving process“. Zbývající koule jsou sdružovány za tvorby výsledných kapes [16].

Tyto metody jsou velmi vhodné k popisu kapes na povrchu proteinu. Jedna z prvních aplikací této metody se objevila v programu PHECOM. Zvláštní název je složeninou, kde “P” je zkratkou pro Probe-based a “HECOM”, dle japonského slova “hekomi”- konkávní tvar [16].

Dalším příkladem je například program SURFNET, který vyhledává kapsy, kavity a podobné útvary v proteinech pomocí koulí vkládaných mezi páry atomů. Koule má stanovené minimum a maximum a tímto rozměrem se musí vejít právě mezi dva atomy. Pokud do takto vzniklé koule zasahuje ještě další třetí, sousední atom, pak je koule zmenšena tak, aby se opět dotýkala pouze daného páru atomů. V případě, že by byla koule zmenšena natolik, že by již nesplňovala ani minimální hodnotu poloměru, pak se tato koule již dále nepočítá. Výsledné kavity jsou pak dány souborem koulí (klastry), které vyplňují určitý oddělený prostor. Pro tyto kavity lze následně vypočítat jejich objem [81].

3.2.1.3 Metody vystavěné na teorii alpha shape

Základní koncept vychází ze sestavení obálky, představující povrch struktury odvíjející se od vlastností tzv. „solvent accessible volume“ [69], tedy části struktury, která přichází do kontaktu se solventem. Tento pojem byl zaveden pro usnadnění popisu makromolekul pomocí obálky. Alpha-shape teorie byla poprvé popsána Edelsbrunnerem a kol. v roce 1998.

Příkladem software je například program Roll. Prvním krokem výpočtu programu Roll je sestavení povrchu dané struktury, který je zde nazván jako „povrchová sonda“ (*probe surface*) obklopující strukturu. V první řadě je vytvořena 3D mřížka, která je vyplněna atomy representovanými 3D koulemi, jejichž poloměry jsou dány van der Waalsovými poloměry odpovídajících atomů. Mřížkové body, v nichž je přítomen atom dané struktury, mají přidělenou hodnotu 1, zatímco mřížkové body, které jsou prázdné, dostanou nulovou hodnotu. Dále Roll používá kutálející se sondu, která vytváří povrchovou sondu. Následně je celá 3D mřížka rozdělena na řezy o stejné tloušťce a v okamžiku, kdy sonda začne prohledávat jednotlivé mřížkové body, přičemž startuje z určitého počátečního bodu. Když sonda narazí na první bod proteinu, začne rotovat kolem proteinového povrchu, přičemž se v žádném okamžiku nepřekrývá s proteinem až do doby, než se vrátí do počáteční pozice. Jako povrchová sonda jsou pak označeny volné části mřížky, jimiž sonda prošla. Kapsy a kavity jsou pak popsány jako oblasti volných bodů, které leží mezi povrchem proteinu a rotující sondou. Algoritmus Roll byl později zabudován do programu POCASA [84].

Další známý zástupce této třídy programů je program 3V [85]. Tento program je určen k vyhledávání všech prázdných vnitřních objemů, tedy kanálů, kavit a dalších. Operuje i s velkými makromolekulárními strukturami včetně makromolekulárních komplexů. 3V představuje zkratku celého názvu programu, kterým je *Voss Volume Voxelator*. Principem 3V je kutálení virtuální sondy v okolí van der Waalsova povrchu makromolekuly v rozsahu daném velikostí tohoto povrchu.

3.2.1.4 Slice metody a Optimalizační metody

Jako „slice metodu“ si můžeme představit proces, kdy je studovaná struktura „nakrájena“ na řezy podél startovního vektoru (nedefinován uživatelem) a následně se použije optimalizace, kterou se odhalí nejširší kouli [4], jež má přesně definovanou polohu vůči definovanému startovnímu vektoru a udává směr hledaného kanálu. Tyto řezy jsou pak vyhodnocovány v závislosti od předem definovaného počátečního bodu, přičemž optimalizační metoda např. Metropolis Monte Carlo [70] vyhledává nejširší kouli v daném řezu, přičemž upravuje polohy bodů, které jsou náhodně přeskupeny za účelem dosažení co největší velikosti této koule. Tento proces je dále opakován pro všechny řezy, až vznikne kanál [66]. Zhruba lze tedy říci, že principem této metody je protlačování gumového míčku středem kanálu [71].

Příkladem software je například PoreWalker [82] či PoreLogo [83]. Společným rysem těchto programů je hledání osy kanálu, která je spojnicí dvou bodů na opačných koncích dané struktury a prochází středem tohoto kanálu. PoreWalker je určen k hledání a popisu kanálů v transmembránových proteinech. PoreLogo pak vytváří sekvence aminokyselin, které ohraničují daný pór, a řadí je v geometrické posloupnosti podél osy kanálu (Obr. 11).



Obrázek 11 PoreLogo – struktura PDB ID 1K4C (převzato z [83]).

Dalším softwarem využívajícím této metody je např. HOLE [80].

3.2.1.5 Voroného teselace

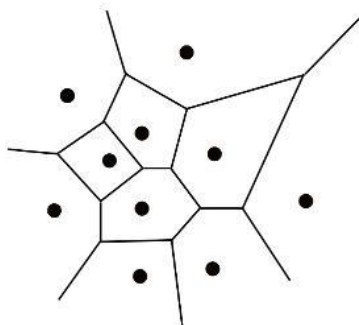
Teselace je proces, pomocí kterého se obecný polygon převádí na nepravidelnou trojúhelníkovou síť. Tato matematická operace byla vyvinuta za účelem zlepšení popisu třídimenzionálních struktur proteinů a dalších molekul. Poprvé byla Voroného teselace a získaný Voroného diagram použit Richardsem v roce 1974 [1].

Voroného teselace mají mnoho využití, obzvláště pak v aplikacích 3D struktur. Mezi tyto aplikace se řadí studie sbalení proteinů, výpočty empirických potenciálů, výpočet kavit a prázdných prostor v proteinech (*voids*). Jako další možnost aplikace je nutno zmínit i molekulárně-dynamické výpočty [72].

3.2.1.5.1 Voroného diagram

Základním prvkem pro sestavení Voroného diagramu je tzv. Voroného buňka (*Voronoi cell*). Kompletní Voroného diagram je pak vystavěn jako soubor těchto buněk. Voroného buňka vzniká tak, že na počátku existuje soustava bodů představujících těžiště objektu a podle počtu těchto bodů je pak Voroného teselace rozdělena do regionů tomuto počtu odpovídajících. Jinými slovy je Voroného buňka mnohostrán, který je jakousi „zónou vlivu“ [72] bodů okolo daného těžiště (Obr. 12).

Voroného diagram tedy rozděluje daný prostor podle vzdáleností mezi diskrétními soubory specifických objektů. Zjednodušeně lze říci, že kdyby každý vrchol Voroného diagramu představoval různě rozmístěné zastávky MHD, pak by Voroného diagram rozděloval prostor na jednotlivé buňky okolo každé zastávky. Pro každou osobu v rámci prostoru této buňky by zastávka představovala nejbližší místo, kde může nastoupit do MHD.

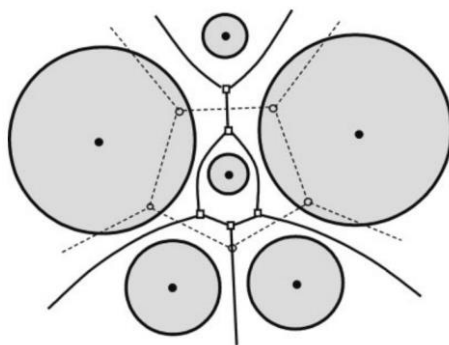


Obrázek 12 Schematické zobrazení Voroného diagramu.

Protože klasický Voroného diagram vykazuje při výpočtech jisté chyby, využívá se tzv. váženého Voroného diagramu, který jim dokáže předcházet. Hlavní chybou, kterou vážený Voroného diagram řeší, je fakt, že klasický Voroného diagram nebere v potaz různé rozměry atomů v proteinu [72]. Na rozdíl od klasického Voroného diagramu nemají všechny atomy struktury stejnou váhu, ale jsou tzv. „vážené.“ Protože se ukázalo, že pro popis „ničeho“ v proteinech je popis atomů pouze na základě jejich atomových center nedostačující, a že je třeba přidat i hodnotu poloměru atomů, začalo se pro jejich reprezentaci v rámci 3D prostoru používat atomových van der Waalových poloměrů.

Vážený Voroného diagram vychází z předpokladu, že klasické mnohoúhelníky Voroného diagramu jsou ve váženém Voroného diagramu nahrazeny tzv. S-regiony. Hlavním rozdílem je způsob výstavby S-regionů oproti klasickým Voroného regionům. Zatímco

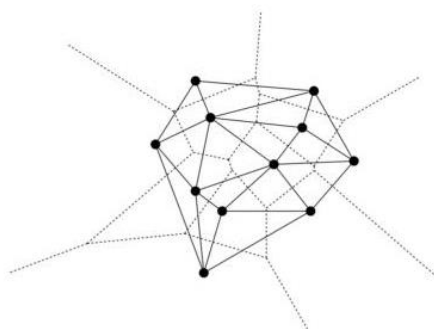
klasický Voroného diagram vychází pouze ze středů atomů, S-regiony využívají navíc povrchy jednotlivých atomů (Obr. 13). Tento rozdíl se také projevuje v tom, že vazby Voroného diagramu jsou vždy rovné čáry, ale vazby S-sítě jsou spojeny křivkami, jejichž tvar vychází z hyperbol či elips [73].



Obrázek 13 Vážený Voroného diagram oproti klasickému Voroného diagramu. Čárkované přímky představují klasický Voroného diagram, kdežto plnými čarami je znázorněn vážený Voroného diagram. Koule representují jednotlivé atomy (převzato z [73]).

3.2.1.5.2 Delauneyho triangulace

Triangulace znamená pokrytí nepřekrývajícími se trojúhelníky. Vztah Delauneyho triangulace a Voroného diagramu je dualita. Pokud spolu dvě Voroného buňky $v(P_i)$ a $v(P_j)$ sousedí, tedy mají společnou hranu, pak pro daný Voroného diagram $\text{Vor}(P)$, získáme Delauneyho triangulaci bodů množiny P s hranou Delauneyho triangulace P_iP_j (Obr. 14) [74].



Obrázek 14 Duální vztah mezi Delauneyho triangulací (tmavé čáry spojující body) a Voroného diagramem (světle šedé čáry kolmé na Delauneyho triangulaci). Obrázek převzat z [68].

Delauneyho triangulaci můžeme s úspěchem využít při konstrukci Voroného diagramu, protože je výpočetně méně náročná.

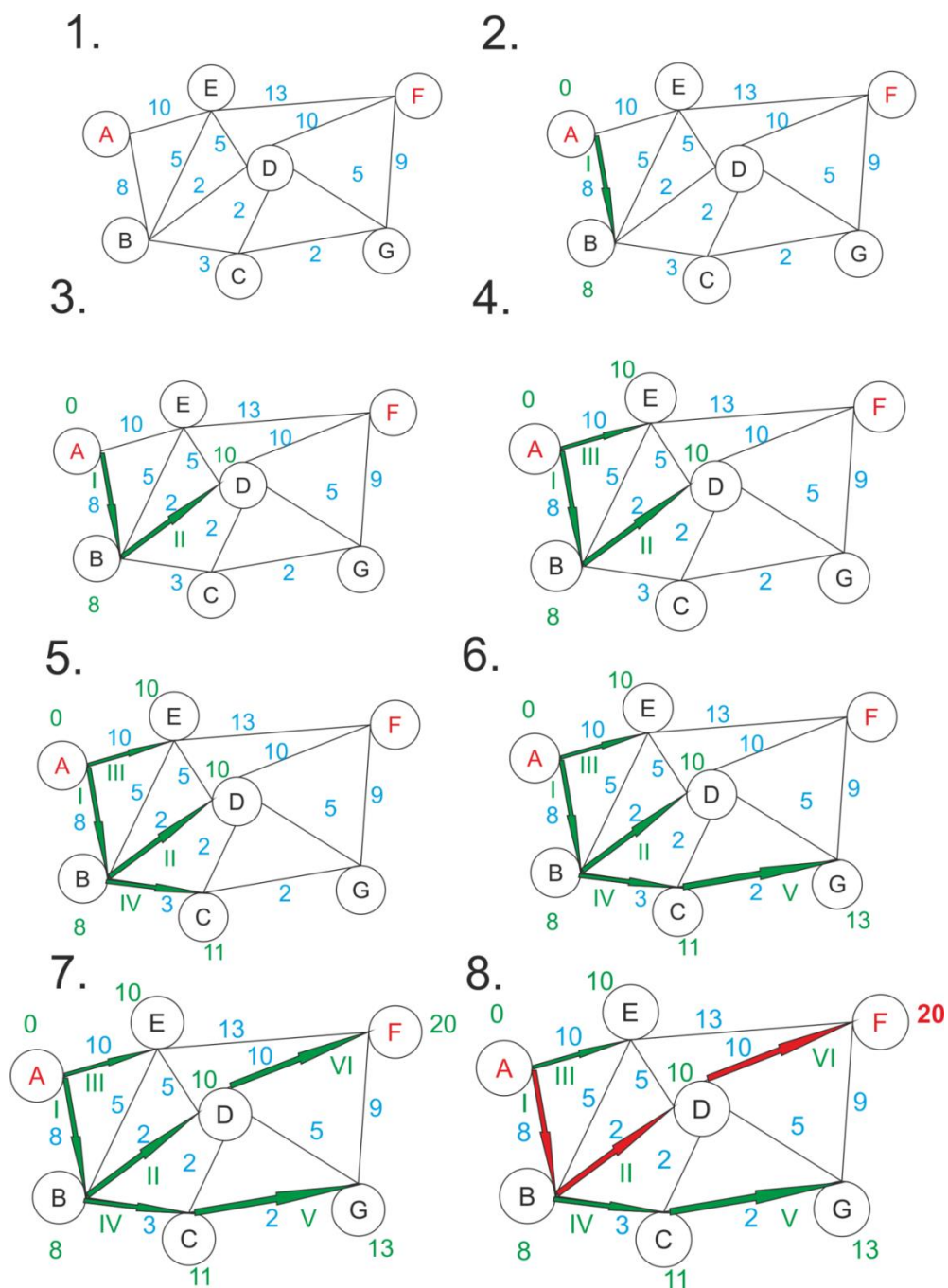
Prvním programem využívajícím Voroného teselaci byl program MOLE 1.0. MOLE je nástupcem programu CAVER. Patří mezi programy využívající pro výpočet „ničeho“ konstrukce Voroného diagramu. Algoritmus pracuje tak, že vytváří Voroného diagram na základě vzdáleností mezi diskrétními množinami center atomů, která jsou zde reprezentována jako van der Waalovy koule. Poloměr těchto koulí je pak odvozen ze silového pole AMBER99 [78]. Voroného buňky jsou zde dány množinou bodů, které jsou nejbližší danému atomu v centru každé buňky. Protože se při konstrukci rozhraní (malé plošky) mezi jednotlivými Voroného buňkami uvažují pouze jednotlivá atomová centra, nebere MOLE v potaz atomové poloměry. Tento problém je však částečně redukován tím, že jednotlivé plošky představují ve Voroného diagramu roviny, což umožňuje, že při konstrukci obecného Voroného diagramu mohou být zahrnuty i rozdíly v atomových poloměrech [79].

Dalším programem využívajícím Voroného teselaci je program MolAxis. Atomy jsou zde převedeny na koule o poloměru, který je shodný s poloměrem nejmenšího atomu této struktury. Pokud jsou centra dvou atomů stejně velké a ve stejné vzdálenosti od atomových povrchů, pak je taková oblast označena jako Voroného hrana. Na základě uživatelem definovaného rozlišení se provádí porovnání rozdílu mezi van der Waalovým povrchem původních atomů proteinu a aproximovanými atomy. Pro správné sestavení Voroného diagramu je nutné, aby tento rozdíl byl menší než nadefinované rozlišení. Pro vygenerování relevantních kanálů MolAxis využívá tzv. „cost funkce“. Tato funkce porovnává jednak délku každé Voroného hrany, tak i vzdálenost mezi dvěma vrcholy hran a jejich nejbližšími atomy. Všechny kanály jsou vypočítány najednou a následně jsou pomocí „cost funkce“ seřazeny podle vynaložené ceny [80].

3.2.1.6 Dijkstrův algoritmus nejkratších cest

Dijkstrův algoritmus byl publikován v roce 1959 nizozemským informatikem Edsgerem Dijkstrou [75] a kromě jiných aplikací je též velmi často využívám v programech zabývajících se výpočtem „ničeho“. Jedná se o tzv. grafový algoritmus. Na počátku je nutno nadefinovat graf, což je dvojice množin (V,E) , přičemž V je množinou vrcholů (*vertices*) a E je pak množinou hran (*edges*). Hran jsou popsány jako dvojice x,y a spadají pod množinu vrcholů V . Cestu mezi dvěma vrcholy grafu pak tvoří soubor vrcholů, které jsou na spojnici počátečního a koncového vrcholu.

Průběh algoritmu vychází z prvotního grafu, v němž jsou všechny hrany ohodnoceny podle vzdáleností mezi jednotlivými vrcholy. Pro každou hranu je pak stanovena hodnota v závislosti na její vzdálenosti od okolních vrcholů. Vrcholy jsou následně rozděleny na ty s trvalým ohodnocením a vrcholy s dočasným ohodnocením. Trvalé ohodnocení pak popisuje výslednou nejkratší cestu, protože jde o nejlepší spojnicí mezi počátečním a koncovým vrcholem (Obr. 15)[74].



Obrázek 15 Schéma průběhu hledání nejkratší cesty pomocí Dijkstrova algoritmu.

3.3 MOLE 2.0

MOLE 2.0 je software určený k hledání kavit, kanálů a pórů v rozličných makromolekulách. Jako nástupce programu MOLE byl vyvinut pracovníky Katedry fyzikální chemie Univerzity Palackého v Olomouci ve spolupráci s týmem z Masarykovy Univerzity v Brně. Tento program je volně dostupný na adrese: <http://mole.chemi.muni.cz>.

MOLE 2.0 [86] jakožto program primárně zaměřený na hledání tunelů, hledá nejkratší možnou cestu, jež spojuje bod zanořený uvnitř molekuly s povrchem dané struktury. Když je tato cesta nalezena, MOLE 2.0 propojí tuto dráhu pomocí spojnice, tzv. *centerline*.

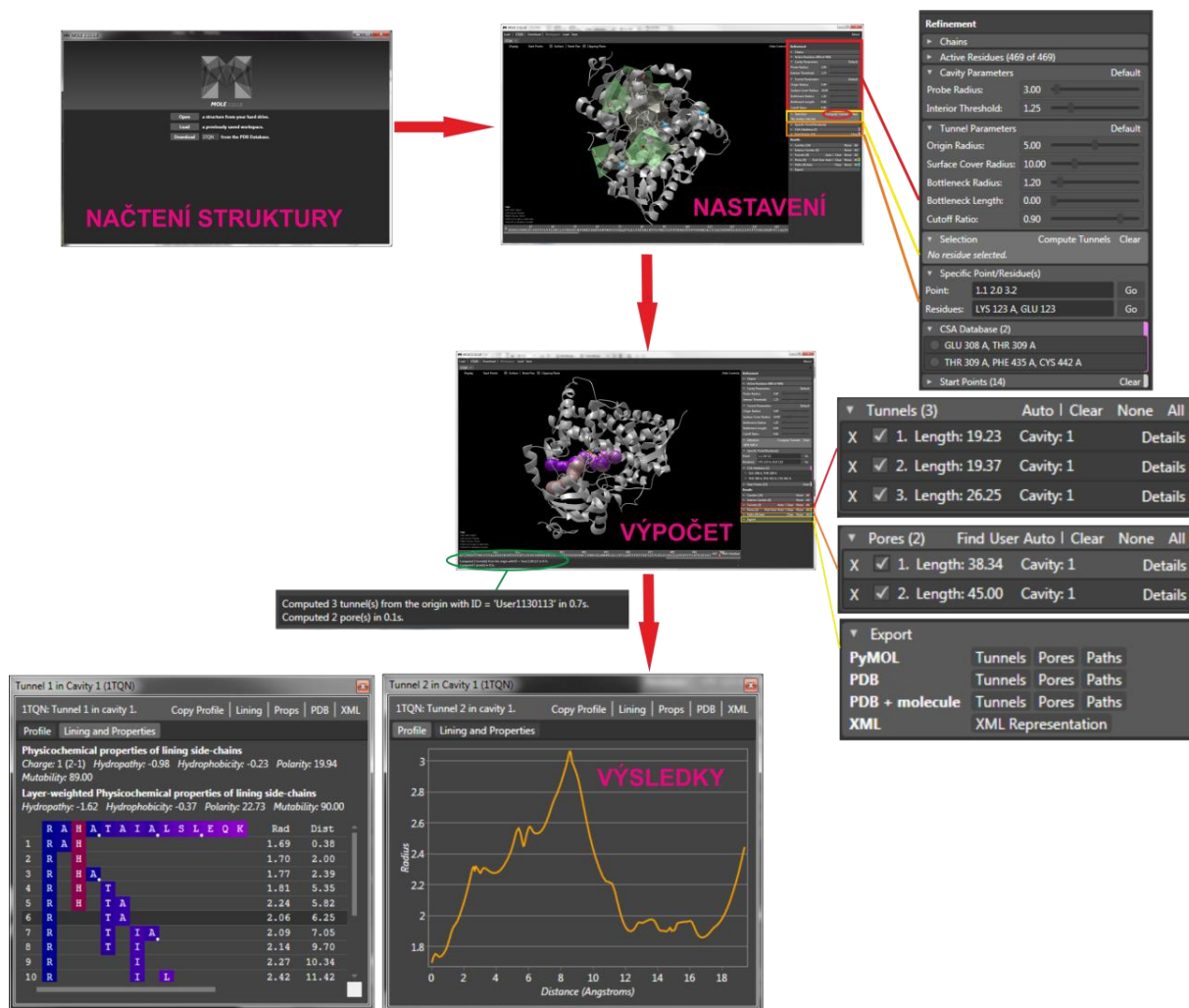
Základem výpočtu v MOLE 2.0 je využití Delauneyho triangulace a Voroného diagramu. Na podobném principu byla postavena i předchozí verze MOLE [87]. MOLE 2.0 využívá váženého Voroného diagramu k sestavení základny pro výpočet tunelů, tzv. diagramy kavit (*cavity diagrams*). Ty jsou pak využity k určení počátečního a konečného bodu kanálu. K samotnému vyhledání tunelů je pak aplikován Dijkstrův algoritmus (*Dijkstra's algorithm*; viz kapitola Dijkstrův algoritmus).

Specialitou MOLE 2.0 oproti jeho předchůdcům je možnost výpočtu fyzikálně-chemických vlastností nalezených kavit, pórů a tunelů. Fyzikálně-chemické vlastnosti jsou zde získávány na základě charakteru aminokyselin, které daný tunel, kavitu či pór obklopují. Tímto způsobem můžeme získat informaci o polaritě, náboji, hydrofobicitě a hydropatii a také o mutabilitě dané struktury. Doplnujícími informacemi jsou pak délka tunelu a poloměr jeho hrdla (*bottleneck*). Získáním těchto charakteristických vlastností můžeme docílit lepšího vhledu do zkoumané struktury a tyto vlastnosti mohou pomoci utvořit přesnější představu o charakteru tunelu, kavity či póru. Nesmírně cennou se tato informace stává v okamžiku, kdy začneme uvažovat např. substrátovou specifitu proteinů, či povahu molekul transportovaných cestou makromolekulárních kanálů.

MOLE 2.0 je možno využívat ve dvou verzích a to jednak verzi desktop neboli Graphical User Interface (GUI), která nabízí grafické uživatelské rozhraní v prostředí OS Windows (Obr. 16), a na straně druhé v tzv. serverové verzi, která je určena spíše pokročilým uživatelům a k práci v systémech typu Linux, Mac a také Windows. Tato verze je vhodná pro zpracování většího množství dat a stojí v pozadí implementace v rámci webového serveru MOLEonline 2.0. Kromě těchto možností je nabízen také plugin pro program PyMOL

3.3.1 GUI

Desktop (GUI) verze je určena k hledání kanálů, kavit a pórů, přičemž umožňuje i jejich okamžitou vizualizaci díky zabudovanému grafickému rozhraní, čímž značně ulehčuje vizuální inspekci výsledků. Panel nástrojů umožňuje snadno a rychle dosáhnout požadovaných výsledků (viz Obr. 16).



Obrázek 16 Postup průběhu výpočtu v MOLE 2.0 GUI.

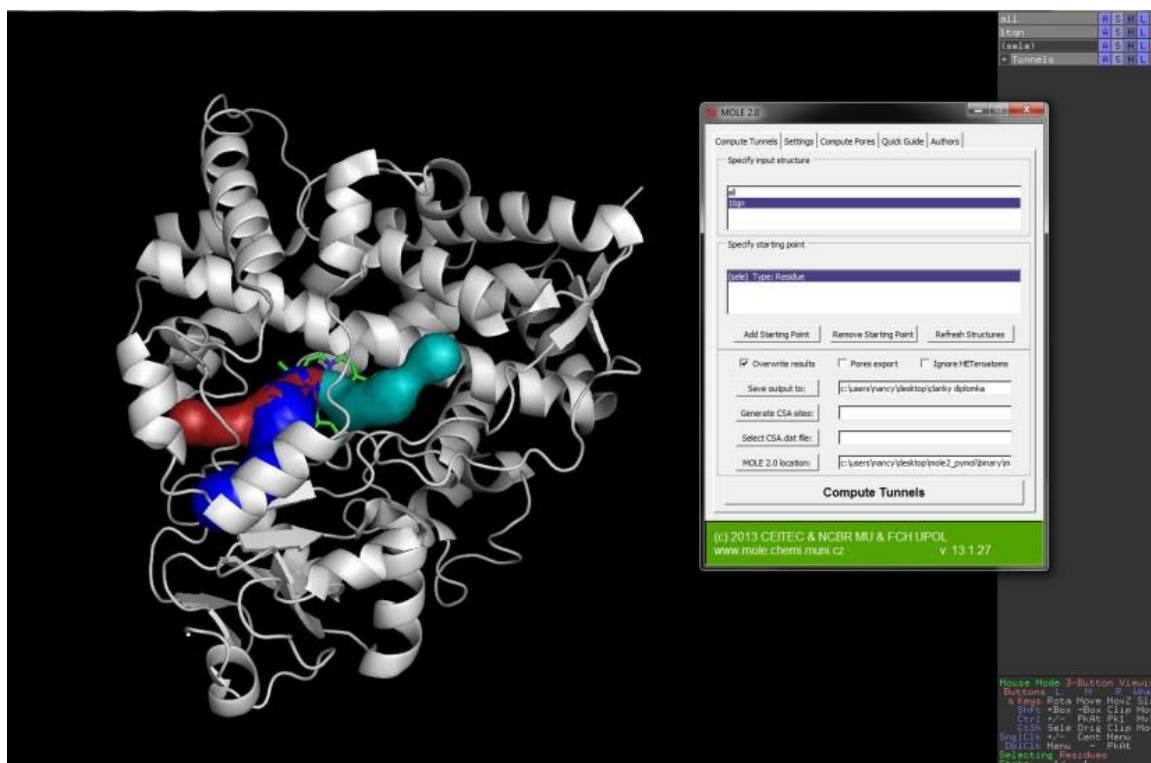
Dále je také k dispozici několik možností exportu výsledných dat. Zároveň zde získáváme informaci o fyzikálně-chemických vlastnostech nalezených útvarů ve formě přehledných tabulek.

3.3.2 Serverová verze

Serverová verze je určena pokročilým uživatelům, znalým alespoň základním zásadám skriptování a práce v prostředí systémů Unix, neboť využívá prostředí příkazové řádky (command-line). Tato verze pracuje pod operačními systémy Linux a Mac nástrojového balíku MONO framework, který je volně ke stažení na <http://www.mono-project.com>. Tato verze umožňuje zapojení MOLE 2.0 do skriptů a tak jej využívat pro rychlé zpracování velkých souborů dat. Tato verze poskytuje výsledky ve XML a PDB souborů. Vygenerované PDB soubory pak umožňují vizuální kontrolu např. v programu PyMol [38].

3.3.3 MOLE 2.0 PyMol plugin

MOLE 2.0 rovněž nabízí implementaci - plugin pro grafický vizualizační software PyMol [38]. Plugin pracuje na stejném principu jako MOLE 2.0. Opět je zde možnost nastavení pokročilých parametrů i volba vlastního počátečního bodu (Obr. 17). Také nabízí hledání pórů a generování fyzikálně-chemických vlastností. Výhodou je okamžitá vizualizace výsledků v programu PyMol a další možnosti úprav, které PyMol umožňuje (např. změna reprezentace lines na cartoon, změna barvy, zobrazení povrchu, apod.).

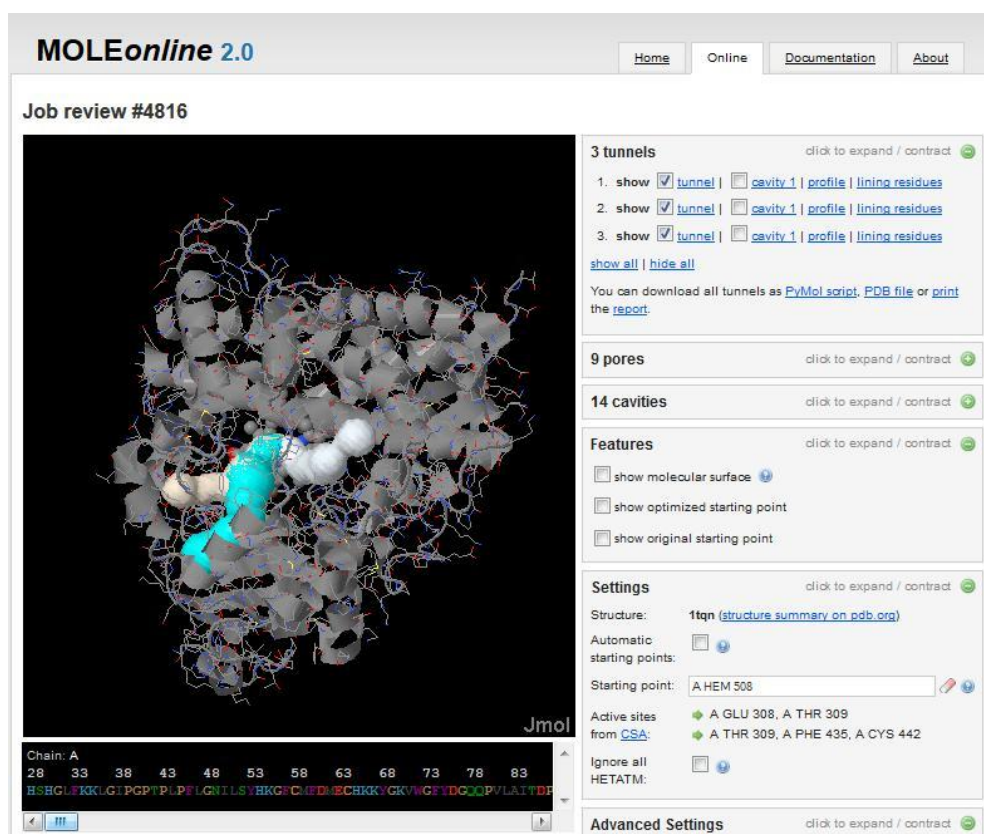


Obrázek 17 Pymol plugin MOLE 2.0.

3.3.4 MOLEonline 2.0

Jedná se o online aplikaci, která používá serverovou implementaci (viz níže) programu MOLE 2.0 k hledání „ničeho“. MOLEonline 2.0 [86] je přístupný na adrese: <http://mole.upol.cz> (Obr. 18). Tato webová aplikace, jejíž fungování se dá shrnout ve třech krocích:

- nastavení* (vlození struktury, nastavení parametrů, etc.)
- vlastní výpočet* (výpočet kavit, kanálů a pórů a jejich fyzikálně-chemických vlastností)
- zobrazení výsledků* (zobrazení nalezených typů „ničeho“, tabulku s popisem fyzikálně-chemických vlastností a vizualizace výsledných dat pomocí aplikace Jmol [92]).

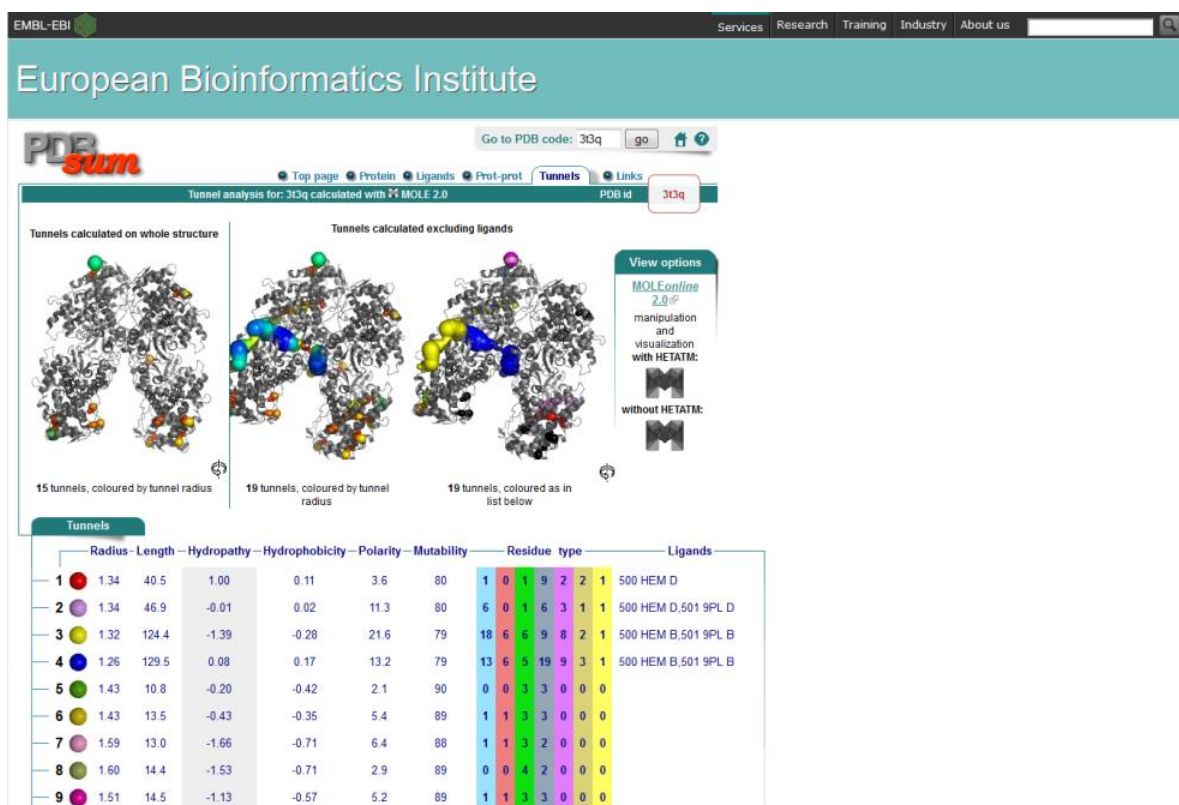


Obrázek 18 MOLEonline 2.0: výsledková část s vizualizací výsledků pomocí aplikace Jmol.

MOLEonline 2.0 je navíc obohacen o možnost vyhledávání startovního residua v databázi známých katalytických míst v proteinech CSA (Catalytic Site Atlas) poskytovaným Evropským Bioinformatickým Institutem (EMBL-EBI) na adrese: http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA_NEW [93].

3.3.4.1 Implementace MOLEonline 2.0 v databázi PDBsum

MOLEonline 2.0 byl v roce 2012 úspěšně implementován do evropské databáze proteinů PDBsum [94-95] provozované EMBL-EBI ve skupině Janet Thornton na adrese <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>. Kanály jsou vypočteny pro každou strukturu v databázi PDBsum, kde je možno si je zobrazit na kartě „Tunnels“ (Obr. 19). Pod obrázkem vypočítaných kanálů dané struktury je vypsán celkový počet nalezených kanálů a dále tabulka s popisem fyzikálně-chemických vlastností podle aminokyselinového složení. V pravém menu, vedle obrázku kanálů je možné nastavit, zda budou kanály vypočítány za přítomnosti heteroatomů, nebo pokud bude zvolena možnost „without HETATM“ nebudou heteroatomy brány při výpočtu v potaz, což se může projevit na počtu výsledných kanálů. Pro detailnější analýzu kanálů je možno přes odkaz, rovněž v tomto menu, přejít přímo na stránky MOLEonline 2.0.



Obrázek 19 Implementace MOLEonline 2.0 do databáze PDBsum. Ukázka tetrameru cytochromu P450 2A6 s pilokarpinem (PDBID: 3T3Q).

3.3.5 Algoritmus MOLE 2.0

Algoritmus výpočtu „ničeho“ v MOLE 2.0 se dá popsat v sedmi krocích:

- a) Výpočet Delauneyho triangulace (Voroného diagramu) atomových center
- b) Sestavení molekulárního povrchu
- c) Popis kavit
- d) Detekce startovních bodů kanálů
- e) Detekce koncových bodů
- f) Nalezení kanálů
- g) Filtrování nalezených kanálů

3.3.5.1 Výpočet „ničeho“ v MOLE 2.0

Výpočet tunelů, kavit a pórů je možno ovlivnit pomocí nastavení hodnot pokročilých parametrů, jež MOLE 2.0 nabízí. Dílčí kroky výpočtu jsou silně ovlivněny jednotlivými parametry. Mezi základní pokročilé parametry řadíme: *Probe radius*, *Interior Threshold*, *Origin Radius* a *Surface Cover Radius*. Pro vysvětlení funkce každého z parametrů si nejprve proberme, jak výpočet probíhá (Obr. 20):

- a) V počáteční fázi je sestaven Delauneyho triangulací diagram, z něhož je díky duálnímu vztahu k Voroného diagramu, sestaven Voroného diagram atomových center dané molekuly. Voroného diagram je vlastně grafem, který má vrcholy společné se středy (opsaných) koulí Delauneyho čtyřstěňů. Hrany Voroného diagramu jsou dány čtyřstěňy, které sdílejí alespoň jednu stranu (pokud dva čtyřstěňy sdílejí strany, vždy sdílejí přesně tři vrcholy).
- b) Dalším bodem je vytvoření molekulárního povrchu jakožto soustavy čtyřstěňů. V tomto bodě také dochází k aproximaci molekulárního povrchu tak, že hraniční čtyřstěňy, které jsou příliš velké, jsou odstraněny. Zde vstupuje do výpočtu parametr *Probe Radius*. Hodnota parametru *Probe Radius* určuje rozměr koule, kterou musí projít čtyřstěň, z něhož je tvořen molekulární povrch. Pokud je čtyřstěň příliš velký a koulí neprojde, pak je vymazán (čtyřstěň T projde koulí S s hodnotou *Probe radius* r , pokud střed C koule S může být umístěn dovnitř čtyřstěňu a vzdálenost od všech vrcholů T je větší nebo rovna součtu r s van der Waalsovým poloměrem atomu

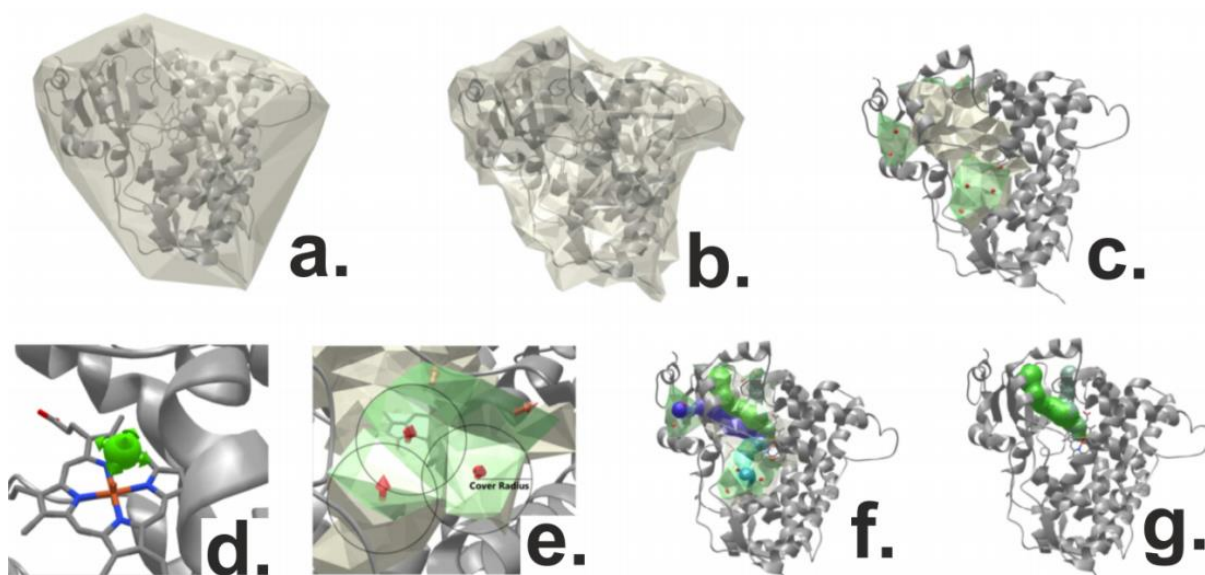
- odpovídajícímu danému vrcholu). Proto, čím menší bude hodnota *Probe Radius*, tím více čtyřstěnů bude odstraněno.
- c) Ve třetí fázi dochází ke hledání kavit a odstranění nejmenších čtyřstěnů. Zde vystupuje další z parametrů, kterým je *Interior Threshold*. Tento parametr působí jako filtr, kterým se odstraní nejmenší čtyřstěny, které ještě zbývají po dokončení druhého kroku výpočtu. Nastavená hodnota *Interior Threshold* odpovídá poloměru koule, kterou musí projít čtyřstěn, aby byl zařazen do výčtu dostatečně velkých čtyřstěnů finálního souboru. Pokud skrz kouli dokáže projít (je příliš malý), pak je vymazán. Ze zbývajících čtyřstěnů je pak sestavena jedna nebo více spojených komponent, přičemž tato komponenta obsahuje alespoň jeden čtyřstěn, který leží na molekulárním povrchu diagramu kavity. Diagram kavity však ještě není přesným popisem reálné kavity, ale slouží pouze ke geometrické reprezentaci a usnadnění výpočtu kanálů.
- d) Po odstranění největších a příliš malých čtyřstěnů, přichází na řadu určení počátečního bodu kanálu, kde figuruje parametr *Origin Radius*. V případě, že je startovní bod zadaný uživatelem, pak algoritmus zkontroluje, zda leží uvnitř prostoru daného parametrem *Origin Radius* (ve vzdálenosti od už specifikovaného bodu) alespoň jedno těžiště tetraedru náležícího kavitě. Pokud v této oblasti není přítomen žádný čtyřstěn, pak v této kavitě není možné nalézt žádný tunel. Tento postup je proveden pro každou nalezenou kavitu.
- e) Pátý krok zahrnuje identifikaci koncových bodů jakožto center hraničních čtyřstěnů. Koncové body jsou určeny na základě nalezení vzdálenosti mezi dvěma body, která odpovídá minimálně zadané hodnotě *Surface Cover Radius*. Tato identifikace probíhá na základě nalezení největšího hraničního čtyřstěnu (ten jediný je označen jako konečný) a odstranění všech okolních čtyřstěnů, které se nacházejí ve vzdálenost dané hodnotou *Surface Cover Radius*. Tento proces je opakován do doby, než jsou odstraněny všechny přebytečné hraniční čtyřstěny.
- f) Ve finální fázi probíhá výpočet tunelů, přičemž je vyhledána nejkratší cesta mezi všemi páry počátečních a koncových bodů (vyskytujících se ve stejné kavitě). Pro tyto účely se zde využívá Dijkstrův algoritmus nejkratších cest, jehož funkci lze popsat pomocí vzorce:

$$w(e) = \frac{l(e)}{d(e)^2 + \varepsilon}$$

kde $l(e)$ představuje délku hrany, $d(e)$ je vzdálenost hrany od van der Waalovy koule nejbližšího atomu, ε je malé číslo dosazené pro předcházení dělení nulou [87]. Každý kanál je zde popsán pomocí souboru čtyřstěňů.

- g) Filtrování kanálů na základě filtrovacích parametrů – *Bottleneck Tolerance*, *Bottleneck Radius* a *MaxTunnelSimilarity*. V jednotlivých krocích výpočtu se vygeneruje vždy větší množství kanálů, přičemž ne všechny jsou dostatečně relevantní (příliš úzké, duplicitní kanály). Z tohoto důvodu obsahuje algoritmus MOLE 2.0 ještě další doplňující parametry určené k odstranění těchto nedostatečně relevantních kanálů. První dva parametry *Bottleneck radius* a *Bottleneck Tolerance*, se zaměřují na šířku hrdla kanálu. Třetí doplňující parametr *MaxTunnelSimilarity* odstraňuje duplicitní kanály. Těmto parametrům se podrobně věnuje kapitola 3.5.4.

Stručně řečeno, MOLE 2.0 nejprve hledá kavity, následně kanály a nakonec póry.



Obrázek 20 Struktura výpočtu „ničeho“ v MOLE 2.0 (molekula cytochromu P450 3A4; PDB id: 1TQN).

3.4 Úprava krystalových struktur cytochromů P450

Všechny krystalové struktury byly podrobeny další úpravě. První z úprav, představovala rozdělení struktur s více řetězcovou strukturou na jednotlivé řetězce. Dále byly z cytochromů odstraněny molekuly krystalové vody a ligandů. Touto úpravou byly získány samostatné řetězce.

V dalším kroku bylo provedeno přeložení všech připravených struktur pomocí strukturního porovnání přes sebe. Tento krok byl nezbytný, jelikož díky němu bylo možné stanovit stejný počáteční bod pro všechny tyto struktury a následně je mezi sebou porovnat. Toto strukturní porovnávání bylo provedeno pomocí programu Pymol 0.99, [38], v němž byla následně provedena i vizuální kontrola kvality přeložení. Strukturou, která posloužila jako vzor (*must*) byla molekula cytochromu P450 3A4 s PDB ID 1TQN.

Cytochromy P450 BM3 a CAM představují zástupce bakteriálních cytochromů P450. Pro účely analýzy kanálů byly vybrány všechny dostupné krystalové struktury CYP (k 13. lednu 2013). Struktury byly získány z RCSB PDB databáze (www.pdb.org) [96]. Pro výpočet tunelů bylo použito 43 struktur CAM a 37 struktur BM3, které byly rozděleny do 54 samostatných řetězců CAM a 80 pro BM3. Samostatné řetězce byly posléze překládány strukturním porovnáním v programu PyMol pro CAM přes strukturu 1AKD a pro BM3 přes strukturu 1BU7. Výčet struktur CAM a BM3 je uveden v Tabulkách SB a SC v sekci Doplňující materiály.

Lidské cytochromy P450 tvoří dnes již rozsáhlou skupinu CYP, jejíž nové krystalové struktury jsou publikovány téměř každý měsíc. Pro účely analýzy kanálů bylo vybráno všech 82 krystalových struktur CYP, které byly dostupné (k 13. lednu 2013). Struktury byly získány z RCSB PDB databáze (www.pdb.org) [96]. Kompletní přehled dostupných struktur lidských cytochromů P450 je uveden v Tabulce SD v Doplňujících materiálech. Pro výpočet tunelů bylo použito 82 struktur lidských CYP, které byly rozděleny do 214 samostatných řetězců.

3.5 Úprava struktur zeolitů

Jako další testovací sada byly použity vybrané struktury zeolitů, jakožto strukturně odlišného materiálu, ve kterém bylo vzhledem k jeho povaze, očekáváno nalezení přístupových cest v podobě pórů. Pro analýzu bylo vybráno pět struktur zastupujících rozdílné

typy geometrie (Obr. 21). Struktury zeolitů byly získány s databáze zeolitů IZA-SC [97]. Počáteční bod nebyl předem zadán, ale kvůli různorodosti struktur zeolitů, bylo použito funkce MOLE 2.0 automatického počátečního bodu.

ABW	ACO	AEI	AEL	AEN	AET	AFG	AFI	AFN	AFO	AFR	AFS
AFT	AFX	AFY	AHT	ANA	APC	APD	AST	ASV	ATN	ATO	ATS
ATT	ATV	AWO	AWW	BCT	*BEA	BEC	BIK	BOF	BOG	BOZ	BPH
BRE	BSV	CAN	CAS	CDO	CFI	CGF	CGS	CHA	-CHI	-CLO	CON
CZP	DAC	DDR	DFO	DFT	DOH	DON	EAB	EDI	EMT	EON	EPI
ERI	ESV	ETR	EUO	EZT	FAR	FAU	FER	FRA	GIS	GIU	GME
GON	GOO	HEU	IFR	IHW	IMF	IRR	ISV	ITE	ITH	ITR	-ITV
ITW	IWR	IWS	IWV	IWW	JBW	JOZ	JRY	JSN	JST	JSW	KFI
LAU	LEV	LIO	-LIT	LOS	LOV	LTA	LTF	LTJ	LTN	LTN	MAR
MAZ	MEI	MEL	MEP	MER	MFI	MFS	MON	MOR	MOZ	*MRE	MSE
MSO	MTF	MTN	MTT	MTW	MVY	MWW	NAB	NAT	NES	NON	NPO
NPT	NSI	OBW	OFF	OSI	OSO	OWE	-PAR	PAU	PCR	PHI	PON
PUN	RHO	-RON	RRO	RSN	RTE	RTH	RUT	RWR	RWY	SAF	SAO
SAS	SAT	SAV	SBE	SBN	SBS	SBT	SFE	SFF	SFG	SFH	SFN
SFO	SFS	*SFV	SGT	SIV	SOD	SOF	SOS	SSF	SSY	STF	STI
*STO	STT	STW	-SVR	SZR	TER	THO	TOL	TON	TSC	TUN	UEI
UFI	UOS	UOZ	USI	UTL	UWY	VET	VFI	VNI	VSV	WEI	-WEN
YUG	ZON										

Obrázek 21 Přehled kódů zeolitů podle jejich geometrie [97].

Před samotným výpočtem kanálů a pórů v zeolitech bylo nutné získané struktury patřičně upravit. Jelikož databáze zeolitů IZA-SC shromažďuje zeolity pouze ve formátu CIF, případně ve formě kartézských souřadnic XYZ, bylo proto nutné převést je do formátu validního pro MOLE 2.0, tedy do formátu PDB. Konverze mezi těmito formáty byla provedena v programu OpenBabel [98].

Další filtrace nalezených pórů, jak tomu bylo u skupin kanálů cytochromů, nebyly u zeolitů provedeny, především z hlediska malého počtu struktur a také proto, že pro póry zeolitů neexistuje nomenklatura podobná nomenklatuře kanálů CYP. Sledovanými parametry pórů byly: délka póru a poloměr jeho hrdla, dále také vzdálenost hrdla od počátečního bodu póru. Protože byly u některých struktur nalezeny póry i autopóry, byly obě tyto skupiny vyhodnoceny zvlášť.

3.6 Parametry výpočtu

Pro všechny výpočty v programu MOLE 2.0 byly použity následující hodnoty pokročilých parametrů:

- Interior Threshold 1.25,
- Origin Radius 3,
- Bottleneck radius 1.25,
- Probe Radius 3,
- Surface Cover Radius 10.

Fyzikálně chemické parametry jsou v Tabulce SA v Doplnujících materiálech

Pro všechny struktury cytochromů P450 byl použit stejný počáteční bod pro výpočet tunelů. Tento bod umístěný v blízkosti hemového kofaktoru, je označen jako tzv. „exact point“ neboli přesný bod, který je dán xyz souřadnicemi: X= -18,5, Y= -21,0, Z= -11,5. Pokud některá struktura obsahovala dva kanály, které byly velice podobné, byl do finálního souboru vybrán vždy jen ten kratší z nich. Delší kanál byl pak označen jako tzv. „duplikát“.

Následně bylo provedeno rozdělení krystalových struktur podle CYP rodin a byla provedena analýza v rámci těchto rodin. Tento krok přinesl možnost porovnání vlastností kanálů vzájemně mezi rodinami a zároveň díky menším strukturním odchylkám byla analýza celkově zpřesněna.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Kanály v systémech P450 CAM a BM3

Cytochromy P450 BM3 a CAM představují zástupce bakteriálních cytochromů P450. Jejich výhodou pro testování software MOLE 2.0 bylo velké množství takřka identických struktur. Cílem bylo provést robustní studie pro software MOLE 2.0 a získat tak dostatečné podklady pro doložení jeho výsledků. Tyto dvě skupiny byly mezi sebou porovnány nejen ze strukturního hlediska, ale i s ohledem na to, které struktury jsou tzv. zavřené či otevřené. Je možno říci, že kanály se objevují hlavně v těch strukturách, které jsou tzv. otevřené. Mezi tyto otevřené struktury patří: 1K2O, 1QMQ a 1RF9.

U struktury CAM bylo nalezeno podstatně menší množství kanálů než v BM3. Celkově se v CAM objevilo 13 kanálů a tři duplikáty (Obr. 22). U struktur BM3 bylo nalezeno celkově 209 kanálů a 26 duplikátů (Obr. 23). Objevuje se zde kanál solventu, vodní kanál a hojně je zastoupena i rodina kanálů 2.

Kanály CAM jsou průměrně kratší než kanály u BM3, což však může být zapříčiněno použitou hodnotou parametru Probe Radius 3. Z pohledu geometrie hrdla jsou však kanály CAM oproti BM3 více otevřené. Maximální hodnota průměrného poloměru hrdla u BM3 je 1,72 Å, kdežto u CAM se objevuje nejširší hrdlo s poloměrem až 2,24 Å. Rovněž kanál solventu je u CAM více otevřen. U BM3 je kanálem s nejširším hrdlem kanál 2b, u CAM se jedná o kanál 2a. (viz Tabulky 1-3)

Kanál vody je u CAM opět kratší než u BM3. Na stranu druhou je hydrofilita kanálů vody u BM3 nižší než u CAM, což platí také pro hodnoty průměrné polarity. Nejpolárnější z kanálů CAM je kanál solventu, jehož index polarity dokonce převyšuje polaritu kanálu vody. Oproti tomu nejméně polárním kanálem CAM je 2a, zatímco u BM3 je to kanál 2f.

Z hlediska indexů hydropatie a hydrofobicity, hydrofobního charakteru nabývají kanály 2d, 2ac a 2c u BM3. U CAM se nejhydrofobnější kanály objevují také u rodiny 2, konkrétně se jedná o kanály 2a a 2f. Tomuto hydrofobnímu charakteru odpovídají i hodnoty polarit daných kanálů zmíněné výše.

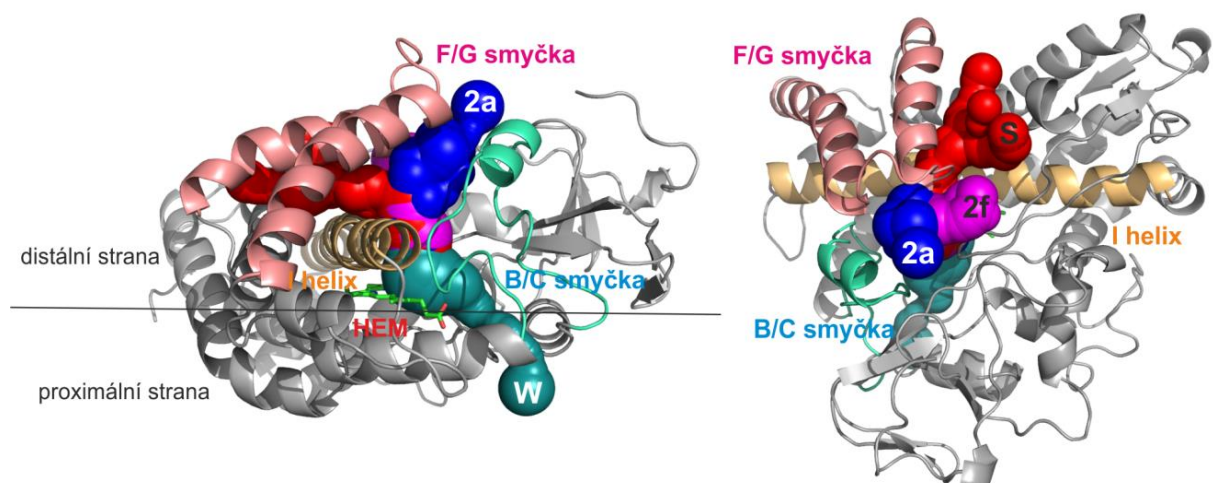
Mutabilita CAM i BM3 je poměrně vysoká, což naznačuje možnost relativně snadné záměny aminokyselin u těchto struktur. Zároveň tyto vysoké hodnoty mutability odpovídají strukturální proměnlivosti mezi jednotlivými zástupci CAM a BM3.

Vlastností s velmi proměnlivým charakterem je vzdálenost hrdla od počátečního bodu kanálu. Tato vlastnost se doslova mění struktury od struktury, proto je velice variabilní a díky tomu i velice citlivá. Tuto vlastnost je tudíž nutno brát s ohledem na tyto faktory.

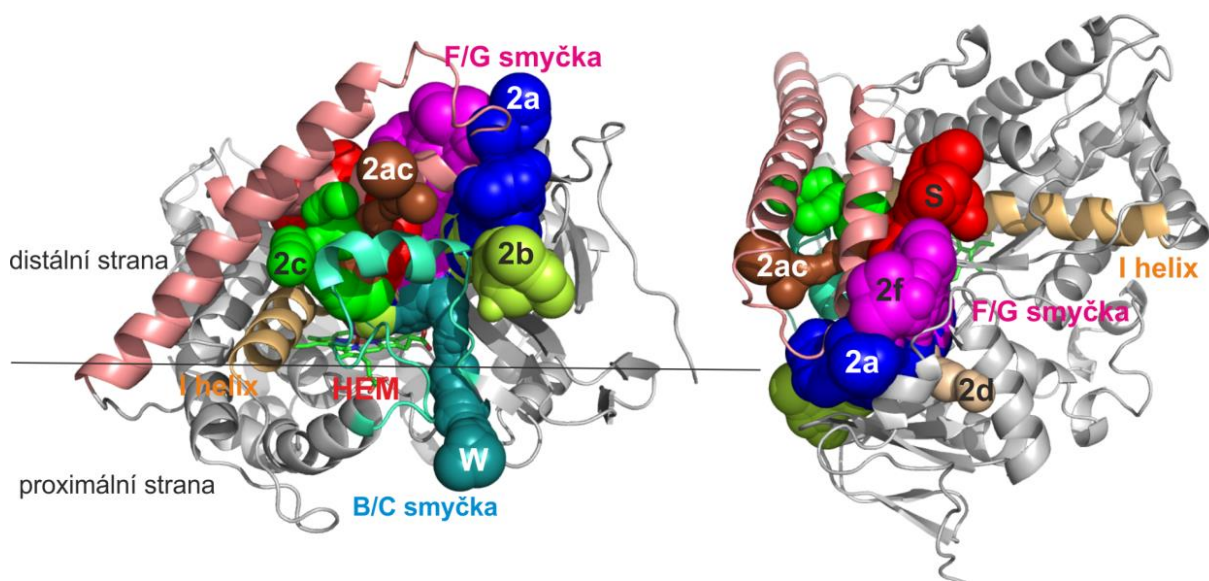
Celkově lze říci, že fyzikálně-chemické vlastnosti kanálů BM3 a CAM se průměrně liší v méně než dvaceti procentech [4].

Tabulka 1 Srovnání fyzikálně-chemických vlastností kanálů cytochromů P450 CAM. U jednotlivých vlastností je vždy uvedena směrodatná odchylka.

CAM	S	W	2a	2f
Počet kanálů + Duplikáty	4 + 3	3 + 0	4 + 0	2 + 0
Délka [Å]	27,2 ± 1,7	25,1 ± 1,6	17,2 ± 4,2	19,1 ± 3,2
Min - Max	24,8 – 28,9	23,5 – 26,7	13,5 – 23,1	16,8 – 21,4
Hrdlo	1,50 ± 0,38	1,16 ± 0,09	2,24 ± 0,55	2,17 ± 0,15
Min - Max	1,16 – 1,94	1,06 – 1,24	1,43 – 2,63	2,06 – 2,27
Náboj	-1,5 ± 0,6	0,7 ± 0,6	-0,3 ± 0,5	1,0 ± 0,0
Min - Max	-2 – -1	0 – 1	-1 – 0	1 – 1
Index hydropatie	0,07 ± 0,58	-0,72 ± 0,35	1,88 ± 0,26	1,20 ± 0,36
Min - Max	-0,45 – 0,90	-1,00 – -0,33	1,62 – 2,19	0,94 – 1,45
Index hydrofobicity	-0,02 ± 0,16	-0,25 ± 0,08	0,67 ± 0,11	0,31 ± 0,07
Min - Max	-0,14 – 0,22	-0,32 – -0,16	0,52 – 0,77	0,26 – 0,36
Polarita	17,8 ± 3,8	14,1 ± 2,1	1,7 ± 1,4	4,8 ± 3,3
Min - Max	12,6 – 21,8	11,8 – 16,0	0,9 – 3,7	2,5 – 7,1
Mutabilita	83,8 ± 1,0	83,7 ± 1,5	78,3 ± 2,2	82,5 ± 3,5
Min - Max	83 – 85	82 – 85	76 – 81	80 – 85
Vzdálenost hrdla od poč. bodu [Å]	21,1 ± 5,2	15,7 ± 1,5	15,2 ± 3,4	18,5 ± 3,8
Min - Max	13,4 – 24,0	14,1 – 17,1	12,1 – 19,9	15,9 – 21,2



Obrázek 22 Kanály ve strukturách CAM. Struktura je zobrazena v reprezentaci cartoon. Kanály jsou označeny následovně: kanál solventu – červeně, 2f – fialově, 2a – tmavě modrá, kanál vody – tyrkysová. Důležité sekundární strukturální prvky jsou také vyznačeny barevně: F/G smyčka a F, G helixy – růžová, B/C smyčka – modrozelená, I helix – světle oranžová.



Obrázek 23 Kanály ve strukturách BM3. Struktura je zobrazena v reprezentaci cartoon. Kanály jsou označeny následovně: kanál solventu – červeně, 2f – fialově, 2a – tmavě modrá, kanál vody – tyrkysová, 2b – žlutozelená, 2c – hráškově zelená, 2d – béžová, 2ac – hnědá. Důležité sekundární strukturální prvky jsou také vyznačeny barevně: F/G smyčka a F, G helixy – růžová, B/C smyčka – modrozelená, I helix – světle oranžová.

Tabulka 2 Vlastnosti kanálů solventu a vody ve strukturách BM3. U jednotlivých vlastností je vždy uvedena směrodatná odchylka.

BM3	S	W
Počet kanálů + Duplikáty	32 + 6	38 + 1
Délka [Å]	19,7 ± 3,5	31,4 ± 2,8
Min - Max	11,6 – 27	26,9 – 38
Hrdlo [Å]	1,42 ± 0,19	1,17 ± 0,04
Min - Max	1,07 – 1,77	1,11 – 1,29
Náboj	-0,7 ± 0,7	0,5 ± 0,5
Min - Max	-2 – 1	0 – 1
Index hydropatie	0,59 ± 0,44	-0,21 ± 0,36
Min - Max	-0,15 – 1,63	-1,08 – 0,43
Index hydrofobicity	0,00 ± 0,19	-0,22 ± 0,09
Min - Max	-0,26 – 0,5	-0,44 – -0,06
Polarita	9,4 ± 3,2	12,8 ± 2,7
Min - Max	4,2 – 18	8,6 – 19,2
Mutabilita	84,9 ± 2,7	81,5 ± 2,1
Min - Max	81 – 93	76 – 86
Vzdálenost hrdla od poč. bodu [Å]	11,6 ± 2,9	18,3 ± 3,3
Min - Max	6,2 – 17,1	13,7 – 32,7

Tabulka 3 Vlastnosti kanálů rodiny 2 ve strukturách BM3. U jednotlivých vlastností je vždy uvedena směrodatná odchylka.

BM3	2a	2b	2c	2ac	2d	2f
Počet kanálů + Duplikáty	27 + 6	63 + 3	3 + 0	2 + 0	3 + 4	41 + 6
Délka [Å]	30,2 ± 4,8	23,8 ± 8,4	25,1 ± 3,2	31 ± 5,8	30 ± 3,5	28,7 ± 4,4
Min - Max	14,9 – 36,9	7,2 – 34,2	22,6 – 28,7	27 – 35	26 – 32,5	17,7 – 37,2
Hrdlo [Å]	1,59 ± 0,37	1,72 ± 0,26	1,3 ± 0,03	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,05	1,67 ± 0,31
Min - Max	1,04 – 2,39	1,18 – 2,55	1,27 – 1,33	1 – 1,2	1,5 – 1,6	1,04 – 2,39
Náboj	0,9 ± 0,5	0,4 ± 0,6	-0,3 ± 1,2	0,5 ± 0,7	0 ± 1	-0,4 ± 0,7
Min - Max	-1 – 2	-1 – 2	-1 – 1	0 – 1	-1 – 1	-2 – 1
Index hydropatie	1,11 ± 0,33	0,79 ± 0,65	1,83 ± 0,71	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,04 ± 0,41
Min - Max	0,07 – 1,7	-0,37 – 2,13	1,31 – 2,64	1,7 – 1,9	1,8 – 2,03	-0,08 – 1,72
Index hydrofobicity	0,29 ± 0,11	0,13 ± 0,14	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0	0,6 ± 0,04	0,19 ± 0,15
Min - Max	-0,01 – 0,54	-0,2 – 0,4	0,35 – 0,93	0,5 – 0,6	0,6 – 0,63	-0,11 – 0,45
Polarita	3,8 ± 1,6	5,2 ± 3,4	3,8 ± 2,7	4,5 ± 1,3	2,2 ± 1,3	2 ± 1,2
Min - Max	1,2 – 8,6	0,7 – 12,2	1,1 – 6,5	3,6 – 5,4	0,8 – 3,4	0,9 – 5,6
Mutabilita	78,7 ± 3,3	83,9 ± 3,3	84,7 ± 7,2	74 ± 2,1	75 ± 0,6	81,5 ± 3,4
Min - Max	73 – 86	71 – 92	80 – 93	72 – 75	75 – 76	77 – 88
Vzdálenost hrdla od poč. bodu [Å]	18,9 ± 11,8	14,4 ± 11,2	18,9 ± 2,5	22 ± 4,1	28 ± 3,7	14,8 ± 10,6
Min - Max	3 – 33	1,8 – 30,6	17 – 21,8	19 – 25	24 – 30,7	1,6 – 30,4

4.2 Lidské cytochromy P450

Dále byla zvolena řada lidských cytochromů P450 a to z důvodů značné podobnosti sekundárních strukturních prvků krystalových struktur v rámci jednotlivých rodin této skupiny enzymů. Díky poměrně velkým strukturním rozdílům byly následně porovnávány nalezené tunely v rámci rodin cytochromů P450. Cytochromy P450 obsahují mnoho isoform. V této práci bylo zahrnuto 19 isoform, u nichž byly nalezeny kanály. Následně byly sledovány rozdíly v distribuci kanálů mezi jednotlivými rodinami cytochromů P450 a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti.

4.2.1 Celkové vlastnosti kanálů lidských cytochromů P450

V této části byla provedena analýza všech nalezených kanálů všech rodin cytochromů P450 (neboli CYP). Jsou zde rozebrány z pohledu jejich fyzikálně-chemických vlastností, geometrie a typy rodin přítomných kanálů. V celém souboru skládajícím se z 82 struktur lidských CYP bylo nalezeno 245 kanálů a 15 duplikátů (Obr. 24).

Nejvíce kanálů bylo nalezeno u 2b a kanálu solventu, jež tvořily 19 % ze všech nalezených kanálů. Nejméně jsou zastoupeny kanály rodiny 3 (~2,9 %), 4 (~2,5 %), 2ac (~2,0 %) a konečně rodina kanálů 1, pro niž byl nalezen pouze jeden kanál (CYP 8A1; 3B6H). Struktury lidských cytochromů P450 neobsahují rodinu kanálu 2d. Všechny ostatní rodiny kanálů jsou zde však ve větší či menší míře zastoupeny.

Z hlediska délky kanálů se zde jako nejdelší objevuje kanál 5 následovaný kanálem 3. Tyto kanály jsou podle snižující se délky následovány kanály rodiny 1, 4, 2a, 2ac, 2f, vodním kanálem a kanálem solventu až nejkratšímu druhému kanálu solventu S2.

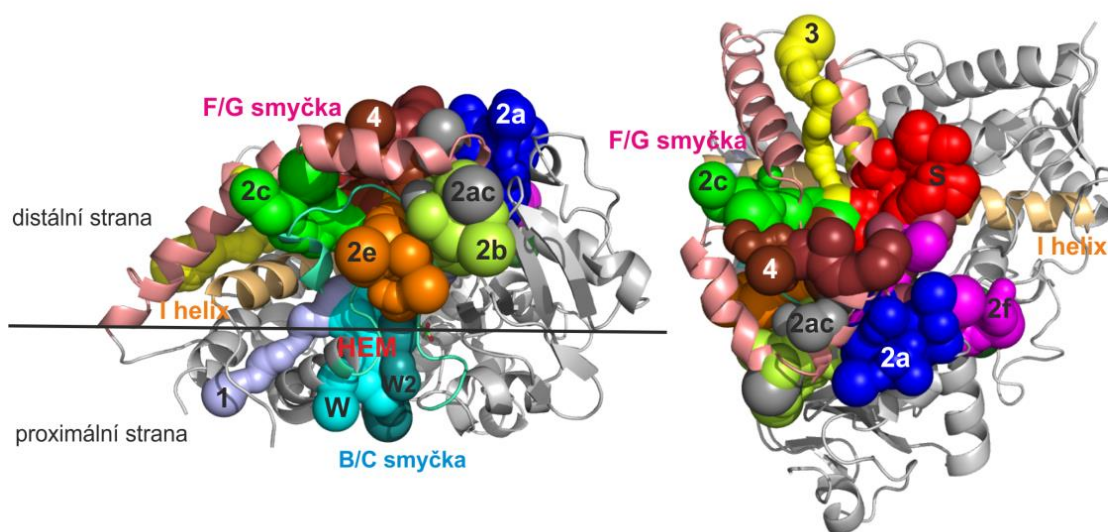
Hrdlo kanálu hraje ústřední roli v určení, zda kanálem vůbec může procházet molekula o určité velikosti. Příliš úzké hrdlo v podstatě zavírá kanál a neumožní tak např. molekule substrátu projít kanálem do aktivního místa. U lidských CYP se poloměr hrdla pohybuje v rozmezí od 1,28 do 1,79 Å. Nejširší hrdlo mezi lidskými CYP představují kanály rodiny 2 a kanály solventu. Naopak nejúžším hrdlem se vyznačují kanály rodiny 1. Kanály 3, 4, 5, S, S2, W, a všechny nalezené kanály rodiny 2 mají hrdlo, které umožňuje průchod molekulám vody, případně menším substrátům (>1,4 Å). Lidské CYP však již nejsou tak otevřené jako kanály rodiny 2 nalezené u bakteriálních CAM či BM3.

Podle průměrného náboje kanálů lze říci, že záporný náboj upřednostňují kanály solventu, 1, 3, a 5. Kladný náboj naopak vyhledává vodní kanál, rodina 4 a všechny kanály rodiny 2. U kanálů 2b, 2c a 2f se průměrně jeví jako elektroneutrální, nicméně díky variabilitě jednotlivých struktur CYP tento charakter nelze jednoznačně považovat za pravidlo.

Indexy hydropatie a hydrofobicity naznačují, že nejhydrofilnější jsou kanály rodiny 1 a kanál vody. Hydrofilní charakter je podpořen rovněž nejvyššími hodnotami polaritativity u těchto kanálů. Naopak nejhydrofobnějším kanálem je kanál 4, který je následován kanály 2ac, 2a, 3 a 2f.

Index mutability naznačuje, že největší sklony ke změnám aminokyselinového složení mají kanály 5 a S2. Nejnižší hodnota mutability se objevuje u kanálu rodiny 1.

Vzdálenost hrdla od počátečního bodu je podobně jako u předchozích CAM a BM3 poměrně variabilní. Tento fakt však vychází z proměnlivosti struktur dokonce i v rámci jednotlivých rodin CYP, jak dokazují výsledky analýzy kanálů rodin lidských CYP (níže).



Obrázek 24 Přehled kanálů nalezených ve všech analyzovaných lidských CYP, rodiny kanálů jsou členěny podle barev následujícím způsobem: kanál solventu (S) – červená, 2f – fialová, 2a – tmavě modrá, 2ac – šedá, kanál 4 – hnědá, kanál 3 – žlutá, 2b – limetková, 2c – hráškově zelená, 2e – oranžová, kanál vody – světle modrá, kanál vody 2 (W2) – tmavě zelená, kanál 1 – světle fialová. Kanály jsou zobrazeny na struktuře s PDB id 1TQN, která je zobrazena v reprezentaci cartoon, hem je zobrazen jako zelené tyčinky. Důležité sekundární strukturní prvky jsou vyznačeny barevně: F/G smyčka a F, G helixy – růžová, B/C smyčka – modrozelená, I helix – světle oranžová.

4.2.2 Porovnání kanálů rodin lidských CYP

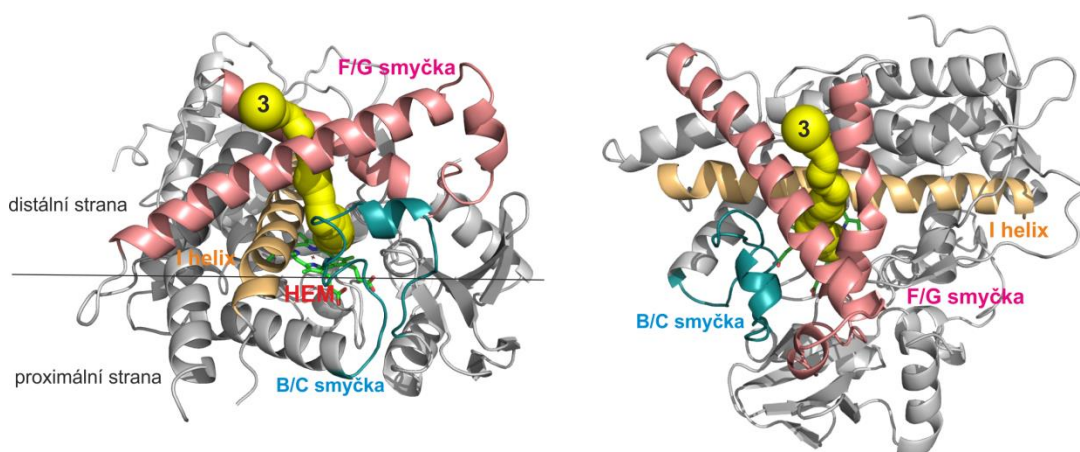
Dále byla provedena analýza jednotlivých rodin lidských CYP, které byly mezi sebou vzájemně porovnány. Bylo zde zpracováno 19 rodin lidských cytochromů P450. Celkově bylo nalezeno 245 kanálů a dalších 15 tzv. duplikátů. Jako duplikáty byly označeny kanály, které tvarově kopírují jiný kanál, ale nedosahují jeho kvalit z hlediska fyzikálně-chemických a geometrických vlastností, proto nejsou mezi výsledné kanály započítány. Následně bylo provedeno rozdělení krystalových struktur podle rodiny CYP, do níž náležely, a byla provedena analýza v rámci těchto rodin. Tento krok přinesl možnost porovnání vlastností kanálů vzájemně mezi těmito rodinami a zároveň díky menším strukturálním odchylkám byla analýza celkově zpřesněna. Protože variabilita jednotlivých fyzikálně-chemických vlastností byla probrána již na tabulce celkových výsledků, budou u jednotlivých rodin CYP probrány detailně spíše vzácné vlastnosti specifické pro danou rodinu.

4.2.2.1 CYP 1A2

Rodina 1A2 je zastoupena strukturou 2HI4. U této struktury však žádné kanály nebyly nalezeny.

4.2.2.2 CYP 1B1

Tato rodina je zastoupena také pouze jednou strukturou a to 3PM0. V této struktuře byl nalezen jeden kanál (Obr. 25). Jedná se o kanál rodiny 3 s poměrně širokým hrdlem. Vyznačuje se záporným nábojem a nepříliš vysokou polaritou.



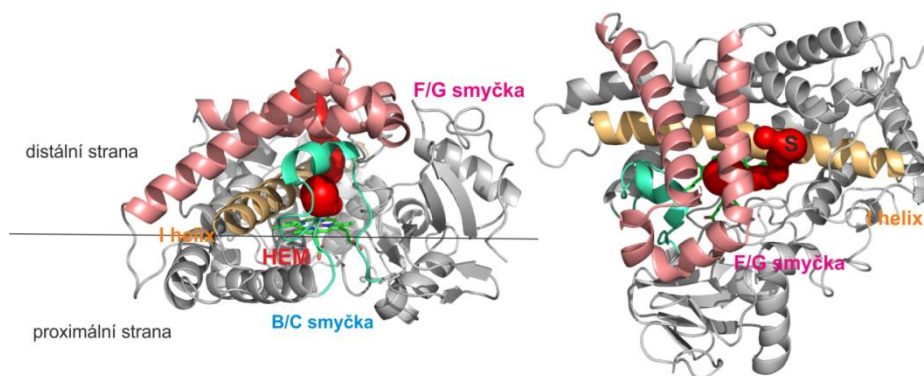
Obrázek 25 Kanál struktury CYP 1B1, struktura 3PM0.

4.2.2.3 CYP 2Ax

Rodina 2Ax obsahuje podrodiny 2A6 (13 krystalových struktur) a 2A13 (5 krystalových struktur). Tyto struktury jsou však značně uzavřené, což dokazuje velmi malý počet nalezených kanálů. U struktury 2A6 byl nalezen pouze jeden kanál, u struktury 2A3 jich bylo nalezeno pět. Níže jsou obě podrodiny popsány samostatně.

4.2.2.3.1 CYP 2A6

Tato rodina je zastoupena pouze jediným nalezeným kanálem, jímž je kanál solventu ve struktuře 3T3R (Obr. 26). Žádné duplikáty nebyly nalezeny.

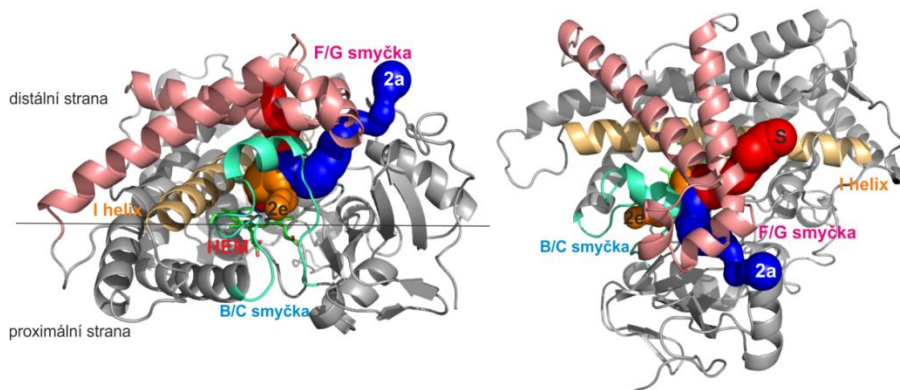


Obrázek 26 Kanál struktur CYP 2A6, struktura 3T3R.

Tento kanál solventu má poměrně široké hrdlo, a vyšší hodnotu polarity a nízký index hydrofobicity a hydropatie.

4.2.2.3.2 CYP 2A13

Rodina 2A13 sestává z pěti krystalových struktur, jmenovitě: 2P85, 3T3S, 4EJG, 4EJH, 4EJI. Zastoupení kanálů je zde však velmi malé, protože v některých strukturách se neotevírají vůbec žádné kanály. Kanály tedy byly nalezeny pouze ve strukturách 4EJH a 4EJG. Celkově bylo nalezeno 5 kanálů a jeden duplikát (Obr. 27).

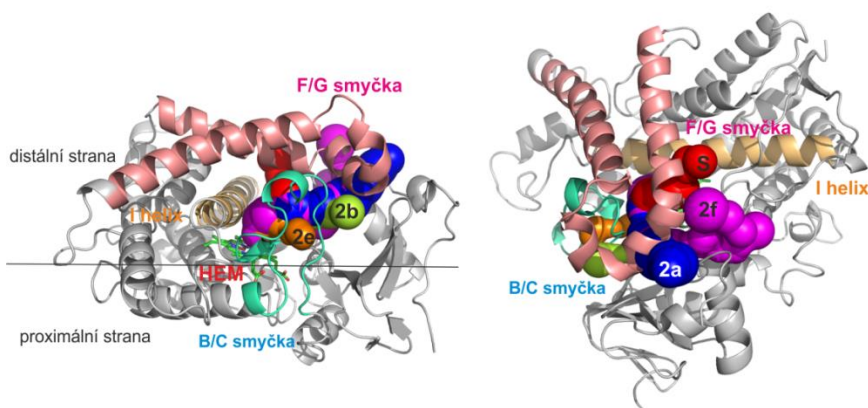


Obrázek 27 Kanály struktur CYP 2A13, struktura 4EJG.

Nejvíce je zde zastoupen kanál solventu, který se objevuje ve třech případech. Tento kanál je také nejvíce otevřený a jeho náboj se může pohybovat v rozmezí od -1 do 1. Hodnota hydropatie a hydrofobicity tohoto kanálu převyšuje ostatní kanály a nabývá tak částečně hydrofobního charakteru. Nejpolarnější je kanál 2e, za nímž následuje kanál solventu. Variabilita polarity je značná a lze ji opodstatnit rozdíly mezi krystalovými strukturami i v rámci jednotlivých řetězců. Kanál 2a byl nejdelší ze všech nalezených kanálů. Jeho polarita je ovšem nejnižší.

4.2.2.4 CYP 2B6

Rodina 2B6 se skládá ze čtyř krystalových struktur s kódy: 3IBD, 3QOA, 3QU8 a 3UA5. Objevují se zde kanály solventu i rodiny 2, konkrétně 2a, 2b, 2e a 2f. Celkové množství nalezených kanálů bylo 12 a k tomu jeden duplikát. Nejvíce zastoupeny jsou kanály 2f, které se objevily ve všech krystalových strukturách (Obr. 28).

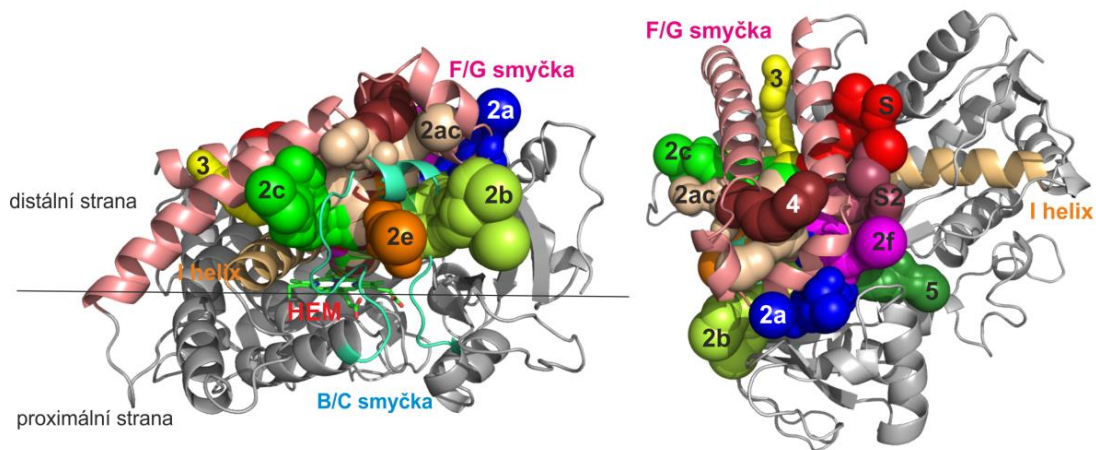


Obrázek 28 Kanály struktur CYP 2B6, struktura 3IBD

Kanály 2f mají spíš hydrofobní charakter a jsou obvykle záporně nabitě. Oproti jiným kanálům však 2f nemají příliš široké hrdlo. Průměrný poloměr hrdla 2f činí $1,34 \pm 0,15 \text{ \AA}$. Naopak nejširší hrdlo se vyskytuje u kanálu 2a ($2,29 \pm 0,04 \text{ \AA}$) a následně u kanálu solventu ($2,19 \pm 0,01 \text{ \AA}$). Kanály solventu a 2a se však otevírají pouze u struktury 3UA5. Velmi neobvyklá je hydrofobní povaha kanálu solventu doplněná i velmi nízkou polaritou těchto kanálů. Celkově mají všechny nalezené kanály u 2B6 značně hydrofobní charakter rozdílný od ostatních rodin CYP, jelikož jejich indexy hydropatie a hydrofobicity jsou výrazně vyšší. Kanál solventu je zde také elektroneutrální. Kanály 2a, 2b a 2e preferují kladný náboj kdežto u 2f se objevují i záporně nabitě kanály. Nejpolárnější je kanál 2b, jehož indexy hydropatie a hydrofobicity jsou rovněž nejnižší.

4.2.2.5 CYP 2Cx

Rodina 2Cx se skládá ze tří podrodin 2C8, 2C9 a 2C19. Rodina 2C8 sestává z pěti struktur: 1PQ2, 2NNH, 2NNI, 2NNJ, 2VN0. Rodina 2C9 je zastoupena třemi krystalovými strukturami: 1OG2, 1OG5 a 1R90. CYP 2C19 reprezentuje jedna struktura, kterou je 4GQS. Celkově bylo do analýzy 2Cx zahrnuto devět krystalových struktur.



Obrázek 29 Kanály struktur CYP 2Cx, struktura 1OG2.

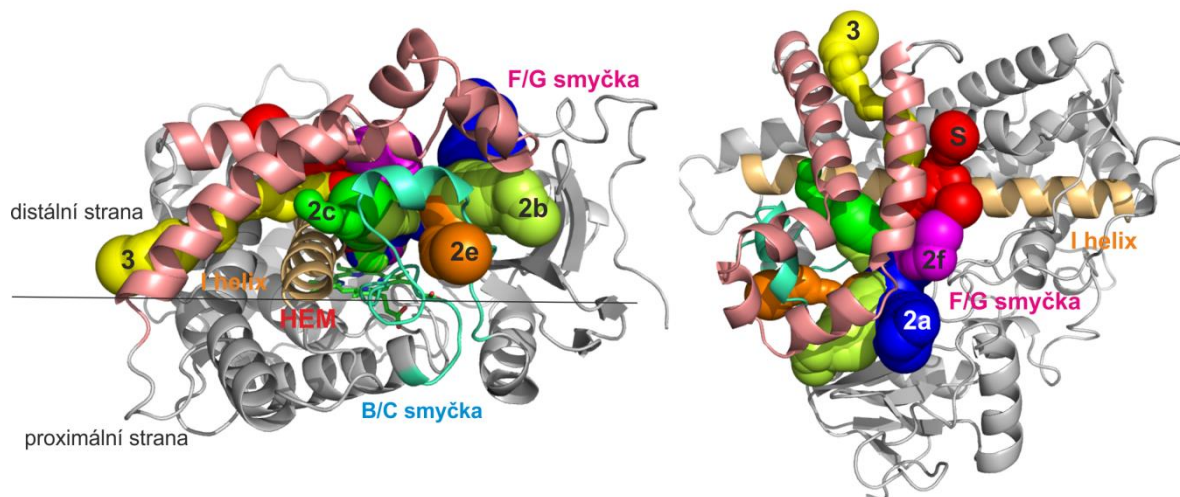
U 2Cx byly nalezeny kanály jedenácti typů: 2a, 2b, 2c, 2ac, 2e, 2f, kanály solventu a dále kanály rodin 3, 4 a 5. Bylo nalezeno 61 kanálů a dva duplikáty (Obr. 29). CYP 2Cx se vyznačují výskytem vzácných kanálů 2ac, který se objevila u všech tří podrodin. Další specifickou záležitostí 2Cx je přítomnost druhého kanálu solventu označeného jako S2. Tyto kanály se objevují jako druhá větve klasických kanálů solventu, ale většinou jsou kratší a

mohou se lišit i fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Nejvíce je zde zastoupena skupina kanálů 2c. Tyto kanály jsou rovněž nejpolarnější a mají jednu z nejnižších hodnot hydrofobického indexu. Druhé nejpolarnější jsou kanály solventu, a to, jak klasický solvent - S, tak druhotný - S2. Nejhydrofobnější kanál spadá do rodiny 4 s hodnotou hydrofobie $2,44 \pm 0,02$. Kanál 4 je následován kanálem 2ac s hodnotou hydrofobického indexu $2,18 \pm 0,38$. Kanály S2 se objevují ve strukturách 1OG2, 1OG5, 1R9O a 4GQS. Jedná se o nejkratší nalezené kanály s průměrnou délkou pouze $16,3 \pm 3,1$ Å. Hrdlo S2 je širší než u klasického solventu a hodnoty indexů hydrofobie, hydrofobicity a polaritativy jsou zde také poněkud vyšší. Z hlediska hydrofobie se S2 již spíše příkloní k hydrofobnímu charakteru kanálů.

Kanály 2ac jsou přítomny pouze u struktur 1R9O, 2NNH a 4GQS. Jsou tedy hydrofobní a jejich náboj se pohybuje v kladných hodnotách. Nejširší hrdlo představují kanály 2b s průměrnou hodnotou poloměru hrdla $2,00 \pm 0,24$ Å. Naopak nejužší hrdlo je přítomno u kanálu 3. Jako zcela elektroneutrální se jeví kanály 2a, kde všech šest nalezených kanálů mělo nulovou hodnotu náboje. 2a se objevil u struktur 1PQ2, 2VN0 a 4GQS. U ostatních kanálů 2Cx se vyskytuje určitá nábojová variabilita daná odchylkami mezi jednotlivými strukturami. U kanálů 2a se objevuje nejnižší průměrná hodnota polaritativy $1,15 \pm 0,12$. Nejdelšími kanály s průměrnou hodnotou délky přes 30 Å se vyznačují rodiny 4 a 5 a 2f. Kanály rodiny 5 jsou polarnější a mírně hydrofilnější oproti rodině 4. Průměrným nábojem se tyto dvě skupiny také liší, protože rodina 5 vykazuje negativní náboj, kdežto rodina 4 upřednostňuje kladné hodnoty náboje. Kanály 2f se vyznačují nízkou polaritativou, ale oproti rodinám 4 a 5 mají díky nižšímu hydrofobickému a hydrofobickému indexu spíše hydrofilní charakter. Struktura rodiny 2C9 1R9O je poněkud atypická, díky strukturální odchylce způsobené chybějící F/G smyčkou. Vyskytují se zde kanály typu 2e, které se v ostatních strukturách podrodiny 2C9 neobjevují. Zbylé dva kanály typu 2e byly nalezeny ve strukturách podrodiny 2C8, tedy u struktur 1PQ2 a 2VN0.

4.2.2.6 CYP 2D6

Rodina 2D6 je zastoupena čtyřmi krystalovými strukturami: 2F9Q, 3QM4, 3TBG, 3TDA. Celkový počet nalezených kanálů byl 28 a dva duplikáty. V těchto strukturách se objevuje poměrně velká škála rodin kanálů (Obr. 30). Jde o kanály: 2a, 2b, 2c, 2e, 2f a kanál solventu.

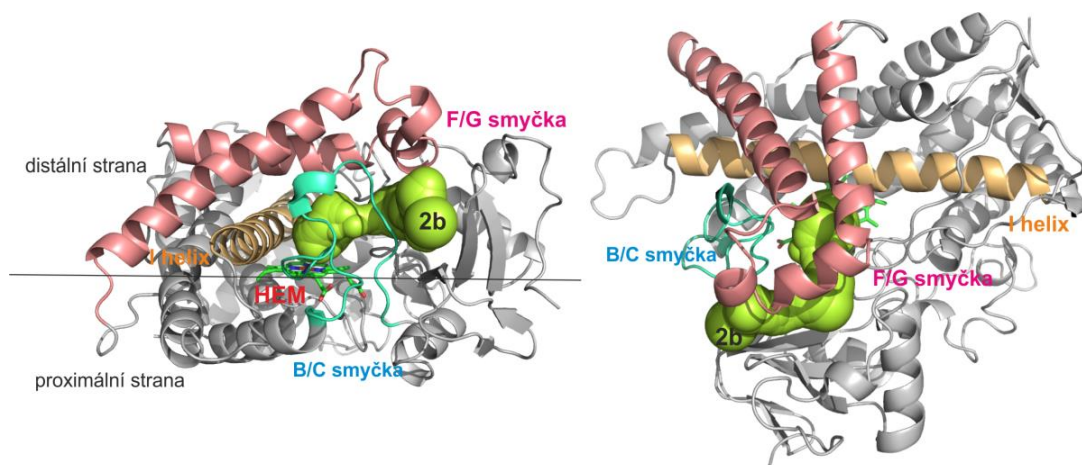


Obrázek 30 Kanály struktur CYP 2D6, struktura 2F9Q.

Nejvyšším počtem kanálů je zastoupena rodina 2a. Nejkratší kanály jsou podle průměrných hodnot délky 2f. Nejdelší kanály se objevují u rodiny 2e. Otevřenost je nejvyšší také u kanálu 2f s průměrným poloměrem hrdla $1,96 \pm 0,29$ Å. Po 2f jsou poměrně dosti otevřené i kanály 2a a 2b. U kanálů 2a, 2b, 2c a kanálu solventu převažuje celkový záporný náboj. Výjimkou jsou pak kanály 2e a 2f, které jsou zpravidla kladně nabitě. Nejpolarnější kanál je 2b, za ním následují 2c a 2e. Index hydropatie je nejvyšší u kanálu 2f, čemuž odpovídá i jeho velmi nízká polarita. Překvapivý je hydropatický index kanálu solventu $1,34 \pm 0,37$ Å i jeho nízká polarita, která je u tohoto typu kanálu značně neobvyklá. K variabilitě fyzikálně-chemických vlastností nejspíše přispívá absence určitých částí struktury, která se vyskytuje u několika testovaných struktur (např. chybějící smyčka mezi N-koncem a helixem A).

4.2.2.7 CYP 2E1

CYP 2E1 je rodinou zahrnující šest krystalových struktur: 3E4E, 3E6I, 3GPH, 3KOH, 3LC4 a 3T3Z. Bylo zde nalezeno 10 kanálů a jeden duplikát.



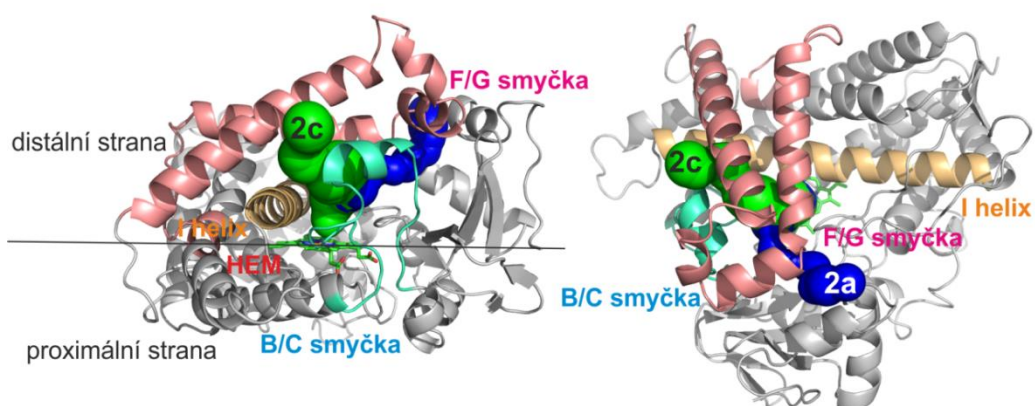
Obrázek 31 Kanály struktur CYP 2E1, struktura 3E4E.

Pro cytochromy P450 2E1 je typická přítomnost pouze jednoho typu kanálů. Analýzou všech dostupných krystalových struktur bylo zjištěno, že CYP 2E1 upřednostňuje výhradně kanály 2b. Kanály 2b byly nalezeny ve všech strukturách kromě 3E6I a 3GPH (Obr. 31). Kanály 2b zde mají nízkou polaritu a mírně hydrofobní charakter. Hrdlo je poměrně otevřené s průměrnou hodnotou poloměru $1,39 \pm 0,09$ Å. Podle negativního náboje kanálů budeme očekávat transport spíše kladně nabitých látek.

4.2.2.8 CYP 2R1

CYP 2R1 sestává ze tří krystalových struktur: 3C6G, 3CZH a 3DL9. Celkově zde bylo nalezeno 9 kanálů a žádný duplikát.

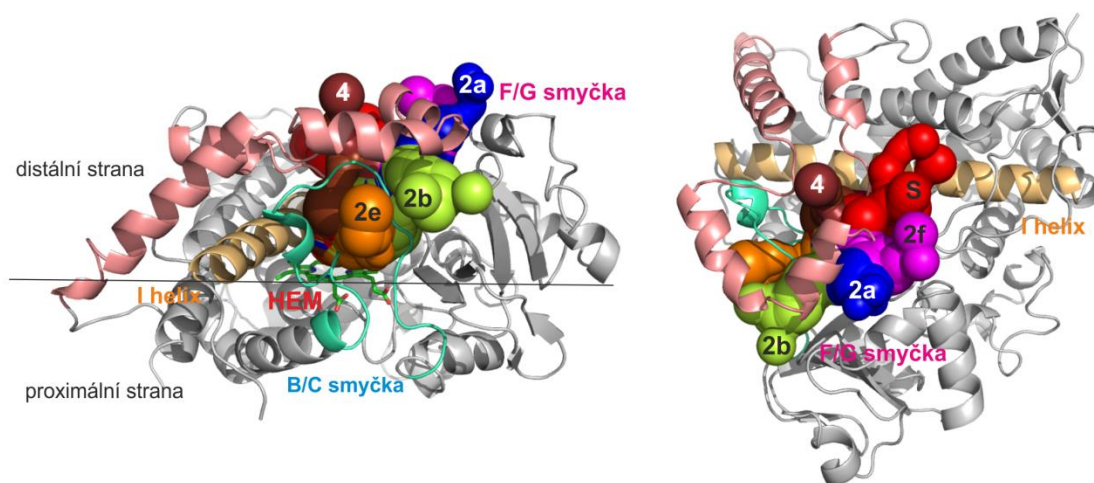
U CYP 2R1 jsou výhradně zastoupeny kanály typu 2c a 2a (Obr. 32). Hlavní podíl šesti kanálů z devíti představují kanály 2c. Oba typy kanálů mají u rodiny 2R1 nízkou polaritu s čímž souvisí jejich sklony k hydrofobicitě dané hodnotami indexů hydropatie a hydrofobicity. 2a je elektroneutrální, zatímco 2c má spíše negativní náboj. Délky kanálů se mezi těmito dvěma rodinami liší zhruba o 5 Å. Kanály 2c mají široké hrdlo ($\bar{R} = 2,11 \pm 0,15$ Å), ale kanály 2a je mají téměř poloviční ($\bar{R} = 1,38 \pm 0,09$ Å).



Obrázek 32 Kanály struktur CYP 2R1, struktura 3C6G.

4.2.2.9 CYP 3A4

CYP 3A4 sestává z devíti krystalových struktur: 1TQN, 1W0E, 1W0F, 1W0G, 2J0D, 2V0M, 3NXU, 3TJS. V těchto strukturách bylo nalezeno 38 kanálů a 2 duplikáty (Obr. 33).



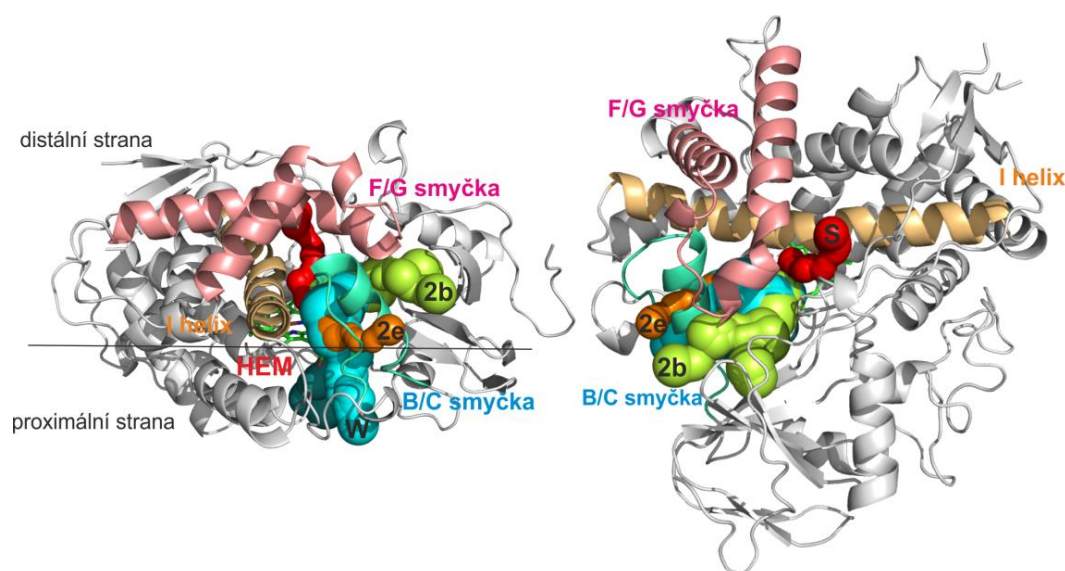
Obrázek 33 Kanály struktur CYP 3A4, struktura 1TQN.

Analýzou krystalových struktur cytochromu P450 3A4 byly zjištěny rozdíly v obsazenosti těchto struktur kanály. U struktury 2J0D nebyly nalezeny žádné kanály. Jejím pravým opakem je však struktura s PDB ID 2V0M. CYP 3A4 obsahuje tyto typy kanálů: kanál solventu, 2a, 2b, 2e, 2f a 4. Nejvíce zastoupeny jsou kanály typu 2e a 2b. Širší hrdla kanálů, obzvláště pak hrdlo 2b ($\bar{R} = 2,07 \pm 0,22 \text{ \AA}$), umožňuje přenos i větších molekul. Průměrná délka nejdelšího z kanálů 2a je $33,9 \pm 1,6 \text{ \AA}$. Nejpolarnějším kanálem je 2b, za nímž následuje na druhém místě 2e. Hydrofobní charakter se nejvíce projevuje u kanálu 4,

jehož hodnoty hydrofobicitního i hydrofatického indexu převyšují hodnoty u kanálů ostatních. Tento fakt je podpořen také jejich velmi nízkou polaritou. Kanály 4 se též vyznačují svojí elektroneutralitou. U ostatních kanálů je náboj poměrně variabilní veličinou, nicméně není se čemu divit, jelikož aminokyselinové složení v této oblasti se mezi jednotlivými strukturami různí. Totéž lze říci také o variabilitě v oblasti polarity kanálů.

4.2.2.10 CYP 7A1

Rodina 7A1 zde byla zastoupena třemi krystalovými strukturami: 3DAX, 3SN5 a 3V8D. Celkově bylo u 7A1 nalezeno 16 kanálů a tři duplikáty (Obr. 34). Struktury rodiny 7A1 se od ostatních zástupců lidských cytochromů P450 značně liší.

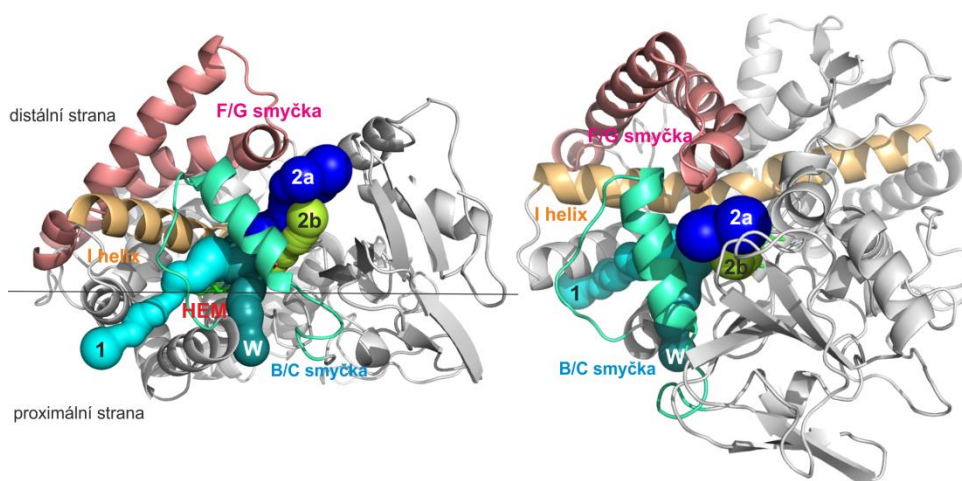


Obrázek 34 Kanály struktur CYP 7A1, struktura 3DAX.

Největší odchylky se objevuje v oblastech F/G a B/C smyček. Díky těmto odchýlkám se tak u 7A1 vyskytuje i specifická sada kanálů. Kromě klasického vodního kanálu se zde objevuje i druhý pseudo-vodní kanál, který byl značen jako W2. Po jednom kanálu se zde objevují rodiny kanálů solventu a 2e (struktura 3DAX). Ostatní krystalové struktury dávají přednost kanálů 2b a vodním. Polarita kanálu solventu a vodního kanálu je opět nejvyšší mezi ostatními kanály. Kanál solventu je záporně nabitý, zatímco kanál vody nese náboj +1. Kanál W2 však již vykazuje polaritu o polovinu nižší, z čehož je možno říci, že se spíše než o hodnověrnou větev vodního kanálu, jedná o jakousi anomálii. Poměrně zajímavá je šířka hrdla kanálu vody, jelikož je ze všech kanálů nejširší. Druhým nejvíce otevřeným kanálem je pak 2b. Kanály 2b jsou spíše hydrofobního charakteru, čemuž odpovídá i hodnota polarity.

4.2.2.11 CYP 8A1

Rodina 8A1 zahrnuje pouze dvě krystalové struktury: 2IAG a 3B6H. Podobně jako 7A1 se i 8A1 vyznačuje změnami polohy v F/G a B/C smyčkách. B/C smyčka je nicméně velmi netypická, což ovlivňuje i výsledné kanály. U této rodiny bylo nalezeno 6 kanálů a navíc jeden duplikát (Obr. 35).

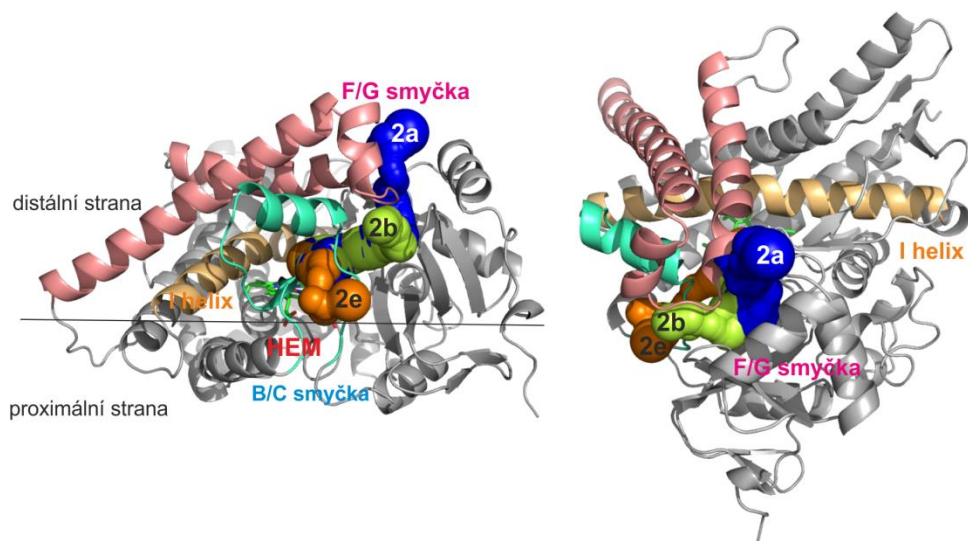


Obrázek 35 Kanály struktur CYP 8A1, zobrazeno na struktuře 2IAG.

Vyskytují se zde kanály 2a, 2b, rodina 1 a vodní kanál. Kanály 2b se pak objevují výhradně u struktur 3B6H. Kanály 2a zase u 2IAG. Nejdelším kanálem je kanál 1, který je zároveň i kanálem nejpolarnější, nicméně jeho hrdlo je mezi ostatními kanály v 8A1 nejužší. Jako nejvíce otevřené se jeví kanály 2a s průměrnou hodnotou poloměru hrdla 1,81 Å. Kanály 2a jsou zde spíše hydrofobního charakteru a kladně nabitě. Rodina kanálů 2b je však mírně hydrofilní a tyto kanály jsou také podstatně kratší.

4.2.2.12 CYP 11A1

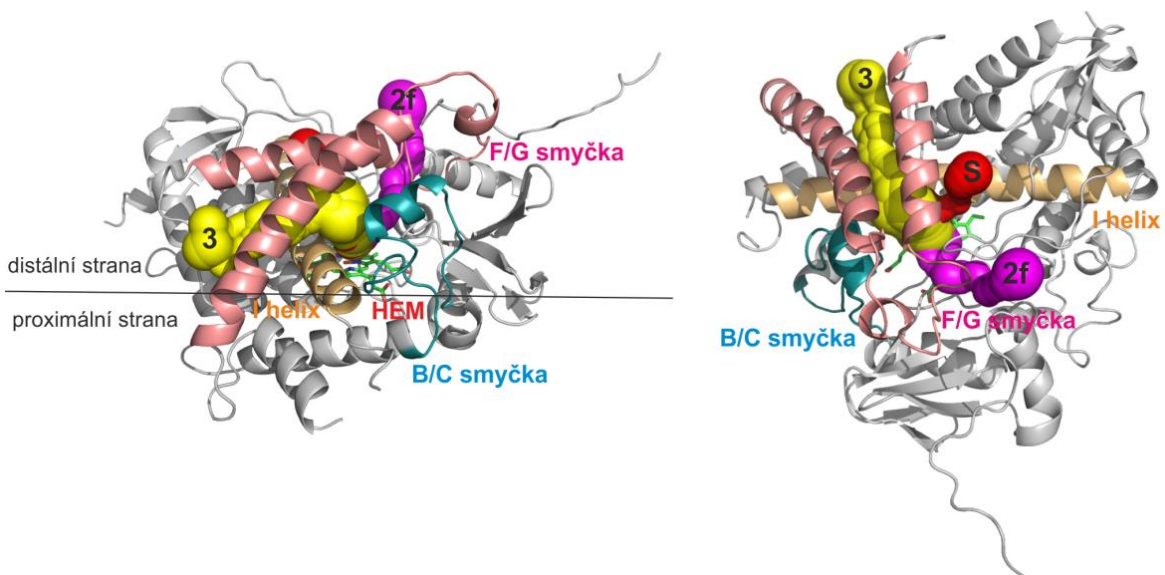
CYP 11A1 se skládá ze čtyř struktur: 3N9Y, 3N9Z, 3NA0 a 3NA1. 11A1 je typická přítomností kanálů rodiny 2, konkrétně se zde vyskytují kanály 2a, 2b a 2e. Nalezených kanálů bylo 20 (Obr. 36). Nebyly nalezeny žádné duplikáty. Největším počtem sedmi kanálů jsou zastoupeny kanály 2b a 2e. Nejpolarnější kanálem je jednoznačně 2e, zbylé dvě rodiny kanálů jsou polární velice málo a 2b již má spíše hydrofobní charakter. Kanály 2b mají průměrně nejširší hrdlo, jsou tedy nejvíce otevřené, s průměrným poloměrem hrdla $1,55 \pm 0,12$ Å. Nábojový charakter kanálů naznačuje, že se u všech bude objevovat spíše kladný náboj. Kanál solventu je nejdelší a 2e nejkratší.



Obrázek 36 Kanály struktur CYP 11A1, struktura 3NA1.

4.2.2.13 CYP 17A1

Rodina 17A1 je zastoupena dvěma krystalovými strukturami, z nichž každá obsahuje čtyři řetězce. Těmito strukturami jsou: 3RUK a 3SWZ. Bylo nalezeno 9 kanálů a žádný duplikát nebyl přítomen.

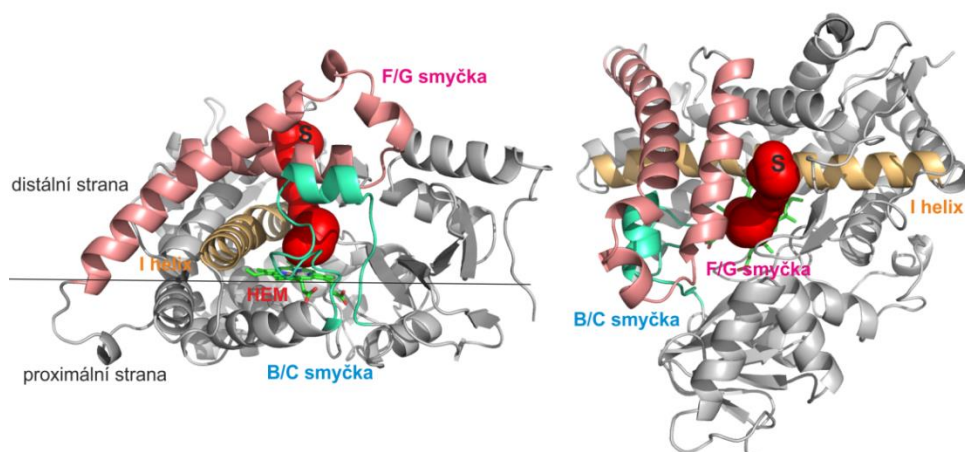


Obrázek 37 Kanály struktur CYP 17A1, struktura 3RUK.

U CYP 17A1 se objevují kanály 2f, kanál solventu a kanál 3 (Obr. 37). Nejvíce zastoupená je právě rodina kanálů 3, která se podle průměrného poloměru hrdla (1,48 Å) jeví také nejvíce otevřená. Nejpolarnější i nejhydrofilnější kanálem je 2f a zároveň se vyznačuje negativním nábojem. Kanál solventu vykazuje průměrnou hodnotu náboje -1,5. Hodnota indexu hydrofobie je dosti vysoká (2,10) a značí spíše hydrofobní charakter kanálu solventu.

4.2.2.14 CYP 19A1

Cytochromy P450 19A1 se dělí do pěti krystalových struktur: 3EQM, 3S79, 3S7S, 4GL5 a 4GL7. Byly zde nalezeny čtyři kanály, přičemž se jednalo výhradně o kanály solventu (Obr. 38). Mezi fyzikálně-chemickými vlastnostmi neprojevují kanály nijak výrazně rozdíly. Podle průměrné hodnoty poloměru hrdla se jedná o poměrně otevřené kanály.



Obrázek 38 Kanály struktur CYP 19A1, struktura 3EQM.

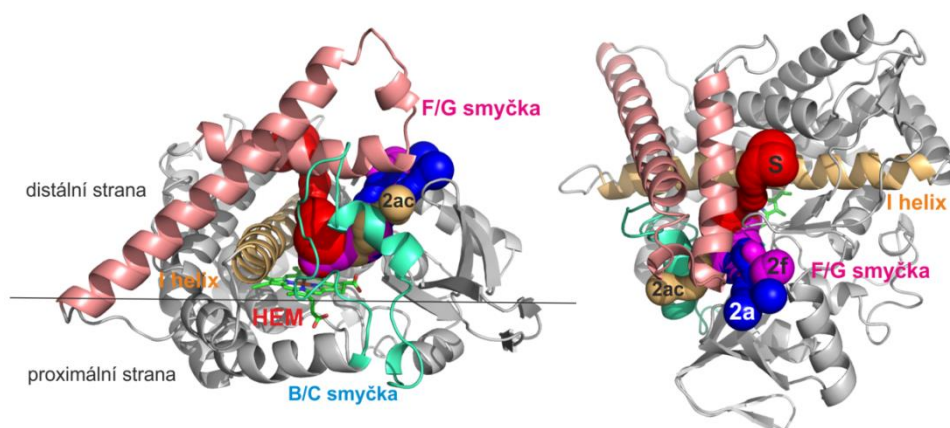
Kanály solventu struktur 19A1 jsou spíše záporně nabitě s hydrofilním charakterem, jemuž odpovídá i průměrná polarita.

4.2.2.15 CYP 46A1

CYP 46A1 je zde zastoupen osmi strukturami 2Q9F, 2Q9G, 3MDM, 3MDR, 3MDT, 3MDV, 4ENH A 4FAI. Bylo zde nalezeno 11 kanálů a žádné duplikáty (Obr. 39).

Rodina 46A1 je typická výskytem kanálů typu solventu, 2a, 2f a struktura 4ENH obsahuje jeden kanál 2ac. Hrdla kanálů jsou poměrně široká, z tohoto hlediska je nejotevřenější kanál 2a s hodnotou poloměru hrdla 1,44 Å. Podobně široké jsou však i kanály

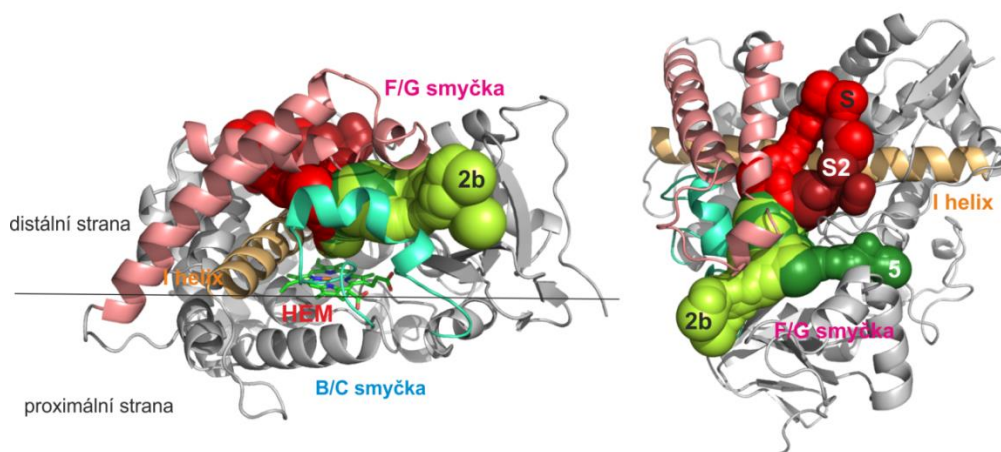
2f (1,40 Å) a kanál solventu (1,41 Å). Kanál 2ac je nejpolárnější a také nejhydrofilnější, jak naznačují indexy hydropatie a hydrofobicity. Druhý nejpolárnější je kanál solventu, jehož hydrofilní charakter je již nižší. Z hlediska náboje jsou kanály 2f neutrální, ale 2ac je naopak kladně nabitý.



Obrázek 39 Kanály struktur CYP 46A1, struktura 3MDM.

4.2.2.16 CYP 51A1

Mezi cytochromy rodiny 51A1 patří tři krystalové struktury s PDB ID 3JUS, 3JUV a 3LD6. Celkově tedy byly porovnány tři krystalové struktury rozdělené do pěti řetězců. V těchto strukturách bylo nalezeno celkem 14 kanálů a žádné duplikáty.



Obrázek 40 Kanály struktur CYP 51A1, struktura 3JUS.

Zatímco struktury 3JUS a 3LD6 jsou strukturně téměř identické, struktura 3JUV jeví značný posun v oblasti F/G smyčky, která je zde jakoby „propadlá“ směrem dovnitř struktury. Díky posunutí v oblasti F/G smyčky se u struktury 3JUV neobjevují kanály 2a. Naopak se zde vyskytuje jako u jediné ze struktur CYP 51A1 kanál rodiny 2f. Jedinečná je 3JUV také výskytem vodního kanálu. Struktury 3LD6 a 3JUS mají velmi podobnou skladbu rodin kanálů. U obou se objevuje kanál solventu a kanál 2a (Obr. 40). Žádná z těchto struktur neobsahuje kanály okolo B/C smyčky.

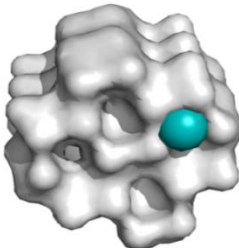
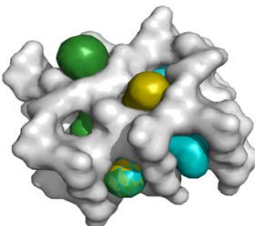
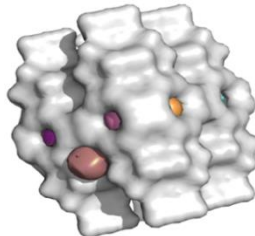
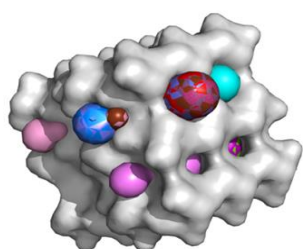
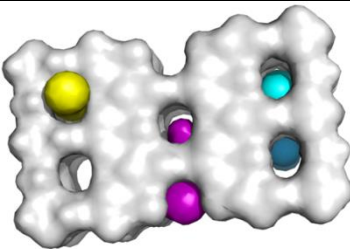
Zajímavostí CYP 51A1 je výskyt druhé větve kanálu solventu, který je zde označen jako S2. Tento specifický kanál se objevuje u všech krystalových struktur. Jejich výskyt je opodstatněn uspořádáním sekundárních strukturních prvků. Helixy F a F' jsou u CYP 51A1 posazené výše než u ostatních lidských CYP, což umožňuje vstup dalšího kanálu.

Nejdelší z nalezených kanálů je 2f (délka 27,5 Å), zatímco nejkratšími kanály jsou rodiny 2a, popřípadě S2. Z hlediska šířky hrdla kanálu se jako nejotevřenější jeví kanály rodiny 2a. Nejširší hrdlo se vyskytuje u struktury 3JUS s poloměrem 2,36 Å. Nejpolárnější je vodní kanál, který se vyskytuje pouze u struktury 3JUV. Druhým nejpolárnějším kanálem je kanál solventu. Vysoké hodnoty polarit těchto kanálů jsou v dobré shodě se zápornými hodnotami indexu hydrofobicity a hydropatie. Kanály 2s a 2f jsou typicky neutrální, kdežto kanály solventu jsou záporně nabitě. Poměrně překvapivý je kladný náboj vodního kanálu (+3). Tyto fyzikálně-chemické vlastnosti naznačují, že vodní kanál může sloužit jako výstupní cesta produktů odcházejících z aktivního místa. Kanály rodiny 5 se vyskytují ve strukturách 3LD6 a 3JUV. Hodnota jejich průměrné polarit $13,24 \pm 2,50$ se v rámci kanálů CYP 51A1 dá považovat za střední. Tyto kanály jsou poměrně otevřené se slabě hydrofilním charakterem.

4.3 Zeolity

4.3.1 Nalezené póry ve strukturách zeolitů

Tabulka 4 Přehled nalezených pórů ve vybraných zeolitech. Struktura zeolitu je zobrazena s molekulárním povrchem v šedé barvě, pór jsou vyznačeny pomocí koulí.

zeolit	průměrná délka [Å]	průměrný poloměr hrdla [Å]	vzdálenost od počátečního bodu [Å]	počet pórů	struktura zeolitu
ABW-77	15,68	1,41	8,93	1	
PUN-12	36,65	1,34	11,85	1	
UFI-6				0	
ZON-17	18,24 ± 10,84	0,98 ± 0,07	9,72 ± 6,22	6	
AFO-99	8,26 ± 4,64	2,13 ± 0,11	5,56 ± 4,70	2	

Tabulka 5 Nalezené autopóry ve vybraných strukturách zeolitů. Struktura zeolitu je zobrazena s molekulárním povrchem v šedé barvě, póry jsou vyznačeny pomocí koulí.

zeolit	průměrná délka [Å]	průměrný poloměr hrdla [Å]	vzdálenost od počátečního bodu [Å]	počet autopórů
ABW-77				0
PUN-12	22,25 ± 4,63	1,41 ± 0,15	13,05 ± 6,44	3
UFI-6	17,72 ± 9,21	1,90 ± 0,35	11,26 ± 8,64	30
ZON-17	19,00 ± 8,77	1,13 ± 0,27	9,05 ± 7,52	17
AFO-99	10,90 ± 4,86	1,37 ± 0,98	7,16 ± 4,91	4

V tabulkách 4 a 5 jsou uvedeny geometrické vlastnosti nalezených pórů.

4.3.1.1 Struktura ABW-72

Zeolitický skelet ABW-72 zastupuje materiál Li-A (Barrer, White) s chemickým složením $[Li_4^+(H_2O)_4I][Al_4Si_4O_{16}]^-$.

U této struktury byl nalezen pouze jeden pór a žádný autopór. Celková délka póru byla naměřena 15,68 Å. Hrdlo je poměrně otevřené s hodnotou poloměru 1,41 Å. Vzdálenost hrdla od jeho počátku byla 8,93 Å. Tento zeolit je z hlediska pórovitosti poněkud uzavřen.

4.3.1.2 Struktura PUN-12

PUN-12 je materiálem nesoucí název PKU-9 a chemickým složením: $|C_5H_{14}N|_8^{+1}[Ge_{28}Al_8O_{72}]^-$.

V dané struktuře PUN-12 byl nalezen jeden pór a tři autopóry. Pór je velmi dlouhý, nicméně autopóry mají průměrně širší poloměr hrdla. Autopóry se opět vyskytují v několika velikostech, které souhrnně přispívají k hodnotě směrodatné odchylky pro délku $\pm 4,63$ Å. Ještě vyšší je však odchylka průměrné vzdálenosti hrdla od počátečního bodu póru. Průměrně se u autopórů hrdlo pohybuje v okolí 13 Å od počátku póru. Hrdla póru i autopórů jsou si velikostně blízká. Směrodatná odchylka hrdel autopórů nenabývá vyšších hodnot. Jejich šířka tedy zůstává i přes rozdílnou délku poměrně zachována.

4.3.1.3 Struktura UFI-6

Jedná se strukturu o složení $|K_8^+|[Al_8Si_{55}O_{128}]^-$.

Tento zeolit obsahuje velké množství pórů různých délek. Pomocí MOLE 2.0 bylo ve struktuře UFI-6 nalezeno 30 autopórů. Nejdelší nalezený pór dosahoval délky 41,96 Å, zatímco nejkratší pór měl pouze 5,57 Å. Hrdlo je u pórů UFI-6 poměrně široké $1,90 \pm 0,35$ Å. Vysoká směrodatná odchylka se ovšem objevuje u vzdálenosti hrdla od počátku póru, což koreluje s proměnlivostí délek jednotlivých pórů.

4.3.1.4 Struktura ZON-17

Struktura zeolitu ZON-17 představuje látku s názvem ZAPO-M1 a chemickým vzorcem $|(C_4H_{12}N^+)_8|[Zn_8Al_{24}P_{32}O_{128}]^-$.

Struktura ZON-17 obsahovala 6 pórů a 17 autopórů. Póry a autopóry se v průměrných vlastnostech poměrně liší. Póry jsou celkově kratší než autopóry, nicméně jedná se o rozdíl menší než 1 Å. Velikostní rozmezí je u obou poměrně široké. Nejdelší autopór dosahuje délky 33,75 Å a nejdelší pór je dlouhý 37,20 Å. Hrdla autopórů jsou širší, ovšem s vyšší směrodatnou odchylkou než se objevuje u pórů. Je však nutno brát v potaz fakt, že autopórů je v tomto ohledu více a i jejich rozpětí je širší. Vzdálenost hrdla od počátečního bodu je u obou typů nalezených pórů velmi proměnlivá.

4.3.1.5 Struktura AFO-99

Jedná se o zeolit s názvem AIPO-41. Chemické složení tohoto materiálu je $[Al_{10}P_{10}O_{40}]^-$.

U této struktury zeolitu bylo získáno šest pórů, z toho čtyři byly nalezeny jako autopóry a dva jako póry. Průměrná délka se podobně jako u ostatních devíti zeolitů pohybuje ve vyšších hodnotách než u pórů. Rozsah délek je však u pórů i autopórů poměrně velký, z čehož se odvíjí i relativně vysoké směrodatné odchylky délky. Ve srovnání s póry u ostatních zeolitů jsou póry struktury AFO-99 značně široké. Dva nalezené póry mají průměrný poloměr hrdla $2,13 \pm 0,11$ Å. Autopóry však již tak otevřené nejsou, protože jejich průměrný poloměr hrdla je téměř poloviční jako u pórů. Vzdálenost hrdla od počátečního bodu je vzhledem k těmto hodnotám u pórů ostatních zeolitů spíše kratší, nicméně opět je značně variabilní, s širokým rozsahem hodnot v rámci jednotlivých pórů.

5 Závěry

5.1 CAM a BM3

Srovnáním nalezených kanálů u bakteriálních cytochromů P450 CAM a BM3 bylo zjištěno, že struktury CAM obsahují podstatně menší množství kanálů než BM3. U CAM byl nejpočetnějším kanálem 2a (31 %) a u BM3 bylo nalezeno nejvíce kanálů u rodiny 2b (58 %). U cytochromů P450 BM3 se vyskytuje poměrně vzácný kanál 2d. Z geometrického hlediska jsou kanály CAM průměrně kratší než BM3, avšak jejich hrdla jsou oproti BM3 více otevřena. Zatímco u kanálů CAM byly nalezeny pouze rodiny kanálů vody a solventu, doplněné dvěma kanály rodiny 2, u BM3 bylo zastoupení rodin kanálů podstatně větší. Typicky nejhydrofilnějšími kanály se ukázaly být kanály vody (zastoupeny z 35 %) a dále kanály solventu, čímž se potvrzuje domněnka, že by mohly sloužit k dopravě molekul vody do aktivního místa. Naopak nejhydrofobnějšími kanály byli zástupci rodiny 2. Obecně lze říci, že se kanály objevovaly ve zvýšené míře u struktur, které byly označovány jako „otevřené“.

5.2 Lidské cytochromy P450

5.2.1 Celkové zhodnocení lidských cytochromů P450

U lidských CYP byly nejvíce zastoupeny kanály 2b (19 %). Kanály solventu pak tvoří druhou nejpočetnější skupinu nalezených kanálů, jež mají zhruba 17 % zastoupení. Zajímavé jsou lidské CYP výskytem vzácných kanálů 1, 5 či 2ac, které se v jiných CYP příliš neobjevují. Speciálním případem lidských CYP je také výskyt druhého paralelního kanálu solventu, zde nazvaný S2. Tyto kanály ústí v těsném sousedství kanálu solventu, jsou však delší s užšími hrdly a zpravidla více hydrofobní. Kanály S2 tvořily ~5 % z celkového počtu kanálů. Podobně jako u CAM a BM3 se nejhydrofilněji chovají kanály vody, které se ovšem objevují v mnohem menší míře, pouze okolo 3 %. Oproti BM3 a CAM jsou však kanály solventu nalezené v lidských CYP méně hydrofilní, čemuž odpovídá i nižší hodnota polarity. Nicméně vzhledem k charakteru kanálů nalezených u CYP tvoří kanály solventu druhý nejpolárnější typ kanálu. Nejhydrofobnějšími byly shledány kanály rodiny 4. Mutabilita je u lidských CYP poměrně vysoká, což podobně jako u polarity, vychází ze strukturální rozdílnosti.

5.2.2 Rodiny lidských cytochromů P450

Kanály lidských cytochromů P450 se mezi jednotlivými rodinami poměrně liší, přičemž každá rodina obvykle preferuje jiné kanály:

- solvent kanál preferují CYP 2Ax, 19A1, 46A1,
- kanál 2a preferují CYP 2D6, 8A1 a 51A1,
- kanál 2b preferují CYP 2E1, 7A1, 11A1,
- kanál 2c preferují CYP 2Cx, 2R1,
- kanál 2e unikátně preferuje CYP 3A4 (společně s 2b),
- kanál 2f unikátně preferují CYP 2B6,
- kanál 3 preferují CYP 1B1 a 17A1,
- jako příliš uzavřené se jeví CYP rodiny 1A2.

Kanály solventu a vody jsou většinou vysoce polární a podporují tak předpoklad, že nejspíše slouží k transportu molekul vody a polárních produktů z aktivního místa. Kanály z rodiny 2 jsou nejčastěji hydrofobnější, leč značně variabilní a mohly by představovat hlavní kanály pro vstup nepolárních substrátů.

5.3 Zeolity

V pěti strukturách vybraných zeolitů byly vyhledány póry. Jednotlivé typy zeolitů měly odlišné zastoupení pórů v závislosti na svých geometriích. Ve většině struktur byly nalezeny jak póry, tak automaticky dle MOLE 2.0 nalezené autopóry. Celkově bylo nalezeno více autopórů, konkrétně 20 pórů a 115 autopórů. Nejvíce autopórů bylo nalezeno u struktury UFI-6, nejméně u zeolitu PUN-12. Nejširší hrdla mají póry struktury AFO-99. Dále u autopórů vykazuje největší průměrný poloměr hrdla struktura UFI-6. Vzdálenost hrdla od počátečního bodu je značně proměnlivou veličinou a je nutné ji brát s rezervou.

Lze tedy říci, že póry struktur zeolitů se liší v závislosti a geometrickém uspořádání dané struktury a jejich vlastnosti mají určitou míru variability.

5.4 Celkový závěr

Cílem této práce bylo provést rešerši a analyzovat různé druhy „ničeho“ ve vybraných souborech nanomateriálů. Pro analýzu byly vybrány bionanomateriály – cytochromy P450, doplněné o zástupce anorganických porézních nanomateriálů – zeolity.

Cytochromy P450 byly testovány u dvou velkých skupin, kde první skupinu představovaly bakteriální cytochromy P450 CAM a BM3 a skupinu druhou pak tvořily lidské cytochromy P450. U obou skupin byla provedena studie zahrnující vyhledání kanálů v těchto strukturách a popis jejich fyzikálně-chemických vlastností. Fyzikálně-chemické vlastnosti kanálů BM3 a CAM jsou si poměrně blízké, nicméně vyšší hodnoty směrodatných odchylek těchto vlastností naznačují značnou variabilitu těchto systémů při studiu jejich statických struktur. Variabilita je pak dána jejich strukturním uspořádáním, které se mezi jednotlivými krystalovými strukturami může i značně lišit.

Byla provedena detailní analýza kanálů jednotlivých 19 rodin lidských cytochromů P450. V těchto strukturách bylo nalezeno velké množství kanálů. Nejvíce kanálů bylo nalezeno u rodiny kanálu 2b a kanálů solventu. Z hlediska fyzikálně-chemických vlastností se jedná o podobně variabilní systémy, jako tomu bylo u CAM a BM3, což je navíc opodstatněno i větším počtem zkoumaných krystalových struktur. Porovnáním výsledků mezi rodinami bylo zjištěno, že každá rodina upřednostňuje spíše jen některé typy kanálů, ale vyskytují se i případy, kdy určitá rodina lidských cytochromů P450 preferuje pouze jeden druh kanálů, jako je tomu např. u rodiny CYP 2E1 či CYP 1B1.

U anorganických nanomateriálů zeolitů bylo vybráno pět struktur, na kterých byla provedena klasifikace přítomných pórů. U nalezených pórů byly posouzeny geometrické vlastnosti, jako je délka póru a poloměr hrdla. Póry zeolitů se liší především škálou velikostí nalezených pórů, která byla u některých struktur zeolitů opravdu široká, z čehož vyplývá i rozdílnost geometrických vlastností pórů zeolitů.

Program MOLE 2.0 se pro testování těchto velkých souborů struktur nanomateriálů osvědčil a potvrdilo se, že je možné jej použít pro analýzu „ničeho“, jak pro struktury biologického původu, tak pro struktury anorganické a může tak pomoci osvětlit některé oblasti, jež dosud zůstávaly oku vědce skryty.

6 Shrnutí

“Nic”, čili prázdný prostor uvnitř materiálu, tvoří důležitou součást mnohých struktur. Kavity, póry či kanály mohou zastupovat rozličné funkce jako je transport molekul či udržování stability daného systému. Cílem práce bylo hledat tyto prázdné prostory v nanomateriálech, konkrétně kanály a póry a popsat je jak z hlediska geometrického, tak z hlediska fyzikálně-chemických vlastností. Pro analýzu „ničeho“ ve vybraných nanomateriálech byl využit specializovaný program MOLE 2.0. Pro účely diplomové práce byly vybrány dvě skupiny zástupců nanomateriálů, přičemž první skupinu tvořily cytochromy P450, jakožto bionanomateriály. Druhou skupinu pak tvořily nanomateriály anorganického původu – zeolity, jejichž strukturní uspořádání a mikroporézní charakter přímo vybízí k jejich průmyslovému využití jako cenných adsorbentů či katalyzátorů.

Analýza cytochromů P450 byla provedena na strukturách bakteriálních cytochromů P450 – CAM a BM3 a také u lidských cytochromů P450. Fyzikálně-chemické vlastnosti nalezených kanálů se u jednotlivých skupin cytochromů mění v závislosti na odlišnostech mezi krystalovými strukturami.

U zkoumaných struktur pěti zeolitů byly za pomoci programu MOLE 2.0 nalezeny póry. Tyto póry byly klasifikovány z hlediska geometrických vlastností. Výsledkem bylo zjištění, že póry jednotlivých zeolitů se od sebe liší obzvláště rozsahem velikostí.

MOLE 2.0 se tak ukázal jako cenný nástroj pro testování dokonce i tak velkých souborů strukturních dat, jakých bylo použito v této práci. Vzhledem k provedené analýze pórů zeolitů jej lze rovněž doporučit pro geometrickou analýzu „ničeho“ v anorganických materiálech.

7 Summary

“Nothing” or empty space within any material is important part of many structures. Cavities, pores or channels can show various roles in molecular transport or maintenance of the stability of the system. The goal of this thesis was to find these empty spaces in nanomaterials, particularly channels and pores, and to describe their geometrical and physico-chemical properties with use of specialized program MOLE 2.0. For the purpose of the thesis, two groups of nanomaterial were chosen. The first group was cytochromes P450 as an example of bionanomaterials, and second group was zeolites - nanomaterials of inorganic origins, whose structural arrangement and microporous character evoke their usage in industry as valuable adsorbents or catalyzers.

Analysis of cytochromes P450 was performed on bacterial structures of cytochromes P450 – CAM and BM3 and also on human cytochromes P450. Physico-chemical properties of channels vary among particular cytochromes P450 depending on differences of their X-ray structures.

Pores were analyzed in five zeolite structures with MOLE 2.0 program. Pores were classified by their geometrical properties, whereas pores differ mostly in size range.

MOLE 2.0 program package has proven to be a valuable tool for analysis of big collections of structural data similar to this thesis. With regards to performed analysis of zeolite pores the program could be as well recommended as tool for analysis of “nothing” in inorganic materials.

8 Seznam použité literatury

- [1] Richards, F.M., The interpretation of protein structures: Total volume, group volume distributions and packing density, *J. Mol. Biol.* 82 (1974) 1-14
- [2] Mathews, B.W., Liu, L., A review about nothing: Are apolar cavities in proteins really empty?, *Protein Science* 18 (2009) 494-502
- [3] Connolly, M.L., Atomic size packing defects in proteins, In1 *J. Pept. Protein. Res.* 28 (1985) 360-36
- [4] Sehnal, D., Svobodová-Vařeková, R., Berka, K., Pravda, L., Navrátilová, V., Banáš, P., Ionescu, C.-M., Geidl, S., Otyepka, M., MOLE 2.0: Advanced Approach for Analysis of Biomacromolecular Channels., *submitted*
- [5] Williams, M.A., Goodfellow, J.M., Thornton, J.M., Buried waters and internal cavities in monomeric proteins, *Prot. Sci.* (1994), 1224-1235
- [6] Edelsbrunner, H., Facello, M., Liang, J., On the Definition and the Constructiuon of Pockets in Macromolecules, *Disc. Appl. Math.* 88 (1995) 19-29
- [7] Liang, J., Dill, K.A., Are proteins well packed?, *Biophys. J.* 81 (2001) 751-766
- [8] Poulos, T.L., Finzel, B.C., Howard, A.J., High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam, *J. Mol. Biol.* 195(3) (1987) 687-700
- [9] Bizzari, A., R., Cannistraro, S., Molecular Dynamics of Water at the Protein-Solvent Interface, *J. Phys. Chem. B.* (2002) 106, 6617-6633
- [10] Levy, Y., Onuchic, J.N., Water and proteins: A love-hate relationship, *Proc. Natl. Acad. Aci. USA* 101 (2004) 3325-3326, communication
- [11] Levitt, M., Park, B.H., Water: now you see it, now you don't, *Structure* 15 vol. 1, no. 4 (1993) 223-226
- [12] Quilin, M.L., Breyer, W.A., Griswold, I.J., Matthews, B.W., Size *versus* Polarizability in Protien-Ligand Interactions: Binding of Noble Gases within Engineered Cavities in Phage T4 Lysozyme, *J. Mol. Biol.* 302 (2000) 955-977
- [13] Supuran, C.T, Carbonic anhydrases – an overview, *Curr. Pharm. Des.* 14 (7) (2008) 603-614
- [14] Lee, J-O., Russo, A.A., Pavletich, N., Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7, *Nature* 391 (1998) 859-865
- [15] Voet, D., Voet, J.G. *Biochemistry*, 3rd ed. New York: Wiley, 2004, s.460

- [16] Kawabata, T., Go, N., Detection of pockets on protein surfaces using small and large probe spheres to find putative ligand binding sites, *Proteins*, 68 (2007) 516–529. DOI: 10.1002/prot.21283
- [17] McFarlane, A.A., Orriss, G.L., Stetefeld, J., The use of coiled-coil proteins in drug delivery systems, *Eur. J. Pharmacol.* (2009) 625, 101-107
- [18] Crick, F.H.C., Is alpha-keratin a coiled coil? *Nature* 170 (1952) 882–883
- [19] Walshaw, J., Woolfson, D.N., SOCKET: A Program for Identifying and Analysing Coiled-coil Motifs Within Protein Structures, *J. Mol. Biol.* 307 (2001) 1427-1450
- [20] Efimov, V.P., Engel, J., Malashkevich, V.N., Crystallization and preliminary crystallographic study of the pentamerizing domain from cartilage oligomeric matrix protein: a five-stranded alpha-helical bundle. *Proteins* 24 (1996) 259–262
- [21] Malashkevich, V.N., Kammerer, R.A., Efimov, V.P., Schulthess, T., Engel, J., The crystal structure of a five-stranded coiled coil inCOMP: a prototype ion channel?, *Science* 274 (1996) 761–765
- [22] Liu, J., Deng, Y., Zheng, Q., Cheng, C.S., Kallenbach, N.R., Lu, M., A seven-helix coiled coil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 15457–15462
- [23] Chann, D.C., Chutkowski, C.T., Kim, P.S., Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998) 15613-15617
- [24] Verkman, A.S., Mitra, A.K., Structure and function of aquaporin water channels, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 278 (2000) F13-F28
- [25] Zhang, R., Skach, W., Hasegawa, H., van Hoek, A. N., Verkman, A. S., Cloning, functional analysis and cell localization of a kidney proximal tubule water transporter homologous to CHIP28. *J. Cell Biol.* 120 (1993) 359–369
- [26] Braden, C.B., Goldbaum, F.A., Chen, B-X., Kirschner, A.N., Wilson, S.R., Erlanger, B.F., X-ray crystal structure of an anti-Buckminsterfullerene antibody Fab fragment: Biomolecular recognition of C60, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (22) (2000) 12193-12197
- [27] Roumen, L., A Computational Study of the Substrate Conversion and Selective Inhibition of Aldosterone Synthase, Eindhoven University of Technology Library (2008) ISBN: 978-90-386-1365-9
- [28] Porubsky P. R., Meneely K. M., Scott E. E.: Structures of Human Cytochrome P-450 2E1: Insights Into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates, *J. Biol. Chem.* 283 (28) (2008) 33698-33707

- [29] Orengo, C.A., Michie, A.D., Jones, S., Jones, D.T., Swindells, M.B., Thornton, J.M., CATH – A hierarchic classification of protein domain structures, *Structure* 5 (1997), 1093-1108
- [30] Ortiz de Montellano, P.R., *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3rd ed., Kluwer Academic, New York, 2005
- [31] Kalra, B.S., Cytochrome P450 and drug interactions, *Indian J. Med. Sci.* 61 (2) (2007) 102-116
- [32] Munro, A.W., Girvan, H.M., Mason, A.E., Dunford, A.J., McLean, K.J., What makes a P450 tick?, *Trends Biochem. Sci.* 38 (3) (2013) 140-150
- [33] Otyepka, M., Skopalík, J., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P., What common structural features and variations of mammalian P450s are known to date?, *Biochim. Biophys. Acta* 1770 (2007) 376-389
- [34] Poulos, T. L., Raag, R., Cytochrome P450cam: crystallography, oxygen activation, and electron transfer, *FASEB J.* 6 (1992) 674-679
- [35] Navrátilová, V., Flexibilita aktivního místa lidského cytochromu P450 CYP2E1, *Bakalářská práce, Univerzita Palackého*, 2011
- [36] Wade, R.C., Winn, P.J., Schlichting, I., Sudarko, A survey of active site access channels in cytochrome P450, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1175-1182
- [37] Cojocar, V., Winn, P.J., Wade, R.C., The ins and outs of cytochrome P450s, *Biochim. Biophys. Acta* 1770 (2007) 390-340
- [38] Schrödinger, L., *The PyMOL Molecular Graphics System*. 2010
- [39] 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* 113 (2009) 13018-13025
- [40] Poulos, T.L., Finzel, B.C., Howard, A.J., Crystal Structure of Substrate-Free *Pseudomonas putida* Cytochrome P-450, *Biochemistry* 25 (1986) 5314-5322
- [41] Lüdemann, S. K., Lounnas, V., Wade, R. C. , How do Substrates Enter and Products Exit the Buried Active Site of Cytochrome P450cam? 1. Random Expulsion Molecular Dynamics Investigation of Ligand Access Channels and Mechanisms, *J. Mol. Biol.* 303 (2000) 797-81
- [42] Scott, E.E., Halpert, J.R., Structures of cytochrome P450 3A4, *Trends. Biochem. Sci.* 30 (1) (2005) 5-7

- [43] Williams, P.A., Cosme, J., Matak Vinković, D., Ward, A., Angove, H.C., Day, P.J., Vonnrhein, C., Tickle, I.J., Jhoti, H., Crystal Structures of Human Cytochrome P450 3A4 Bound to Metirapone and Progesterone, *Science* 305 (30) (2004) 683-686
- [44] Chang, G.W., Kam, P.C., The physiological and pharmacological roles of cytochrome P450 isoenzymes, *Anesthesia* 54 (1999) 42-50
- [45] Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., Guengerich, F.P., Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270 (1994) 414-423
- [46] Bailey, D.G., Malcolm, J., Arnold, O., Spence, J.D., Grapefruit juice-drug interactions, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 46 (1998) 101-110
- [47] Hendrychová T., Anzenbacherová E., Hudeček J., Skopalík J., Lange R., Hildebrandt P., Otyepka M., Anzenbacher P.: Flexibility of human cytochrome P450 enzymes: Molecular dynamics and spectroscopy reveal important function-related variations, *Biochim. Biophys. Acta* 1814 (2010) 58-68
- [48] Newsman, J. M., The zeolite cage structure, *Science*, 231 (4742) (1986) 1093–1099
- [49] Perego, C., Bagatin, R., Tagliabue, M., Vignola, R., Zeolites and related mesoporous materials for talented environmental solutions, *Microporous Mesoporous Mater.* 166 (2013) 37-49
- [50] Chica, A., Zeolites: Promised Materials for the Sustainable Production of Hydrogen, *ISRN Chemical Engineering*, 2013 (2013) Article ID 907425, 19 s., 2013.
doi:10.1155/2013/907425
- [51] Weitkamp, J., Zeolites and catalysis, *Solid State Ionics* 131 (2000) 175-188
- [52] Coombs, D.S., Alberti, A., Armbruster, T., Artioli, G., Colella, C., Galli, E., Grice, J.D., Liebau, F., Mandarino, J.A., Minato, H., Nickel, E.H., Passaglia, E., Peacor, D.R., Quartieri, S., Rinaldi, R., Ross, M.I., Sheppard, R.A., Tillmanns, E., Vezzalini, G., *Can. Mineral.* 35 (1997) 1571
- [53] Cronstedt, A.F., “Rön och beskrifning om en obekant bärg art, som kallas Zeolites,” *Akademeins. Handlingar*, Stockholm, 18 (1756) 120
- [54] Damour, A., *Ann. Mines.* 17 (1840) 191
- [55] Eichorn, H., *Ann. Phys. Chem.* 105 (1858) 126
- [56] Hamor, W.A., The purification and softening of water by permutite, *Ind. Eng. Chem.* 4 (1912) 240

- [57] Weigel, O., Steinhoff, E., Adsorption of organic liquid vapors by chabazite, *Z. Kristallogr.* 61 (1925) 125
- [58] Maters, A.F., Zeolites curiosity to cornerstone, *Microporous Mesoporous Mater.* 142 (2011) 423-438
- [59] G.T. Kerr, *J. Phys. Chem.* 71 (1967) 4155
- [60] G.T. Kerr, G.C. Johnson, *J. Phys. Chem.* 64 (1960) 381
- [61] Meier, W.M., Olson, D.H., *Atlas of Zeolite Structure Types*, Juris Druck & Verlag AG, Zurich, (1978)
- [62] Odawara, H., Noguchi, Y., Ohno, M., Fructose is effectively separated from a mixture of sugars by contacting an aqueous solution of a mixture of sugars with crystalline aluminosilicate, US Patent 4014711, 1977
- [63] Nováková, J., Dolejšek, Z., A comment on the oxidation of coke deposited on zeolites, *Zeolites*, 10 (3) (1990) 189–192
- [64] Anderson, R.A., “Molecular Sieve Adsorbent Applications State of the Art”, *Molecular Sieves-II* 40 (1977) 637–649
- [65] Ozin, G.A., A. Kuperman, A., Stein, A., *Advanced zeolite, materials science, Angewandte Chemie*, 28 (3) (1989) 359–376
- [66] Brezovský, J., Chovancová, E., Gora, A., Pavelka, A., Biedermanová, L., Damborský, J., Software tools for identification, visualization and analysis of protein tunnels and channels, *Biotechnol. Adv.*, 31 (2012) 38-49
- [67] Petřek, M., Otyepka, M., Banáš, P., Košinová, P., Koča, J., Damborský, J., CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities, *BMC Bioinformatics* 7 (2006) 316
- [68] Pravda, L., *Computational Methods for Detecting Ligand Accessible Pathways*, Master’s Thesis, Masaryk University, 2012
- [69] Lee, B., Richards, F., The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility, *J. Mol. Biol.* 55 (1971) 379–400
- [70] Metropolis, N., Rosenbluth, A.W., Rosenbluth, M.N., Teller, A.H., Teller, E., Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *J. Chem. Phys.* 21 (6) (1953) 1087-1092, ISSN: 00219606. DOI: 10.1063/1.1699114
- [71] Smart, O.S., Neduvélil, J.G., Wang, X., Wallace, B.A., Sansom, S.P., HOLE: A program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 354-360

- [72] Poupon, A., Voronoi and Voronoi-related tessellations in studies of protein structure and interaction, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14 (2004) 233-241
- [73] Medveděv, N.N., Voloshin, V.P., Luchnikov, V.A., Gavrilova, M.L., An Algorithm for Three-Dimensional Voronoi S-Network, *J. Comput. Chem.* 27 (2006) 1676-1692
- [74] Košinová, P., Přístupové cesty aktivních míst proteinů a jejich flexibilita, Diplomová práce, Univerzita Palackého, 2007
- [75] Dijkstra, E. W., A note on two problems in connection with graphs. *Num. Math.* 1 (1959) 83-89
- [76] Damborský, J., Petřek, M., Banáš, P., Otyepka, M., Identification of tunnels in proteins, nucleic acids, inorganic materials and molecular ensembles, *Biotechnol. J.* 2 (2007) 62-67
- [77] Ho, B.K., Gruswitz, F., HOLLOW: Generating Accurate Representation of Channel and Interior Surfaces in Molecular Structures, *BMC Struct. Biol.* 8 (1) (2008) 49
- [78] Cornell, W.D., Cieplak, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz, J.K.M., Ferguson, D.M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J.W., Kollman, P.A., A 2nd generation force-field for simulation of proteins, nucleic-acids and organic-molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 5179–5197
- [79] Petřek, M., Košinová, P., Koča, J., Otyepka, M., MOLE: A Voronoi-Based Explorer of Molecular Channels, Pores, and Tunnels, *Structure* 15 (2007) 1357-1363
- [80] Yaffe, E., Fishelovitch, D., Wolfson, H.J., Halperin, D., Nussinov, R., MolAxis: Efficient and accurate identification of channels in macromolecules, *Proteins* 73 (2008) 72-86
- [81] Glaser, F., Morris, R.J., Najmanovich, R.J., Laskowski, R.A., Thorton, J.M., A Method for Localizing Ligand Binding Pockets in Protein Structures, *Proteins* 62 (2006) 479-488
- [82] Pellegrini-Calace, M., Maiwald, T., Thorton, J.M., PoreWalker: A Novel Tool for the Identification and Characterization of Channels in Transmembrane Proteins from Their Three-Dimensional Structure, *PLoS Comput. Biol.* 5 (7) (2009) e1000440
- [83] Oliva, R., Thorton, J.M., Pellegrini-Calace, M., PoreLogo: a new tool to analyse, visualize and compare channels in transmembrane proteins, *Bioinformatics* 25 (23) (2009) 3183-3184
- [84] Yu, J., Zhou, Y., Tanaka, I., Yao, M., Roll: a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere, *Bioinformatics* 26 (1) (2010) 46-52
- [85] Voss, N.R., Gerstein, M., 3V: cavity, channel and cleft volume calculator and extractor, *Nucleic Acid Res.* 38 (2010) 555-562

- [86] Berka K, Hanák O, Sehnal D, Banáš P, Navrátilová V, Jaiswal D, Ionescu C-M, Svobodová Vareková R, Koca J, Otyepka M: MOLEonline 2.0: interactive web-based analysis of biomacromolecular channels. *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) W222–W227
- [87] Petřek., M., Košinová, P., Koča, J., Otyepka, M., MOLE: A Voronoi Diagram-Based Explorer of Molecular Channels, Pores, and Tunnels, *Structure* 15 (2007) 1357-1363
- [88] Cid. H. et al., Hydrophobicity and structural classes in proteins. *J. Protein. Engineering* 5 (1992) 373-375
- [89] Kyte, J., Doolittle, R.F., A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105-132
- [90] Zimmerman, J.M., et al., The characterization of amino acid sequences in proteins by statistical methods, *J. Theor. Biol.* 21 (1968) 170-201
- [91] Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M., The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences, *Comput. Appl. Biosci.* 8 (3) (1992) 275-282
- [92] Herráez, A., Biomolecules in the computer: Jmol to the rescue, *Biochem. Mol. Biol. Edu.* 34 (2006) 255–261
- [93] Craig T. Porter, Gail J. Bartlett, and Janet M. Thornton, The Catalytic Site Atlas: a resource of catalytic sites and residues identified in enzymes using structural data, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) D129-D133.
- [94] Laskowski, R.A. "PDBsum new things." *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) D355-D359
- [95] Laskowski, R. A. "PDBsum: summaries and analyses of PDB structures." *Nucleic Acids Res.* 29 (1) (2001) 221-222
- [96] www.pdb.org (22. 4. 2013)
- [97] <http://izasc.ethz.ch/fmi/xsl/IZA-SC/xrd.xsl> (22. 4. 2013)
- [98] http://cds.dl.ac.uk/cds/interface_and_utilities/babel.html (22. 4. 2013)

9 Doplnující materiály

Tabulka SA. Fyzikálně-chemické vlastnosti aminokyselin (převzato z [4])

Aminokyselina	Náboj	Hydropatie ^a	Hydrofobicita ^b	Polarita ^c	Mutabilita ^d	
ALA	A	0	1,8	0,02	0	100
ARG	R	1	-4,5	-0,42	52,0	83
ASN	N	0	-3,5	-0,77	3,38	104
ASP	D	-1	-3,5	-1,04	49,7	86
CYS	C	0	2,5	0,77	1,48	44
GLU	E	-1	-3,5	-1,14	49,9	77
GLN	Q	0	-3,5	-1,10	3,53	84
GLY	G	0	-0,4	-0,80	0	50
HIS	H	0	-3,2	0,26	51,6	91
ILE	I	0	4,5	1,81	0,13	103
LEU	L	0	3,8	1,14	0,13	54
LYS	K	1	-3,9	-0,41	49,5	72
MET	M	0	1,9	1,00	1,43	93
PHE	F	0	2,8	1,35	0,35	51
PRO	P	0	-1,6	-0,09	1,58	58
SER	S	0	-0,8	-0,97	1,67	117
THR	T	0	-0,7	-0,77	1,66	107
TRP	W	0	-0,9	1,71	2,10	25
TYR	Y	0	-1,3	1,11	1,61	50
VAL	V	0	4,2	1,13	0,13	98
Hlavní řetězec		0	-0,4	-0,80	3,38	-

a) Kyte, J.; Doolittle, R. F. *J. Mol. Biol.* 1982, 157, 105–132.

b) Cid, H.; Bunster, M.; Canales, M.; Gazitúa, F. *Protein Eng.* 1992, 5, 373–375.

c) Jones, D. T.; Taylor, W. R.; Thornton, J. M. *Comput. Appl. Biosci.* 1992, 8, 275–82.

d) Zimmerman, J. M.; Eliezer, N.; Simha, R. *J. Theor. Biol.* 1968, 21, 170–201.

Tabulka SB. Přehled použitých struktur CAM.

CAM	řetězec	CAM	řetězec
7CPP	A	1QMQ	A
6CPP	A	1PHG	A
6CP4	A	1PHG	A
5CP4	A	1PHF	A
3CPP	A	1PHE	A
2ZAX	A	1PHD	A
2ZAW	A	1PHC	A
2Z97	A	1PHB	A
2H7Q	A	1PHA	A
2FEU	A	1O76	A
2FEU	B	1O76	B
2FER	A	1K2O	A
2FE6	A	1K2O	B
2CPP	A	1IWK	A
1YRD	A	1IWJ	A
1YRC	A	1IWI	A
1UYU	A	1GEM	A
1UYU	B	1GEK	A
1T88	A	1DZ9	A
1T88	B	1DZ9	B
1T87	A	1DZ8	A
1T87	B	1DZ6	A
1T86	A	1DZ6	B
1T86	B	1DZ4	A
1T85	A	1DZ4	B
1RF9	A	1CP4	A
1RE9	A	1AKD	A

Tabulka SC. Přehled použitých struktur BM3.

BM3	řetězec	BM3	řetězec	BM3	řetězec	BM3	řetězec
1BU7	A	1YQP	A	2UWH	C	3HF2	A
1BU7	B	1YQP	B	2UWH	D	3HF2	B
1BVY	A	1ZO4	A	2UWH	E	3KX3	A
1BVY	B	1ZO4	B	2UWH	F	3KX3	B
1JME	A	1ZO9	A	2X7Y	A	3KX4	A
1JME	B	1ZO9	B	2X7Y	B	3KX4	B
1P0V	A	2IJ2	A	2X8Y	A	3KX5	A
1P0V	B	2IJ2	B	2X8Y	B	3KX5	B
1P0W	A	2IJ3	A	3BEN	A	3M4V	A
1P0W	B	2IJ3	B	3BEN	B	3M4V	B
1P0X	A	2IJ4	A	3CBD	A	3NPL	A
1P0X	B	2IJ4	B	3CBD	B	3NPL	B
1SMI	A	2J1M	A	3DGI	A	3PSX	A
1SMI	B	2J1M	B	3DGI	B	3PSX	B
1SMJ	A	2J4S	A	3EKB	A	3QI8	A
1SMJ	B	2J4S	B	3EKB	B	3QI8	B
1SMJ	C	2NNB	A	3EKD	A	4DQL	A
1SMJ	D	2NNB	B	3EKD	B	4DQL	B
1YQO	A	2UWH	A	3EKF	A	4DQK	A
1YQO	B	2UWH	B	3EKF	B	4DQK	B

Tabulka SD. Přehled použitých struktur lidských cytochromů P450.

PDB ID	řetězec	PDB ID	řetězec	PDB ID	řetězec	PDB ID	řetězec	PDB ID	řetězec	PDB ID	řetězec
2HI4	A	3EBS	A	4EJH	A	3QM4	A	3NXU	A	3S79	A
3PM0	A		B		B	3QM4	B	3NXU	B	3S7S	A
1Z10	A		C		C	3TBG	A	3TJS	A	4GL5	A
	B		D		D	3TBG	B	3DAX	A	4GL7	A
	C	3T3Q	A		E	3TBG	C	3DAX	B	2Q9F	A
	D		B		F	3TBG	D	3B6H	A	2Q9G	A
1Z11	A		C		G	3TDA	A	3B6H	B	3MDM	A
	B		D		H	3TDA	B	3SN5	B	3MDR	A
	C	3T3R	A	4EJI	A	3TDA	C	3V8D	A	3MDR	B
	D		B	3IBD	A	3TDA	D	3V8D	B	3MDT	A
2FDU	A		C	3QOA	A	3E4E	A	2IAG	A	3MDT	B
	B		D	3QU8	A	3E4E	B	2IAG	B	3MDV	A
	C	4EJJ	A	3QU8	B	3E6I	A	3B6H	A	3MDV	B
	D		B	3QU8	C	3E6I	B	3B6H	B	4ENH	A
2FDV	A		C	3QU8	D	3GPH	A	3N9Y	A	4FIA	A
	B		D	3QU8	E	3GPH	B	3N9Y	B	3JUS	A
	C	2P85	A	3QU8	F	3KOH	A	3N9Y	C	3JUS	B
	D		B	3UA5	A	3KOH	B	3N9Y	D	3JUV	A
2FDW	A		C	3UA5	B	3LC4	A	3N9Z	A	3LD6	A
	B		D	1PQ2	A	3LC4	B	3N9Z	B	3LD6	B
	C		E	1PQ2	B	3T3Z	A	3N9Z	C		
	D		F	2NNH	A	3T3Z	B	3N9Z	D		
2FDY	A	3T3S	A	2NNH	B	3T3Z	C	3NA0	A		
	B		B	2NNI	A	3T3Z	D	3NA0	B		
	C		C	2NNJ	A	3C6G	A	3NA0	C		
	D		D	2VN0	A	3C6G	B	3NA0	D		
2PG5	A		E	1OG2	A	3CZH	A	3NA1	A		
	B		F	1OG2	B	3CZH	B	3NA1	B		
	C		G	1OG5	A	3DL9	A	3NA1	C		
	D		H	1OG5	B	3DL9	B	3NA1	D		
2PG6	A	4EJG	A	1R9O	A	1TQN	A	3RUK	A		
	B		B	4GQS	A	1W0E	A	3RUK	B		
	C		C	4GQS	B	1W0F	A	3RUK	C		
	D		D	4GQS	C	1W0G	A	3RUK	D		
2PG7	A		E	4GQS	D	2J0D	A	3SWZ	A		
	B		F	2F9Q	A	2J0D	B	3SWZ	B		
	C		G	2F9Q	B	2V0M	A	3SWZ	C		
	D		H	2F9Q	C	2V0M	B	3SWZ	D		
	A			2F9Q	D	2V0M	C	3EQM	A		
						2V0M	D				

MOLE 2.0 - Shrnutí funkcí pokročilých parametrů

Interior Threshold

Interior Threshold (IT) je „práh“, který udává minimální šířku na začátku kanálu. Pomocí IT jsou identifikovány všechny prázdné prostory, které jsou širší než dvojnásobek nastavené hodnoty IT. Samozřejmě, čím menší bude hodnota IT, tím více kavit a následně pak tunelů, program vygeneruje.

Jinými slovy slouží vlastně jako filtr pro nalezení kanálu s relevantním průměrem. Pokud je tunel příliš úzký, nevstoupí do něj dokonce ani sebemenší molekula, takovýto tunel pak ztrácí svoji základní funkci, tedy transport molekul, a označuje se jako uzavřený. Parametr IT tak zajišťuje, že vypočítaný tunel nebude mít průměr užší, než je jeho nastavená hodnota. Standardní přednastavená hodnota programem činí 1,25 Å.

Probe Radius

Probe Radius (dále PR) udává úroveň detailů molekulárního povrchu. Nižší hodnota PR vygeneruje hrubý molekulární povrch s vysokou úrovní detailů. Naopak vyšší hodnota PR vytvoří velmi hladký povrch, kde je úroveň detailů nižší.

Origin Radius

Origin Radius (dále OR) ovlivňuje oblast, v níž probíhá definování potenciálních počátečních bodů (při volbě automatického vyhledávání počátečního bodu) pro výpočet kanálů. Zvýšením hodnoty OR bude docíleno prohledání větší oblasti kavity. Pokud žádný bod neleží uvnitř definované hodnoty OR uvnitř kavity, pak nemůže být nalezen žádný počáteční bod.

Surface Cover Radius

Surface Cover Radius je úzce spjat s hledáním koncového bodu kanálu. Proto bude hlouběji rozebrán v následující kapitole.

Popis počátečního a koncového bodu

Popis počátečních a konečných bodů vychází z několika menších diagramů kavit. Tyto diagramy jsou generovány jakožto vhodné propojení mezi vrcholy kavity. Jako počáteční je pak označen takový bod, který je zanořen nejhlouběji ve struktuře (nejhlubší vrchol kavity). Popis koncového bodu je zprostředkován definováním pozice nejširšího čtyřstěnu na vnějším okraji kavity („největší“ vrchol kavity).

Počáteční bod

Bod, z něhož bude ústít vypočítávaný kanál je možno získat dvěma způsoby. Jednak si může uživatel nadefinovat vlastní počáteční bod (*User defined*) nebo je možné použít algoritmus MOLE 2.0. První možnost dovoluje uživateli vybrat si vlastní počáteční bod buď jako výběr residuí v aminokyselinové sekvenci struktury, nebo bod ve formě XYZ souřadnic. Ve druhém případě MOLE 2.0 vypočítá počáteční bod jako nejhlubší vrchol kavity dané struktury. Hloubka vrcholu je popsána jako nejkratší spojnice tohoto bodu s vrcholem na vnějším okraji kavity.

Koncový bod

Koncový bod můžeme získat opět dvěma způsoby – buď koncový bod vypočítá MOLE 2.0, nebo ho může v desktop verzi zadat uživatel. Ten si může zvolit vlastní koncový bod kliknutím na molekulární povrch dané struktury načtené v desktop verzi MOLE 2.0. Častější volbou k nalezení tohoto bodu je však využití MOLE 2.0. Při výpočtu je prohledán diagram kavity a pro každý tento diagram je vytvořen podgraf sestavený z hraničních vrcholů kavity. Tyto body jsou propojeny, a vzniklé spoje jsou v dalším kroku pokryty koulemi, jejichž velikost (poloměr) je dána hodnotou *Surface Cover Radius*. Čtyřstěny, které se shodují s centry těchto koulí, jsou pak označeny jako koncové body tunelu.

Parametry určené k filtrování kanálů

Jemnějšího filtrování výsledků lze docílit využitím dalších tří parametrů s názvy: *Bottleneck Radius*, *Bottleneck Tolerance* a *MaxTunnelSimilarity*.

Bottleneck Radius

Tento parametr pro jemné filtrování kanálů popisuje minimální poloměr kanálu v každém bodě po celé délce tunelu. Nižší hodnota *Bottleneck Radius* umožní vygenerování více kanálů. Tento parametr je blízce příbuzný základnímu parametru *Interior Threshold*, ale používá se na rozdíl od něj až ve filtrování již vypočítaných kanálů.

Bottleneck Tolerance

Parametr *Bottleneck Tolerance* úzce souvisí s předchozím parametrem. Tento parametr umožňuje nalézt i kanály, které jsou na některém místě užší, než nastavený *Bottleneck Radius*, takže jsou například ve statické struktuře uzavřeny. *Bottleneck Tolerance* pak určuje maximální délku takového užšího úseku.

MaxTunnelSimilarity

MaxTunnelSimilarity je parametr pro odstranění redundantních kanálů při srovnání podobnosti vypočítaných kanálů. Pokud jsou ve struktuře nalezeny dva kanály, které jsou svými proporcemi téměř shodné, pak je vybrán pouze kratší z nich a delší je odstraněn. Od nastavené hodnoty *MaxTunnelSimilarity* se samozřejmě odvíjí i počet výsledných kanálů. Hodnota *MaxTunnelSimilarity* pohybující se v blízkosti 1 není příliš dobrou volbou, protože filtrační kritérium je v tomto případě slabé, zatímco snížením hodnoty blíže k 0,5 kritérium podobnosti nabyde na síle a následně bude vygenerováno menší množství kanálů.

Výpočet pórů

Hledání póru začíná až v okamžiku, kdy MOLE 2.0 nalezl ve struktuře kanály. Důvod pro tento postup je zřejmý již se samotné definice póru. Pór je popsán jakožto kanál propojující dvě strany povrchu struktury, a proto je v MOLE 2.0 sestaven jako dva kanály ústící každý na jiné straně molekulárního povrchu. Pokročilé a filtrační parametry se při výpočtu pórů uplatňují stejnou měrou, jako při výpočtu kanálů. Protože je koncové body možno určit pouze na základě vnějších hranic kavit, parametry jako *Interior Threshold*, *Probe Radius* či *Surface Cover Radius* silně ovlivňují popis koncových bodů pórů.

Auto póry

Funkce auto pórů (*auto-pores*) umožňuje přesnější zacílení koncových bodů pórů. Tento proces vypočítává póry mezi všemi páry koncových bodů, které jsou automaticky generovány pro všechny hraniční body kavity. Je však nutné zmínit, že ne všechny takto určené potenciální body jsou konečnými body již nalezených kanálů.

Desktop verze MOLE 2.0 navíc dovoluje nastavení uživatelem definovaného koncového bodu, jednoduše kliknutím na molekulární povrch při současném držení klávesy Ctrl. Toto individuální nastavení je vhodné při cíleném vyhledávání „ničeho“ v dané struktuře, které ovšem vyžaduje dostatečnou znalost studovaného proteinu či nanomateriálu.

Výpočet fyzikálně-chemických vlastností

Fyzikálně-chemické vlastnosti vycházejí ze složení aminokyselin, jež rámuje celý tunel. Při výpočtu je průběh tunelu označen linií s názvem *centerline*. Tyto linie jsou dále složeny z vrstev (layers), přičemž každá vrstva je složena z několika residuí, které ji obklopují, tudíž aminokyseliny rámuující celý tunel jsou vlastně výčtem všech residuí ze všech vrstev tunelu. Jako první jsou vypočítávány hodnoty délky každé vrstvy a také poloměr hrdla (*bottleneck*). Dále je z postranních řetězců aminokyselin v okolí tunelu zjišťována hydrofobicita, hydropatie, polarita, mutabilita a také náboj.

Vlastnosti jednotlivých aminokyselin jsou získávány z tabelovaných hodnot (Tabulka SA.) a celkový výsledek pak představuje průměrnou hodnotu všech postranních řetězců aminokyselin v okolí tunelu. Rovněž je možno získat výsledek v podobě vážených vlastností (vyjma náboje). V takovém případě je vypočítán vážený průměr vlastností, kde je váha dotyčné aminokyseliny vztažena na délku vrstvy [4].

Hydrofobicita

Hydrofobicita je počítána jako průměr normalizovaných hydrofobicit dle Cida a kol. [88]. Škála hydrofobicity se pohybuje od nejhydrofobnější hodnoty isoleucinu (1,810) až k nejhydrofilnější kyselině glutamové s hodnotou hydrofobicity -1,140. Podobným ukazatelem hydrofobicity systému je hydropatie, která se liší hlavně rozmezím stanovujícím úroveň hydrofobního charakteru struktury. Pokud jsou hlavní řetězce aminokyselin namířeny dovnitř tunelu, pak se pro výpočet hydrofobicity používá tabelovaná hodnota pro glycin (Gly).

Hydropatie

Hydropatie se vypočítává z hydropatických indexů jednotlivých residuí jako jejich průměr. Výpočet hydropatie je realizovaná pole metody Kyte a Doolittle [89]. Rozmezí hodnot pro výpočet hydrofobitního indexu je stanoven od nejhydrofilnějšího argininu (-4,5) až po nejhydrofobnější isoleucin (4,5). Hydrofobitní index je dále vypočítán jako poměr hydrofilicity a hydrofobicity daných aminokyselin. Pokud jsou hlavní řetězce aminokyselin namířeny dovnitř tunelu, pak se pro výpočet hydropatie používá tabelovaná hodnota pro glycin (Gly).

Polarita

Hodnota polarity je průměrem polarit pro jednotlivé aminokyseliny odvozená z metody Zimmermana a kol. [90]. Podobně jako u předchozích fyzikálně-chemických vlastností má i tato vlastnost danou škálu polarit. Tato škála vychází od zcela nepolárních aminokyselin (Ala, Gly), jejichž hodnota je nulová. Dále se hodnota zvyšuje až k polárním residuům, jako je např. serin (1,67) až k nabitým aminokyselinám jako je kyselina glutamová (49,90) či arginin (52,00). Pro výpočet polarity se v případě natočení hlavního řetězce do tunelu používá tabelovaná hodnota polarity pro asparagin (Asn).

Mutabilita

Mutabilita je stanovována na základě práce Jonese a kol. [91]. Výsledná hodnota mutability je určena jako průměr relativních mutabilit jednotlivých aminokyselin, které rámují daný kanál či pór. Při výpočtu mutability nejsou brána v potaz residua, jež jsou do tunelu orientována svým hlavním řetězcem.

Náboj

Posledně jmenovaný náboj je vypočítáván podle zastoupení nabitých aminokyselin, jako jsou kladně nabitý arginin (Arg) a lysin (Lys) a ze záporně nabitých pak kyselina asparagová (Asp) a glutamová (Glu). Výsledný náboj je vypočten na základě průměru jednotlivých nábojů na postranních řetězcích aminokyselin.

Formát zadávání výpočtu

Serverová verze MOLE 2.0 vyžaduje specifický formát XML pro zadání výpočtu „ničeho.“

Specifikace vstupu (Input)

V tomto základním nastavení zadáváme umístění a strukturu či struktury, na kterých bude výpočet tunelů, kavit a porů proveden. Prvním bodem je specifikace vstupního souboru.

`<Input>` tag

- specifies the input filename

`<Input>1TQN.pdb</Input>`

- specifies the input chains (not case sensitive)

`<Input SpecificChains="">` = all chains are selected

`<Input SpecificChains="a">` = chain A is selected

`<Input SpecificChains=" ">` = "nameless chain" is selected

`<Input SpecificChains=" ABC">` = chains "nameless chain", A, B, and C are selected

Vkládanou molekulou je v našem příkladu molekula cytochromu P450 3A4 s PDB ID 1TQN. Dále, jak vidíme na příkladu, je zde možnost nastavení výběru jednotlivých částí makromolekuly, např. zda chceme do výpočtu zahrnout jen určitý řetězec daného polymeru, což provádíme v položce *Input SpecificChains*.

Pracovní složka (Working Directory)

Po specifikaci vstupních souborů provedeme popis pracovní složky, do níž se bude výpočet ukládat.

`<WorkingDirectory>`

- specifies the working directory

`<WorkingDirectory>./output/</WorkingDirectory>`

Nastavení neaktivních residuí (NonActiveResidues)

Pokud je třeba nějaký atom z výpočtu vynechat, např. pokud nechceme, aby byl do výpočtu zahrnut hemový kofaktor proteinu, můžeme jej zde nastavit jako tzv. *Non active residue*, čímž zajistíme, že si ho již program při výpočtu tunelů nebude všimát.

`<NonActiveResidues>`

`<Residue Name="HEM" Chain="A" SequenceNumber="508" />`

`</NonActiveResidues>`

V tomto případě bude HEM 508 brán při výpočtu jako neaktivní residuum a tudíž nebude do výpočtu zahrnut.

Specifikace počátečního bodu (Start point specification)

Pro nastavení počátečního bodu využijeme tuto část. Jako počáteční residuum můžeme vybrat jednu či více aminokyselin, popřípadě je možno zadat přesnou pozici v rámci xyz souřadnic získaných z PDB souboru, tzv. „*exact point*.“ Exact point, tedy přesný bod, umístí počáteční bod na nejbližší čtyřúhelník.

```
<Residue Chain="X" Name="CYS" SequenceNumber="123" />
<Point X="x" Y="y" Z="z" />
<ExactPoint X="x" Y="y" Z="z" />
```

Zadávání parametrů

Serverová verze rovněž nabízí širokou škálu pokročilých parametrů, kterými je možno ovlivnit výsledné tunely, kavity a póry. Parametry jsou stejné jako ve verzi Desktop. Přehled parametrů:

```
<Params> tag attributes
- ProbeRadius = real number
- InteriorThreshold = real number
- SurfaceCoverRadius = real number
- OriginRadius = real number
- IgnoreHETAtoms = 0 for false/anything else for true
- MinDepth = integer, Minimum cavity depth in the number of
tetrahedrons (default = 8)
- BottleneckRadius = real number
- BottleneckTolerance = real number
- MaxTunnelSimilarity = real number (percentage 0.0-1.0)
```

Export

Jak již bylo zmíněno, vypočítané kanály a jejich vlastnosti jsou generovány ve výstupu ve formátu XML. V této části zadáváme, co všechno chceme ve výsledku získat. Nejčastějším požadavkem pro export bude nejspíše vytvoření souboru ve formátu PDB, který umožňuje vizualizaci v grafických nástrojích, jako je PyMol. Dále zde můžeme nastavit, zda chceme, či nechceme exportovat i kavity a póry.

```
<Export> tag attributes
- Mesh = 0/anything, determines if .mesh files are generated
```


- MeshGz = 0/anything, determines if .mesh.gz files are generated
- Cavities = 0/anything, determines if "cavity files" are generated
- PyMol = 0/anything, determines if "pymol files" are generated
- PDB = 0/anything, determines if "PDB exports" are generated
- MeshDensity = real number, determines density of exported meshes
- ShortOutput = 0/anything, if enabled, short information about tunnels is printed out to the console
- Pores = 0/anything, determines if pores are computed (both merge and auto pores)
- PDBId - if present, uses this in PyMol scripts

10 Přílohy na CD

1. Berka K, Hanák O, Sehnal D, Banáš P, Navrátilová V, Jaiswal D, Ionescu C-M, Svobodová Vareková R, Koca J, Otyepka M: **MOLEonline 2.0: interactive web-based analysis of biomacromolecular channels**. Nucleic Acids Res. 40 (2012) W222–W227
2. Sehnal D., Svobodová-Vařeková R., Berka K., Pravda L., Navrátilová V., Banáš P., Ionescu C.-M., Geidl S., Otyepka M., **MOLE 2.0: Advanced Approach for Analysis of Biomacromolecular Channels.**, *submitted*