

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

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



Simulace Cytochrom P450 reduktázy

Diplomová práce

Autor:

Bc. Martin Šrejber

Školitel:

doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.

Studijní program:

N 1407 Chemie

Studijní obor:

Fyzikální chemie

Forma studia:

Prezenční

Olomouc 2016

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

Faculty of Science

Department of Physical Chemistry



Simulation of Cytochrome P450 Reductase

Diploma Thesis

Author:

Bc. Martin Šrejber

Supervisor:

doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.

Study programme:

N 1407 Chemistry

Major:

Physical Chemistry

Study form:

Daily

Olomouc 2016

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a veškeré literární prameny použité v této práci jsem uvedl v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne:

Martin Šrejber

Tímto bych rád poděkovat vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Karlu Berkovi, Ph.D. a studentskému kolektivu teoretické chemie místnosti 3.004 za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích. Dále bych rád poděkoval přítelkyni Janě a své rodině za podporu během studia.

Bibliografická identifikace

Autor: Bc. Martin Šrejber

Název práce: Simulace Cytochrom P450 reduktázy

Typ práce: Diplomová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.

Rok obhajoby: 2016

Pracoviště: Katedra fyzikální chemie, UP v Olomouci

Abstrakt:

Cytochrom P450 reduktáza (CPR) je klíčovým proteinem mikrosomálních elektronových transportů. Na cytosolární straně endoplazmatického retikula tvoří CPR komplexy s řadou redoxních partnerů a zprostředkovává zde elektronový transport. Tímto je nepřímo zapojen do procesu biodegradace látek xenobiotického a endobiotického původu. V krystalech se CPR vyskytuje buď v uzavřené, nebo v otevřené konformaci, přičemž jejich přechod je spojen s rozsáhlou konformační změnou struktury proteinu. V této práci byly simulovány různé konformace CRP spolu s konformační změnou, kterou protein podstupuje. Dále byl popsán proces přenosu redukčního ekvivalentu mezi plně redukovanou formou kofaktoru NADPH a kofaktorem FAD. Závěrem byl připraven a simulován model komplexu CPR s redoxním partnerem cytochromem P450 3A4 ukotvených na fosfatidylcholinové membráně.

Klíčová slova:

cytochrom P450 reduktáza, molekulárně dynamické simulace, metadynamické simulace, elektronový transport

Počet stran: 64

Jazyk: Český

Bibliographic identification**Author:** Bc. Martin Šrejber**Title:** Simulation of Cytochrome P450 Reductase**Type of Thesis:** Diploma**Supervisor:** Assoc. Prof. RNDr. Karel Berka, Ph.D.**Department:** Department of Physical Chemistry, UP Olomouc**The Year of Presentation:** 2016**Abstract:**

Cytochrome P450 reductase (CPR) plays key role in microsomal electron transport chains. CPR binds all variety of redox partners on the cytosolic side of endoplasmic reticulum. By this, CPR is indirectly involved in processes of biodegradation of compounds of xenobiotic and endobiotic origin. CPR crystal structures can be found in close and open conformation while their transition lead to great conformational changes in protein structure. Here, we performed simulations of CPR in different conformation along with simulation of protein conformation changes. In addition, we describe the process of transfer of reduction equivalent between fully reduced form of NADPH cofactor and FAD cofactor. Finally, we created and simulated model of complex of CPR with its redox partner cytochrome P450 3A4 on phosphatidylcholine membrane.

Keywords:

cytochrome P450 reductase, molecular dynamics simulations, metadynamics simulations, electron transport

Number of Pages: 64**Language:** Czech

„Don' t Eat That Yellow Snow!“

F. Zappa; „Gromacs Quotes“

Seznam použitých zkratk

CPR	Cytochrom P450 reduktáza
CYP	Cytochrom P450
ET	Elektronový transport
ER	Endoplazmatické retikulum
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
CYB5	Cytochrom b ₅
MM	Molekulová mechanika
MD	Molekulová dynamika
MTD	Metadynamika
CV	kolektivní proměnné (z angl. Collective Variables)
DOPC	Dioleoylfosfatidylcholin

1. ÚVOD	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 CYTOCHROM P450 REDUKTÁZA	11
2.1.1 STRUKTURA CYTOCHROM P450 REDUKTÁZY	12
2.1.2 INTRAPROTEINOVÝ ELEKTRONOVÝ TRANSPORT CPR	16
2.1.3 REDOXNÍ PARTNEŘI CYTOCHROM P450 REDUKTÁZY	19
2.2 TEORETICKÁ CHEMIE	23
2.2.1 MOLEKULOVÁ MECHANIKA	24
2.2.1.1 Příspěvky vazebných interakcí	24
2.2.1.2 Příspěvky nevazebných interakcí	27
2.2.2 MOLEKULOVÁ DYNAMIKA	29
2.2.3 METADYNAMIKA	31
3. METODY	33
3.1 PŘÍPRAVA MODELŮ	33
3.2 NASTAVENÍ MD SIMULACÍ	34
4. VÝSLEDKY	36
4.1 SIMULACE UZAVŘENÉ FORMY CPR	36
4.2 SIMULACE REDOXNÍ REAKCE METADYNAMIKOU	42
4.3 SIMULACE OTEVŘENÉ FORMY CPR	45
4.4 SIMULACE PROCESU UZAVÍRÁNÍ CPR	48
4.5 KOMPLEX CPR-CYP	52
5. ZÁVĚR	56
6. SUMMARY	57
7. POUŽITÁ LITERATURA	58
8. DOPLŇUJÍCÍ MATERIÁLY	63

1. Úvod

Cytochrom P450 reduktáza (CPR) je multidoménový protein ukotvený na cytosolární straně membrány endoplazmatického retikula. Zde se váže na řadu redoxních partnerů například cytochromy na P450 a zprostředkovává jejich směrem elektronový transport. CPR se tak stává zcela nepostradatelným proteinem mikrosomálních elektronových transportních řetězců.

Jak je známo z krystalových struktur, CPR se může vyskytovat v uzavřené a otevřené konformaci. V uzavřené konformaci kompaktní struktura proteinu umožňuje intraproteinový elektronový transport mezi dvěma flavinovými kofaktory (FAD a FMN) a nukleotidovým NADPH kofaktorem. Redukovaný CPR následně prochází změnou konformace ve směru flexibilní otevřenější struktury. Její hlavní funkcí je pak vazba na redoxní partnery a zprostředkování meziproteinového elektronového transportu.

V současné době jsme díky rozvoji výpočetní chemie a nárůstu výpočetní síly schopni pomocí molekulové dynamiky studovat chování proteinů, jakými je například cytochrom P450 reduktáza na atomistické úrovni na nanosekundové škále. Pomocí pokročilých vzorkovacích metod – např. metadynamiky – je pak možné dosáhnout i na méně časté události, či děje, které by byly nad možnosti klasické molekulové dynamiky.

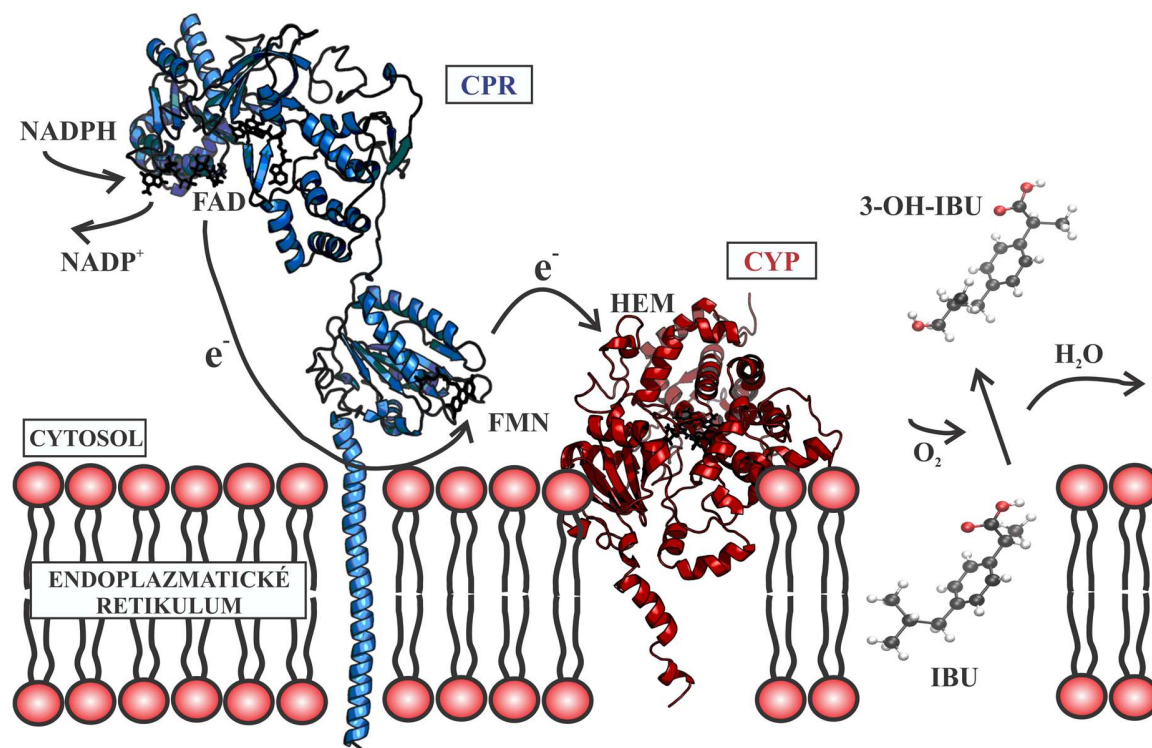
Cílem mé práce bylo modelování jednotlivých forem CPR ukotvených na membráně, procesu jejich konformačních změn a finální tvorba modelu CPR se svým redoxním partnerem cytochromem P450 ukotvených na membráně. Dále jsem studoval mechanismus prvního z řady intraproteinových elektronových transportů v rámci CPR – přenosu elektronu z plně redukovaného kofaktoru NADPH na kofaktor FAD. Výsledkem je nakonec komplexní popis jednotlivých forem CPR, který může vést k hlubšímu porozumění chování tohoto klíčového metabolického proteinu.

2. Teoretická část

2.1 Cytochrom P450 reduktáza

Cytochrom P450 reduktáza (CPR, také CYPOR, P450R) je multidoménový protein lokalizovaný na endoplazmatickém retikulu (mikrosomech). Na cytosolové straně membrány endoplazmatického retikula (ER) vytváří komplexy se svými redoxními partnery cytochromy P450 (CYPy). CPR zde funguje jako elektronový přenašeč dodávající CYPům elektrony potřebné ke katalytickým metabolickým reakcím xenobiotik a endobiotik. Zdrojem elektronů je plně redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH), který je řadou dílčích redoxních reakcí zahrnujících flavinadeninukleotid (FAD) a flavinmononukleotid (FMN) oxidován a uvolněné elektrony pak slouží k oxidativním reakcím charakteristickým pro cytochromy P450.^[1] Vzájemný poměr CPR vůči CYPům na mikrosomální membráně činí 1 : 15.^[2] Tímto způsobem jsou veškeré mikrosomální CYPy závislé na interproteinovém elektronovém transportu (ET) a nepřímo se tak cytochrom P450 reduktáza podílí na velkém množství fyziologických procesů.

První důkaz o existenci proteinu se datuje do roku 1950 kdy B. L. Hocker z prasečích jater purifikoval a následně vykrytalizoval protein redukující cytochrom c – CPR. Dle schopnosti redukovat cytochrom c byla cytochrom P450 reduktáza původně považována za cytochrom c reduktázu.^[3] V roce 1962 byl protein (stále ještě jako cytochrom c reduktáza) lokalizován v mikrosomech, čímž byla vyvrácena mylná představa, že se protein účastní mitochondriálního dýchacího řetězce.^[4,5] V roce 1969 byl CPR odlišen od cytochromu c reduktázy a vznikl základní model katalytické cesty pro ω -hydroxylační reakce skládající se z cytochromu P450, cytochromu P450 reduktázy a lipidů.^[6] Ukázka směru přenosu elektronů a jednotlivých účastníků oxidace ibuprofenu naleznete na Obrázek 1.



Obrázek 1 Schéma znázorňující zapojení CPR do katalytického procesu metabolismu léčiv. Po navázání plně redukovaného NADPH dochází k intraproteinovému elektronovému transportu skrze sérii flavinových kofaktorů (FAD, FMN) za následného uvolnění oxidovaného NADP⁺. Elektrony poté putují do aktivního místa CYPu, kde jsou hemovou prostetickou skupinou využity pro celou řadu oxidačně-redukčních dějů. Příkladem může být hydroxylace ibuprofenu (IBU) za tvorby 3-hydroxyibuprofenu (3-OH-IBU).

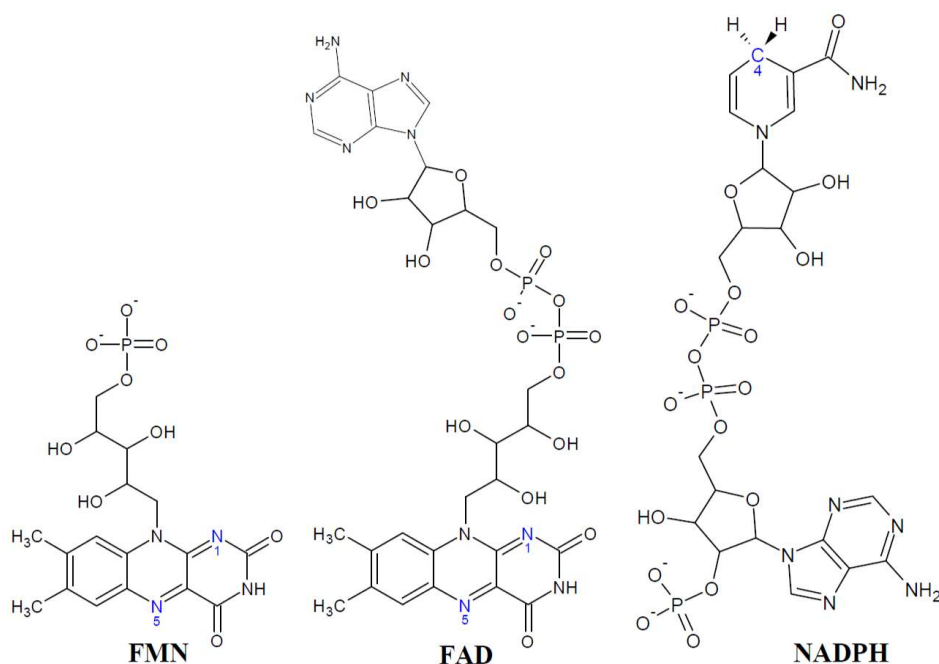
2.1.1 Struktura cytochrom P450 reduktázy

Cytochrom P450 reduktáza je kódován jediným genem nacházejícím se na chromosomu 7 v lokusu 7q11.2.^[7] V sekvenci proteinu se nachází 680 aminokyselin. CPR patří spolu s bakteriální sířičitanovou reduktázou (SiR)^[8], NO syntázou (NOS)^[9], methionin syntáza-reduktázou (MSR)^[10] a cytoplasmatickou „novou“ reduktázou 1 (NR1; z anglického novel reductase 1)^[11] do rodiny diflavinových reduktáz tj. enzymů obsahujících ve své struktuře FAD a FMN kofaktory sloužící jako elektronové přenašeče.

Do membrány endoplasmatického retikula je CPR ukotven N-terminální hydrofobní transmembránovou doménou tzv. **kotvou**. Kotva nese strukturální motiv α -šroubovice a má

zásadní roli jak pro správnou orientaci proteinu na membráně, tak pro jeho funkci. Při delecii kotvy je CPR schopen redukovat cytochromy c a malé organické molekuly, ale zcela ztrácí schopnost redukovat cytochromy P450.^[6,12]

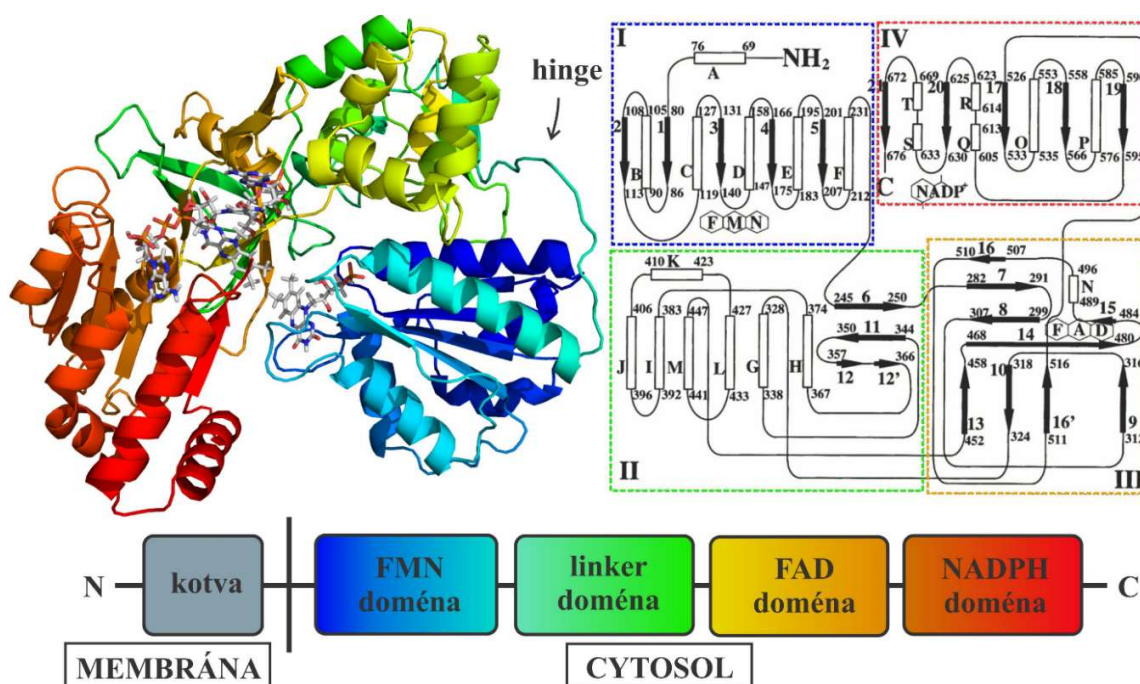
Na cytosolové straně ER jsou na kotvu navázány zbylé čtyři proteinové podjednotky – FMN doména, linker doména, FAD doména a NADPH doména. Sekundární struktura **FMN domény** nesoucí flavinmononukleotid je uspořádána do pěti vláken paralelních β -skládaných listů obklopených pěti α -šroubovicemi. Na ni navazující tzv. **linker doména** nese strukturální motiv α -šroubovice. **FAD doména** obsahující flavinadeninindinukleotid je uspořádána do struktury anti-paralelně orientovaných β -skládaných listů. Poslední podjednotkou je **NADPH doména** nesoucí motiv pěti paralelních β -skládaných listů ohraničených α -šroubovicemi. Poslední částí je tzv. **hinge** mezi linkerem a FMN doménou. Tato krátká flexibilní smyčka je v krystalech nerozlišená.^[13] Struktury kofaktorů jsou zobrazeny v Obrázek 2.



Obrázek 2 Struktury kofaktorů FAD, FMN a NADPH s vyznačenými místy přenosu redukčních ekvivalentů. U flavinových kofaktorů FAD a FMN jsou to dusíky N5 a následně N1 nacházející na isoalloxazinových částech kofaktorů. U NADPH dochází k reakci na atomu uhlíku C4 vázaném na nikotinamidovém kruhu.

Z krystalových struktur jsou známy dvě strukturální formy cytochrom P450 reduktázy: kompaktní uzavřená a flexibilní otevřená konformace.

V **uzavřené konformaci** (Obrázek 3) jsou flavinové kofaktory v bezprostřední blízkosti a po navázání NADPH u nich dochází k přímému intraproteinovému elektronovému přenosu. Vzdálenost isoalloxazinových částí flavinových kofaktorů činí $<5 \text{ \AA}$ a planární části ležící v rovině spolu svírají vzájemný úhel $\sim 150^\circ$.

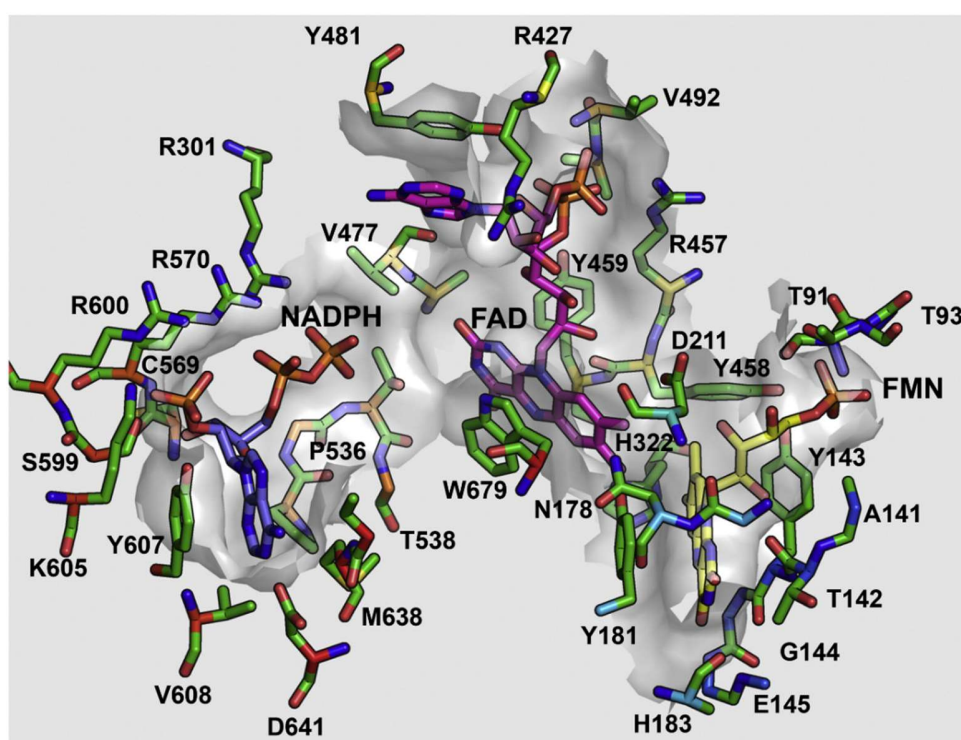


Obrázek 3 Strukturální popis CPR. Struktura uzavřené konformace CPR je vlevo nahoře (PDBID 3QE2). Dole je ukázáno řazení domén v sekvenci. Na N-terminálním konci se po transmembránové kotvě nachází FMN doména spojená s linker doménou flexibilní smyčkou tzv. hinged. Dál pak navazuje FAD doména a na C-terminálním konci je NADPH doména. Jednotlivé podjednotky jsou barevně rozlišeny a ve 3D struktuře zobrazeny v cartoon reprezentaci, kofaktory pak v reprezentaci sticks. Schéma vpravo nahoře pak zobrazuje prvky sekundární struktury proteinu. Převzato a upraveno z [13].

Flavinové kofaktory jsou ve struktuře stabilizovány řadou nevazebných interakcí (Obrázek 4). Po obou stranách isoalloxazinového kruhu FMN kofaktoru se nacházejí fenolové skupiny blízkých aminokyselin. Na tzv. *re-* straně¹ je FMN stabilizován Tyr143, na

¹ *re-* strana – metylové skupiny se na flavinovém kruhu nacházejí na pravé straně

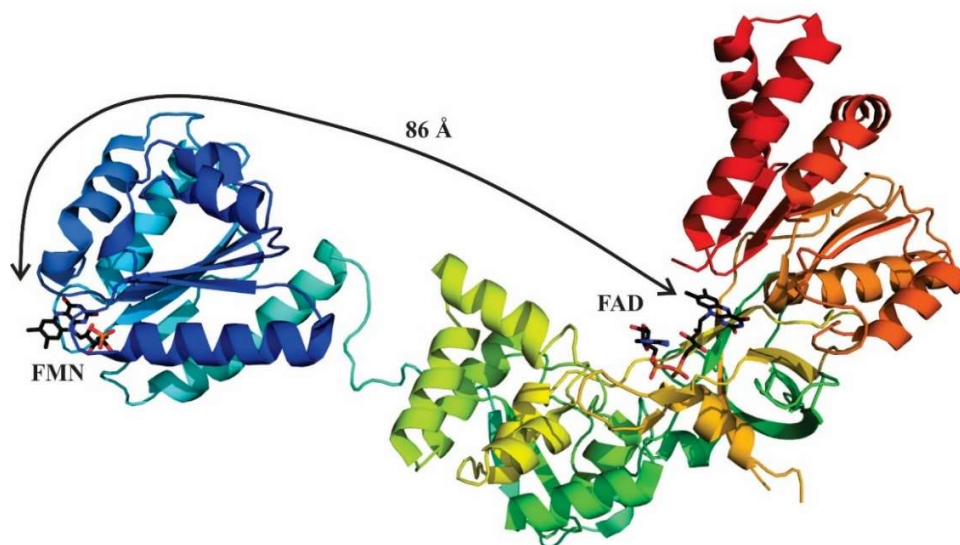
si- straně² pak Tyr181. Také FAD kofaktor je podobným způsobem fixován ve struktuře, a to fenolovou skupinou Tyr459 na *si*- straně a na *re*- straně pak Trp679. Trp679 hraje klíčovou roli při regulaci elektronového transportu mezi NADPH a FAD. Fosfátová část FAD kofaktoru interaguje s postranními aminokyselinovými řetězci za vzniku solných můstků s Arg457 a řadou vodíkových vazeb s Val492-Tyr459. Adeninový kruh FAD je stabilizován interakcí s Tyr481. Adeninová část NADPH kofaktoru interaguje s Tyr607.^[13,14]



Obrázek 4 Popis vnitřní struktury CPR a vyobrazení aminokyselin v bezprostřední blízkosti kofaktorů. Převzato z ^[1].

Po intraflavinovém elektronovém přenosu dochází k výrazným konformačním změnám proteinu, které mají za následek přechod CPR do **otevřené konformace** (Obrázek 5). V této konformaci jsou od sebe katalytické domény výrazně vzdáleny a po ztrátě vzájemných interakcí jednotlivých podjednotek z uzavřené struktury se protein stává více flexibilním. Vzdálenost FAD a FMN kofaktorů v otevřené formě je 86 Å. V této formě se předpokládá, že FMN doména váže své redoxní partnery.^[15]

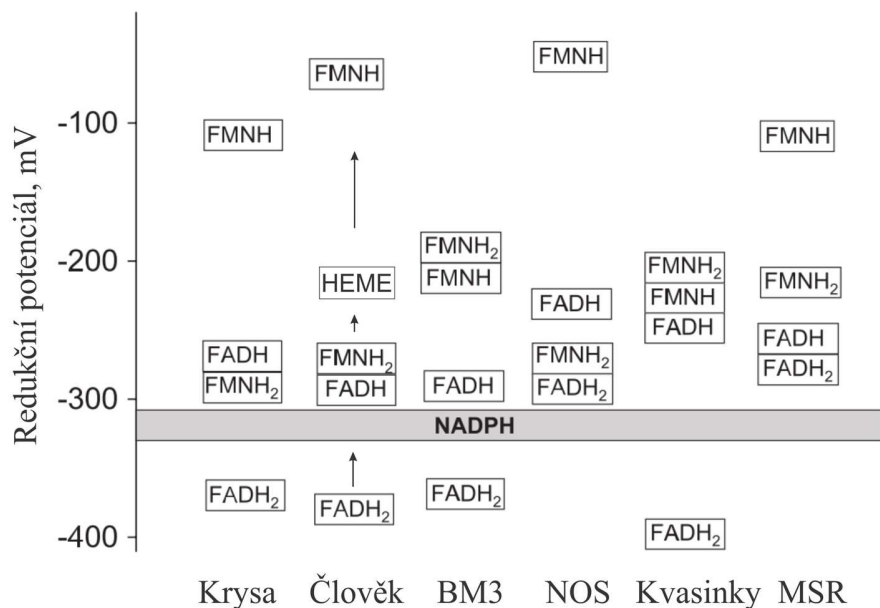
² *si*- strana – metylové skupiny se na flavinovém kruhu nacházejí na levé straně



Obrázek 5 Struktura otevřené konformace CPR (PDBID: 3FJO). Vzdálenost FAD a FMN kofaktorů je 86 Å. Protein je zobrazen v cartoon reprezentaci, kofaktory pak v reprezentaci sticks.

2.1.2 Intraproteinový elektronový transport CPR

Cytochrom P450 reductáza je klíčovým enzymem biodegradace látek jak endobiotického původu, tj. látek organismem přirozeně produkováných, tak xenobiotik, tedy látek pro organismus cizorodých, přijatých například ve formě léčiva. Zde plní CPR roli elektronového přenašeče dodávajícího elektrony proteinům přímo odpovědným za biodegradaci malých molekul. Elektronového transportního řetězce se účastní přenosem redukčních ekvivalentů skrze kofaktory vázané ve struktuře. Ty během těchto reakcí fungují jako akceptory a donory těchto ekvivalentů a mění své redoxní stavy dle závislosti na redoxním potenciálu to ve směru méně záporného potenciálu – např. u člověka od plně redukované formy FADH_2 ke stabilnímu FMNH (Obrázek 6).^[16]

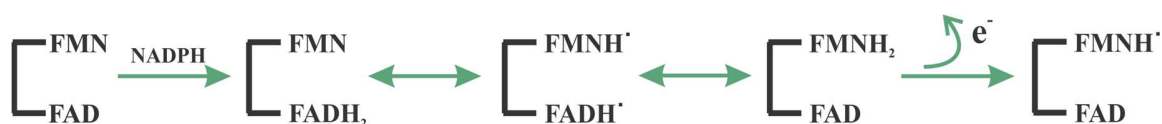


Obrázek 6 Redoxní potenciály lidské, krysí a kvasinkové CPR, cytochromu BM3, NO syntázy a methionin-syntáza reduktázy určující směr elektronového transportu. Elektronový přenos probíhá ve směru menší negativity redukčního potenciálu a je pro různé reduktázy je specifický. Hodnota redoxního potenciálu hemu je -220 mV. Převzato a upraveno z [16].

V elektronovém transportním řetězci vystupuje molekula NADPH a to ve dvou redoxních stavech – NADPH pro redukovanou formu; NADP^+ pro formu oxidovanou. Redukční ekvivalenty jsou přenášeny z atomu uhlíku C4 plně redukovaného NADPH na isoalloxazinové kruhy flavinových kofaktorů FAD a FMN. Ty se mohou v rámci řetězce nacházet ve formě plně oxidované (neobsahující žádný redukční ekvivalent), semichinonové (redoxní ekvivalent přenesen na atom dusíku N5 atom) a hydrochinonové tj. plně redukované (redoxní ekvivalenty přeneseny na postupně na dusíkové atomy N5 a následně na N1). Pozice reakčních center jsou znázorněny také na Obrázku 2.

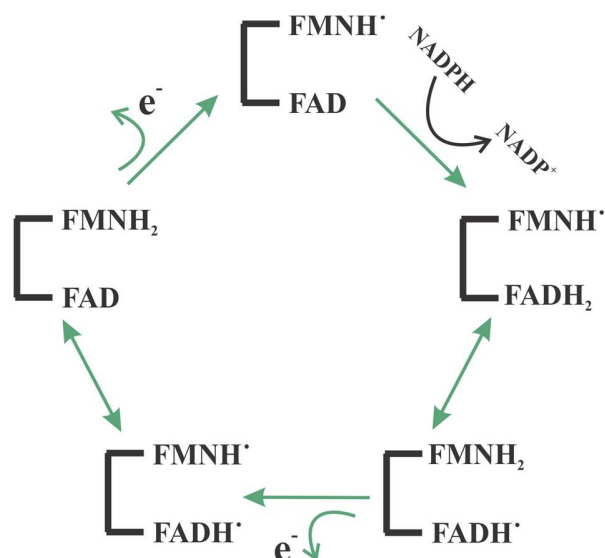
První částí elektronového transportního řetězce je tzv. „přípravná“ reakce (z anglického „priming reaction“). Do této vstupuje plně oxidovaná forma CPR s oběma flavinovými kofaktory v oxidovaném stavu (FAD/FMN). Po navázání plně redukované formy $\text{NADPH} + \text{H}^+$ dojde k přenesení redukčního ekvivalentu formou hydridového iontu (H^-) za tvorby hydrochinonu FADH_2 tj. její plně redukované formy FAD (FADH_2/FMN). Ve druhém kroku pak přecházejí oba kofaktory do semichinonové formy ($\text{FADH}^\cdot/\text{FMNH}^\cdot$).

Poslední částí je tvorba (FAD/FMNH₂) s plně redukovaným FMNH₂ kofaktorem, který je elektronovým donorem pro řadu redoxních partnerů. Těmito reakcemi CPR dostává semichinonovou formu flavinmononukleotidu (FAD/FMNH[•]), která je stabilní a ve fyziologickém prostředí převládá (Obrázek 7).



Obrázek 7 Schéma přípravné reakce elektronového řetězce CPR. Protein do ní vstupuje ve zcela oxidovaném stavu a na jejím konci se nachází ve stabilní semichinonové formě (FAD/FMNH[•]). Převzato a upraveno z ^[17].

Po přípravné reakci pak CPR (FAD/FMNH[•]) vstupuje do cyklu (Obrázek 8), v jehož průběhu jsou elektronovým akceptorům postupně transportovány dva elektrony. První reakcí cyklu je přijetí další redukované formy NADPH a přenosu redukčního ekvivalentu za tvorby systému hydrochinon/semichinon (FADH₂/FMNH[•]). Následuje přenos elektronu mezi flavinovými kofaktory (FADH/FMNH₂) a po něm transfer prvního elektronu redoxnímu partnerovi (FADH[•]/FMNH[•]). Znovu dochází k intraflavinovému transportu (FAD/FMNH₂) a cyklus je ukončen odevzdáním druhého elektronu elektronovému akceptoru, po kterém se vrací do původního stavu stabilního semichinonu (FAD/FMNH[•]). V obou případech je elektron přenášen z plně redukované formy FMNH₂.^[17]

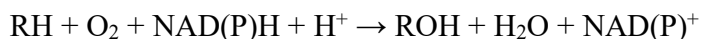


Obrázek 8 Schéma elektronového transportního cyklu CPR. Po vstupu dvou elektronů z plně redukovaných NADPH kofaktorů a jejich přenesení elektronovým akceptorům se CPR vrací do stabilního semichinonového stavu (FAD/FMNH•).

2.1.3 Redoxní partneři cytochrom P450 reduktázy

Hlavní funkcí cytochrom P450 reduktázy je přenos redukčních ekvivalentů svým redoxním partnerům. Mezi nejvýznamnější partnery patří např. cytochromy P450, cytochrom b5, heme oxygenáza a skvalen monooxygenáza.

Cytochromy P450 jsou enzymy obsahující v aktivním místě hemovou prostetickou skupinu. Jsou zodpovědné za metabolismus celé řady látek, jakými jsou např. xenobiotika a endobiotika. Podstatou těchto reakcí monooxygenace substrátu za vzniku více polárnějšího metabolitu. Obecně lze monooxygenační reakce zapsat jako



kde RH představuje nepolární substrát a ROH metabolit. NAD(P)H a H⁺ pomocí CPR dodávají elektrony reakci a NAD(P)⁺ je oxidovaná forma tohoto kofaktoru CPR.^[18]

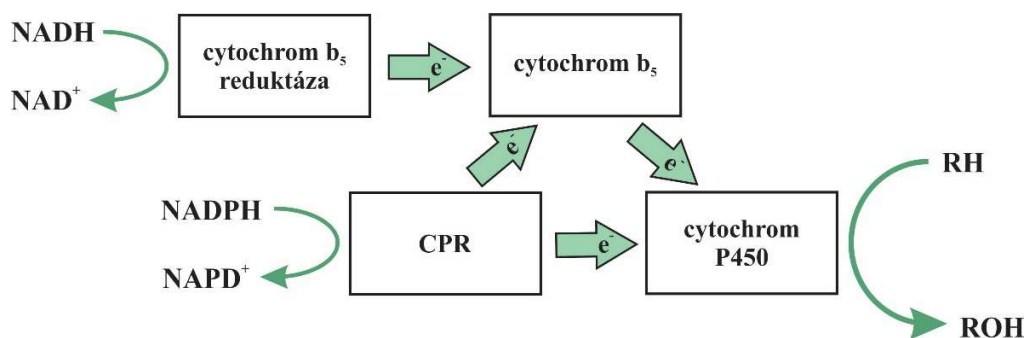
Lidské cytochromy P450 lze rozdělit do 57 rodin. Také lze rozdělovat podle metabolizovaných látek:^[19,18]

- steroly (1B1, 7A1, 7B1, 8B1, 11A1, 11B1, 11B2, 17A1, 19A1, 21A2, 27A1, 39A1, 46A1, 51A1)
- xenobiotika (1A1, 1A2, 2A6, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1, 3A4, 3A5, 3A7)
- mastné kyseliny (2J2, 4A11, 4B1, AF12)
- eikosanoidy (4F2, 4F3, 4F8, 5A1, 8A1)
- vitamíny (2R1, 24A1, 26A1, 26B1, 26C1, 27B1)
- a s neznámými substráty (2A7, 2S1, 2U1, 2W1, 3A43, 4A22, 4F11, 4D22, 4V2, 4X1, 4Z1, 20A1, 27C1).

Podle klasifikace na základě uspořádání proteinů při elektronovém transportu patří savčí cytochromy P450 vážící se na CPR do *Třídy II.* tj. třídy mikrosomálních CYPů ukotvených na membráně.

Speciálním případem jsou pak bakteriální CYPy spadající do *Třídy VIII.*, které tvoří komplexy neukotvené v ER, ale volně se vyskytující v cytosolu. Hlavními zástupci této třídy jsou flavocytochromy CYP102A1 (neboli cytochromy P450BM3) vzniklé sloučením CYPů a katalytických domén svých redoxních partnerů. Cytochromy P450BM3 pak obsahují kromě molekul hemu vlastní aparát flavinových kofaktorů poskytujících redukční ekvivalenty.^[20,21]

Cytochromy b₅ (CYB5) jsou malé (16.7 kDa), membránově vázané hemoproteiny, jejichž struktura se skládá pouze z 6 α -šroubovic a 5 vláken β -skládaných listů. CYB5 jsou elektronovými přenašeči s funkcí elektronových akceptorů i donorů. Elektrony přijímají od svého redoxního partnera cytochromu b₅ reduktázy i cytochrom P450 reduktázy. Elektrony se pak dále předávají cytochromům P450 (Obrázek 9).^[22,23]



Obrázek 9 Schéma propojení redoxních partnerů s cytochromem b₅. CYB5 funguje jako mediátor elektronů pro cytochromy P450. Elektrony může získat od cytochromu b₅ reduktázy i CPR. Převzato a upraveno z [23].

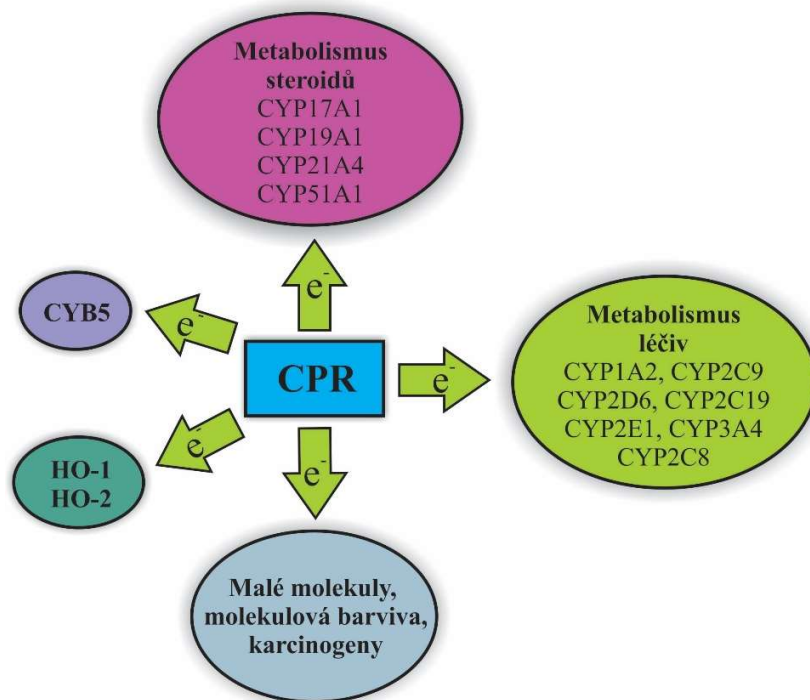
Heme oxygenázy (HO-1 a HO-2) jsou enzymy způsobující katabolismus molekul hemu vázaných v mikrosomálních cytochromech P450. Jedná se o autokatalytickou reakci, ve které molekula hemu vystupuje jak v roli substrátu tak koenzymu. Při tříkrokové biodegradaci (hem → *α-meso*-hydroxyhem → verdohem → biliverdin) jsou spotřebovávány elektrony dodané CPR a molekuly kyslíku podle reakce



za vzniku biliverdinu, oxidu uhelnatého (CO), Fe²⁺ a vody.^[24,25]

Skvalen monooxygenáza (též skvalen epoxidáza) je stejně jako cytochrom P450 reduktáza flavinovým enzymem obsahujícím FAD kofaktor. Neváže však NADPH a redukční ekvivalenty získává od CPR. Funkcí skvalen monooxygenázy je biodegradace skvalenu na 2,3-oxidoskvalen nesoucím epoxidovou skupinu (cyklický ether). Tato reakce je zásadním krokem následné biosyntézy sterolů.^[26]

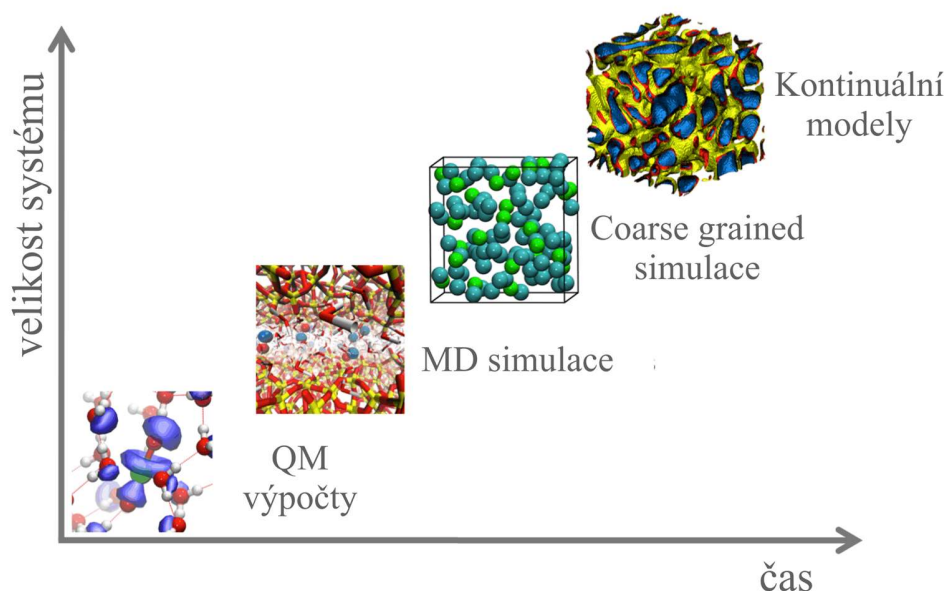
Kromě těchto redoxních partnerů jsou CPR schopny přímo dodávat elektrony některým malým organickým molekulám (Obrázek 10).^[27,28]



Obrázek 10 Schéma znázorňující různé biochemické procesy, ve kterých je CPR zahrnut. Cytochromy P450 reductázy zprostředkovávají elektronový cytochromům P450 zodpovědným například za metabolismus léčiv a steroidních hormonů. Dále je také donorem elektronů prostředníkovi elektronového přenosu cytochromu b5 či heme oxygenáze. Na přísunu elektronů jsou též závislé některé malé organické molekuly. Převzato a upraveno z ^[1].

2.2 Teoretická chemie

Teoretická chemie je rozsáhlým vědní obor zabývající se problematikou modelování chování chemických otázek. Umožňuje studovat chemické otázky na různých úrovních a pomáhá doplňovat a překračovat fyzikální limity experimentálních technik. Z hlediska velikosti studovaných systémů metodami výpočetní chemie jsme schopni studovat systémy od velikosti jednotlivých atomů až po kontinuální modely simulující mezoskopické vlastnosti látek. U časových měřítek se pohybujeme od velmi rychlých procesů, jakými jsou femtosekundové elektronové excitace až po mikrosekundové simulace biomakromolekul (Obrázek 11).



Obrázek 11 Schéma znázorňující časovou a velikostní škálu, ve kterém se výpočetní chemie využívá. Kvantově-mechanické (QM) techniky vycházejí z řešení Schrödingerovy rovnice a využívají se k výpočtům elektronických vlastností systémů. Molekulárně-dynamické (MD) simulacemi popisují chování atomů a slouží tak k popisu molekulárních systémů. Hrubozrnné modely (CG; z anglického „Coarse Grained“) využívají aproximace, ve kterém se více atomů (obvykle 3–4) popíše jednou skupinou, tzv. beadem. Díky tomuto zjednodušení je možné CG modely používat pro studium větších systémů jako například membránových pórů nebo větších proteinových komplexů. Speciální případem jsou pak simulace kontinuálních modelů mezoskopických systémů, které se velikostně nacházejí na pomezí mezi mikroskopickými a makroskopickými systémy. Převzato a upraveno z [29].

Studiem elektronových vlastností molekul se zabývá kvantová chemie (**kvantová mechanika** (QM) a **kvantová dynamika** (QD)). Tyto jsou však kvůli výpočetní náročnosti aplikovatelné pouze na menší systémy (většinou <100 atomů). Pro popis mechanických vlastností větších systémů (>1000 atomů) používáme metody **molekulové mechaniky** (MM) a **molekulové dynamiky** (MD), které modelují pohyb atomů pomocí Newtonových pohybových zákonů.^[30]

2.2.1 Molekulová mechanika

Metoda molekulové mechaniky vychází z přiblížení, ve kterém jsou atomy a vazby reprezentovány soustavou „kuliček a pružin“. MM je realizována soustavou jednoduchých algebraických rovnic obsahujících konstanty odvozené ze spektroskopických dat a *ab initio* kalkulací a zcela zanedbává informace o elektronických vlastnostech molekul. Potenciální energie systému je zde pouze funkcí pozic atomů, $E_p = f(R)$. Dalším zjednodušením je i rovnocennost stejných příspěvků energií jednotlivých meziatomových vibrací (např. C-H ve všech methylových skupinách systému) různých molekul, tzv. přenositelnost parametrů. Pro lepší přenositelnost parametrů jsou zaváděny **atomové typy** charakterizující jednotlivé atomy (např. náboj atomu, vdW poloměr, relativní atomová hmotnost, vaznost atomu). Tak dostáváme charakteristické parametry například pro atomy uhlíku v různých hybridizacích (sp^2 pro aromatické kruhy, sp^3 pro methylové skupiny) nebo pro kyslíky v karbonylových skupinách karboxylových kyselin a ketonů.^[31,32]

Jednotlivé příspěvky do výsledné rovnice popisující MM lze rozdělit na příspěvky **vazebných** a **nevazebných** interakcí.

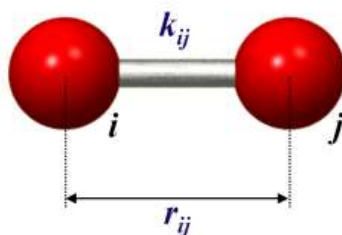
$$E_p = E_{vazebná} + E_{nevazebná} \quad (1)$$

2.2.1.1 Příspěvky vazebných interakcí

Vazebné délky – vycházejí z popisu kovalentních vazeb jako soustavy harmonických oscilátorů popsanych rovnicí

$$E_{vazby}(r_{ij}) = k_{ij}^{vazby} (r_{ij} - r_{ij}^{id})^2 \quad (2)$$

kde k_{ij}^{vazby} je silová konstanta odvozena z Hookova zákona, r_{ij} je momentální vazebná vzdálenost a r_{ij}^{id} je ideální vazebná délka mezi atomy i a j . Krom soustav harmonických potenciálů je možné vazebné délky popsat také kubickou závislostí nebo Morseho potenciálem.

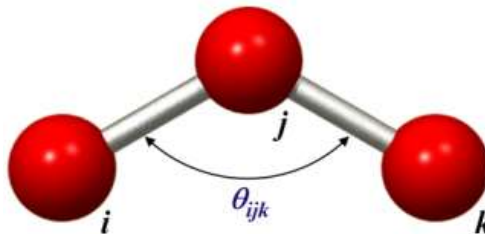


Obrázek 12 Diatomická molekula popsaná modelem molekulové mechaniky; atomy se nacházejí v momentální vzdálenosti r_{ij} a silová konstanta k_{ij}^{vazby} udává rigiditu vazby. Převzato z [33].

Vazebné úhly – jsou popisovány harmonickými potenciály působící na úhel θ_{ijk} :

$$E_{úhlu}(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ijk}^{\theta} (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^{id})^2 \quad (3)$$

kde k_{ijk}^{θ} je silová konstanta působící proti vychýlení od ideální hodnoty úhlu, θ_{ijk} je momentální vazebného úhlu a θ_{ijk}^{id} je ideální hodnota úhlu mezi trojicí vazebných partnerů.

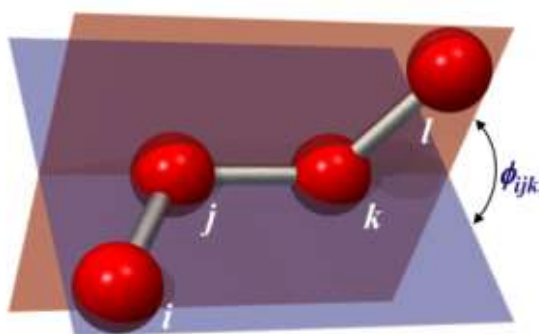


Obrázek 13 Popis vazebného úhlu θ_{ijk} mezi trojicí atomů. Převzato z [33].

Dihedrání úhly – jsou popsány jako úhly, které vzájemně svírají planární části dvojic úhlů (mezi atomy i,j,k a j,k,l) mezi čtveřicí atomů i,j,k a l podle vztahu

$$E_{dihedrálu}(\phi_{ijkl}) = k_{\phi}^{dihedrálu} (1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \phi_{ijkl}^{id})) \quad (4)$$

kde $k_{\phi}^{dihedrálu}$ je silová konstanta, ϕ_{ijkl} momentální hodnota dihedrálu, ϕ_{ijkl}^{id} jeho rovnovážná hodnota a n jeho multiplicita.

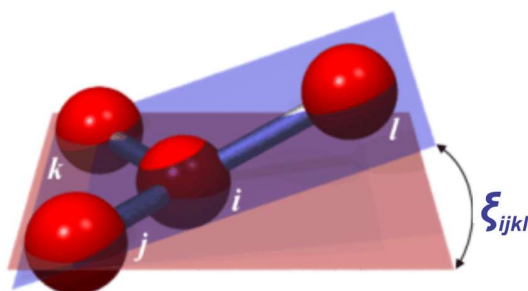


Obrázek 14 Znárodnění dihedráního úhlu ϕ_{ijkl} . Dihedrání úhel je popsán pomocí dvou ploch definovaných úhly mezi trojicemi atomů. Převzato z [33].

Nepřavé dihedrání úhly – jsou zaváděny pro udržení planárních částí molekul v rovině:

$$E_{nepr. dihed.}(\xi_{ijkl}) = \frac{1}{2} k_{\xi}^{dihedrálu} (\xi_{ijkl} - \xi_{ijkl}^{id})^2 \quad (5)$$

kde $k_{\xi}^{dihedrálu}$ je silová konstanta, ξ_{ijkl} je hodnota nepřavého dihedráního úhlu a ξ_{ijkl}^{id} jeho ideální hodnota.



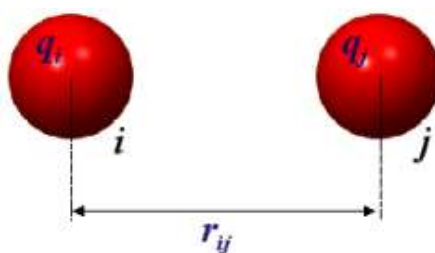
Obrázek 15 Popis nepravého dihedrálního úhlu ξ_{ijkl} vychází ze vzájemných orientací ploch definovaných trojicemi atomů. Zabraňuje porušení rovinných částí planárních molekul. Převzato a upraveno z [33].

2.2.1.2 Příspěvky nevazebných interakcí

Elektrostatické interakce – vycházejí z Coulombova zákona vzájemného působení nabitých částic. Charakter interakce závisí na nábojích částic – pro stejně nabitě částice má odpuzivý charakter, pro různě nabitě pak charakter přitažlivý. Elektrostatické interakce jsou popsány vztahem

$$E_{Coulomb}(r_{ij}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (6)$$

kde ϵ_0 je permitivita vakua, ϵ_r relativní permitivita, q_i a q_j jsou náboje atomů a r_{ij} jejich vzdálenost. Mezi tyto interakce patří interakce typu dvou nabitých částic, nabitá částice-dipól, dipól-dipól a interakce vyšších multipólů.

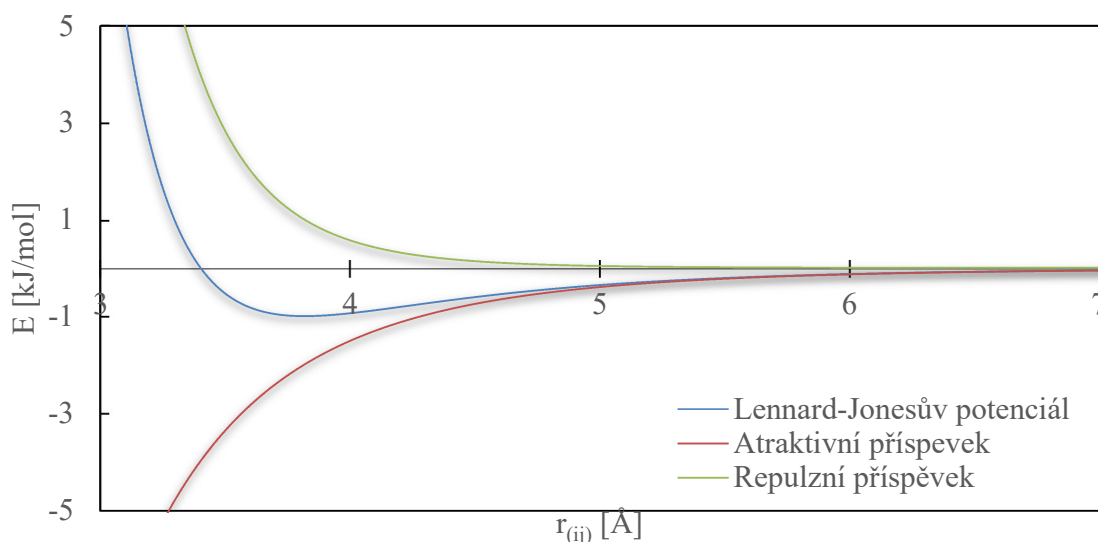


Obrázek 16 Schéma reprezentující vzájemné silové působení atomů nesoucí náboje q_i a q_j . Převzato a upraveno z [33].

van der Waalovy síly – popisují silové působení mezi atomy bez náboje, nejčastěji jsou vyjádřeny Lennard-Jonesovým potenciálem. Rovnici tohoto potenciálu lze rozdělit na dva členy – repulzní a atraktivní a je také někdy nazývána „12-6 potenciál“. První člen rovnice popisuje Pauliho repulzi atomů nacházejících se ve vzdálenosti, kdy dochází k překryvu jejich elektronových orbitalů a u nějž nahrazuje exponenciální závislost členem s dvanáctou mocninou vzdálenosti. Druhý člen vycházející z Londonových disperzí popisuje naopak atrakci atomů působící na sebe na větší vzdálenost, která má zhruba závislost s šestou mocninou vzdálenosti. V nekonečné vzdálenosti atomů je pak potenciál nulový podle vztahu

$$E_{LJ}(r_{ij}) = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (7)$$

kde ϵ_{ij} představuje minimální potenciál interakce nenabitých částic, σ_{ij} představuje vzdálenost částic, ve které je výslednice repulzních a přitažlivých sil nulová a r_{ij} je vzdálenost atomů. Krom Lennard-Jonesova potenciálu lze pro popis van der Waalových interakcí použít například Buckinghamův potenciál.



Obrázek 17 Závislost Lennard-Jonesova potenciálu na vzdálenosti interagujících atomů. Zvlášť jsou uvedeny i atraktivní a repulzní příspěvky.

Vyjádřením jednotlivých rovnic a příslušných parametrů pro celý systém získáváme tzv. **silové pole** (FF; z anglického Force Field). Obecný vztah pro rovnici silového pole je pak

$$\begin{aligned}
 E_{potenc.} &= E_{vazebná} + E_{nevazebná} & (8) \\
 &= \sum_{vazby} E_{vazby} + \sum_{úhly} E_{úhly} + \sum_{dihed.} E_{dihedrálu} \\
 &+ \sum_{nepr.dih.} E_{per. dihed.} + \sum_{Coulomb} E_{Coulomb} \\
 &+ \sum_{LJ} E_{LJ}
 \end{aligned}$$

kde se provádějí sumace přes veškeré příspěvky jednotlivých členů pro párové interakce.^[32]

2.2.2 Molekulová dynamika

Metoda molekulové dynamiky aplikuje potenciální energii popsanou MM společně s kinetickou energií do soustav Newtonových pohybových rovnic a umožňuje tak sledovat časové změny poloh jednotlivých atomů v reálném čase. Z gradientu potenciální energie popsané silovým polem lze určit síly působící na každý atom systému. Z těch jsou následně

vypočítána zrychlení jednotlivých atomů pohybujících se určitou rychlostí. Obecně je tento proces popisován rovnicí

$$F_i = -\nabla_i V \quad (9)$$

,

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i} \quad (10)$$

kde t je čas, F_i je síla působící na i -tý atom, m_i hmotnost atomu, x_i jeho souřadnice a $-\nabla_i V$ je záporný potenciálový gradient. Obecný algoritmus pro molekulovou dynamiku je následující:

- (1) **Určení počátečních poloh a rychlostí** – počáteční souřadnice jsou určeny strukturním souborem; počáteční rychlosti pro každý atom (pokud nejsou zadány) jsou učeny dle Maxwell-Boltzmannovy nebo Gaussovy distribuční funkce pro odpovídající teplotu jako:

$$p(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi kT}} \exp\left(-\frac{m_i v_i^2}{2kT}\right) \quad (11)$$

kde $p(v_i)$ odpovídá pravděpodobnosti, že se atom i o hmotnosti m_i při teplotě T pohybuje rychlostí v_i a k je Planckova konstanta ($6,626 \times 10^{-34}$ J·s). Určuje se také integrační krok Δt , který musí být větší než nejrychlejší pohyb v systému (nejčastěji 1 až 2 fs).

- (2) **Výpočet sil** – jsou vypočítány síly působící na každý atom v gradientu potenciální energie. Přepočítány jsou příspěvky potenciální a kinetické energie a tlakový tenzor.
- (3) **Aktualizování konfigurací** – nové pozice jednotlivých atomů jsou určeny řešením Newtonových pohybových rovnic.
- (4) **Výstup aktualizovaných parametrů** – jsou vypsány pozice, rychlosti, aktuální teplota a tlak.
- (5) **Opakování bodů 2, 3, 4 podle požadovaného počtu kroků** ^[32]

2.2.3 Metodynamika

Metodami molekulové mechaniky jsme schopni studovat časové škály stovek nanosekund v oblasti atomistických simulací, mikrosekundové škály pak v případě hrubozrnných modelů. Řada chemických a biologických dějů jakými jsou například strukturní fázové přechody nebo procesy sbalování proteinů se ale odehrávají v časových měřítcích, které jsou řádově větší, a proto mluvíme ve spojení se MD simulacemi o těchto dějích jako o „vzácných případech“ (z anglického „rare events“). V běžných případech se systémy nacházejí v minimu potenciální energie a překročení energetické bariéry ve směru uvažovaného děje – vzácného případu – je tedy energeticky nevýhodné a k tomuto přechodu pak dochází v simulaci velmi ojediněle s nedostatečným vzorkováním. Metodynamika (MTD) je pokročilá vzorkovací metoda urychlující výskyt vzácných případů posouváním systému z lokálního minima, ve kterém se nachází a umožní tak prozkoumávání větší části konformačního prostoru.

Jedním ze základních parametrů MTD simulací jsou tzv. kolektivní proměnné (CV; z anglického „Collective Variables“), podle kterých mapujeme profil volné energie kolektivních proměnných. Kolektivní proměnné jsou zaváděny dle sledovaného děje a nejčastěji jsou reprezentovány souborem pozic atomů (x), například vzdáleností atomů nebo atomových grup či úhlů, které tyto soubory svírají. Vlastnosti systému jsou pak popisovány jako funkce konečného počtu kolektivních proměnných $S_\alpha(x)$, kde $\alpha = 1, d$ kde d je malé číslo. Rovnovážné chování kolektivních proměnných lze zapsat pomocí rozdělení pravděpodobnosti $P(s)$ jako

$$P(s) = \frac{\exp(-(1/T)F(s))}{\int ds \exp(-(1/T)F(s))} \quad (12)$$

kde s značí d -dimensionální vektor (s_1, \dots, s_d) , $F(s)$ je volná energie vyjádřená jako

$$F(s) = -T \ln \left(\int dx \exp \left(-\frac{1}{T} V(x) \right) \delta(s - S(x)) \right) \quad (13)$$

kde $V(x)$ je potenciál odpovídající danému souboru pozic atomů (x); velké S značí funkci souřadnic $S(x)$ a malé s hodnotu CV. Nachází-li se systém ve svém lokálním minimu nabývá

hodnota volné energie minimálních hodnot a pravděpodobnost výskytu v tomto stavu $P(s)$ je naopak maximální.

Principem MTD simulací je přidávání umělého potenciálu (někdy též označovaný jako Gaussův potenciál) ve formě Gaussových funkcí k dotyčným hodnotám CV o definovaných vlastnostech (výška a šířka), čímž dochází k postupnému zaplňování potenciálové jámy a systém tak může překonávat energetickou bariéru. Umělý potenciál je zapisován ve formě

$$V_G(S(x), t) = w \sum_{\substack{t' = \tau_G, 2\tau_G \\ t' > t}} \exp\left(-\frac{(S(x) - s(t'))^2}{2\delta s^2}\right) \quad (14)$$

kde w je výškou a δs šířkou vkládané Gaussovy funkce a τ_G je frekvence, se kterou se Gaussiány vkládají. Parametry Gaussových funkcí ovlivňují kvalitu provzorkování povrchu volné energie – jsou-li Gaussovy funkce příliš vysoké, je plocha prozkoumána rychleji (menší výpočetní náročnost) ovšem takto vykonstruovaná plocha je zatížena množstvím chyb. Vysoká frekvence vkládání Gaussových funkcí pak zpomaluje výpočet.

Systému v MTD tedy prozkoumává větší část konformačního prostoru podél CV a může tak prozkoumat i jinak nepravděpodobné vzácné případy. Při kompletním provzorkování se v limitním čase $t \rightarrow \infty$ hodnota umělého přidaného potenciálu rovná záporné hodnotě volné energie podle Rovnice 15.^[34]

$$\lim_{t \rightarrow \infty} V_G(s, t) \sim -F(s) \quad (15)$$

3. Metody

3.1 Příprava modelů

Pro stavbu modelů lidské CPR vhodných pro MD simulace byla použita metoda homologního modelování. Při tvorbě modelů se vycházelo ze znalosti kompletní sekvence lidské CPR (UniProt ID: P16435), jejímž zdrojem byl UniProt (The Universal Protein Resource; www.uniprot.org ^[35]). Templáty krystalových struktur pro tvorbu homologních modelů byly vybírány na základě strukturních požadavků (malé rozlišení, organismus *Homo Sapiens*) a shody se známou sekvencí. Pro vyhledání struktur s nejlepší shodou se známou sekvencí byl použit algoritmus BLAST ^[36]. Veškeré struktury byly získány z www.pdb.org ^[37] a homologní modely byly vytvořeny pomocí programu Modeller 9.13 ^[38] v rozhraní implementovaném ve vizualizačním softwaru UCSF Chimera 10.1. ^[39]

Templátem pro uzavřenou konformaci CPR byla zvolena struktura s PDBID: 3QE2 ^[14] (chain A), která byla z 99 % identická se zadanou sekvencí při pokrytí sekvence z 90 %. Rozlišení krystalové struktury činilo 1,75 Å. Pro CPR v otevřené konformaci byla zvolena struktura s PDBID: 3FJO ^[15] s 83% identitou, pokrytím sekvence z 89 % a rozlišením 2,5 Å. Krystal pro otevřenou strukturu CPR byl vytvořen z tzv. chimérického proteinu tj. proteinu uměle připraveného spojením částí genů původně kódující různé proteiny. V případě krystalu 3FJO byla použita FMN doména z CPR obsaženého v kvasnicích a zbývající domény z lidské CPR.

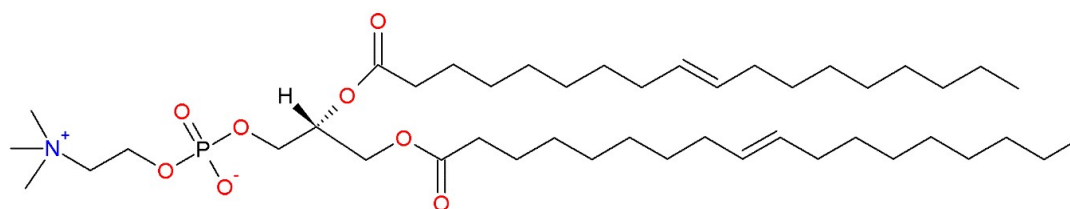
V případě uzavřené i otevřené konformace krystalové struktury neobsahovaly N-terminální transmembránovou doménu. Ta byla na základě znalosti sekvence dostavena ve formě α -šroubovice v programu PyMol 1.4.1 (Schrödinger LLC).

Jako struktura cytochromu P450 3A4 byl pro stavbu modelu komplexu CYP-CPR použit model CYP 3A4 vycházející z krystalové struktury s PDBID: 1TQN. ^[40]

Struktury a pozice kofaktorů byly získány přímo z krystalové struktury. V krystalu nerozlišená struktura kofaktoru NADPH byla domodelována dle struktury rozlišeného NADPH kofaktoru z krystalu s PDBID: 1AJ1. Do struktur byly přiřazeny vodíkové atomy

tak, aby odpovídaly fyziologickému pH (fosfátové skupiny záporně nabitě). Parametry kofaktorů byly vygenerovány pro silové pole Amber99SB programem Antechamber ^[41] implementovaného v programu Chimera. Parciální náboje na molekulách byly přepočítány použitím metody RESP (Restrained Electrostatic Potential) v programu Gaussian 03^[42] na úrovni HF/6-31G*. Parametry pro hemovou prostetickou skupinu byly převzaty z ^[43].

Modely CPR (resp. CPR s CYPy v komplexu) byly N-terminálními konci zanořeny do membrán složených z dioleoylfosfatidylcholinových (DOPC) lipidů (Obrázek 18). K zanoření do dvojvrstvy byl použit program g_membed,^[44] přičemž každá vrstva obsahovala 250 lipidových molekul. K solvataci byl použit explicitní TIP3P ^[45] modelu vody. Kvůli zachování fyziologické koncentrace systému byly přidány Na⁺ a Cl⁻ ionty tak, aby byl systém neutrální a sůl měla výslednou fyziologickou koncentraci 0,15 M NaCl.



Obrázek 18 Struktura dioleoylfosfatidylcholinu (DOPC). Molekula DOPC je neutrální lipidová molekula s dvojnými vazbami mezi uhlíky 9 a 10 alifatických řetězců.

3.2 Nastavení MD simulací

Veškeré simulace byly provedeny v softwaru GROMACS (verze 4.5.5 ^[46] a 5.0 ^[47]) s implementovaným programem Plumed 2.1.2 ^[48] pro metadynamické simulace. Pro proteiny bylo použito silové pole Amber99SB ^[49] spolu s parametry Slipids ^[50] pro lipidovou dvojvrstvu. Periodické okrajové podmínky byly aplikovány ve všech směrech. Integrační krok výpočtu byl zvolen 2 fs. V systému byla udržována konstantní teplota 310 K Nosé-Hooverovým termostatem s kontrolou teploty každých 0,5 ps. Tlak systému byl udržován na konstantní hodnotě 1 bar za semiisotropních podmínek pomocí Parrinello-Rahmanova barostatu o kompresibilitě $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ při kontrole tlaku každých 10 ps. Pro výpočet dalekodosahových Coulombických interakcí nad 1 nm použita metoda PME ^[51] (Particle Mesh Ewald). Pro interakce van der Waalsovského typu byl stanoven dosah 1 nm. Povolená délka vazeb byla kontrolována algoritmem p-LINCS ^[52]. U všech

systemů byla nejdříve provedena minimalizace energie a přípravná simulace o délce 5 ns se zamrzlou strukturou páteře proteinu pro ekvilibrace prostředí. Výsledná délka simulací byla nastavena v rozmezí 50–200 ns dle simulovaného systému (bude uvedeno individuálně).

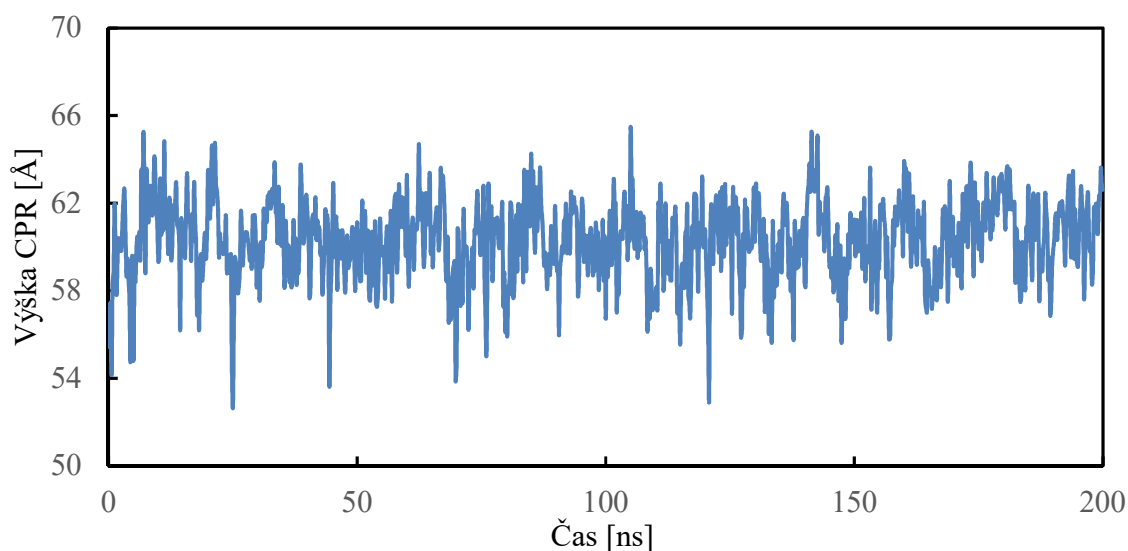
V případě metadynamických simulací byly zavedeny speciální parametry charakterizující jednotlivé simulované procesy. V případě simulace redoxní reakce byla jako kolektivní proměnná zadána vzdálenost mezi atomu N5 (FAD) a C4 (NADPH) zodpovědných za elektronový transport. Pro simulaci pozicování proteinu na membráně byla souběžně sledována vzdálenost částí proteinu (Ala94-Arg107 na FMN doméně a Gly539-Trp552 na NADPH doméně) na vzdálenosti od membrány. Při procesu konformačních změn byla jako CV použita DRMSD mezi referenčními strukturami v otevřené a uzavřené konformaci funkcí FUNCPATHMSD sledující cestu mezi jednotlivými kolektivními proměnnými. Podrobnější parametry jsou uvedeny v Doplňujících materiálech.

4. Výsledky

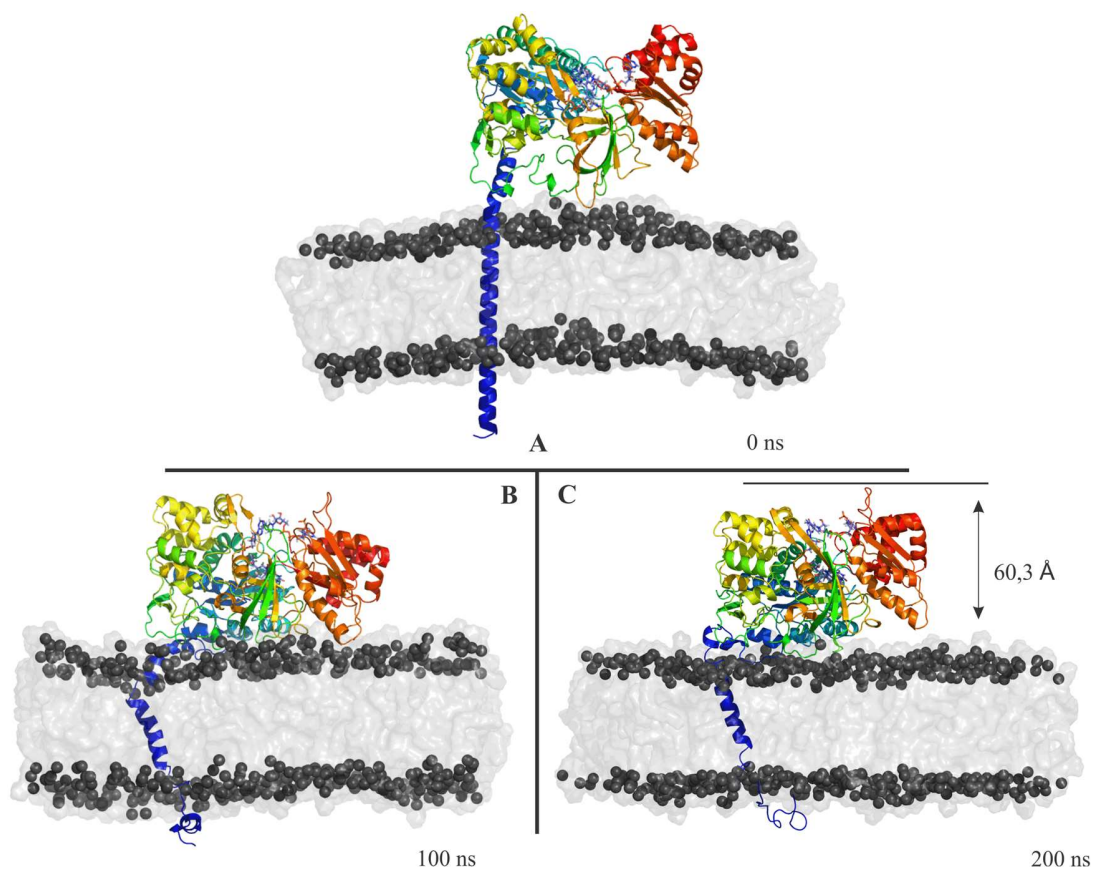
4.1 Simulace uzavřené formy CPR

V uzavřené formě CPR se flavinové kofaktory nacházejí v blízkém kontaktu umožňujícím přímý elektronový transport. Strukturální stabilita proteinu v uzavřené konformaci hraje klíčovou roli při elektronovém transportu, neboť určuje přesnou pozici a vzájemnou orientaci kofaktorů. Během 200 ns simulace CPR nedocházelo k strukturálním změnám jednotlivých katalytických domén nebo proteinu jako celku (Obrázek 19). Nedocházelo také ani ke spontánnímu konformačním změnám přechodu uzavřené formy do otevřené. Pozice jednotlivých kofaktorů zůstala zachována během celé délky simulace.

Základním ukazatelem kvality připraveného modelu byla výška, kterou protein zaujímá nad fosfolipidovou dvojvrstvou. Tato byla experimentálně určena metodou mikroskopie atomárních sil jako $56 \pm 22 \text{ \AA}$.^[53] Z této výšky lze usuzovat i na orientaci CPR vůči membráně. Výška proteinu se během simulace pohybovala okolo stabilní hodnoty $60,3 \pm 1,8 \text{ \AA}$ (Graf 1), což odpovídá experimentálně naměřené hodnotě.

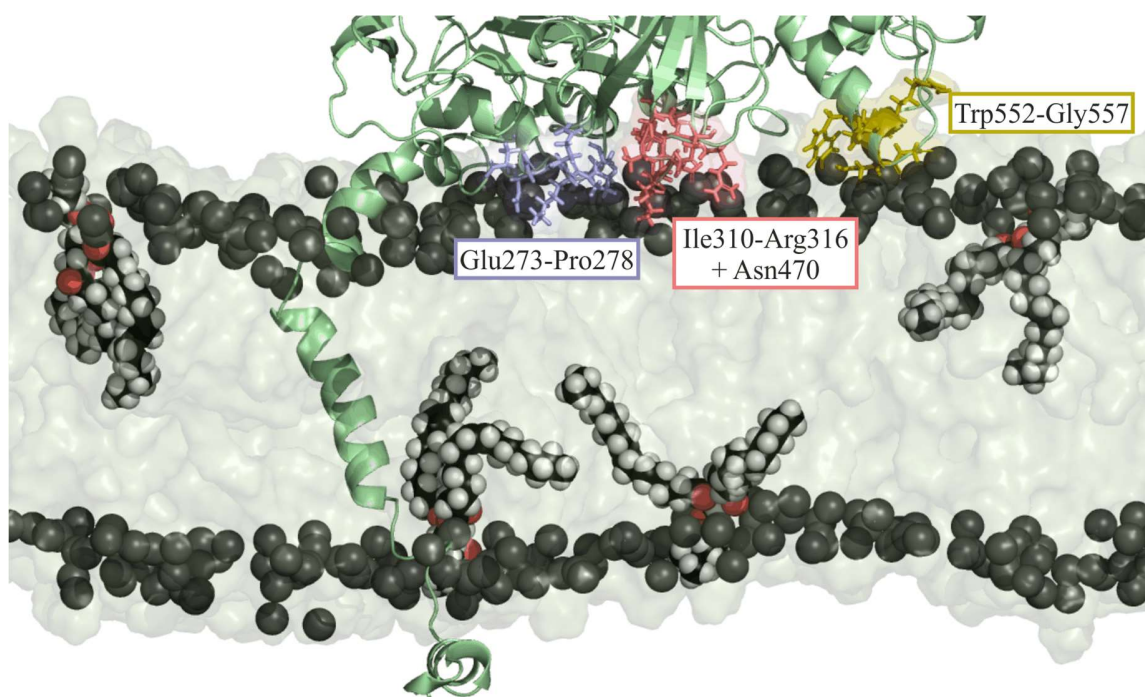


Graf 1 Změna výšky katalytických domén nad fosfatidylcholinovou dvouvrstvou. Během 200 ns ekvilibrace dochází jen k drobným fluktuacím a průměrná výška CPR činí $60,3 \pm 1,8 \text{ \AA}$.



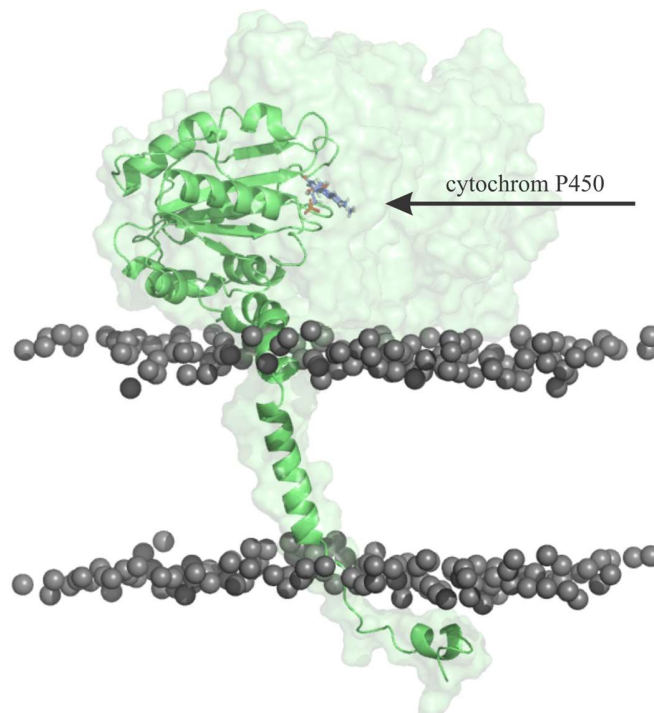
Obrázek 19 Model CPR před ekvilibrace (panel A), po 100 ns (panel B) a struktura po 200 ns (panel C). Výška proteinu se pohybovala kolem hodnoty $60,3 \pm 1,8$ Å nad úrovní membrány. Ze snímku je patrný kontakt smyček FAD a NADPH vázících domén s oblastí polárních hlav lipidové dvojvrstvy. DOPC membrána je vyobrazena v reprezentaci surface s fosfáty zvýrazněnými formou kuliček (šedá); protein je vyobrazen v reprezentaci cartoon a kofaktory reprezentací sticks (modrá).

Stabilita CPR vychází ze samotné interakce proteinu s membránou. V průběhu simulace byly určeny aminokyseliny setrvávající v kontaktu s polárními hlavami fosfolipidové membrány (Obrázek 20). Tyto aminokyseliny jsou součástí FAD domény a NADPH domény a jsou to Glu273-Pro278 (FAD doména), Ile310-Arg316 (FAD doména), Trp552-Gly557 (NADPH doména) a residuum Asn470 (FAD doména). Volná rotace proteinu na membráně nebo změna vzájemné orientace proteinu s membránou je tímto kontaktem značně omezena.



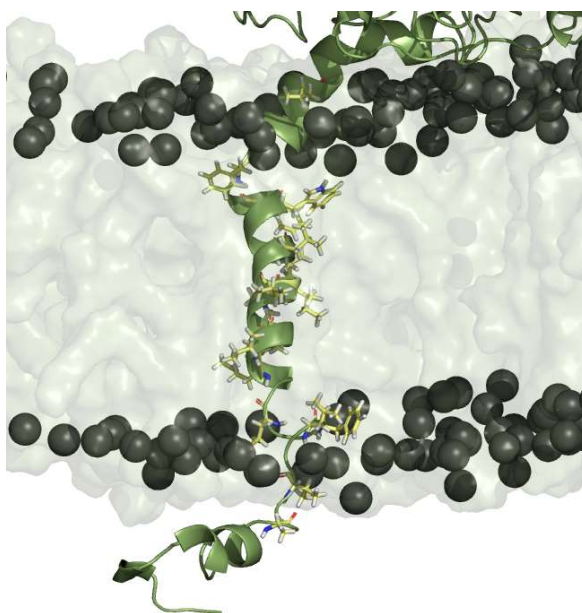
Obrázek 20 Vyobrazení reziduí, která byla v kontaktu s membránou po dobu 175 ns. FAD doména interaguje aminokyselinami Glu273-Pro278 (reprezentace sticks; modrá), Ile310-Arg316 a Asn470 (reprezentace sticks; červená), NADPH doména pak aminokyselinami Trp552-Gly557 (reprezentace sticks; žlutá). Během posledních 25 ns docházelo k mírnému oddalování NADPH domény od membrány a aminokyseliny Trp552-Gly557 ztrácely kontakt s membránou. DOPC membrána je vyobrazena v reprezentaci surface s fosfáty zvýrazněnými formou kuliček (šedá) a čtyřmi lipidy DOPC v kuličkové reprezentaci; protein je vyobrazen v reprezentaci cartoon (zelená).

Z hlediska interakce se svým redoxními partnery cytochromy P450 byla zvažována vhodná orientace FMN domény, která by po konformační změně do otevřené struktury byla v kontaktu s CYPy a to na proximální straně molekuly hemu. Ekvilibrovaná struktura byla pro interakci správně orientovaná; molekula FMN by po otevření struktury byla přímo přístupná interakci s redoxním partnerem (Obrázek 21).



Obrázek 21 Orientace FMN domény nesoucí flavinmononukleotid s vyznačením přístupu redoxního partnera cytochromu P450. Po ekvilibrace byla doména vhodně orientována tj. kofaktor by v případě interakce s CYPem nesměřoval kolmo na osu membránu, ale byl by orientován paralelně s membránou, jak se při interakci s redoxním partnerem předpokládá. Transmembránová kotva a na ni napojená FMN doména jsou zobrazeny v reprezentaci cartoon (zelená), zbylá část proteinu, která by při tvorbě komplexu odstoupila a odhalila tak FMN kofaktor je vyobrazena v reprezentaci surface. DOPC membrána je vyobrazena fosfáty v kuličkové reprezentaci (šedá), FMN kofaktor pak v reprezentaci sticks (modrá).

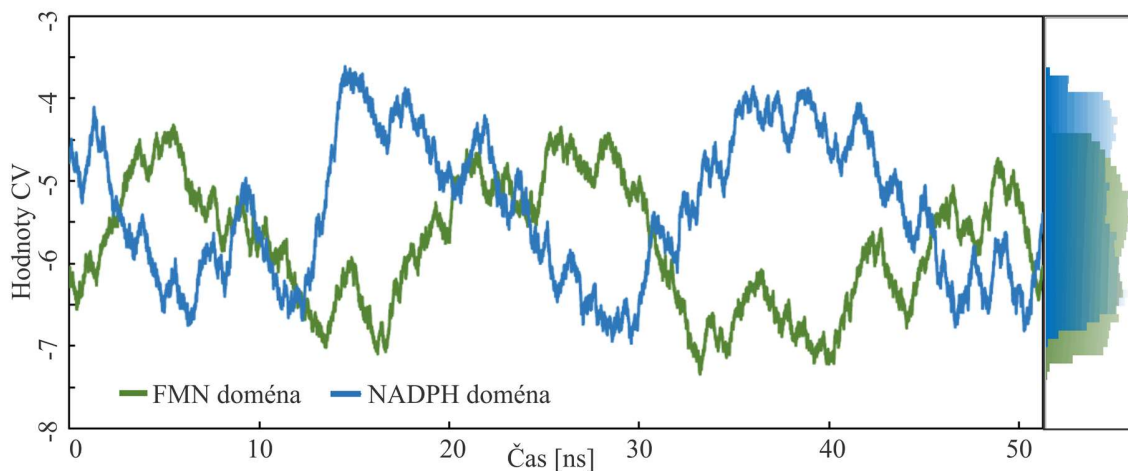
Během simulace byla dále sledována transmembránová doména, pomocí které jsou katalytické domény ukotveny na membráně. Díky přítomnosti velkého počtu hydrofobních aminokyselin ve struktuře kotvy nedocházelo k vysouvání či hlubšímu zanoření CPR do membrány. Šroubovicová struktura zůstala neporušena v oblasti zanoření. K narušení ideální šroubovicové struktury došlo v oblasti, kdy kotva prostoupila skrze membránu do oblasti solventu (Obrázek 22).



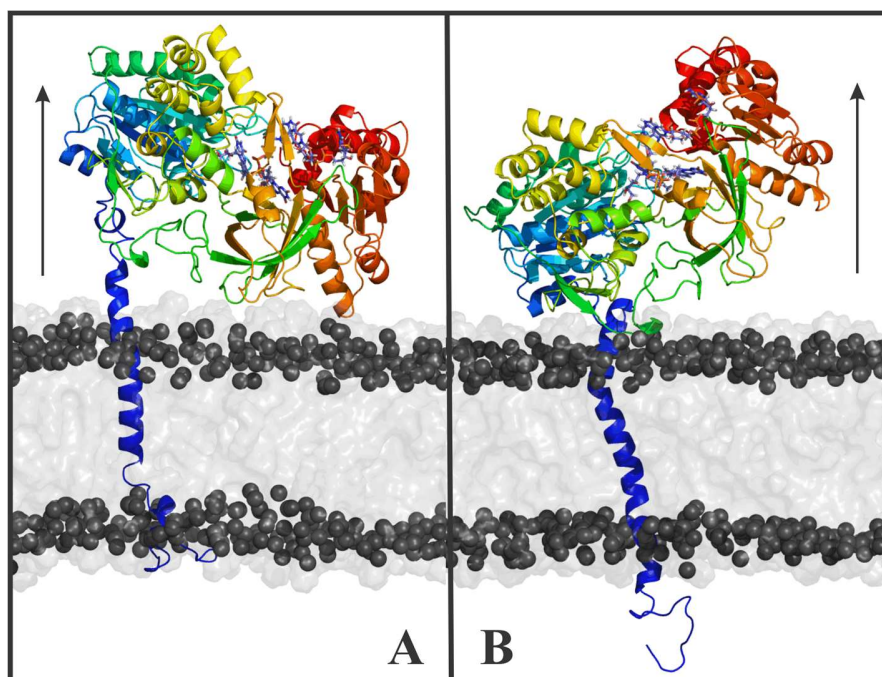
Obrázek 22 Detailní zobrazení transmembránové domény. Šroubovicová struktura kotvy byla zachována v oblasti zanoření proteinu do membrány. Zde je kotva držena ve stálé pozici (nedochází k vysouvání ani hlubšímu zanořování kotvy) pomocí hydrofobních aminokyselin (A20, V23, L25, F26, M28, M31, I32, F34, L36, I37, V38, L40, L41, W44, F45, F47, V54; reprezentace sticks; žlutá). Na N-terminálním konci nacházejícím se v oblasti solventu dochází k narušení sekundární struktury proteinu. DOPC membrána je vyobrazena v reprezentaci surface s fosfáty zvýrazněnými formou kuliček (šedá); protein je vyobrazen v reprezentaci cartoon (zelená).

Z hlediska lepšího posouzení vzájemné orientace proteinu vzhledem k membráně jsme použili metadynamické simulace, které umožňují prozkoumání větší část konformačního prostoru a tím studovat i jevy v běžných časových měřítcích MD simulací nedosažitelné. Jako CV byly zvoleny části FMN a NADPH domén a byla sledována změna jejich vzdálenosti vzhledem k membráně.

V průběhu ~52 ns metadynamické simulace byla pozorována opakovaná změna pozice proteinu na membráně, během které se CPR na povrchu membrány „houpal“ (Graf 2). Docházelo k opakovanému přibližování a oddalování FMN a NADPH domén vzhledem k povrchu membrány (Obrázek 23). Aminokyseliny, které byly v průběhu volné dynamiky v kontaktu s polárními hlavami lipidů, zůstaly v průběhu metadynamické simulace orientovány směrem k povrchu membrány.



Graf 2 Změna vzdálenosti mezi FMN a NADPH domén a membránou v průběhu 52 ns metadynamické simulace během níž se protein „houpal“ na povrchu membrány. Histogram četností výskytu jednotlivých stavů uveden v pravém panelu.



Obrázek 23 Změna pozice CPR na membráně. Opakovaně docházelo k oddálení FMN domény (panel A) a NADPH domény (panel B) od membrány). DOPC membrána je vyobrazena v reprezentaci surface s fosfáty zvýrazněnými formou kuliček (šedá); protein je vyobrazen v reprezentaci cartoon.

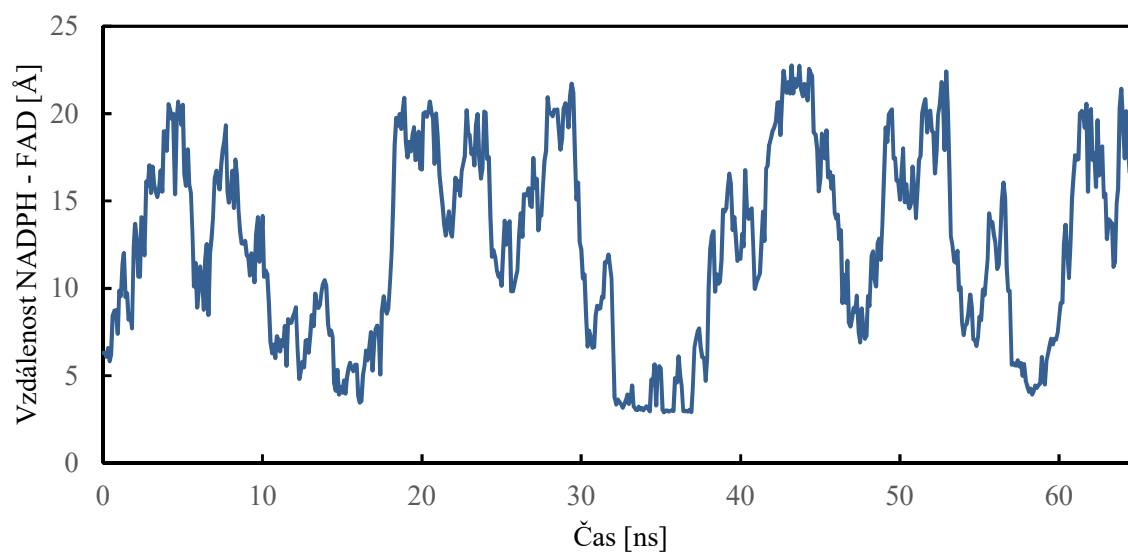
4.2 Simulace redoxní reakce metadynamikou

Prvním krokem intraproteinového elektronového transportu je po navázání plně redukované formy NADPH přenos redukčního ekvivalentu na FAD kofaktor. Části kofaktorů přenášející tento ekvivalent (atom C4 molekuly NADPH; atom N5 molekuly FAD) jsou však v krystalu vzdáleny 12,8 Å. Na *re*- straně kofaktoru FAD se také nachází Trp679, který brání přiblížení nikotinamidové části NADPH (Obrázek 24; panely A a B).

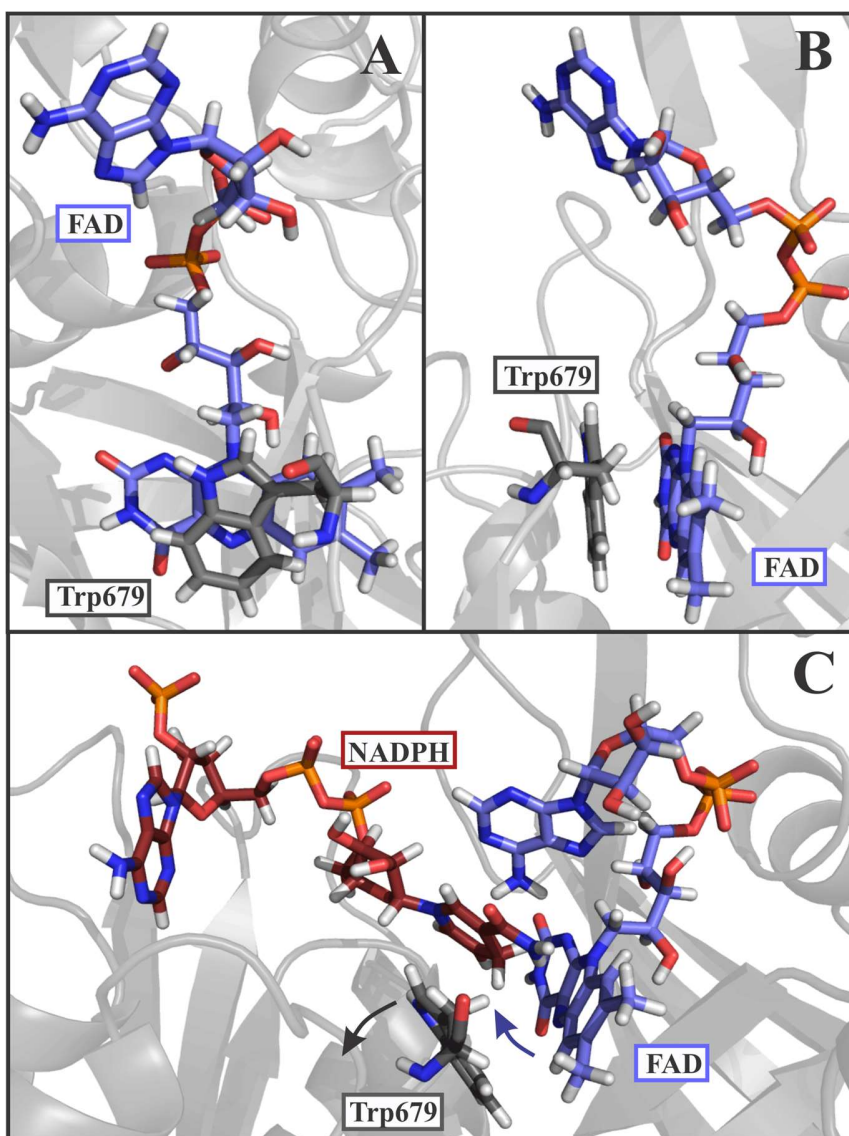
Během simulací volné dynamiky bylo nikotinamidové raménko NADPH kofaktoru značně flexibilní. Vzdálenosti mezi NADPH a FAD ani jejich vzájemné orientace nenaznačovaly vhodné strukturní uspořádání pro ET mezi těmito kofaktory. Proto byla provedena metadynamická simulace procesu simulující přiblížení interagujících kofaktorů během nichž byla sledována vzdálenost mezi interagujícími atomy (atom N5 molekuly FAD a atom C4 molekuly NADPH), které byly zavedeny jako CV.

V průběhu 65 ns metadynamické simulace došlo k několikrát ke zkrácení vzdálenosti interagujících částí kofaktorů pod 5 Å (Graf 3), což je vzdálenost dostatečná pro uskutečnění ET. Při přiblížení atomu C4 kofaktoru NADPH a atomu N5 kofaktoru FAD pod 5 Å docházelo ke strukturní reorientaci aminokyseliny Trp679. Tato aminokyselina v krystalu přímo clonící FAD kofaktor při přiblížení odstoupila a tím umožnila přiblížení nikotinamidové části NADPH. Tento mechanismus byl dříve postulován v práci Hubbard et al. (2001) kdy bylo delecí Trp679 ze struktury CPR umožněno přímé přiblížení NADPH kofaktoru.^[54] Zároveň také bylo pozorováno vytočení spodní části FAD kofaktoru (nesoucí atom N5) směrem k přibližujícímu se NADPH kofaktoru. (Obrázek 24. panel C.) Obě tyto strukturní změny umožnily přiblížení redukovaného NADPH potřebné k přenosu redukčního ekvivalentu. Po následném oddálení interagujících kofaktorů se Trp679 znovu přeorientoval před planární část FAD kofaktoru.

V Průběhu metadynamické simulací nedocházelo je spontánním konformačním změnám přechodu uzavřené formy do otevřené.



Graf 3 Změna vzdálenosti atomů C4 molekuly NADPH a atomu N5 molekuly FAD během metadynamické simulace. Během 65 ns simulace se kofaktory několikrát přiblížily a vzájemně se orientovaly způsobem, který je typickým pro ET.



Obrázek 24 V krystalové struktuře je přímé přiblížení interagujících kofaktorů znemožněno přítomností Trp679 přímo orientovaného na *re*-straně kofaktoru FAD. Zobrazení *re*-strany FAD kofaktoru a clonícího Trp679 (panel A). Boční zobrazení, ve kterém jsou planární části molekul souběžně orientovány (panel B). Vzájemná orientace kofaktorů a Trp679 při vzdálenosti dostatečné pro uskutečnění přenosu redukčního ekvivalentu (panel C). Docházelo k souběžnému odvrácení Trp679 a vychýlení spodní části kofaktoru FAD směrem k přibližujícímu se NADPH. Kofaktory FAD (modrá), NADPH (červená) a Trp679 (šedá) jsou vyobrazeny reprezentací sticks; zbytek proteinu reprezentací cartoon s transparentností 60 %.

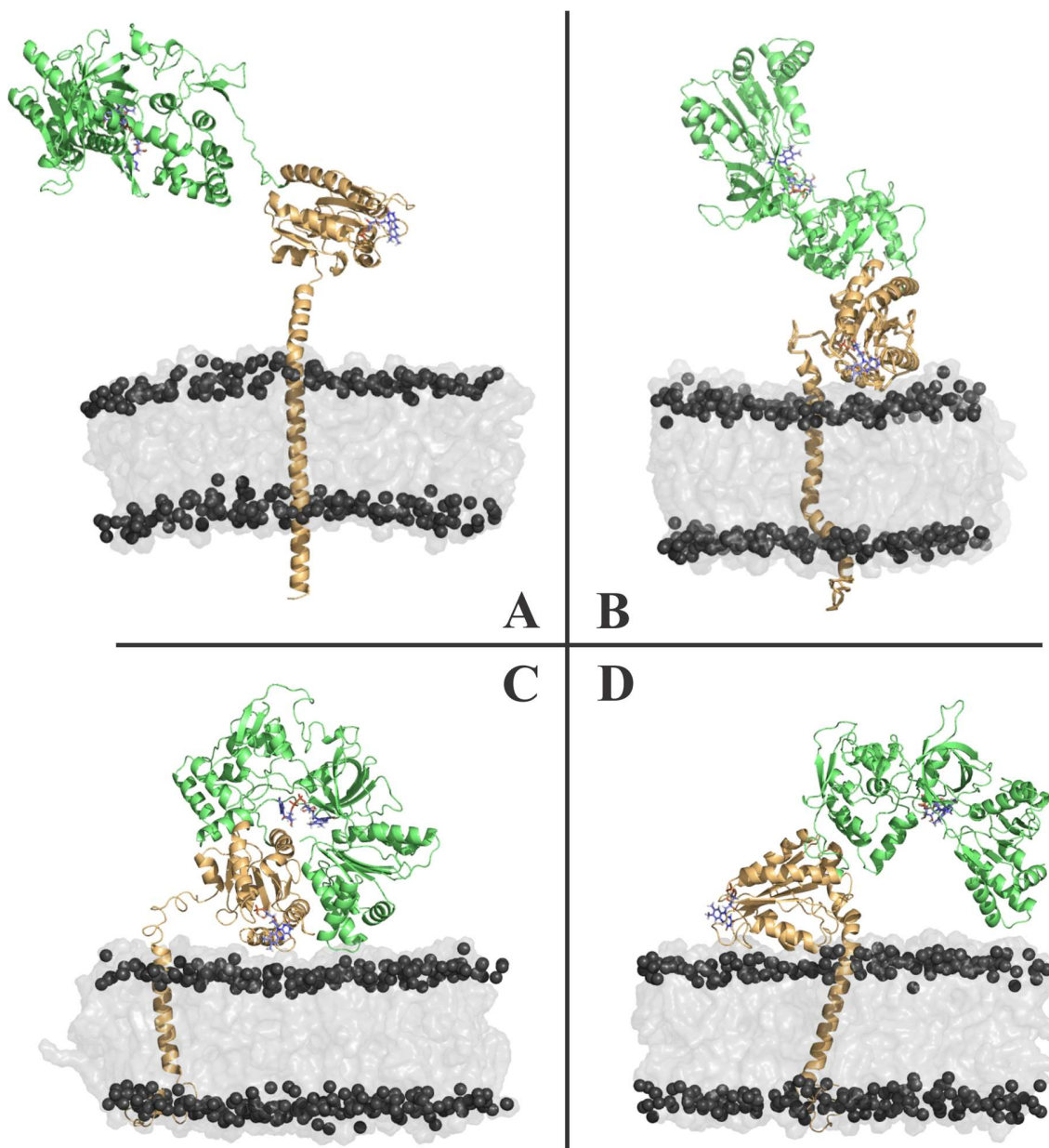
4.3 Simulace otevřené formy CPR

V otevřené formě jsou flavinové kofaktory v krystalu vzdáleny 86 Å od sebe. FMN v FMN doméně zde není skryt na rozdíl od uzavřené formy ostatními katalytickými doménami. Předpokládá se, že v této konformaci cytochrom P450 reduktáza tvoří komplexy se svými redoxními partnery a dochází k meziproteinovému elektronovému transportu. Tři paralelně provedené simulace CPR v otevřené konformaci ale ukázaly nestabilitu této formy. V těchto 100 ns dlouhých simulacích byl protein velmi flexibilní a jednotlivé simulace popisovaly rozdílné chování proteinu, který se simulacemi vždy vzdálil původní otevřené struktuře.

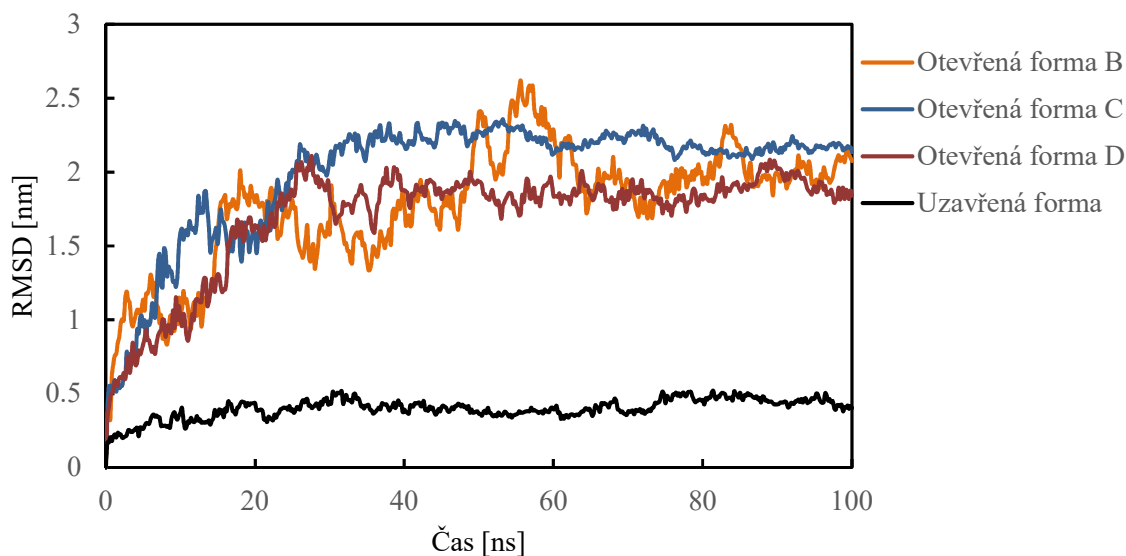
V průběhu první simulace (Obrázek 25. panel B; Graf 4. Otevřená forma B) protein vykazuje značnou míru flexibility. Největší mobilitu vykazuje část proteinu napojená na FMN doménu flexibilním smyčkou tzv. hinge. Ostatní katalytické domény se po celou dobu simulace volně pohybují v oblasti solventu. FMN doména se v průběhu simulace dostala do přímého kontaktu s membránou, přičemž výsledná orientace flavinmononukleotidu směřujícího do membrány znemožňuje případnou interakci s CYPy.

V druhé simulaci (Obrázek 25. panel C; Graf 4. Otevřená forma C) byla flexibilita proteinu značně omezena vzájemnou interakcí FMN domény se zbytkem proteinu. Během prvních 50 ns došlo k přiblížení katalytických domén, což mělo za následek trvalou interakci po zbytek 100 ns simulace. Přestože došlo ke značnému přiblížení flavinových kofaktorů (z původních 86 Å na 46 Å) výsledný stabilní kontakt katalytických domén neumožnil další strukturní změny. Z tohoto důvodu simulace nebyla vyhodnocena jako spontánní konformační změna k uzavřené formě.

Ve třetí simulaci otevřené formy CPR (Obrázek 25. panel D; Graf 4. Otevřená forma D) byla opět pozorována značná strukturní flexibilita linkeru, FAD i NADPH vázících domén orientovaných do oblasti solventu. Podobně jako v případě simulace otevřené formy A se tyto volně pohybovaly v prostoru solventu. V 50 ns simulace však došlo ke kontaktu FMN domény s linkerem, který přetrval po zbylých 100 ns simulace. Tato interakce měla za následek (stejně jako v případě simulace otevřené simulace C) snížení flexibility CPR. FMN doména po konci simulace nacházela v kontaktu s hydrofilní oblastí polárních hlav membrány v orientaci nevhodné pro tvorbu komplexu s redoxními partnery.



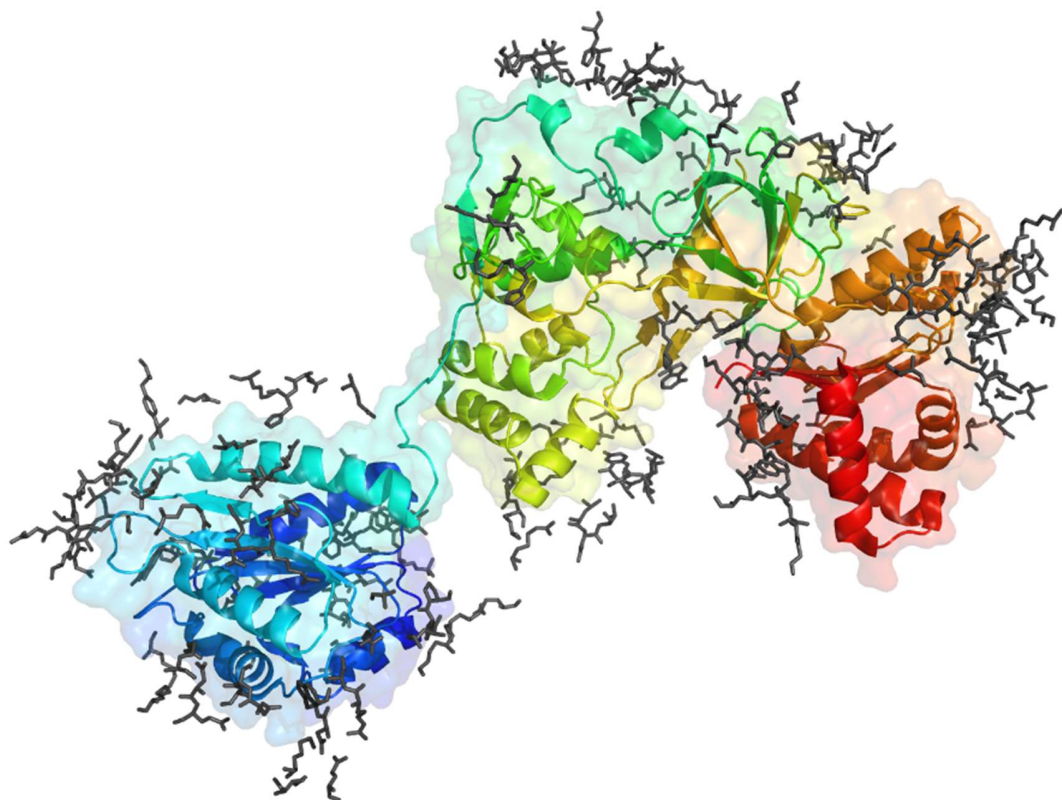
Obrázek 25 Panel A reprezentuje neekvilibrovanou strukturu modelu CPR v otevřené formě. FMN doména ukotvená na membráně je volně orientována do oblasti solventu a není jako v případě uzavřené formy kryta zbylými katalyckými doménami. Panely B, C a D reprezentující různé výstupy struktury A po 100 ns ekvilibraci simulované za stejných podmínek. Protein je vyobrazen v reprezentaci cartoon (FMN doména s kotvou žlutě; linker, FAD i FADPH vázící doména zeleně). DOPC membrána je vyobrazena v reprezentaci surface s fosfáty zvýrazněnými formou kuliček (šedá).



Graf 4 Porovnání RMSD jednotlivých simulací otevřené formy CPR s uzavřenou formou. Na výraznou nestabilitu CPR v otevřené formě poukazují řádově vyšší hodnoty RMSD v porovnání s uzavřenou strukturou.

Přestože u všech tří simulací CPR v otevřené formě byla zjištěna značná flexibilita proteinu jako celku (zejména díky volné pohyblivosti okolo hinge), jednotlivé katalytické domény si zachovaly strukturální integritu.

Stabilita krystalové struktury CPR v otevřené konformaci je podmíněna značným množstvím krystalových kontaktů (Obrázky 26). Zdá se tedy, že otevřená forma CPR je pouze artefaktem krystalizace proteinu, neboť bez přítomnosti redoxního partnera vykazuje značnou flexibilitu a nestabilitu. Přítomnost redoxního partnera však výrazně stabilizuje zejména membránovou pozici FMN domény, která je zodpovědná na meziproteinovou interakci (viz níže).

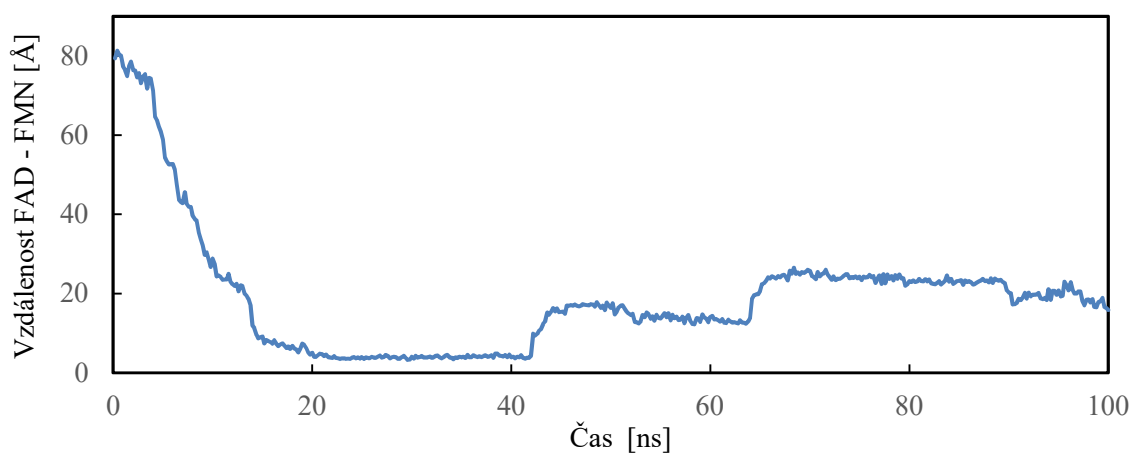


Obrázek 26 Krystalová struktura CPR v otevřené konformaci stabilizovaná značným množstvím krystalových kontaktů. Krystalové kontakty jsou zobraceny do vzdálenosti 6 Å od proteinu reprezentací sticks, protein pak reprezentací cartoon.

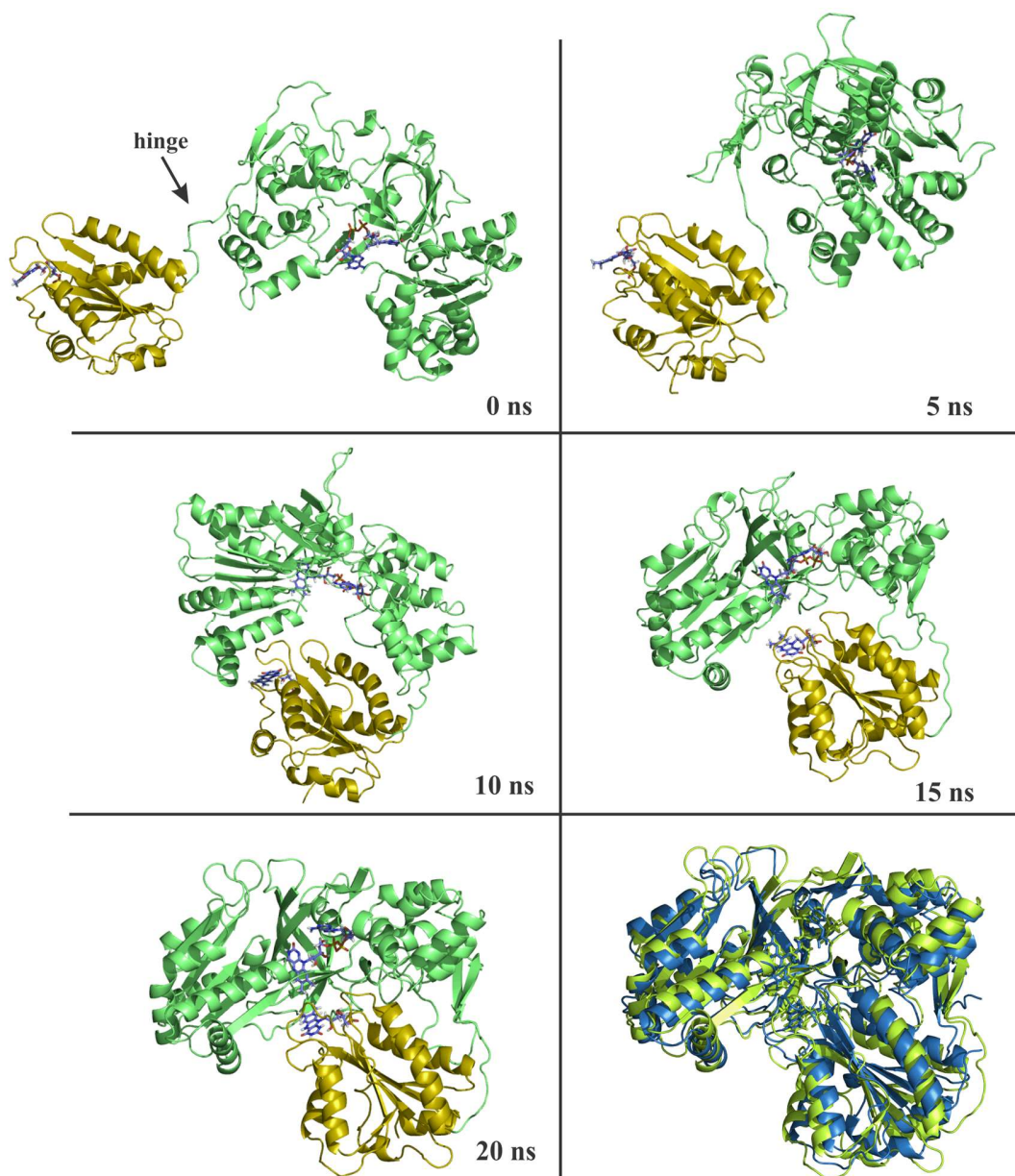
4.4 Simulace procesu uzavírání CPR

Vzhledem k tomu, že v průběhu simulací otevřené formy CPR nedocházelo ke spontánním konformačním změnám směrem k uzavírání struktury CPR, byly pro simulace tohoto procesu použity metadynamické simulace. Jako CV byla sledována DRMSD proteinové páteře (v oblasti aminokyseliny Phe204-Val348) při přechodu otevřené struktury do uzavřené.

Proces uzavírání CPR lze popsat řadou dílčích kroků. V prvním dochází ke změně vzájemné orientace FMN domény se zbytkem proteinu pootočením na flexibilním regionu hinge. Tento zde plní roli „pantu“, na kterém se dochází k rotaci linkeru, FAD i NADPH domén směrem k FMN doméně. V tomto kroku dochází k nejvýraznějším změnám v oblasti hinge (Obrázek 27. v čase 5 ns). V druhém kroku dochází k přiblížení katalytických domén. Linker, FAD a NADPH domény přistupují směrem k vrchní části FMN domény (šroubovice Ala186-Leu195 a Glu216-Glu232; (Obrázek 27. v čase 10 ns a 15 ns). Posledním kroku pak dochází k zakrytí přední části FMN domény vy které je navázán flavinmononukleotid (Obrázek 27. v čase 20 ns). Po kompletním uzavření proteinu se flavinové kofaktory nacházely ve vzdálenosti ~ 5 Å, což je ve shodě se vzdáleností kofaktorů v krystalu (Graf 5). V kompaktní formě protein setrval 20 ns. Při procesu uzavírání však došlo nevhodné orientace proteinu na membráně, která měla za následek, že se CPR otevíral směrem „do membrány“. Tím bylo znemožněno další otevírání změn CPR z otevřené struktury, ke které po zbytek 100 ns metadynamické simulace nedošlo.

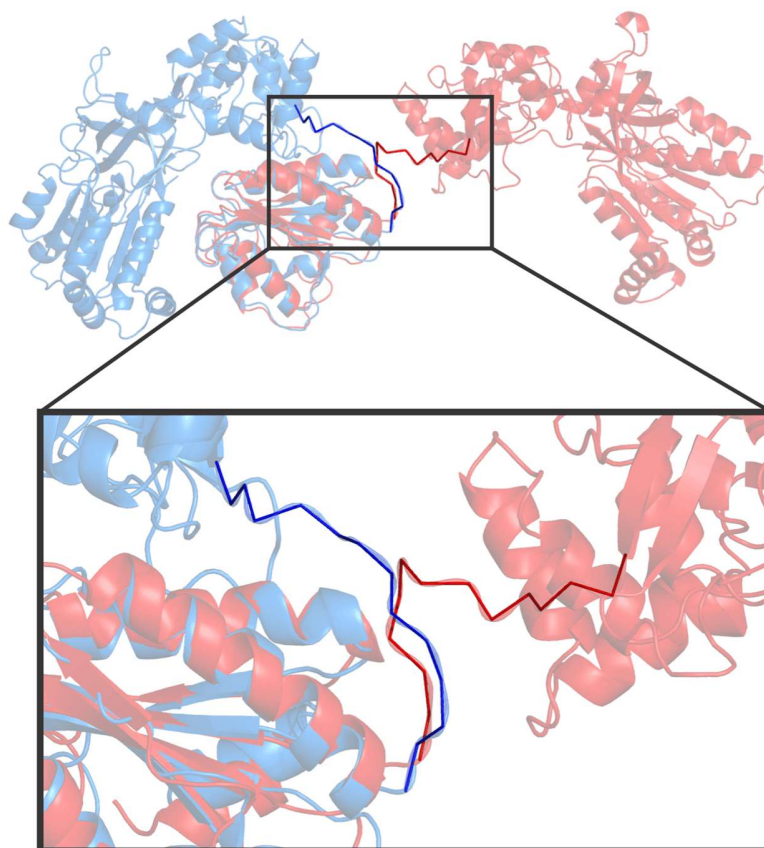


Graf 5 Změna vzdálenosti flavinových kofaktorů v průběhu procesu konformačních změn. Ze vzdálenosti přes 80 Å u flavinových kofaktorů v otevřené formě dochází k přiblížení pod 5 Å. Tato vzdálenost odpovídá vzdálenosti kofaktorů v krystalu uzavřené formy CPR. Dalšímu otevření struktury bránila nevhodná orientace proteinu na membráně.



Obrázek 27 Časový průběh procesu konformační změny CPR při přechodu z otevřené formy do uzavřené. Během prvních 20 ns metadynamické simulace dojde k úplnému uzavření proteinu. V čase 20 ns pak vzdálenost i vzájemná orientace kofaktorů odpovídá krystalu. Poslední snímek zobrazuje strukturu po 20 ns metadynamické simulace (zeleně) v překryvu s krystalovou strukturou lidské CPR (modře).

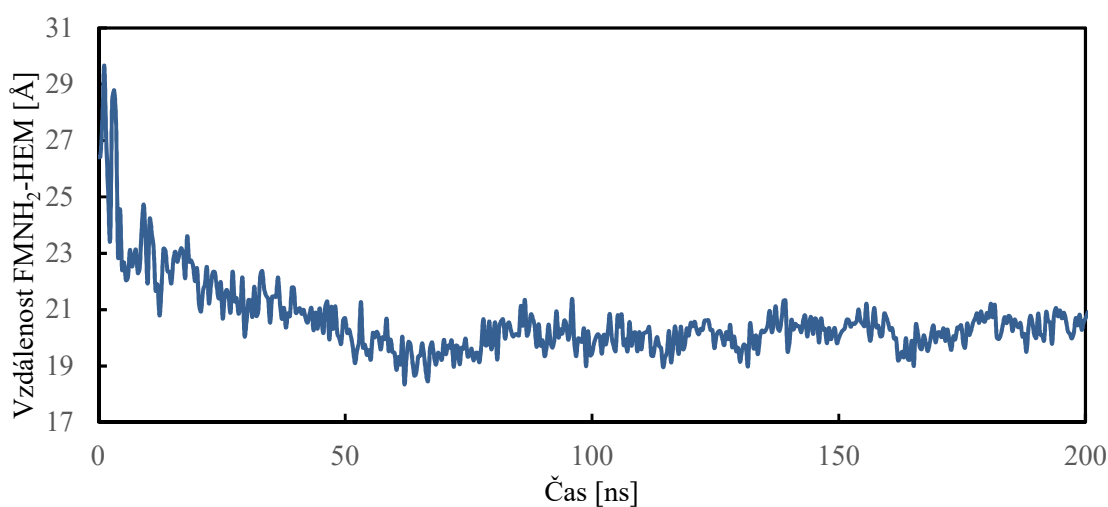
I přes výrazné konformační změny, ke kterým v průběhu uzavírání CPR dochází, si jednotlivé katalytické domény zachovaly svou strukturální integritu. Nejvýraznější změna pak byla pozorována ve struktuře hinge (Obrázek 28).



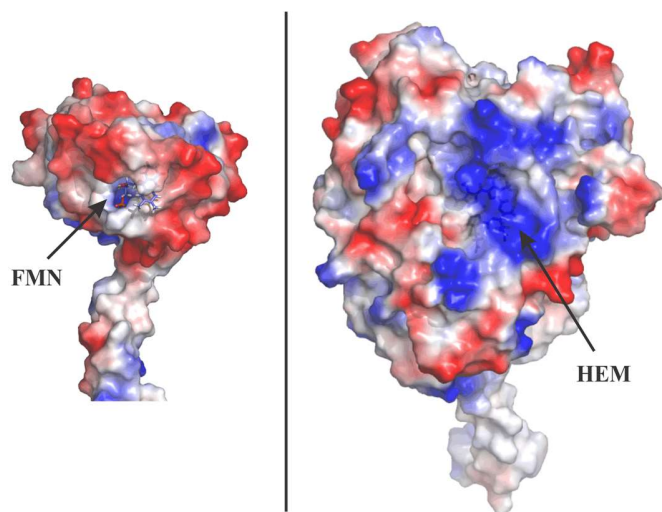
Obrázek 28 Porovnání otevřené konformace CPR se strukturou CPR po procesu zavírání. Detail snímku pak zobrazuje výrazné strukturální změny v regionu hinge. Ten zde vykonává funkci „pantu“ jehož rotací dochází ke konformačním změnám proteinu. CPR v otevřené formě je zobrazen reprezentací cartoon červeně, uzavřená forma pak modře s transparentností sniženu na 60 %. V detailu jsou hinge zvýrazněny reprezentací ribbon. Struktury byly přeloženy přes FMN doménu.

4.5 Komplex CPR-CYP

Hlavní funkcí CPR je elektronový transport směrem ke svým redoxním partnerům. Pro simulace komplexu CPR-CYP byla použita připravená struktura CPR v otevřené konformaci. Výchozí orientace proteinů byla zvolena tak, aby záporně nabitě aminokyseliny na povrchu FMN domény byly orientovány směrem ke kladně nabitým aminokyselinám CYPu v místě vázaného hemu (Obrázek 29). Elektrostatické interakce rozdílně nabitých aminokyselin na površích proteinů hrají klíčovou roli při vzájemné interakci proteinů.^[55] V průběhu 200 ns ekvilibrace došlo k utvoření velmi stabilního komplexu. Vzdálenost kofaktorů zodpovědných za ET (FMNH₂ a hem) klesla z původní hodnoty 29,6 Å na konstantních 20 Å (Graf 6). Nejnižší hodnota vzájemné vzdálenosti kofaktorů byla 18,3 Å. Tato vzdálenost je ve shodě s doposud publikovanými výsledky (19 Å; 19,5 Å).^[56,57]

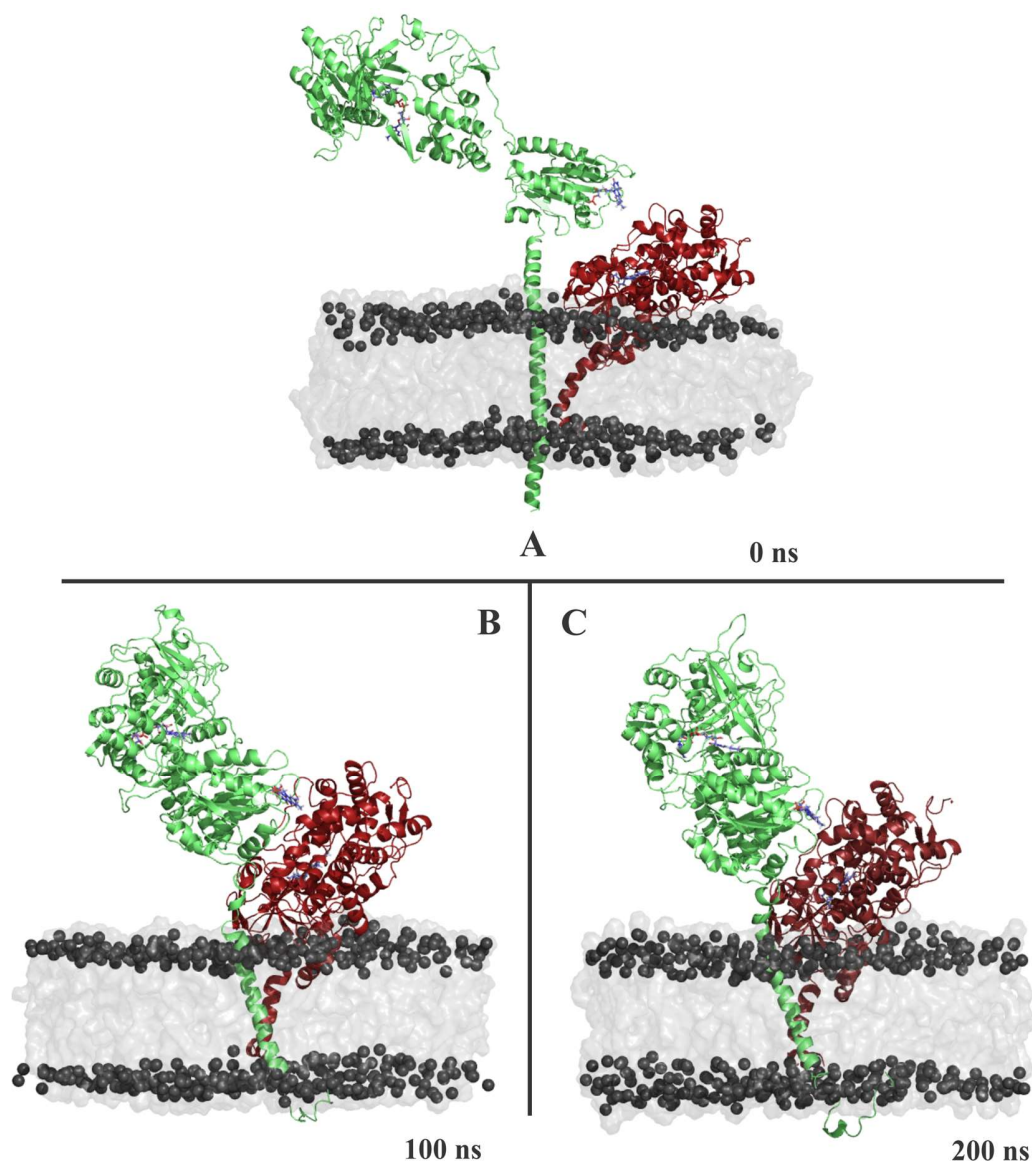


Graf 6 Změna vzdálenosti atomu N5 plně redukované formy FMNH₂ a atomu železa molekuly hemu.



Obrázek 29 Elektrostatická potenciál na povrchu FMN domény (vlevo) a cytochromu P450 s vyznačeným umístěním kofaktorů (vpravo).

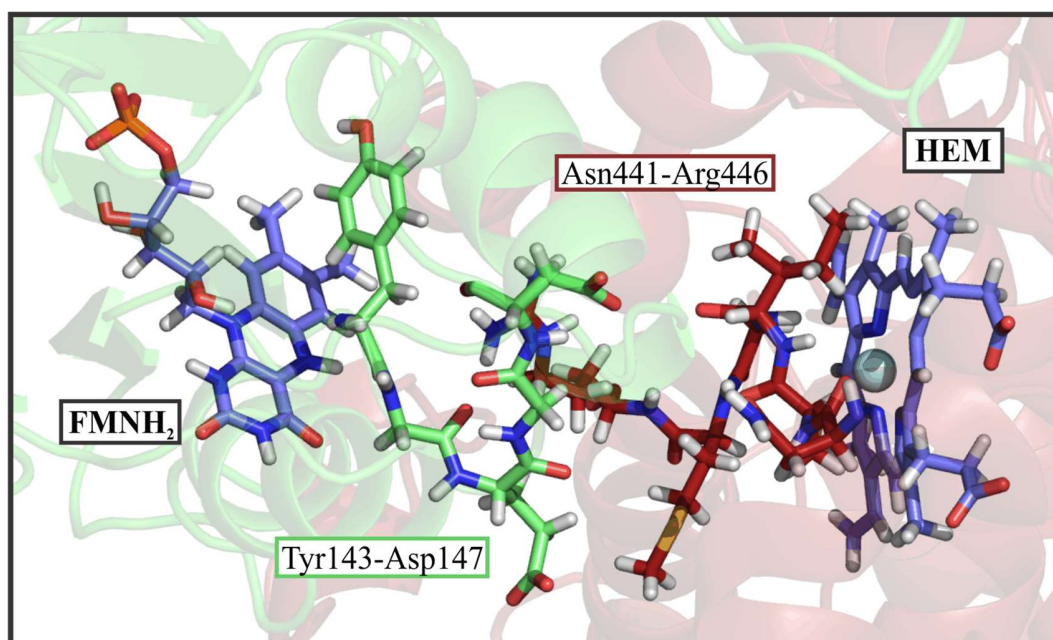
Během ekvilibrace došlo ve struktuře CPR ke změnám totožným, jako v případě simulací otevření formy CPR samotné. Došlo k přiblížení linkeru, FAD a NADPH domén k FMN doméně a následné interakci, která posléze přetrvala po zbytek 200 ns simulace (Obrázek 30). V průběhu simulace došlo k drobným změnám pozice CYPu na membráně. V důsledku interakce proteinů bylo pozorováno přiblížení CYPu směrem k CPR, které mělo za následek vzpřímení CYPu na membráně. Transmembránové domény redoxních partnerů prostupovaly membránou skrz a vzájemně neinteragovaly.



Obrázek 30 Model komplexu CPR-CYP na membráně v čase 0 ns (panel A), 100 ns (panel B) a 200 ns (panel C). Krom konformačních změn CPR byla během simulace je patrná změna pozice CYPu vůči membráně. Proteiny (CPR zelená; CYP tmavě červená) jsou zobrazeny v reprezentaci cartoon. DOPC membrána je vyobrazena v reprezentaci surface s fosfáty zvýrazněnými formou kuliček (šedá).

Silná interakce proteinů v komplexu i dostatečná vzdálenost kofaktorů podporují předpoklad, že model je vhodný pro popis interproteinového elektronového transportu. V komplexu je FMNH₂ kofaktor orientován tak, že dusík N5 směřuje ke struktuře hemu. Přimo mezi kofaktory se nacházejí smyčky Tyr143-Asp147 (Y143, G144, E145 G146 a D147) struktury CPR a Asn441-Arg446 (N441, C442, I443, G444 M445 a R446) struktury CYPu

(Obrázek 31.) Obě smyčky se vyskytovaly v bezprostřední blízkosti kofaktorů (Tyr143 se podílí na vazbě kofaktoru ve struktuře) a jejich vzdálenost během simulace zůstává konstantní. U aminokyseliny C442, M445 a R446 cytochromu P450 3AA již dříve byla popsána role aminokyselin interagujících s redoxními partnery.^[58] U cytochromu P450 2B4 pak mutace R443A (aminokyselina se vyskytuje ve stejné smyčce na proximální straně hemu jako R446 u 3A4) měla za následek snížení interakce s CPR.^[59] Je tedy možné předpokládat, že mnou identifikované části proteinů mohou zprostředkovávat elektronový transport.



Obrázek 31 Navrhované zapojení aminokyselin redoxních partnerů do procesu elektronového transportu. Kofaktory (modrá), aminokyseliny v jejich blízkosti (CPR zelená; CYP červená) jsou a vody mezi nimi jsou zobrazeny reprezentací sticks, zbytek proteinu pak reprezentací cartoon s transparentností 60%.

5. Závěr

Cytochrom P450 reduktáza je klíčovým proteinem mikrosomálního elektronového transportního řetězce. Plní zde funkci přenašeče elektronů získaných oxidací plně redukovaného NADPH kofaktoru. Z biochemického hlediska jsou nevýznamnějšími redoxními partnery CPR mikrosomální cytochromy P450. Jednou z cest vedoucích k lepšímu porozumění biochemických procesů na atomární úrovni je kombinování experimentálně získaných krystalových struktur s nástroji výpočetní chemie a provádění molekulárně dynamických simulací.

Cílem mé diplomové práce bylo provedení molekulárně dynamických simulací CPR v různých konformacích. Kromě simulací CPR v uzavřené a otevřené konformaci byla provedena metadynamická simulace konformačních změn mezi těmito formami. Dále byla provedena metadynamická simulace objasňující mechanismus první z redoxních reakcí intraproteinového cyklu CPR. Na základě dat získaných z těchto simulací byl vytvořen a simulován model CPR interagujících se svým redoxním partnerem cytochromem P450 3A4 poskytující atomární popis meziproteinového elektronového transportu.

CPR v uzavřené konformaci si zachovala svou kompaktní formu a v průběhu 200 ns simulace interagovala řadou aminokyselin s DOPC membránou. Byl popsán mechanismus a konformační změny Trp679 a NADPH kofaktoru během přenosu redoxního ekvivalentu mezi NADPH a FAD kofaktory. Na rozdíl od uzavřené struktury vykazovala otevřená struktura značnou flexibilitu a nestabilitu. Během procesu konformačních změn byla jako nejflexibilnější část proteinu identifikována oblast tzv. hinge spojující FMN doménu se zbytkem katalytických domén. Nakonec byla úspěšně provedena simulace modelu komplexu CPR-CYP při nichž se FMNH₂ a hem kofaktory přiblížily na vzdálenost 18,3 Å v pozici umožňující meziproteinový elektronový transport.

6. Summary

Cytochrome P450 reductase is crucial protein in microsomal electron transport chain. Here CPR acts as intermediary of electrons obtained from oxidation of fully reduced form of NADPH cofactor. From biochemical point of view, the most important redox partners for CPRs are microsomal cytochrome P450s. One way how to improve our understanding of biochemical processes at atomistic level is to combine experimentally obtained crystal structures with state of art computational tool and carry out molecular dynamics simulation.

The goal of my thesis was to carry out molecular dynamics simulations of CPR in different conformations. Simulation of CPR in close and open conformation were performed and analyzed as well as metadynamics simulation of conformational transition between those forms. We also employed metadynamics simulations to clarify mechanism of first redox reaction of CPR intraprotein cycle. Finally, based on data from those simulations we created model and successfully performed simulation of CPR interaction with its redox partner cytochrome P450 3A4. to enable atomistic picture of interprotein electron transfer.

CPR in close conformation remained in compact form with number of amino acids in contact with DOPC bilayer during 200 ns simulation. Mechanism and conformational changes during transfer of redox equivalent between NADPH to FAD was clarified using metadynamics simulation. On the other hand, open conformation of CPR showed great instability and flexibility. The most flexible part of CPR during the process of conformation changes from open to close conformation was the hinge region connecting FMN domain with the rest of the protein. Finally, simulation of complex CPR-CYP model was successfully performed leaving FMNH₂ and heme cofactors only 18.3 Å apart in position enabling interprotein electron transfer.

7. Použitá literatura

- (1) Pandey, A. V.; Flück, C. E.; NADPH P450 Oxidoreductase: Structure, Function, and Pathology of Diseases. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138* (2), 229–254.
- (2) Shephard, E. A.; Phillips, I. R.; Bayney, R. M.; Pike, S. F.; Rabin, B. R.; Quantification of NADPH: Cytochrome P-450 Reductase in Liver Microsomes by a Specific Radioimmunoassay Technique. *Biochem. J.* **1983**, *211* (2), 333–340.
- (3) Hocker, B. L.; Triphosphopyridine Nucleotide-Cytochrome c Reductase in Liver. *J. Biol. Chem.* **1950**, *183* (2), 593–605.
- (4) Williams, C. H.; Kamin, H.; Microsomal Triphosphopyridine Nucleotide-Cytochrome c Reductase of Liver. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237* (2), 587–595.
- (5) Phillips, H. A.; Langdon, R. H.; Hepatic Triphosphopyridine Nucleotide-Cytochrome c Reductase: Isolation, Characterization, and Kinetic Studies. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237* (8), 2652–2660.
- (6) Lu, A. Y. H.; Junke, W.; Coon, M. J.; Resolution of Cytochrome P450 Containing ω -Hydroxylation System of Liver Microsomes into Three Components. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244* (13), 3714–3721.
- (7) Shephard, E. A.; Phillips, I. R.; Santisteban, I.; West, L. F.; Palmer, C. N.; Ashworth, A.; Povey, S.; Isolation of a Human Cytochrome P-450 Reductase cDNA Clone and Localization of the Corresponding Gene to Chromosome 7q11.2. *Ann.Hum.Genet.* **1989**, *53* (4), 291–301.
- (8) Ostrowski, J.; Barber, M. J.; Rueger, D. C.; Miller, B. E.; Siegel, L. M.; Kredich, N. M.; Characterization of the Flavoprotein Moieties of NADPH-Sulfite Reductase from *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia Coli*. Physicochemical and Catalytic Properties, Amino Acid Sequence Deduced From DNA Sequence of *cysJ*, and Comparison with NADPH-Cytochrom. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (27), 15796–15808.
- (9) Bredt, D. S.; Snyder, S. H.; Isolation of Nitric Oxide Synthetase, a Calmodulin-Requiring Enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87* (2), 682–685.
- (10) Leclerc, D.; Wilson, A.; Dumas, R.; Gafuik, C.; Song, D.; Watkins, D.; Heng, H. H. Q.; Rommens, J. M.; Scherer, S. W.; Rosenblatt, D. S.; et al. Cloning and Mapping of a cDNA for Methionine Synthase Reductase, a Flavoprotein Defective in Patients with Homocystinuria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95* (6), 3059–3064.
- (11) Paine, M. J. I.; Garner, A. P.; Sibbald, J.; Sales, M.; Smith, T.; Tew, D. G.; Wolf, R.; Powell, D.; Pratt, N.; Wolf, C. R.; Cloning and Characterization of a Novel Human Dual Flavin Reductase Cloning and Characterization of a Novel Human Dual Flavin Reductase. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (2), 1471–1478.

- (12) Roman, L. J.; McLain, J.; Masters, B. S.; Chimeric Enzymes of Cytochrome P450 Oxidoreductase and Neuronal Nitric-Oxide Synthase Reductase Domain Reveal Structural and Functional Differences. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (28), 25700–25707.
- (13) Wang, M.; Roberts, D. L.; Paschke, R.; Shea, T. M.; Siler Masters, B. S.; Kim, J.-J. P.; Three-Dimensional Structure of NADPH-Cytochrome P450 Reductase: Prototype for FMN- and FAD-Containing Enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94* (16), 8411–8416.
- (14) Xia, C.; Panda, S. P.; Marohnic, C. C.; Martásek, P.; Masters, B. S.; Kim, J.-J. P.; Structural Basis for Human NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase Deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (33), 13486–13491.
- (15) Aigrain, L.; Pompon, D.; Morera, S.; Truan, G.; Structure of the Open Conformation of a Functional Chimeric NADPH Cytochrome P450 Reductase. *EMBO Rep.* **2009**, *10* (7), 742–747.
- (16) Murataliev, M. B.; Feyereisen, R.; Walker, F. A.; Electron Transfer by Diflavin Reductases. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1698* (1), 1–26.
- (17) Iyanagi, T.; Xia, C.; Kim, J.-J. P.; NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase: Prototypic Member of the Diflavin Reductase Family. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *528* (1), 72–89.
- (18) de Montellano, P. O.; *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3rd ed.; Kluwer Academic: New York, 2005.
- (19) Guengerich, F. P. Cytochrome P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity. *AAPS J.* **2005**, *8* (1), E101–E111.
- (20) Girvan, H. M.; Waltham, T. N.; Neeli, R.; Collins, H. F.; McLean, K. J.; Scrutton, N. S.; Leys, D.; Munro, W.; Flavocytochrome P450 BM3 and the Origin of CYP102 Fusion Species. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34* (6), 1173–1177.
- (21) Hannemann, F.; Bichet, A.; Ewen, K. M.; Bernhardt, R.; Cytochrome P450 Systems - Biological Variations of Electron Transport Chains. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2007**, *1770* (3), 330–344.
- (22) Schenkman, J. B.; Jansson, I. The Many Roles of Cytochrome b5. *Pharmacol. Ther.* **2003**, *97* (2), 139–152.
- (23) Dürr, U. H. N.; Waskell, L.; Ramamoorthy, A.; The Cytochromes P450 and b5 and Their Reductases - Promising Targets for Structural Studies by Advanced Solid-State NMR Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768* (12), 3235–3259.
- (24) Evans, J. P.; Niemevz, F.; Buldain, G.; de Montellano, P. O.; Isoporphyrin Intermediate in Heme Oxygenase Catalysis: Oxidation of α -Meso-Phenylheme. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (28), 19530–19539.

- (25) Yoshida, T.; Kikuchi, G.; Features of the Reaction of Heme Degradation Catalyzed by the Reconstituted Microsomal Heme Oxygenase System. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253* (12), 4230–4236.
- (26) Ono, T.; Bloch, K.; Solubilization and Partial Characterization of Rat Liver Squalene Epoxidase. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250* (4), 1571–1579.
- (27) Ramji, S.; Lee, C.; Inaba, T.; Patterson, A. V.; Riddick, D. S.; Human NADPH-Cytochrome P450 Reductase Overexpression Does Not Enhance the Aerobic Cytotoxicity of Doxorubicin in Human Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6914–6919.
- (28) Bligh, H. F.; Bartoszek, A.; Robson, C. N.; Hickson, I. D.; Kasper, C. B.; Beggs, J. D.; Wolf, C. R.; Activation of Mitomycin C by NADPH:Cytochrome P-450 Reductase. *Cancer Res.* **1990**, *50* (24), 7789–7792.
- (29) dostupné 16. 3. 2016; Mesoscopic Modelling and Theoretical Chemistry http://www.icsm.fr/icsm_engl/lmct_en.html.
- (30) Janderka, P.; Molekulové Modelování a Teoretická Chemie Na Pc. *Chem. List.* **2000**, *94*, 28–38.
- (31) Young, D. C. *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems.*, 1st ed.; Wiley: New York, 2001.
- (32) Abraham, M. J.; van der Spoel, D.; Lindhal, E.; Hess, B.; Team, the gromacs developmet.; GROMACS User Manual Version 5.0.7. **2015**.
- (33) dostupné 16. 3. 2016; Molecular Dynamics Code PumMa - Potentials <http://cbio.bmt.tue.nl/pumma/index.php/Theory/Potentials>.
- (34) Laio, A.; Gervasio, F. L.; Metadynamics: A Method to Simulate Rare Events and Reconstruct the Free Energy in Biophysics, Chemistry and Material Science. *Reports Prog. Phys.* **2008**, *71* (12), 126601–126023.
- (35) The UniProt Consortium. UniProt: A Hub For Protein Information. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *43* (Database issue), D204–D212.
- (36) Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J.; Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215* (3), 403–410.
- (37) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.; The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (1), 235–242.
- (38) Eswar, N.; Webb, B.; Marti-Renom, M. A.; Madhusudhan, M. S.; Eramian, D.; Shen, M.-Y.; Pieper, U.; Sali, A.; Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Curr Protoc Bioinforma.* **2006**, *Chapter 5*, Unit 5.6.

- (39) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E.; UCSF Chimera - A Visualization System For Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1605–1612.
- (40) Yano, J. K.; Wester, M. R.; Schoch, G. A.; Griffin, K. J.; Stout, C. D.; Johnson, E. F.; The Structure of Human Microsomal Cytochrome P450 3A4 Determined by X-Ray Crystallography to 2.05 Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (37), 38091–38094.
- (41) Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A.; Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25* (2), 247–260.
- (42) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr, J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; et al. Gaussian 03, Revision E.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT. **2004**.
- (43) Shahrokh, K.; Orendt, A.; Yost, G.; Cheatham, T.; Quantum Mechanically Derived AMBER-Compatible Heme Parameters for Various States of the Cytochrome P450 Catalytic Cycle. *J. Comput. Chem.* **2011**, *33* (2), 191–133.
- (44) Wolf, M. G.; Hoefling, M.; Aponte-Santamaría, C.; Grubmüller, H.; Groenhof, G.; G_membed: Efficient Insertion of a Membrane Protein Into an Equilibrated Lipid Bilayer With Minimal Perturbation. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (11), 2169–2174.
- (45) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L.; Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926.
- (46) Pronk, S.; Páll, S.; Schulz, R.; Larsson, P.; Bjelkmar, P.; Apostolov, R.; Shirts, M. R.; Smith, J. C.; Kasson, P. M.; Van Der Spoel, D.; et al. GROMACS 4.5: A High-Throughput and Highly Parallel Open Source Molecular Simulation Toolkit. *Bioinformatics* **2013**, *29* (7), 845–854.
- (47) Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindah, E.; Gromacs: High Performance Molecular Simulations Through Multi-Level Parallelism From Laptops to Supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1-2*, 19–25.
- (48) Tribello, G. A.; Bonomi, M.; Branduardi, D.; Camilloni, C.; Bussi, G.; PLUMED 2: New Feathers For An Old Bird. *Comput. Phys. Commun.* **2014**, *185* (2), 604–613.
- (49) Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Ritberg, A.; Simmerling, C.; Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters. *Proteins* **2006**, *65* (3), 721–725.
- (50) Jämbeck, J. P. M.; Lyubartsev, A. P.; Derivation and Systematic Validation of a Refined All-Atom Force Field for Phosphatidylcholine Lipids. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (10), 3164–3179.
- (51) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. A; Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J Chem Phys* **1995**, *103* (19), 8577–8593.

- (52) Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M.; LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18* (12), 1463–1472.
- (53) Bayburt, T. H.; Carlson, J. W.; Sligar, S. G.; Single Molecule Height Measurements on a Membrane Protein in Nanometer-Scale Phospholipid Bilayer Disks. *Langmuir* **2000**, *16* (14), 5993–5997.
- (54) Hubbard, P. a; Shen, a L.; Paschke, R.; Kasper, C. B.; Kim, J. J.; NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase: Structural Basis for Hydride and Electron Transfer. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (31), 29163–29170.
- (55) Zhao, Q.; Modi, S.; Smith, G.; Paine, M.; Mcdonagh, P. D.; Wolf, C. R.; Tew, D.; Lian, L.; Roberts, G. C. K.; Driessen, H. P. C.; Crystal Structure of the FMN-Binding Domain of Human Cytochrome P450 Reductase at 1.93 Å Resolution. *Protein Science* **1999**, *8* (2), 298–306.
- (56) Dai, Y.; Zhen, J.; Zhang, X.; Sun, Z.; Zhong, Y.; Liu, S.; Guo, Y.; Wu, Q.; Analysis of the Complex Formation, Interaction and Electron Transfer Pathway Between the “Open” Conformation of NADPH-Cytochrome P450 Reductase and Aromatase. *Steroids* **2015**, *101*, 116–124.
- (57) Yu, X.; Kokh, D. B.; Nandekar, P.; Mustafa, G.; Richter, S.; Wade, R. C.; Dynathor: Dynamics of the Complex of Cytochrome P450 and Cytochrome P450 Reductase in a Phospholipid Bilayer. In *High Performance Computing in Science 15*; Nagel, E. W., Kröner, H. D., Resch, M. M., Eds.; Springer International Publishing, 2016; pp 255–264.
- (58) Liu, J.; Tawa, G. J.; Wallqvist, A.; Identifying Cytochrome P450 Functional Networks and Their Allosteric Regulatory Elements. *PLoS One* **2013**, *8* (12), 1–11.
- (59) Bridges, A.; Gruenke, L.; Chang, Y.-T.; Vakser, I. A.; Loew, G.; Waskell, L.; Identification of the Binding Site on Cytochrome P450 2B4 for Cytochrome b5 and Cytochrome P450 Reductase. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (27), 17036–17049.

8. Doplnující materiály

Parametry pro metadynamické simulace pozicování proteinu na membráně:

```
WHOLEMOLECULES ENTITY0=1-10667
```

```
#####
```

```
COM ATOMS=1437-1659      LABEL=fmn  
COM ATOMS=8366-8587     LABEL=fad  
COM ATOMS=10877-79047:100 LABEL=membrane
```

```
#####
```

```
# CV1 position of FMN domain with respect to the membrane  
d1: DISTANCE ATOMS=fmn,membrane COMPONENTS  
METAD ARG=d1.z PACE=5000 HEIGHT=0.6 SIGMA=0.051 INTERVAL=-7.0,-4.5
```

```
# CV2 position of FAD domain with respect to the membrane  
d2: DISTANCE ATOMS=fad,membrane COMPONENTS  
METAD ARG=d2.z PACE=5000 HEIGHT=0.6 SIGMA=0.047 INTERVAL=-6.5,-4.0
```

```
#####
```

```
PRINT ARG=d1.z,d2.z FILE=colvar STRIDE=1000
```

Parametry pro metadynamické simulace redoxní reakce:

```
WHOLEMOLECULES ENTITY0=1-10667
```

```
#####
```

```
# CV 1 distance between C 10827 (NADPH) - N5 10755  
d1: DISTANCE ATOMS=10827,10755  
METAD ARG=d1 PACE=5000 HEIGHT=0.6 SIGMA=0.075 INTERVAL=0.1,2.0
```

```
#####
```

```
PRINT ARG=d1 FILE=colvar STRIDE=1000
```

Parametry pro metadynamické simulace konformačních změn uzavírání CPR:

```
WHOLEMOLECULES ENTITY0=1-10667
```

```
#####
```

```
drmsd1: DRMSD REFERENCE=milestone_1.pdb LOWER_CUTOFF=0.0 UPPER_CUTOFF=4  
drmsd2: DRMSD REFERENCE=milestone_2.pdb LOWER_CUTOFF=0.0 UPPER_CUTOFF=4
```

```
#####
```

```
##CV1
```

```
drmsdX: FUNCPATHMSD ARG=drmsd1,drmsd2 LAMBDA=2.2  
cv: METAD ARG=drmsdX.s PACE=5000 HEIGHT=0.6 SIGMA=0.05
```

```
#####
```

```
PRINT ARG=drmsdX.s,drmsdX.z,cv.bias FILE=colvar STRIDE=1000
```