

细胞色素 P450 配体通道的研究进展

沈中华, 李卫华*, 许柚, 刘桂霞, 唐赞*

华东理工大学药学院, 分子模拟与设计实验室, 上海 200237

* 联系人, E-mail: whli@ecust.edu.cn; ytang234@ecust.edu.cn

2010-10-09 收稿, 2010-12-27 接受

上海市自然科学基金(10ZR1407000)、华东理工大学优秀青年教师基金(YC0157115)、新世纪优秀人才支持计划(NCET-08-0774)和中央高校基本科研业务费专项资金(WY1014010)资助项目

摘要 细胞色素 P450 (CYP)是一类含亚铁血红素的酶,不但能催化内源性底物的生物合成和代谢,而且对外源性化合物的代谢、激活以及降解毒性等起着重要作用. P450 也是人体内最主要的药物代谢酶,能催化代谢约 75%的临床药物.已有的 P450 酶晶体结构显示,绝大多数酶呈现闭合的构象,其催化活性位点位于血红素上方且深埋于蛋白质的中心,没有明显的通道用于配体进出活性中心.因此一个有趣而重要的问题是,配体如何进出酶的活性中心达到被氧化或发生抑制作用?近年来,关于 P450 酶配体通道的研究取得了显著进展.本文重点综述了通道研究的实验方法及 6 类 P450 酶可能存在的通道和作用机制,并对其未来的发展方向进行了展望.

关键词

细胞色素 P450
分子动力学
拉伸动力学
随机加速动力学
定点突变

细胞色素 P450 (CYP)是以血红素为辅基的金属酶大家族,广泛存在于包括细菌、真菌、植物和动物在内的各种生物体内(<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>),其催化中心的血红素与保守残基半胱氨酸共价结合,参与底物氧化. P450 酶不但参与内源性底物(如脂类和类固醇激素等)的生物合成,而且在异源性化合物(如药物和致癌物等)的代谢中也发挥着重要作用.底物经 P450 氧化后,其水溶性增加,从而更易排出体外. P450 也是人体中最主要的药物代谢酶,参与临床约 75%左右的药物代谢,这其中的 95%由 P450 3A4/5, 2C8/9, 2C19, 2D6, 1A2, 2E1 酶来完成^[1].

P450 是一类单加氧酶,在其催化的氧化反应中,分子氧被分开:一个氧原子被加到底物中,使底物氧化;另一个氧原子与氢原子结合形成水而释放.催化循环步骤如图 1 所示^[2,3]: (i) 底物结合到 P450 的活性部位.这一过程血红素中心的铁原子的自旋态也发生改变,由六配位的低自旋态变为五配位的高自旋态. (ii) NAD(P)H 提供第一个电子,使三价铁还原

成二价铁.这一电子的传递有 2 种情况,主要依赖 P450 在细胞中的位置:对于内质网上的 P450 而言,电子从辅酶 NADPH 经 NAD(P)H-P450 还原酶传递,再到 P450 的铁;对于线粒体上的 P450 而言,电子从辅酶 NAD(P)H 经黄素蛋白还原酶传递给铁氧还蛋白,再到 P450 的铁. (iii) 分子氧结合到血红素的表面,形成 Fe-O₂. (iv) 通过电子传递系统提供第 2 个电子,形成 Fe-O₂复合物.这个电子一般来自 NAD(P)H-P450 还原酶,也有的来自细胞色素 b₅. (v) 体系得到 2 个质子,与 Fe-O₂复合物的一个氧原子结合,形成水而释放. (vi) 底物羟基化并释放,水分子占据该配位位置. (vii) 过氧化物可取代氧分子氧化底物,产生捷径,不再经过 3~5 步骤.

迄今为止已有 30 多个 P450 亚型的晶体结构被报道,这些结构来自于不同的物种,如细菌、真菌以及哺乳动物等.对这些 P450 的晶体结构分析后发现以下特点:虽然有些 P450 的氨基酸同一性(sequence identity)较低(~20%),但它们的二级结构元素相同,整体结构上相似,通常有 13 个 α 螺旋、2~5 个 β 折叠

英文引用格式: Shen Z H, Li W H, Xu Y, et al. Advances in the ligand channels of cytochrome P450s (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2011, 56: 189—197, doi: 10.1360/972010-1865

结构构成三角棱柱结构^[4]; P450 的催化活性中心位于血红素的上方, 深埋于酶的结构内部; 绝大部分 P450 的晶体呈现一个闭合的构象, 没有明显的通道用于配体的进出, 如图 2 所示. 底物要发生催化氧化, 首先必须到达酶的催化活性中心, 然后生成产物离开活性口袋. 实验研究表明, P450 酶在催化代谢循环过程中, 底物在多个步骤均有结合或释放的行为. 但是上述酶的晶体结构特点并不允许配体进入, 因此产生了一个有趣而重要的问题: P450 如何识别底物/抑制剂, 并打开其结构的某一部分, 使得底物/抑制剂能自由进出活性中心^[5,6]? 这些过程十分关键, 因

为它们涉及配体与受体间的相互作用和动态结合路径等重要信息, 同时也可以解释为何 P450 酶具有底物特异性等特点^[7,8].

近年来, 有关配体通道的研究获得了越来越多的关注, 如细胞色素 P450 中配体进出活性中心的通道、核糖体中多肽的进出通道^[9]及细胞膜通道^[10]等. 许多通道识别软件也应运而生, 如 MOLE^[11]和 CAVER^[12]等, 软件的开发与应用为课题研究提供了更多的信息. 本文综述了细胞色素 P450 配体通道研究的实验方法和最新进展, 并做了一些展望, 以期对相关研究提供参考.

1 主要实验方法

1.1 计算机模拟方法

(i) 拉伸分子动力学(steered molecular dynamics, SMD). SMD 方法^[6]通过对配体质心施加外力, 使配体从活性中心移动到蛋白质表面一个确定位置. 它可以加速结合或解离过程, 能够使原本需要在较长时间内发生的动力学行为在允许的时间尺度内完成. 通过分析外力、做功和能量大小, SMD 能准确获得配体与通道之间的作用机制.

SMD 方法中施加于配体小分子上的作用力, 由以下公式计算:

$$\vec{F}(t) = k(t)[\vec{r}_0 - \vec{r}(t)],$$

其中, $k(t)$ 为弹力常数, 与配体的弹性波动幅度有关; $\vec{r}_0 - \vec{r}(t)$ 是距离向量, 是配体的质心与外部约束力点之间的距离.

在拉伸动力学模拟中, 需要注意 2 个方面的因素: (1) 外力的方向; (2) 外力大小与拉伸速度. 对于一般的受体与配体结合, 最佳的路径是 1 条直线. 这时只需要给出 1 个最优的外力方向即可确定解离或结合路径. 在拉伸动力学中, 可选择 2 种外力模式: (1) 等外力大小; (2) 等速度大小. 前者通过速度随时间的变化来体现解离或结合过程中的动态变化, 后者通过力随时间的变化来体现解离或结合过程中的动态变化, 并被广泛采用. 通常, 在最小恒速和外力下使配体离开活性中心, 同时蛋白质构象发生最小改变, 保证实验的可靠性和准确性.

(ii) 随机加速分子动力学 (random acceleration molecular dynamics, RAMD). 2000 年, Lüdemann 等

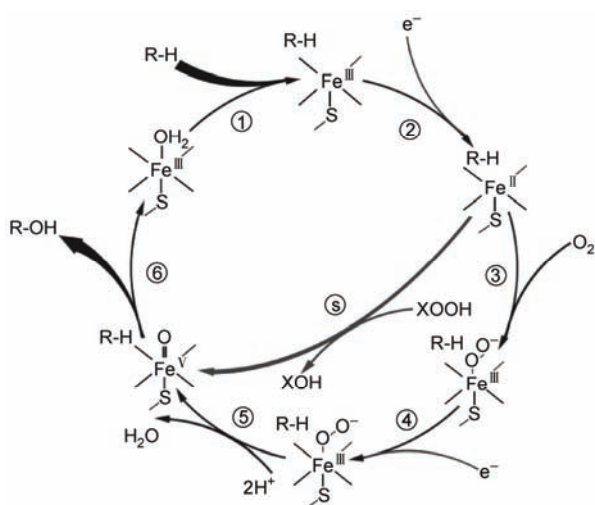


图 1 P450 酶反应循环

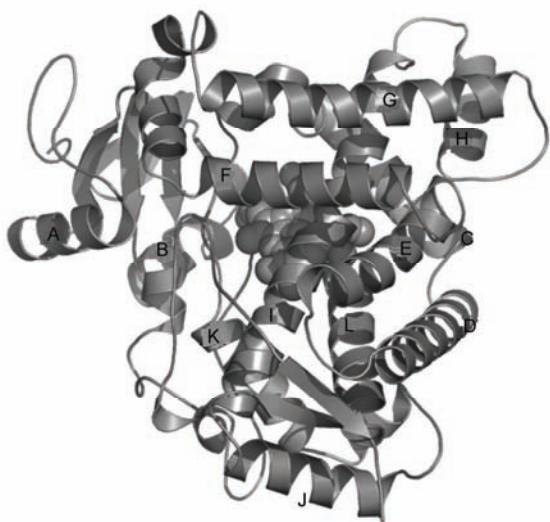


图 2 P450 2A6 三维结构

人^[5]提出了 RAMD 方法. 该方法是 SMD 方法的一种改进. RAMD 方法首先在配体上施加一个随机方向的外力, 当配体在预定时间内不能通过规定的距离时, 外力改变方向; 重复上述过程直到配体离开通道. 与 SMD 相比, RAMD 最大的优势是, 它不需要预先定义一个拉伸方向, 而是能通过设定的条件自动地搜寻配体行走的方向. RAMD 可以提高发现配体通道的可能性, 特别适合于那些结合口袋深埋于结构内部的生物大分子的通道搜寻. 迄今为止, RAMD 已经在维甲酸受体^[13]、雌激素受体^[14]和 P450 体系^[15]中得到了广泛的应用. 2008 年, 中国科学院上海药物研究所 Liu 等人^[16]也提出了一种类似 RAMD 的方法, 简化了模拟过程并且实验结果较为可靠.

施加在配体上的作用力, 由以下公式计算:

$$\vec{F} = k\vec{r}_0,$$

k 为弹力常数; $\vec{r}_0$ 为随机方向的单位向量.

在 RAMD 方法中有 4 个可调参数: (1) k , 在整个模拟过程中保持不变并决定力的大小; (2) N , 在力的方向不变时 MD 的步数; (3) $r_{\min}$, 在经过 N 步后底物必须移动的最小距离; (4) Δt , 步长. 在 $N \times \Delta t$ 时间内, 底物必须经过预定的距离 $r_{\min}$, 否则将选择一个新的单位向量 $\vec{r}_0$.

(iii) 晶体热力学因子法(thermal factors). 不论是在液相还是固相中, 蛋白质柔性是蛋白质结构的固有性质. 从晶体结构获得的热力学因子判断蛋白质柔性大小是一种较为有效的方法. 热力学因子越高则说明蛋白质柔性越大, 这些柔性区域则有可能包含配体进出的热力学运动通道(thermal motion paths, TMPs). 基于这样一个假设, Carugo 等人^[17]提出了一种简单且快速的方法分析通道方向: 选择 3 个在不同残基上、作用范围在 4.5 Å 内的原子作为一组起始三联体, 搜寻并保留周围平均热力因子最高、且质心距离在 7.1 Å 范围内的一组三联体, 重复该过程, 最终得到的三联体链就组成了配体进出的热力学运动通道.

(iv) MOLE 和 CAVER 算法. MOLE^[11]和 CAVER^[12]程序通过对晶体衍射、NMR 或者分子动力学模拟轨迹中获得的结构进行计算, 可以快速地发现从结构内部的裂缝或口袋到表面溶剂的通道. 但是两者运算法则有所不同: MOLE 程序采用基于 Voronoi 图的 Dijkstra 最短路径算法, 而 CAVER 采用

的是格点算法.

以上研究方法中, RAMD 与 SMD 可以对通道变化的动态过程进行分析, 前者用于发现 P450 酶中可能存在的通道, 后者对 1 个已确定的通道进行更具体精确的分析, 如能量和作用力等, 2 种方法较为准确但十分耗时; 晶体热力学因子和 MOLE/CAVER 方法是对通道进行静态分析, 主要针对晶体结构, 计算速度快, 但是无法描述通道中动态相互作用机制.

1.2 定点突变与晶体结构分析

定点突变是分子生物学最常用的技术之一, 主要通过 PCR^[18,19]向目的片段的特定碱基进行定点改变、缺失或者插入, 从而改变对应的氨基酸序列. 对突变基因表达产物的研究有助于了解蛋白质结构与功能的关系. 定点突变结合计算机模拟研究已成为一种很有用的工具来表征 P450 的活性位点和对化合物的立体选择性有重要影响的关键残基.

迄今为止, 蛋白质数据库(PDB)中已有 300 多个 P450 酶晶体结构, 同一酶具有多个结合了不同配体的晶体结构. 这些结构有的来自于低等生物可溶性的 P450, 也有的来自于哺乳类动物膜结合形态的 P450. 通过对这些晶体结构在不同形态(结合及没有结合配体)的构象差异分析, 可以获得酶的柔性部位, 为通道的表征提供参考.

2 P450s 中的通道

2.1 P450cam 中的通道

P450cam 催化天然底物樟脑的羟基化作用, 其活性中心封闭且具有刚性^[20]. 1987 年, Poulos 等人^[21]首先发现了恶臭假单胞菌的 P450cam 晶体结构, 指出该晶体结构有 2 个可能性较大的通道区域: 一个位于 B-螺旋和 F/G 环区之间, 该区域被认为是疏水性底物的进入通道; 另一个靠近血红素丙酸基团并且被认为是亲水性产物的出口通道. 1994 年, Deprez 等人^[22]发现底物进入活性中心的过程受到 Asp251 等残基的静电相互作用调控, 该作用将 F-G 环束缚在 I 螺旋上使活性中心关闭.

2000 年, Lüdemann 等人^[5]用 RAMD 方法发现了 3 类通道(pathway, pw), 根据 Wade 系统命名法^[23], 分别为 pw1, pw2 和 pw3 (图 3), 这与使用晶体热力学

因子法得到的结果一致^[24], 其中 pw1 的热力学因子最大, 表明该通道的柔性最大. Pw1 位于 C 和 H 螺旋或 C 和 L 螺旋之间, 接近 G-H 环和 β_2 折叠, 因为柔性较大, 适合分子量较大的配体出入. pw2 由 pw2a, 2b 和 2c 共 3 个子通道组成^[23]: pw2a 位于 F/G 环和 B-螺旋之间, 模拟过程中发现通道中的残基构象变化较大, 包括 F193, F87, Y29 和 Y96 等残基; pw2b 位于 B/B'-环和 β_1 , β_3 折叠之间, 该通道只有在配体获得较大外力的情况下才存在, 所以作为通道可能性较小; pw2c 位于 B-, G 和 I 螺旋之间, 配体解离过程中破坏了 D97 和 K197 之间的盐键作用, 并且邻近残基的芳香环发生了翻转. pw3 位于 F 和 G 螺旋之间, 主要由脂肪族残基构成, 模拟过程中发现 L200, L177 和 V247 疏水残基发生了位移. 对 RAMD 产生的 14 条轨迹进行分析后发现, pw1, pw2 和 pw3 的比例分别为 4:7:3, 推测 pw2 的可能性较大. 整个 RAMD 模拟过程中, 盐键起着十分重要的作用, 它们束缚相关的链使通道关闭, 而配体的移动需要克服这些作用力.

2000 年, Lüdemann 课题组^[6]在 RAMD 基础上通过绝热映射法和 SMD 方法获得了更为准确的蛋白配体相互作用机制和 3 类通道存在的概率. 结果表明, pw2a 是底物与产物进出最有可能的通道, 因为 pw2a 中的能垒、拉力和做功都是最低的并且通道的长度最短; pw3 存在概率为 pw2a 的十分之一; pw1 所需的能垒、拉力和做功是最大的, 所以在 3 类通道中的可能性最小.

2.2 P450BM-3 中的通道

P450BM-3 是巨大芽孢杆菌脂肪酸单加氧酶. 1993 年, Ravichandran 等人^[25]最先测定了 P450BM-3

的晶体结构. 1997 年, Li 和 Poulos^[26]发布了结合脂肪酸的 P450BM-3 复合物晶体结构, 与未结合底物的晶体结构相比, 该复合物结构发生了较大的构象变化, 致使通道口关闭.

2000 年, Lüdemann 等人^[5]用 RAMD 方法发现 BM-3 中只有 pw2(图 4), 由 pw2a 和 pw2d 共 2 个子通道组成. pw2a 位于 F/G 环和 B-螺旋之间, pw2d 位于 N 末端和 A 螺旋之间, 两者都都位于疏水区域并且可作为对接区. P450BM-3 表面的 Arg47 残基能与配体棕榈油酸(PAM)形成盐键, 使得 PAM 在解离过程中发生翻转, 所以盐键对配体的定位取向十分重要. 为了消除盐键的影响, 将 PAM 上的电荷中和得到 PAMn, 其他条件保持一致, 发现 RAMD 施加的拉力显著下降, 说明 PAM 离开通道的最大阻力是盐键, 而非疏水作用. 底物的柔性也起着十分重要的作用, U 型构象的 PAM 更易进出活性中心.

虽然 P450cam 和 P450BM-3 都存在 pw2a, 但是两者的作用机制完全不同^[6]. 在 P450BM-3 中, 由于 pw2a 与底物 PAM 存在盐键作用, 使得 PAM 的解离需要更大的外力、能量和功. 同时还发现, 虽然两种酶折叠类似, 但结构有较大差异, pw2a 在 P450BM-3 中较长. 2002 年, Winn 等人^[27]证实了这一观点, 并且发现 P450ery 中的 pw2a 也有类似的盐键作用. 此外, 通道中的 R185 能与周围 4 个残基 I174, V176, L76 和 A74 形成氢键使通道关闭, 底物解离需要破坏这些氢键, 使 R185 向外旋转、F/G 和 B-B'-环打开. 2003 年, Poulos^[28]认为, F, G 螺旋及 F/G 环的柔性决定了

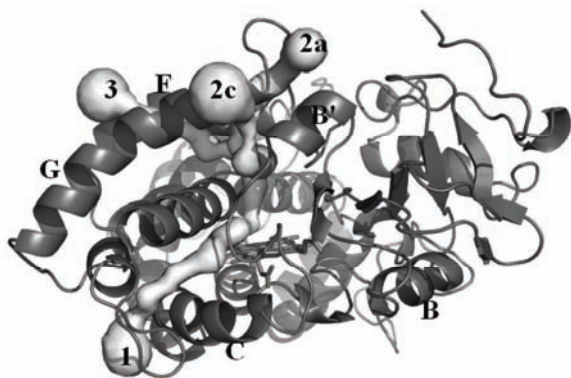


图3 P450cam 中的通道

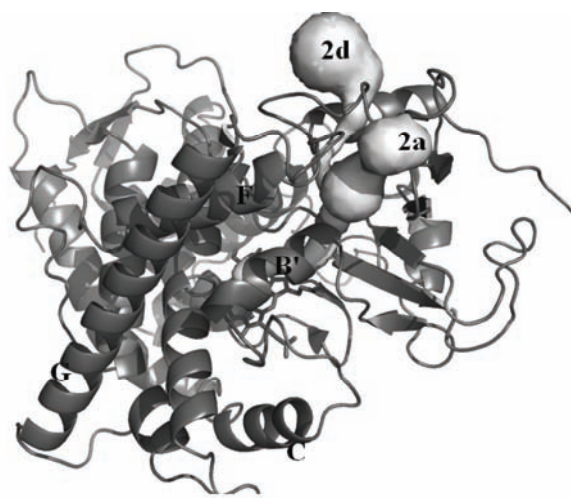


图4 P450BM-3 中的通道

pw2a 通道的开闭, 并且对 pw2ac, pw2f 和溶剂通道 S 的存在也有一定的影响。

2.3 P450 2B1 中的通道

本课题组对 P450 2B1 的通道进行过探索。由于 P450 2B1 的晶体结构到目前为止仍未被解析, Li 等人^[29]用序列一致性较高的 2B4 复合物晶体结构同源模建了 2B1 三维结构(图 5), 并将睾酮对接入活性中心, 用 SMD 模拟方法将睾酮从三个预设通道拉出, 分别为 pw2c, pw2e 和位于 E, F, I 螺旋与 β 3 发夹之间的溶剂通道 S, 其中溶剂通道 S 被认为对传递质子起着十分重要的作用^[30]。

实验结果表明, 溶剂通道 S 需要最大的拉力和主链移动, 通道中的残基 Glu301 和 Lys479 之间的氢键是阻碍睾酮离去最主要的因素。此外, Scott 等人^[31]通过点突变实验认为 F-G 区域不参与该通道形成, 所以溶剂通道 S 在 P450 2B1 中存在的可能性较小。但在其他 P450 酶中, 如 P450 2C5, 2B4, 2D6 和 BM3^[32,33], 在它们的晶体结构中均观察到了溶剂通道 S 的开口。2009 年, Fishelovitch 等人^[34]用 SMD 方法证实了 P450 3A4 存在溶剂通道 S。

pw2c 和 2e 需要相对较小的拉力和主链位移, 所以两者作为通道的可能性较大。在 pw2c 中, F297 和 F108 如同夹子固定睾酮且 S294 与配体形成氢键, 阻止其离开活性中心。当配体克服氢键作用离去时,

F297 的芳环发生旋转并且 B-C 环有较大的移动。点突变实验认为, I 螺旋和 B-C 环具有十分重要的作用, 这个结果也支持了该区域可能存在 pw2c 的结论。在 pw2e 中, F115 作为关键残基稳定配体的结合方向并阻止其离开活性中心。突变实验发现, F115A 影响酶的区域和立体选择性, 使酶的羟基化作用活性下降 5 倍。当配体从 pw2e 中离开时, B-C 环/B-螺旋区域略有扩展但主链未发生较大的移动。在其他 P450 酶中, P450 51^[35]和 P450BS β ^[36]的晶体结构均显示在 B-C 环有较大开口, pw2e 的存在主要与该区域的柔性和大小有关。

2.4 P450 2C5 中的通道

P450 2C5 存在于兔子体内, 主要催化孕酮羟基化^[37], 它是一种膜结合蛋白, 分布在内质网、微粒体和线粒体内膜上, 但在原核生物中 P450 酶是一种可溶性蛋白。2000 年, Williams 等人^[38]发现 P450 2C5 的 N 末端是唯一的跨膜部分并且疏水的 B-C 环与 F-G 环同膜表面结合, 该区域中的 pw2a 具有较高的疏水性并且有一部分嵌入脂膜内, 允许膜中疏水性底物进入。这些结构特点使得真核生物通道存在 2 种机制: 第一种是膜中的疏水性底物与羟基化产物从不同通道进出; 第二种是可溶性底物与羟基化产物从同一通道进出。采用何种机制主要取决于底物的位置。

2000 年, Williams 等人^[39]首次得到了 P450 2C5 的晶体结构, 并利用水探针发现了 4 个通道: pw2a, pw2c, pw2e 和溶剂通道 S。2003 年, Wester 等人^[40]获得了结合底物二甲硝咪唑(DMZ)的 P450 2C5 复合物晶体结构, 但是该结构中没有发现 pw2c, 因为酶结合底物后晶体结构发生较大的变化使通道关闭, 类似的作用方式也存在于 P450 2B4 中^[41]。2005 年, Schleinkofer 等人^[15]通过 RAMD 方法发现了 pw1, 2a, 2c, 2e 和溶剂通道 S(图 6)。模拟后的结果显示 33 条轨迹中有 26 条属于 pw2c, 并且配体在 pw2c 中的加速度是最小的, 所以推测 pw2c 是最主要的出口通道。

Pw2c 主要取决于 B-C 环与 G 螺旋的相互作用以及 B-C 环的柔性。对晶体结构和常规分子动力学结果分析后发现, P450 2C5 并不存在 pw2c, 因为 B-C 环残基 V106 与 G 螺旋残基 K241 之间形成氢键使 pw2c 关闭, 该机制与 P450eryF 中 R185 与周围残基之间的氢键作用类似^[27]。



图 5 P450 2B1 中的通道

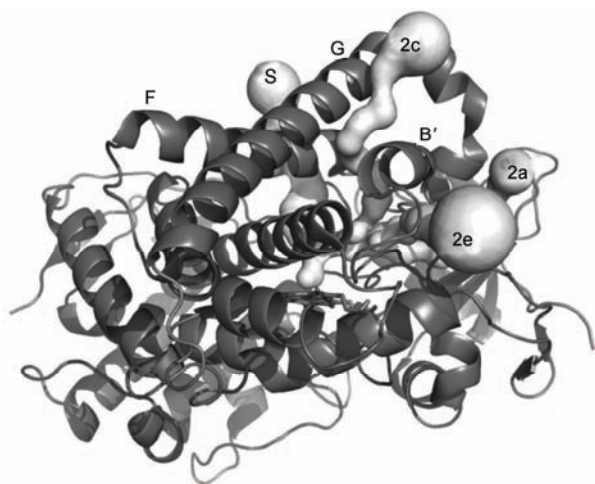


图 6 P450 2C5 中的通道

2.5 P450 3A4 中的通道

P450 3A4 是人体内最重要的药物代谢酶, 参与了大约 50% 的代谢反应. 2004 年, Williams 等人^[42]发表了 P450 3A4 无配体晶体结构, 以及分别结合了抑制剂甲吡酮和底物孕酮的复合物晶体结构. 由于配体较小, 复合物晶体结构与无配体晶体结构相比并未发生较大变化. 在甲吡酮复合物晶体表面发现了 2 个明显的开口: 其中一个位于 $\beta 1$ 折叠、B-B-环和 F-螺旋末端; 另一个位于 B-C 环之间. 在结合孕酮的复合物晶体结构中, 孕酮并未结合在活性中心, 而是与活性中心上方的苯丙氨酸簇结合, 可以推测当苯丙氨酸移动时底物就可以进入活性中心. 当 P450 3A4 与较大配体结合时, 活性中心相应扩大, 晶体构象之间发生很大变化.

根据这些晶体结构特点, 2007 年本课题组的 Li 等人^[43]认为, 甲吡酮晶体复合物结构具有 3 个可能的通道, 分别为 pw2a, pw2e 和 pw3 (图 7), 通过 SMD 模拟发现 pw2e 需要相对较小的外力和残基移动, 同时也发现 F108 和 I120 两个关键残基阻止抑制剂离开活性中心, 突变实验显示这两个残基影响酶的区域与立体选择性^[44]. Pw2a 中的残基在分子动力学模拟过程中形成了氢键致使 pw2a 关闭, 所以在晶体结构中观察到的表面开口区域不一定能成为配体的进出通道口. 在 pw3 中, 抑制剂甲吡酮与苯丙氨酸簇形成疏水相互作用, 该作用使得抑制剂在解离过程中需要较大的外力, 此外, 均方根偏差值 (RMSD) 显示通道周围残基发生了十分大的位移, 这些结果说明了

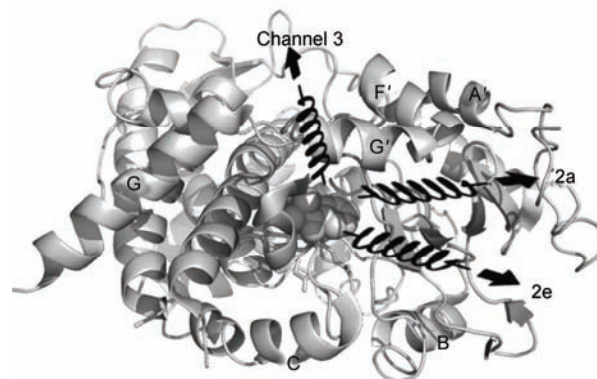


图 7 P450 3A4 中的通道

pw3 成为 P450 3A4 通道的可能性较小. 综上所述, pw2e 最有可能作为甲吡酮的出口通道.

2009 年, Fishelovitch 等人^[34]将产物 6 β 羟基睾酮 (TST-OH) 和羟基安定 (TMZ) 对接入 P450 3A4 的活性中心, 并通过 SMD 模拟方法识别 6 类通道中 (pw2a, 2b, 2c, 2e, 3 和溶剂通道 S) 可能性最大的通道和它们的作用机制. 结果发现, 溶剂通道 S 在 TST-OH 解离过程中形成了最大的表面开口, 并且产物在该通道中需要较小的拉力; TMZ 和 TST-OH 通过 pw2e 时所需的外力最小; 大部分通道都发现了苯丙氨酸 π - π 堆积效应, 该作用力会阻止产物离去. 所以同一 P450 酶的通道并不是唯一的, 在 P450 3A4 中溶剂通道 S 和 pw2e 都有可能作为产物通道.

P450 3A4 具有底物选择性羟基化的性质, 同一底物的羟基化位置不同会导致产物通道的不同, 如产物 TST-16OH 与 TST-6OH, 前者以 pw2c 为主而后者更倾向于 pw3, 所以酶的底物特异性不仅与活性中心有关, 而且与通道的物理化学性质也有密不可分的联系.

2.6 P450 2A6 中的通道

P450 2A6 在人体药物代谢中起着重要作用, 是人体内唯一能催化香豆素羟基化过程的酶^[45]. 此外, 它还与尼古丁和其他烟草致癌物的代谢有关. 与其他哺乳动物 P450 相比, P450 2A6 的活性中心十分小, 没有明显的通道使配体进出. 2010 年, 本课题组对 P450 2A6 中存在的通道进行了细致的研究. Li 等人^[46]首先用 MOLE 软件对晶体结构进行探索, 结果表明晶体中没有通道存在; 然后用 RAMD 方法预测可能存在的通道, 统计所有的轨迹后发现 pw2c 和位于

I, K 螺旋和 $\beta 4$ 折叠之间的 pw6 概率最大(图 8); 再用 SMD 方法分析 2 类通道中配体与受体之间的相互作用和作用力大小, 认为 Phe111 的翻转对配体的进出起着十分重要的作用, 并且在 pw2c 中配体所需的拉力较小; 最后用平均力势^[47]计算这 2 类通道的能量, 结果表明 pw6 需要克服较大的能垒. 所以 pw2c 作为 P450 2A6 的通道的可能性最大.

本课题组首次发现了 pw6 的存在, 进一步证实了由于酶和配体的结构差异, 不同的 P450 酶的通道并不是唯一的. 此外还发现, pw2c 不仅存在于前面已论述的 P450 2B1, 2C5 和 3A4 中, 还存在于 P450 2A6 中, 所以推测 pw2c 更倾向于在动物 P450 酶中存在.

3 结论与展望

到目前为止, 以上 6 类 P450 酶的通道研究较为全面和透彻, 其他 P450 酶在文中有所涉及, 但一般



图 8 P450 2A6 中的通道

只是基于晶体结构表面分析, 并没有使用更为准确的动力学方法、突变实验和其他数据的验证, 所以方法和结果的可靠性还需进一步提高. 此外, 如果能够获得配体在不同时期与受体结合的晶体结构, 则会为通道位置的确定提供更多的支持.

通过以上所述的实验结果, 我们发现: (i) 所有的细胞色素 P450 酶进出通道都不是唯一的. 配体结构的差异会导致与活性中心和通道相互作用改变, 所以配体对通道的选择倾向不同. (ii) 由于酶对底物的选择性氧化, 会使同一底物具有不同的产物通道. (iii) P450 酶具有不同的关键残基, 如 P450 2B1 的 F115 和 3A4 中的 V106 与 K241 等, 它们分别对各自酶的配体进出起着重要影响并且作用方式不同. (iv) 真核生物中的 P450 酶是膜结合蛋白, 相对于原核生物中的游离蛋白, 其通道机制更加复杂和多样. (v) 通过对晶体结构分析得到的通道会与动力学模拟及点突变实验的结果不一致, 酶的动力学运动会导致晶体结构中通道的关闭或开启, 所以对于通道的研究还需要大量实验作为依据.

P450 在药物代谢和解毒方面具有重要作用, 人体内约 75% 的药物经其代谢氧化. 但我们仍对 P450 的底物进出通道机制知之甚少, 主要存在以下 3 个不足: (i) 由于 P450 及其配体复合物的晶体结构较少并且较难获得, 结合不同底物或者在不同的实验条件下都可能使晶体结构发生变化; (ii) 分子动力学模拟仍不够完善; (iii) 缺少实验验证, 动力学模拟的结果仍缺少相关实验的验证, 一些实验结果仍与实际情况有偏差. 随着晶体结构数据库、分子动力学模拟和实验技术的不断发展, 这些数据都可以为细胞色素 P450 的底物进出机制提供研究方向和理论支持, 有利于获得配体与受体间的相互作用、动态结合路径以及受体对配体选择性等重要信息, 可以为药物设计等提供理论帮助.

参考文献

- 1 Guengerich F P. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21: 70–83
- 2 Meunier B, de Visser S P, Shaik S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem Rev*, 2004, 104: 3947–3980
- 3 Shaik S, Kumar D, de Visser S P, et al. Theoretical perspective on the structure and mechanism of cytochrome P450 enzymes. *Chem Rev*, 2005, 105: 2279–2328
- 4 Jiang H L, Tan X S. Human hepatic cytochrome P450 2C metalloenzymes and drug metabolism. *Prog Chem*, 2009, 21: 911–918
- 5 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*, 2000, 303: 797–811
- 6 Lüdemann S K, Lounnas V, Wade R C. How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 2. Steered molecular dynamics and adiabatic mapping of substrate pathways. *J Mol Biol*, 2000, 303: 813–830
- 7 Wade R C, Winn P J, Schlichting E, et al. A survey of active site access channels in cytochromes P450. *J Inorg Biochem*, 2004, 98: 1175–1182
- 8 Domanski T L, Halpert J R. Analysis of mammalian cytochrome P450 structure and function by site-directed mutagenesis. *Curr Drug Metab*, 2001, 2: 117–137
- 9 Voss N R, Gerstein M, Steitz T A, et al. The geometry of the ribosomal polypeptide exit tunnel. *J Mol Biol*, 2006, 360: 893–906
- 10 Gouaux E, MacKinnon R. Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science*, 2005, 310: 1461–1465
- 11 Petrek M, Kosinova P, Koca J, et al. MOLE: A voronoi diagram-based explorer of molecular channels, pores, and tunnels. *Structure*, 2007, 15: 1357–1363
- 12 Petrek M, Otyepka M, Banas P, et al. CAVER: A new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7: 316–324
- 13 Carlsson P, Burendahl S, Nilsson L. Unbinding of retinoic acid from the retinoic acid receptor by random expulsion molecular dynamics. *Biophys J*, 2006, 91: 3151–3161
- 14 Burendahl S, Danciulescu C, Nilsson L. Ligand unbinding from the estrogen receptor: A computational study of pathways and ligand specificity. *Proteins*, 2009, 77: 842–856
- 15 Schleinkofer K, Sudarko, Winn P J, et al. Do mammalian cytochrome P450s show multiple ligand access pathways and ligand channelling? *Embo Rep*, 2005, 6: 584–589
- 16 Liu X, Wang X, Jiang H. A steered molecular dynamics method with direction optimization and its applications on ligand molecule dissociation. *J Biochem Biophys Methods*, 2008, 70: 857–864
- 17 Carugo O, Argos P. Accessibility to internal cavities and ligand binding sites monitored by protein crystallographic thermal factors. *Proteins*, 1998, 31: 201–213
- 18 Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239: 487–491
- 19 Saiki R K, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230: 1350–1354
- 20 Lee Y T, Wilson R F, Rupniewski I, et al. P450cam visits an open conformation in the absence of substrate. *Biochemistry*, 2010, 49: 3412–3419
- 21 Poulos T L, Finzel B C, Howard A J. High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J Mol Biol*, 1987, 195: 687–700
- 22 Deprez E, Gerber N C, Di Primo C, et al. Electrostatic control of the substrate access channel in cytochrome P-450cam. *Biochemistry*, 1994, 33: 14464–14468
- 23 Wade R, Cojocaru V, Winn P J. The ins and outs of cytochrome P450s: Structure and dynamics. *Biophys J*, 2007: 374–375
- 24 Lüdemann S K, Carugo O, Wade R C. Substrate access to cytochrome P450cam: A comparison of a thermal motion pathway analysis with molecular dynamics simulation data. *J Mol Model*, 1997, 3: 1–5
- 25 Ravichandran K G, Boddupalli S S, Hasermann C A, et al. Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science*, 1993, 261: 731–736
- 26 Li H, Poulos T L. The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat Struct Biol*, 1997, 4: 140–146
- 27 Winn P J, Lüdemann S K, Gauges R, et al. Comparison of the dynamics of substrate access channels in three cytochrome P450s reveals different opening mechanisms and a novel functional role for a buried arginine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 5361–5366
- 28 Poulos T L. Cytochrome P450 flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 13121–13122
- 29 Li W, Liu H, Scott E E, et al. Possible pathway(s) of testosterone egress from the active site of cytochrome P450 2B1: A steered molecular dynamics simulation. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33: 910–919
- 30 Wester M R, Johnson E F, Marques-Soares C, et al. Structure of a substrate complex of mammalian cytochrome P450 2C5 at 2.3 Å resolution: Evidence for multiple substrate binding modes. *Biochemistry*, 2003, 42: 6370–6379
- 31 Scott E E, He Y Q, Halpert J R. Substrate routes to the buried active site may vary among cytochromes P450: Mutagenesis of the F-G region in P4502B1. *Chem Res Toxicol*, 2002, 15: 1407–1413
- 32 Scott E E, White M A, He Y A, et al. Structure of mammalian cytochrome P4502B4 complexed with 4-(4-chlorophenyl) imidazole at 1.9-angstrom resolution — into the range of P450 conformations and the coordination of redox partner binding. *J Biol Chem*, 2004, 279: 27294–27301

- 33 Rowland P, Blaney F E, Smyth M G, et al. Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J Biol Chem*, 2006, 281: 7614–7622
- 34 Fishelovitch D, Shaik S, Wolfson H J, et al. Theoretical characterization of substrate access/exit channels in the human cytochrome P450 3A4 enzyme: Involvement of phenylalanine residues in the gating mechanism. *J Phys Chem B*, 2009, 113: 13018–13025
- 35 Podust L M, Poulos T L, Waterman M R. Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 3068–3073
- 36 Lee D S, Yamada A, Sugimoto H, et al. Substrate recognition and molecular mechanism of fatty acid hydroxylation by cytochrome P450 from *Bacillus subtilis* — Crystallographic, spectroscopic, and mutational studies. *J Biol Chem*, 2003, 278: 9761–9767
- 37 Dieter H H, Muller-Eberhard U, Johnson E F. Identification of rabbit microsomal cytochrome P-450 isozyme, form 1, as a hepatic progesterone 21-hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982, 105: 515–520
- 38 Williams P A, Cosme J, Sridhar V, et al. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: Structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell*, 2000, 5: 121–131
- 39 Williams P A, Cosme J, Sridhar V, et al. Microsomal cytochrome P4502C5: Comparison to microbial P450s and unique features. *J Inorg Biochem*, 2000, 81: 183–190
- 40 Wester M R, Johnson E F, Marques-Soares C, et al. Structure of mammalian cytochrome P4502C5 complexed with diclofenac at 2.1 angstrom resolution: Evidence for an induced fit model of substrate binding. *Biochemistry*, 2003, 42: 9335–9345
- 41 Scott E E, He Y A, Wester M R, et al. An open conformation of mammalian cytochrome P4502B4 at 1.6-angstrom resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 13196–13201
- 42 Williams P A, Cosme J, Vinkovic D M, et al. Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science*, 2004, 305: 683–686
- 43 Li W H, Liu H, Luo X M, et al. Possible pathway(s) of metyrapone egress from the active site of cytochrome P450 3A4: A molecular dynamics simulation. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35: 689–696
- 44 Khan K K, He Y Q, Domanski T L, et al. Midazolam oxidation by cytochrome P450 3A4 and active-site mutants: An evaluation of multiple binding sites and of the metabolic pathway that leads to enzyme inactivation. *Mol Pharmacol*, 2002, 61: 495–506
- 45 Yun C H, Shimada T, Guengerich F P. Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P-450 2A6. *Mol Pharmacol*, 1991, 40: 679–685
- 46 Li W, Shen J, Tang Y, et al. Exploring coumarin egress channels in human cytochrome P450 2A6 by random acceleration and steered molecular dynamics simulations. *Proteins*, 2011, 79: 271–281
- 47 Jarzynski C. Nonequilibrium equality for free energy differences. *Phys Rev Lett*, 1997, 78: 2690–2693

Advances in the ligand channels of cytochrome P450s

SHEN ZhongHua, LI WeiHua, XU You, LIU GuiXia & TANG Yun

Laboratory of Molecular Modeling and Design, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Cytochrome P450s (CYPs) are heme-containing monooxygenases that play critical roles in the biosynthesis and degradation of many physiologically important compounds, and in the metabolism and detoxification of xenobiotics. Currently, the available crystal structures of CYPs exhibit similar three-dimensional structural folds at the gross level. The active site of CYPs is buried deep within the center of the protein and above the heme cofactor. Because the active site is inaccessible to the surrounding bulk solvent, the question of how the ligand enters/exits the buried active site remains unresolved. The issue of the ligand access/egress channel in P450s has attracted significant attention in recent years. A complete review of major experimental methods and possible ligand channels of 6 typical P450 enzymes is presented in this review, and further research focuses are also discussed.

cytochrome P450, molecular dynamics, steered molecular dynamics, random acceleration molecular dynamics, site-directed mutagenesis

doi: 10.1360/972010-1865