

Musterlösung zu folgendem Projekt:

Cytochrom P450 2C19

Das menschliche Cytochrom 2C19 ist am Metabolismus einer Reihe von Medikamenten beteiligt deren Umsetzung die verfügbare Dosis verringert. Außerdem unterliegt es ausgeprägten Polymorphismus. Im Gegensatz zu anderen Cytochromen aus der selben Familie (z.B. 2C9, 2C8, 2C5, 2A6, 2B4 und 2D6) gibt es leider noch keine Kristallstruktur. Obwohl das aktive Zentrum und die Tertiärstruktur innerhalb der selben Familie von Cytochromen konserviert sind, können wesentliche Unterschiede auftreten.

Aufgaben:

Generieren Sie ein Homologiemodell für das menschliche CYP2C19. Benutzen Sie als Template ein geeignete Struktur eines menschlichen Cytochroms. Begründen Sie die Wahl Ihres Templates. Diskutieren Sie die Konsequenzen auf das Homologiemodell wenn Sie ein Templat mit geringerer Homologie wählen. In welchen Bereichen werden sich diese besonders stark auswirken (katalytisches Zentrum oder weiter außen) ?

Nennen Sie zwei Medikamente die von CYP2C19 komplexiert oder metabolisiert werden.

Hinweis: Suchen Sie zunächst die *primary asseccion* Nummer und davon ausgehend eine homologe Kristallstruktur.

Punkteverteilung:

Sequenzbestimmung	10%
Auswahl der Struktur	20%
Modellierte Struktur	20%
Fragenteil	30%
Dokumentation, allgemein	20%

1. Einleitung

Im Fokus dieses Projektes steht die Generierung eines Homologiemodells des menschlichen Cytochroms P450 2C19, für welches bis heute noch keine Kristallstruktur verfügbar ist. Dieses Enzym ist, wie bereits aus dem Namen ableitbar, der Familie der Cytochrom P450-Enzyme zuzuordnen. Die Cytochrome P450, auch CYPs genannt, sind eine Superfamily von Häm-Proteinen, die als Monooxygenasen biochemische Transformationen, meist unter Einführung von Sauerstoff auf zu oxidierende Substrate durchführen. Charakteristisch für diese Proteine ist die substituierte Hämgruppe, welche im Wesentlichen aus einem Porphyrinring mit einem zentralen Eisenatom besteht.

Hauptaufgabe der Enzyme dieser Superfamilie, die vorwiegend in der Leber exprimiert werden, ist die Oxidation körpereigener und körperfremder Substanzen, wodurch diese Enzyme auch eine zentrale Rolle im Metabolismus von endogenen Substraten, Umweltschadstoffen, kanzerogenen Stoffen und einer Vielzahl von Arzneistoffen einnehmen. In der sogenannten Phase I-Reaktion werden hierbei in der Leber körperfremde Substrate in besser lösliche und somit besser ausscheidbare Substanzen transformiert. Auch das menschliche Cytochrom P450 2C19, für welches im Rahmen dieses Projektes ein Homologiemodell zu erstellen ist, nimmt im Arzneistoffmetabolismus eine bedeutsame Rolle ein. CYP2C19, das auch einem ausgeprägten Polymorphismus unterliegt, ist u.a. am Metabolismus folgender Arzneistoffe beteiligt [1]:

- Omeprazol , Pantoprazol, Rabeprazol, Lansoprazol (= Protonenpumpenblocker)
- Diazepam, Imipramin, Citalopram (=Psychopharmaka)
- Propranolol (=Betablocker)
- Amitryptilin (=Antidepressivum)

Sie spielen eine wichtige Rolle als Inhibitoren bzw. Induktoren von verschiedenen Wirkstoffen. So inhibiert Cyp2C19 beispielsweise Antidepressiva wie Fluoxetin, Paroxetin oder Sertralin.

[1] <http://www.medicoconsult.de/wiki/Medikamentenstoffwechsel>

2. Bestimmung der Primary Accession number

Die Bestimmung der Primary Accession number des entsprechenden Proteins ist für das weitere Vorgehen, sprich der Generierung eines Homologiemodells essentiell, da basierend darauf eine homologe Kristallstruktur zu suchen ist.

Im Rahmen des Projektes wurde zur Bestimmung der Primary Accession number für das menschliche Cytochrom P450 2C19 auf die Protein-Knowledgebase UniProt KB zurückgegriffen [2]. Die folgende Primary Accession number wurde dabei für das menschliche Cytochrom P450 2C19 gefunden: P33261

[2] <http://www.uniprot.org/>

3. Auswahl der Templatestruktur

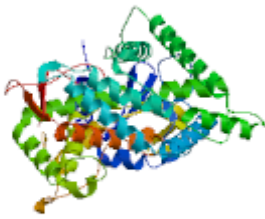
Die Modellierung einer Zielsequenz, sprich die Generierung eines Homologiemodells erfolgt immer anhand einer Vorlagestruktur, auch Template genannt. Die Wahl des Templates ist entscheidend für die spätere Qualität des Homologiemodells. Im Rahmen dieses Projektes wurden, zur Identifikation eines geeigneten Templates für das zu generierende Homologiemodell des menschlichen Cytochroms P450 2C19 auf die voll automatische Target Identifikation von der Homepage SWISS-Model zurückgegriffen [3]. Basierend darauf wurde eine tabellarische Auflistung der zur Generierung eines Homologiemodells für CYP 2C19 in Frage kommenden Templates erstellt. So kommt nach dieser automatischen Suche das Template 1og5_B am ehesten in Frage, da es die größte Sequenzähnlichkeit zeigt. Jedoch wurde hier auch noch ein anderes Template als möglicher Kandidat gefunden, nämlich das Cytochrom P450 2C9 1r9o_A, welches eine bessere Auflösung hat und eine nur geringfügig niedrigere Sequenzähnlichkeit. Deshalb wurde das Cytochrom P450 2C9 1r9o_A für die Modellierung von CYP P450 2C19 favorisiert.

[3] <https://swissmodel.expasy.org/>

4. Generierung des Homologiemodells

Die Generierung des Homologiemodells wurde mit der Seite Swiss-Modell erstellt. Dazu wurde der "SwissModel Automatic Modelling Mode" ausgewählt und primary accession number p33261 als Protein Code eingegeben. Als Template (PDB-ID) wurde 1r9o (Kette A) gewählt. Das hierdurch generierte Modell wurde als PDB-File herunter geladen und mit dem Programm VMD (Version 1.9) weiter untersucht. Die Aminosäureketten wurden jeweils als Cartoon-Grafik dargestellt und das aktive Zentrum durch den Cofaktor oder den Liganden kenntlich gemacht (VDW-Darstellung). Dabei werden Modell und Templat vom Programm automatisch übereinander gelegt. Die Generierung des Homologiemodells ergab folgendes zusammenfassendes Ergebnis:

Model Summary ?



Model information:

Modelled residue range: 44 to 490
Based on template: [1r9oA] ▾ (2.00 Å)
Remark: No search for template was performed.
Only user specified template was used for modelling.
Sequence Identity [%]: 89.5
Evaluate: 0.00e-1
Quality information: [details] ▾
QMEAN Z-Score: 0

display model: as pdb - as DeepView project - as AstexViewer
download model: as pdb - as Deepview project - as text

Abbildung 1: Zusammenfassung des Homologiemodell "1r9oA" basierend auf 1r9o Kette A

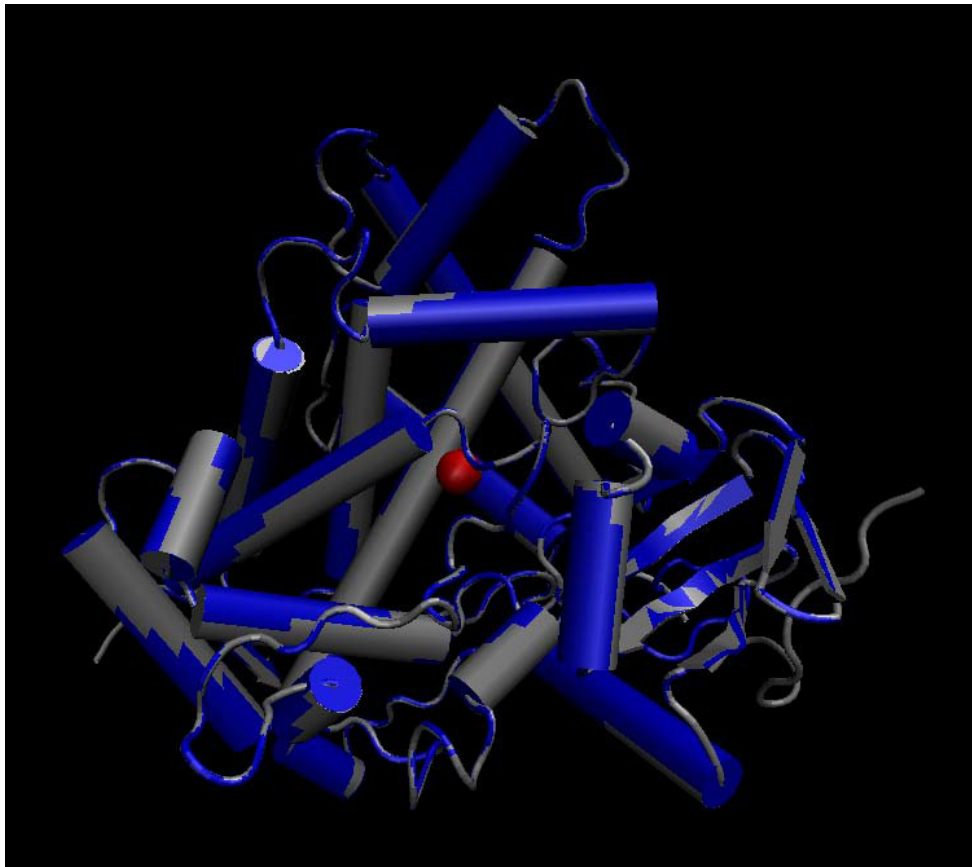


Abbildung 2: Homologiemodell 1r9oA mit Template 1r9o mit FE-Atom im aktiven Zentrum (rot)

In Abbildung 2 ist das generierte Homologiemodell 1r9o_A in blau dargestellt, zusammen mit dem Template 1r9o in grau. Das aktive Zentrum wird durch das Fe-Atom in rot gekennzeichnet. Eine große Übereinstimmung der beiden Modelle ist zu erkennen, da sich die Modelle nur an wenigen Aminosäuren unterscheiden und ansonsten praktisch identisch in der Tertiärstruktur sind. Dies ist aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit auch zu erwarten. Bei einem Templat mit niedrigerer Sequenzähnlichkeit sind Abweichungen vor allem in den Bereichen zu erwarten in denen Gaps im Alignment auftreten, oder bei längeren Loops. Im vorliegenden Fall (siehe Abbildung 3) ist dies aber

nicht der Fall. Ebenso findenden sich fast durchgehend hoch konservierte Aminosäuren oder homologe Austauschungen. Deshalb dürfte das Homologiemodell sehr zuverlässig sein, sowohl was das aktive Zentrum im Inneren, als auch die äußeren Regionen anbelangt. Dies zeigt auch der QMEAN (Z-Score) an, der zur Bewertung des Modells generiert wurde. Je höher dieser Wert ist, um so zuverlässiger ist das erhaltene Modell.

```

c19      MDPFVVLVLCCLLLLLSIWRQSSGRGKLPFGPTPLFVIGNILQIDIKDVSLSLTNLSKI 60
c9       MDSLVLVLCCLLLLLSLWRQSSGRGKLPFGPTPLFVIGNILQIGIKDISLSLTNLSKV 60
          **.:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
c19      YGPFVFTLYFGLERMVVLHGVEVVKALIDLGEFSGRGHFPLAERANRGFGIVFVSNKRW 120
c9       YGPFVFTLYFGLKPIVVLHGVEAVKALIDLGEFSGRGIPLAERANRGFGIVFVSNKRW 120
          *****: :*****:*****:***** ***** *****:
c19      KEIRRFSLMTRLNFGMGKRSIEDRVQEEARCLVEELRKTASPCDPTFILGCAPCNVICS 180
c9       KEIRRFSLMTRLNFGMGKRSIEDRVQEEARCLVEELRKTASPCDPTFILGCAPCNVICS 180
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
c19      IIFQKRFDYKDQQFLNLMEKLNENIRIVSTPWIQICNNFPTIIDYFPGTHNKLLKNLAFM 240
c9       IIFHKRFDYKDQQFLNLMEKLNENIKILSSPWIQICNNFSPIIDYFPGTHNKLLKNVAFM 240
          ***:*****:***:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
c19      ESDILEKVKEHQESMDINNPRDFIDCFLIKMEKEKQSQSEFTIENLVITAADLLGAGTE 300
c9       KSYILEKVKEHQESMDMNNPQDFIDCFMKMEKEKHNQSEFTIESLENTAVDLFGAGTE 300
          :* *****:***:*****:*****:*** *****:* **.:*****:
c19      TTSTTLRYALLLLKHPEVTAKVQEEIERVVGGRNRSPCMQDRGHMPYTDVAVVHEVQRYID 360
c9       TTSTTLRYALLLLKHPEVTAKVQEEIERVIGRNRSPCMQDRSHMPYTDVAVVHEVQRYID 360
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
c19      LIPTSLPHAVTCDVKFRNYLIPKGTIILTSVLDHNKEFPNPEMFDPHFLDEGGNFK 420
c9       LLPTSLPHAVTCDIKFRNYLIPKGTIILISVLDHNKEFPNPEMFDPHFLDEGGNFK 420
          *.*****:*****:***** ***** *****:*****:
c19      KSNYFMPFSAGKRICVGEGLARMELFLFLTIFILQFNFLKSLIDPKDLDTTPVVNGFASVP 480
c9       KSKYFMPFSAGKRICVGEALAGMELFLFLTSILQFNFLKSLVDPKNLDTTPVVNGFASVP 480
          **.:*****:*** ***** *****:***:*****:
c19      PFYQLCFIPV 490
c9       PFYQLCFIPV 490
          *****

```

Abbildung 3: Sequenzalignment von CYP2C19 und dem Templat CYP2C9.