

# Identifikacija i karakterizacija citokroma P450 obitelji 4 u dagnji, *Mytilus galloprovincialis*

---

**Ravlić, Sanda**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2014**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:510934>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

GEOLOŠKI ODSJEK

Sanda Ravlić

**Identifikacija i karakterizacija citokroma  
P450 obitelji 4 u dagnji, *Mytilus  
galloprovincialis***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF GEOLOGY

Sanda Ravlić

**Identification and characterization of  
cytochrome P450 family 4 in the mussel,  
*Mytilus galloprovincialis***

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
GEOLOŠKI ODSJEK

Sanda Ravlić

**Identifikacija i karakterizacija citokroma  
P450 obitelji 4 u dagnji, *Mytilus  
galloprovincialis***

DOKTORSKI RAD

Mentor: izv.prof.dr.sc.Maja Fafandžel

Zagreb, 2014.



University of Zagreb  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF GEOLOGY

Sanda Ravlić

**Identifikacija i karakterizacija citokroma  
P450 obitelji 4 u dagnji, *Mytilus  
galloprovincialis***

DOKTORSKI RAD

*Predložen Vijeću poslijediplomskog studija oceanologije,  
Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja akademskog stupnja doktora  
prirodnih znanosti, grana znanost o moru*

Zagreb, 2014.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentorici izv.prof.dr.sc. Maji Fafandel na ukazanom povjerenju, podršci, razumijevanju, savjetima te posvećenom vremenu koje mi je pružila u mom znanstvenom radu i napredovanju*

*Zahvaljujem se voditeljici laboratorija prof.dr.sc. Nevenki Bihari na konstruktivnim savjetima, diskusiji i osvrtnu na rad te stalnoj podršci*

*Zahvaljujem se dr.sc. Bruni Pleše koja mi je na samom početku otvorila laboratorijska vrata molekularne biologije*

*Zahvaljujem se dr.sc. Jurici Žučku na bioinformatičkoj pomoći i podršci*

*Zahvaljujem članovima povjerenstva prof.dr.sc. Navenki Bihari, dr.sc. Tvrtku Smitalu, prof.dr.sc. Goranu Klobučaru i prof.dr.sc. Višnji Besendorfer na korisnim savjetima, i brzini pri ispravljanju i poboljšanju ovog rukopisa*

*Zahvaljujem se prijateljicama/kolegicama iz sobe 111 Mirti Smodlaki Tanković i Ani Barićević koje su bile moji suputnici na ovom zanimljivom putovanju*

*Zahvaljujem se kolegama iz CIM-a, Jeleni, Danijeli, Emini, Ines, Marinu, Martinu, Tini, Paolu, Ugu na zajedničkim raspravama, izmjenjivanju iskustava o ispitima i nesebičnoj pomoći kad god je bilo potrebno*

*Zahvaljujem se mojim roditeljima i bratu na beskonačnom strpljenju i razumijevanju tijekom svih godina mog školovanja*

*Zahvaljujem se svekrvi i svekru na čuvanju Lukrecie jer bez njih završetak ovog rada ne bi bio moguć*

*Zahvaljujem se svojim prijateljima*

*Zahvaljujem se svojoj maloj obitelji jer postoji*

*I. A. Krilov*  
*PIJETAO I BISER*

*Na bunjištu je pijetao biser iščeprkao*  
*I gledajuć ga mrko*  
*On reče: "Kad bi bila bar*  
*Od koristi ta glupa stvar!*  
*Nije li smiješno, što je tako cijene?*  
*Na primjer, što se tiče mene,*  
*Ja volim većma*  
*Zrno ječma.*  
*Ono doduše nimalo ne sija,*  
*No zato prija."*

Doktorska disertacija izrađena je u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju, pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Maje Fafanđel, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Oceanologije pri Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



**Identifikacija i karakterizacija citokroma P450 obitelji 4 u dagnji, *Mytilus galloprovincialis***

SANDA RAVLIĆ

Centar za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković, G. Paliage 5, Rovinj

Enzimi citokroma P450 (CYP) čine važnu komponentu staničnog sustava detoksifikacije. U dagnji, *Mytilus galloprovincialis*, s različitih lokacija, identificirano je i karakterizirano sedam novih eksprimiranih grupa gena citokroma P450. Filogenetska analiza enzima citokroma P450 pokazala je grupiranje eksprimiranih gena unutar CYP4 monofiletske grupe. Usporedba prevedenih CYP4 aminokiselinskih sljedova dagnje sa CYP4 sljedovima kralješnjaka i beskralješnjaka pokazala je visoki stupanj očuvanja aminokiselina u domenama bitnim za funkcionalnost enzima. Identificirane genske grupe, od kojih svaka sadrži niz genskih varijanti, imenovane su CYP4Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6 i Y7. Grupe gena CYP4Y2 i Y7 te CYP4Y5 i Y6 pokazale su mjesnu specifičnost, dok je prisutnost genskih grupa CYP4Y1, Y3 i Y4 uočena na svim lokacijama uzorkovanja. Dobiveni rezultati ukazuju na veliku ekspanziju genske obitelji CYP4Y u dagnji, vjerojatno kao posljedicu različitih uvjeta u okolišu. Podatci koji se odnose na raznovrsnost gena *cyp4y* mogli bi predstavljati dobru osnovu za buduća istraživanja usmjerena na poboljšanje primjene citokroma P450 kao biomarkera onečišćenja okoliša.

(115 stranica, 17 slika, 3 tablice, 156 literaturnih navoda, 2 priloga, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: citokrom P450, cDNA kloniranje, filogenetska analiza, okoliš, školjkaši

Mentor: izv.prof.dr.sc. Maja Fafandel, viša znanstvena suradnica

Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:

prof.dr.sc. Nevenka Bihari, znanstvena savjetnica,  
dr.sc. Tvrtko Smital, znanstveni savjetnik,  
prof.dr.sc. Goran Klobučar

Rad prihvaćen: 04.srpnja 2014. godine

**Identification and characterization of cytochrome P450 family 4 in the mussel, *Mytilus galloprovincialis***

SANDA RAVLIĆ

Centre for Marine Research, Ruđer Bošković Institute, G. Paliaga 5, Rovinj

Cytochrome P450 enzymes (CYPs) are essential components of cellular detoxification system. In this study seven new cytochrome P450 gene clusters from bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* from different collection sites were identified and characterized. The phylogenetic analysis demonstrated that the identified sequences were clustered within the CYP4 branch. The deduced amino acid sequences showed high conservation of the residues and domains essential to the function of the enzyme. Identified gene transcripts corresponded to seven different gene clusters, each comprising a number of allelic variants, which were designated CYP4Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6 and Y7. Gene clusters CYP4Y2 and Y7, and CYP4Y5 and Y6 were site specific, while the gene clusters CYP4Y1, Y3 and Y4 were present at all investigated locations. Great expansion of the CYP4Y gene subfamily in the mussel *M. galloprovincialis* could be attributed to different environmental conditions. Data concerning diversity of CYP4Y genes could present a good base in further investigations for improvement of cytochrome P450 application as biomarker of marine environmental pollution.

(115 pages, 17 figures, 3 tables, 156 references, 2 additional files, original in Croatian)

Keywords: cytochrome P450, cDNA cloning, phylogenetic analysis, environment, bivalvia

Supervisor: Maja Fafađel, PhD

Reviewers:

prof.dr.sc. Nevenka Bihari, znanstvena savjetnica,  
dr.sc. Tvrtko Smital, znanstveni savjetnik,  
prof.dr.sc. Goran Klobučar

Thesis accepted: 4<sup>th</sup> July 2014

# SADRŽAJ

1	Uvod.....	1
2	Ciljevi i hipoteze istraživanja.....	4
2.1	Ciljevi istraživanja.....	4
2.2	Hipoteze istraživanja.....	4
3	Literaturni pregled.....	6
3.1	Dagnja, <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	6
3.1.1	Dagnja kao indikatorski organizam u studijama praćenja stanja okoliša.....	7
3.2	Sustav citokroma P450.....	9
3.2.1	Organizacija sustava citokroma P450.....	10
3.2.2	Aktivni centar katalize i katalitički mehanizam citokroma P450.....	13
3.2.3	Nomenklatura citokroma P450.....	15
3.2.4	Evolucija citokroma P450.....	16
3.2.5	Proteinska struktura enzima P450.....	18
3.2.6	Genetski polimorfizam citokroma P450.....	21
3.3	Sustav citokroma P450 obitelji 4 (CYP4).....	23
3.3.1	Funkcija enzima citokroma P450 obitelji 4.....	24
3.3.1.1	Uloga obitelji CYP4 u proliferaciji peroksisoma.....	24
3.3.1.2	Uključenost obitelji CYP4 u otpornosti na sekundarne metabolite biljaka i insekticide.....	26
3.3.1.3	Uloga obitelji CYP4 u degradaciji feromona.....	27
3.3.1.4	Indukcija enzima CYP4 ksenobioticima.....	28
3.4	Citokrom P450 kao biomarker organskog zagađenja okoliša.....	29

3.4.1	Potencijal CYP1A enzima kao biomarkera kod morskih beskralješnjaka .....	30
4	Materijali i metode .....	33
4.1	Područje istraživanja i uzorkovanje školjkaša .....	33
4.2	Izolacija ukupne RNA .....	34
4.3	Analiza kvalitete izolirane RNA .....	34
4.4	Brzo umnažanje krajeva komplementarne DNA (cDNA) – RACE-PCR .....	35
4.4.1	Umnažanje 3' kraja cDNA gena <i>cyp4</i> .....	35
4.4.2	Umnažanje 5' kraja cDNA gena <i>cyp4</i> .....	36
4.5	Bakterijsko umnažanje 3' i 5' fragmenata gena <i>cyp4</i> .....	37
4.6	Izolacija plazmidne DNA .....	37
4.7	Određivanje primarne strukture DNA .....	38
4.8	Umnažanje pune duljine cDNA gena <i>cyp4</i> .....	38
4.9	Računalne analize nukleotidnih slijedova .....	39
4.9.1	Nomenklatura identificiranih gena <i>cyp4</i> .....	39
4.9.2	Identifikacija mjesta za prepoznavanje supstrata .....	40
4.9.3	Filogenetska analiza .....	40
5	Rezultati .....	43
5.1	Identifikacija gena <i>cyp4</i> u dagnji, <i>M. galloprovincialis</i> .....	43
5.1.1	Analiza nukleotidnog i izvedenog proteinskog slijeda gena <i>cyp4</i> .....	44
5.2	Puna duljina cDNA gena <i>cyp4</i> dagnje .....	46
5.2.1	Analiza nukleotidnih slijedova eksprimiranih gena <i>cyp4y</i> .....	47
5.3	Obilježja očuvanih domena gena <i>cyp4</i> .....	50
5.4	Mjesta za prepoznavanje supstrata (SRS – substrate recognition site) .....	52
5.5	Filogenetska analiza CYP4 podobitelji .....	63
6	Rasprava .....	66
6.1	Identifikacija i karakterizacija <i>cyp4y</i> gena dagnje, <i>M. galloprovincialis</i> .....	66

6.2	Očuvana struktura gena <i>cyp4y</i> .....	67
6.3	Aminokiselinski sastav aktivnog mjesta CYP4Y enzima <i>M. galloprovincialis</i> .....	68
6.4	Filogenetska analiza aminokiselinskih sljedova CYP4Y .....	73
6.5	Varijabilnost CYP4Y genskih grupa <i>M. galloprovincialis</i> .....	74
7	Zaključci .....	77
8	Literatura .....	79
9	Prilozi .....	90
9.1	Prilog 1. ....	90
9.2	Prilog 2. ....	111
10	Životopis .....	X

## POPIS KRATICA

AHH/BAH/BPH	Benz( $\alpha$ )piren hidroksilaza
BaP	Benz( $\alpha$ )piren
CYP	Citokrom P (pigment) 450
CYP4BM	bakterijska CYP102 hidroksilaza
DO	otopljeni kisik
DMSO	dimetilsulfoksid
EROD	etoksirezorufin O – deetilaza
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
HTH	hipertreosemni hormon
IPTG	izopropil $\beta$ – D – 1 – tiogalaktopiranozid
MFO	oksidaza miješanih funkcija
MgCYP4Y	nukleotidni CYP4 slijed <i>M. galloprovincialis</i>
ML	filogenetska metoda najveće vjerojatnosti
NADPH	nikotinamid – dinukleotid fosfat
ODE	enzim koji razgrađuje mirise
ORF	otvoreni okvir čitanja
PAH	polciklički aromatski ugljikovodici
PCB	poliklorirani bifenili
PGE	hidroksilaza prostaglandina
PPAR	receptor proliferatora peroksisoma
RACE	brzo umnažanje krajeva cDNA
SRS	mjesta prepoznavanja supstrata
TBT	tributiltin
X – gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -d galaktopiranozid
3' UTR	3' nekodirajuća regija
5' UTR	5' nekodirajuća regija
20 – HETE	20 – hidroksieikozatetrenoinska kiselina

# 1. UVOD

---

# 1 UVOD

Dagnja, *Mytilus galloprovincialis*, u velikoj mjeri se koristi kao indikatorski organizam u projektima praćenja stanja okoliša. Baterija fizioloških i staničnih markera u dagnji dala je dokaz sindromu stresa te je ujedno dokazala povezanost biološkog rizika s onečišćenjem okoliša (Viarengo i sur., 2007). U ovom kontekstu dagnje su naročito korisne jer nastanjuju obalna područja s različitom razinom onečišćenja. Uz već navedenu ulogu modelnog organizma u procjeni stanja okoliša, dagnja posjeduje i važan gospodarski značaj (komercijalna vrijednost kao hrana). Hraneći se filtriranjem organske tvari i sitnih organizama iz morske vode dagnja tvori vezu s primarnim proizvođačima te ima važnu ulogu u obalnoj ekologiji. Razumijevanje biologije ovog školjkaša ovisi o definiranju elementarnih procesa, poput odgovora na onečišćenje i procesa adaptacije na stres. Napredak ekotoksikoloških istraživanja zahtjeva razumijevanje mehanizama toksičnosti na molekularnom nivou i na razini genetičke informacije. Izloženost onečišćivačima iz okoliša rezultira ekspresijom različitih gena uključenih u biotransformaciju ksenobiotika. Na biotransformaciju ksenobiotika iz okoliša značajno utječe i sam genotip jedinke, a time posljedično genotip jedinke utječe i na razinu adaptacije na onečišćenje. Zbog sjedilačkog načina života dagnja nije u mogućnosti izbjeći onečišćenje, a uslijed načina ishrane ujedno akumulira i onečišćivač iz morske vode. Iz ovih razloga dagnje su razvile različite stanične mehanizme kako bi osigurale svoj opstanak, npr. potencijal za biotransformaciju ksenobiotika, spojeva stranih organizmu.

Za primarnu fazu biotransformacije ksenobiotika zaslužni su inducibilni enzimi citokroma P450. Enzimi citokroma P450 sačinjavaju jednu od najvećih obitelji proteina zastupljenu u gotovo svim carstvima, od bakterija do jednostaničnih eukariota, biljaka, gljiva i životinja (Estabrook, 2003). Ova proteinska obitelj ogleda se u velikoj složenosti kako unutar jedne tako i između različitih vrsta. Supstrati za CYP enzime egzogeni su spojevi poput policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH), pesticida i sekundarnih metabolita biljaka, te endogeni spojevi poput steroida, masnih kiselina i eikozanoida (James i Boyle, 1998, Feyereisen, 1999, Whalen i sur., 2010). Velika ekspanzija *cyp* gena tijekom evolucije ukazuje da je povišena raznolikosti *cyp* gena posljedica prirodne selekcije. Zagađenje predstavlja uobičajeni stres u morskom okolišu te je danas jedan od najmoćnijih čimbenika prirodne selekcije (Nelson i Strobel, 1987). Ipak, naše razumijevanje utjecaja antropogenih toksikanata



na mehanizam prilagodbe morskih organizama vrlo je oskudno. Podrijetlo interindividulane različitosti *cyp* gena posljedica je utjecaja okoliša, ali i biologije i fiziologije organizma, kao što su spol i hormonalni status (Kirischian i Wilson, 2012). Veliki polimorfizam *cyp* gena koji pripadaju istoj obitelji pripisuje se posljedici utjecaja ksenobiotika, pri čemu velik broj različitih izoformi *cyp* gena osigurava veću mogućnost razgradnje širokog spektra ksenobiotika kojima je organizam izložen (Cui i sur., 2001, Hardwick, 2008).

Indukcija aktivnosti CYP1A enzima koristi se kao biomarker izloženosti riba i drugih kralješnjaka PAHovima i/ili drugim onečišćivalima iz morskog okoliša. Velik broj istraživanja tragao je za sličnim odgovorima CYP enzima kod beskralješnjaka, no interpretacija rezultata spomenutih istraživanja uvelike je bila otežana i) nespecifičnošću antitijela CYP1A kralješnjaka na proteine mekušaca koji nisu pripadali CYP obitelji proteina, ii) niskom enzimskom aktivnošću proteina beskralješnjaka na do tada poznate supstrate za CYP enzime (Livingstone, 1991, Peters i sur., 1998a, Livingstone i sur., 2000, Snyder, 2000). Rezultati istraživanja CYP enzima kod kukaca ukazala su na indukciju CYP enzima obitelji 4 alkaloidima i fenobarbitalom, kao i na njihovu uključenost u otpornost na insekticide, što sugerira na uključenost CYP4 enzima beskralješnjaka u metabolizam ksenobiotika (Danielson i sur., 1998). CYP4 enzimsku obitelj smatra se jednom od najstarijih CYP obitelji koja se razvila iz *cyp* gena uključenih u sintezu steroida, a koja se naknadno pod selekcijskim pritiskom evolucije raščlanila u niz podobitelji i gena koji kodiraju za enzime različitih funkcija (Simpson, 1997). Kod kralješnjaka su *cyp* geni zaslužni za metabolizam masnih kiselina te su ujedno uključeni i u sprječavanje lipotoksičnosti hidroksilirajući eikozanoide (Hardwick, 2008). Nekoliko *cyp4* gena beskralješnjaka već je klonirano (*Nereis virens*, AAR88241; *Cyphoma gibbosum*, ACD75827; *Haliotis rufescens*, AAC32833), no vrlo malo se zna o nukleotidnim i proteinskim slijedovima te o funkciji *cyp4* gena kod školjkaša, čak i unatoč identifikaciji nekoliko parcijalnih slijedova u školjkaša poput *Perna viridis* (ABZ81919) i *M. galloprovincialis* (AAC32835).

## 2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

---

## **2 CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

### **2.1 CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

- 1) Utvrđivanje prisutnosti *cyp4* gena u dagnji, *M. galloprovincialis*
- 2) Identifikacija razine genetske raznolikosti *cyp4* gena u prirodnim populacijama dagnji koje žive pod utjecajem različitog stupnja onečišćenja

### **2.2 HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

Mediterranska dagnja, *M. galloprovincialis*:

- 1) eksprimira *cyp4* gen
- 2) pokazuje varijacije *cyp4* gena
- 3) pokazuje varijaciju u prisutnosti izoformi *cyp4* gena u ovisnosti o okolišnim uvjetima

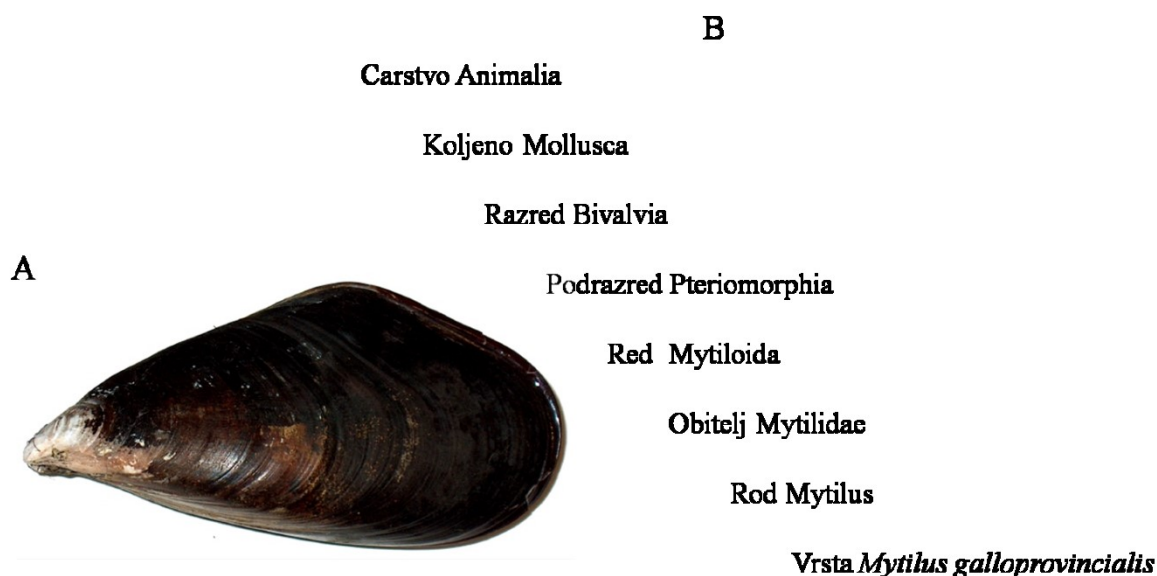
### 3. LITERATURNI PREGLED

---

### 3 LITERATURNI PREGLED

#### 3.1 DAGNJA, *Mytilus galloprovincialis*

Mediteranska dagnja (Slika 1A.) (*M. galloprovincialis* Lamarc 1981) pripada obitelji *Mitilidea* iz koljena Mollusca (Slika 1B.). Porijeklom je iz Mediteranskog, Crnog i Jadranskog mora, no putem balastnih voda i obraštajem trupa brodova proširila se na mnoga



Slika 1. A) vanjski izgled dagnje, *Mytilus galloprovincialis*, B) taksonomska klasifikacija dagnje.

druga područja diljem svijeta (Slika 2.). Mediteranska dagnja nastanjuje zonu plime i oseke izloženih stjenovitih obala s relativno visokom energijom valova, iako se može pronaći i na umjereno zaštićenim obalama te u gustim nakupinama na pješčano – muljevitim dnima slanih laguna (Ceccherelli i Rossi, 1984). Za podlogu se pričvršćuje bisusnim nitima te ju možemo pronaći i na plutačama, sidrenim konopima i usiderenim brodovima. Dagnja se može naći i na dubinama preko 20 m. Ova naselja najčešće se pojavljuju na podmorskim temeljima raznih građevina, na konstrukcijama naftnih platformi te kavezima za uzgoj riba i slično.



**Slika 2.** Geografska rasprostranjenost dagnje, *M. galloprovincialis* (□) (Preuzeto sa: [http://eol.org/data\\_objects/19122362](http://eol.org/data_objects/19122362)).

Zahvaljujući sposobnosti zatvaranja i otvaranja čvrstih ljuštura, prilagođena je životu u uvjetima povremenog izranjanja, izlaganja visokim temperaturama i promjenama saliniteta zbog evaporacije, što navodi na činjenicu da dagnja podnosi širok raspon temperatura kao i različitih saliniteta (Seed, 1976).

Dagnja se hrani kontinuiranim filtriranjem morske vode. Ključnu ulogu hranjenja obavljaju škrge koje, uz istodobno omogućavanje procesa disanja, osiguravaju i stalnu dobavu hranjivih čestica. U prehrani dagnje prevladava fitoplankton, fini organski detritus, razgrađena organska tvar, bakterije, mikrozooplankton i anorganske čestice (Jørgensen, 1990). Reproductivni ciklus dagnje obuhvaća cijeli niz događaja, od aktivacije gonada, gametogeneze, do ispuštanja zrelih gameta (faza mrijesta) te naknadne faze mirovanja gonada. Reproductivno razdoblje karakterizirano je s jednim ili više ciklusa gametogeneze, a svaki je popraćen otpuštanjem gameta iz zrelih reproductivnih folikula. Poput mnogih vodenih školjkaša, i dagnja podliježe sezonskom obrascu reproductivne (Gosling, 1992).

### **3.1.1 DAGNJA KAO INDIKATORSKI ORGANIZAM U STUDIJAMA PRAĆENJA STANJA OKOLIŠA**

Sredinom sedamdesetih godina prošlog stoljeća razvila se svijest o geografskom opsegu i ozbiljnosti onečišćenja morskog okoliša te pripadajućeg biološkog učinka, koja do tada nije bila dokumentirana. Godine 1975. predloženo je osnivanje „Mussel watch“ programa

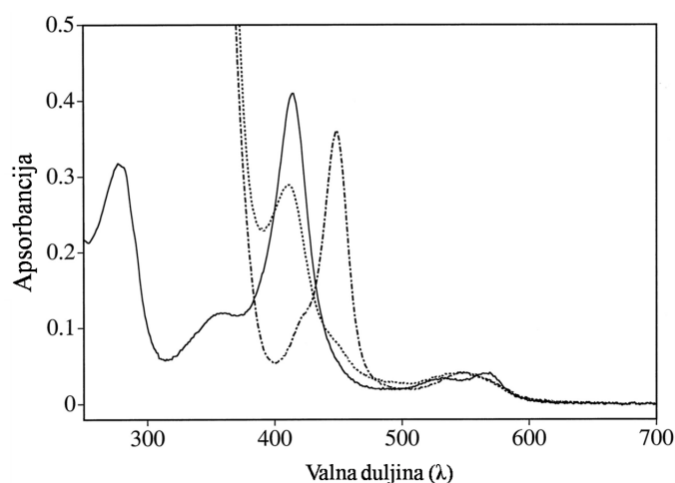
sustavnog praćenja kemijskih onečišćivala u estuarijima i obalnim područjima Sjeverne Amerike (Goldberg, 1975), uz korištenje školjkaša kao indikatorskih organizama. Ubrzo je u mnogim zemljama svijeta došlo do uspostave sličnih lokalnih ili regionalnih programa. Glavni razlog određivanja kemijskih onečišćivala u priobalnim vodama bila je zaštita ljudskog zdravlja te zaštita prirodnih resursa.

Biološka svojstva samog organizma nametnula su školjkaše kao izvrsne indikatorske organizme u praćenju stanja okoliša (Gosling, 1992):

- 1) Geografski široko rasprostranjeni školjkaši, poput dagnje, dominantni su članovi obalnih zajednica, čime se smanjuje problem prikupljanja i uspoređivanja podataka različitih istraživanja.
- 2) Dagnja je sjedilački organizam te je stoga kao integrator kemijskog onečišćenja u danom okolišu bolji izbor od pokretnih vrsta.
- 3) Dagnja je relativno otporna na široki raspon okolišnih uvjeta, uključujući umjereno povišene razine mnogih tipova onečišćenja.
- 4) Zbog načina ishrane, kontinuiranog filtriranja morske vode, u tkivima dagnje se akumuliraju onečišćivala iz morske vode.
- 5) Mjerenje koncentracije onečišćivala u tkivu dagnje omogućuje procjenu biološke dostupnosti onečišćivala, što nije vidljivo iz mjerenja koncentracije onečišćivala u vodi, otopljenoj tvari ili sedimentu.
- 6) U usporedbi s ribama i rakovima enzimski sustavi odgovorni za metabolizam organskih onečišćivala u dagnji, poput aromatskih ugljikovodika i polikloriranih bifenila, odlikuju se niskom razinom aktivnosti. Stoga, koncentracija onečišćivala u tkivima dagnje preciznije odražava opseg okolišnog onečišćenja.
- 7) Populacije dagnji relativno su stabilne, te su dostatno velike za slučaj opetovanog uzorkovanja, čime se osigurava prikupljanje podataka za studije kratkoročnih i dugoročnih promjena razina onečišćenja.
- 8) Dagnja se lako može prenijeti i održavati u kavezima, ili u zoni plime i oseke, ili u dubini kada su pričvršćene na sidrišta, gdje zbog manjka supstrata za vezanje populacije dagnji nisu u mogućnosti normalno rasti.
- 9) Dagnja ima komercijalnu važnost (vrijednost kao hrana) te je mjerenje kemijskog onečišćenja od interesa za zdravstvo.

### 3.2 SUSTAV CITOKROMA P450

Citokrom P450 u svijet znanosti ušao je 1955. godine eksperimentalnim izvješćem o enzimskoj aktivnosti prisutnoj u endoplazmatskom retikulumu stanica jetre zeca a koja je uključena u oksidaciju ksenobiotika (spojeva stranih organizmu) (Axelrod, 1955, Brodie i sur., 1955). Godine 1958. Klingenberg i Garfinkel u zasebnim istraživanjima mikrosoma štakora i svinje izloženih ugljikovom monoksidu (CO) dokazuju prisutnost crvenog pigmenta i njegovu jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra na valnoj duljini ( $\lambda$ ) od 450 nm (citirano iz Omura i Sato, 1964a). Primjer ovakvog spektra prikazan je na Slici 3. Upravo je zbog ovog istraživanja citokrom P450 (Pigment 450 nm, ili CYP) dobio i ime, te je do danas jedina grupa enzima koja stvara apsorpcijski maksimum na 450 nm (Silverman, 2002). Ova optička karakteristika doista je neobična jer većina drugih hemoproteina ne pokazuje slična spektralna svojstva. Na primjer, kompleks željezo – CO u mioglobinu maksimalnu apsorpciju pokazuje pri 423 nm (Josephy i sur., 1997). Zbog svojih dvostrukih svojstava, kao oksidansa i reducensa, ovaj pigment ujedno je dobio naziv i „oksidaza miješanih funkcija“. Omura i Sato (1964a) karakterizirali su citokrom P450 kao hemoprotein, te su ujedno pokazali i povezanost citokroma P450 sa citokromom b<sub>5</sub>, još jednim hemoproteinom u mikrosomima jetre zeca (Omura i Sato, 1964b).



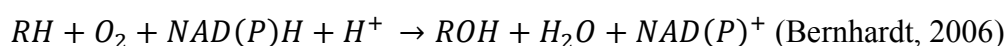
**Slika 3.** CYP119 iz *Sulfolobus solfataricus*. Puna linija: slobodni hemoprotein, Točkasta linija: hemoprotein reduciran ditionitom, Puna – istočkana linija: Hem – CO kompleks (Preuzeto iz Koo i sur., 2000).



Nakon dugogodišnjih istraživanja danas se zna da sustav citokroma P450 sačinjava superobitelj enzima prisutnu u gotovo svim carstvima od bakterija do jednostaničnih eukariota, biljaka, gljiva i životinja (Werck-Reichhart i Feyereisen, 2000). U najširem smislu, postoje dvije osnovne funkcije enzima citokroma P450. Jedna je metabolizam ksenobiotika kojim se strani spojevi degradiraju ili izlučuju iz organizma (povećanje polarnosti, topivosti u vodi), a druga je biosinteza signalnih molekula koje sudjeluju u kontroli razvoja i održavanju homeostaze organizama. U tkivima sisavaca, funkcije produkata P450 gena ogledaju se u metabolizmu lijekova i ksenobiotika, sintezi steroidnih hormona, metabolizmu vitamina topivih u mastima te pretvorbi polinezasićenih masnih kiselina u biološki aktivne molekule. Slične uloge enzima P450 su i u biljkama (biosinteza hormona, razgradnja herbicida) i u insektima (kontrola razvoja kroz biosintezu hormona i otpornost na insekticide) (Guengerich, 1991). O tkivnoj distribuciji P450 enzima ne postoji nikakvo pravilo. Kako su im funkcije izrazito raznolike, može ih se pronaći u svim tipovima organizama, svim vrstama tkiva, a ujedno posjeduju i razvojno regulirane putove ekspresije. Kao posljedica velike funkcionalne različitosti enzima, a ujedno i preklapanja reakcija koje kataliziraju, enzimi sustava citokroma P450 metaboliziraju široki raspon spojeva, od endogenih lipida do ksenobiotika. P450 enzimi iz svih organizama sudjeluju u detoksifikaciji, ili ponekada aktivaciji ksenobiotika. Ovisno o supstratu mogu se dogoditi različite reakcije, oksidativna i reduktivna dehalogenacija, N – hidroksilacija, N – oksidacija, oksidativna deaminacija, S -, N – i O – dealkilacija te alifatska i aromatska hidroksilacija (Sono i sur., 1996). Unatoč širokom rasponu reakcija koje kataliziraju enzimi sustava citokroma P450 (CYP) opća topografija te zajednička strukturalna i funkcionalna obilježja visoko su očuvani.

### 3.2.1 ORGANIZACIJA SUSTAVA CITOKROMA P450

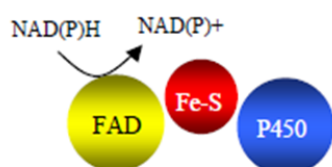
Proteini citokroma P450 glavne su komponente mikrosomalnog sustava oksidaza miješanih funkcija. Enzimi citokroma P450 po svom djelovanju tipične su monooksigenaze (oksidaze miješanih funkcija) koje kataliziraju ugradnju jednog atoma molekularnog kisika u supstrat s pratećom redukcijom vode drugim atomom kisika. Opća reakcija koju kataliziraju CYP enzimi prikazana je formulom:



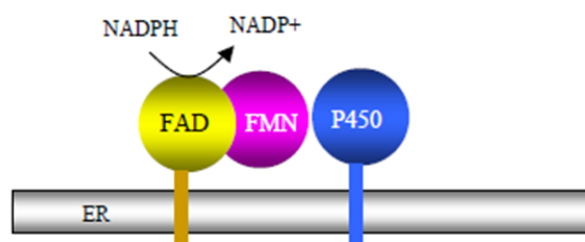
CYP enzimi pripadaju vanjskim monooksigenazama što znači da zahtijevaju vanjskog donora elektrona potrebnog za aktivaciju kisika te naknadnu hidroksilaciju supstrata (Bernhardt, 2006, Hannemann i sur., 2007). Vanjski donor elektrona u sustavu P450 je NAD(P)H (nikotinamid - dinukleotid fosfat). CYP enzimi se opskrbljuju reducirajućim oblicima iz NADPH putem svojih redoks partnera. Sukladno prirodni redoks partnera, odnosno pomoćnih proteina, sustav citokroma P450 odlikuje se s četiri osnovne grupe (Miles i sur., 2000).

Sustav oksidaza miješanih funkcija grupe I nalazi se u većini bakterija te u mitohondrijskim membranama eukariota. Ovaj sustav oksidaza miješanih funkcija sastoji se od tri komponente, reduktaze koja pripada obitelji flavoproteina koristeći FAD (flavin adenin dinukleotid) kao kofaktor (FAD reduktaza), adrenodoksina (Fe – S protein) i enzima citokroma P450 (Slika 4.).

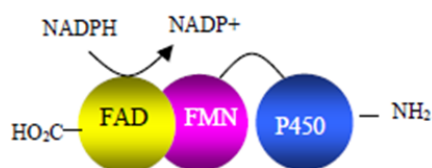
### Grupa I



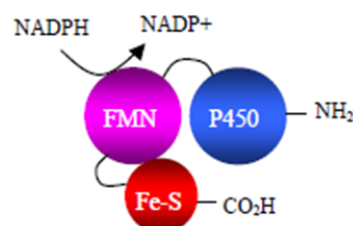
### Grupa II



### Grupa III



### Grupa IV



**Slika 4.** Shematski prikaz različitih grupa sustava citokroma P450. Sustav citokroma P450 grupe I sastoji se od tri komponente: FAD reduktaze, Fe – S proteina i enzima citokroma P450. Sustav grupe II vezan je na membranu, a sastoji se od FAD/FMN reduktaze i enzima citokroma P450. Kod sustava grupe III FAD/FMN reduktaza spojena je s enzimom citokroma P450 čineći jedan polipeptid. Sustav grupe IV sastoji se od FMN- reduktaze s centrom adrenodoksina spojenim s proteinom P450 u jedan polipeptid (Preuzeto iz Roberts i sur., 2002).

Prokariotski P450 su topivi u vodi te razgrađuju spojeve koje koriste kao izvor ugljika ili detoksificiraju ksenobiotike. Ostale funkcije opisane za prokariotski P450 uključuju metabolizam masnih kiselina i biosintezu antibiotika. Kod gljiva, funkcije citokroma P450 uključuju sintezu membranskih sterola i mikotoksina, detoksifikaciju fitoaleksina, i metabolizam lipidnih izvora ugljika. Enzimi mitohondrijske grupe kod eukariota vezani su na unutarnju mitohondrijsku membranu te kataliziraju nekoliko koraka u biosintezi steroidnih hormona i vitamina D3 (sisavci). Adrenodoksin (Fe-S protein) je topivi protein koji se nalazi u matriksu mitohondrija. Mitohondrijski P450 također su pronađeni u kukcima i oblicima, ali do danas niti jedan nije opisan kod biljaka.

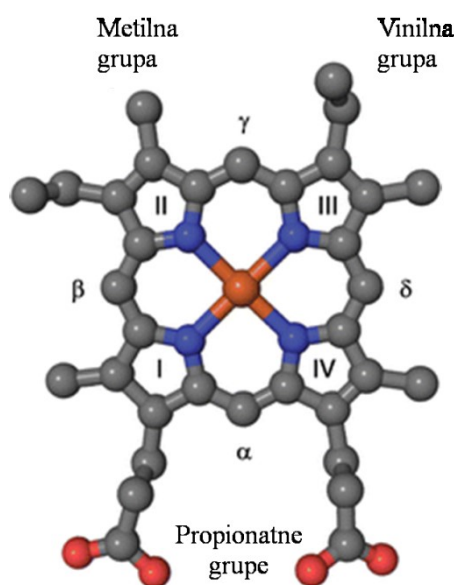
Sustav oksidaza miješanih funkcija grupe II sastoji se od samo dvije komponente, citokrom P450 reduktaze ovisne o NADPH koja kao kofaktore koristi FAD i FMN (flavin mononukleotid) te enzima citokroma P450 (Slika 4.) (Munro i Lindsay, 1996). CYP enzimi grupe II nalaze se u mikrosomima eukariota uronjeni u vanjsku stranu membrane endoplazmatskog retikuluma. Svi do sada izolirani citokromi P450, koji sudjeluju u metabolizmu ksenobiotika, pripadaju ovoj grupi. Potvrđeno je da aktivnost nekih mikrosomalnih P450 enzima dodatno pojačava citokrom  $b_5$  koji prenosi elektrone sa NAD(P)H, a također je usidren u endoplazmatski retikulum. Ova stimulacijska aktivnost citokroma  $b_5$  ovisna je o formi citokroma P450 te metaboliziranom supstratu (Schenkman i Jansson, 2003, Pandey i Miller, 2005, Shimada i sur., 2005).

Sustav oksidaza miješanih funkcija grupe III pronađen je isključivo kod bakterija. Sustav je vrlo sličan sustavu grupe II, međutim, kod prokariota je FAD/FMN – citokrom P450 reduktaza spojena s P450 proteinom čineći jedan polipeptid (Miles i sur., 2000, Werck-Reichhart i Feyereisen, 2000, Roberts i sur., 2002) (Slika 4.).

Sustav oksidaza miješanih funkcija grupe IV identificiran je kod bakterija (Roberts i sur., 2002). Sastoji se od FMN- reduktaze s centrom adrenodoksina spojenim s proteinom P450 u jedan polipeptid (Slika 4.). Postoje i enzimi citokroma P450 koji za svoje reakcije ne zahtijevaju niti molekularni kisik, niti vanjski izvor elektrona - autonomni P450. Oni kataliziraju preraspodjelu ili dehidraciju alkilhidroperoksida ili alkilperoksida inicijalno proizvedenih dioksigenzom (Kahn i Durst, 2000). Enzimi autonomne P450 klase uključeni su u sintezu signalnih molekula poput prostaglandina u sisavcima i jasmonata (hormon rasta) u biljkama. U biljkama imaju raznoliku subcelularnu lokalizaciju, te su pronađeni i u plastidima.

### 3.2.2 AKTIVNI CENTAR KATALIZE I KATALITIČKI MEHANIZAM CITOKROMA P450

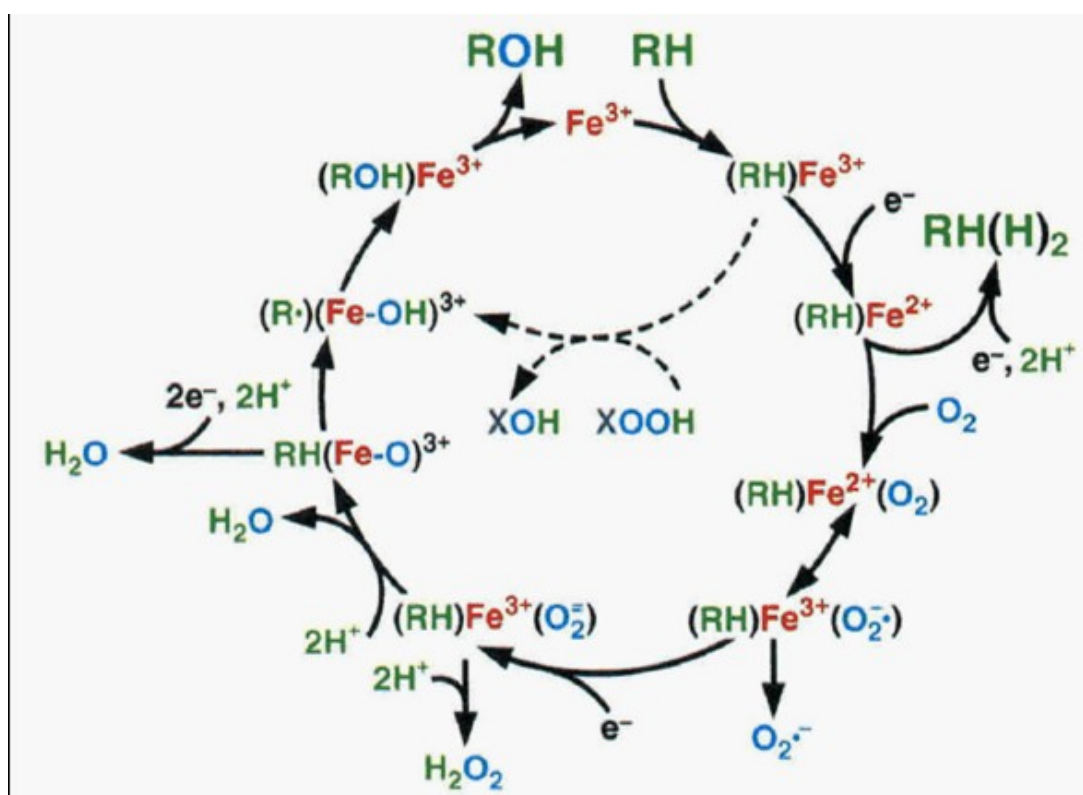
Enzimi citokroma P450 kao aktivni centar katalize posjeduju hem prostetičku skupinu željezo protoporfirin IX (Schneider i sur., 2007). Hem je smješten blizu centra proteina P450 te nije kovalentno vezan za sam protein. Kada je protein u stanju mirovanja atom željeza nalazi se u trovalentnom feri stanju ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) te je koordiniran putem šest liganada: četiri liganda su dušici pirola koji sačinjavaju protoporfirinski prsten u ravnini hema, jedan ligand je tiolat konzerviranog cisteinskog ostatka, dok posljednju koordinacijsku poziciju (lociranu iznad atoma željeza) čini molekula vode (Slika 5.). U slučaju prisutnosti supstrata ili liganda jačega od vode može doći do interakcije s atomom željeza što dovodi do same promjene koordinacije i/ili valencije hema u aktivirani (fero,  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) oblik (Werck-Reichhart i Feyereisen, 2000, Schneider i sur., 2007).



**Slika 5.** Molekularni prikaz hem prostetičke skupine proteina citokroma P450. Tetrapirolni prsten sačinjavaju četiri pirolna prstena (I – IV) povezana metilnim mostovima ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ). U centru protoporfirinskog prstena nalazi se željezo (narančasta boja) u feri ili fero obliku, koordinirano pirolnim dušicima (plava boja). Tiolat cisteinskog ostatka i molekula vode, kao 5. i 6. koordinacijsko mjesto željeza nisu prikazani (Preuzeto iz Schneider i sur., 2007).

Opći katalitički mehanizam CYP enzima opisan je na Slici 6. (Porter i Coon, 1991, Hodgson i Strobel, 1996). NAD(P)H preko redoks partnera enzimima citokroma P450 donira elektrone potrebne za reakciju katalize supstrata. Pri tome dolazi do aktivacije molekule kisika ( $\text{O}_2$ ) što dovodi do ugradnje jednog kisikovog atoma u organski supstrat (RH) s pratećom redukcijom

vode drugim atomom kisika. Iniciranje reakcije katalize supstrata započinje vezanjem supstrata na aktivno mjesto enzima citokroma P450. Ovo vezanje vodi do snižavanja redoks potencijala hem željeza čime se omogućava prijenos elektrona s redoks partnera citokroma b<sub>5</sub> i citokroma P450 reduktaze. Mikrosomalni P450 koriste citokrom P450 reduktazu koja sadrži FAD i FMN domene kao donore elektrona (Degtyarenko i Kulikova, 2001). U aktivnom mjestu događa se promjena stanja hem željeza. Kao rezultat prvog prijenosa elektrona (Slika 6.) događa se redukcija Fe<sup>III</sup> iona. Molekularni kisik (O<sub>2</sub>) brzo se veže na Fe<sup>II</sup> stvarajući Fe<sup>II</sup> - O<sub>2</sub> kompleks, koji polako prelazi u Fe<sup>III</sup> - O<sub>2</sub><sup>-</sup>, posljednji relativno stabilni intermedijer u ovom ciklusu.



**Slika 6.** Shema katalitičkog ciklusa enzima citokroma P450. Fe predstavlja hem željezo, RH supstrat, RH(H)<sub>2</sub> produkt redukcije, ROH produkt monooksigenacije, te XO·OH peroksi spoj koji može služiti kao dodatni donor kisika (Preuzeto iz Porter i Coon, 1991).

Prijenosom drugog elektrona formira se superoksidni kompleks (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Tada dolazi do formacije različitih aktivnih kisikovih specija P450 enzima, ovisno o protoniranom stanju kompleksa i o homolitičkom ili heterolitičkom cijepanju reducirane molekule kisika. Iako je formalna reakcija ugradnja jednog atoma kisika u supstrat, dok drugi služi za redukciju vode (odavde naziv oksidaze miješanih funkcija), priroda oksidirajućih specija varira. P450 oksid - željezo, (Fe<sup>III</sup>- O- O)<sup>2-</sup>, P450 hidroperokso- željezo (Fe<sup>III</sup>- O- OH)<sup>-</sup> i P450 željezo- okso

( $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ ) oblici su prevladavajućih aktivnih kisikovih formi. Cijepanje kisikove veze ( $\text{O}_2$ ) rezultira stvaranjem ( $\text{Fe} - \text{O}$ )<sup>III</sup> kompleksa i vode. Kisik se zatim iz željeznog liganda prenosi na supstrat stvarajući hidroksilirani spoj. Otpuštanjem produkta iz aktivnog mjesta, CYP enzim ponovno stječe svoje inicijalno stanje proteina u mirovanju te je slobodan za novi ciklus katalize (Miles i sur., 2000, Munro i sur., 2007).

Reakcijski ciklus P450 sadržava najmanje tri točke grananja gdje se često, pod fiziološkim uvjetima, događaju višestruke usporedne reakcije (Graham i Peterson, 1999). Tri glavne zaostale reakcije su (i) autooksidacija okso-željeznog P450 s pratećom produkcijom superoksidnog aniona i povratkom enzima u stanje mirovanja, (ii) peroksidna izmjena, gdje peroksidni ili hidroperoksidni anion disocira sa željeza stvarajući vodikov peroksid, uslijed čega dolazi do dvostruke redukcije kisika i (iii) oksidaznog nespajanja pri čemu umjesto oksigenacije supstrata dolazi do oksidacije željezo- okso oblika ( $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ ), što rezultira redukcijom četiri elektrona molekule kisika, te dolazi do oslobađanja vode.

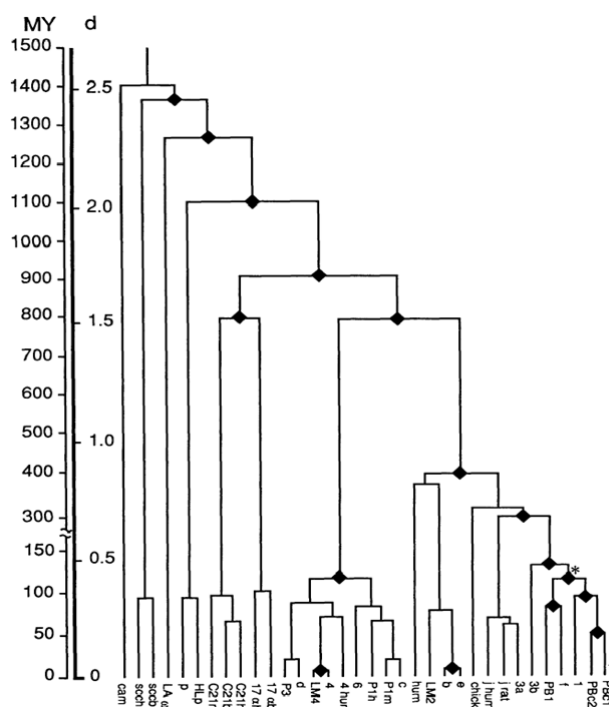
### 3.2.3 NOMENKLATURA CITOKROMA P450

Nelson i sur. (1996) su razradili sustav imenovanja (nomenklatura) citokroma P450 koji se konstantno preispituje i ažurira, a baziran je na aminokiselinskim sljedovima P450 proteina, divergentnoj evoluciji ove proteinske superobitelji te organizaciji gena. Na osnovu sličnosti u aminokiselinskom slijedu geni citokroma P450 (*cyp*) sistematizirani su u obitelji i podobitelji. Na osnovu filogenetskih odnosa *cyp* geni koji su se odvojili od zajedničkog ishodišnog gena pretka, daleko u evolucijskoj povijesti, te dijele zajedničku funkciju grupirani su u klanove (Nelson i sur., 1996). Izvorna oznaka CYP izvedena je iz *cytochrome P450*, a slijedi ju arapski broj koji upućuje na obitelj, slovo koje upućuje na podobitelj, te naposljetku arapski broj koji naznačuje individualne članove podobitelji (izoenzime). Istoj obitelji obično su pridruženi CYP enzimi sa  $\geq 40\%$  identičnosti amino kiselinskog slijeda. Enzimi koji dijele  $\geq 55\%$  amino kiselinske identičnosti su u istoj podobitelji (Nelson i sur., 1996). Do danas je u svim trima životnim domenama identificirano preko 20 000 *cyp* gena podijeljenih u preko 1000 obitelji. Geni citokroma P450 opisani su kod 85 eukariotskih i 20 prokariotskih vrsta. Samo u životinjskom svijetu postoji 11 CYP klanova, od kojih svaki klan sadržava jednu ili više CYP genskih obitelji. Kod biljaka pronalazimo potpuno drugačiji set klanova, osim klanova CYP 51 i CYP 74 koji su zajednički i biljkama i životinjama (<http://drnelson.utmem.edu/nelsonhomepage.html>). Posljednji popis imenovanih nukleotidnih

sljedova citokroma P450 iz kolovoza 2013. god. navodi 6313 sljedova identificiranih u životinjskom svijetu, od kojih 3452 otpada na kukce, 1928 na kralješnjake, a 883 na ostale beskralješnjake izuzevši kukce. U biljkama je identificirano 7446 različitih nukleotidnih CYP sljedova, u gljivama 5729, a u bakterijama 1258. Popis također sadrži i broj identificiranih nukleotidnih sljedova citokroma P450 za praživotinje, na koje otpada 247 sljedova, zatim Archeae u kojima su identificirana 22 slijeda, te viruse u kojima su identificirana samo dva različita slijeda citokroma P450 (<http://drnelson.utmem.edu/nelsonhomepage.html>).

### 3.2.4 EVOLUCIJA CITOKROMA P450

Velika raznolikost u funkcijama proteina iz ove obitelji gena rezultat je uzastopnih duplikacija gena te njihovog naknadnog razilaženja. Prvo značajno dijeljenje CYP enzima dogodilo se između prokariota i eukariota, kada je došlo do odvajanja gena na bakterijske vodotopive proteine i na eukariotske proteine integrirane u membranu (Slika 7.).



**Slika 7.** Filogenetsko stablo 34 proteina citokroma P450. ♦ predstavljaju događaj duplikacije gena. Neoznačena mjesta granjanja predstavljaju događaje specijacije. „\*“ predstavlja pretpostavljenu duplikaciju gena, iz razloga što je prerano reći o razilaženju dvije vrste (Preuzeto iz Nelson i Strobel, 1987).

Duplikacija eukariotskog gena pretka koja se dogodila prije oko 1400 miliona godina doprinjela je razvoju CYP enzima smještenih u dva različita organela, u mitohondriju i endoplazmatskom retikulumu. Čini se da je rana povijest CYP proteina povezana s

metabolizmom kolesterola. Najraniji eukariotski CYP enzimi pripadaju mitohondrijskim citokromima P450, a uloga im je kataliza kolesterola u svrhu produkcije pregnenolona, prekursora svih steroidnih hormona (Nelson i Strobel, 1987). U uskom srodstvu s mitohondrijskim CYP enzimima pronalazimo enzime uključene u metabolizam masnih kiselina, poput CYP4 obitelji hidroksilaza laurinske kiseline. Uloge CYP4 i mitohondrijskih enzima citokroma P450 ukazuju na njihovu uključenost u održavanju integriteta membrane kod ranih eukariota (Nebert i Gonzalez, 1987).

Vjerojatno najznačajniji događaj u evoluciji citokroma P450 bila je duplikacija gena prije oko 900 milijuna godina. Nastankom dvaju kopija gena jedna linija nastavila je funkcionirati kao endogeni tip citokroma P450, dok je druga grana započela novu funkciju, detoksifikaciju supstrata stranih organizmu. Grupa gena s funkcijom detoksifikacije supstrata stranih organizmu ubrzo je doživjela novu duplikaciju te se prije 800 milijuna godina podijelila na dvije obitelji gena inducirane različitim grupama ksenobiotika, obitelj induciranu fenobarbitalom i obitelj induciranu 3 – metilkolantrenom. Veliko razgranjavanje fenobarbitalske CYP obitelji prije otprilike 400 milijuna godina poklapa se s razdobljem početka invazije i koloniziranja zemlje od strane kralješnjaka. Impuls za ovo upečatljivo razgranjavanje možemo pronaći u naglom izlaganju kralješnjaka toksičnim spojevima iz kopnenih biljaka. Biljke su nastanile kopno nekoliko milijuna godina prije kralješnjaka, što im je dalo obilje vremena za razvoj spojeva s kojima do tada vodeni kralješnjaci nisu došli u doticaj.

U eukariotskim genomima, postojanje genskih obitelji koje sadrže više od jednog identičnog člana može se objasniti ponavljajućom duplikacijom specifičnog DNA slijeda tijekom vremena. Naknadnom specijacijom formiraju se dvije linije organizama, gdje svaka sadrži isti broj članova genske obitelji. Ponavljajućim duplikacijama svake linije zasebno dolazi do još većeg razilaženja članova genske obitelji te oni postaju sve manje i manje slični. Da je ovo slučaj i s članovima obitelji citokroma P450 potvrđuje mnoštvo izoformi CYP2D podobitelji gena štakora, lociranih u klasteru gena na istom kromosomu (Matsunaga i sur., 1990). Još jedan primjer uređenja obitelji gena citokroma P450 je genomska organizacija P450 klastera na humanom kromosomu 19, gdje se na 350 kilobaza DNA protežu CYP2A, 2B i 2F podobitelji gena (Hoffman i sur., 1995).

Konverzija gena važan je molekularni mehanizam koji doprinosi evoluciji vrsno – specifičnih gena, te je ona kao proces jednosmjernog prijenosa informacije DNA s jednog gena na drugi



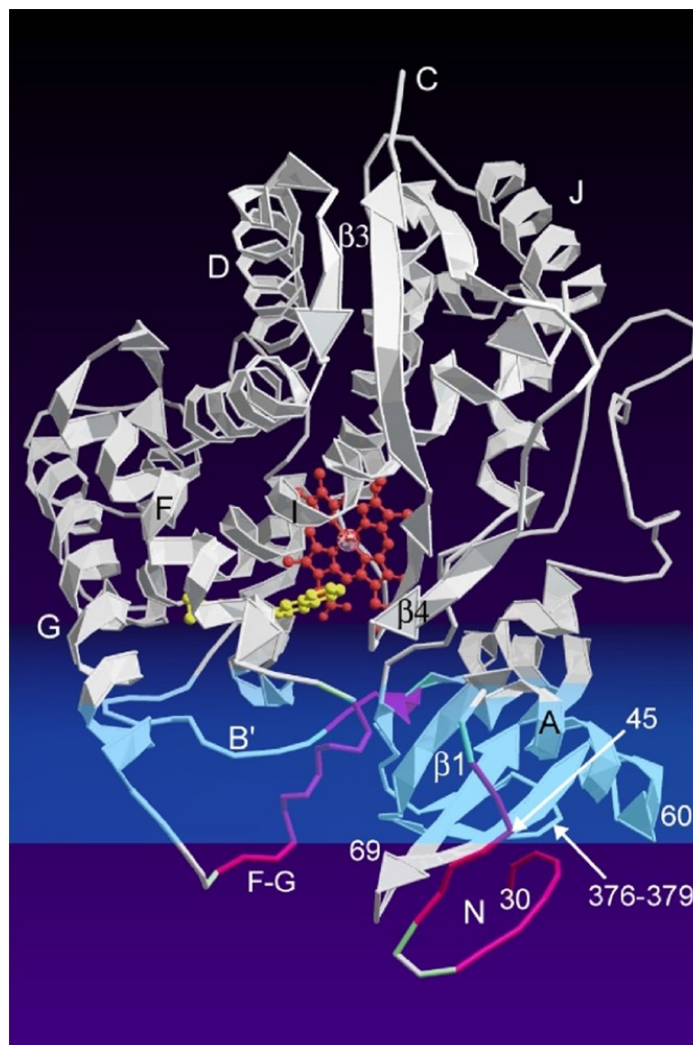
doprinijela raznolikosti *cyp* gena. Proces konverzije najčešće se odvija tijekom n reciprocne rekombinacije i popravka pogrešno vezanih baza, kada dio jednog alela zamjenjuje odgovarajući dio drugog alela istog gena (Baltimore, 1981). Četiri od pet CYP2D gena štakora potvrđuju događaj konverzije gena, kod kojih područja egzona i introna posjeduju visoku sličnost s dijelovima gena za kojeg se smatra da nije produkt genske konverzije (Gonzalez i Nebert, 1990, Matsunaga i sur., 1990). Unatoč konverziji gena geni citokroma P450 zadržali su homogenost oko cisteinskog ostatka (Cys), koji služi kao peti ligand željeza hema te je važan u funkciji svih CYP enzima (Nebert i Gonzalez, 1987).

### 3.2.5 PROTEINSKA STRUKTURA ENZIMA P450

Eukariotski enzimi citokroma P450 membranski su proteini locirani u unutrašnjoj membrani mitohondrija i/ili se nalaze vezani na endoplazmatski retikulum u citoplazmi stanice (Williams i sur., 2000). Enzimi kataliziraju vrlo široki raspon supstrata te kataliziraju mnoštvo kemijskih reakcija. Ipak, svi CYP proteini dijele opću topografiju i visoko konzerviranu strukturu. Opća topografija aludira na već spomenuti zajednički mehanizam aktivacije kisika (Werck-Reichhart i Feyereisen, 2000, Hannemann i sur., 2007). Kodirajuća regija CYP gena uglavnom se sastoji od 1500 parova baza (pb) koje se prepisuju u protein dug 500 aminokiselina (Nelson i sur., 2004). Identičnost aminokiselinskog slijeda između CYP proteina često je vrlo niska, u nekim slučajevima < 20%.

Prva kristalna struktura CYP proteina vezanog na supstrat tj. kamfor (P450cam, CYP101) određena je za organizam *Pseudomonas putida* (Poulos i sur., 1985). Topografska analiza je pokazala da protein P450cam ima oblik trokuta, što je naknadno dokazano i za druge P450 enzime čija je kristalografska struktura razriješena (Poulos i sur., 1987, Hasemann i sur., 1995, Williams i sur., 2000, Rowland i sur., 2006). Kristalna struktura proteina CYP101 dokazala je prisutnost 12  $\alpha$  – uzvojnica (A – L) i 5 beta ( $\beta$ ) ploča koje formiraju terciarnu strukturu, prisutnu među svim CYP proteinima (Poulos i sur., 1987, Hasemann i sur., 1995, Graham i Peterson, 1999). Do danas je utvrđeno nekoliko kristalnih struktura *cyp* gena uključujući bakterijske P450cam, P450terp, P450<sub>BM-3</sub> (Hasemann i sur., 1995) proteine, CYP2C5 protein zeca (Williams i sur., 2000) te CYP2D6 (Rowland i sur., 2006) i CYP3A4 proteine (Yano i sur., 2004) čovjeka. U svim navedenim rekonstrukcijama CYP proteina ukupna kristalna struktura bila je slična čak i unatoč vrlo maloj identičnosti aminokiselinskog slijeda (< 15%) (Nelson i sur., 1993, Hasemann i sur., 1995). Molekula hema je kod svih

proteina citokroma P450 smještena unutar šupljine okružene polarnim ostatcima: svežnjem četiri  $\alpha$  - uzvojnice (D, E, I i L),  $\alpha$  – uzvojnicama J i K, dvjema beta nabranim pločama te meandrom (Slika 8.) (Poulos i sur., 1985, Werck-Reichhart i Feyereisen, 2000).



**Slika 8.** Prikaz distalne strane CYP2C5 mikrosomalnog proteina koji prikazuje strukturu proteina citokroma P450. Hem prostetička grupa prikazana je molekularnim prikazom kao crvena kugla, dok je supstrat prikazan žutim molekularnim prikazom.  $\alpha$  uzvojnice i  $\beta$  ploče su označene. Mjesto vezivanja CYP2C5 proteina s membranom endoplazmatskog retikuluma označeno je ljubičastom bojom (Preuzeto iz Werck-Reichhart i Feyereisen, 2000).

Najveće očuvanje u strukturi CYP proteina nalazimo u samoj jezgri oko hema te ono odražava opći mehanizam prijenosa elektrona i protona kao i aktivaciju kisika. Mnogi proteini citokroma P450 mijenjaju strukturu hidrofobnih supstrata u hidrofilne derivate čime je olakšano njihovo uklanjanje iz organizma. Zbog hidrofobnosti P450 supstrata membrana predstavlja vrlo stabilan okoliš za enzime citokroma P450 koji su svojim aminoterminalnim krajem ugnježđeni u lipidni dvosloj membrane. Aminoterminalni hidrofobni dio proteina

citokroma P450 naziva se "signalni slijed" te se on može odcijepiti od ostatka proteina (Sabatini i sur., 1982). "Signalni slijed" sastoji se od 14-20 hidrofobnih aminokiselina koje prethode inicijacijskom metioninu (Met) na aminoterminalnom kraju proteina (High i Dobberstein, 1992). Čini se da su u proteinima citokroma P450 apsolutno očuvani samo sljedovi koji neposredno okružuju dvije ključne aminokiseline: cistein (Cys) na amino kraju proteina, te visoko očuvani treonin (Thr) u  $\alpha$  – uzvojnici I uključen u vezanje kisika (Lesk i Chothia, 1980). Apsolutno očuvani cistein služi kao proksimalni ili peti ligand hem željeza (Poulos i sur., 1985, Werck-Reichhart i Feyereisen, 2000) te je sastavni dio visoko očuvanog konsenzusnog slijeda Pro-Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly, koji se nalazi unutar šupljine, proksimalno prostetičkoj hem skupini. Ovaj slijed također je poznat kao „potpis“ enzima citokroma P450 te je karakterističan za sve do sada istražene CYP proteine (Gonzalez, 1988). Treonin se nalazi u  $\alpha$  – uzvojnici I te je sastavni dio visoko očuvanog konsenzusnog slijeda (Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser), koji se nalazi u utoru prijenosa protona, distalno molekuli hema. Smatra se da je visoko konzervirani treonin, koji se nalazi u aktivnom mjestu, uključen u katalizu supstrata (Werck-Reichhart i Feyereisen, 2000). Glutaminska ili asparaginska kiselina, smještene tik uz treonin prema amino kraju proteina također su apsolutno očuvane među proteinima citokroma P450. Struktura šupljine prostetičke hem skupine također je stabilizirana proksimalnim konsenzusnim slijedom Glu-X-X-Arg smještenim unutar  $\alpha$  – uzvojnice K (Werck-Reichhart i Feyereisen, 2000). Visoko konzervirana Trp-X-X-X-Arg regija locirana je u centru  $\alpha$  – uzvojnice C te uz pomoć triptofanskog dušika i arginina neutralizira naboj bočnog lanca propionata hem – skupine (Graham i Peterson, 2002). Kod obitelji proteina CYP4 u  $\alpha$  – uzvojnici I nalazi se konsenzusni slijed duljine 13 aminokiselina Glu-Val-Asp-Thr-Phe-Met-Phe-Glu-His-Asp-Thr-Thr, za koji se smatra da sudjeluje u prijenosu protona tijekom monooksigenacije (Williams i sur., 2000) te predstavlja potpis CYP4 obitelji proteina.

CYP proteini posjeduju i vrlo varijabilne regije koje predstavljaju fleksibilna područja prepoznavanja supstrata, a time posljedično i njihovu svestranu sposobnost katalize mnoštva supstrata (Hannemann i sur., 2007). Metodom kristalografije X – zrakama na proteinu P450 101A bakterije vrste *Pseudomonas putida* također su identificirani i dijelovi proteina koji su u interakciji sa supstratom (Poulos i sur., 1987). Gotoh (1992) je sravnio 51 aminokiselinski slijed obitelji CYP1, CYP2 i CYP3 s osam bakterijskih sljedova, uključujući i P450 101A *P.putida*, te identificirao područja velikih neistoznačnih aminokiselinskih promjena koja su

odgovarala mjestima za vezanje supstrata P450 101A (Gotoh, 1992). Na osnovu pojave visokog nivoa aminokiselinskih promjena u istim područjima proteina, dijelovima proteina koji interreagiraju sa supstratom kod P450 101A, te područjima s funkcionalno važnim točkastim mutacijama kod proteina citokroma P450 sisavaca, predloženo je šest mjesta za prepoznavanje supstrata (SRS – eng. *substrate recognition site*) (Gotoh, 1992).

### 3.2.6 GENETSKI POLIMORFIZAM CITOKROMA P450

Individualna varijabilnost u aktivnosti enzima citokroma P450 često je uzrokovana polimorfizmom gena koji kodiraju za individualne proteine. Enzimi citokroma P450 sastavni su dio prve faze metabolizma ksenobiotika, u kojoj se ksenobiotici podvrgavaju oksidaciji, redukciji i/ili hidrolizi, a sve u svrhu biotransformacije endogenih i egzogenih supstrata. Dosadašnja istraživanja ukazuju na postojanje dvije glavne grupe enzima citokroma P450. U prvu grupu uključeni su enzimi citokroma P450 obitelji 5 – 51 koji su od velikog značaja za biotransformaciju endogenih supstrata, npr. sintezu steroidnih hormona, prostaglandina te eikozanoida (Zuber i sur., 2002). Druga grupa, koja obuhvaća obitelji CYP1 – 3, ima važnu ulogu u metabolizmu egzogenih supstrata, poput policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH), lijekova, karcinogena. U ovakvoj podjeli obitelj enzima CYP4 zauzima središnji položaj jer metabolizira i endogene i egzogene supstrate (Buzková i sur., 2006). Unutar svake od ovih genskih obitelji postoje mnoge genske varijante (aleli, alternativni sljedovi molekule DNA), koje naknadno rezultiraju u individualnoj nejednakosti ekspresije i aktivnosti enzima. Dio varijabilnosti određen je okolišem zbog pratećeg priliva različitih ksenobiotika i prehrambenih proizvoda koji uzrokuju indukciju ili inhibiciju različitih izoformi P450 enzima (Porter i Coon, 1991). Konsenzusni, referentni slijed kodira za fenotip učinkovitog metabolizma, dok varijantni geni (aleli) kodiraju za fenotip slabog metabolizma, s lošom ili nepostojećom aktivnošću prema određenom ksenobiotiku, kao i za fenotip brzog metabolizma.

Polimorfizam obično uključuje promjenu samo jednog nukleotida (SNP), deleciju manjeg ili većeg dijela slijeda DNA, umetanje određenog broja nukleotida ili pak ponavljanja di-, tri- ili oligonukleotida različit broj puta, a koji varira među pojedincima. Mutacije u *cyp* genima uzrokuju stvaranje enzimskih produkata sa ukinutom, oslabljenom, izmijenjenom ili povišenom učinkovitošću. Izuzeće enzimske aktivnosti posljedica je delecije cijelog gena, sa porijeklom u mutacijama koje uzrokuju izmijenjeno izrezivanje mRNA, stop kodone,

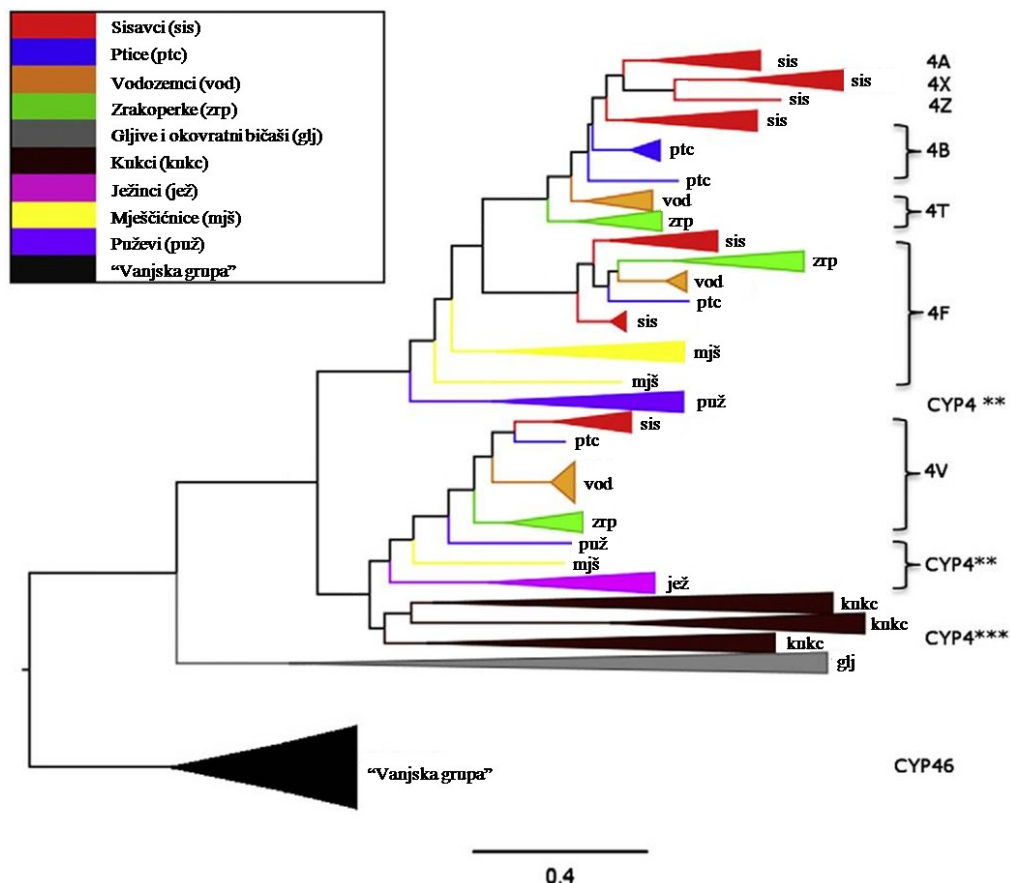
izostanak ili deleciju početnih mjesta transkripcije i delecijske promjene u amino kiselinama. Mutacije u mjestima prepoznavanja supstrata (SRS) mogu uzrokovati sintezu enzima sa izmijenjenom specifičnošću za supstrate, kao što je vidljivo kod humanog CYP2D6\*17 pronađenom u crnoj afričkoj populaciji (Ingelman-Sundberg i sur., 1999). Do izmijenjene specifičnosti za supstrate može doći i zbog promjena u sklapanju proteina što pronalazimo kod humanog CYP2D6\*10. Povišenu enzimsku aktivnost pronalazimo kod jedinki s mnogostrukim kopijama aktivnog gena P450, kao što je opisano za humani *cyp2d6*\*2 (Oscarson i sur., 1997).

### 3.3 SUSTAV CITOKROMA P450 OBITELJI 4 (CYP4)

Obitelj enzima CYP4 jedna je od najstarijih P450 obitelj proteina, koja se razvila nakon formiranja gena za biosintezu steroida (Simpson, 1997). Obitelj gena *cyp4* tijekom evolucije je ostala visoko konzervirana, i kraljeznjaci i beskraljeznjaci posjeduju *cyp4* gene (Nelson, 1998). Tri bakterijska citokroma P450, CYP110 cijanobakterija roda *Anabeana*, CYP102 *Bacillus megaterium* i CYP118 *Mycobacterium leprae*, čine klaster s klanom 4, također su uključeni u hidroksilaciju masnih kiselina, što navodi na zaključak da je hidroksilacija masnih kiselina jedna od primitivnih funkcija enzima citokroma P450 (Nelson, 1998). Sudjelovanje CYP4 obitelji enzima u metabolizmu kolesterola sugerira na uključenost *cyp4* gena u održanje integriteta membrane rano u eukariotskoj povijesti (Nebert i Gonzalez, 1987).

Obitelj gena *cyp4* otkrivena je 1982. godine, kada su Orton i Parker kod štakora induciranog klofibratom uz porast veličine jetre zabilježili i rast aktivnosti  $\omega$  – hidroksilacije laurinske kiseline (Orton i Parker, 1982). Laurinska  $\omega$  – hidroksilaza inducirana klofibratom nazvana je CYP4A1, te je prvi puta izolirana iz štakora (Hardwick i sur., 1987). Kako je aminokiselinski slijed CYP4A1 posjedovao manje od 36 % identičnosti sa drugim CYP enzimima poznatim u to doba dodijeljeno mu je mjesto prvog člana nove genske obitelji (Nebert i Gonzalez, 1987). Danas je *cyp4* obitelj gena podijeljena u 72 podobitelji. Većina podobitelji nalazi se u beskralješnjacima, te je samo 7 podobitelji pronađeno kod kralješnjaka (Nelson, 2003, Baldwin i sur., 2009, Nelson, 2009). Detaljna evolucijska istraživanja *cyp* gena klana 4 iz 28 vrsta naznačuju veliko račvanje CYP4 obitelji na CYP4V i ostale CYP4 podobitelji kralješnjaka, CYP4A, B, F, T, X i Z (Kirischian i sur., 2011, Kirischian i Wilson, 2012) (Slika 9.). Podobitelj CYP4V jedina je podobitelj klana 4 podijeljena između kralješnjaka i beskralješnjaka (Nelson, 2009).

Nekoliko cDNA citokroma 4 (CYP4 cDNA) mekušaca već je klonirano te im je određen nukleotidni slijed. Do danas su identificirane višestruke izoforme *cyp4* gena kod slatkovodnih i morskih kolutićavaca i mekušaca, uključujući *Neathens virens* (pristupni broj: AAR88241), *Cyphoma gibbosum* (ACD75827), *Haliothis rufescens* (AAC32833). Vrlo malo se zna o nukleotidnim sljedovima i funkcijama CYP4 obitelji kod školjkaša, čak i unatoč identifikaciji nekoliko parcijalnih sljedova poput *Unio tumidus* (AAS01348), *Perna viridis* (ABZ81919) i *M. galloprovincialis* (AAC32835) (Snyder, 1998, Snyder, 2000, Chaty i sur., 2004).



**Slika 9.** Filogenetska analiza citokroma P450 obitelji 4. Prikaz evolucijskih odnosa između CYP4 podobitelji beskraljeznjaka i kraljeznjaka. Grane koje uključuju *cyp4* gene koji nisu dodijeljeni niti jednoj podobitelji označeni su CYP\*\*. *cyp4* geni *Drosophila melanogaster* koji predstavljaju 10 CYP4 podobitelji kukaca označeni su CYP\*\*\* (Preuzeto iz Kirischian i Wilson, 2012).

### 3.3.1 FUNKCIJA ENZIMA CITOKROMA P450 OBITELJI 4

#### 3.3.1.1 ULOGA OBITELJI CYP4 U PROLIFERACIJI PEROKSISOMA

Primarna funkcija CYP4 enzima kraljeznjaka  $\omega$  - hidroksilacija je zasićenih, razgranatih i nezasićenih masnih kiselina uključujući fiziološki važne signalne molekule poput eikozanoida, prostaglandina, leukotriena i arahidonske kiseline. Masne kiseline  $\omega$  - hidroksilirane CYP4 enzimima dodatno su metabolizirane citosolnim dehidrogenazama do dikarboksilnih kiselina koje su zatim metabolizirane peroksisomalnom  $\beta$  - oksidacijom. Naknadno, masne kiseline otpuštene nakon peroksisomalne  $\beta$  - oksidacije također mogu biti dodatno  $\omega$  - hidroksilirane CYP4 enzimima (Singh, 1997). Dikarboksilne kiseline srednjih i kratkih lanaca formirane kombinacijom mikrosomalne  $\omega$  - hidroksilacije i peroksisomalne  $\beta$  - oksidacije mogu biti izlučene urinom. Iako  $\omega$  - hidroksilacijski put razgradnje i eliminacije

masnih kiselina predstavlja 4 – 15 % ukupnog metabolizma masnih kiselina, njegova važnost drastično raste tijekom razdoblja povišene raspoloživosti slobodnih masnih kiselina (npr. razdoblje gladovanja, izloženost etanolu, proliferatorima peroksisoma, različita metabolička oboljenja) (Hardwick, 2008). Osim uloge u katabolizmu masnih kiselina, CYP4 enzimi također kataliziraju stvaranje  $\omega$  – hidroksiliranog metabolita arahidonske kiseline, 20 – hidroksieikozatetrenoinsku kiselinu (20 – HETE), koja regulira krvožilne i bubrežne funkcije (Roman, 2002).

Najviše su istraženi članovi podobitelji CYP4A zbog svoje indukcije proliferatorima peroksisoma, regulacije postom, visokomasnom dijetom, konzumiranjem alkohola i pojavom dijabetesa kod štakora. CYP4A podobitelj proteina pokazuje prednost prema metaboliziranju masnih kiselina srednje duljine lanca (C10 – C16), posebice tijekom razdoblja gladovanja te smanjenog unosa kalorija. Tada dolazi do velike indukcije *cyp4a* gena, koji ne samo da sprječavaju toksičnost lipida, već sudjeluju i u stvaranju nutrijenata za periferna tkiva tijekom gladovanja. Enzimi peroksisomalnog  $\beta$  – oksidacijskog sustava metaboliziraju  $\omega$  - hidroksilirane masne kiseline srednje duljine lanaca (dikarboksilne kiseline) do sukcinata i acetil CoA. Sukcinat je glukoneogeni prekursor, dok acetil CoA pretvoren u acetat služi kao izvor energije za periferna tkiva ili kao lipogeni prekursor za sintezu kolesterola u jetri. Dikarboksilne kiseline nastale  $\omega$  - hidroksilacijom masnih kiselina srednje duljine lanaca induciraju peroksisomalnu  $\beta$  - oksidaciju, ali ne i mikrosomalnu  $\omega$  - hidroksilaciju, što navodi na zaključak da ovaj oblik metabolizma masnih kiselina zahtijeva da indukcija CYP4A proteina prethodi indukciji peroksisomalnih enzima, poput acetil CoA oksidaze (Milton i sur., 1990, Bell i Elcombe, 1991). Dvostruko izlaganje štakora proliferatoru peroksisoma, klofibratu, i inhibitoru sinteze proteina, cikloheksimidu, nije spriječilo prepisivanje CYP4A1 mRNA, ali je spriječilo indukciju aktivnosti i *cyp4a1* i acil CoA oksidaza (Milton i sur., 1990). Kako indukcija prepisivanja CYP4A1 mRNA nije bila spriječena pod utjecajem klofibrata, za razliku od mRNA acetil CoA oksidaze, sugerirano je da je za indukciju acetil CoA oksidaze potreban protein, vjerojatno CYP4A. Navedeno istraživanje ukazuje da CYP4A  $\omega$  - hidroksilacijski put ima važnu ulogu u indukciji peroksisomalne  $\beta$  - oksidacije. Kod genetski modificiranog miša s inaktiviranim *ppar* genom (gen receptora proliferatora peroksisoma) došlo je do ukinuća indukcije jetrenog *cyp4a* gena kao i proliferacije peroksisoma (Waxman, 1999), što dokazuje važnu funkciju PPAR receptora. CYP4A također



kataliziraju hidroksilaciju arahidonske, laurinske i palmitinske kiseline, dok je hidroksilacija posljednje dvije uočena i od strane CYP4V proteina (Simpson, 1997, Hardwick, 2008).

Hiperglikemijski i adipokinetički hormoni kod insekata potiču pretvorbu metabolita pohranjenog masnog tkiva u cirkulirajuće metabolite. Kod žohara je u određenom stadiju gladovanja dokazano da HTH (hipertreolosemni) hormon uzrokuje povišenje aktivnosti CYP4C1 enzima (Bradfield i sur., 1991) te je naknadna aktivnost hormona HTH bila pod utjecajem enzima CYP4C1. Glavna uloga HTH hormona poticanje je glikogenolize masnog tkiva, kada dolazi do pretvorbe glikogena u trehlozu, glavni cirkulirajući ugljikohidrat kod insekata.

Podobitelj proteina CYP4B metabolizira masne kiseline kratkih lanaca (C7 – C10) te egzogene spojeve poput valproinske kiseline (C8), 3 – metilindola (C9) i nekoliko aromatskih amina. CYP4B1 visoko je eksprimiran u plućima i jetri gdje je dokazana njegova funkcija u aktivaciji pro- karcinogena. Pri smanjenoj opskrbi tkiva kisikom dolazi do velike indukcije *cyp4b1* gena, što objašnjava njegovu povišenu ekspresiju u tumorskim tkivima mokraćnog mjehura i pluća. Smatra se da  $\omega$  – hidroksilirani produkti kratkih lanaca masnih kiselina, pretvoreni u dikarboksilne kiseline, odlaze u mitohondrije na kompletnu  $\beta$  – oksidaciju. Potpuna oksidacija masnih kiselina kratkih lanaca povisuje razinu oksidativne fosforilacije te na taj način snabdijeva tkivo energijom potrebnom za popravak i proliferaciju (Hardwick, 2008).

CYP4F podobitelj proteina mnogo je raznovrsnija u svojim metaboličkim ulogama, pa je tako dokazana njena uloga u hidroksilaciji vrlo dugih lanaca masnih kiselina (C18 – C26), hidroksilaciji leukotriena, prostaglandina te vitamina s dugim bočnim alkilnim lancima. Za funkcije proteina podobitelji CYP4X i Z postoji vrlo malo istraživanja, no ekspresija gena *cyp4x* se povezuje s regijama na mozgu, dok je za gen *cyp4z* dokazana povišena ekspresija u tkivu raka dojke (pregledni rad Kirischian i Wilson, 2012).

### 3.3.1.2 UKLJUČENOST OBITELJI CYP4 U OTPORNOSTI NA SEKUNDARNE METABOLITE BILJAKA I INSEKTICIDE

Visoke aktivnosti enzima citokroma P450 kod herbivornih kukaca su povezane s njihovom ishranom biljkama koje sadrže visoku koncentraciju otrovnih sekundarnih metabolita. Aktivnost enzima citokroma P450 brzo se povisuje nakon unosa sekundarnih metabolita u

organizam te se nakon uklanjanja spornih spojeva iz prehrane brzo vraća na početnu razinu. Vrlo specifično povišenje (17x) aktivnosti enzima CYP4D10 vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) dokazano je uslijed izloženosti vinske mušice izokvinolinskim alkaloidu kaktusa (Danielson i sur., 1998). U gusjenicama (*Manduca sexta*) koje se hrane listovima duhana pronađena je povišena razina enzima CYP4M1 i M3, kao odgovor na prisutnost sekundarnog metabolita nikotina. Laboratorijske studije hranjenja morskog mekušca *Cyphoma gibbosum* žarnjacima (*Plexaura homomallia*) koji sadrže visoki udio toksičnih prostaglandina pokazale su povišenu aktivnost gena *cyp4bk* i *cyp4bl* (Whalen i sur., 2010).

Dokazano je da povišena ekspresija i aktivnost proteina citokroma P450 kao rezultat povišene transkripcije gena citokroma P450 kod kukaca otpornih na insekticide rezultira povišenim metabolizmom detoksifikacije insekticida kod kukaca (Gilbert, 2011). Rezultati istraživanja Gong i sur. (2013) na komarcima (*Culex quinquefasciatus*) izloženim permetrinu pokazali su povišenu regulaciju nekoliko gena citokroma P450: *cyp325 - k3v1*, - *g4*; *cyp4 - d42v2*, - *38*, - *h40*; *cyp9j45*. Istovremeno povišenje aktivnosti nekoliko proteina citokroma P450 (CYP4D4v2, CYP4G2, CYP6A38) također je dokazano nakon izloženosti muhe (*Musca domestica*) permetrinu (Zhu i sur., 2008). Povišena razina ekspresije nekoliko različitih proteina citokroma P450: CYP4C27, CYP4H15, CYP6Z1, CYP6Z2 i CYP12F1 dokazana je kod komarca (*Anopheles gambiae*) nakon izloženosti DDT-u (Chiu i sur., 2008). Rodovi vinske mušice (*D. melanogaster*) otporni na DDT pokazali su čak 50 puta veću bazalnu aktivnost citokroma P450 u odnosu na kontrolne uzorke. CYP4E2 *D. melanogaster* pokazao je i nekoliko puta veću ekspresiju u DDT otpornim rodovima u odnosu na kontrolne (Amichot i sur., 1998).

### 3.3.1.3 ULOGA OBITELJI CYP4 U DEGRADACIJI FEROMONA

Mirisni sustav kopnenih životinja specijaliziran je za detekciju feromona, hlapivih hidrofobnih supstrata. Enzimatska razgradnja mirisnih molekula biološka je potreba sprečavanja kontinuirane stimulacije osjetilnih živaca. Nekoliko „mirisnih“ enzima citokroma P450 identificirano je kod štakora, krave i zeca (Citirano iz Maïbèche-Coisne i sur., 2002). Kod kukaca su se istraživanja razgradnje mirisnih agenasa fokusirala na enzime koji razgrađuju mirise (ODE – eng, *odorant degrading enzymes*). U mirisnim i okusnim pupoljcima antena noćnog laptira (*Mamestra brassicae*) dokazana je povišena ekspresija CYP4L4 i CYP4S4 (Maïbèche-Coisne i sur., 2002). Smatra se da enzimi citokroma P450

transformiraju hidrofobne mirisne molekule u hidrofilne supstrate te na taj način potiču njihovu eliminaciju iz organizma te su ujedno odgovorni za brzi prekid mirisnog signala. U antenama hrušta (*Phyllopertha diversa*) također je citokrom P450 obitelji 4 (*cyp4aw1*) identificiran kao zaslužan u degradaciji feromona (Maïbèche-Coisne i sur., 2004).

#### 3.3.1.4 INDUKCIJA ENZIMA CYP4 KSENOBIOTICIMA

Izoenzimi citokroma P450 obitelji 4 osim obavljanja fiziološki važnih zadaća u organizmu (bazalna ekspresija) pokazuju i induciranu ekspresiju. Postoje podatci da je nakon izloženosti benzo( $\alpha$ )pirenu (BaP) došlo do povišene ekspresije *cyp4a* gena u stanicama jetre štakora. Razina CYP4F7 mRNA se nakon izloženosti BaP-u kod brancina smanjila i do 40 % (Sabourault i sur., 1999). Navedeni rezultati ukazuju na to da CYP4 enzimi različitih podobitelji pokazuju različite odgovore na izloženost PAH-ovima (policiklički aromatski ugljikovodici), što se može povezati s njihovom funkcijom. Različiti rezultati utjecaja PAH-ova na ekspresiju CYP4 izoformi također su uočeni i kod beskralješnjaka. Dokazana je 2.6x povišena ekspresija CYP4 izoformi kod mnogočetinaša *Nereis virens*, nakon izloženosti benz(a)antracenu, dok BaP nije imao nikakav utjecaj na ekspresiju *cyp4* gena *N. virens* (Rewitz i sur., 2004). Još jedan PAH, B-naftoflavon, pokazao je negativan trend na ekspresiju CYP4Y1 mRNA *M. galloprovincialis* (Snyder, 1998). Rezultati Miao i sur. (2011) pokazali su reduciranu ekspresiju CYP4 mRNA, u škragama i probavnoj žlijezdi školjkaša *Chlamys farreri* nakon izloženosti BaP-u. Suprotno tome, kod školjkaša *Ruditapes philippinarum* izloženost BaP-u je utjecala na povišenu ekspresiju CYP4 mRNA (Pan i sur., 2011). Također je dokazana ovisnost CYP4Y1 *M. galloprovincialis* o koncentraciji otopljenog kisika (DO), gdje je razina CYP4Y1 kod viših koncentracija DO bila značajno snižena (Snyder, 2000). Izloženost DMSO-u (dimetilsulfoksid) utjecala je na povišenu razinu CYP4A1 kod glodavaca, koji je reguliran aktiviranim receptorom proliferatora peroksisoma (PPAR), čija je mRNA (PPAR mRNA) također bila inducirana DMSO-om (Pauley i sur., 2002). Kukuruzno ulje sadrži visoku razinu C16 i C18 masnih kiselina, koji su dokazano supstrati i inducери CYP4 enzima kralješnjaka (Fisher i sur., 1998). Povišena razina ekspresije *cyp4* gena uočena kod jedinki *N. virens* injektiranih kukuruznim uljem i DMSO-om ukazuje da masne kiseline reguliraju CYP4 enzime, pokazujući sličnosti u regulatornim mehanizmima i funkciji CYP4 enzima *N. virens* i CYP4 enzima kralješnjaka (Rewitz i sur., 2004).

### 3.4 CITOKROM P450 KAO BIOMARKER ORGANSKOG ZAGAĐENJA OKOLIŠA

Organska zagađivala, poput produkata izgaranja, industrijskih, poljoprivrednih i drugih spojeva, neprestano ulaze u vodeni i kopneni okoliš te lako dospijevaju u tkiva rezidentnih organizama (Walker i Livingstone, 1992). Takvi spojevi uključuju alifatske ugljikovodike, policikličke aromatske ugljikovodike (PAH), poliklorobifenile (PCB), poliklorirane dibenzo – p – dioksine i dibenzofurane, tributiline (TBT), nitroaromate, ftalatne estere i organoklorine. Toksični spojevi u organizam mogu ući iz sedimenta, tla, vodenog stupca, atmosfere te preko hranidbenog lanca, a njihova koncentracija u organizmu ovisi o biodostupnosti i lipofilnosti samog spoja, te o kapacitetu organizma da ga metabolizira i/ili ukloni iz organizma. Slabo metabolizirajuća onečišćivala, poput PCB-a, u najvišim koncentracijama se nakupljaju u tkivima kralješnjaka na samom vrhu hranidbenog lanca, dok se brzo metabolizirajuća onečišćivala, poput PAH-ova, u najvećoj koncentraciji nalaze u tkivima organizama pri samom dnu hranidbenog lanca, u beskralješnjacima kod kojih nivo unosa prelazi razinu biotransformacije (Livingston, 1994).

Potreba za otkrivanjem i procjenom utjecaja zagađenja (posebice niskih koncentracija složenih mješavina spojeva) na kvalitetu okoliša dovela je do razvoja molekularnih markera biološkog učinka (biomarkera) onečišćivala na organizme (Haux, 1988, McCarthy i Shugart, 1990, Livingstone, 1993). Inducirana sinteza enzima citokroma P450 CYP1A koristi se kao biomarker izloženosti organskim onečišćivalima, gdje su poglavito zastupljena istraživanja na ribama i nižim kralješnjacima. Bit molekularnih biomarkera poput CYP1A je specifičnost, tj. da se povišena sinteza enzima pojavljuje isključivo kao odgovor na izloženost organskim onečišćivalima. Budući se interakcije onečišćenja i organizma inicijalno događaju na molekularnom nivou, važno obilježje povišene sinteze enzima CYP1A je da se ono koristi kao rani pokazatelj izloženosti organskim onečišćivalima (Livingston, 2002).

U sedamdesetim i osamdesetim godinama 20. stoljeća se do dokaza o povišenoj sintezi enzima CYP1A dolazilo uz pomoć tri osnovene metode: mjerenjem katalitičke aktivnosti (Burke i Mayer, 1974, Klotz i sur., 1984), imunokemijskim analizama (Goksoyr, 1985) te detekcijom sinteze mRNA uz korištenje komplementarne DNA, cDNA (Heilmann, 1988). Mjerenja katalitičke aktivnosti mjerenja su aktivnosti enzima CYP1A (tj. nivoa pretvorbe supstrata). Prva metoda detekcije aktivnosti enzima CYP1A uključivala je mjerenja

hidroksilacije benz(a)pirena (BaP) (BAH ili AHH test). Etoksirezorufin O–deetilaza (EROD) još je jedan test mjerenja katalitičke aktivnosti enzima CYP1A. Iako etoksirezorufin nije prirodni spoj, test katalitičke aktivnosti EROD–a vrlo je specifičan za enzim CYP1A. Katalitičke aktivnosti AHH i EROD–a se kod netretiranih organizama javljaju u vrlo niskim, ponekada nemjerljivim razinama, no kod organizama tretiranih ugljikovodičnim spojevima pokazuju visoku inducibilnost. Pročišćavanje CYP1A proteina (Williams i Buhler, 1983, Goksoyr, 1985) omogućilo je proizvodnju poliklonalnih i monoklonalnih antitijela koja su se koristila za izravno mjerenje nivoa enzima uz pomoć „Western blot“ tehnike te imunokemijske analize „ELISA“ (Stegeman, 1989, Goksoyr i sur., 1991). Izravno mjerenje samog enzima putem imunokemijskih metoda ima prednost u odnosu na mjerenje katalitičke aktivnosti gdje uslijed pripreme uzorka može doći do degradacije enzima, degradacije enzima proteazama itd. Antitijela detektiraju kako aktivne tako i degradirane enzime, dok analiza katalitičke aktivnosti zahtjeva enzimsku aktivnost. Helimann i sur. (1988) su iz hemocita Kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) klonirali te odredili nukleotidni slijed citokroma P450 inducirano PAH-om. Ovo istraživanje je potvrdilo da je citokrom P450 induciran PAH-om iz Kalifornijske pastrve član genske obitelji citokroma P450 CYP1A. CYP1A cDNA proba hibridizirala je sa genomskom DNA pastrve te također sa mRNA induciranih hemocita pastrve.

### **3.4.1 POTENCIJAL CYP1A ENZIMA KAO BIOMARKERA KOD MORSKIH BESKRALJEŠNJAKA**

Iako do sedamdesetih godina 20. stoljeća sustav miješanih oksidaza (MFO) nije potvrđen u mekušcima (Lee i sur., 1972, Payne, 1977), od tada su enzimi citokroma P450, kao sastavni dijelovi MFO sustava, identificirani u brojnim vrstama beskralješnjaka pa tako i mekušaca. Nivo citokroma P450 i aktivnost MFO sustava kod morskih je beskralješnjaka najviša u endoplazmatskom retikulumu probavne žlijezde, glavnom mjestu za metabolizam ksenobiotika (Livingstone, 1991). Katalitičku aktivnost EROD–a, karakterističnog za CYP1A kralješnjaka, nije bilo moguće detektirati u mikrosomima beskralješnjaka, ili je bila prisutna na vrlo niskoj razini (Stegeman, 1985). Za razliku od EROD–a, katalitička BPH aktivnost kod beskralješnjaka je prepoznatljiva (Livingston, 1994). Također su dokazane i sezonske varijacije u BPH aktivnosti kod školjkaša *M. edulis* izloženog dizel gorivu (Livingstone, 1987). Najjači dokaz o postojanju izoenzima citokroma P450 kod mekušaca dala je

hibridizacijska studija na ukupnoj RNA probavne žlijezde *M. edulis* sa cDNA probom CYP4A1 štakora, koja je ukazala na prisutnost CYP4A1 izoenzima kod beskralješnjaka (Spry JA, 1989). Ovaj izoenzim kod štakora uključen je u endogeni metabolizam masnih kiselina, te se smatra drevnim citokromom P450 razvijenim prije 800 ili više milijuna godina (Nelson i Strobel, 1987). Specifične dokaze o prisutnosti enzima, sličnog enzimu CYP1A, kod mekušaca dale su i imunokemijske studije u kojima su dokazani i) epitopi u mikrosomima *M. edulis* i *M. galloprovincialis* na poliklonalna CYP1A antitijela grgeča (Porte i sur., 1995), ii) epitopi u *M. edulis* na CYP1A, 2B, 2E, 3A, 4A antitijela sisavaca i riba (Peters i sur., 1998b). Ekspresija gena, sličnog genu *cyp1a*, u *M. edulis* dokazana je uz korištenje početnica očuvane regije *cyp1a* gena Kalifornijske pastrve i ukupne RNA *M. edulis*. Umnažanje slijeda cDNA *M. edulis* rezultiralo je dvijema vrpcom u agaroznom gelu (220 pb i 280 pb), a naknadna hibridizacija tehnikom bugaćenja po Southernu rezultirala je hibridizacijom cDNA CYP1A probe pastrve s 280 pb vrpcom u agaroznom gelu (Wootton i sur., 1996). Dakako, važno je napomenuti da nepobitnih dokaza i stvarnih informacija o postojanju i identifikaciji citokroma P450 obitelji 1 (poput CYP1A kralješnjaka) kod beskralješnjaka još uvijek nema. Kao dokazi o prisustvu gena ili proteina citokroma P450 kod beskralješnjaka koristila su se CYP antitijela i CYP cDNA probe kralješnjaka. Interpretacija ovih podataka vrlo je rizična, prvenstveno iz razloga niske aminokiselinske sličnosti proteina citokroma P450 kralješnjaka i beskralješnjaka. Potreban je veliki oprez i u interpretaciji rezultata imunokemijskih studija s antitijelima sisavaca i kralješnjaka zbog mogućeg međudjelovanja CYP1A antitijela s proteinima mekušaca koji nisu proteini citokroma P450, ili zbog niske enzimatske aktivnosti s poznatim supstratima za citokrome P450 kralješnjaka (Livingstone, 1991, Peters i sur., 1998a, Livingstone i sur., 2000, Snyder, 2000, Shaw i sur., 2004). Smatra se da je CYP1 obitelj specifična za kralješnjake, a da je metabolizam ksenobiotika kod beskralješnjaka preuzela obitelj proteina CYP4. Rezultati istraživanja *cyp4* gena *D. melanogaster* ukazala su na uključenost *cyp4d10* gena u otpornost na insekticide, te ujedno njegovu indukciju fenobarbitalom i alkaloidima (Danielson i sur., 1998) te je ovo istraživanje predložilo izoforme enzima CYP4 kao odgovorne za metabolizam ksenobiotika kod beskralješnjaka. Štoviše, završetkom genomskog projekta *D. melanogaster* identificirana su 83 funkcionalna *cyp* gena, od kojih niti jedan ne pripada obitelji enzima CYP1. Većina *cyp* gena vinske mušice definirani su kao članovi genskih obitelji CYP4 i CYP6.

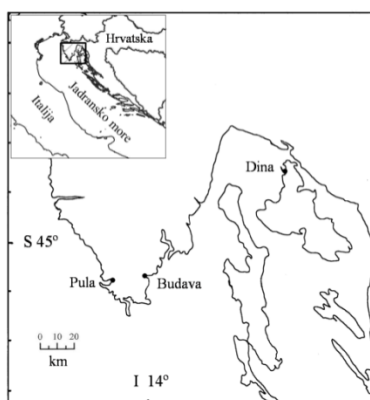
## 4. MATERIJALI I METODE

---

## 4 MATERIJALI I METODE

### 4.1 PODRUČJE ISTRAŽIVANJA I UZORKOVANJE ŠKOLJKAŠA

Uzorci dagnji, *M. galloprovincialis* Lamarc 1819, sakupljeni su od rujna 2011. godine do srpnja 2012. godine, na tri odabrane postaje u sjevernom Jadranu: Pula, Budava i Dina (Slika 10.). Po deset jedinki dagnji prosječne mase ( $10 \pm 2$  g) i duljine ( $4 \pm 1$  cm), uzorkovane su iz prirodnih staništa svaki drugi mjesec. Mjesto uzorkovanja Pula (S 44°53'; I 13°51') nalazi se na zapadnoj obali istarskog poluotoka, u unutarnjem dijelu luke grada Pule. U neposrednoj blizini visoko urbaniziranog područja i industrijskih postrojenja mjesto uzorkovanja Pula pod utjecajem je mješavine onečišćivala porijeklom iz komunalnih ispusta i brodogradilišta Uljanik. Mjesto uzorkovanja Budava (istočna obala istarskog poluotoka; S 44°54'; I 13°59') udaljeno je od naseljenih mjesta, zaklonjeno od udara vjetrova, ima dotok slatke vode te druge povoljne uvjete za razvoj marikulture (nezagađeno mjesto uzorkovanja). Mjesto uzorkovanja Dina (S 45°13'; I 14°32') nalazi se na otoku Krku, u blizini Petrokemijske industrije. Prema izvješću Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije nije utvrđen utjecaj ispuštanja otpadnih voda petrokemije na kvalitetu morske vode i sedimenta („Izvještaj o praćenju utjecaja objekta DINA – petrokemija d.d. Omišalj na okoliš 2008. godine“), te se prema tome ovo mjesto uzorkovanja smatra nezagađenim. Jedinke su nakon uzorkovanja, u spreminicima s morskom vodom, prenešene u laboratorij gdje se unutar jednog sata od uzorkovanja pristupilo izolaciji ukupne RNA.



**Slika 10.** Mjesta uzorkovanja dagnje, *Mytilus galloprovincialis*, u sjevernom Jadranu (•).



## 4.2 IZOLACIJA UKUPNE RNA

U svrhu identifikacije eksprimiranog produkta gena izolirana je ukupna RNA, čemu je prethodilo seciranje i izolacija probavne žlijezde iz dagnje. 100 mg tkiva probavne žlijezde dagnje uronjeno je u tekući dušik (LN<sub>2</sub>), nakon čega je pomoću TRI Reagent® Solution (Ambion, USA) izolirana ukupna RNA. Tkivo svake jedinke je iz tekućeg dušika preneseno u 1.5 mL tubicu s 1 mL TRI Reagent® otopine, nakon čega su uzorci homogenizirani na ledu u trajanju od 60 sekundi. Nakon dodatka 200 µL kloroforma, te inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 3 minute, uzorci su centrifugirani na 11 900 g; 4°C; 15 minuta. Nakon centrifugiranja otopina se podijelila na organsku (talog) i vodenu fazu (supernatant). Vodena faza, u kojoj se nalazi RNA, prebačena je u novu 1.5 mL tubicu u koju je dodano 500 µL ledeno hladnog izopropanola (-20°C). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta uslijedilo je centrifugiranje na 11 900 g; 4°C; 10 minuta. Kao rezultat centrifugiranja u talogu je dobivena čista RNA, koja je zatim isprana sa 70 % etanolom (750 mL), pri čemu je uslijedilo centrifugiranje na 7500 g; 4°C; 5 minuta. Nakon dekantiranja supernatanta talog je osušen na zraku u trajanju od 15 minuta. Osušeni talog otopljen je u 70 µL vode slobodne od RNaza (RNase free water). Za otapanje taloga korišten je termoblok (Thermomixer 5437, Eppendorf) u trajanju od 10 minuta na 60°C. Uzorci otopljene RNA spremjeni su na -80°C preko noći.

## 4.3 ANALIZA KVALITETE IZOLIRANE RNA

Količina, čistoća te integritet izolirane RNA provjereni su vizualno (elektroforeza na 1 % agaroznom gelu) te mjerenjem UV apsorpcije (NanoPhotometer™ Pearl, Implen, Germany). Elektroforeze su vođene u TAE puferu (40 mM TRIS, 20 mM ledena octena kiselina, 1 mM EDTA pH 8.0) u gelovima koncentracije 1 %, pri konstantnom naponu od 100 V u trajanju od 30 minuta. Gelovi su potom inkubirani u otopini etidij bromida koncentracije 2 mg/L u trajanju od 15 minuta, te ispirani u destiliranoj vodi također u trajanju od 15 minuta. Gelovi su pregledani pod UV svjetlom (312 nm) i fotografirani digitalnim sustavom za dokumentaciju. Količina i čistoća izolirane ukupne RNA određene su i spektrofotometrijski, mjerenjem apsorpcije na 230, 260 i 280 nm. Omjeri apsorpcija A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> i A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> korišteni su za procjenu čistoće izolirane RNA. Količina ukupne RNA određena je po formuli:

$$A_{260} = 1 = 40\mu g \frac{RNA}{mL}$$

## 4.4 BRZO UMNAŽANJE KRAJEVA KOMPLEMENTARNE DNA (cDNA) – RACE-PCR

U svrhu dobivanja pune duljine komplementarne DNA (cDNA) gena *cyp4* korištena je tehnika 3' i 5' RACE-PCR, koja se izvodila na ukupnoj RNA prema protokolu proizvođača (GeneRacer™Kit, Invitrogen, USA) uz male izmjene. Specifične CYP4 početnice (Frace, Rrace; Tablica 1.) dizajnirane su prema poznatom parcijalnom nukleotidnom slijedu *cyp4y1* dagnje, *M. galloprovincialis* (AF072855.1).

Tablica 1. Slijedovi početnica korištenih za identifikaciju, umnažanje i sekvenciranje CYP4 gena

Početnica	5' – 3' slijed
Frace	CAGAATATCAGAAAATGTGTCAGAATGAA
Rrace	GGAGACCATATATGTTGATACCGAAAA
R2	AAGAGTCCATCTTTGTAGCATTG
3-1	GTTCCTTTCTGCGTTTTGC
5-1	GGCGAACATAAGCTTTTTGTC
GeneRace™ 3'Primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG
GeneRace™ 5'Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
pUC/M13 forward	CCCAGTCACGACGTTGTA AAAACG
pUC/M13 reverse	AGCGGATAACAATTCACACAGGAA

### 4.4.1 UMNAŽANJE 3' KRAJA CDNA GENA *cyp4*

Za umnažanje 3' kraja cDNA gena *cyp4* korištena je ukupna RNA koncentracije 1 µg/µL. Reverznom prepisivanju ukupne RNA prethodila je ligacija ukupne RNA (1 µg/µL) sa sintetskom GeneRacer™ oligo dT početnicom (50 µM) u reakcijskoj smjesi koja je uz sterilnu vodu sadržavala i 0.5 mM mješavinu nukleotida. Nakon inkubacije pri 65°C u trajanju od 5 minuta, reakcijska smjesa je ohlađena na ledu te lagano centrifugirana. Nakon ligacije ukupne RNA na sintetsku početnicu pristupilo se reverznom prepisivanju ukupne RNA u reakcijskoj smjesi sadržaja: 13 µL ligirane RNA, 4 µl 5X pufera, 1 µl 0.1 M DTT-a, 1 µl RNase out (40 U/µl), 1 µl Superscript III RT (200 U/µl). Nakon laganog centrifugiranja uslijedila je inkubacija reakcijske smjese pri 50°C u trajanju od 60 minuta. Reakcija reverznog prepisivanja prekinuta je zagrijavanjem reakcijske smjese pri 70°C u trajanju od 15 minuta, nakon čega je uslijedilo brzo hlađenje na ledu (2 minute) i lagano centrifugiranje. Dodatkom RNaze H (2U) u reakcijsku otopinu, uslijedila je inkubacija pri 37°C u trajanju od 20 minuta, pri čemu su specifično uklonjene molekule RNA još uvijek vezane za novosintetizirani lanac

cDNA gena *cyp4*. Reverzno prepisani 3' kraj cDNA gena *cyp4* spremljen je na -20°C do daljnje analize. Fragment 3' kraja cDNA gena *cyp4* umnožen je lančanom reakcijom polimeraze (PCR – eng. *polymerase chain reaction*), prilikom čega je korištena specifična Rrace i GeneRacer™ 3' početnica (Tablica 1.). Ukupni volumen reakcijske otopine za PCR bio je 50 µL. Sastav PCR otopine konačnog volumena 50 µl: 1 µl 3' cDNA, 1x pufer za PCR, 3 µl Rrace, 1 µl GeneRacer™, 0.2 mM mješavina nukleotida, 0.05 U enzima Taq polimeraze, 3 mM MgCl<sub>2</sub>. Odsječci su umnoženi u termo bloku C1000™ Thermal Cycler (BioRad, USA), pod programom: 94°C, 2'; 10 ciklusa 94°C, 30", 65°C, 30", 72°C, 1'; 15 ciklusa 94°C, 30", 62°C, 30", 72°C, 1'; 10 ciklusa 94°C 30", 58°C 30", 72°C, 1'; 72°C, 10'. Produkt PCR umnažanja 3' kraja cDNA gena *cyp4* analiziran je elektroforezom na 1 % agaroznom gelu, nakon čega je pročišćen iz gela uz pomoć MinElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany), po protokolu proizvođača.

#### 4.4.2 UMNAŽANJE 5' KRAJA CDNA GENA *cyp4*

Za umnažanje 5' kraja cDNA gena *cyp4* korištena je ukupna RNA koncentracije 1 µg/µL. Za uklanjanje 5' fosfata u ukupnoj RNA korištena je CIP fosfataza, nakon čega je uklanjana 5' struktura kape, čime su ostvareni uvjeti za ligaciju. Nakon ligacije dekapirane mRNA na sintetski GeneRacer™RNA Oligo uslijedilo je reverzno prepisivanje cDNA korištenjem CYP4 specifične početnice R2 (Tablica 1.) u reakcijskoj smjesi koja je uz sterilnu vodu sadržavala i 0.5 mM mješavinu nukleotida. Nakon inkubacije pri 65°C u trajanju od 10 minuta, reakcijska smjesa je kratko ohlađena na ledu i lagano centrifugirana. Nakon ligacije ukupne RNA na sintetsku početnicu, ukupna RNA je reverzno prepisana u reakcijskoj smjesi sadržaja: 13 µL ligirane RNA, 4 µl 5X pufera, 1 µl 0.1 M DTT-a, 1 µl RNase out (40 U/ µl), 1 µl Superscript III RT (200 U/µl). Uslijedila je daljna obrada jednakom metodom kao nakon reverznog prepisivanja 3' kraja cDNA gena *cyp4*, uz izmjenu inkubacije reakcijske smjese pri 55°C. Fragment 5' kraja cDNA gena *cyp4* umnožen je lančanom reakcijom, prilikom čega je korištena specifična Rrace i GeneRacer™ 5' početnica (Tablica 1.). Ukupni volumen reakcijske otopine za PCR bio je 50 µL. Sastav PCR otopine konačnog volumena 50 µl: 1 µl 5' cDNA, 1x pufer za PCR, 3µl Rrace, 1 µl GeneRacer™, 0.2 mM mješavina nukleotida, 0.05 U enzima Taq polimeraze, 3 mM MgCl<sub>2</sub>. Odsječci su umnoženi u termo bloku C1000™ Thermal Cycler (BioRad, USA), pod programom: 94°C, 3'; 5 ciklusa 94°C, 30", 65°C, 30", 72°C, 1'30"; 10 ciklusa 94°C, 30", 62°C, 30", 72°C, 1'30"; 10 ciklusa 94°C 30", 60°C, 30",

72°C, 1'30"; 5 ciklusa 94°C 30", 58°C, 30", 72°C, 1'30"; 72°C, 10'. Produkt PCR umnažanja 5' kraja cDNA gena *cyp4* analiziran je elektroforezom na 1 % agaroznom gelu, čemu je uslijedilo njegovo pročišćavanje iz gela uz pomoć MinElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany), po protokolu proizvođača.

#### 4.5 BAKTERIJSKO UMNAŽANJE 3' I 5' FRAGMENTA GENA *cyp4*

Nakon pročišćavanja produkata PCR - reakcija 3' i 5' kraja cDNA gena *cyp4* (MinElute™ Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany), uslijedila je njihova ligacija u pGEM - T easy vektor pomoću enzima T4 DNA ligaze, sastavnog dijela kompleta „pGEM® - T easy Vector System“ (Promega, USA). Sastav ligacijske smjese: 2X ligacijski pufer 5 µL, pGEM T easy vektor 1 µL, T4 DNA ligaza 1 µL, pročišćeni PCR produkt 3 µL. Ligacijske smjese su nakon miješanja pipetiranjem inkubirane 2 sata na sobnoj temperaturi.

Tijekom istraživanja korišteni su komercijalni sojevi kemijski kompetentnih „*Subcloning Efficiency DH5α Chemically Competent Cells*“ (Invitrogen, USA) bakterijskih stanica. Transformacija je provedena prema uputama proizvođača. Bakterijske stanice uzgajane su preko noći u tekućoj i/ili na krutoj hranjivoj podlozi. Tekuća hranjiva podloga sadržavala je (po litri): 10 g triptona, 50 g kvašćevog ekstrakta, 10 g NaCl, uz dodatak ampicilina (finalne koncentracije 100 µg/mL). Kruta hranjiva podloga bila je istog sastava uz dodatak 20 g agara/L. Za plavo – bijeli probir klonova korišteni su IPTG (isopropyl β – D – 1 – thiogalactopyranoside) kao induktor i X – Gal (5 – bromo – 4 – chloro – 3 – indolyl – β – d – galactopyranoside) kao supstrat (Applichem, Germany). Nanešeno je po 100 µL 100 mM IPTG i 20 µL X – Gal (20 mg/ mL) po ploči. Uzgoj je trajao preko noći na 37°C. Pozitivni klonovi, tj. klonovi sa ugrađenim insertom, također su identificirani i PCR probiranjem korištenjem vektor specifičnih početnica (pUC/M13 forward, pUC/M13 reverse, Tablica 1.).

#### 4.6 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA

U svrhu izolacije plazmidne DNA uzgojene stanice bakterija su centrifugirane na 16 600 g u trajanju od 1 minute. Talog stanica je resuspendiran u 100 µL hladnog Glc – TE pufera (50 mM glukoza, 25 mM Tris – HCl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8)) te je inkubiran 1 – 2 minute na sobnoj temperaturi. Nakon dodatka 200 µL lužnatog SDS-a sobne temperature (0.2 M NaOH, 1% SDS) i miješanja suspenzije, smjesa je inkubirana u ledu u trajanju od 5 minuta. Uslijedio je dodatak 150 µL hladne 3M KAC otopine (30 mL 5M Kac, 5.75 mL ledene octene

kiseline, 14.25 mL destilirane H<sub>2</sub>O, pH 4.8), miješanje i ponovna inkubacija u ledu u trajanju od 5 minuta. Suspenzija je centrifugirana na 16 600 g u trajanju od 10 minuta. Supernatant je prebačen u novu 1.5 mL tubicu uz dodatak 450 µL ledeno hladnog izopropanola te je inkubiran na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta. Nakon još dva centrifugiranja na 16 600 g u trajanju od 10 minuta, između kojih je talog plazmida ispran s 500 µL 70 % etanola, talog je otopljen u 50 µL mqH<sub>2</sub>O. Koncentracija izolirane plazmidne DNA procijenjena je uporabom NanoPhotometer<sup>TM</sup>Pearl (Implen, Germany).

#### 4.7 ODREĐIVANJE PRIMARNE STRUKTURE DNA

Slijed nukleotida kloniranih odsječaka DNA 3' i 5' kraja gena *cyp4* određen je (sekvenciran) u servisima ustanove Macrogen (Macrogen Inc., Korea) na ABI3730XL DNA Analyzer uređaju. Prilikom očitavanja nukleotidnog slijeda iz 3' i 5' smjera korištene su komercijalno dostupne plazmidne početnice pUC/M13 forward (F), pUC/M13 reverse (R) (Tablica 1.). Očitani sljedovi 3' i 5' kraja cDNA gena *cyp4* omogućili su identifikaciju inicijacijskog i terminacijskog kodona gena *cyp4*.

#### 4.8 UMNAŽANJE PUNE DULJINE CDNA GENA *cyp4*

Identifikacija inicijacijskog i terminacijskog kodona gena *cyp4* omogućila je dizajniranje početnica za umnažanje pune duljine cDNA gena *cyp4*. Početnice su sintetizirane u servisima Sigma – Aldrich (St. Louis, USA). Ukupna RNA je izolirana iz jedinki dagnji prikupljenih na tri odabrane lokacije. Po jedinci dagnje rađena je jedna izolacija ukupne RNA. Po jednom uzorku ukupne RNA rađena je jedna sinteza prvog lanca cDNA. Korištenjem ukupne RNA, oligo dT i heksamernih početnica, a uz pomoć enzima reverzne transkriptaze, po protokolu proizvođača je sintetiziran prvi lanac komplementarne DNA (cDNA) (Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit, Roche). Puna duljina gena *cyp4* umnožena je PCR reakcijom prilikom čega su korištene početnice dizajnirane da obuhvaćaju punu duljinu CYP4 cDNA (5 – 1, 3 – 1, Tablica 1.). Ukupni volumen reakcijske otopine za PCR bio je 25 µL. Sastav PCR otopine konačnog volumena 25 µl: 1 µL cDNA, 2.5 µL pufera (Thermo Scientific, USA), 0.5 µL 5 – 1 (Sigma – Aldrich), 0.5 µL 3 – 1 (Sigma – Aldrich), 1 mM mješavina nukleotida (Fermentas, Thermo Scientific, USA), 0.02 U enzima Taq polimeraze, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, USA). Odsječci su umnoženi u termo bloku C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BioRad, USA), pod programom: 94°C, 2'; 30 ciklusa 94°C, 30", 52°C, 30", 72°C, 1'40"; 72°C, 10'. Produkti PCR umnažanja pune duljine CYP4 gena analizirani su elektroforezom na 1 %

agaroznom gelu, nakon čega su pročišćeni iz gela uz pomoć MinElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany), po protokolu proizvođača. Pročišćeni produkti PCR reakcija umnažanja pune duljine cDNA gena *cyp4* ligirani su u plazmidne vektore. Nakon transformacije bakterije *E. coli* i uzgoja bakterijskih stanica izolirani su plazmidi sa punom duljinom gena *cyp4* kao insertom. Navedeni koraci manipulacije produktima PCR reakcija već su opisani u odjeljcima 4.5 – 4.7.

## 4.9 RAČUNALNE ANALIZE NUKLEOTIDNIH SLIJEDOVA

U svrhu umažanja odsječaka DNA pristupilo s ručnom dizajnanju početnica. Početna obrada nukleotidnih slijedova 3' i 5' kraja gena *cyp4* te sravnjenje napravljeni su uz pomoć algoritma MUSCLE, implementiranog u program MEGA 5 (Tamura i sur., 2011). Određivanje pravog okvira čitanja gena *cyp4* određeno je uz pomoć NCBI ORF pretraživača (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

Obrada nukleotidnih slijedova pune duljine cDNA gena *cyp4*, sravnjenje, obilježavanje pojedinih segmenata, te pretraživanje slijedova u odnosu na substrukture, ponavljanja i različite motive također je napravljeno uz pomoć programa MEGA 5. Određivanje konsenzusnog slijeda za pojedine skupine slijedova napravljeno je u programu ClustalW 2.12. Pretraga homolognih regija nukleotidnih i izvedenih proteinskih slijedova *cyp4* gena ostvarena je preko BLAST servisa NCBI baze podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Identificirani i sekvencirani slijedovi *cyp4* gena poslani su Odboru za imenovanje P450 gena (P450 Nomenclature committee) te su također pohranjeni u GenBank bazu podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

### 4.9.1 NOMENKLATURA IDENTIFICIRANIH GENA *cyp4*

Bazirano na aktualnim pravilima nomenklature citokroma P450, proteini koji dijele 40 % identičnosti dodjeljeni su istoj obitelji; proteini koji dijele  $\geq 55$  % identičnosti grupirani su unutar iste podobitelji; genske varijante (aleli) istog gena posjeduju  $\leq 3$  % različitosti, osim u slučaju dokazane funkcionalne različitosti (katalitička aktivnost) (Nelson, 2006). Navedena pravila uvažena su kod klasifikacije CYP4 slijedova identificiranih u dagnji, *M. galloprovincialis*. Klasifikacija identificiranih CYP4 slijedova napravljena je filogenetskom analizom metodom najveće vjerojatnosti (eng. *Maximum Likelihood method*). Za filogenetsku

analizu korišteno je višestruko sravnjenje 14 aminokiselinskih sljedova provedeno uz pomoć bioinformatičkog računalnog programa ClustalW.

#### 4.9.2 IDENTIFIKACIJA MJESTA ZA PREPOZNAVANJE SUPSTRATA

CYP4Y proteinski slijedovi *M. galloprovincialis* sravnjeni su s karakteriziranim hidroksilazama masnih kiselina kralješnjaka u svrhu definiranja moguće funkcije i asortimana supstrata za CYP4Y oblike uspoređivanjem ključnih očuvanih ostataka između grupa. CYP4Y proteinski slijedovi *M. galloprovincialis* također su sravnjeni s koordinatama kristalne strukture CYP102 bakterijske hidroksilaze masnih kiselina (CYPBM3) (Ravichandran i sur., 1993) i CYP4 oblicima opisanim u (Whalen i sur., 2010) u svrhu boljeg definiranja SRS domena, te bolje vizualizacije razlika prisutnih u aktivnim mjestima i regijama prepoznavanja supstrata između CYP4Y oblika *M. galloprovincialis*. Bakterijski CYP102 korišten je kao kalup za sravnjenje genskih grupa podobitelji CYP4Y *M. galloprovincialis* (CYP4Y1 – Y7). Dodatno, u višestruko sravnjenje uključeni su i CYP4F3 i CYP4F11 proteini čovjeka te CYP4A4, CYP4A5, CYP4A6, CYP4A7 zeca kao pomoć u usporedbi već određenih aktivnih ostataka hidroksilaza masnih kiselina sisavaca i CYP4Y proteinskih slijedova *M. galloprovincialis*. Bakterijski CYP102 poslužio je kao kalup za identifikaciju SRS domena unutar CYP4Y proteina *M. galloprovincialis*. Što se tiče strukturno neočuvanih regija, ako se duljina strukturno neočuvane regije CYP4Y slijeda poklopila s identičnom regijom slijeda CYP102, koordinate CYP102 su korištene i kod CYP4Y slijedova. Za višestruko sravnjenje pune duljine izvedenih CYP4Y proteinskih slijedova *M. galloprovincialis* i CYP102 te nekoliko CYP4 proteinskih slijedova sisavaca čiji su SRS ranije determinirani korišten je program ClustalX (Gotoh, 1992, Loughran i sur., 2000, Kalsotra i sur., 2004). Sravnjenja su vizualizirana u programu BioEdit 7.2.0. (Hall, 1999) te su SRS regije proteinskih slijedova *M. galloprovincialis* generirane kopiranjem koordinirane osi SRS regija CYP102.

#### 4.9.3 FILOGENETSKA ANALIZA

Filogenetski odnosi klonova gena *cyp4* identificiranih na različitim lokacijama analizirani su metodom najveće vjerojatnosti (ML) s izračunom 1000 mjera stalnosti (eng. *bootstrap*). U svrhu određivanja pripadnosti identificiranih CYP4 slijedova pristupilo se višestrukum sravnjenju CYP4 izvedenih proteinskih slijedova s reprezentativnim proteinskim slijedovima

drugih CYP obitelji proteina. Višestruko sravnjenje kreirano je uz pomoć programa ClustalW 2.12. Reprezentativni proteinski CYP1, CYP2, CYP3 i CYP4 sljedovi preuzeti su iz baze podataka GenBank i Ensembl.

Da bi se pokazao odnos identificiranih *cyp4* gena s genima *cyp4* podobitelji drugih organizama također se pristupilo višestrukom sravnjenju uz pomoć programa ClustalW 2.12. Reprezentativni proteinski CYP4 sljedovi drugih organizma preuzeti su sa Cytochrome P450 Homepage (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>).

Sve filogenetske analize potrebne za kreiranje filogenetskih stabala provedene su korištenjem programa MEGA 5.



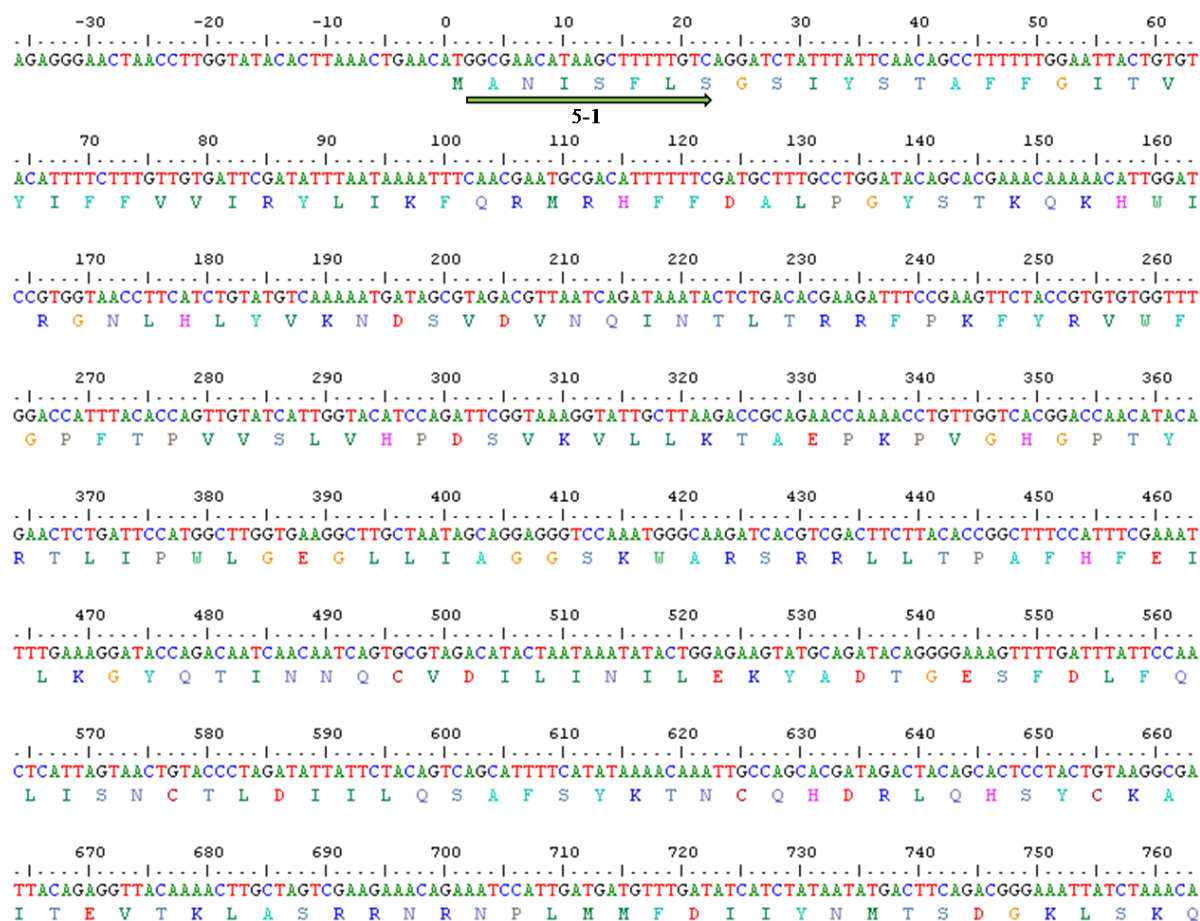
## 5. REZULTATI

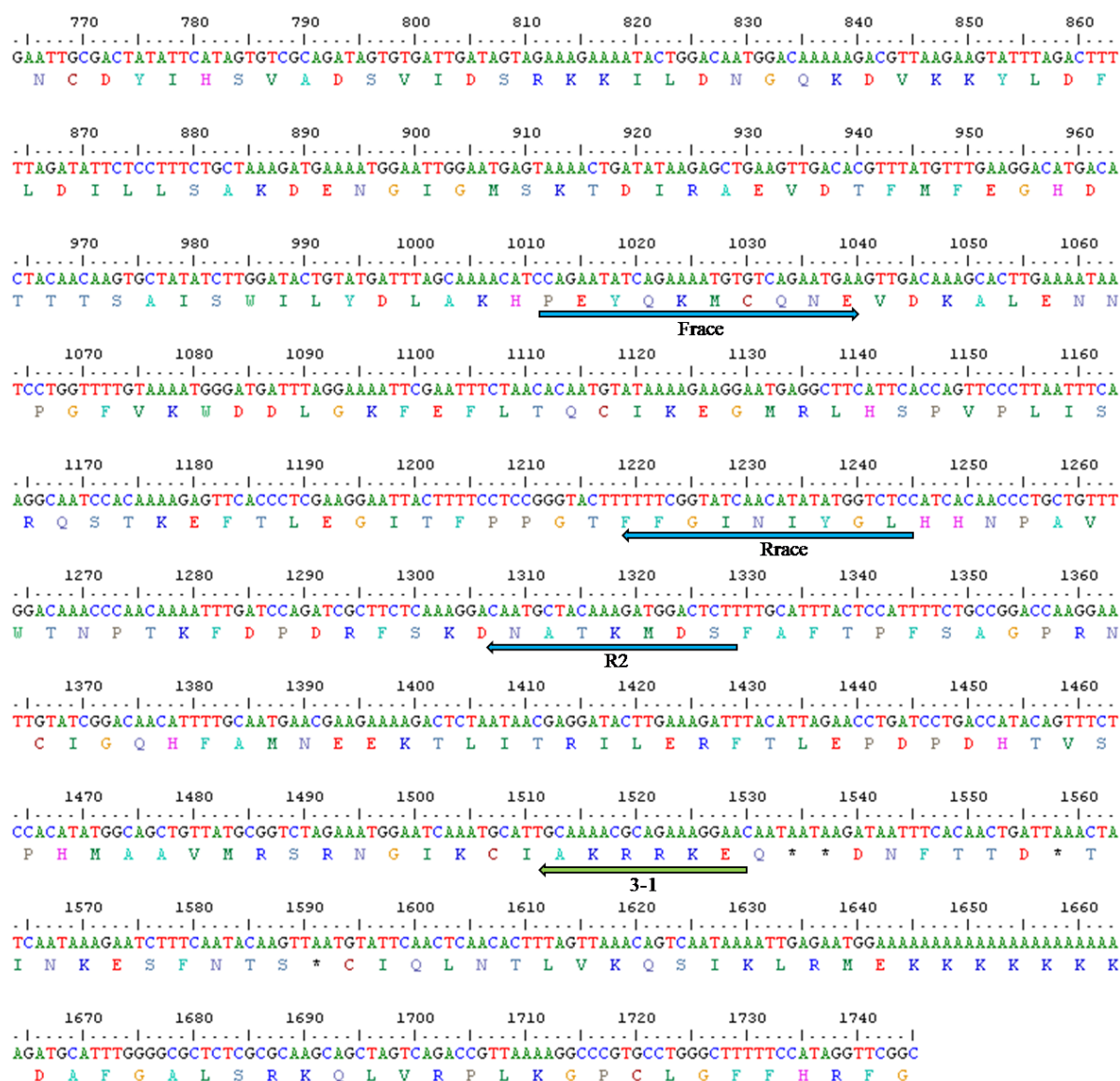
---

## 5 REZULTATI

### 5.1 IDENTIFIKACIJA GENA *cyp4* U DAGNJI, *M. GALLOPROVINCIALIS*

RACE – PCR umnažanje rezultiralo je dvjema parcijalnim cDNA gena *cyp4*. Umnažanje 3' kraja gena *cyp4* ishodilo je parcijalnim cDNA slijedom u duljini od 1082 nukleotida, dok je umnažanjem 5' kraja gena *cyp4* generiran cDNA slijed od 722 nukleotida. Svrnjenjem 3' i 5' kraja cDNA gena *cyp4* dobivena je puna duljina cDNA gena *cyp4* (Slika 11.), koja sadrži dio 5' nekodirajuće regije (5' UTR) od 36 baznih parova, 3' nekodirajuću regiju (3' UTR) od 210 baznih parova sa poli (A) repom i otvoreni okvir čitanja (ORF) od 1536 baznih parova.





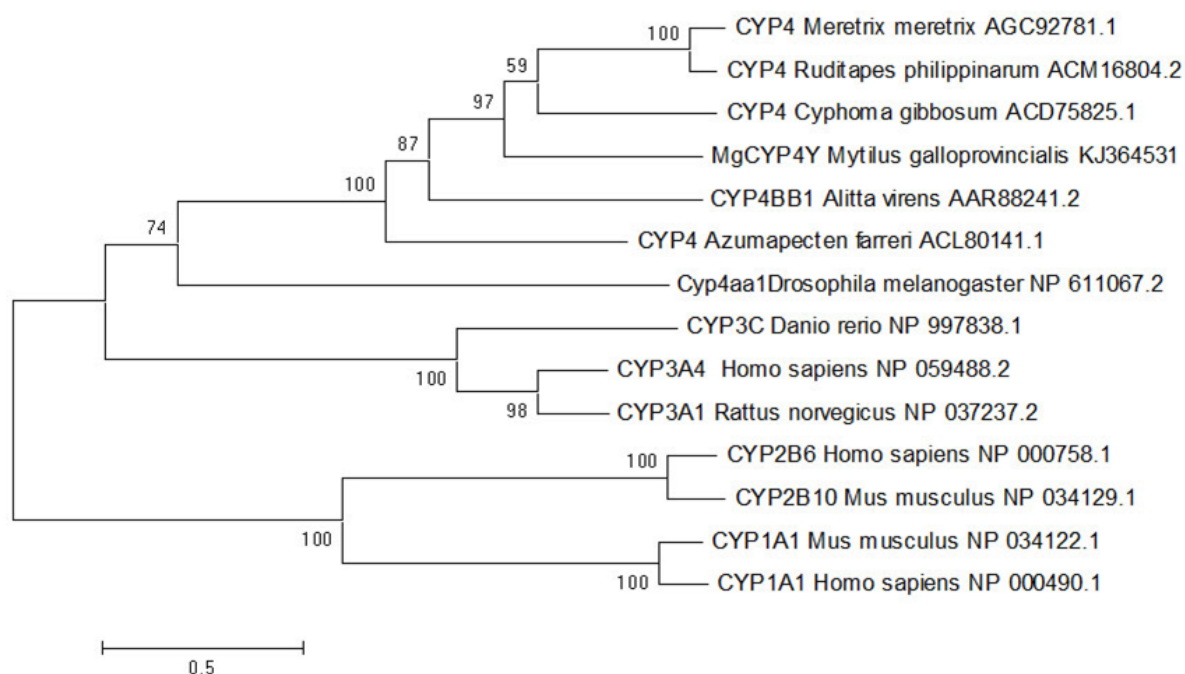
**Slika 11.** Nukleotidni i izvedeni proteinski slijed gena *cyp4* *Mytilus galloprovincialis* (GenBank pristupni broj: KJ364531, MgCYP4Y). Mjesta vezanja početnica upotrijebljenih za RACE – PCR označena su plavom bojom. Mjesta vezanja početnica upotrijebljenih za umnažanje pune duljine gena *cyp4* označena su zelenom bojom. Nukleotidni slijedovi početnica (5' → 3') prikazani su u Tablici 1.

### 5.1.1 ANALIZA NUKLEOTIDNOG I IZVEDENOG PROTEINSKOG SLIJEDA GENA

#### *cyp4*

Nukleotidni CYP4 slijed *M. galloprovincialis* (MgCYP4Y) podudara se s ranije identificiranim parcijalnim slijedom (447 baznih parova) CYP4Y1 dagnje *M. galloprovincialis* (Snyder, 1998; AF072855.1), s 95 % identiteta duž cijele duljine fragmenta. BlastX pretraga pune duljine cDNA slijeda identificirala je *cyp4* gene nekoliko mekušaca kao

najsličnije MgCYP4Y slijedu, dijeleći do 55 % identičnosti. MgCYP4Y pokazao je 55 % identičnosti sa genom *cyp4* školjkaša *Ruditapes philippinarum* (ACM16804.2), 53 % identičnosti sa genom *cyp4f22* školjkaša *Crassostrea gigas* (EKC34228.1) te 52 % identičnosti sa genom *cyp4* školjkaša *Meretrix meretrix* (AGC92781.1). U svrhu određivanja filogenetskih odnosa između različitih podobitelji *cyp* gena izvedeni proteinski MgCYP4Y slijed je analiziran s drugim CYP aminokiselinskim sljedovima sisavaca, riba i beskralješnjaka (Slika 12.). Rezultat filogenetske analize metodom najveće vjerojatnosti pokazuje da MgCYP4Y slijed pripada klanu 4 citokroma P450. Vjerodostojnost filogenetskog stabla potvrđena je metodom samoučitavanja (*bootstrap*) s visokim postotcima provjere.



**Slika 12.** Filogenetsko stablo dizajnirano metodom najveće vjerojatnosti s izračunom 1000 mjera stalnosti metodom samoučitavanja (*bootstrap*). Brojevi na granjanjima prikazuju postotak potpore metodom samoučitavanja. Pristupni broj slijedova naveden je nakon oznake gena i organizma.

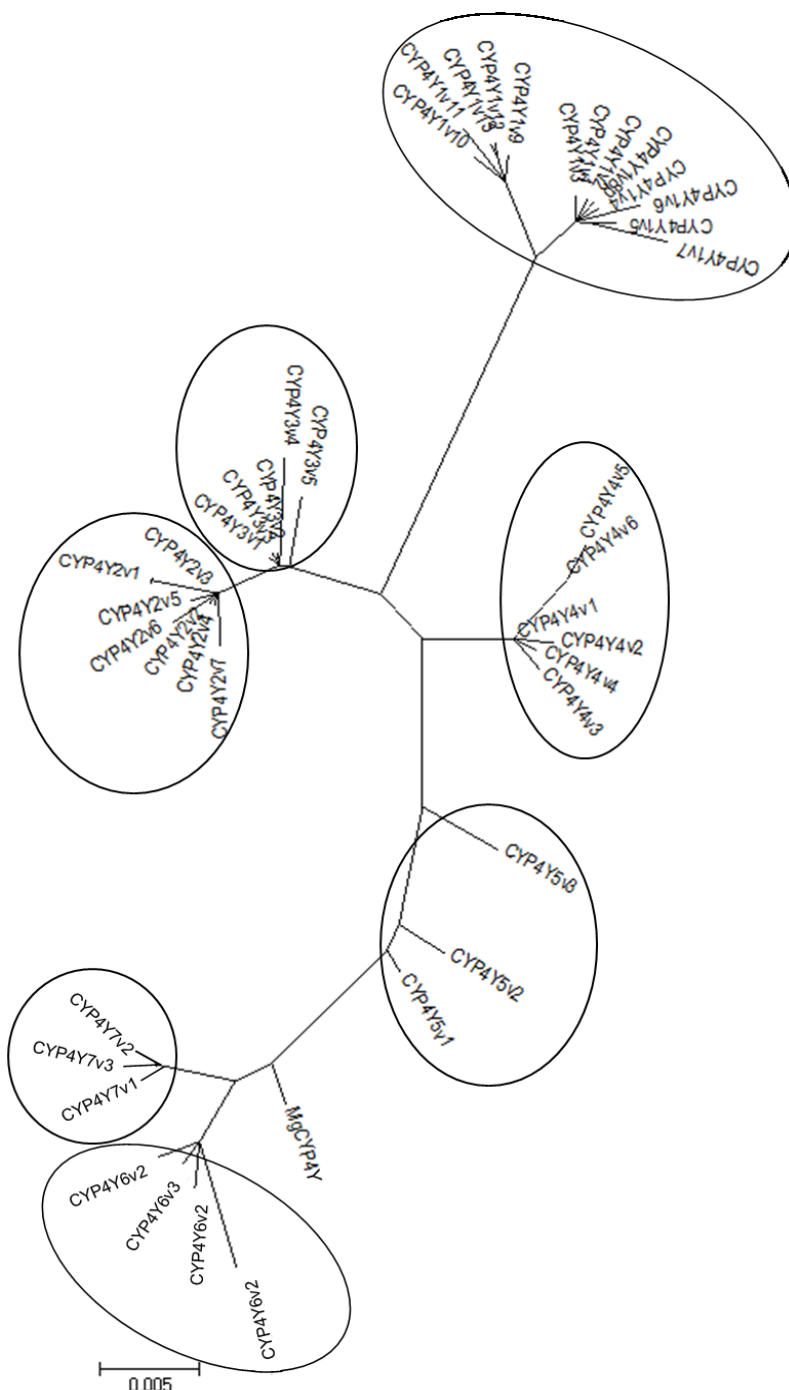
## 5.2 PUNA DULJINA cDNA GENA *cyp4* DAGNJE

Identifikacija slijeda CYP4 cDNA dagnje, *M. galloprovincialis*, omogućila je dizajn početnica za umnažanje pune duljine gena *cyp4* iz dagnji (5–1, 3–1, Slika 11.) sakupljenih dvomjesečno kroz godinu dana na tri postaje različitog stupnja onečišćenja (Slika 10.). Od rujna 2011. - srpnja 2012. godine izolirano je oko 180 ukupnih RNA iz različitih jedinki dagnji. Na osnovu kvalitete izolirane ukupne RNA odabrani su uzorci za sintezu prvog lanca komplementarne DNA (cDNA). Uzorci cDNA koji su dali pozitivan rezultat u PCR reakciji umnažanja pune duljine cDNA gena *cyp4* odabrani su za daljnju manipulaciju u pokusima kloniranja (Tablica 2.). Ukoliko u svrhu daljnje analize volumen sintetizirane cDNA nije bio dostatan, reverzna transkripcija ukupne RNA danog uzorka je ponovljena. Na očitavanje slijeda DNA iz oba smijera (sekvenciranje) poslano je minimalno 8 klonova po odsječku PCR reakcije, koji odgovara jedinci dagnje. Ukupno je generiran 41 različit cDNA slijed iz 48 jedinki dagnji (24 jedinke iz Budave, 8 jedinki iz Dine, 16 jedinki iz Pule; Tablica 2.). Uspješno generirani cDNA sljedovi rezultat su eksperimenata na ukupnoj RNA izoliranoj iz jedinki školjakša uzorkovanih u studenom i siječnju kada je temperatura mora bila 11°C, te također u ožujku s lokacije Budava kada je temperatura mora bila 13°C. Uzorci ukupne RNA izolirane iz školjkaša uzorkovanih u ranu jesen, te u proljetnim i ljetnim mjesecima rezultirale su nikakvim ili vrlo niskim količinama MgCYP4Y genskog transkripta, koje nisu bile dovoljne za daljnje pokuse kloniranja i umnažanja.

**Tablica 2.** Broj sintetiziranih cDNA u odnosu na broj RNA izolata te broja uzorkovanih jedinki dagnje. Uzorci cDNA s dostatnom količinom CYP4 genskog transkripta za daljnje pokuse kloniranja podebljani su i podvučeni.

### 5.2.1 ANALIZA NUKLEOTIDNIH SLJEDOVA EKSPRIMIRANIH GENA *cyp4y*

Sravnjenje nukleotidnih sljedova upotrijebljenih za dizajn filogenetskog stabla metodom najveće vjerojatnosti omogućilo je identifikaciju različitih *cyp4* gena (Slika 13.).



**Slika 13.** Grupna analiza klonova unutar CYP4Y podobitelji vizualizirana metodom najveće vjerojatnosti. Krugovi prikazuju grupe gena predstavljene s nekolicinom genskih varijanti (alela). MgCYP4Y slijed također je uključen u analizu u svrhu vizualizacije njegovog grupiranja.

Rezultati filogenetske analize te matrice uparenih udaljenosti (eng. *pairwise distance*) cDNA sljedova (Slika 14.) potvrđuju prisustvo višestrukih gena na CYP4Y lokusu u dagnji. Na Slici 14. prikazana je toplinska mapa s prikazom udaljenosti između CYP4Y cDNA sljedova *M. galloprovincialis*.

	CYP4Y1	CYP4Y2	CYP4Y3	CYP4Y4	CYP4Y5	CYP4Y6	CYP4Y7
CYP4Y1		0,034	0,026	0,028	0,031	0,026	0,027
CYP4Y2	0,033		0,015	0,024	0,037	0,042	0,036
CYP4Y3	0,029	0,007		0,018	0,029	0,034	0,028
CYP4Y4	0,033	0,019	0,016		0,023	0,033	0,026
CYP4Y5	0,033	0,028	0,025	0,021		0,025	0,017
CYP4Y6	0,028	0,036	0,032	0,030	0,022		0,018
CYP4Y7	0,032	0,033	0,030	0,027	0,017	0,011	

**Slika 14.** Toplinska mapa s prikazom udaljenosti između CYP4 cDNA *M. galloprovincialis*. Vrijednosti su obojane prema postotku različitosti, gdje zelena označava najniži, a crvena najviši stupanj različitosti. Postotak različitosti nukleotidnih sljedova prikazan je u donjem trokutu, dok je postotak različitosti aminokiselinskih sljedova prikazan u gornjem trokutu.

Međunarodni odbor za imenovanje (P450 nomenclature committee) rasporedio je 41 identificirani CYP4 slijed u sedam različitih genskih grupa (CYP4Y1, CYP4Y2, CYP4Y3, CYP4Y4, CYP4Y5, CYP4Y6, CYP4Y7) unutar podobitelji CYP4Y. Prema pripadnosti određenoj grupi gena napravljeno je grupiranje 41 slijeda cDNA, te je između grupa izračunat postotak različitosti. Matrica uparenih udaljenosti pokazala je da 41 izvedeni CYP4Y proteinski slijed dijeli aminokiselinsku identičnost u rasponu od 94.8 do 99.9 %.

Genske grupe identificirane u ovom istraživanju pokazale su mjesno specifičnu distribuciju. Grupe gena CYP4Y1, Y2 i Y3 pronađene su na sve tri lokacije uzorkovanja. Prisutnost genskih grupa CYP4Y2 i Y5 potvrđena je na mjestu uzorkovanja Budava, dok je prisutnost CYP4Y6 i Y7 genskih grupa bila specifična za lokaciju Pula.

CYP4Y1 predstavljena je kao najveća grupa gena s 12 genskih varijanti (*cyp4y1v1-v7*, *cyp4y1v9 - v13*) koje dijele 99 % identičnost, i jednim pseudogenom *cyp4y1v8p*, čija mutacija na 835. baznom paru rezultira stop kodonom skraćujući protein. Prisutnost genske grupe CYP4Y1 potvrđena je u 20 od 48 jedinki dagnji, od kojih je 8 bilo uzorkovanih na lokaciji Budava, 8 u Puli i 4 jedinke u Dini. U četiri jedinke iz Budave i dvije jedinke iz Dine uz alel

*cyp4y1* u istim jedinkama je identificiran i alel *cyp4y3*. U svim ostalim jedinkama potvrđen je samo alel *cyp4y1*.

Druga po veličini genska grupa, CYP4Y2, predstavljena je sa 7 genskih varijanti (*cyp4y2v1-v7*) koje karakterizira delecija jedne aminokiseline na 423 poziciji proteinskog slijeda. Karakteristična za lokaciju uzorkovanja Budava genska grupa CYP4Y2 potvrđena je u sedam jedinki dagnji, te je iz rezultata očitavanja slijeda DNA (sekvencirani klonovi) u danim jedinkama potvrđena prisutnost isključivo *cyp4y2* alela, bez prisutnosti drugih alela podobitelji CYP4Y. Iako se slijed CYP4Y3v5 postavio kao vanjska grupa (outgroup) sestrinskim grupama CYP4Y2 i CYP4Y3, na osnovu matrice uparenih udaljenosti je od strane međunarodnog odbora za imenovanje dodijeljen CYP4Y3 grupi gena.

Unatoč tomu da genske grupe CYP4Y3 i Y4 posjeduju aminokiselinsku identičnost veću od 98 %, na osnovu filogenetske analize smještene su u zasebne grupe. Genska grupa CYP4Y3 predstavljena je s 5 alela (*cyp4y3v1-v5*), dok je CYP4Y4 predstavljena sa 6 genskih varijanti (*cyp4y4v1-v6*), obje dijeleći 99 % identičnost unutar grupe. Genska grupa CYP4Y3 potvrđena je u 16 od 48 jedinki dagnji, podijeljenih između sve tri postaje uzorkovanja. U četiri jedinke uzorkovane u Budavi i Dini uz alel *cyp4y3* identificiran je i alel *cyp4y1*. U pet jedinki iz Pule uz alel *cyp4y3* u jedinkama je identificiran i alel *cyp4y5*. Kao samostalan alel *cyp4y3* je identificiran u tri jedinke dagnji iz Budave. Genska grupa CYP4Y4 potvrđena je u 12 od 48 jedinki dagnji uzorkovanih na sve tri postaje. U četiri jedinke dagnji uzorkovanih u Dini alel *cyp4y4* nalazio se kao samostalan alel. U pet jedinki dagnji iz Budave uz alel *cyp4y4* u jedinkama je identificiran i alel *cyp4y7*. U tri jedinke iz Pule uz alel *cyp4y4* identificiran je i alel *cyp4y6*.

Unutar CYP4Y5 genske grupa su 3 alela (*cyp4y5v1-v3*) koji dijele 98.8 % identičnosti. Specifična isključivo za lokaciju uzorkovanja Pula genska grupa CYP4Y5 je identificirana u 11 jedinki, te među svim identificiranim klonovima nije potvrđena prisutnost niti jednog drugog alela. CYP4Y6 predstavljena je s 3 genske varijante (*cyp4y6v1-v3*) koje dijele 98.6 % identičnosti, i jednim pseudogenom, *cyp4y6v4p*, čija mutacija na 381. baznom paru rezultira stop kodonom skraćujući protein. *Cyp4y6* aleli su identificirani u 17 jedinki dagnji s lokacije uzorkovanja Pula. Za gensku grupu CYP4Y6 je analizom svih sedam genskih grupa dokazana najveća različitost između slijedova. Tri alela unutar CYP4Y7 genske grupe (*cyp4y7v1-v3*)



dijele 99.5 % identičnosti aminokiselinskog slijeda te su identificirani u 12 jedinki dagnji uzorkovanih na lokaciji Budava.

Premda matrice uparenih udaljenosti cDNA sljedova genskih grupa CYP4Y5, Y6 i Y7 nisu pokazale različitost veću od 3 % (Slika 14.), na osnovu filogenetske analize smještene su u zasebne grupe. Svi identificirani sljedovi pohranjeni su u GenBank bazu podataka s pristupnim brojevima KJ364532 do KJ364572.

### 5.3 OBILJEŽJA OČUVANIH DOMENA GENA *cyp4*

Nekoliko očuvanih domena prisutno je u svim novoidentificiranim CYP4Y proteinskim sljedovima dagnje, *M. galloprovincialis*. Na Slici 15. prikazano je višestruko sravnjenje izvedenih aminokiselinskih sljedova predstavnika svake od 7 identificiranih CYP4Y grupa gena s nekolicinom aminokiselinskih sljedova odabranih kralježnjaka i beskralježnjaka. Predstavnicima genskih grupa odabrani su prema postotku svoje pojavnosti u analizi.

Krenuvši od amino (N) – terminalnog kraja CYP4 proteini dagnje posjeduju visoko očuvane domene prisutne kod svih proteina citokroma P450: i) slijed aminokiselina odgovornih za usmjeravanje CYP proteina na točnu lokaciju u stanici, ii) visoko očuvanu WxxxR (W<sup>152</sup>ARSR<sup>156</sup>) domenu smještenu u centru  $\alpha$  - uzvojnice C, iii) GxxT domenu (E<sup>323</sup>VDTFMFEGHDTT<sup>335</sup>) smještenu u  $\alpha$  - uzvojnici I, iv) očuvanu ExxR (E<sup>388</sup>GMR<sup>391</sup>) domenu u  $\alpha$  - uzvojnici K smještenu na proksimalnoj strani hema, v) P450 konsenzusni slijed, FxxGxRxCxG (F<sup>461</sup>SAGPRNCIG<sup>470</sup>) s apsolutno očuvanim cisteinom, smješten točno prije  $\alpha$  - uzvojnice L.

Novoidentificirani sljedovi gena *cyp4* dagnje, *M. galloprovincialis*, pokazali su jasne karakteristike vezane za očuvane domene CYP4 aminokiselinskih sljedova. Kod genskih varijanti CYP4Y2 grupe gena, ustanovljena je zamjena baza u ExxR domeni, 390M/V. Zamjena baza u WxxxR domeni ustanovljena je kod genskih varijanti *cyp4y1v10* i *cyp4y7v3* (152W/R), te također kod pseudogena *cyp4y1v8p* (156R/H). Za GxxT domenu ustanovljena je zamjena baza 334T/S prisutna kod genske izoforme *cyp4y3v4*.

MmCYP4BK4	-----MKDVKFTLFEQMLTVSKILLGTLLAYIIF-----LLIKFPLYVHRLKRVFG-----DVPGPE-KHMLY	57
RpCYP4BK3	-----L-----K-----M.P.S.S.D.MI-----I-----L-----A-----	1
CgCYP4F22	MLITIQ.IY.YDTSIKIKCHDITASISW.LPSLAENSECQKCEVIDKUVSETKFGQLKOLAVISUUUI.I.Q.LIKL.UKYAYHGLPE.LED-----	99
MusCYP4F14	MPVPERSRMSQLS.SWLGGLGPEVATPKWTKLLLG-----ASW.I.ARI.L.QIYAAY.NYRHLHGFPQ.PKR--N.M	69
MgCYP4Y1v3	-----PWYTLK.L.MANISF.S.SIYSTAFFG-----ITUVIFFWVIRYL IKFQ.MRHFDFALPGYST.Q....	64
MgCYP4Y2v3	-----PWYTLK.L.MANISF.S.SIYSTAFFG-----ITUVIFFWVIRYL IKFQ.MRHFDFALPGYST.Q....	64
MgCYP4Y3v3	-----PWYTLK.L.MANISF.S.SIYSTAFFG-----ITUVIFFWVIRYL IKFQ.MRHFDFALPGYST.Q....	64
MgCYP4Y4v4	-----PWYTLK.L.MANISF.S.SIYSTAFFG-----ITUVIFFWVIRYL IKFQ.MRHFDFALPGYST.Q....	64
MgCYP4Y5v3	-----PWYTLK.L.MANISF.S.SIYSTAFFG-----ITUVIFFWVIRYL IKFQ.MRHFDFALPGYST.Q....	64
MgCYP4Y6v1	-----PWYTLK.L.MANISF.S.SIYSTAFFG-----ITUVIFFWVIRYL IKFQ.MRHFDFALPGYSTQ....	64
MgCYP4Y7v2	-----PWYTLK.L.MANISF.S.SIYSTAFFG-----ITUVIFFWVIRYL IKFQ.MRHFDFALPGYSTKQ....	64
MmCYP4BK4	GMLHLPLSTMS-HDRIMFGVSNMNTYIRVYVWMTTFAKTSLTVCHPETHVIMKTSPEKPTGFMGIYRFGLPWLGEGLLIAGGKKWARSRELLTFAHFD	156
RpCYP4BK3	-----L-----K-----M.P.S.S.D.MI-----I-----L-----A-----	84
CgCYP4F22	-----H.PIFSNKIAGQSVDKFLWETAK.P.M.L.FGFFDARVULM.DPI.KIL...D...VM.GQV..H.I.....A.K.....	199
MusCYP4F14	-----HVGWTF.E.QG--LKEITLVLG.PQGLM.IGPHVUUI.L.SDI.RSILNA.AVALKDUVIF.SILK...D...USA.D...S.H.M.....	166
MgCYP4Y1v3	-----YUKND.--IDVQIS.LTRRPFKF.RV.FGFFTPUUSLV.DS.VLL.A...V.HGPT.TLI.....S.....	162
MgCYP4Y2v3	-----YUKND.--IDVQIS.LTRRPFKF.RV.FGFFTPUUSLV.DS.VLL.A...V.HGPT.TLI.....S.....	162
MgCYP4Y3v3	-----YUKND.--IDVQIS.LTRRPFKF.RV.FGFFTPUUSLV.DS.VLL.A...V.HGPT.TLI.....S.....	162
MgCYP4Y4v4	-----YUKND.--IDVQIS.LTRRPFKF.RV.FGFFTPUUSLV.DS.VLL.A...V.HGPT.TLI.....S.....	162
MgCYP4Y5v3	-----YUKND.--IDVQIS.LTRRPFKF.RV.FGFFTPUUSLV.DS.VLL.A...V.HGPT.TLI.....S.....	162
MgCYP4Y6v1	-----YUKND.--UDVQIS.LTRRPFKF.RV.FGFFTPUUSLV.DS.VLL.A...V.HGPT.TLI.....S.....	162
MgCYP4Y7v2	-----YUKND.--UDVQIS.LTRRPFKF.RV.FGFFTPUUSLV.DS.VLL.A...V.HGPT.TLI.....S.....	162
MmCYP4BK4	ILKPYMAUYMDAADTLUGNLRRYAEKR-EKFEVFDYISROTLDVILRCASFYHTDCQKEQGVURHPYOKAVEEIADEWNYRARKPWLYPDWVYFLTRGRK	255
RpCYP4BK3	-----S-----L-----E.M.K-R-----A-----M-----Q-----DK.T-----Q-----A-----L.M.M.RH.KQ	183
CgCYP4F22	-----R.VKIK.KSC.I.AR.IEISV.N-.SV.I.SLV.SC.I...Q...K.NFC.TI...IS.M.SAT.R.N.A...H.P.FYR.AE.KS	298
MusCYP4F14	-----GKIFP.STNIMHAKWQ.LISDGSARLDH.EHW.LM...SLQK.V.FDSM.EKS--SE.IA.I.L.SALVAK.HQQ.LMM.LL.N.PD.HR	263
MgCYP4Y1v3	-----G.QTIN.QCV.I.INIMEK.DTG-.S.DL.QL.NC.I...QS...K.N.HDR-LQ.S.C.IT.UTKLGR.N.N.LMMF.I.NM.SD.KL	260
MgCYP4Y2v3	-----G.QTIN.QCV.I.INIMEK.DTG-.S.DL.QL.NC.I...QS...K.N.HDR-LQ.S.C.IT.UTKLGR.N.N.LMMF.I.NM.SD.KL	260
MgCYP4Y3v3	-----G.QTIN.QCV.I.INIMEK.DTG-.S.DL.QL.NC.I...QS...K.N.HDR-LQ.S.C.IT.UTKLGR.N.N.LMMF.I.NM.SD.KL	260
MgCYP4Y4v4	-----G.QTIN.QCV.I.INIMEK.DTG-.S.DL.QL.NC.I...QS...K.N.HDR-LQ.S.C.IT.UTKLGR.N.N.LMMF.I.NM.SD.KL	260
MgCYP4Y5v3	-----G.QTIN.QCV.I.INIMEK.DTG-.S.DL.QL.NC.I...QS...K.N.HDR-LQ.S.C.IT.UTKLGR.N.N.LMMF.I.NM.SD.KL	260
MgCYP4Y6v1	-----G.QTIN.QCV.I.INIMEK.DTG-.S.DL.QL.NC.I...QS...K.N.HDR-LQ.S.C.IT.UTKLGR.N.N.LMMF.I.NM.SD.KL	260
MgCYP4Y7v2	-----G.QTIN.QCV.I.INIMEK.DTG-.S.DL.QL.NC.I...QS...K.N.HDR-LQ.S.C.IT.UTKLGR.N.N.LMMF.I.NM.SD.KL	260
MmCYP4BK4	FKRNCYVHGSVAEDUINQRKEALERS-----GKSDRKYVDFLDILLTARDNMQGLTPLEIRNEUDTIFMEGHDTTASATSWLISYSLAKHPEYQKKCQ	348
RpCYP4BK3	-----R.K-----T-----K-----DK-----RM-----K.E.G-----I-----Y-----	276
CgCYP4F22	-----I.AK...Q...DK.RMT...TQ-----I.SQ...K.E.GK.MSKED.S...I...E.M...C.R...	391
MusCYP4F14	-----RKA.MV.EPTDA.RE.HRT.PDQGLDFLKS.AKS.T...I.V.LSK.EDGKE.SDED.A.A...GL...M...R...ER.R	363
MgCYP4Y1v3	-----Q...I.S.DS.DS.KI.DMG-----Q.DVK...S.K.E.GI.MSKTD.A...T.I...D...M...M...353	353
MgCYP4Y2v3	-----Q...I.S.DS.DS.KI.DMG-----Q.DVK...S.K.E.GI.MSKTD.A...T.I...D...M...M...353	353
MgCYP4Y3v3	-----Q...I.S.DS.DS.KI.DMG-----Q.DVK...S.K.E.GI.MSKTD.A...T.I...D...M...M...353	353
MgCYP4Y4v4	-----Q...I.S.DS.DS.KI.DMG-----Q.DVK...S.K.E.GI.MSKTD.A...T.I...D...M...M...353	353
MgCYP4Y5v3	-----Q...I.S.DS.DS.KI.DMG-----Q.DVK...S.K.E.GI.MSKTD.A...T.I...D...M...M...353	353
MgCYP4Y6v1	-----Q...I.S.DS.DS.KI.DMG-----Q.DVK...S.K.E.GI.MSKTD.A...T.I...D...M...M...353	353
MgCYP4Y7v2	-----Q...I.S.DS.DS.KI.DMG-----Q.DVK...S.K.E.GI.MSKTD.A...T.I...D...M...M...353	353
MmCYP4BK4	EEIDQLLQGRDIDDIEUSDIPKLEYLTMCIKESGMRDHSFVPIQREFTHDIEL-DGKTFPAGTIVSLHIFGLHNMKHUV-ENPMEFIPERFTKDMIAMKD	446
RpCYP4BK3	Q...E...I...S...DS...KI.DMG-----Q.DVK...S.K.E.GI.MSKTD.A...T.I...D...M...M...353	374
CgCYP4F22	-----Q...KVISETKSGQL.K.LGG...Q...L...G.L.DIQSLRE-GDHEI.R.S.LIS.N...PT...GKDHQAQ.K...SPE.TEER.	490
MusCYP4F14	-----Q.VQE.R.EFEE...D.LAQ.PF...SL.L.P.TV.S.CC.Q.HL.P.R.I.K.I.CILIS...I...PS.PD-EVVD.Y.F.DPE...KDS	462
MgCYP4Y1v3	-----N.V.KA.E-MNPGFVK.E.LG.F.F...L...L.S.S.QS.KE.T-E.I...P...PFGIN.Y...PA.TD-TK.D.D.S...AT...450	450
MgCYP4Y2v3	-----N.V.KA.E-MNPGFVK.E.LG.F.F...L...L.S.S.QS.KE.T-E.I...P...PFGIN.Y...PA.TD-TK.D.D.S...AT...449	449
MgCYP4Y3v3	-----N.V.KA.E-MNPGFVK.E.LG.F.F...L...L.S.S.QS.KE.T-E.I...P...PFGIN.Y...PA.TD-TK.D.D.S...AT...450	450
MgCYP4Y4v4	-----N.V.KA.E-MNPGFVK.E.LG.F.F...L...L.S.S.QS.KE.T-E.I...P...PFGIN.Y...PA.TD-TK.D.D.S...AT...450	450
MgCYP4Y5v3	-----N.V.KA.E-MNPGFVK.E.LG.F.F...L...L.S.S.QS.KE.T-E.I...P...PFGIN.Y...SA.TD-TK.D.D.S...AT...450	450
MgCYP4Y6v1	-----N.V.KA.E-MNPGFVK.E.LG.F.F...L...L.S.S.QS.KE.T-E.I...P...PFGIN.Y...PA.TD-TK.D.D.S...AT...450	450
MgCYP4Y7v2	-----N.V.KA.E-MNPGFVK.E.LG.F.F...L...L.S.S.QS.KE.T-E.I...P...PFGIN.Y...SA.TD-TK.D.D.S...AT...450	450
MmCYP4BK4	TQVFPVFSAGPRNCIGQHFAMNEEKILSKLLRRYWELDESHIURRKYGAVMR.AENG.IYHVTPTPDU-----	514
RpCYP4BK3	-----T.L...I...L...R...L-----	442
CgCYP4F22	-----S.A.C...N...S...RTV...AT...Q...PT...SV...KT...K...EQ...IS...RY...KLF...A...-----	556
MusCYP4F14	-----P.L.A.I...T...S.M...A.ALT.L.FELLP...DKEP...QPELIL...G.LWLR.E.LSAGAH-----	532
MgCYP4Y1v3	-----S.A.T...T...TLITRI.E.FTL.P.PD.T.SPHMA...SR...KCIAKR.KEQDNFTTDTINKESFNTSCIQLNLTUKQS IKLR	550
MgCYP4Y2v3	-----S.A.T...T...TLITRI.E.FTL.P.PD.T.SPHMA...SR...KCIAKR.KEQDNFTTDTINKESFNTSCIQLNLTUKQS IKLR	549
MgCYP4Y3v3	-----S.A.T...T...TLITRI.E.FTL.P.PD.T.SPHMA...SR...KCIAKR.KEQDNFTTDTINKESFNTSCIQLNLTUKQS IKLR	550
MgCYP4Y4v4	-----S.A.T...T...TLITRI.E.FTL.P.PD.T.SPHMA...SR...KCIAKR.KEQDNFTTDTINKESFNTSCIQLNLTUKQS IKLR	550
MgCYP4Y5v3	-----S.A.T...T...TLITRI.E.FTL.P.PD.T.SPHMA...SR...KCIAKR.KEQDNFTTDTINKESFNTSCIQLNLTUKQS IKLR	550
MgCYP4Y6v1	-----S.A.T...T...TLITRI.E.FTL.P.PD.T.SPHMA...SR...KCIAKR.KEQDNFTTDTINKESFNTSCIQLNLTUKQS IKLR	550
MgCYP4Y7v2	-----S.A.T...T...TLITRI.E.FTL.P.PD.T.SPHMA...SR...KCIAKR.KEQDNFTTDTINKESFNTSCIQLNLTUKQS IKLR	550
MmCYP4BK4	-----	514
RpCYP4BK3	-----	442
CgCYP4F22	-----	556
MusCYP4F14	-----	532
MgCYP4Y1v3	MEKKKKKKKDAFGALSSEKQURPLKGPCLGFFHRFG	585
MgCYP4Y2v3	MEKKKKKKKDAFGALSSEKQURPLKGPCLGFFHRFG	584
MgCYP4Y3v3	MEKKKKKKKDAFGALSSEKQURPLKGPCLGFFHRFG	585
MgCYP4Y4v4	MEKKKKKKKDAFGALSSEKQURPLKGPCLGFFHRFG	585
MgCYP4Y5v3	MEKKKKKKKDAFGALSSEKQURPLKGPCLGFFHRFG	585
MgCYP4Y6v1	MEKKKKKKKDAFGALSSEKQURPLKGPCLGFFHRFG	585
MgCYP4Y7v2	MEKKKKKKKDAFGALSSEKQURPLKGPCLGFFHRFG	585

Slika 15. Višestruko sravnjeno CYP4 aminokiselinskih slijedova organizama *Meretrix meretrix* (MmCYP4BK4), *Ruditapes philippinarum* (RpCYP4BK3), *Crassostrea gigas* (CgCYP4F22), *Mus musculus* (MusCYP4F14) te izvedenih aminokiselinskih slijedova predstavnika svake CYP4Y grupe gena identificirane u ovom istraživanju. Očuvane domene obilježene u sivim sjenčanjem. Jedinostveni ostatak glutaminske kiseline prisutan isključivo kod CYP4 proteina označen je „\*“. Slijed aminokiselina za usmjeravanje proteina na točnu lokaciju u stanici označen je iscrtkanom crtom iznad višestrukog sravnjenja.

## 5.4 MJESTA ZA PREPOZNAVANJE SUPSTRATA (SRS – SUBSTRATE RECOGNITION SITE)

Aminokiselinska identičnost između bakterijskog CYP102 i CYP4Y proteinskih slijedova *M. galloprovincialis* iznosila je od 18.9 do 21.9 %. Bakterijski CYP102 poslužio je kao kalup za identifikaciju SRS domena unutar CYP4Y proteina *M. galloprovincialis*. Višestruko sravnjenje prevedenih aminokiselinskih slijedova CYP4Y1 grupe gena pokazuje da su varijacije ograničene na 20 od 510 mogućih pozicija u slijedu (Slika 16A.). Dva od 20 varijabilnih ostataka podobitelji CYP4Y1 smještena su u dva od šest mjesta za prepoznavanje supstrata koji su ključni u definiranju specifičnosti prema supstratu i aktivnosti enzima citokroma P450 kralješnjaka i beskralješnjaka (Gotoh, 1992, Pan i sur., 2004). Zasebna višestruka sravnjenja aminokiselinskih slijedova CYP4Y2 i CYP4Y3 grupa gena pokazuju ograničavanje varijacija na 11 od 510 mogućih pozicija u slijedu, od kojih se kod obje grupe gena po dvije varijacije nalaze u dva mjesta za prepoznavanje supstrata (Slika 16B, C.). Za CYP4Y4, kao i za CYP4Y5 grupu gena, karakteristično je prisustvo devet od 510 mogućih varijacija u aminokiselinskom slijedu, gdje se u CYP4Y4 (Slika 16D.) grupi gena dvije varijacije nalaze u dva mjesta za prepoznavanje supstrata, dok je kod CYP4Y5 (Slika 16E.) grupe gena jedna varijacija prisutna u jednom mjestu za prepoznavanje supstrata. Grupa gena CYP4Y6 odlikuje se sa 16 varijacija u slijedu duljine 510 aminokiselina, od kojih se dvije varijacije nalaze u dva mjesta za prepoznavanje supstrata (Slika 16F.). Genska grupa CYP4Y7 (Slika 16G.) odlikuje se najmanjim brojem prisutnih varijacija, 4 od 510 aminokiselinskih ostataka, gdje niti jedna varijacija nije pronađena u mjestima za prepoznavanje supstrata.

**A**

CYP102	1	-----MTIKEMPOPK---TF.E.KNLPDLLNTDKPV.ALHKRIADELGEIYKFEA.GRVTR
CYP4F3hs	1	.POL.LSSLG.WPMAA.PWLLLLL.GASWLLA.I.AMTYTFYDNCRR.RCFPPQPKRN.FL.H.G.IH-SSEEGLLYTO..ACT.GDHCCW.V..WHAI.
CYP4F11hs	1	.POL.LSWLG.GPVA.A.PWLLLLL.GGSWLLA.V.AMTYTFYDNCRR.QCFPPQPKRN.FW.HQG.VT-PTEEGHRTLTO.VITTY.QGFKL.L..TF.LL
CYP4A4rabb	1	.SVSALSPT.R.P..LSGLLOVAALLGLLLLLLKAQQLYLRQWLLR..QQFPCCP-F..LL.HSREFQ-.QE-LEK.OKVVEK..GACPW.LSGNKARL
CYP4A5rabb	1	.SVSALSPT.R.P..LSGLLOVAALLGLLLLLLKAQQLYLRQWLLR..QQFPCCP-F..LL.HSREFQ-MNQE-LQ..LKUVEK..RACPH.I.GNKVR.
CYP4A6rabb	1	.SVSALSPT.R.P..LSGLLOVAALLGLLLLLLKAQQLYLRQWLLR..QQFPCCP-F..LL.HSREFQ-GHE-LQVMLKVEK..SACPR.LWGSRAHL
CYP4A7rabb	1	.SVSALSPT.R.P..FSGFLQAAALLGLLLLLLKAQQLYLRQWLLR..QQFPCCP-S..LL.HSREFP-I..E-LQ.VLKRVEK..SACPR.LWGSLEFL
CYP4Y1v13	1	.....Y.....T.....
CYP4Y1v12	1	.....Y.....T.....
CYP4Y1v11	1	.....Y.....T.....
CYP4Y1v10	1	.....Y.....T.....
CYP4Y1v9	1	.....Y.....T.....
CYP4Y1v8p	1	.....Y.....T.....
CYP4Y1v7	1	.....Y.....T.....
CYP4Y1v6	1	.....Y.....T.....
CYP4Y1v5	1	.....Y.....T.....
CYP4Y1v4	1	.....Y.....T.....
CYP4Y1v3	1	.....Y.....T.....
CYP4Y1v2	1	.....Y.....T.....
CYP4Y1v1	1	MANISF-----LSGSIYSTAFFGITVYIFFVIVRYLIKFORMRHFDDALPGYSSKQ-KHWIRGNLHLVKNDSIDVNOISSLTRRFPKFYRVWFQPFVTVV

**B** **β2** **B'** **C** **D** **E**

CYP102	52	Y.SSORLI.EACDESR-FIKNLSOALKFVRDFA.D..FTSUTHEKN.KKANNI.L.S.SQOAM..HAMMVDIAVQ.VOKV.RLN--ADHEIIEVPEMTR
CYP4F3hs	100	RIF..TYI.PV.FAPAIVFKDKVF.SF.K...D..LSA--E..S.H.M.....N..P.MK.F.ES.N.MHAKWOLL.SE.SARL.M.EH..L
CYP4F11hs	100	I.C...IIRPITSASAAVA...PKMIF.GF.K...D..LS--D..S.H.M.....N..P.MK.F.KS.N.MHDKWOLL.SE.SARL.M.EH..L
CYP4A4rabb	98	LWVD..YL..I.GRSD--FKAPRN.KLMT..I.Y..LLD--QT.FOH..M.....YD..P.VGLMVDQ.Q.MLDRV.QLISQDS--LEI..HV.L
CYP4A5rabb	98	Q.VD..YM..I.GRSD--FKSRGS.TFVA..I.Y..LLN--QT.FOH..M.....YD..P.VGLMVDQ.Q.MLDRV.QLISQDS--LEV..D..L
CYP4A6rabb	98	LIVD..YM..I.GRSD--FKAOGS.F.A..I.Y..LLN--QT.FOH..M.....YD..P.VGLMVDQ.Q.MLDRV.QLISQDS--LEV..D..L
CYP4A7rabb	98	ICVD..YM..TI.GRSD--FKARVS.SF.A..I.Y..LLE--QT.FOH..M.....YD..P.VGLMVDQ.Q.MLDRV.QLISQDS--LEV..D..L
CYP4Y1v13	96	.....K.....
CYP4Y1v12	96	.....K.....
CYP4Y1v11	96	.....K.....
CYP4Y1v10	96	.....R.....
CYP4Y1v9	96	.....R.....
CYP4Y1v8p	94	.....H.....
CYP4Y1v7	94	.....G.....
CYP4Y1v6	96	.....G.....
CYP4Y1v5	95	.....G.....
CYP4Y1v4	96	.....G.....
CYP4Y1v3	96	.....G.....
CYP4Y1v2	96	.....G.....
CYP4Y1v1	96	SLVHPDSVVKLLKTAEPKFGHGPTVRTLIPHLGEGLLTAG--GSKWARSRRLLTPAFHFEILKGYQTINNCQVDILINIEKVAADTGES-FDLQQLISN

**SRS-1** **F** **G**

CYP102	149	L...T.GLGG.N.RF.SFYR-D.P..FITSHVRALDE.HNRLQR-ANP.D.PA.--DENKRC.QEIRIVYD.LV.KI.AD..ASGE-----Q
CYP4F3hs	198	M...SLQKCV..PDSH..EK--PSHIA..L.LSA.VTK.HQOI.LVI.FL.YL.P..DR.RRA.RLV.DPT.A..QE.RRT.PSQ.VDDFLQA.AKS.
CYP4F11hs	198	M...SLQKCV..PDSH..EK--PSHIA..L.LSAFVEK..QOI.LHT.FL.YL.P..DR.RRA.HLV.DPT.A..QE.RCT.PTQ.IDDFLKM.AKS.
CYP4A4rabb	192	M..T.MKC...QGSV.L..NSQ..IQ..NDLNN.VFY.A..VFHGS.FL.RLSPE.R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ..AQ.QQE.E--LEKVR.R
CYP4A5rabb	192	M..T.MKC...QGSV.L..NSQ..IQ.VGDLNN.VFA.V..IFHGS.T.RLSPE.R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ..AQ.QQE.E--LEKVR.R
CYP4A6rabb	192	M..T.MKC...HQS.V.L..NSQ..IQ.VGDLNN.VFS.V..VFHGS.T.RLSPE.R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ..AQ.QQE.E--LEKVR.R
CYP4A7rabb	192	M..ET.MKC...HQS.V.LES.TSK..IQ.VR.LSD..LQ.V..VFHGS.FL.RLSPE.R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ..AQ.QQE.E--LEKVR.R
CYP4Y1v13	193	.....Y.....
CYP4Y1v12	193	.....Y.....
CYP4Y1v11	193	.....Y.....
CYP4Y1v10	193	.....Y.....
CYP4Y1v9	193	.....Y.....
CYP4Y1v8p	191	.....Y.....
CYP4Y1v7	191	.....Y.....
CYP4Y1v6	193	.....G.....
CYP4Y1v5	192	.....G.....
CYP4Y1v4	193	.....G.....
CYP4Y1v3	193	.....G.....
CYP4Y1v2	193	.....G.....
CYP4Y1v1	193	CTLDILIQSAPFSYKTNCOHD-RQHSKCKALIEVTKLACBRRURPLMFDIIVNHTSDGKLEKONCDYIHSVADSVIDSRKKILD-NGQ--KDVKK

**H** **SRS-2** **SRS-3** **J** **K**

CYP102	231	SD.L.T.HM.NG..P.T.EPLDDH...VQLI.LIA..E..SGLL.FA..F.V..HVLQKAAE.AARV.VDP---VPSYKQVRLKTYGKVLN..AL..FP
CYP4F3hs	295	T...I.V..LS..-D.KKL.DN...A...A...L.V..H..H...ER.RQ..QEL.KDRE.KEIE.D..AQLP..M...SL..P
CYP4F11hs	295	T...I.V..LS..-D.KEL.DN...A...A...L.V..H..H...EQ.RQ..QEL.KDRE.IEIE.D..AQLP..M...SL..P
CYP4A4rabb	288	R...V..F..M--SSL.DG.L...A...A...V..F.A..TH..H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT..H.DCMPYT.M...AL..YP
CYP4A5rabb	289	R...V..F..M--SSL.DG.L...A...A...V..F.A..TH..H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT..H.DCMPYT.M...AL..YP
CYP4A6rabb	288	R...V..F..M--SSL.DG.L...A...A...V..F.A..TH..H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT..H.DCMPYT.M...AL..YP
CYP4A7rabb	289	R...V..F..M--SSL.DG.L...A...A...V..F.A..TH..H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT..H.D.MPYT.M...AL..YP
CYP4Y1v13	285	.....H.....
CYP4Y1v12	285	.....H.....
CYP4Y1v11	285	.....H.....
CYP4Y1v10	285	.....H.....
CYP4Y1v9	285	.....H.....
CYP4Y1v8p	283	.....H.....
CYP4Y1v7	283	.....H.....
CYP4Y1v6	285	.....H.....
CYP4Y1v5	284	.....P.....
CYP4Y1v4	285	.....P.....
CYP4Y1v3	285	.....P.....
CYP4Y1v2	285	.....P.....
CYP4Y1v1	285	VLDPLDLLSAND-ENGIGSKIDRAEVDTHHEGHDITTSVILYDLAKRNPYQKHCQNEVDKALENN-PGFVKWEDLQKFEFLTQCKEKGHLS

**β5** **β6** **β7** **β8** **SRS-4** **L** **β9**

CYP102	326	TA.AF.LIAKEDTV.GGETPLEK.DELHVL.PQ..RDKTI.G.DVEE.R.E..ENP--SAIPQH..K..GN.Q.A...Q..LH.ATLVLGHM..H.DF.
CYP4F3hs	394	...AV..CC.QDIV.PD.RVI.K.IICL.SVF.T...P--EVY..F..DPK.IKERSPL..I...A...A.H.VVLGLT.L..RVL
CYP4F11hs	394	...V..CC.QD.V.PD.RVI.K.IICL.SVF.T...P--EVY..F..DQE.IKERSPL..I...A...A.H.VVLGLT.L..RVL
CYP4A4rabb	385	...SVT..LS.PV.FPD.RSL.K.VILFSL...Y..K..QN--EV..F..AP--SAYH..H..L..G.A...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4A5rabb	386	...A..LSSPV.FPD.RSL.K.VITVLS...N..PN--EV..G..TPG--SARH..H..L..G.A...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4A6rabb	385	...GVG..LSSPV.FPD.RSL.K.VITVLS...A...K..PN--EV..FP.APG--SARH..H..L..G.A...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4A7rabb	386	...GVGSLSSPV.FPD.RSL.K.IITVLS...K..PN--EV..S..APG--SARH..H..L..G.S...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4Y1v13	383	.....S.....
CYP4Y1v12	383	.....S.....
CYP4Y1v11	383	.....S.....
CYP4Y1v10	383	.....S.....
CYP4Y1v9	383	.....S.....
CYP4Y1v8p	381	.....S.....
CYP4Y1v7	381	.....E.....I.....V.....
CYP4Y1v6	383	.....E.....
CYP4Y1v5	382	.....E.....
CYP4Y1v4	383	.....E.....
CYP4Y1v3	383	.....E.....
CYP4Y1v2	383	.....E.....
CYP4Y1v1	383	SVPLISRSKKEFTL-EGITFPFGTFGINIYGLHNPVAVTD-PTKFDPRFSKDNATKHSFAFTPFSAQPRNCGHGFAMNEEKTILTRILKRFTE

**SRS-5**

		<u>β10</u>	<u>β11</u>	<u>β12</u>	
CYP102	426	DHTNYELDIH	ETLTLKPE	EFVVKAKSKKIPLG	..PSPSTEQSAKKVR
CYP4F3hs	493	..HT-EPRRR	PEL.L.AE	-----	-G.LWLRVEPLS----
CYP4F11hs	493	.THT-EPRRR	PEL.L.AE	-----	-G.LWLRVEPLGANSQ----
CYP4A4rabb	482	..TRIPI	EARV.LK.K	-----	...HLRLRKLH----
CYP4A5rabb	483	..TRIPK	TARL.LK.N	-----	...HLRLRKLQ----
CYP4A6rabb	482	..KRVPDQR	PRL.LK.S	-----	...HLRLRKLKLR----
CYP4A7rabb	483	..TRVPI	TTRL.LK.K	-----	...HLRLRKLH----
CYP4Y1v13	481	.....	.....	-----	.....
CYP4Y1v12	481	.....	.....	-----	.....
CYP4Y1v11	481	.....	.....	-----	.....
CYP4Y1v10	481	.....	.....	-----	.....
CYP4Y1v9	481	.....	.....	-----	.....
CYP4Y1v8p	479	.....	.....	-----	.....
CYP4Y1v7	479	.....	.....	-----	.....
CYP4Y1v6	481	.....	.....	-----	.....
CYP4Y1v5	480	.....	.....	-----	.....
CYP4Y1v4	481	.....	.....	-----	.....
CYP4Y1v3	481	.....	.....	-----	.....
CYP4Y1v2	481	.....	.....	-----	.....
CYP4Y1v1	481	PDPDHTVSPH	MAAVMRSE	-----	-NGIKCIAKRKE----

SRS-6



CYP102	1	-----MTIKEMPQPK-TFGELK..P.LNTDKP--.QALMKIADELGEIIFKFEAPG--R.T
CYP4F3hs	1	MPQLSLSLGG.WPMAA.PWLLLLL.GASULLA.I.AWTYTFYDNCRR.RCFPPQPKRN.FL.H.G.IHSSEEG-LLYTQ..ACT.GDMCCM.V..WHAI.
CYP4F11hs	1	MPQLSLSLGG.GPVAA.PWLLLLL.GGSULLA.V.AWTYTFYDNCRR.QCFPPQPKRN.FW.HGG.VTPTEEG-MKTLTQ.VTTY.QGFKL.L..TF.LL
CYP4A4rabb	1	MSVSALSPT.R.P..LSGLLQVAALLGLLLLLLKAQQLYLHRQWLLR..QQFFCPP-F..LL.HSREFQNDQE--LER.QKWVEK..GACPW.LSGNKARL
CYP4A5rabb	1	MSVSALSPT.R.P..LSGLLQVAALLGLLLLLLKAQQLYLHRQWLLR..QQFFCPP-F..LL.HSREFQNDQE--LER.QKWVEK..GACPW.LSGNKARL
CYP4A6rabb	1	MSVSAL.PTR.P..LSGLLQVAALLGLLLLLLKAQQLYLHRQWLLR..QQFFCPP-F..LL.HSREFQNGHE--LQVHLKWEK..SACPR.LWGSRAHL
CYP4A7rabb	1	MSVSALSSTR.P..FSGFLQAAAALLGLLLLLLKAQQLYL.RQWLLR..QQFFCPP-S..LL.HSREFPIDSE--LQ.VLKRVEK..SACPR.LWGSSELFL
CYP4Y3v5	1	-----R.....
CYP4Y3v4	1	-----A.....K.....
CYP4Y3v3	1	-----
CYP4Y3v2	1	-----
CYP4Y3v1	1	---MANISFLSGSIYSTAFFGITVYIFFVVRVYLIKFORMRVFFDALPGYSTEQ-KHWIRGNLHLYVVKMDSIDVNIQSSLTRKRFKFRVVFVGFPIPVV
CYP102	51	B                    β2                    B'                    C                    D                    E
CYP4F3hs	100	RIF..TYI.PV.FAPAAIWPDKV.FS.K..D..LSA--.E.S.H..M.....N..P.MK.F.E.S.N.MHAKWQLL.SE.SARL.M.EH..L
CYP4F11hs	100	I.C...IIRPITSASAIVPKDMIF.GF.K..D..LS--.D.S.H..M.....N..P.MK.F.KS.N.MHDKWQLL.SE.SARL.M.EH..L
CYP4A4rabb	98	LVDY..YL..I.GRSD--PKAPRN.KLMT..I.Y..LLD--DT.FQH..M.....YD..P.VGLMVDS.Q.MLDRW.QLISQDS.-LEI..HV.L
CYP4A5rabb	98	Q.YD..YM..I.GRSD--PKSRGS.TFVA..I.Y..LLN--DP.FQH..M.....YD..P.VGLMVDS.Q.MLDRW.QLISQDS.-LEV..D..L
CYP4A6rabb	98	LIYD..YM..I.GRSD--PKAQS..F.A..I.Y..LLN--DT.FQH..M.....YD..P.VGLMADS.Q.MLDRW.QLISQDS.-LEV..D..L
CYP4A7rabb	98	ICYD..YM.TI.GRSD--PKARVS.SF.A..I.Y..LLE--DT.FQH..M.....YD..P.VGLMVDS.CVMLDKL..L.RKDAP-LEIYEHV.L
CYP4Y3v5	96	-----
CYP4Y3v4	94	-----A.....
CYP4Y3v3	95	-----E.....
CYP4Y3v2	94	-----
CYP4Y3v1	96	SLVHPDSSVKVLLKTAEPKIVGHGPTTYRLLIPHLGEGLLIAG--GKWARSRRLTPAFHFEILKGYQTINNOQVCDILINIMEKVADTGES-FDLFQLISN
CYP102	149	L...T.GLCC.N.RF.SFYR-DQP..FITSHVRLADE.MNKLQR-ANPD.PA.DENK--RQ.QEDIKVNDLV.KI.AD..ASGEQSDD-----
CYP4F3hs	198	M...SLQKCV..PDSH..EK--PSE.IA..L.LSA.VTK.HQOILYI.FL.VL.P..QR.RRA.RLV.DFT.A..QE.RRTLPSQ.VDDFLQA.AKS.
CYP4F11hs	198	M...SLQKCV..FES...EK--PSE.IA..L.LSAFVEK..QOI.LMT.FL.VL.P..QR.RRA.HLV.DFT.A..QE.RCTLPTQ.IDDFLKN.AKS.
CYP4A4rabb	192	M...T.MKC...QGSV.L..NS..IQ..NDLNN.VFY.A..VFHCS.FL.RLSPE..R..HRA.QLA.EHT.R..QQ..AQLQOE.E---LEKVR.R
CYP4A5rabb	192	M...T.MKC...QGSV.L.S.NSQ..IQ.VGD.LNN.VFA.V..VFHCS.T..RLSPE..R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ..AQLQOE.E---LEKVR.R
CYP4A6rabb	192	M...T.MKC...HQGSV.L..NSQ..IQ.VGD.LNN.VFS.V..VFHCS.T..RLSPE..R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ..AQLQOE.E---LEKVR.R
CYP4A7rabb	192	M...ET.MKC...HQGSV.LES.TSK..IQ.VR.LSD..LQ.V..VFHCS.FL.RLSPE..R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ..AQLQOE.E---LEKVR.R
CYP4Y3v5	193	-----
CYP4Y3v4	191	-----Y.....
CYP4Y3v3	192	-----
CYP4Y3v2	191	-----
CYP4Y3v1	193	CTLDIILQSAFYSKTNCOHD-RLOHSYCKAITEVTKLAGRRNRLNLMFDIIYNMHTSDGKLFKONCDYIHSVADSVIDSRK-KILDNGQ-----KDVKK
CYP102	233	H                    I                    SRS-2                    J                    SRS-3                    J'                    K
CYP4F3hs	295	---L.THM.NG..P.T.EPLDEN..YQIIL.LIA..E..SGLL.FA..F.V.N.HVLQKAAE.AARV.VDP---VPSYKQKQLKYGVMVNL.AL..WP
CYP4F11hs	295	T...I.V..LS..-D.KKL.DE...A.....A..SL.V..H.....ER.RQ..QEL.KDRE.KEIE...AQLP..M...SL...P
CYP4A4rabb	288	R...V..F..M...SSL.DC.L.....A..SV..F.A..T..H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT.EH.DMPYT.M...A...YP
CYP4A5rabb	289	R...V..F..M...SSL.DC.L.....A..SV..F.A..T..H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT.EH.DMPYT.M...A...YP
CYP4A6rabb	288	R...V..F..M...SSL.DC.L.....A..SV..F.A..T..H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT.EH.DMPYT.M...A...YP
CYP4A7rabb	289	R...V..F..M...SSL.DC.L.....A..SV..F.A..T..H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT.EH.DMPYT.M...A...YP
CYP4Y3v5	285	-----A.....
CYP4Y3v4	283	-----S.....
CYP4Y3v3	284	-----
CYP4Y3v2	283	-----
CYP4Y3v1	285	YLDLFDILLSAKD-ENGIGMSKIDIRAEVDTFMPEGHDTTISAISWILYDLAKHPEYQKMCQNEVDKALENN-PGFVKWDDLQKFEFLTQCKIEGMRHS
CYP102	328	β5                    β6                    β7                    β8                    SRS-4                    L                    β9
CYP4F3hs	394	TA.AP.LYAKEDTV.GGEYPLEK.DELHVL.PQ..RDKTI.GDDVEE.R.E..ENP--SAIPQH..K..GN.Q.A...Q..LH.ATLVLGHM.KH.DF.
CYP4F11hs	394	..V..CC.QDIV.PD.RVI.K.IICL.SVF.T.....PD-.EVY..F..DPK.IKERSPL..I.....A..A.M.VVLGLT.L..RVL
CYP4A4rabb	385	..SVT.CLS.PV.FPD.RSL.K.VILFSL...Y..K..Q..EV..F..AP--SAYH.H..L..G.A...KQ...R.L.VAVALT.V..E.L
CYP4A5rabb	386	..A...DLSSPV.FPD.RSL.K.FVTLS.....N..P..EV..G..TPG--SARH.H..L..G.A...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4A6rabb	385	..GVG.CLSSPV.FPD.RSL.K.VIVTSL..A...K..P..EV..FP.APG--SARH.H..L..G...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4A7rabb	386	..GVGSKLSSPV.FPD.RSL.K.IIITLS.....K..P..EV..S..APG--SARH.H..L..G.S...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4Y3v5	383	-----M.....
CYP4Y3v4	381	-----M.....
CYP4Y3v3	382	-----M.....
CYP4Y3v2	381	-----M.....
CYP4Y3v1	383	PVPLIRSESTKEFTL-EGITFPFGTFGIIYGLHHPAVWNTN-PTKDPDRFSKDNATKVDVFAFTFSAAGPRNCGHQHFAMNEEKLTILRILERFTLE
CYP102	426	SRS-5                    B10                    B11                    B12
CYP4F3hs	493	DHTNYELDIHETLTKPEGFVVKAKSKRIPLG..PSPSTEQSAKKVR
CYP4F11hs	493	HT-EPRRRPEL.L.AE-----G.LWLRVEPLS-----
CYP4A4rabb	482	THT-EPRRRPELIL.AE-----G.LWLRVEPLGANSQ-----
CYP4A5rabb	483	TRIP.IARV.LK.K-----HLRLRKLH-----
CYP4A6rabb	482	TRIP.KARL.LK.N-----HLRLRKLQ-----
CYP4A7rabb	483	KRVDPQPR.LK.S-----HLRLRKLK-----
CYP4Y3v5	481	-----
CYP4Y3v4	479	-----
CYP4Y3v3	480	-----
CYP4Y3v2	479	-----
CYP4Y3v1	481	PDPDHTVSPHNAVNRSS-----NGIKCIAKRRE-----
		SRS-6

CYP102	1	-----MTIKEMPQPK-----TF.E.KNLP LLNTDKPV.ALMKIADELGEIFKFEA.GRVTR
CYP4F3hs	1	MPQLSLSLGLG.WPMAA.PWLLLLL.GASWLLA.I.AWTYTFYDNCRR.RCFPQPPKRN.FL.H.G.IH-SSEEGLLYTO..ACT.GDMCCW.V..WHAI.
CYP4F11hs	1	MPQLSLSLGLG.GPVAA.PWLLLLL.GGSWLLA.V.AWTYTFYDNCRR.QCFPQPPKRN.FW.HQG.VT-PTEEGMKTLTO.VTTY.QGPKL.L..TF.LL
CYP4A4rabb	1	MSVSALSPTTR.P..LSGLLQVAALLGLLLLLLAKAQLYLHRQWLLR..QQFPCCPP-F..LL.HSREFQ-..QE-LEK.QKWEK..GACPW.LSGNKARL
CYP4A5rabb	1	MSVSALSPTTR.P..LSGLLQVAALLGLLLLLLAKAQLYL.RQWLLR..QQFPCCPP-F..LL.HSREFQ-MNQE-LQ..LKUVEK..RACPH.I.GNKVR.
CYP4A6rabb	1	MSVSAL.PTR.P..LSGLLQVAGLLGLLLLLLAKAQLYLHRQWLLR..QQFPCCPP-F..LL.HSREFQ-..GHE-LQVMLKUVEK..SACPR.LWGSRAHL
CYP4A7rabb	1	MSVSALSSTR.P..FSGFLQAAALLGLLLLLLAKAQLYL.RQWLLR..QQFPCCPP-S..LL.HSREFP-I..E-LQ.VLKRVEK..SACPR.LWGSSEFL
CYP4Y4v6	1	-----
CYP4Y4v5	1	-----
CYP4Y4v4	1	-----
CYP4Y4v3	1	-----P-----
CYP4Y4v2	1	-----S-----
CYP4Y4v1	1	-----MANISFLSGSIYSTAFFGITVYVYFFVYVIRYLKIFQRMRYFFDALPGYSTEQ-KHWIRGNLHLVVKIDSIDVWQISSLTKRFPKFRVWFVGFPTPVV
CYP102	52	Y.SSORLI.EACDESR-FIKNLSQALKFVRDFA.D..FTSWTHEKN.KKANNI.L.S.SQOAM..HAMMVDIAVQ.VOKU.RLN--ADEHIEVPEDMTR
CYP4F3hs	100	RIF..TYI.PV.FAPAAIVPKDKVF.SF.K...D..LSA--E..S.H..M.....N...P.MK.F.ES.NIMHAKWQLL.SE.SARL.M.EH..L
CYP4F11hs	100	I.C...IIRPITSASAAVPKDMIF.GF.K...D..LS--D..S.H..M.....N...P.MK.F.KS.NIMHDKWQRL.SE.SARL.M.EH..L
CYP4A4rabb	98	LVYD..YL..I.GRSD--PKAPRN.KLMT..I.Y..LLD--DT.FQH..M.....YD...P.VGLMVDS.QIMLDRU.QLISQDS--LEI..HV.L
CYP4A5rabb	98	Q.YD..YM..I.GRSD--PKSRGS.TFVA..I.Y..LLN--DP.FQH..M.....YD...P.VGLMVDS.QIMLDRU.QLVQDS--LEV..D..L
CYP4A6rabb	98	LIYD..YM..I.GRSD--PKAQS..F.A..I.Y..LLN--DT.FQH..M.....YD...P.VGLMADS.QIMLDRU.QLVQDS--LEV..D..L
CYP4A7rabb	98	ICVD..YM..TI.GRSD--PKARVS.SF.A..I.Y..LLE--DT.FQH..M.....YD...P.VGLMVDS.QVMLDKL..L.RKDAP-LEIYEHV.L
CYP4Y4v6	95	-----
CYP4Y4v5	95	-----
CYP4Y4v4	96	-----
CYP4Y4v3	96	-----
CYP4Y4v2	95	-----
CYP4Y4v1	96	SLVHPDSVKVLLKTAEPKFGVGHGPTTYRTLIPWLGEGLLIAG--GSKVARSRLLTAFHFEILKGYQTINNQCVDTLINIMEKYADTGES-FDLFQLISN
CYP102	149	L...T.GLCCG.N.RF.SFYR-DQP.FFITSHVRLDE.MNKLOR-ANPD.PA.DENK--RQ.QEDIRVNDLV.KI.AD..ASG-----EQ
CYP4F3hs	198	M...SLQKCV..FDSH..EK--PSE.IA..L.LSA.VTK.HQOI.LYI.FL.YL.P..QR.RRA.RLV.DFT.A..QE.RRT.PSQ.VDFLQA.AKS.
CYP4F11hs	198	M...SLQKCV..F.S...EK--PSE.IA..L.LSAFVEK..QOI.LHT.FL.YL.P..QR.RRA.RLV.DFT.A..QE.RCT.PQ.IDDFLKN.AKS.
CYP4A4rabb	192	M...T.MKC...QGSV.L..NSQ..IQ..NDLNN.VFY.A..VFHCS.FL.RLSPE.R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ..AQ.QQE.E--LEKVR.R
CYP4A5rabb	192	M...T.MKC...QGSV.L.S.NSQ..IQ.VGDLNN.VFA.V..VFHCS.T..RLSPE.R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ..AQ.QQE.E--LEKVR.R
CYP4A6rabb	192	M...T.MKC...HOGSV.L..NSQ..IQ.VGDLNN.VFS.V..VFHCS.T..RLSPE.R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ..AQ.QQE.E--LEKVR.R
CYP4A7rabb	192	M...ET.MKC...HOGSV.LES.TSK..IQ.VR.LSD..LQ.V..VFHCS.FL.RLSPE.R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ..AQ.QQE.E--LEKVR.R
CYP4Y4v6	192	-----
CYP4Y4v5	192	-----
CYP4Y4v4	193	-----
CYP4Y4v3	193	-----
CYP4Y4v2	192	-----
CYP4Y4v1	193	CTLDIILQSAFSYETNCQHD-RLQHSYCKATTEVTKLASRRNRNPLMMDIITYNMTSDGKLFKQNCIDYIHSVADSVIDSRKKIL-DNGQ-----KDVKK
CYP102	231	SD.L.THM.NG..P.T.EPLDDEN..YQIT..LIA..E..SGLL.FA..F.V.N.HVLOKAAE.AARV.VDP--VPSYKQVKQLKYVGMVNL.AL..WP
CYP4F3hs	295	T...I.V..LS..-D.KKL.DE...A...A..L.V..H.....EQ.RQ..QEL.KDRE.KEIE...AQLP..M...SL..P
CYP4F11hs	295	T...I.V..LS..-D.KEL.DE...A...A..L.V..H.....EQ.RQ..QEL.KDRE.IEIE...AQLP..M...SL..P
CYP4A4rabb	288	R...V..F..M...SSL.DC.L...A..SV..F.A..T..H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT.EH.DMPYT.M...AL..YP
CYP4A5rabb	289	R...V..F..M...SSL.DC.L...A..SV..F.A..T..H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT.EH.DMPYT.M...AL..YP
CYP4A6rabb	288	R...V..F..M...SSL.DC.L...A..SV..F.A..T..H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT.EH.DMPYT.M...AL..YP
CYP4A7rabb	289	R...V..F..M...SSL.DC.L...A..SV..F.A..T..H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT.EH.DMPYT.M...AL..YP
CYP4Y4v6	284	-----
CYP4Y4v5	284	-----
CYP4Y4v4	285	-----
CYP4Y4v3	285	-----
CYP4Y4v2	284	-----
CYP4Y4v1	285	YLDFLDILLSAKD-ENGIGMSKIDTRAQVDFPHFGHDTTTSATSWILYDLAKHPEYORKMCQNEVDKALENN-PGFVVRDDDLGKFEFLTQCIRKGMRLHS
CYP102	328	TA.AFLVYKEDTV.GGEYPLEK.DELMVL.PG..RDKTI.GDDVE.R.E..ENP--SAIPQH..K..GN.Q.A...Q..LH.ATLVGLGHM.KH.DF.
CYP4F3hs	394	...AV..CC.QDIV.PD.RVI.K.IICL.SVF.T...PD--EVY..F..DPK.IKERSPL..I...A...A.M.VVLGLT.L..RVL
CYP4F11hs	394	...V..CC.QD.V.PD.RVI.K.IVCL..I..I.Y..T..PD--EVY..F..DQE.IKERSPL..I...A...A.M.VVVALT.LH.RIL
CYP4A4rabb	385	...SVT..LS.PV.FPD.RSL.K.VILFSL...Y..K..Q..EV..F..AP--SAYH.H..L..G.A...KQ...R.L.VAVALT.V..E.L
CYP4A5rabb	386	...A...LSSPV.FPD.RSL.K.FTVLS...N..P..EV..G..TPG--SARH.H..L..G.A...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4A6rabb	385	...GVG..LSSPV.FPD.RSL.K.VIVTSL..A...K..P..EV..FP.APG--SARH.H..L..G.A...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4A7rabb	386	...GVGSKLSSPV.FPD.RSL.K.IIITLS...K..P..EV..S..APG--SARH.H..L..G.S...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4Y4v6	382	-----E-----
CYP4Y4v5	382	-----E-----
CYP4Y4v4	383	-----I-----
CYP4Y4v3	383	-----
CYP4Y4v2	382	-----
CYP4Y4v1	383	PVPLISRSSTKEFTL-EGITFPPTFFGINIYGLHHPAVWTM-PTKFDPRFSDKDNATKMDSFATPFSAGPRICIGQHFAVNEEKLITRILERFTLE
CYP102	426	DHINYELDIKTELTKPEGFFVVKAKSKKIPLG..PSPSTEQSAKKVR
CYP4F3hs	493	..HT-EPRRPEL.L.AE-----G.LWLRVEPLS
CYP4F11hs	493	..THT-EPRRPELIL.AE-----G.LWLRVEPLGANSQ
CYP4A4rabb	482	..TRIPI..ARV.LK.K-----HLRLRKLH
CYP4A5rabb	483	..TRIPK..ARL.LK.M-----HLRLRKLQ
CYP4A6rabb	482	..KRVPDQPR.LK.S-----HLRLRKLH
CYP4A7rabb	483	..TRVPI..TRL.LK.K-----HLRLRKLH
CYP4Y4v6	480	-----V-----
CYP4Y4v5	480	-----V-----
CYP4Y4v4	481	-----
CYP4Y4v3	481	-----
CYP4Y4v2	480	-----
CYP4Y4v1	481	PDPDHTVSPHMAAVMRSE-----NGIKCIAKRRKE-----



CYP102	1	-----MTIKEMPQPK---TF.E.KNLPLLNTDKPV.ALHKIADELGEIFKFEA.GRVTR
CYP4F3hs	1	MPQLSLSSLG.WPMAA.PWLLLLL.GASWLLA.I.AWTYTFYDNCRR.RCFPPQPKRN.FL.H.G.IHS-SEEGLLYTQS.ACT.GDMCCW.V.V.WHAI.
CYP4F11hs	1	MPQLSLSWLG.GPVAA.PWLLLLL.GGSWLLA.V.AWTYTFYDNCRR.QCFPPQPKQN.FW.HQG.VTP-TEEGMKTTLQ.VTTY.QGFKL.L.TF.LL
CYP4A4rabb	1	MSVSALSPTR.P..LSGLLQVAALLGLLLLLAKAAQYLHRQWLLR..QQFPCPP-F..LL.HSREFQN-QE-LEK.QKWEK..GACPW.LSGNKARL
CYP4A5rabb	1	MSVSALSPTR.P..LSGLLQVAALLGLLLLLAKAAQYL.RQWLLR..QQFPCPP-F..LL.HSREFQN-NQE-LQ..LKWVEK..RACPH.I.GNKVR.
CYP4A6rabb	1	MSVSAL.PTR.P..LSGLLQVAGLLGLLLLLAKAAQYLHRQWLLR..QQFPCPP-F..LL.HSREFQN-GHE-LQVMLKWEK..SACPR.LWGSRAHL
CYP4A7rabb	1	MSVSALSSTR.P..FSGFLQAAALLGLLLLLAKAAQYL.RQWLLR..QQFPCPP-S..LL.HSREFPI-..E-LQ.VLKRVEK..SACPR.LWGSLEFL
CYP4Y5v3	1	----A.....V.....Y.....E.....
CYP4Y5v2	1	.....A.....N.....
CYP4Y5v1	1	-----NISFLSGSIYSTAFFGITVYIFVIVIRYLIKFORMRHFDDALPGYSTKQ-KHWIRGNLHLYVKNDSIDVNOQNTLRRFPKFRVWFPGFPTPVV
		B                    β2                    B'                    C                    D                    D'                    E
CYP102	52	Y.SSQRLI.EACDES.RFDKNLSQALKFVRDFA.D..FTSWTHEKN.KKAHNI.L.S.SQAM...HAMMVDIAVQ.VQKW.RLN--ADEHIEVPEDMTR
CYP4F3hs	100	RIF..TYI.PV.FAPAAIIVPKDKVF.SF.K...D..LSA--E..S.H..M.....N...P.MK.F.ES.N.MHAKWQLL.SE.SARL.M.EH..L
CYP4F11hs	100	I.C...IIRPITSASAAVAIPKDMIF.GF.K...D..LS--D..S.H..M.....N...P.MK.F.KS.N.MHDKWQRL.SE.SARL.M.EH..L
CYP4A4rabb	98	LVDY..YL..I.GRSD--PKAPRN.KLMT..I.Y...LLD--QT.FQH..M.....YD...P.VGLMVD.S.Q.MLDRW.QLISQDS--LEI..HV.L
CYP4A5rabb	98	Q.YD..YM..I.GRSD--PKSRGS.TFVA..I.Y...LLN--QP.FQH..M.....YD...P.VGLMVD.S.Q.MLDRW.QLVSQDS--LEV..D..L
CYP4A6rabb	98	LIYD..YM..I.GRSD--PKAQGS.F.A..I.Y...LLN--QT.FQH..M.....YD...P.VGLMVD.S.Q.MLDRW.QLVSQDS--LEV..D..L
CYP4A7rabb	98	ICYD..YM..TI.GRSD--PKARVS.SF.A..I.Y...LLE--QT.FQH..M.....YD...P.VGLMVD.S.QVMLDK..L.RKDAP-LEIYEHV.L
CYP4Y5v3	95	.....M.....
CYP4Y5v2	94	.....R.....
CYP4Y5v1	94	SLVHPDSVVKLLKTAEPKLVGHGPTVYRTLIPWLGEGLLIAG--SKWARSRLLTTPAFHFELKGYQTINNOQVDILINILEKYADTGES-FDLQQLISN
		SRS-1                    F                    G
CYP102	149	L...T.GLCG.N.RF.SFYR-DQP..FITSWVRLDE.MNKLQR-ANFD.PA.DE--NKRQ.QEDIKVHNDLV.KI.AD..ASGEQSD-----
CYP4F3hs	198	M...SLQKCV.FDSH..EK--PSE.IA..L.LSA.VTK.HQOI.LYI.FL.YL.P..QR.RRA.RLV.DFT.A..QE.RRT.PSQGVDDFLQA.AKS.
CYP4F11hs	198	M...SLQKCV.F.S..EK--PSE.IA..L.LSAFVEK..QOI.LHT.FL.YL.P..QR.RRA.HLV.DFT.A..QE.RCT.PTQGIIDFLKN.AKS.
CYP4A4rabb	192	M...T.MKC...QGSV.L.-NS...IQ..NDLNN.VFY.A..VFHCS.FL.RLSPE.R..HRA.QLA.EHT.R..QQ..AQ.QOEGE--LEKVR.R
CYP4A5rabb	192	M...T.MKC...QGSV.L.S.NSQ...IQ.VGLN.VFA.V..IFHCS.T..RLSPE.R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ..AQ.QOEGE--LEKVR.R
CYP4A6rabb	192	M...T.MKC...HQGSV.L.-NSQ...IQ.VGLN.V.FS.V..VFHCS.T..RLSPE.R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ..AQ.QOEGE--LEKVR.R
CYP4A7rabb	192	M...ET.MKC...HQGSV.LES.TSK..IQ.VR.LSD..LQ.V..VFHCS.FL.RLSPE.R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ..AQ.QOEGE--LEKVR.R
CYP4Y5v3	192	.....S.....
CYP4Y5v2	191	.....P.....
CYP4Y5v1	191	CTLDIILQSASFSYETNCQHD-RLQHSYCKAITVETKLASRRNRNPLMFDIINYMTSDGKLFKQNCDYIHSVADSVIDSRKILDNGQ-----KDVKK
		H                    I                    SRS-2                    J                    SRS-3                    J'                    K
CYP102	232	--.L.THM.NG..P.T.EPLDDEN..YQIT..LIA..E..SGLL.FA.YF.V.N.HVLQKAAE.AARV.VDPVP--SYKQVKQLKYGVHVLN.AL..WP
CYP4F3hs	295	T...I.V..LS..-D.KKL.DE...A.....A.....SL..V.YH.....EQ.RQ..QEL.KDREPKIE...AQLP..M...SL...P
CYP4F11hs	295	T...I.V..LS..-D.KEL.DE...A.....A.....GL..V.YH.....EQ.RQ..QEL.KDREPIEIE...AQLP..M...SL...P
CYP4A4rabb	288	R...V..F..M...SSL.DC.L.....A.GV...FYA..T..H.HR.RE.IQGL.GDGAS--IT.EH.DQMPYT.M...AL..YP
CYP4A5rabb	289	R...V..F..M...SSL.DC.L.....A.GV...FYA..T..H.HR.RE.IQGL.GDGAS--IT.EH.DQMPYT.M...AL..YP
CYP4A6rabb	288	R...V..F..M...SSL.DC.L.....A.GV...FYA..T..H.HR.RE.IQGL.GDGAS--IT.EH.DQMPYT.M...AL..YP
CYP4A7rabb	289	R...V..F..M...SSL.DC.L.....A.GV...FYA..T..H.HR.RE.IQGL.GDGAS--IT.EH.DQMPYT.M...AL..YP
CYP4Y5v3	284	.....P.....
CYP4Y5v2	283	.....R.....
CYP4Y5v1	283	YLDLFDLILLSAKD-ENGIKMSKTDIRAEVDTFMFEGHDTTTSASWILFDLAKHPYQKMCQNEVDKALENNPG-FVRVDDLGKFEFLTCCIKEGMRLHS
		β5                    β6                    β7                    β8                    K'                    SRS-4                    L                    β9
CYP102	328	TA.AFLAKEDTV.GGEYPLEK.DELMVL.PQ..RDKTI.GDDVEE.R.E..ENP--SAIPQH..K..GN.Q.A...Q..LH.ATLVLGHH.KH.DF.
CYP4F3hs	394	...AV..CC.QDIV.PD.RVI.K.IICL.SVF.T...P..PD--EVY..F..DPK.IKERSPL..I.....A..M.VVLGLT.L..RVL
CYP4F11hs	394	...V..CC.QD.V.PD.RVI.K.IVCL...I.I.Y.PT..PD--EVY..F..DQE.IKERSPL..I.....A..M.VVLALT.LH.RIL
CYP4A4rabb	385	...SVT...LS.PV.FPD.RSL.K.VILFSL...Y.PK..Q..-EV..F..AP--SAYH.H..L..G.A...KQ...R.L.VAVALT.V..E.L
CYP4A5rabb	386	...A..LSSPV.FPD.RSL.K.FVTLS...PN..P..-EV..G..TPG--SARH.H..L..G.A...KQ...N.L.VAVALT.V..E.L
CYP4A6rabb	385	...GVG..LSSPV.FPD.RSL.K.VIVTLS..A...PK..P..-EV..FP.APG--SARH.H..L..G...KQ...N.L.VAVALT.V..E.L
CYP4A7rabb	386	...GVGSKLSSPV.FPD.RSL.K.IIITLS...PK..P..-EV..S..APG--SARH.H..L..G.S...KQ...N.L.VAVALT.V..E.L
CYP4Y5v3	382	.....N.....
CYP4Y5v2	381	.....N.....
CYP4Y5v1	381	EVPLISRCSTKEFTL-EGITFPFGTFPGINIGLHNSAVWTN-PTKFPDRFSKDNATKNDFAFTPSAGPRNICGQHFAMSEKTLITRILERFTLE
		SRS-5                    β10                    β11                    β12
CYP102	426	DHTNVELDIKELTLKPHGFVVKAKSKKIPLG..PSPSTEQSAKVR
CYP4F3hs	493	..HT-EPRRPEL.L.AE-----G.LVLRVEPLS----
CYP4F11hs	493	..THT-EPRRPELIL.AE-----G.LVLRVEPLGANSQ----
CYP4A4rabb	482	...TRIP.I.IARV.LK.R-----HLRLRKLH----
CYP4A5rabb	483	...TRIP.K.IARL.LK.N-----HLRLRKLQ----
CYP4A6rabb	482	...KRVPDQPR.LK.S-----HLRLRKLH----
CYP4A7rabb	483	...TRVPI.ITRL.LK.R-----HLRLRKLH----
CYP4Y5v3	480	.....N.....
CYP4Y5v2	479	.....N.....
CYP4Y5v1	479	PDPDHTVSPHMAAVMRSE-----NGIKCIAKRKE-----
		SRS-6

CYP102	1	-----MTIKEMPQPK---TF.E.KNLPLLNTDKPV.ALMKIADLGEIFKFEA.GRVTR
CYP4F3hs	1	MPQLSLSSLG.WPMAA.PWLLLLL.GASULLA.I.AWTYTFYDNCRR.CCFPQPPKRN.FL.H.G.IH-SSSEGLLYTQS.ACT.GDMCCV.V.UHAI.
CYP4F11hs	1	MPQLSLSWLG.GPVAA.PWLLLLL.GGSULLA.V.AWTYTFYDNCRR.CCFPQPPKRN.FW.HQG.VT-PTTEGMKTLTQ.VTTY.QGFKL.L.TF.LL
CYP4A4rabb	1	MSVSALSPT.R.P.LSGLLQVAALLGLLLLLLKAQLYLHRQWLLR..QQFPQPP-F.LL.HSREFQ-.QE-LE.R.QKWVEK..GACPW.LSGNKARL
CYP4A5rabb	1	MSVSALSPT.R.P.LSGLLQVAALLGLLLLLLKAQLYLHRQWLLR..QQFPQPP-F.LL.HSREFQ-MNQE-LQ..LKWVEK..RACPH.I.GNKVR.
CYP4A6rabb	1	MSVSAL.PTR.P.LSGLLQVAALLGLLLLLLKAQLYLHRQWLLR..QQFPQPP-F.LL.HSREFQ-.GHE-LQVHLKWVEK..SACPR.LWGSRAHL
CYP4A7rabb	1	MSVSALSSTR.P..FSGFLQAAALLGLLLLLLKAQLYL.RQWLLR..QQFPQPP-S.LL.HSREFP-I..E-LQ.VLKRVEK..SACPR.LWGSSEFL
CYP4Y6v4p	1	-----K.....
CYP4Y6v3	1	-----S.....
CYP4Y6v2	1	-----S.....
CYP4Y6v1	1	-----ANISFLSGSIYSTAFFGITVYIFFVIRVYLIKQRMHFDDALPGYSTKQ-KHWIRGNLHLVVKNDSDVNVQINTLRRFPKRYRVWFQPFPTPVV
CYP102	52	Y.SSQRLLT.EACDESR-FDKNLSQALKFVRDFA.D..FTSWTHEKN.KRAHNI.L.S.SQAM...HAMMVDIAVQ.VQKW.RLN--ADEHIEVPEDMTR
CYP4F3hs	100	RIF..TYI.PV.FAPAAIVPKDKVF.SF.K...D..LSA--E..S.H..M...N...P.MK.F.E.S.N.MHAKWQLL.SE.SARL.M.EH..L
CYP4F11hs	100	I.C...IIRPITSASAAVAPKDMIF.GF.K...D..LS--D..S.H..M...N...P.MK.F.KS.N.MHDKWQRL.SE.SARL.M.EH..L
CYP4A4rabb	98	LVIYD..YL..I.GRSD--PKAPRN.KLMT..I.Y...LLD--QT.FQH..M...YD..P.VGLMVDS.Q.MLDRW.QLISQDS--LEI..HV.L
CYP4A5rabb	98	Q.YD..YM..I.GRSD--PKSRGS.TFVA..I.Y...LLN--QP.FQH..M...YD..P.VGLMVDS.Q.MLDKW.QLVSQDS--LEV..D..L
CYP4A6rabb	98	LIYD..YM..I.GRSD--PKAQGS.F.A..I.Y...LLN--QT.FQH..M...YD..P.VGLMADS.Q.MLDRW.QLVSQDS--LEV..D..L
CYP4A7rabb	98	ICYD..YM.TI.GRSD--PKARVS.SF.A..I.Y...LLE--QT.FQH..M...YD..P.VGLMVDS.QVMLDK...L.RKDAP--LEIYEHV.L
CYP4Y6v4p	95	-----I.....
CYP4Y6v3	94	-----I.....
CYP4Y6v2	94	-----I.....
CYP4Y6v1	95	SLVHPDSSVKVLLKTAEPKPVGHGPTVRYLIPHLGEGLLIAG--GSKWARSRLLPAPHFELIKGYQTINNOCVLDLILNILEKVAADGES-FDLFQLISN
CYP102	149	L...T.GLGG.N.RF.SFYR-DQP.FFITSHVRALDE.MNKLQR-ANFD.PA.DENK--RQ.QEDIRVLDLV.KI.AD..ASGEQSDD-----
CYP4F3hs	198	M...SLQKCV..FDSH..EK--PSE.IA..L.LSA.VTK.HQOI.LYI.FL.YL.P...QR.RRA.RLV.DFT.A..QE.RRT.PSQ.VDDFLQA.AKS.
CYP4F11hs	198	M...SLQKCV..FES..EK--PSE.IA..L.LSAFVEK..QOI.LHT.FL.YL.P...QR.RRA.HLV.DFT.A..QE.RCT.PTO.IDDFLKN.AKS.
CYP4A4rabb	192	M...T.MKC...QGSV.L..NS..IQ..NDLNN.VFY.A.V.VFHQS.FL.RLSPE.R..HRA.QLA.EHT.R..QQ.AQ.QQE.E--LEKVR.R
CYP4A5rabb	192	M...T.MKC...QGSV.L.S.NSQ..IQ.VGDLMN.VFA.V..IFHQS.T..RLSPE.R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ.AQ.QQE.E--LEKVR.R
CYP4A6rabb	192	M...T.MKC...HQGSV.L..NSQ..IQ.VGDLMN.FFS.V..VFHQS.T..RLSPE.R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ.AQ.QQE.E--LEKVR.R
CYP4A7rabb	192	M..ET.MKC...HQGSV.LES.TSK..IQ.VR.LSD..LQ.V..VFHQS.FL.RLSPE.R..SHRA.QLA.EHT.R..QQ.AQ.QQE.E--LEKVR.R
CYP4Y6v4p	192	-----C.....G.....H.....N.....
CYP4Y6v3	191	-----Y.....M.....N.....
CYP4Y6v2	191	-----Y.....M.....N.....
CYP4Y6v1	192	CTLDIILQSAFYSKTNQCHD-RLQHSYCKAITEVTKLASRBNMPLMMFDIIVNTTSDGKLEKQNCYIHSVADSVIDSRKKILD-DGQ-----KDVKK
CYP102	233	---L.THM.NG..P.T.EPLDDEN..YQIIL.LIA..E..SGLL.FA..F.V.N.HVLQKAAE.AARV.VDP---VPSYKQVKQKLYVGHVNLN..AL..WP
CYP4F3hs	295	T...I.V..LS..-D.KKL.DE...A...A..L.V..H...ER.RQ..QEL.KDRE.KEIE.D..AQLP...M...SL..P
CYP4F11hs	295	T...I.V..LS..-D.KEL.DE...A...A..L.V..H...EQ.RQ..QEL.KDRE.IEIE.D..AQLP...M...SL..P
CYP4A4rabb	288	R...V..F..M...SSL.DQ.L...A...A..V...F.A..T...H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT..H.DMPYT.M...AL..YP
CYP4A5rabb	289	R...V..F..M...SSL.DQ.L...A...A..V...F.A..T...H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT..H.DMPYT.M...AL..YP
CYP4A6rabb	288	R...V..F..M...SSL.DQ.L...A...A..V...F.A..T...H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT..H.DMPYT.M...AL..YP
CYP4A7rabb	289	R...V..F..M...SSL.DQ.L...A...A..V...F.A..T...H.HR.RE.IQGL.GDG--ASIT..H.DMPYT.M...AL..YP
CYP4Y6v4p	284	-----G.....F.....
CYP4Y6v3	283	-----F.....
CYP4Y6v2	283	-----F.....
CYP4Y6v1	284	YLDIFLDILLSAKD-ENGIGSKTIDIRAVDTEMEEGDITTSLSIMVLDLAKHPEYQKMCQNEVDKALENN-PGIVKWEDLGKFEFLTQCIKEGMRIHS
CYP102	328	TA.AF.LYAKEDTV.GGEYPLEK.DELMVL.PQ..RDKTI.G.DVEE.R.E..ENP--SAIPQH..K..GN.Q.A...Q..LH.ATLVLGMH..H.DF.
CYP4F3hs	394	...AV..CC.QDIV.PD.RVI.K.IICL.SVF.T...P..EVY..F..DPK.IKERSPL..I...A...A.M.VVLGLT.L..RVL
CYP4F11hs	394	...V...CC.QD.V.PD.RVI.K.IVCL..I.I.Y.T.P..EVY..F..DOE.IKERSPL..I...A...A.M.VVLGLT.LH.RIL
CYP4A4rabb	385	...SVT..LS.PV.FPD.RSL.K.VILFSL...Y..K..QN--EV..F..AP--SAYH.H..L..G.A...KQ...R.L.VAVALT.V..E.L
CYP4A5rabb	386	...A...DLSSPV.FPD.RSL.K.FVTLS...N..PN--EV..G..TPG--SARH.H..L..G.A...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4A6rabb	385	...GVG..LSSPV.FPD.RSL.K.VIVTSL..A...K..PN--EV..FP.APG--SARH.H..L..G.S...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4A7rabb	386	...GVGK.LSSPV.FPD.RSL.K.IIITLS...K..PN--EV..S..APG--SARH.H..L..G.S...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4Y6v4p	382	-----T.....
CYP4Y6v3	381	-----A.....
CYP4Y6v2	381	-----A.....
CYP4Y6v1	382	EVPLISRCSTREFTL-EGITFPPTGTFGGINIYGLHNPVAVTDP-PTKFPDRFSKDNATKMSDFATPFSAGFRNCIGQHFAMNEKTLITRILKRFTLE
CYP102	426	DHINVELDKETLTKRPEGFVVKAKSKKIPLG..PSPSTEQSAKKVR
CYP4F3hs	493	..HT-EPRRKP.LL.AE-----G.LWLRVEPLS
CYP4F11hs	493	..THT-EPRRKP.LL.AE-----G.LWLRVEPLGANSQ
CYP4A4rabb	482	..TRIP.IARV.LK.K-----HLRLRKLH
CYP4A5rabb	483	..TRIPK.TARL.LK.N-----HLRLRKLQ
CYP4A6rabb	482	..KRVPDQKPR.LK.S-----HLRLRKLK
CYP4A7rabb	483	..TRVPI.ITRL.LK.K-----HLRLRKLH
CYP4Y6v4p	480	-----
CYP4Y6v3	479	-----
CYP4Y6v2	479	-----
CYP4Y6v1	480	PDPDHTVSPHMAAVMRSE-----NGIKCIAKRRE-----

CYP102	1	-----HTIKEMPQPK---TF.E.KNLP LLNTDKPV.ALMNKIADLGEIFKFEA.GRVT
CYP4F3hs	1	.PQL.LSSLG.WPMAA.PWLLLLL.GASULLA.I.AWYTYFYDNCRR.CCFPQPKRN.FL.H.G.IH-SSEEGLLYTQS.ACT.GDMCCU.V..WHAI.
CYP4F11hs	1	.PQL.LSWLG.GPVAA.PWLLLLL.GGSULLA.V.AWYTYFYDNCRR.CCFPQPKRN.FW.HQ.G.VT-PTEEGMKTL.Q.VTTY.QGFKL.L..TF.LL
CYP4A4rabb	1	.SVSALSPTTR.P..LSGLLQVAALLGLLLLLKKAAQLYLHRQULLR..QQFPCPP-F..LL.HSREFQ-QE-LER.QKWVEK..GACPW.LSGNKARL
CYP4A5rabb	1	.SVSALSPTTR.P..LSGLLQVAALLGLLLLLKKAAQLYL.RQULLR..QQFPCPP-F..LL.HSREFQ-MNQE-LQ..LKWVEK..RACPH.I.GNKVVR.
CYP4A6rabb	1	.SVSALNPTTR.P..LSGLLQVAALLGLLLLLKKAAQLYLHRQULLR..QQFPCPP-F..LL.HSREFQ-GHE-LQVMLKWVEK..SACPR.LWGSRAHL
CYP4A7rabb	1	.SVSALSSTR.P..FSGFLQAAALLGLLLLLKKAAQLYL.RQULLR..QQFPCPP-S..LL.HSREFP-I..E-LQ.VLKRVEK..SACPR.LWGSSEFL
CYP4Y7v3	1	.....S.....
CYP4Y7v2	1	.....
CYP4Y7v1	1	MANISF---LSGSYSTAFFGITVYIFVIVIRLTIKFRMRHFFDALPGYSTKQ-KHWIRGNLHLVVKNDSDVDNQITTLTRRPFKFRVVFVGFPTVVV
CYP102	52	Y.SSQRLLI.EACDESFR-FDKNLSQALKFVRDFA.D..FTSWTHEKN.KKAHNI.L.S.SQQAM..HAMVVDIAVQ.VQKW.RLN--ADEHIEVPEDMTR
CYP4F3hs	100	RIF..TYI.PV.FAPAAIVPKDKVF.SF.K...D..LSA--E..S.H..M.....N...P.MK.F.ES.N.MHAKWQLL.SE.SARL.M.EH..L
CYP4F11hs	100	I.C...IIRPITSASAAVAIPKDMIF.GF.K...D..LS--D..S.H..M.....N...P.MK.F.KS.N.MHDKWQRL.SE.SARL.M.EH..L
CYP4A4rabb	98	LVYD..YL..I.GRSD--PKAPRN.KLMT..I.Y..LLD--QT.FQH..M.....YD...P.VGLMVDS.Q.MLDRW.QLISQDS.-LEI..HV.L
CYP4A5rabb	98	Q.YD..YM..I.GRSD--PKSRGS.TFVA..I.Y..LLN--QP.FQH..M.....YD...P.VGLMVDS.Q.MLDRW.QLISQDS.-LEV..D..L
CYP4A6rabb	98	LIYD..YM..I.GRSD--PKAQGS.F.A..I.Y..LLN--QT.FQH..M.....YD...P.VGLMADS.Q.MLDRW.QLISQDS.-LEV..D..L
CYP4A7rabb	98	ICYD..YM.TI.GRSD--PKARVS.SF.A..I.Y..LLE--QT.FQH..M.....YD...P.VGLMVDS.QVMLDK..L.RKDAP-LEIYEHV.L
CYP4Y7v3	96	.....R.....
CYP4Y7v2	96	.....
CYP4Y7v1	96	SLVHPDSVVKLLKTAEPKFGHGPTTYRTLIPWLGEGLLIAG--GSKVARSRRLLTPAFHFEILKGYQITINNQCVDLILINILEKYADTGES-FDLFQLISN
CYP102	149	L...T.GLCG.N.RF.SFYR-DQP.FFITSVHRALDE.MNKLQR-ANPD.PA.DENK--RQ.QEDIRVM
CYP4F3hs	198	M...SLQKCV..FDSH..EK--PSE.IA..L.LSA.VTK.HQOI.LYI.FL.YL.P..QR.RRA.RLV
CYP4F11hs	198	M...SLQKCV..FES..EK--PSE.IA..L.LSAFVEK..QOI.LHT.FL.YL.P..QR.RRA.HLV
CYP4A4rabb	192	M...T.MKC...QGSV.L.-.NSQ..IQ..NDLNN.VFY.A..VFHCS.FL.RLSPE.R..HRA.QLA
CYP4A5rabb	192	M...T.MKC...QGSV.L.S.NSQ..IQ.VGDLNN.VFA.V..IFHCS.T..RLSPE.R.SHRA.QLA
CYP4A6rabb	192	M...T.MKC...HQGSV.L.-.NSQ..IQ.VGDLNN.VFS.V..VFHCS.T..RLSPE.R.SHRA.QLA
CYP4A7rabb	192	M..ET.MKC...HQGSV.LES.TSK..IQ.VR.LSD..LQ.V..VFHCS.FL.RLSPE.R.SHRA.QLA
CYP4Y7v3	193	.....
CYP4Y7v2	193	.....
CYP4Y7v1	193	CTLDIILQSASFYKTNCOHD-RLQHSYCKAITEVTKLARSRRNRLMHPDIINYNTSDGKLFKONCDYIHSVADSVIDSRKKILDNGQ-----KDVKK
CYP102	232	--L.THM.NG..P.T.EPLDDEN..YQII..LIA..E..SGLL.FA..F.V.N.HVLQKAAE.AARV.VDPVP--SYKQVKQLKYVGMVNL.AL..HP
CYP4F3hs	295	T...I.V..LS...D.KKL.DE...A.....A..EL.V..H.....ER.RQ..QEL.KDREPKEIE...AQLP..M...SL..P
CYP4F11hs	295	T...I.V..LS...D.KEL.DE...A.....A..EL.V..H.....EQ.RQ..QEL.KDREPKEIE...AQLP..M...SL..P
CYP4A4rabb	288	R...V..F..M...SSL.DC.L...A.....A..GV..F.A..T..H.HR.RE.IQGL.GDGAS--IT.EH.DQMPYT.M...AL..YP
CYP4A5rabb	289	R...V..F..M...SSL.DC.L...A.....A..GV..F.A..T..H.HR.RE.IQGL.GDGAS--IT.EH.DQMPYT.M...AL..YP
CYP4A6rabb	288	R...V..F..M...SSL.DC.L...A.....A..GV..F.A..T..H.HR.RE.IQGL.GDGAS--IT.EH.DQMPYT.M...AL..YP
CYP4A7rabb	289	R...V..F..M...SSL.DC.L...A.....A..GV..F.A..T..H.HR.RE.IQGL.GDGAS--IT.EH.D.MPYT.M...AL..YP
CYP4Y7v3	285	.....I.....
CYP4Y7v2	285	.....I.....
CYP4Y7v1	285	YLDPLDILLSAKD-ENGVGMSKTDIRAEVDTFMFEGHDTTISAISWILYDLAKHPEYQKMCQNEVDKALENNPG-FVKWDDLKGFELTQCIEGHRHS
CYP102	328	TA.AF.LYAKEDTV.GGEYPLEK.DELMVL.PQ..RDKTI.GDDVEE.R.E..ENP--SAIQH.K..GN.Q.A...Q..LH.ATLVLGMM.KH.DF.
CYP4F3hs	394	...AV..CC.QDIV.PD.RVI.K.IICL.SVF.T..P..PD-EVY..F..DPK.IKERSPL..I.....A...A.M.VVLGLT.L..RVL
CYP4F11hs	394	...V..CC.QD.V.PD.RVI.K.IVCL..I.I.Y.PT..PD-EVY..F..DOE.IKERSPL..I.....A...A.M.VVALT.LH.RIL
CYP4A4rabb	385	...SVT..LS.PV.FPD.RSL.K.VILFSL...Y.PK..Q..EV..F..AP--SAYH.H..L..G.A...KQ...R.L.VAVALT.V..E.L
CYP4A5rabb	386	...A..DLSSPV.FPD.RSL.K.FVTLS...PN..P..EV..G..TPG--SARH.H..L..G.A...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4A6rabb	385	...GVG..LSSPV.FPD.RSL.K.VIVTSL..A...PK..P..EV..FP.APG--SARH.H..L..G.A...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4A7rabb	386	...GVGSKLSSPV.FPD.RSL.K.IIITLS...PK..P..EV..S..APG--SARH.H..L..G.S...KQ...L.VAVALT.V..E.L
CYP4Y7v3	383	.....
CYP4Y7v2	383	.....
CYP4Y7v1	383	PVPLISRCBTKEFTL-EGITFPPTFFGINIYGLHNSAVWTM-PTKFDPRFSKDNATKMDSFAFTPFSAGPRNCIGQHFAMNEEKTLITRILERFTLE
CYP102	426	DHINYELDIRETLTKPEFVVVAKSCKIPLG..PSPSTEQSACKVR
CYP4F3hs	493	..HT-EPRRKPEL.L.AE-----G.LWLRVEPLS----
CYP4F11hs	493	.THT-EPRRKPELIL.AE-----G.LWLRVEPLGANSQ----
CYP4A4rabb	482	...TRIP.I.IARV.LK.K-----HLRLRKLH----
CYP4A5rabb	483	...TRIP.K.TARL.LK.N-----HLRLRKLQ----
CYP4A6rabb	482	...KRVPDQKPR.LK.S-----HLRLRKLH----
CYP4A7rabb	483	...TRVPI.ITRL.LK.K-----HLRLRKLH----
CYP4Y7v3	481	.....
CYP4Y7v2	481	.....
CYP4Y7v1	481	PDPDHTVSPHAAAVMRSR-----NGIKCIAKRKRE----

SRS-6

**Slika 16.** Višestruko sravnjenje prevedenih aminokiselinskih sljedova CYP4Y1 (A), CYP4Y2 (B), CYP4Y3 (C), CYP4Y4 (D), CYP4Y5 (E), CYP4Y6 (F), CYP4Y7 (G) *M. galloprovincialis*. Istaknuti su mogući aminokiselinski ostatci uključeni u prepoznavanje supstrata i katalitičku aktivnost enzima. CYP4Y slijedovi *M. galloprovincialis* sravnjeni su sa CYP4F ljudi i CYP4A zeca, čija su mjesta za prepoznavanje supstrata već definirana (Loughran i sur., 2000). Kristalna struktura bakterijskog CYP102 (Ravichandran i sur., 1993) osigurala je strukturni predložak te elemente sekundarne strukture (A – L zavojnice i 1 – 12  $\beta$  – nabrane ploče) koji su kopirani na ovo sravnjenje. Aminokiseline identične klonovima varijante 1 (v1) svih sedam grupa označene su točkama unutar višestrukog sravnjenja. Uokvirene regije predstavljaju šest mjesta za prepoznavanje supstrata (SRS-1; - 6). Regije osjenčane u sivo predstavljaju očuvane regije CYP4 proteina već opisane u poglavlju 6.4. N – terminalna regija za ugnježđenje u membranu označena je istočkanom linijom iznad višestrukih sravnjenja. Aminokiseline koje utječu na aktivnost hidroksilaze masnih kiselina kod CYP4A izoformi zeca označene su crvenim točkama ispod višestrukih sravnjenja (Loughran i sur., 2000). Aminokiseline koje oblažu kanal za vezanje supstrata označene su crnim točkama ispod višestrukih sravnjenja (Chang i Loew, 1999). Praznine unutar višestrukih sravnjenja označene su crticom (-). Proteinski slijedovi korišteni za višestruko sravnjenje uključuju: bakterijski CYP102 (2HPD), CYP4A4 (zec, P10611), CYP4A5 (zec, P14579), CYP4A6 (zec, P14580), CYP4A7 (zec, P14581), CYP4AF3 (čovjek, Q08477), CYP4F11 (čovjek, Q9HB16).

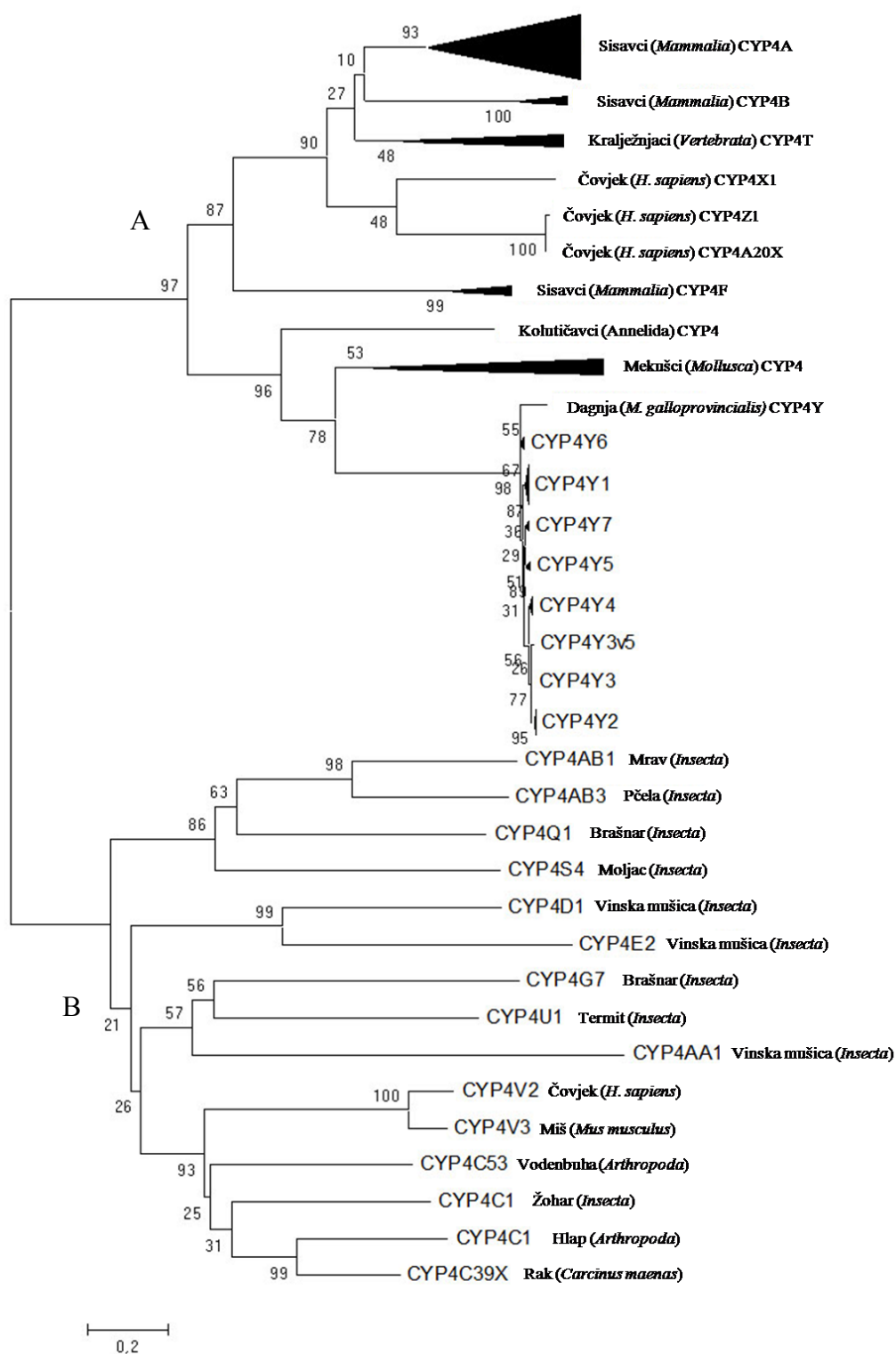
Pretpostavljeni model homologije ljudskog CYP4A11 s bakterijskom CYP102 hidroksilazom masnih kiselina u kombinaciji s usmjerenom analizom mutacija istaknuo je ključne aminokiselinske ostatke aktivnog mjesta i pristupnog kanala za supstrate koji utječu na specifičnost prema supstratu te na poziciju hidroksilacije (Chang i Loew, 1999). Tablica 3. sadrži popis istaknutih aminokiselinskih ostataka CYP102 i CYP4A11 s odgovarajućim ostacima CYP4Y1 – Y7 genskih grupa *M. galloprovincialis*. Unatoč ukupno niskoj sličnosti aminokiselinskih sljedova, polovica ostatatka unutar donjeg supstratnog kanala potpuno je očuvana između bakterijskog, ljudskog i proteina *M. galloprovincialis*, uključujući T261, F262, G266 i T269 enzima CYP102. Tri aminokiselinska ostatka, također unutar donjeg supstratnog kanala, u blizini hem jezgre CYP102 enzima (L76, A265, i A329), kod proteinskih su sljedova CYP4Y1 – Y7 *M. galloprovincialis* zamijenjeni glomaznijim aminokiselinskim ostacima (Y121, E322, V386) (Tablica 3.). Unutar aktivnog mjesta CYP4A11 enzima čovjeka aminokiseline bakterijskog CYP102 (L76, A265, i A329), također su, kao i kod *M. galloprovincialis*, zamijenjeni glomaznijim aminokiselinskih ostacima. Enzimi genskih grupa CYP4Y1 – Y7 *M. galloprovincialis* na pozicijama R88 CYP4A7 zeca i Y52 bakterijskog CYP102 posjeduju aminokiseline sa malim bočnim lancima (serin, leucin, valin). Dodatno, Y204 i F252 CYP4A4 enzima zeca podudaraju se s odgovarajućim aminokiselinama u CYP4Y1 – Y7 *M. galloprovincialis* (Slika 16.).



## 5.5 FILOGENETSKA ANALIZA CYP4 PODOBITELJI

Za filogenetsku analizu korišteno je sravnjenje 97 aminokiselinskih sljedova gena *cyp4* koji predstavljaju 17 CYP4 podobitelji. Od 46 sljedova školjkaša korištenih u filogenetskoj analizi, 41 slijed dobiven je tijekom ovog istraživanja. Preostali aminokiselinski sljedovi upotrijebljeni u filogenetskoj analizi su proteinski sljedovi CYP4 kralješnjaka, mekušaca, rakova i kukaca. Homologni CYP4 sljedovi preuzeti su sa Cytochrome P450 Homepage baze podataka (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>). Rezultat filogenetske analize metodom najveće vjerojatnosti prikazao je odnos između proteinskih slijedova CYP4 podobitelji uključenih u analizu. Veliko račvanje CYP4 podobitelji na dvije monofiletske grupe A i B poduprieto je visokom potporom metodom samoučitavanja (97 %; Slika 17.). Novoidentificirani sljedovi CYP4Y podobitelji sestrinska su grana koljenu mekušaca uz visoku potporu metodom samoučitavanja (78 %; Slika 17.), te oni zajedno s CYP4 proteinima kolutićavaca tvore monofiletsku grupu (clade), također s visokom potporom metodom samoučitavanja (96 %). Najbliži homolozi ovoj monofiletskoj grupi su CYP4F, A, B, Z, X i T podobitelji proteina kralješnjaka (97 % potpora metodom samoučitavanja), s kojom čine granu A filogenetskog stabla. Grana A filogenetskog stabla uključuje sve CYP4 podobitelji kralješnjaka, osim CYP4V podobitelji. CYP4F sisavaca čvrsto je poduprijet (87 % potpora metodom samoučitavanja) kao korijen svim drugim CYP4 podobiteljima kralješnjaka, osim CYP4V podobitelji. Monofiletska grupa CYP4T, B, X, Z i A nastala je račvanjem, odvajajući CYP4F gene od većine podobitelji CYP4 kralješnjaka. Granu B filogenetskog stabla čine CYP4Q, S, E, G i U podobitelji proteina kukaca, CYP4V podobitelj kralješnjaka te CYP4C podobitelji člankonožaca i kukaca.

Filogenetsko stablo najveće vjerojatnosti, sa svim unutarnjim čvorištima i granama prikazano je u dodatnim materijalima. Sva unutarnja čvorišta poduprijeta su visokim postocima provjere metodom samoučitavanja (> 75 %).



**Slika 17.** Odnos proteinskih sljedova izabranih CYP4 podobitelji sisavaca, kralježnjaka, mekušaca, člankonožaca i kukaca prikazan filogenetskom metodom najveće vjerojatnosti. Brojevi na čvorištima prikazuju potporu metodom samoučitavanja. Sljedovi CYP4 proteina upotrebljeni u analizi prikazani su u prilogu 1. Filogenetsko stablo sa svim unutarnjim čvorištima i granama nalazi se u prilogu 2.

## 6. RASPRAVA

---



## 6 RASPRAVA

### 6.1 IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA *cyp4y* GENA DAGNJE, *M. galloprovincialis*

Ovo istraživanje rezultiralo je prvim dokazima o sedam novih grupa gena obitelji citokroma P450 identificiranih i karakteriziranih u mediteranskoj dagnji, *M. galloprovincialis*. Izoforme novoidentificiranih gena citokroma P450 obitelji 4 (*cyp4*) u dagnji (MgCYP4Y), opisane u ovom istraživanju, prvi su potpuni cDNA CYP4 sljedovi prijavljeni za obitelj *Mitilidea*, ekonomski i ekološki važnu obitelj školjkaša.

Filogenetska analiza je potvrdila da sljedovi MgCYP4Y pripadaju obitelji citokroma P450 obitelji 4, odvajajući ih u zasebnu filogenetsku grupu, odvojenu od CYP1, CYP2 i CYP3 grupa gena. Temeljem pravila nomenklature citokroma P450 gdje 40 % identičnosti aminokiselinskog slijeda određuje razinu obitelji, a 55 % identičnosti aminokiselinskog slijeda određuje razinu podobitelji (Nelson i sur., 2004), te u skladu s već opisanom *cyp4y* podobitelji gena beskralješnjaka (Snyder, 1998), svi MgCYP4Y sljedovi smješteni su u podobitelj CYP4Y. Iako MgCYP4Y sljedovi dijele manje od 40 % identičnosti aminokiselinskog slijeda s članovima CYP4 obitelji kralješnjaka uključeni su u CYP4 obitelj, kako u znak priznanja drevnom porijeklu obitelji CYP4 gena, tako i iz rezultata i stava da filogenetsku analizu treba uzeti u obzir prilikom dodjeljivanja sljedova određenim obiteljima (Nelson i sur., 2004).

U ovom istraživanju utvrđeno je postojanje sedam različitih genskih grupa podobitelji CYP4Y, gdje svaka grupa obuhvaća niz alelnih varijanti gena, i gdje sve alelne varijante dijele visoku identičnost nukleotidnog slijeda, negdje i veću od 97 %, što je uvriježena granica za razmatranje dvaju sljedova alelima na istom lokusu (Nebert i sur., 1989). Zbog visokog postotka identiteta između sljedova svih genskih varijanti, nije bilo moguće odrediti točan broj alelnih varijanti gena u odnosu na ukupan broj *cyp4y* gena prisutnih u jednom organizmu. U pravilu, sljedovi koji posjeduju  $\leq 3$  % različitosti aminokiselinskog slijeda imenovani su alelnim varijantama istog gena (Nelson, 2006), iako postoje primjeri različitih P450 gena koji dijele aminokiselinsku sličnost veću od 97 %, otežavajući imenovanje određenog slijeda alelnom varijantom u odnosu na mogući genski paralog (Nebert i sur.,

1989). Stoga, mogućnost da je broj novoidentificiranih gena *cyp4y* *M. galloprovincialis* manji od ovdje navedenog ne može biti isključena.

## 6.2 OČUVANA STRUKTURA GENA *cyp4y*

Tijekom evolucije geni *cyp4* ostali su visoko očuvani jer i kralješnjaci i beskralješnjaci posjeduju *cyp4* gene. Prevedeni aminokiselinski sljedovi MgCYP4Y gena višestruko sravnjeni s CYP4 proteinima drugih vrsta pokazali su očuvanu prirodu *cyp4* gena, što ukazuje na činjenicu da su očuvane regije CYP proteina uključene u funkcije esencijalne za enzime i stoga visoko očuvane, unatoč relativno niskoj ukupnoj sličnosti sljedova (Jorgensen i sur., 2005). Prisutnost očuvanih regija, do sada opisanih u literaturi, potvrđena je i u CYP4Y proteinima *M. galloprovincialis*. Na amino (N) – terminalnom kraju CYP4Y proteini dagnje posjeduju slijed aminokiselina odgovornih za usmjeravanje CYP proteina na točnu lokaciju u stanici, a koji je odsutan kod topivih bakterijskih CYP proteina. Ova različitost u N – terminalnom kraju proteina je opravdana, jer je ova regija proteina odlučujuća za staničnu lokalizaciju mikrosomalnih proteina vezanih na membranu endoplazmatskog retikuluma i topivih bakterijskih P450 enzima (Sakaguchi M, 1987, Vergeres i sur., 1989). U centru  $\alpha$  - uzvojnice C kod CYP4Y sljedova dagnje smještena je visoko očuvana WxxxR domena s visoko očuvanim triptofanom (W152) i argininom (R156), za koje je dokazano da nautraliziraju naboj jednog od propionatnih bočnih lanaca hem grupe (Graham i Peterson, 2002). Istraživanje Lewisa (1995) ukazalo je na ključnu funkcionalnu i/ili strukturnu ulogu kako triptofana (W152) tako i arginina (R156) kao posrednika između redoks partnera i hema, te ih je potvrdilo kao kritične za vezanje FMN komponente citokrom P450 reduktaze. Visoko očuvana WxxxR domena zajednička je svim citokromima P450. Također je u aminokiselinskim sljedovima CYP4Y dagnje, u  $\alpha$  - uzvojnici I, potvrđena prisutnost visoko očuvane GxxT domene, jedinstvene za CYP4 obitelj proteina, a koja je odsutna iz svih drugih P450 obitelji (Williams i sur., 2000, Colas i Ortiz de Montellano, 2003). Važnu razliku u GxxT domeni CYP4Y sljedova dagnje i bakterijskog CYP102 čini ostatak glutaminske kiseline (E318) koji je u bakterijskom CYP102 zamijenjen alaninom (A265). Čini se da glutaminska kiselina i alanin čine razliku između terminalne i ne – terminalane hidroksilacije supstrata (Simpson, 1997, Chang i Loew, 1999). Smatra se da glutaminska kiselina posjeduje svojstva koja odbijaju karboksilnu grupu supstrata tako da supstrat zadobije orijentaciju koja je u skladu s terminalnom hidroksilacijom (Lewis i Lake, 1999), što je i slučaj za CYP4Y

proteine *M. galloprovincialis*. Ostatak glutaminske kiseline također je i ranije prijavljen kao nepromjenjiv među članovima obitelji CYP4 (Liu i Zhang, 2004, Miao i sur., 2011, Pan i sur., 2011). Visoko očuvani treonin (T322), sastavni dio GxxT domene, identificiran je i u CYP4Y proteinima dagnje, a za kojeg je dokazano da se nalazi u utoru prijenosa protona te je uključen u katalizu supstrata (Werck-Reichhart i Feyereisen, 2000). ExxR domena za koju je dokazano sudjelovanje u stabilizaciji jezgre hema identificirana je i u CYP4Y sljedovima dagnje, a odlikuje se visoko očuvanim ostatkom glutaminske kiseline (E375) i arginina (R378). Glutaminska kiselina (E375) i arginin (R378) čine ionski par te su visoko konzervirani među svim P450 enzimima (Lewis, 1995). Točno prije  $\alpha$  - uzvojnice L kod CYP4Y sljedova dagnje potvrđena je prisutnost P450 konsenzusnog slijeda, FxxGxRxCxG, potpisa svih enzima citokroma P450. Za apsolutno očuvani cistein, koji je prisutan i kod CYP4Y sljedova dagnje (C465) dokazano je sa služi kao peti ligand hema željeza. Kada enzim nije vezan na supstrat,  $Fe^{3+}$  heksakoordiniran je upravo sa C465 u CYP4Y enzimima *M. galloprovincialis* i molekulom vode koja predstavlja drugi aksialni ligand (Ravichandran i sur., 1993, Werck-Reichhart i Feyereisen, 2000).

### 6.3 AMINOKISELINSKI SASTAV AKTIVNOG MJESTA CYP4Y ENZIMA *M. galloprovincialis*

Analize promjena kodona visokopolimorfnih gena kompleksa tkivne podudarnosti grupe I i II (Hughes i Nei, 1988) te imunoglobulinskih gena (Tanaka i Nei, 1989) pokazale su visoku stopu neistoznačnih promjena aminokiselina unutar mjesta za prepoznavanje antigena. Ova zapažanja tumačena su kao rezultat pozitivnog evolucijskog pritiska (Tanaka i Nei, 1989). Budući je evolucijsko razilaženje P450 gena, glavnih gena za metabolizam ksenobiotika kod životinja, potaknuto prilagodbom na toksične spojeve u hrani i okolišu (Gonzalez i Nebert, 1990), posljedice adaptivne evolucije P450 gena mogle bi se pratiti u aminokiselinskim sljedovima P450 gena, kao što je slučaj i kod gena kompleksa tkivne podudarnosti i/ili imunoglobulinskih gena. Selekcija supstrata i njegova orijentacija u aktivnom mjestu enzima citokroma P450 omogućena je strukturom samog proteina P450, iz čega onda proizlazi i velika raznolikost reakcija pripisana enzimima citokroma P450. Primjer interakcije supstrata kamfora i enzima citokroma P450 1A1, prikazan uz pomoć kristalografije X – zrakama, pokazao je da supstrat interreagira s aminokiselinskim ostacima raspršenim na nekoliko zasebnih lokusa u primarnoj strukturi enzima (Poulos i sur., 1985, 1987). Analizom

kodirajućeg slijeda P450 gena obitelji 2 (*cyp2*) pronađeno je da se regije s visokom stopom neistoznačnih promjena aminokiselina poklapaju s potencijalnim mjestima vezanja supstrata (Gotoh, 1992). Usporedba ključnih aminokiselinskih ostataka već karakteriziranih hidrosilaza masnih kiselina sisavaca (Chang i Loew, 1999, Loughran i sur., 2000) i CYP4Y proteinskih sljedova dagnje napravljena je u svrhu definiranja moguće funkcije i asortimana supstrata za CYP4Y oblike *M. galloprovincialis*, čime je dokazan značajan broj podudarnosti između CYP4Y dagnje i CYP4A aminokiselinskih sljedova sisavaca. Bolje definiranje mjesta za prepoznavanje supstrata (SRS) u aminokiselinskim sljedovima CYP4Y *M. galloprovincialis* omogućeno je višestrukim sravnjenjem CYP4Y sljedova dagnje s koordinatama kristalne strukture CYP102 bakterijske hidrosilaze masnih kiselina, CYPBM3 (Ravichandran i sur., 1993). Homologijom primarne strukture bakterijskog CYP102 s drugim bakterijskim P450 proteinima pokazan je nizak postotak podudarnosti aminokiselinskih sljedova (15 – 20 %), te se u filogenetskom stablu citokroma P450 bakterijski CYP102 izdvojio u monofiletsku grupu s eukariotskim citokromima P450 obitelji 4 i 52 (Nelson i sur., 1993). Na evolucijsko srodstvo bakterijskih i enzima CYP4A podobitelji sisavaca sugerira i činjenica da su dugi lanci masnih kiselina supstrati kako za CYP4A enzime sisavaca tako i za bakterijske CYP102 enzime (Fulco, 1991). Zajednička specifičnost prema supstratu te prisustvo vezanog supstrata masne kiseline u kristalnoj strukturi, čini enzim CYP102 idealnim strukturnim kalupom za modeliranje izoenzima, kako CYP4A tako i CYP4Y podobitelji. Iako bakterijski CYP102 i CYP4A sisavaca dijele zajedničku funkciju hidrosilaza masnih kiselina, između njih su uočene izrazito različite lokacije oksidacije. Bakterijski CYP102 izvršava neterminalnu hidrosilaciju ili epoksidaciju dok enzimi CYP4A sisavaca izvide terminalnu  $\omega$  - oksidaciju supstrata (Chang i Loew, 1999). Prisustvo glutaminske kiseline (E318) u GxxT domeni CYP4Y sljedova dagnje, identificirane također u CYP4A aminokiselinskim sljedovima sisavaca, ističe ulogu CYP4Y enzima u terminalnoj  $\omega$  - oksidaciji supstrata. Fiziološka važnost terminalne  $\omega$  - hidrosilacije supstrata još uvijek nije u potpunosti razrješena, no ističe se mogućnost da  $\omega$  – hidrosilacija asistira u razgradnji masnih kiselina kada su one u suvišku, te u razgradnji masnih kiselina otpornih na  $\beta$  – oksidaciju (Simpson, 1997).

Iako je višestrukim sravnjenjem dokazan nizak postotak homologije P450 proteina izabranih za analizu, takav rezultat je i za očekivati iz razloga znatne strukturne različitosti njihovih supstrata. Prilikom razmatranja razlike veličine i oblika supstrata za CYP4A podobitelj

enzima, npr. laurata (ravni lanac dvanaest ugljika), prostaglandina (20 ugljika, oblik ukosnice, nezasićena masna kiselina sa ciklopentanskim prstenom) te arahidonske kiseline (20 ugljika, oblik ukosnice, nezasićena masna kiselina) očito je da CYP4A enzimi moraju imati izvanrednu fleksibilnost naspram supstrata (Loughran i sur., 2000). Jasan zaključak koji možemo donijeti iz danog višestrukog sravnjenja, a koji je također vidljiv i iz radova drugih istraživača (Gotoh, 1989), veća je homologija C – terminalnog dijela P450 proteina, u odnosu na N – terminalni kraj. Značajno poklapanje aminokiselinskih ostataka pronalazimo unutar  $\alpha$  - uzvojnice I gdje su locirane nepromijenjene aminokiseline, zajedničke svim enzimima citokroma P450 (Gotoh, 1989). Osim esencijalno očuvanih hidrofobnih aminokiselina unutar  $\alpha$  - uzvojnice I (T314, F315, G319, T322 u CYP4Y) važnu razliku od CYP102 čini E318 u CYP4Y koji odgovara A265 u CYP102. Unutar aktivnog mjesta CYP4A11 enzima čovjeka, a na mjestu A256 bakterijskog CYP102 enzima također se nalazi aminokiselinski ostatak glutaminske kiseline (E322 u CYP4A11). Stark i sur. (2005) su za aminokiselinski ostatak glutaminske kiseline opisali da se veže na hem željezo pozicioniranjem masne kiseline u poziciju koja favorizira  $\omega$  – hidroksilaciju. Glomazniji aminokiselinski ostatci (Y121, E318, V386) u blizini hem jezgre proteina CYP4Y1 – Y7 *M. galloprovincialis* uvelike se razlikuju od odgovarajućih ostataka bakterijskog CYP102 (L76, A265, i A329), gdje kontroliraju ulaz i dubinu prodiranja supstrata unutar aktivnog mjesta enzima CYP4Y. Omogućavanje samo  $\omega$  – metilnoj grupi da dođe u blizinu feri kisika sugerira na favoriziranje terminalne hidroksilacije te je isto potvrđeno kod CYP4A11 enzima čovjeka (Chang i Loew, 1999), u kojima su se glomazni aminokiselinski ostatci podudarali s onima pronađenim kod CYP4Y proteina dagnje. Istraživanje CYP4A11 enzima čovjeka potvrdilo je da tirozin (Y) i valin (V) kontroliraju ulaz supstrata u aktivno mjesto, a da glutaminska kiselina (E) kontrolira dubinu aktivnog mjesta, čime je potvrđeno puno veće ograničenje aktivnog mjesta CYP4Y i CYP4A11 enzima, u odnosu na bakterijski CYP102 (Chang i Loew, 1999). Čini se da ulogu usmjeravanja metabolizma masnih kiselina prema  $\omega$  – 2 poziciji izdvajanjem  $\omega$  – metilne grupe supstrata ima i F88 smješten u SRS – 1 regiji bakterijskog CYP102 enzima (Graham-Lorence i sur., 1997, Oliver i sur., 1997). Ova teorija također je potvrđena kristalnom strukturom CYP102 enzima vezanog na palmitoleinsku kiselinu (Li i Poulos, 1997), te NMR studijama vezanja laurinske kiseline na CYP102 (Modi i sur., 1995, Modi i sur., 1996). Kako u CYP4Y proteinima *M. galloprovincialis*, tako i u CYP4A proteinima sisavaca, fenilalanin (F88) je zamijenjen aminokiselinom leucin (L133 u CYP4Y). Shodno tomu, zbog

komplementarnih hidrofobnih interakcija između supstrata i aktivnog mjesta može se i kod CYP4Y dagnje i kod CYP4A11 čovjeka očekivati terminalna  $\omega$  – hidroksilacija masnih kiselina (Lewis i Lake, 1999). Aktivno mjesto hema supstratu je dostupno preko dugog hidrofobnog kanala, dužine 8-10 Å, obloženog uglavnom nearomatskim hidrofobnim aminokiselinskih ostatcima (Ravichandran i sur., 1993). Aminokiseline koje doprinose ograničenoj topologiji aktivnog mjesta kod CYP4Y uključuju Y121, L133, T314, F315, E318, G319, T322 i V386. Svaka od ovih aminokiselina visoko je očuvana među svim CYP4 enzimima, pa se prema tome može zaključiti i da su topologije regija aktivnih mjesta svih CYP4 enzima slične.

Modelne studije CYP4A enzima sisavaca (Chang i Loew, 1999, Loughran i sur., 2000) ukazuju na to da aminokiselinski ostatci koji ne potpadaju pod opisane SRS regije (Gotoh, 1992) također imaju ključnu ulogu u vezanju supstrata i enzimskoj aktivnosti. Otvoreni kraj kanala za vezivanje supstarata, blizu površine proteina, kod bakterijskog CYP102 omeđen je argininom, R48, mjestom koje kod CYP4 enzima sisavaca pokazuje varijabilnost te je ta pozicija zamijenjena lizinom, fenilalaninom i/ili glutaminskom kiselinom, dok se kod svih CYP4Y izoformi *M. galloprovincialis* pojavljuje treonin (T). U istraživanju Graham - Lorence i sur. (1997) R48 iz bakterijskog CYP102 opisan je kao jedan od glavnih ion – vezujućih kontakata sa supstratom (Li i Poulos, 1997). Ova fleksibilnost aminokiselina pronađena kod dagnje i ostalih proteina sisavaca na samom ulazu u kanal potrebna je iz razloga katalize oksigenacije masnih kiselina različitih duljina (Ravichandran i sur., 1993). Sloj hidrofobnih aminokiselina izloženih otapalu, a smještenih na samom ulazu u kanal za vezivanje supstrata, kod enzima CYP102 je identificiran i karakteriziran kao mjesto inicijalnog pristajanja lipofilnog supstrata na enzim (Ravichandran i sur., 1993). Kod CYP4Y enzima *M. galloprovincialis* na odgovarajućim mjestima hidrofobnih aminokiselina definiranih za CYP102 enzim, pronalazimo identične ili istoznačne aminokiselinske promjene (L59L, L62Y, P63V, P90P, A237P), koje naknadno ne utječu na funkciju enzima. Na ušću supstratnog kanala aminokiseline R88 i W91 u CYP4A6 i A7 zeca, odgovaraju W88 i S91 kod CYP4A4 zeca, te se smatra da služe kao sidrišta supstrata, a sve u svrhu pravilnog umetanja supstrata u pristupni kanal aktivnog mjesta, kako je i dokazano pri metabolizmu arahidonske kiseline enzimom CYP102 (Graham-Lorence i sur., 1997). Kod CYP4Y enzima *M. galloprovincialis* na pozicijama odgovornim za sidrenje masnih kiselina u supstratni kanal smještene su aminokiseline s malim bočnim lancima (R88 zečijeg CYP4A6 i A7 odgovara

V86 u CYP4Y, W91 odgovara G89 u CYP4Y) što sugerira na to da je pristupni supstratni kanal CYP4Y enzima u mogućnosti primiti veće masne kiseline. Definirana je još jedna aminokiselina odgovorna za sidrenje terminalne karboksilne grupe masne kiseline na protein, Y52 kod bakterijskog CYP102, a kojoj kod CYP4Y enzima odgovara S96, osim kod CYP4Y3 izoformi kod kojih se na tom mjestu nalazi L97. Y52 bakterijskog CYP102 kod ljudskog je CYP4A11 zamijenjen argininom (R97) za kojeg je, uz leucin 132 (L132) koji odgovara bakterijskom fenilalaninu (F88), dokazano da tvori solni most s karboksilatom supstrata laurinske kiseline, te ju na taj način drži čvrsto u supstratnom kanalu (Lewis i Lake, 1999). Između bakterijskog CYP102 i CYP4Y dagnje mutacijom Y → S zadržana su osnovna svojstva aminokiselinskog ostatka (polarnost OH – grupe). Dodatno, u radu Loughrana i sur. (2000) identificirane su dvije aminokiseline (Y204 i F252) CYP4A4 enzima zeca, od kojih se jedna nalazi izvan pretpostavljenih mjesta za prepoznavanje supstrata definiranih za CYP4Y1 – Y7 *M. galloprovincialis*, a koja utječe na aktivnost hidroksilaze prostaglandina (PGE). Regija enzima oko SRS-2 i -3, lokalizirana u  $\alpha$  – uzvojnica F i G, sadrži aminokiseline uključene u aktivnost arahidonske i prostagladinske hidroksilaze (Johnson i sur., 1990, Roman i sur., 1993). Y205 CYP4Y enzima lociran uzvodno od SRS – 2 odgovara H i/ili Y 204 CYP4A4 – A7 zeca, dok F253 CYP4Y odgovara S i/ili F252 enzima zeca. U istraživanju Loughran i sur. (2000) mutantni proteini H204Y i S253F CYP4A podobitelji zeca pokazali su povišenu aktivnost hidroksilaze prostaglandina, kao i povećani metabolizam arahidonske kiseline (3X). U istom istraživanju potvrđen je i metabolizam arahidonske kiseline u odsutnosti citokroma  $b_5$  također pripisan H204Y i S253F mutantima. Enzimi CYP4Y1 – Y7 *M. galloprovincialis* posjeduju identične aminokiseline na odgovarajućim mjestima poput aminokiselina CYP4A4 enzima zeca, ističući njihovu moguću ulogu u hidroksilaciji prostaglandina. Smatra se da je povišena aktivnost hidroksilaze laurinske i arahidonske kiseline, uslijed prisutnosti tirozina (Y) i fenilalanina (F) na odgovarajućim mjestima aminokiselinskog slijeda, povezana s promjenom volumena vezujućeg kanala (Loughran i sur., 2000). Proteini divljeg tipa zeca koji na odgovarajućim mjestima posjeduju H204 i S253 potpuno su ovisni o citokormu  $b_5$  za hidroksilaciju supstrata. Smatra se da mutacija, tj. prisustvo tirozina i fenilalanina oponaša, iako u manjoj mjeri, konformacijski utjecaj citokroma  $b_5$ , utječući na hidrofobnost i/ili naboj okolnih aminokiselina koje oblažu kanal za vezivanje supstrata, te na taj način utječu na orijentaciju supstrata u vezujućem kanalu. Uloga citokroma  $b_5$  u promjeni konformacije proteina CYP4A7 zeca dokazana je istraživanjem u

kojem je citokrom b<sub>5</sub> osiromašen hemom, čime mu je uloga prijenosnika elektrona bila onemogućena, još uvijek utjecao na povišenu aktivnost enzima CYP4A7 (Loughran i sur., 2001).

## 6.4 FILOGENETSKA ANALIZA AMINOKISELINSKIH SLJEDOVA CYP4Y

MgCYP4Y sljedovi opisani u ovom istraživanju doprinose novim saznanjima o raznolikosti i evolucijskom odnosu članova CYP4 obitelji već opisanim za morske beskralješnjake. Podobitelj CYP4Y sačinjava monofiletsku grupu sa drugim CYP4 proteinima mekušaca i kolutićavaca, pokazujući izričito odvajanje od članova CYP4 podobitelji kralješnjaka. Analiza homologije sljedova te filogenetska analiza navode na zaključak da CYP4Y sljedovi *M. galloprovincialis* skupa sa sljedovima mekušaca i kolutićavaca najveću aminokiselinsku identičnost dijele s homolozima kralješnjaka unutar podobitelji CYP4F, A, B i T, dobro poznatih po njihovoj ulozi u metabolizmu prostaglandina (Capdevila i Falck, 2002, Kikuta i sur., 2002, Kalsotra i Strobel, 2006). Za enzime CYP4F obitelji sisavaca dokazana je povećana raznolikost u njihovim funkcijama metaboliziranjem i endogenih i egzogenih supstrata (Cui i sur., 2001, Kalsotra i sur., 2004, Hardwick, 2008). Enzim CYP4F11 metabolizira eikozanoide i lijekove (Kalsotra i sur., 2004), dok CYP4F2 i CYP4F3 izvršavaju  $\omega$  – hidroksilaciju leukotriena (Hardwick, 2008). Dvojaka funkcija enzima CYP4 dokazana je i za CYP4 enzime mnogočestinaša *Nereis virens*, također uključenog u filogenetsku analizu, a koji sa CYP4Y enzimima *M. galloprovincialis* tvori monofiletsku grupu poduprtu visokim postotkom samoočitavanja. U istraživanju Rewitz i sur. (2004) kod *N. virens* je dokazana povišena ekspresija enzima CYP4 kako nakon izloženosti endogenim supstratima poput masnih kiselina, tako i nakon izloženosti benz(a)antracenu te sirovoj nafti. Za enzime CYP4A podobitelji dokazano je da favoriziraju metabolizam masnih kiselina srednje duljine lanca te je za enzim CYP4A11 dokazano da oksidira arahidonsku kiselinu (Hardwick, 2008). Transkripti enzima CYP4Y *M. galloprovincialis* dijele identične aminokiseline s CYP4A enzimima sisavaca za koje je dokazana važnost u metabolizmu prostaglandina (Loughran i sur., 2000). Filogenetskom analizom pokazano je i izričito odvajanje CYP4Y sljedova *M. galloprovincialis* od članova citokroma P450 iz podobitelji CYP4V kralješnjaka te CYP4C, D, E, G kukaca, a čije funkcije uključuju oksidaciju masnih kiselina izazvanu hormonima tijekom gladovanja (žohar, CYP4C1) (Kuang-Hui i sur., 1996) te metabolizam masnih



kiselina u mrežnici kralješnjaka (Hsu i sur., 2007). Slično filogenetsko grupiranje dobiveno je u analizi CYP4 sljedova *N.virens* (Rewitz i sur., 2004) i školjkaša *Chlamys farreri* (Miao i sur., 2011), gdje je također pokazano izričito odvajanje CYP4 sljedova kolutićavaca i mekušaca od članova kralješnjačke podobitelji CYP4V. Općenito, filogenetsko stablo prikazuje razdvajanje CYP4 sljedova u dvije velike grupe, što je u podudarnosti s prije opisanim CYP4 grupiranjem (Kirischian i Wilson, 2012) gdje je razdvajanje CYP4 gena kralješnjaka i beskralješnjaka objašnjeno kao rezultat zajedničkog i snažno poduprtog događaja duplikacije. Razdvajanje CYP4 sljedova beskralješnjaka u filogenetskom stablu može biti posljedica velike raznolikosti CYP4 enzima beskralješnjaka, te je moguće da CYP4 sljedovi beskralješnjaka korišteni u ovoj filogenetskoj analizi predstavljaju različite paraloge CYP4 gena. Zbog vrlo niskog postotka identičnosti MgCYP4Y sljedova s drugim CYP4 sljedovima, filogenetska analiza otvara mogućnost novih uloga CYP4 enzima, osim onih već opisanih za ovu obitelj citokroma P450 (Hardwick, 2008, Whalen i sur., 2010).

## 6.5 VARIJABILNOST CYP4Y GENSKIH GRUPA *M. galloprovincialis*

Ekspanzija CYP4Y skupina gena navodi na razmatranje utjecaja pozitivne selekcije kao sudionika u povećanju raznolikosti ove podobitelji gena, vjerojatno kroz uzastopne duplikacije gena te njihovo naknadno razilaženje (Nelson i Strobel, 1987). Zagađenje predstavlja uobičajeni stres u morskom okolišu te je danas jedan od najjačih uzročnika selekcije, no naše razumijevanje utjecaja antropogenih toksikanata na mehanizme prilagodbe morskih populacija vrlo je oskudno. Velika ekspanzija gena podobitelji CYP4Y *M. galloprovincialis* prisutnih na tri lokacije različitog stupnja onečišćenja može biti objašnjena utjecajem različitih onečišćivala, a samim time i potrebom za različitim izoformama *cyp4y* gena koji bi u konačnici pružili veću mogućnost razgradnje cijelog niza onečišćivala prisutnih u okolišu. Različite okolišne (ekološke) niše odabrane u ovom istraživanju mogle bi biti važan čimbenik koji će doprinjeti raznolikosti gena *cyp4y* prisutnih u prirodnim populacijama dagnji odabranih područja. Za pretpostaviti je da CYP4Y grupe gena prisutne na svim lokacijama posjeduju fiziološku ulogu u metabolizmu endogenih supstrata, dok bi uloga mjesno specifičnih CYP4Y genskih grupa mogla biti pod utjecajem specifičnih uvjeta u danom okolišu. Značajno veća ekspanzija gena *cyp4* također je uočena u podobiteljima *cyp4a*, *cyp4b* i *cyp4f* glodavaca (Nelson i sur., 2004). Duplikacija gena *cyp4f* glodavaca povezana je s

povećanom raznolikošću funkcija u metaboliziranju i endogenih i egzogenih supstrata (Cui i sur., 2001, Hardwick, 2008).

Izuzev utjecaja okoliša i genskog polimorfizma *cyp* gena, izvori varijabilnosti u prisutnosti i/ili aktivnosti *cyp* gena također mogu biti biološke i fiziološke odrednice, poput spola i hormonalnog statusa. Potvrda prisutnosti MgCYP4Y genskog transkripta u dagnji *M. galloprovincialis* ovisila je o sezoni uzorkovanja. Budući većina morskih životinja izražava sezonske varijacije fizioloških i biokemijskih procesa, za očekivati je da će se sezonske varijacije pojaviti i u aktivnosti i/ili prisutnosti gena *cyp4*. Dostatna količina gen specifične mRNA potrebne za postupke kloniranja dobivena je iz uzoraka sakupljenih u zimskim mjesecima. Vrlo je vjerojatno da se količina CYP4 genskih transkripata prisutnih u dagnji može povezati sa razvojem gonada, tj. reproduktivnim ciklusom koji je usko vezan sa sezonskim promjenama temperature mora.

Reproduktivni ciklus školjkaša, osim što je podvrgnut sezonskim varijacijama, povezan je i s promjenom sadržaja neutralnih lipida u peroksisomima probavne žlijezde (Cancio i sur., 1999). Velika stimulacija perosidacije lipida zabilježena je u gonadama i probavnoj žlijezdi školjkaša *Mizuhopecten yessoensis* u periodima prije i za vrijeme mrijesta (Lukyanova i Khotimchenko, 1995). Ova indukcija aktivnosti peroksidaze može biti povezana s povišenom koncentracijom supstrata za  $\beta$  – oksidaciju, poput eikozanoida (prostaglandini i leukotrieni) koji su pokazali značajnu sezonsku varijabilnost povezanu s reproduktivnim ciklusom *M. yessoensis* (Lukyanova i Khotimchenko, 1995). Opažanjem razvoja gonada školjkaša *M. galloprovincialis*, uzorkovanog na području sjevernog Jadrana, veliki broj dagnji u stadiju mrijesta potvrđen je u prosincu kada je temperatura mora pala ispod 16°C (Hrs - Brenko, 1971). Ukupna RNA uzorkovana u travnju na lokaciji Budava, kada je temperatura mora bila 13°C, također je sadržavala dostatnu količinu gen specifične mRNA, što se može povezati s produljenim čuvanjem gonada tijekom niskih zimskih temperatura. CYP4F podobitelj kralješnjaka dokazano je uključena u hidrosilaciju prostaglandina i leukotriena (pregledni rad; Kirischian i Wilson, 2012), a uključenost MgCYP4Y gena u lipidnu peroksidaciju tek se treba potvrditi budućim eksperimentima.

## 7. ZAKLJUČCI

---

## 7 ZAKLJUČCI

1. Mediteranska dagnja, *M. galloprovincialis*, eksprimira produkt *cyp4* gena.  
Otvoreni okvir čitanja identificiranog *cyp4* gena sastoji se od 1536 baznih parova.
2. Identificiran je i karakteriziran 41 potpuni cDNA slijed citokroma P450 koji je raspoređen u sedam novih grupa gena, te su oni prvi potpuni cDNA sljedovi citokroma P450 prijavljeni za obitelj *Mitilidae*.
3. Svi identificirani geni citokroma P450 dagnje smješteni su u podobitelj CYP4Y.  
Sedam novih grupa gena citokroma P450 imenovano je: CYP4Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6 i Y7. Svaka grupa gena obuhvaća niz alelnih varijanti gena.
4. Prevedeni CYP4Y aminokiselinski sljedovi *M. galloprovincialis* pokazuju očuvanu prirodu CYP4 proteina prisutnu u CYP4 proteinima drugih vrsta.
5. Prisutnost pojedinih aminokiselina na određenim mjestima u prevedenom CYP4Y aminokiselinskom slijedu sugerira na uključenost CYP4Y enzima u terminalnu  $\omega$  - hidroksilaciju supstrata.  
Posjedovanje aminokiselina na odgovarajućim mjestima CYP4Y enzima u dagnji identičnih aminokiselinama CYP4A4 enzima zeca ističe njihovu moguću ulogu u hidroksilaciji prostaglandina.
6. Potvrda prisutnosti CYP4Y genskog transkripta u dagnji uvelike je ovisila o sezoni uzorkovanja iz čega se može zaključiti da sezonske varijacije fizioloških i biokemijskih procesa morskih životinja utječu i na aktivnost i/ili prisutnost gena *cyp4*.
7. Na postajama različitog stupnja i vrste onečišćenja identificirane su različite izoforme gena *cyp4y*, što upućuje ne utjecaj pozitivne selekcije kao sudionika u povećanju raznolikosti ove podobitelji gena.

## 8. LITERATURA

---

## 8 LITERATURA

Amichot, M, Brun, A, Cuany, A, De Souza, G, Le Mouél, T, Bride, JM, Babault, M, Salaün, JP, Rahmani, R, Bergé, JB (1998) Induction of cytochrome P450 activities in *Drosophila melanogaster* strains susceptible or resistant to insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 121:311-319.

Axelrod, J (1955) THE ENZYMATIC DEMETHYLATION OF EPHEDRINE. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 114:430-438.

Baldwin, WS, Marko, PB, Nelson, DR (2009) The cytochrome P450 (CYP) gene superfamily in *Daphnia pulex*. *BMC Genomics*. 10:169.

Baltimore, D (1981) Gene conversion: Some implications for immunoglobulin genes. *Cell*. 24:592-594.

Bell, DR, Elcombe, CR (1991) Induction of acyl-CoA oxidase and cytochrome P450IVA1 RNA in rat primary hepatocyte culture by peroxisome proliferators. *Biochem J*. 280 ( Pt 1):249-253.

Bernhardt, R (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology*. 124:128-145.

Bradfield, JY, Lee, YH, Keeley, LL (1991) Cytochrome P450 family 4 in a cockroach: molecular cloning and regulation by regulation by hypertrehalosemic hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:4558-4562.

Brodie, BB, Axelrod, J, Cooper, JR, Gaudette, L, La Du, BN, Mitoma, C, Udenfriend, S (1955) Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science*. 121:603-604.

Burke, MD, Mayer, RT (1974) ETHOXYRESORUFIN: DIRECT FLUORIMETRIC ASSAY OF A MICROSOMAL O-DEALKYLATION WHICH IS PREFERENTIALLY INDUCIBLE BY 3-METHYLCHOLANTHRENE. *Drug Metabolism and Disposition*. 2:583-588.

Buzková, H, Pechandová, K, Slanar, O, Perlík, F (2006) Genetic polymorphism of cytochrome P450 and methods for its determination. *Prague medical report*. 107:383-393.

Cancio, I, Ibabe, A, Cajaraville, MP (1999) Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structure in mussels *Mytilus galloprovincialis* and its relationship with the lipid content. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 123:135-144.

Capdevila, JH, Falck, JR (2002) Biochemical and molecular properties of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 68-69:325-344.

Ceccherelli, VU, Rossi, R (1984) Settlement, growth and production of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series*. 16:173-184.

Chang, Y-T, Loew, GH (1999) Homology modeling and substrate binding study of human CYP4A11 enzyme. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 34:403-415.

Chaty, S, Rodius, F, Vasseur, P (2004) A comparative study of the expression of CYP1A and CYP4 genes in aquatic invertebrate (freshwater mussel, *Unio tumidus*) and vertebrate (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*. 69:81-94.

- Chiu, T-L, Wen, Z, Rupasinghe, SG, Schuler, MA (2008) Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105:8855-8860.
- Colas, C, Ortiz de Montellano, PR (2003) Autocatalytic Radical Reactions in Physiological Prosthetic Heme Modification. *Chemical Reviews*. 103:2305-2332.
- Cui, X, Kawashima, H, Barclay, TB, Peters, JM, Gonzalez, FJ, Morgan, ET, Strobel, HW (2001) Molecular Cloning and Regulation of Expression of Two Novel Mouse CYP4F Genes: Expression in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$ -Deficient Mice upon Lipopolysaccharide and Clofibrate Challenges. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 296:542-550.
- Danielson, PB, Foster, JL, McMahon, MM, Smith, MK, Fogleman, JC (1998) Induction by alkaloids and phenobarbital of Family 4 Cytochrome P450s in *Drosophila*: evidence for involvement in host plant utilization. *Mol Gen Genet*. 259:54-59.
- Degtyarenko, KN, Kulikova, TA (2001) Evolution of bioinorganic motifs in P450-containing systems. *Biochemical Society transactions*. 29:139-147.
- Estabrook, RW (2003) A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab Dispos*. 31:1461-1473.
- Feyereisen, R (1999) Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol*. 44:507-533.
- Fisher, MB, Zheng, Y-M, Rettie, AE (1998) Positional Specificity of Rabbit CYP4B1 for  $\omega$ -Hydroxylation of Short-Medium Chain Fatty Acids and Hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun*. 248:352-355.
- Fulco, AJ (1991) P450BM-3 and other Inducible Bacterial P450 Cytochromes: Biochemistry and Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 31:177-203.
- Gilbert, LI (2011) *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Elsevier Science,
- Goksoyr, A (1985) Purification of hepatic microsomal cytochromes P-450 from beta-naphthoflavone-treated Atlantic cod (*Gadus morhua*), a marine teleost fish. *Biochim Biophys Acta*. 840:409-417.
- Goksoyr, A, Larsen, HE, Husoy, AM (1991) Application of a cytochrome P-450 IA1-ELISA in environmental monitoring and toxicological testing of fish. *Comp Biochem Physiol C*. 100:157-160.
- Goldberg, ED (1975) The mussel watch — A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin*. 6:111.
- Gong Y, LT, Zhang L, Gao X, Liu N (2013) Permethrin Induction of Multiple Cytochrome P450 Genes in Insecticide Resistant Mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *Int J Biol Sci*. 9:863-871.
- Gonzalez, FJ (1988) The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacological Reviews*. 40:243-288.
- Gonzalez, FJ, Nebert, DW (1990) Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends in genetics* : TIG. 6:182-186.
- Gosling, E (1992) *The Mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics, and culture*. Elsevier,

- Gotoh, O (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *Journal of Biological Chemistry*. 267:83-90.
- Gotoh, O, Fuji-Kuriyama, Y. (1989) *Frontiers in Biotransformation, Basis and Mechanisms of Regulation of Cytochrome P-450* Taylor & Francis, London, New York, Philadelphia, 1989,
- Graham-Lorence, S, Truan, G, Peterson, JA, Falck, JR, Wei, S, Helvig, C, Capdevila, JH (1997) An Active Site Substitution, F87V, Converts Cytochrome P450 BM-3 into a Regio- and Stereoselective (14S,15R)-Arachidonic Acid Epoxygenase. *Journal of Biological Chemistry*. 272:1127-1135.
- Graham, SE, Peterson, JA (1999) How Similar Are P450s and What Can Their Differences Teach Us? *Arch Biochem Biophys*. 369:24-29.
- Graham, SE, Peterson, JA (2002) Sequence alignments, variabilities, and vagaries. *Methods Enzymol*. 357:15-28.
- Guengerich, FP (1991) Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. 266:10019-10022.
- Hall, TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hannemann, F, Bichet, A, Ewen, KM, Bernhardt, R (2007) Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1770:330-344.
- Hardwick, JP (2008) Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases. *Biochemical Pharmacology*. 75:2263-2275.
- Hardwick, JP, Song, BJ, Huberman, E, Gonzalez, FJ (1987) Isolation, complementary DNA sequence, and regulation of rat hepatic lauric acid omega-hydroxylase (cytochrome P-450LA omega). Identification of a new cytochrome P-450 gene family. *Journal of Biological Chemistry*. 262:801-810.
- Hasemann, CA, Kurumbail, RG, Boddupalli, SS, Peterson, JA, Deisenhofer, J (1995) Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure*. 3:41-62.
- Haux, CF, L. (1988) Biochemical methods for detecting effects of contaminants on fish. *Ambio*. 176:376-380.
- Heilmann, LJ, Sheen Y-Y, Bigelow S. W., Nebert D. W. (1988) Trout P450IA1: cDNA and Deduced Protein Sequence, Expression in Liver, and Evolutionary Significance *Cell Biol*. 7 379-387.
- High, S, Dobberstein, B (1992) Mechanisms that determine the transmembrane disposition of proteins. *Current Opinion in Cell Biology*. 4:581-586.
- Hodgson, AV, Strobel, HW (1996) Characterization of the FAD Binding Domain of Cytochrome P450 Reductase. *Arch Biochem Biophys*. 325:99-106.
- Hoffman, SMG, Fernandez-Salguero, P, Gonzalez, FJ, Mohrenweiser, HW (1995) Organization and evolution of the cytochrome P450 CYP2A-2B-2F subfamily gene cluster on human chromosome 19. *Journal of Molecular Evolution*. 41:894-900.



- Hrs - Brenko, M (1971) The reproductive cycle of the *Mytilus galloprovincialis* Lamk in the Northern Adriatic Sea and *Mytilus edulis* L. at Long Island Sound. *Thalassia Jugoslavica*. 7:533-542.
- Hsu, M-H, Savas, Ü, Griffin, KJ, Johnson, EF (2007) Human Cytochrome P450 Family 4 Enzymes: Function, Genetic Variation and Regulation. *Drug Metabolism Reviews*. 39:515-538.
- Hughes, AL, Nei, M (1988) Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature*. 335:167-170.
- Ingelman-Sundberg, M, Oscarson, M, McLellan, RA (1999) Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends in Pharmacological Sciences*. 20:342-349.
- James, MO, Boyle, SM (1998) Cytochromes P450 in crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 121:157-172.
- Johnson, EF, Walker, DL, Griffin, KJ, Clark, JE, Okita, RT, Muerhoff, AS, Masters, BS (1990) Cloning and expression of three rabbit kidney cDNAs encoding lauric acid .omega.-hydroxylases. *Biochemistry*. 29:873-879.
- Jorgensen, A, Rasmussen, LJ, Andersen, O (2005) Characterisation of two novel CYP4 genes from the marine polychaete *Nereis virens* and their involvement in pyrene hydroxylase activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 336:890-897.
- Jørgensen, CB (1990) Bivalve Filter Feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Olsen & Olsen,
- Joseph, PD, Mannervik, B, de Montellano, PRO (1997) *Molecular Toxicology*. Oxford University Press,
- Kahn, RA, Durst, F (2000) Chapter Six Function and evolution of plant cytochrome P450. U: John T. Romeo, RILV, Vincenzo De, L, (ed.) *Recent Advances in Phytochemistry*. vol. Volume 34. Elsevier, p. 151-189.
- Kalsotra, A, Strobel, HW (2006) Cytochrome P450 4F subfamily: At the crossroads of eicosanoid and drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics*. 112:589-611.
- Kalsotra, A, Turman, CM, Kikuta, Y, Strobel, HW (2004) Expression and characterization of human cytochrome P450 4F11: Putative role in the metabolism of therapeutic drugs and eicosanoids. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 199:295-304.
- Kikuta, Y, Kusunose, E, Kusunose, M (2002) Prostaglandin and leukotriene omega-hydroxylases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 68-69:345-362.
- Kirischian, N, McArthur, A, Jesuthasan, C, Krattenmacher, B, Wilson, J (2011) Phylogenetic and Functional Analysis of the Vertebrate Cytochrome P450 2 Family. *Journal of Molecular Evolution*. 72:56-71.
- Kirischian, NL, Wilson, JY (2012) Phylogenetic and functional analyses of the cytochrome P450 family 4. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 62:458-471.
- Klotz, AV, Stegeman, JJ, Walsh, C (1984) An alternative 7-ethoxyresorufin o-deethylase activity assay: A continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. *Analytical Biochemistry*. 140:138-145.

- Koo, LS, Tschirret-Guth, RA, Straub, WE, Moëne-Loccoz, P, Loehr, TM, Ortiz de Montellano, PR (2000) The Active Site of the Thermophilic CYP119 from *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Biological Chemistry*. 275:14112-14123.
- Kuang-Hui, L, Bradfield, JY, Keeley, LL (1996) Age and Starvation Effects on Hypertrehalosemic Hormone-dependent Gene Expression of Cytochrome P450C1 in the Cockroach, *Blaberus discoidalis*. *Journal of Insect Physiology*. 42:925-930.
- Lee, RF, Sauerheber, R, Benson, AA (1972) Petroleum Hydrocarbons: Uptake and Discharge by the Marine Mussel *Mytilus edulis*. *Science*. 177:344-346.
- Lesk, AM, Chothia, C (1980) How different amino acid sequences determine similar protein structures: The structure and evolutionary dynamics of the globins. *Journal of Molecular Biology*. 136:225-270.
- Lewis, DFV (1995) Three-dimensional models of human and other mammalian microsomal P450s constructed from an alignment with P450102 (P450bm3). *Xenobiotica*. 25:333-366.
- Lewis, DFV, Lake, BG (1999) Molecular modelling of CYP4A subfamily members based on sequence homology with CYP102. *Xenobiotica*. 29:763-781.
- Li, H, Poulos, TL (1997) The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat Struct Mol Biol*. 4:140-146.
- Liu, N, Zhang, L (2004) CYP4AB1, CYP4AB2, and Gp-9 gene overexpression associated with workers of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. *Gene*. 327:81-87.
- Livingston, DR (2002) Cytochrome P450 in Pollution Monitoring. Use of Cytochrome P450 1A (CYP1A) as a Biomarker of Organic Pollution in Aquatic and other Organisms. U: Richardson, M, ed *Environmental Xenobiotics*. Taylor & Francis, London, UK, p. 143-160.
- Livingston, DRaF, L. and George, S.G. (1994) Molecular biomarkers and toxic consequences of impact by organic pollution in aquatic organisms. U: Sutcliffe, DW, ed *Water quality & stress indicators in marine and freshwater systems: linking levels of organisation*. vol. FBA Special Publications,4. Freshwater Biological Association, Ambleside, UK, p. 154-171.
- Livingstone, D (1991) Organic Xenobiotic Metabolism in Marine Invertebrates. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. vol. 7. Springer Berlin Heidelberg, p. 45-185.
- Livingstone, DR (1987) Seasonal responses to diesel oil and subsequent recovery of the cytochrome P-450 monooxygenase system in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and the periwinkle, *Littorina littorea* L. *Science of The Total Environment*. 65:3-20.
- Livingstone, DR (1993) Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 57:195-211.
- Livingstone, DR, Chipman, JK, Lowe, DM, Minier, C, Pipe, RK (2000) Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *International Journal of Environment and Pollution*. 13:56-91.
- Loughran, PA, Roman, LJ, Miller, RT, Masters, BSS (2001) The Kinetic and Spectral Characterization of the *E. coli*-Expressed Mammalian CYP4A7: Cytochrome b5 Effects Vary with Substrate. *Arch Biochem Biophys*. 385:311-321.

- Loughran, PA, Roman, LJ, Aitken, AE, Miller, RT, Masters, BSS (2000) Identification of Unique Amino Acids That Modulate CYP4A7 Activity†. *Biochemistry*. 39:15110-15120.
- Lukyanova, ON, Khotimchenko, YS (1995) Lipid peroxidation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* and sea-urchin *Strongylocentrotus intermedius* during the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 110:371-377.
- Maibèche-Coisne, M, Jacquin-Joly, E, François, MC, Nagnan-Le Meillour, P (2002) cDNA cloning of biotransformation enzymes belonging to the cytochrome P450 family in the antennae of the noctuid moth *Mamestra brassicae*. *Insect Molecular Biology*. 11:273-281.
- Maibèche-Coisne, M, Nikonov, AA, Ishida, Y, Jacquin-Joly, E, Leal, WS (2004) Pheromone anosmia in a scarab beetle induced by in vivo inhibition of a pheromone-degrading enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:11459-11464.
- Matsunaga, E, Umeno, M, Gonzalez, F (1990) The rat P450 IID subfamily: Complete sequences of four closely linked genes and evidence that gene conversions maintained sequence homogeneity at the heme-binding region of the cytochrome P450 active site. *Journal of Molecular Evolution*. 30:155-169.
- McCarthy, JF, Shugart, LR (1990) *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Publishers,
- Miao, J, Pan, L, Liu, N, Xu, C, Zhang, L (2011) Molecular cloning of CYP4 and GSTpi homologues in the scallop *Chlamys farreri* and its expression in response to Benzo[a]pyrene exposure. *Mar Genomics*. 4:99-108.
- Miles, CS, Ost, TWB, Noble, MA, Munro, AW, Chapman, SK (2000) Protein engineering of cytochromes P-450. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1543:383-407.
- Milton, MN, Elcombe, CR, Gibson, GG (1990) On the mechanism of induction of microsomal cytochrome P450IVA1 and peroxisome proliferation in rat liver by clofibrate. *Biochem Pharmacol*. 40:2727-2732.
- Modi, S, Sutcliffe, MJ, Primrose, WU, Lian, L-Y, Roberts, GCK (1996) The catalytic mechanism of cytochrome P450 BM3 involves a 6 Å movement of the bound substrate on reduction. *Nat Struct Mol Biol*. 3:414-417.
- Modi, S, Primrose, WU, Boyle, JMB, Gibson, CF, Lian, L-Y, Roberts, GCK (1995) NMR Studies of Substrate Binding to Cytochrome P450 BM3: Comparisons to Cytochrome P450 cam. *Biochemistry*. 34:8982-8988.
- Munro, AW, Lindsay, JG (1996) Bacterial cytochromes P-450. *Molecular Microbiology*. 20:1115-1125.
- Munro, AW, Girvan, HM, McLean, KJ (2007) Cytochrome P450–redox partner fusion enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1770:345-359.
- Nebert, DW, Gonzalez, FJ (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem*. 56:945-993.
- Nebert, DW i sur., (1989) The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA*. 8:1-13.

- Nelson, D (2006) Cytochrome P450 Nomenclature, 2004. U: Phillips, I, Shephard, E, (ed.) Cytochrome P450 Protocols. vol. 320. Humana Press, p. 1-10.
- Nelson, DR (1998) Metazoan cytochrome P450 evolution. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 121:15-22.
- Nelson, DR (2003) Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution. *Arch Biochem Biophys.* 409:18-24.
- Nelson, DR (2009) The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics.* 4:59-65.
- Nelson, DR, Strobel, HW (1987) Evolution of cytochrome P-450 proteins. *Molecular Biology and Evolution.* 4:572-593.
- Nelson, DR, Zeldin, DC, Hoffman, SM, Maltais, LJ, Wain, HM, Nebert, DW (2004) Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics.* 14:1-18.
- Nelson, DR i sur., (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12:1-51.
- Nelson, DR i sur., (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* 6:1-42.
- Oliver, CF, Modi, S, Sutcliffe, MJ, Primrose, WU, Lian, L-Y, Roberts, GCK (1997) A Single Mutation in Cytochrome P450 BM3 Changes Substrate Orientation in a Catalytic Intermediate and the Regiospecificity of Hydroxylation†. *Biochemistry.* 36:1567-1572.
- Omura, T, Sato, R (1964a) The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: I. EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE. *Journal of Biological Chemistry.* 239:2370-2378.
- Omura, T, Sato, R (1964b) The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: II. SOLUBILIZATION, PURIFICATION, AND PROPERTIES. *Journal of Biological Chemistry.* 239:2379-2385.
- Orton, TC, Parker, GL (1982) The effect of hypolipidemic agents on the hepatic microsomal drug-metabolizing enzyme system of the rat. Induction of cytochrome(s) P-450 with specificity toward terminal hydroxylation of lauric acid. *Drug Metabolism and Disposition.* 10:110-115.
- Oscarson, M, Hidestrand, M, Johansson, I, Ingelman-Sundberg, M (1997) A Combination of Mutations in the CYP2D6\*17(CYP2D6Z) Allele Causes Alterations in Enzyme Function. *Molecular Pharmacology.* 52:1034-1040.
- Pan, L, Liu, N, Xu, C, Miao, J (2011) Identification of a novel P450 gene belonging to the CYP4 family in the clam *Ruditapes philippinarum*, and analysis of basal- and benzo(a)pyrene-induced mRNA expression levels in selected tissues. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 32:390-398.
- Pan, L, Wen, Z, Baudry, J, Berenbaum, MR, Schuler, MA (2004) Identification of variable amino acids in the SRS1 region of CYP6B1 modulating furanocoumarin metabolism. *Arch Biochem Biophys.* 422:31-41.

- Pandey, AV, Miller, WL (2005) Regulation of 17,20 Lyase Activity by Cytochrome b5 and by Serine Phosphorylation of P450c17. *Journal of Biological Chemistry*. 280:13265-13271.
- Pauley, CJ, Ledwith, BJ, Kaplanski, C (2002) Peroxisome proliferators activate growth regulatory pathways largely via peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -independent mechanisms. *Cellular Signalling*. 14:351-358.
- Payne, JF (1977) Mixed function oxidases in marine organisms in relation to petroleum hydrocarbon metabolism and detection. *Marine Pollution Bulletin*. 8:112-116.
- Peters, LD, Nasci, C, Livingstone, DR (1998a) Variation in levels of cytochrome P4501A, 2B, 2E, 3A and 4A-immunopositive proteins in digestive gland of indigenous and transplanted mussel *Mytilus galloprovincialis* in Venice Lagoon, Italy. *Marine Environmental Research*. 46:295-299.
- Peters, LD, Nasci, C, Livingstone, DR (1998b) Immunochemical investigations of cytochrome P450 forms/epitopes (CYP1A, 2B, 2E, 3A and 4A) in digestive gland of *Mytilus* sp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 121:361-369.
- Porte, C, Lemaire, P, Peters, LD, Livingstone, DR (1995) Partial purification and properties of cytochrome P450 from digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Marine Environmental Research*. 39:27-31.
- Porter, TD, Coon, MJ (1991) Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 266:13469-13472.
- Poulos, TL, Finzel, BC, Howard, AJ (1987) High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *Journal of Molecular Biology*. 195:687-700.
- Poulos, TL, Finzel, BC, Gunsalus, IC, Wagner, GC, Kraut, J (1985) The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Journal of Biological Chemistry*. 260:16122-16130.
- Ravichandran, K, Boddupalli, S, Hasermann, C, Peterson, J, Deisenhofer, J (1993) Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science*. 261:731-736.
- Rewitz, KF, Kjellerup, C, Jørgensen, A, Petersen, C, Andersen, O (2004) Identification of two *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) cytochromes P450 and induction by xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 138:89-96.
- Roberts, GA, Grogan, G, Greter, A, Flitsch, SL, Turner, NJ (2002) Identification of a New Class of Cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp. *Journal of Bacteriology*. 184:3898-3908.
- Roman, LJ, Palmer, CNA, Clark, JE, Muerhoff, AS, Griffin, KJ, Johnson, EF, Masters, BSS (1993) Expression of Rabbit Cytochromes P4504A Which Catalyze the  $\omega$ -Hydroxylation of Arachidonic Acid, Fatty Acids, and Prostaglandins. *Arch Biochem Biophys*. 307:57-65.
- Roman, RJ (2002) P-450 Metabolites of Arachidonic Acid in the Control of Cardiovascular Function. *Physiological Reviews*. 82:131-185.
- Rowland, P i sur., (2006) Crystal Structure of Human Cytochrome P450 2D6. *Journal of Biological Chemistry*. 281:7614-7622.
- Sabatini, DD, Kreibich, G, Morimoto, T, Adesnik, M (1982) Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles. *The Journal of Cell Biology*. 92:1-22.

- Sabourault, C, Amichot, M, Pauron, D, Bergé, JB, Lafaurie, M, Girard, JP (1999) Cloning of CYP4F7, a Kidney-Specific P450 in the Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Biochem Biophys Res Commun.* 258:155-161.
- Sakaguchi M, MK, Sato R. (1987) A short amino-terminal segment of microsomal cytochrome P-450 functions both as an insertion signal and as a stop-transfer sequence. *EMBO J.* 6:2425-2431.
- Schenkman, JB, Jansson, I (2003) The many roles of cytochrome b5. *Pharmacology & Therapeutics.* 97:139-152.
- Schneider, S, Marles-Wright, J, Sharp, KH, Paoli, M (2007) Diversity and conservation of interactions for binding heme in b-type heme proteins. *Natural Product Reports.* 24:621-630.
- Seed, R (1976) *Ecology.* Cambridge University Press, Cambridge,
- Shaw, JP, Large, AT, Donkin, P, Evans, SV, Staff, FJ, Livingstone, DR, Chipman, JK, Peters, LD (2004) Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology.* 67:325-336.
- Shimada, T, Mernaugh, RL, Guengerich, FP (2005) Interactions of mammalian cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450 reductase, and cytochrome b5 enzymes. *Arch Biochem Biophys.* 435:207-216.
- Silverman, RB (2002) *The Organic Chemistry of Enzyme-catalyzed Reactions.* Academic Press,
- Simpson, AECM (1997) The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *General Pharmacology: The Vascular System.* 28:351-359.
- Singh, I (1997) *Biochemistry of peroxisomes in health and disease.* Molecular and Cellular Biochemistry. 167:1-29.
- Snyder, MJ (1998) Cytochrome P450 Enzymes Belonging to the CYP4 Family from Marine Invertebrates. *Biochem Biophys Res Commun.* 249:187-190.
- Snyder, MJ (2000) Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquat Toxicol.* 48:529-547.
- Sono, M, Roach, MP, Coulter, ED, Dawson, JH (1996) Heme-Containing Oxygenases. *Chemical Reviews.* 96:2841-2888.
- Spry JA, LD, Wiseman A, Gibson GG, Goldfarb PS (1989) Cytochrome P-450 gene expression in the common mussel *Mytilus edulis*. *Biochem Soc Trans.* 17:1013-1014.
- Stark, K, Wongsud, B, Burman, R, Oliw, EH (2005) Oxygenation of polyunsaturated long chain fatty acids by recombinant CYP4F8 and CYP4F12 and catalytic importance of Tyr-125 and Gly-328 of CYP4F8. *Arch Biochem Biophys.* 441:174-181.
- Stegeman, JJ (1985) Benzo[a]pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusc species from the Western North Atlantic. *Marine Biology.* 89:21-30.
- Stegeman, JJ (1989) Cytochrome P450 forms in fish: Catalytic, immunological and sequence similarities. *Xenobiotica.* 19:1093-1110.

- Tamura, K, Peterson, D, Peterson, N, Stecher, G, Nei, M, Kumar, S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28:2731-2739.
- Tanaka, T, Nei, M (1989) Positive darwinian selection observed at the variable-region genes of immunoglobulins. *Molecular Biology and Evolution*. 6:447-459.
- Vergeres, G, Winterhalter, KH, Richter, C (1989) Identification of the membrane anchor of microsomal rat liver cytochrome P-450. *Biochemistry*. 28:3650-3655.
- Viarengo, A, Lowe, D, Bolognesi, C, Fabbri, E, Koehler, A (2007) The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 146:281-300.
- Walker, CH, Livingstone, DR (1992) *Persistent pollutants in marine ecosystems*. Pergamon Press,
- Waxman, DJ (1999) P450 Gene Induction by Structurally Diverse Xenochemicals: Central Role of Nuclear Receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys*. 369:11-23.
- Werck-Reichhart, D, Feyereisen, R (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol*. 1:1-9.
- Whalen, K, Starczak, V, Nelson, D, Goldstone, J, Hahn, M (2010) Cytochrome P450 diversity and induction by gorgonian allelochemicals in the marine gastropod *Cyphoma gibbosum*. *BMC Ecology*. 10:24.
- Williams, DE, Buhler, DR (1983) Comparative properties of purified cytochrome P-448 from  $\beta$ -naphthoflavone treated rats and rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 75:25-32.
- Williams, PA, Cosme, J, Sridhar, V, Johnson, EF, McRee, DE (2000) Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell*. 5:121-131.
- Wootton, AN, Goldfarb, PS, Lemaire, P, O'Hara, SCM, Livingstone, DR (1996) Characterization of the presence and seasonal variation of a CYP1A-like enzyme in digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*. 42:297-301.
- Yano, JK, Wester, MR, Schoch, GA, Griffin, KJ, Stout, CD, Johnson, EF (2004) The Structure of Human Microsomal Cytochrome P450 3A4 Determined by X-ray Crystallography to 2.05-Å Resolution. *Journal of Biological Chemistry*. 279:38091-38094.
- Zhu, F, Li, T, Zhang, L, Liu, N (2008) Co-up-regulation of three P450 genes in response to permethrin exposure in permethrin resistant house flies, *Musca domestica*. *BMC Physiology*. 8:18.
- Zuber, R, Anzenbacherová, E, Anzenbacher, P (2002) Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 6:189-198.

## 9. PRILOZI

---



## 9 PRILOZI

### 9.1 PRILOG 1.

Homologni CYP4 sljedovi korišteni u dizajnu Slike 17. Homologni CYP4 sljedovi preuzeti su sa [Cytochrome P450 Homepage](http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html) baze podataka (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>).

>CYP4A1\_rat|203866|gb|AAA41061\_1|\_CYP4A1\_rat|203866|gb|AAA41061.1|\_cytochrome  
\_P-450-LA-omega\_Rattus\_norvegicus\_509\_bp

MSVSALSSTRFTGSISGFLQVASVLGLLLLLVKAVQFYLRQWLLKAFQQFSPFFHW  
FFGHKQFQGDKELQQIMTCVENFPSAFPRWFWGSKAYLIVYDPDYMKVILGRSDPKA  
NGVYRLLAPWIGYLLLLNGQPWFQHRRLTPAFHYDILKPYVKNMADSIRLMLDK  
WEQLAGQDSSIEIFQHISLMTLDTVMKCAFSHNGSVQVDGNYKSYIQAIGNLNDLFHS  
RVRNIFHQNDTIYNFSSNGHLFNRACQLAHDHTDGVILRDKDQLQNAELEKVKKK  
RRLDFLDILLARMENGDSLSDKDLRAEVDTFMFEGHDTTASGVSWIFYALATHPKH  
QQRCREEVQSVLGDGSSITWDHLDQIPYTTMCIKEALRLYPPVPGIVRELSTSVTFPDG  
RSLPKGIQVTLISYGLHHNPKVWPNPEVFDPSRFAPDSPRHSHSFLPFSSGGARNCIGKQ  
FAMSEMKVIVALTLRFELLPDPTKVIPLPRLVLKSKNGIYLYLKKLH

>CYP4A2\_rat|203789|gb|AAA41039\_1|\_CYP4A2\_rat|203789|gb|AAA41039.1|\_cytochrome  
\_P-450\_IVA2\_Rattus\_norvegicus\_504\_bp

MGFSVFSPTRSLDGVSGFFQGAFLLSLFLVLFKAVQFYLRQWLLKALEKFPSTPSHW  
LWGHNLKDREFQQVLTWVEKFPGLQWLSGSTARVLLYDPDYVKVVLGRSDPKP  
YQSLAPWIGYLLLLNGKKWFQHRRLTPAFHYDILKPYVKIMADSVSIMLDKWEK  
LDDQDHPLEIFHYVSLMTLDTVMKCAFSHQGSVQLDVNSRSYTKAVEDLNNLIFFRV  
RSAFYGNSIYNMSSDGRLSRRACQIAHEHTDGVILTRKAQLQNEEELQKARKKRHL  
DFLDILLFAKMEDGKSLSEDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWIFYALATHPEHQR  
CREEVQSILGDGTSVTWDHLDQMPYTTMCIKEALRLYSPVPSVSRELSSPVTFPDGRSI  
PKGIRVTILYGLHHNPSYWPNPKVFDPSRFSPDSPRHSHAYLPFSSGGARNCIGKQFAM  
NELKVAVALTLRFELLPDPTRIPVPMPLVLKSKNGIHLRLKCLR

>CYP4A3\_rat|204990|gb|AAA41458\_1|\_CYP4A3\_rat|204990|gb|AAA41458.1|\_cytochrome  
\_P450\_(IVA3)\_Rattus\_norvegicus\_507\_bp

MGFSVFTPTRSLDGVSGFFQGAFLLSLFLVLFKAVQFYLRQWLLKALEKFPSTPSHW  
LWGHDLKDREFQQVLTWVEKFPGACLQWLSGSKTRVLLYDPDYVKVVLGRSDPKA  
SGIYQFLAPWIGYGLLLLNGKKWFQHRMLTPAFHYGILKPYVKIMADSVNIMLDK  
WEKLDDQDHPLEIFHYVSLMTLDTVMKCAFESHQGSVQLDVNSRSYTKAVEDLNNLT  
FFRVRSAFYGNSIIYNMSSDGRSRRACQIAHEHTDGVIMRKAQLQNEEELQKARK  
KRHLDFLDILLFAKMEDGKSLSEDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWVFYALATHPE  
HQERCREEVQSILGDGTSVTWDHLDQIPYTTMCIKEALRLYPPVPSVSRELSSPVTFPD  
GRSIPKGITTTILYGLHHNPSYWPNPKVFDPSRFSRSPRSHAYLPFSGGARNCIGKQ  
FAMNELKVAVALTLRFELLDPTRIPVPMARLVLKSKNGIHLRLKCLR

>CYP4A4\_rabbit|164981|gb|AAA31232\_1|\_CYP4A4\_rabbit|164981|gb|AAA31232.1|\_cytochrome\_P-450p-2\_partial\_Oryctolagus\_cuniculus\_490\_bp

VAALLGLLLLLLKAAQLYLHRQWLLRALQQFPCPPFWLLGHSREFQNDQELERIQK  
WVEKFPGACPWWLSGNKARLLVYDPDYLVILGRSDPKAPRNYKLMTWPWIGYGLLL  
LDGQTFWQHRMLTPAFHYDILKPYVGLMVDSVQIMLDRWEQLISQDSSLEIFQHVS  
LMTLDTIMKCAFSYQGSVQLDRNSHSYIQAINDLNNLVFYRARNVHFHQSDFLYRLSP  
EGRLFHRACQLAHEHTDRVIQQRKAQLQQEGELEKVRKRRLDFLDVLLFAKMENG  
SSLSDQDLRAEVDTFMFEGHDTTASGVSWIFYALATHPEHQHRCREEIQGLLDGASI  
TWEHLDQMPYTTMCIKEALRLYPPVPSVTRQLSKPVTFPDGRSLPKGVILFLSIYGLH  
YNPKVWQNPEVDFPFRFAPDSAYHSHAFLPFSGGARNCIGKQFAMRELKVAVALTL  
VRFELLDPTRIPPIARVVLSKNGIHLRLRKLH

>CYP4A5\_rabbit|164975|gb|AAA31229\_1|\_CYP4A5\_rabbit|164975|gb|AAA31229.1|\_lauric  
\_acid\_omega-hydroxylase\_Oryctolagus\_cuniculus\_511\_bp

MSVSALSPTRLPGSLGLLQVAALLGLLLLLLKAAQLYLRRQWLLRALQQFPCPPFH  
WLLGHSREFQMNQELQQILKWVEKFPACPHWIGGNKVRVQLYDPDYMKVILGRS  
DPKSRGSYTFVAPWIGYGLLLLNGQPWFQHRMLTPAFHYDILKPYVGLMVDSVQI

MLDKWEQLVSQDSSLEVFQDISLMTLDTIMKCAFSYQGSVQLDSRNSQSYIQAVGDL  
NNLVFARVRNIFHQSDTIYRLSPEGRLSHRACQLAHEHTDRVIQQRKAQLQQEGELE  
KVRRKRRLDFLDVLLFAKMENGSSLSLSDQDLRAEVDTFMFEGHDTTASGVSWIFYAL  
ATHPEHQHRCREEIQGLLGDGASITWEHLQMPYTTMCIKEAMRLYPPVPAISRDLSS  
PVTFPDGRSLPKGFTVTLSTIYGLHHNPNVWPNPEVDFDPGRFTPGSARHSHAFLPFSSGG  
ARNCIGKQFAMNELKVAVALTLVRFELLPDPTRIPKPTARLVLKSNNGIHLRLRKLQ

>CYP4A6\_rabbit|164987|gb|AAA31234\_1|\_CYP4A6\_rabbit|164987|gb|AAA31234.1|\_cytochrome\_P-450-ka1\_(EC\_1.14.99.)\_Oryctolagus\_cuniculus\_510\_bp

MSVSALNPTRLPGSLSGLLQVAGLLGLLLLLLKAAQLYLHRQWLLRALQQFPCPPFH  
WLLGHSREFQNGHELQVMLKWVEKFPSACPRWLWGSRAHLLIYDPDYMKVILGRS  
DPKAQGSYRFLAPWIGYGLLLLNGQTFWFQHRRMLTPAFHYDILKPYVGLMADSVQI  
MLDKWEQLVSQDSSLEVFQDISLMTLDTIMKCAFSSHQGSVQLDRNSQSYIQAVGDLN  
NLFFSRVRNVFHQSDTIYRLSPEGRLSHRACQLAHEHTDRVIQQRKAQLQQEGELEK  
VRRKRRLDFLDVLLFAKMENGSSLSLSDQDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWIFYALAT  
HPEHQHRCREEIQGLLGDGASITWEHLQMPYTTMCIKEALRLYPPVPGVGRQLSSP  
VTFPDGRSLPKGVIVTSLIYALHHNPKCGPNPEVDFDPSFAPGSARHSHAFLPFSSGGPR  
NCIGKQFAMNELKVAVALTLRFEELLPDKRVPDQKPRLVLKSNNGIHLRLRKLK

>CYP4A7\_rabbit|164979|gb|AAA31231\_1|\_CYP4A7\_rabbit|164979|gb|AAA31231.1|\_lauric\_acid\_omega-hydroxylase\_Oryctolagus\_cuniculus\_511\_bp

MSVSALSSTRLPGSFSGFLQAAALLGLLLLLLKAAQLYLRRQWLLRALQQFPCPPSH  
WLLGHSREFPIDSELQQVLKRVEKFPSACPRWLWGSELFLICYDPDYMKTILGRSDPK  
ARVSYSLAPWIGYGLLLLLEGQTFWFQHRRMLTPAFHYDILKPYVGLMVDSVQVMLD  
KLEKLARKDAPLEIYEHVSLMTLETIMKCAFSSHQGSVQLESRTSKSYIQAVRELSDLA  
LQRVRNVFHQSDFLYRLSPEGRLSHRACQLAHEHTDRVIQQRKAQLQQEGELEKVR  
KRRLDFLDVLLFAKMENGSSLSLSDQDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWIFYALATHPE  
HQHRCREEIQGLLGDGASITWEHLQMPYTTMCIKEALRLYPPVPGVGSKLSSPVTFP  
DGRSLPKGIITLSIYGLHHNPKVWPNPEVDFDPSRFAPGSARHSHAFLPFSSGGSRNCIGK  
QFAMNELKVAVALTLVRFELLPDPTRVPIPITRLVLKSKNGIHLRLRKLH

>CYP4A8\_rat|203757|gb|AAA63485\_1|\_CYP4A8\_rat|203757|gb|AAA63485.1|\_cytochrome  
\_P450\_Rattus\_norvegicus\_508\_bp

MSGSALSFTIFPGSILGFLQIATVLTVLLLLLKTAFYLRHRRWLLRATQQFPSPPSHWF  
FGHKIPKDQDFQDILTRVKNFSPACQWLWGSNVRIQVYDPEYMKLILGRSDPKAHG  
SYRFLAPWIGYGLLLLNGQTFWFQHRMRLTAPAFHYDTLKPYPVGMADSVRIMLDKWE  
QIVGQDSTLEIFQHITLMTLDTIMKCAFSQEGSVQLDRKYKSYKAVEDLNNLFFFRV  
QNMFHQNDFIYSLSSNGRKAHNAWQLAHDYTDQVIKSRKAQLQDEEELQKVKQKR  
RLDFLDILLFARIENGSSLSKDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWIFYALATNPEHQQG  
CRKEIQSLLGDGASITWDDLKMPYTTMCIKEALRIYPPVTAVSRMLSTPVTFPDGRS  
LPKGITVMLSFYGLHHNPTVWPNEVFDPYRFAPESSRHSFLPFGSGGARNCIGKQF  
AMNELKVAVALTLLRFELLPDPTRIPPIPRVLKSKNGIYLRLKKLQ

>CYP4A10\_mouse|3738263|dbj|BAA33804\_1|\_CYP4A10\_mouse|3738263|dbj|BAA33804.1|  
\_cytochrome\_P-450\_Mus\_musculus\_509\_bp

MSVSALSPTRFADSLSGFLQVASVLGLLLLLVKAVQFYLHRQWLLKAFQQFPSPPFH  
WFFGHEQFKGDHELQEIVSCIENFSAFPRWFWGSKAYLTVYDPDYMKVILGRSDPK  
ANGAYRLLAPWIGYGLLLLNGQPWFQHRMRLTAPAFHYDILKPYPVKNMADSIRLMLD  
KWERLADQDSSIEIFQHISLMTLDTVMKCAFESHKGSVQVDGNYRXYLQAIGDLNNLF  
HSRVRNIFHQNDTIYKLSNGRLAKQACQLAHDHTDGVILRKRKDLQDEGELEKIKK  
KRRLDFLDILLFARMENGDSMSDKDLRAEVDTFMFEGHDTTASGVSWIFYALATHPD  
HQQRCREEVQSLLGDGSSITWDHLDQIPYTTMCIKEALRLYPPVPGIVRELSTSVTFPD  
GRSLPKGQVQVTLIYGLHHNPKVWPNEVFDPSRFAPDSRHSFLPFGSGGARNCIG  
KQFAMSELKVIVALTLLRFELLPDPTRVPMPLARLVKSKNGIYLHLKKLH

>CYP4A11\_human|456996|gb|AAB29502\_1|\_CYP4A11\_human|456996|gb|AAB29502.1|\_fa  
tty\_acid\_omega-hydroxylase\_Homo\_sapiens\_519\_bp

MSVSVLSPSRLLDVSGILQAASLLILLLLIKAVQLYLHRQWLLKALQQFPCPPSHW  
LFGHIQELQQDQELQRIQKWVETFPSACPHWLWGGKVRVQLYDPDYMKVILGRSDP  
KSHGSYRFLAPWIGYGLLLLNGQTFWFQHRMRLTAPAFHYDILKPYPVGLMADSVRML  
DKWEELGQDSPLEVFQHVSLMTLDTIMKCAFESHQGSIQVDRNSQSYIQAISDLNNLV

FSRVRNAFHQNDTIYSLTSAGRWTHRACQLAHQHTDQVIQLRKAQLQKEGELEKIKR  
KRHLDFLDILLAKMENGSIKDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWILYALATHPKH  
QERCREEIHSLGSGASITWNHLDQMPYTTMCIKEALRLYPPVPGIGRELSTPVTFPD  
GRSLPKGIMVLLSIYGLHHNPKVWPNEVFDPSRFAPGSAQHSHAFLPFSGGSRNCIG  
KQFAMNELKVATALTLRFELLDPTRIPPIARLVLKSKNGIHLRLRRLPNPCEDKDQ  
L

>CYP4A11\_Macaca\_fuscicularis|71152709|gb|AAZ29443\_1|\_CYP4A11\_Macaca\_fusciculari  
s|71152709|gb|AAZ29443.1|\_cytochrome\_P450\_4A11\_Macaca\_fuscicularis\_519\_bp

MSVSVLSPSRLGSGVILQVTSLLILLIKAAQLYLHRQWLLKALQQFPCPPSHWF  
FGHFQKFQQDQELQRIRKVVEMFPSACPLWLWGGKVRVQLHDPDYMKVILGRSDP  
KSHGSYRFLAPWIGYGLLLNGQTFWFQHRMLTPAFHYDILKAYVALMADSVRVM  
LDKWEKLLGQDSPLEVFQHVSLMTLDTIMKCAFESHQGSIQVDRDSQSYIQAISDLNLL  
VFSRVRNVFHQNDTIYSLTSTGRWTHRACQLAHQHTDQVIQLRKAQLQKEGELEKV  
KRKKHLDFLDILLAKMENGSIKDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWILYALATHP  
KHQERCREEIHGLGSGASITWNHLDQMPYTTMCIKEALRLYPPVPGISRELSTPVT  
PDGRSLPKGIAVMLSIYGLHHNPKVWPNEVFDPSRFAPGSAQHSHAFLPFSGGSRNC  
IGKQFAMNELKVATALTLRFELLDPTRIPIMARLVLKSKNGIHLRLRRLPNPCEDK  
DQL

>CYP4A12A\_mouse\_552\_bp

MSASALSSIRFPGSISEYLQVASVLSLLLLLKFKAQLYLHRQWLLSSTQQFSPPSHWL  
FGHKILKDQDLQDILTRIKNFPSACPQWLWGSKVRIQVYDPDYMKLILGRSDPKANG  
SYRFLAPWIGRGLMLDGQTFWFQHRMLTPAFHYDILKPYTEIMADSVRVMMLDKWE  
QIVGQDSTLEIFRHITLMTLDTIMKCAFSEGSVQLDRKYKSYIQAVEDLNDLVFSRV  
RNIFHLNDIIRVSSNGCKANSACKLAHDHTDQVIKSRRIQLQDEEELEKLLKKRRLD  
FLDILLFARMENGKSLSDKDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWIFYALATNPEHQQRRCR  
KEIQSLLGDGTSITWNDLDKMPYTTMCIKEALRIYPPVPSVSRELSSPVTFPDGRSLPK  
GIHVMLSFYGLHHNPTVWPNEVFDPSRFAPGSSRHSFLPFSGGARNCIGKQFAMN  
ELKVAVALTLRFELLDPTRVPIPIPRIVLKSKNGIHLHLKELQMSASALSSIRFPGSIS  
EYLQVASVLSLLLLLKFKAQLYLHRQWL

>CYP4A12B\_mouse\_464\_bp

LSSTQQFPSPSHWLFHGKILKDQDLQDILTRIKNFPSACPQWLWGSKVRIQVYDPDY  
MKLILGRSDPKAHGSYRFLAPWIGRGLLLLDGQTFWFQHRMMLTPAFHYDILKPYTEI  
MADSVRVMLDKWEQIVGQDSTLEIFQHITLMTLDTIMKCAFSHEGSVQLDRKYKSYI  
QAVEDLNNLFFLRVRNIFHQNDIYRVSSNGCLANSACQLAHDHTDQVIKSRRSQLQD  
EEELEKLLKKRRLDFLDILLFARMENGKSLSDKDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWIF  
YALATNPEHQQRCKEIQSLLGDGASITWNDLDKMPYTTMCIKEALRIYPPVPSVSRE  
LSSPVTFPDGRSLPKGIHVMLSFYGLHHNPTVWPNPEVFDPSRFAPGSSRHSHSFLPFS  
GGARNCIGKQFAMNELKVAVALTLLRFELLPDPTRVPIPIPRIVLKSKNGIHLHLKQLQ

>CYP4A13\_guinea\_pig|348550117|ref|XP\_003460879\_1|\_CYP4A13\_guinea\_pig|348550117  
|ref|XP\_003460879.1|\_PREDICTED:\_cytochrome\_P450\_4A6\_isoform\_X1\_Cavia\_porcellus  
\_508\_bp

MSVSAFSPARFPGSISGFLQVVSLLSLLLLLFKAAHFYLCRQWLLKAFQQFPCAPSHW  
LLGHKILPEDELQQTLKWKVEFPSAYPRWFWGSEAHLIYDPDYMKVILGRSDPKAIS  
FYRFLAPWIGYGLLLNGPTWFQHRMMLTPAFHYDILKPYVEIMANSVRVMLDKWE  
KLISQDASMEIFQPVSLMTLDSIMKCAFSYQGSVQLDWKSRPYLQAIEMNNMFFSR  
VRNMFHQNDTIYSLSSNGQRCKRATQIAHHHTDQIIKQRKAQLKDDKELENIRKKRH  
LDFLDILLFARTENGSSLSDEDLRAEVDTFMFEGHDTTASGICWTLYALATHPSHQQR  
CREEVQNLLGDKGSITWEHLDQMSYTTMCIKEALRLYPPVPSVGRELSKPVTFPDGK  
SLPKGINVILSFHGLHHNPKVWPNPEIFDPSRFAPDSSRHSHSFLPFSGGPRNCIGKQFA  
MNELKVAVAQTLRFELLPDPTRVPIPIQIVLKSKNGIHVYLRKLH

>CYT4A14\_mouse|035728|CP4AE\_MOUSE\_Cytochrome\_P450\_4A14\_OS\_Mus\_musculus  
\_GN\_Cyp4a14\_PE\_2\_SV\_1\_507\_bp

MGFFLFSPTRYLDGISGFFQWAFLLSLFLVLFKAVQFYLRQWLLKTLQHFPMPH  
WLWGHHLKDKELQQILWVEKFPSACLQCLSGSNIRVLLYDPDYVKVVLGRSDPKAS  
GIYQFFAPWIGYGLLLNGKKWFQHRMMLTPAFHYDILKPYVKIMADSVNIMLDKW  
EKLDGQDHPLEIFHCVSLMTLDTVMKCAFSYQGSVQLDENSKLYTKAVEDLNNLTF

RLRNAFYKYNIINYNMSSDGRSLSHHACQIAHEHTDGVIMRKSQIQNEEELQKARKKR  
HLDFLDILLFARMEDRNSLSDEDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWIFYALATHPEHQQ  
RCREEVQSILGDGTSVTWDHLGQMPYTTMCIKEALRLYPPVISVSRELSSPVTFPDGR  
SIPKGITATISYGLHHNPRFWPNPKVFDPSRFAPDSSHHSHAYLPFSGGSRNCIGKQFA  
MNELKVAVALTLRFELLPDPTRIPVPIARLVLKSKNGIHLCLKCLR

>CYP4A15\_koala\_Phascolarctos\_cinereus\_(koala)\_664\_bp

MNSPLSFAWFQGNVSGLLQVSFLLGLGLLVLKVAQMYVRRQRLLRDFQNFPGPPSH  
WLYGNTLEFPVEEELPKMASLAEKFPFCAFPRLTGSWNLLQVYDPEYMKLILSKRDP  
KSHDVYKFLIPWIGKGLLVNLSWFRHRLLTPAFHSDILKPYVGLMADSARVMLD  
KWEKLSYQPLSLEISEHVSLMTLDSLKCAFQSHQSNQMDRHSNLYIQAVHDLSYLL  
SSRMRNAFYHNDVLYWFSSAGRRTREAAQRAHQYTDQVIQRRRQQLQEGGLEAIS  
RKRHLDFLDILLCARTEGGDSLDEELRAEVDTFMFEGHDTTASGISWLLYALATHPE  
HQQKCREEIRGVLGDGTSITWDHLGQLPYTTMCIKEALRLYPPVPSIGRDIKETITFPD  
GRILRAGNSVSLHIYALHHNPRVWENPEVFNPFSPENLTLQHSHAFLPFSAGSRNCI  
GQKFAMNEMKVVLLALTLFFFELKPDTPKPLPISKLVKSKMEPSWLQELMAHPFL  
LILLCMSLLLQVIRLYQRRRWMIRALHLFPAPPAHWFYGHKEFYVKEFEVYHKLM  
EKYPCAVPLWVGPFTMFFSVHDPDYAKILLKRQDPKSAVSHKILES WVGRGLVTLDG  
SKWKKHRQIVKPGFNISILKIFITMMSESVRMML

>CYP4A20X\_human\_340\_bp

NKWEHIAQNSRLELFQHVSLMTLDSIMKCAFQSHQSIQLDRSSYLKAVFNLSKISNQ  
RMNNFLHHNDLVFKFSSQGQIFSKFNQELHQFTHLEKVIQDRKESLKDCLKQDQTTQK  
RRWDFLDILLSAKVENTKDFSEADLQAEVKTTFMFAGHDTTSSAISWILYCLAKYPEH  
QQRCRDEIRELLGDGSSITWEHLSQMPYTTMCIKECLRLYAPVVNISRLLDKPITFPDQ  
RSLPAGITVFINI WALHHNPYFWEDPQVFNPLRFSRENSSEKIHPYAFIPFSAGPRNCIGQ  
HFAIIECKVAVALTLRFKLAPDHSRPPQVVRQVVLKSKNGIHVFAKKV

>CYP4A21\_pig\_504\_bp

MTVPALASVSGLLQVASLLGLLLLLLKAAQLYLRRQWLLKALQQFPSPPSHWLYGH  
SREFQEESELQPLLKRVEKYPSACARWLWGTRAMVLVYDPDYMKVVLARSEPKAPV  
LYRLLIPWIGCGLLLLNGQMWFQRRRMLTPAFHYDILKPYVGLMAKSVQVMLDKW  
EQLVAQDPRLEIVGPVSLMTLDTIMKCAFSHQGSAQTDGDSQSYIQAIWDLKNLIFSR  
LRS AFLQNDIYRLSPEGRQCQRACQKVHQHTDRVIQLRKT HLQKEGEMENVKKKRH  
LDFLDILLFARMENGNSLSDTDVRAEVDTFMAAGHDSTASGISWVLYALASNPEHQQ  
RCREEIQGLLDGTSITWDHLDQMPYTTMCIKEALRLYPPVPSVGRELSKPITFPDGRS  
LPAGIILSLSIYGLHHNPQVWPVNPEEFDPSRFAPGSARHSHAFMPFSGGSRNCIGKQFA  
MNEMKVVALTLLRFELAPDPSRIPVPIQGIVLKS KN GIHLNLRKIP

>CYP4A22\_human\_519\_bp

MSVSVLSPSRRLGGVSGILQVTSLLILLLLLIKAAQLYLHRQWLLKALQQFPCPPSHW  
LFGHIQEFQHDQELQRIQERVKTFPSACPYWIWGGKVRVQLYDPDYMKVILGRSDPK  
SHGSYKFLAPRIGYGLLLLNGQTFWFQHRMLTPAFHNDILKPYVGLMADSVRVMLD  
KWEELGQDSPLEVFQHVSLMTLDTIMKSAFSHQGSIQVDRNSQSYIQAISDLNSLVF  
CCMRNAFHENDTIYSLTSAGRWTHRACQLAHQHTDQVIQLRKAQLQKEGELEKIKR  
KRHLDFLDILLAKMENGSIKDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWILYALATHPKH  
QERCREEIHGLLGDGASITWNHLDQMPYTTMCIKEALRLYPPVPGIGRELSTPVTFPD  
GRSLPKGIMVLLSIYGLHHNPKVWPVNLEVFDPSRFAPGSAQHSHAFLPFSGGSRNCIG  
KQFAMNQLKVARALTLLRFELLPDPTRIPMARLVLKS KN GIHLRLRRLPNPCEDKD  
QL

>CYP4A23\_\_pig\_504\_bp

MTVPALASVSGPLQVASLLGLLLLLLKAAQLYLHRQWLLKALQQFPSPPSHWLYGH  
SREFQEESELPPLLKRVEKYPSACARWLWGTRAMVLVYDPDYMKVVLARSDPKTSV  
VYRLLIPWIGCGLLLLNGQTFWFQRRRMLTPAFHYDILKPYVGLMAKSVQVMLDKWE  
QLVAQDPRLEIVGPVSLMTLDTIMKCAFSHQGSVQTDGDSHSYIQAIWDLKNLFSTRT  
KSAFLQNDIYRLSPEGHKNHRAARIAHQHTDRVIQLRKAQLQKQGEMENVRKKRHL  
DFLDILLAQMEKGNSLSDTDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWILYALASHPEHQQR  
CREEIQGLLDGTSITWDHLDQMPYTTMCIKEALRLYPPVPGVSRELSKPITFPDGRSL



PAGIILSLFIYGLHHNPQVWPNPPEEFDPSRFAPGSARHSHAFMPFSGGSRNCIGKQFAM  
NEMKVAVALTLRFELAPDPSRKPIATPEVVLNSKNGIHLKLRKLP

>CYP4A24\_pig\_|20338995|emb|CAC85662.1|\_cytochrome\_P450\_Sus\_scrofa\_504\_bp

MTVPALASASGLLQVASLLGLLLLLLKAAQLYLHRQWLLKALQQFPSPPSHWLYGH  
SREFQEESELPLLKRVEKYPSACALWRWGTRAMVLVYDPDYMKVVLARSDPKNSV  
VYRLLIPWIGCGLLLLNGQTFQRRRMLTPAFHYDILKPYVGLMAKSVQVMLDKWE  
QLVAQDPRLEIVGPVSLMTLDTIMKCAFESHQGSQAQTDGDSHSYIQAIWDLKNLFSIRT  
KSAFLQNDIYRLSPEGRKNHRAARIAHQHTDRVIQLRKAQLQKQGEMENVRKKRHL  
DFLDILLARMEKGNLSDTDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWILYALASHPEHQQR  
REEIQGLLDGTSITWDHLDQMPYTTMCIKEALRLYPPVPGVSRELSKPITFPDGRSLP  
AGITLSLSIYGLHHNPQVWPNPPEEFDPSRFAPGSARHSHAFMPFSGGSRNCIGKQFAM  
NEMKVAVALTLRFELAPDPSRKPIATPEVVLNSKNGIHLKLRKLP

>CYP4A25\_pig\_504\_bp

MTVPALASASGLLQVASLLGLLLLLLKAAQLYLRRQWLLKALQQFPSPPSHWLYGH  
SREFQEESELQPLLKRVEKYPSACARWLWGTRAMVLVYDPDYMKVVLARSEPKAPV  
LYRLLIPWIGCGLLLLNGQTFQRRRMLTPAFHYDILKPYVGLMAKSVQVMLDKWE  
QLVAQDPRLEIVGPVSLMTLDTIMKCAFESHQGSQAQTDGDSHSYIQAIWDLKNLFSIRT  
KSAFLQNDIYRLSPEGRKNHRAARIAHQHTDRVIQLRKAQLQKQGEMENVRKKRHL  
DFLDILLARMEKGNLSDTDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWILYALASHPEHQQR  
REEIQGLLDGTSITWDHLDQMPYTTMCIKEALRLYPPVPGVSRELSKPITFPDGRSLP  
AGIILSVYSLHHNPQVWPNPPEEFDPSRFAPGSARHSHAFMPFSGGSRNCIGKQFAM  
NEMKVAVALTLRFELAPDPSRKPTVIPEVVLHNSKNGIHLKLRKLP

>CYP4B1\_human|153218660|ref|NP\_000770\_2|\_CYP4B1\_human|153218660|ref|NP\_000770.2|\_cytochrome\_P450\_4B1\_isoform\_b\_Homo\_sapiens\_511\_bp

MVPSFSLSFSSLGLWASGLLVLGFLKLIHLLLRQTLAKAMDKFPGPPTHWLFGHA  
LEIQETGSLDKVVSWAHQFPYAHPLWFGQFIGFLNIYEPDYAKAVYSRGDPKAPDVY  
DFFLQWIGRGLLVLEGPKWLQHRKLLTPGFHYDVLKPYVAVFTESTRIMLDKWEK

AREGKSFDIFCDVGHMALNTLMKCTFGRGDTGLGHRDSSYYLAVSDLTLLMQQRLV  
SFQYHNDFIYWLTTPHGRRFLRACQVAHDHTDQVIRERKAALQDEKVRKKIQNRRHL  
DFLDILLGARDEDDIKLSDADLRAEVDTFMFEGHDTTTSGISWFLYCMALYPEHQHR  
CREEVREILGDQDFQWDDLKMTYLTMCIKESFRLYPPVPQVYRQLSKPVTVDGR  
SLPAGSLISMHIYALHRNSAVWPDPEVFDLRFSTENASKRHPFAFMPFSAGPRNCIGQ  
QFAMSEMKVVTAMCLLRFEFSLDPSRLPIKMPQLVLRSKNGFHLHLKPLGPGSGK

>CYP4B1\_pig\_511\_bp

MVPALLSLSLSHLSLWALGLLALGVLKLTSLLLRRQMLARAMDKFPGPPTHWIFGH  
ALEIQQTGSLDKMVSWAHQFPHAHPLWLGPFGLFNLNIEPEYAKAVYSRGDPKASDL  
YDFFLQWIGKGLLVLHGPKWFQHRKLLTPGFHHDVLPYVAVMANSARVMLDKWE  
EKAREDKSFDIYHDVGHMALELLMKCTFGKGTSGLNYSNAYHLAVRDLTLLMQQ  
RLSSFQYHNDFIYWLTTPHGRRFLRACRVAHDHTDQVIRERKAALQDKEEQERIQSRR  
HLDFLDILLGAQDEDRVKLPDADLRAEVDTFMFGGHDTTTRGISWFLYCMSLNPEHQ  
HRCRDEIREILGDRDSIQGEDLGKMTYLTMCIRESFRLYPPGPQVYRQLSEPVSFVDG  
RSLPAGSLISLHIYALHRNSAVWPDPEVFDPLRFSLENMAGRHPFAFLPFSAGPRNCIG  
QQFAMNEMKVVAALSLLRFEFAPDPSRPPMPQLTLCSTGIHLRLTSLGQGSGK

>CYP4B2\_goat\_511\_bp

MVPVLLSLSLSHLSLWAFGLVSVLVFLKLTRLLRRQMLARAMDRFSGPPTHWLFHG  
ALEIQQTGGLDKVVYWTHQFPYAHQLWLGRFLGFLNIYDPEYAKAVYSRGDPKAPD  
VYDFFLQWIGKGLLVLQGPWFQHRKLLTPGFHYDVLKPYVAVFAESARVMLDKW  
EKKAREQKSFDIFSDVGHMALDSLMKCTFGKGTSGLNDRDNNYYLAVSELTLLMQQ  
RIDSFQYHNDFIYFLTPHGRRFLRACQVAHDHTDQVIRERKAALQDKKEREKIQSKRH  
LDFLDILLGARDEEGIKLSDEDLRAEVNTFMFAGHDTTSAISWVLYCMSLYPEHQRR  
CREEIQEILGDRDSLKWEDLAEMTYLTMCIKESFRLYPPVPQVYRQLSKPVNFVDGRS  
LPAGSLISLHIYALHRNSTVWTDPEVFDPLRFSPENVAGRHSFAFIPFSAGPRNCIGQQF  
AMNEVKVVTALCLLRFEFSPDPSKLPQMPQLVLRSKNGIHLHLKPVGPGSEK

>CYP4C1\_cockroach|P29981|CP4C1\_BLADI\_Cytochrome\_P450\_4C1\_OS\_Blaberus\_discoi  
dalis\_GN\_CYP4C1\_PE\_2\_SV\_1\_511\_bp

MEFITILLSTALFIVTFLFLFRQGAKRARFVYLVNKLPGPTAYPVVGNAIEAIVPRNKLF  
QVFDRAKLYGPLYRIWAGPIAQVGLTRPEHVELILRDTKHIDKSLVYSFIRPWLGEGL  
LLTGTGAKWHSRKMTPTFHFKILDIFVDVFVEKSEILVKKLQSKVGGKDFDIYPFIT  
HCALDIICETAMGIQMNAQEESESEYVKAVYEISELTMQRSVRPWLHPKVIFDLTTMG  
KRYAECLRILHGFTNKVIQERKSLRQMTGMKPTISNEEDELGKKKRLAFLDLLLEAS  
ENGTKMSDTDIREEVDTFMFEGHDTTSAGICWALFLLGSHPEIQDKVYEELDHIFQGS  
DRSTTMRDLADMKYLERVIKESLRLFPSVFIGRVLKEDTKIGDYLPAGCMMNLQI  
YHVHRNQDQYPNPEAFNPDNFLPERVAKRHPYAYVPFSAGPRNCIGQKFATLEEKTV  
LSSILRNFKVRSIEKREDLTLMNELILRPESGIKVELIPRLPADAC

>CYP4C15X\_crayfish|6456874|gb|AAF09264\_1|AF091117\_1\_CYP4C15X\_crayfish|645687  
4|gb|AAF09264.1|AF091117\_1\_cytochrome\_P450\_Orconectes\_limosus\_513\_bp

MSWLLDGALDLETGSVITYLIVTTLITLTLVWYFKRQQKQVWVLEEQIPGPRGLPILGNV  
LYLNVDPPELFLERFLAVAEYGEVSRLWLCNMCTCLLSSATTAEVILSSTKHLDKSEDY  
TLLHPWLGESLLNSAGSRWHARRKLLTPAFHFKILEQFMEVFNSQTNKLVHKLKKA  
DGSPFDISDDITHCVLDIICETAMGRSINAQDNSESEYVQAVRKISGLIQYRQFRPVMY  
YEFLFKLMGPIKEYNACFKTLHDMSNSTIKERKESRKDKANTEVLEEEVFGKKKRQ  
AFLDLMLEYAEDNPELTDEEIRKEVDTFMFAGHDTTASAINWVLYTLGLHPDIQTRV  
QEELDDIFGSSDRPATMDDLQMKYAEMCIKETMRLFTPVPVISRDIKEEVVINNYRIP  
ANTIVAVVIYKIHDPDPEVFPDPRFLPENALKRHPYAYVPFSAGPRNCIGQKFA  
MLELKTIVSSIFRKL RVESVIPRKDLKMTAEIILRPANGNILKLSPRTK

>CYP4C39X\_shore\_crab|37538493|gb|AAQ93010\_1\_CYP4C39X\_shore\_crab|37538493|gb|  
AAQ93010.1\_cytochrome\_P450\_CYP4C39\_Carcinus\_maenas\_515\_bp

MALLLREFVWSSVASYSLGTAACLALLLTFWIRRQQTWVWVWVLEKLPGRSLPILGNA  
LDVNVAPRELFLKIMEFCEYGNTVKIWLGMYPYCLVSEAKSAEVLLSSNKHLDKSRD  
YNFLHPWLGTGLLSTGKKWHSRRKILTPAFHFKILEDFVEVFNSQSNKMLDKLTPK  
ADGKAFFDIFPYITLCTLDIICETAMGININAQGNNSSEYVNAVYRIGALVQHRQTRPWI  
QPDFLFRFLFGYAKLHDEYLRVLLHHSNSAIENRRKEYQLEKLNKENIDDDVIGKKR  
RLAFLDLLLNYSETQMPLSNEDIREEVDTFMFEGHDTTAAALNWSVYLLGCHPEIQA  
KVHEELDALFGSDRPTMADLREMKYTENCIKEALRLFPSVPFLARELREEAVINN

YRIPVGTVMVITYRLHRDPEQFPNPETFDPDRLFLENVAKRHPYSYVPFSAGPRNCIG  
QKFAIMEEKIVLSSIMRRFRVESTTRREELKLLGELILRPENGNTVKLIPRTPKV

>CYP4C53\_water\_flea|116642350|dbj|BAF35771\_1|\_CYP4C53\_water\_flea|116642350|dbj|B  
AF35771.1|\_cytochrome\_P450\_4\_family\_Daphnia\_magna\_526\_bp

MDVTSGGESSVWISSFSVYTVTTILVTLVVLAVVKRYNFMQRCNKVLGSPTDIPLFGG  
GSLIFVPPEEIMNLLLLLHVVFGRLSPSGIIRAWIGPLPMFFATTAEAVEAVLSSNKIITK  
SREYDFLHPWLNTGLLTSTGSKWQTRRKLTPAFHFKILEDVHVFNEQSLILVNKLN  
QAVAKDKDLNIFPFVTLCTLDIICETAMGRNVEAQSKTDSAYVQAVYNMSQLIQHRQ  
VRFYWLWDMFKLSSHWPQRKTLGILHGFTNKVIQERKAEHQQRSSDIAEPSKDVT  
EDAVFSKRRLAFLDLLIEFSQGGTVLSASDIREEVDTFMFEGHDTTSAAITWSIFLIGSH  
PEVQEMVNEELDRVFGSDRPMADLSELKYLECCVKEALRLYPSVPIISRTCVEDT  
VIGGDEIPAGTSVSICSYYLHRDPKYFPDPELYQPKRFLAHAERRHPYSYVPFSAGPR  
NCIGQRFALMEEKAVLSAILRNHFVQSLDKREEIILLAEILRPRDGIRVRLEPKKKQ

>CYP4D1\_Drosophila|P33269|CP4D1\_DROME\_Cytochrome\_P450\_4d1\_OS\_Drosophila\_m  
elanogaster\_GN\_Cyp4d1\_PE\_2\_SV\_2\_512\_bp

MFLVIGAILASALFVGLLLYHLKFKRLIDLISYMPGPPVLPLVGHGHHFIGKPPHEMVK  
KIFEFMETYSKDQVLKVWLGPELNVLMGNPKDVEVVLGTLRFNDKAGEYKALEPW  
LKEGLLVSRGRKWHKRRKIITPAFHFKILDQFVEVFEKGSRDLLRNMEQDRLKHGES  
GFSLYDWINLCTMDTICETAMGVSINAQSNADSEYVQAVKTISMVLHKRMFNILYRF  
DLTYMLTPLARAEKKALNVLHQFTEKIIVQRREELIREGSSQESSNDDADVGAKRKM  
AFLDILLQSTVDERPLSNLDIREEVDTFMFEGHDTTSSALMFFFYNIATHPEAQKKCFE  
EIRSVVGNDKSTPVS YELLNQLHYVDLCVKETLRMYPSPVLLGRKVLEDCEINGKLIP  
AGTNIGISPLYLGRREELFSEPNSFKPERFDVVTAEKLNPAAYIPFSAGPRNCIGQKFA  
MLEIKAIVANVLRHYEVDFVGDSSSEPPVLAELILRTKEPLMFKVRERVY

>CYP4E2\_Drosophila|Q27606|CP4E2\_DROME\_Cytochrome\_P450\_4e2\_OS\_Drosophila\_m  
elanogaster\_GN\_Cyp4e2\_PE\_2\_SV\_2\_526\_bp

MWFLVLYIFLALPLLLVAYLELSTFRRRRVLNKFNGPRGLPLMGNAHQMGKNPSEILD  
TVFSWWHQYGKDNFVFWIGTYSNVLVTSSKYLEFILSSQTLITKSDIYQLTHPWLGLG  
LLTSTGSKWHKHRKMITPAFHFNILQDFHEVMNENSTKFIKHLKTVAAGDNIFDFQE  
QAHYLTLDVICDTAMGV SINAMENR SSSIVQAFKDMCYNINMRAFHPLKRNELLYRL  
APDYPAYSRTLKTLQDFTNEIIAKRIE AHKSGAVSTNAGDEFTRKKMAFLDTLLSSTID  
GRPLNSKELYEEVSTFMFEGHDTTTSVGSFAVYLLSRHQDEQRKLFKEQREVMGNSE  
LGRDATFQEISQMKYLDLFIKEAQRVYPSVPIGRFTEKDYVIDGDLVPKGTTLNGL  
VMLGYNEKVFKDPHKFRPERFELEKPGPFYVPFSAGPRNCIGQKFALLEIKTVVSKII  
RNFEVLPALDELVSKDGYISTTIGLPDAERKKRDPYRHKYDPILSAVLTLLKSENGLYIR  
LKERH

>CYP4\_F1\_rat|203791|gb|AAA41040\_1|\_CYP4\_F1\_rat|203791|gb|AAA41040.1|\_cytochrom  
e\_P450\_4F1\_Rattus\_norvegicus\_524\_bp

MSQLSLSWLGLGPEVAFPWQTLLLFGASWILAQILTQIYAA YRNFRRLLRGFPQPPKRN  
WLMGHVGMVTPTEQGLKELTRLVGTYPQGFLMWIGPMVPVITLCHSDIVRSILNASA  
AVALKDVIFYTILKPWLGDGLLVSAGDKWSRHRMLTPAFHFNILKPYVKIFNDSTNI  
MHAKWKRLISEGSSRLDMFEHVSLMTLDSLQKCVFSFDSNCQEKSSSEYIAAILELSAL  
VAKRHQQPLL FMDLLYNLTPDGMRFHKACNLVHEFTDAVIRERRRTL PDQGLDEFL  
KSKAKSKTLDFIDVLLLTKDEDGKELSDERAEADTFMFEGHDTTASGLSWILYNLA  
NDPEYQERCRQEVQELLRDRDPEEIEWDDLAQLPFLTMCIKESLRLHPPVTVISRCCT  
QDILLPDGRTIPKGIICLISIFGIHHNPSVWPDPEVYNPFRFDPENIKDSSPLAFIPFSAGP  
RNCIGQTFAMSEMKVALALTLRFLLPDDKEPRRQPELILRAEGGLWLRVEPLTAG  
AQ

>CYP4F2\_human|9313018|gb|AAC50052\_2|\_CYP4F2\_human|9313018|gb|AAC50052.2|\_cy  
tochrome\_P450\_4F2\_Homo\_sapiens\_520\_bp

MSQLSLSWLGLCRVAASPWLLLLLVGASWLLAHVLAWTYAFYDNCRRRLRCFPQPPR  
RNWFWGHQGMVNPTEEGMRVLTQLVATYPQGFKVWMPISPLLSLCHPDIIRSVINA  
SAAIAPKDKFFYSFLEPWLGDLLLSAGDKWSRHRMLTPAFHFNILKPYMKIFNESV  
NIMHAKWQLLASEGSACLDMFEHISLMTLDSLQKCVFSFDSHCQEKPSSEYIAAILELS  
ALVSKRHHEILLHIDFLYLLTPDGQRFRRACRLVHDFTDAVIQERRRTLPSQGVDDFL

QAKAKSKTLDFIDVLLLSKDEDGKKLSDEDIRAEADTFMFEGHDTTASVLSWVLYHL  
AKHPEYQERCRQEVQELLKDREPKEIEWDDLAHLPFLTMCMKESLRVHPPVPVISRH  
VTQDIVLPDGRVIPKGIICLISVFGTHHNPAVWPDPEVYDPFRFDPENIKERSPLAFIPFS  
AGPRNCIGQTFAMAEMKVVLALTLRFRVLPDHTEPRRKPELVLRAEGGLWLRVEPL  
S

>CYP4F3\_chimp\_517\_bp

MPQLSLSLGLWPMAASPWLLLLLVGASWLLARILAWTYTFYDNCRRLRCFPQPLK  
RNWFLGHLGLIHSSEGLLYTQSLACTFGDMCCWWVGPWHAIVRIFHPTYIKPVLFA  
PAAIVPKDKVFYSFLKPWLGDGLLLSAGEKWSRHRMLTPAFHFNILKPYMKIFNES  
VNIMHAKWQLLASEGSARLDMFEHISLMTLDSLQKCVFSFDSHCQEKPSEYIAAILEL  
SALVTKRHQQILLYIDFLYYLTHDGQRFRRACRLVHDFTDAVIQERRRTLPSQGVDDF  
LQAKAKSKTLDFIDVLLLSKDEDGKKLSDEDIRAEADTFMFEGHDTTASGLSWVLYH  
LAKHPEYQERCRQEVQELLKDREPKEIEWDDLAHLPFLTMCMKESLRLHPPVPAVSR  
CCTQDIVLPDGRVIPKGIICLISVFGTHHNPAVWPDPEVYDPFRFDPKNIKERSPLAFIPF  
SAGPRNCIGQAFAMAEMKVVLGLTLRFRVLPDHTEPRRKPELVLRAEGGLWLRVE

>CYP4G7\_red\_flour\_beetle\_534\_bp

MVVVEESLNHSLNLGNSVLISLGVVAVILAVYHFWLQSLRYTKLGNKIPGYDPLPIIG  
NAHMVMNKNPTQVMELALRVASEKGSVVRFWFGSKLGVALLDPRDIELILGSNVHL  
EKSSEYRFFEPWLGDGLLISKGDKWRSHRKMIAPTFHQSILKTFVPVFNKNAMDLVE  
QLRNEALDQICDVHDYLSGATVDVLETVMGVKKTKARTSYKYAKAVMDMCTIL  
HFRHVKLWLRSDWIFSFTKLFKEQTSLLRIIHNLTDRVIKQKKKETEEENLKIKNEQTF  
NFGSGLRDDL DENDENLGEKKRLAFLDFMVEASQTEGNKLNDEEIREEVNTIMFEGH  
DTTAAASSFFICILGVYPEIQEKVYQELRDIFQSDRPITFNDTLQMKYLERVLETLR  
MYPPVPIITRVINEEVKLASGDYTLVGTTVGIGQFLVHRNPKYFPNPKFDPDNFLPE  
RCQQRHYYSFIPFSAGPRSCVGRKYAMLKLLKILLASIVRNFKIKSVVKEKDFQLQADII  
LKRADGFRVILTSRT

>CYP4Q1\_red\_flour\_beetle\_503\_bp

MLLSTTLVCAIGLLGVFHLLAWIKFHASNYMKMCVIPGPPQKGILIGNMTYLQTTPEK  
IFLRLREATKNFYPIYKLNALHKCAANILNPEDCELIMSNSAHNQGQIYDLLRNWLK  
DGLLTSFGAKWQTRRKILTPAFHFSILQQFVQIFNEEAEILVEDLKKDCSKSYISSHIT  
KFTLKTIAETAMGSKLKFFETQKEIDYYQAVYDVGKILLYRLTHPWFIHYVNFSPWY  
LQEVKVTKTLHNFTREVIKHREENFKDIELPTEEHEVYKGGKRLAML DLLLSAKHKE  
GIVENDGIQEEVDTFMFKGHDTTSAALCFALMLIASHSEVQESIVAEMREVLGDLSKK  
PSYNDLQNLKYLERCIKETLRLYPSVHFISRTLQDLITTGGYTLPKESNAIIHIYDVHH  
NADIYPDPEKFDPRFLPENVQKRHPYAYLPFSAGPRNCIGQRFAMLELKAICAILA  
NFTLQPIDTPETIILVVDIILRTKEPIKIKFVPRS

>CYP4S4\_moth|24181416|gb|AAL48299\_1|\_CYP4S4\_moth|24181416|gb|AAL48299.1|\_cyt  
ochrome\_P450\_CYP4S4\_Mamestra\_brassicae\_492\_bp

MLLTLALLGFITFVIWRLLADEENTLDQLPGPPRRPIIGCALEFLKISPRELFLKMRQYK  
KEYGDRYVIKMMKRRILHLSNEKDVEVVLSHSRNIKKSKPYTFLEAWLGTGLLLSSG  
AKWHRRRKILTPTFFHFNILKSFTVVMKEKSRSLVETLNNLEGTEVNLLPVISDYTYTI  
CETAMGTQLDADKSSKTLEYKTAILEIGNLLGRLTRVWLHNEYLFKKFPIGRRFENC  
LEKVHSFADDVIMERKKNWKPGQSEFTEDDVSIGGKKRYAML DLLLEAENKGEIDLE  
GIREEVNTLMFEGHDTTAMAIVLGLMLIADHEEVQDRIFECCQKILGDSDRTPMSDL  
ADMKYLEAVIKETLRLYPSVPIAREITEDFMLDDLVPKKGSEVSIHIYDLHRRPDLFP  
EPDAFIPDRFLSGAPMHPYAFVPSAGPRNCIGQRFAMLEMKCVFSAICRNFR LAPKV  
QGYRPALLADMLIRPEGPVYVKFSRR

>CYP4T2\_sea\_bass|4091078|gb|AAC98961\_1|\_CYP4T2\_sea\_bass|4091078|gb|AAC98961.1|  
\_cytochrome\_P450\_Dicentrarchus\_labrax\_515\_bp

MELTEAFLTLHWGLPRLHLLALLCLVAVVYKLATLLAKRRDVFRSYEDFPGPPTH  
WLFQHVLEFKQDGTDFDTLMAWTKQYPYAFPLWFGPFFCVLNIHHPDYVKILASTE  
PKDDVSYRFILSWIGEGLLVSSGQKWFRHRRFLTPGFHYDVLKPYVKLMSDSTKTML  
DKWGSYANSNESFELFQHVSLMTLDSILKCAFSYNSNCQTESGTVYIKAVYELSDLI  
NLRLRTPYHSDLIFYLSPHGYRYRKAIKVAQSHTEEVIKKRKEALKEEKELDRIQAK  
KNLDFLNILLARDEKQQGLSDEDIRAQVVDTFMFEHDTTASGISFILYSLACHPEHQK  
ICRDEIMQVLDGKDTMDWEDLSKIPYTTMCIKESLRIYPPVPGMSRKITKPITFCDGRT

---

LPEGSYIGTSVFGIHRNGIVWENPDVFDHWRFLPENVSKRSPHAFVPFSAGPRNCIGQ  
NFAMNEMKVVIALTLKKYHLIEDPNWPKIIPRLVLRSLNGIHIKIKPVDPQV

>CYP4T3v1\_Xenopus\_501\_bp

MWNA LVWQQVAALLCLLAVLLKATQIYLSKKRQERILEQFPGPPRHVLLGNVDQIR  
RDGKDLLLVNWTQSHGGAYPVWFGNFSSFLFLTHPDYAKVIFGREEPKRQLSYNFL  
VPWIGNGLLVLTGPKWFQHRRLTPGFHYDVLKPYVKLISKCTTDMMLDNWEKLITK  
QKTVELFQHVSLMTLDSIMKCAFSYESNCQKSDNAYIKAVFDLSYLANLRLRCFPY  
HNDTIFYLSPpwvsispslqnsEHTDKVIQQRKESMKHEKELEKIQQKRHLDFLDILLFAR  
DEKGHGLSDEDLRAEVDTFMFEGHDTTASGISWILYCMAYPEHQKCREEIKEVLG  
DRQTM EWKDLGKIPYTNMCIKESLRIYPPVPGVARMLRNPVTFDGRSIPAGTLVGLS  
IYAIHKNPVWEDPEVFNPLRFTPENSANRHSFAFPFAAGPRNCIGQNFAMNEMKI  
AVALTLNRFHLAADLENPPILIPQLVLKSKNGIHVHLNKVQ

>CYP4T6\_Xenopus\_515\_bp

MASTLWKALSSPWLSVNIYQIGQFVALLCVVLLLLKAYALYSRGRFAAALVPFPGP  
PAHWLYGHVNQFRRDGDRLMVVWVVKYPNAFPLWIGKFFGTLIITDPDYAKVVF  
GRSDPKTSTGYNFLVPWIGKGLLILSGNTWFQHRRLITPGFHVDVLKPYVSLISDSTKI  
MLDEL DVYSNKDESVELFQHVSLMTLDSIMKCAFSYHSNCQTDKDNDYIQA VYDLS  
WLTQQRIRTFPYHSNLIYFLSPHGFRFRKACRIVHLHTDKVIGQRKKLLESKEELEKV  
QKKRHLDFLDILLCSKDENGQGLSHEDLRAEVDTFMFEGHDTTSSGISWILYCMATH  
PEHQKCREEISEALGERQTM EWDDLNRMPYTTMCIKESLRLYPPVPSVSRELAKPIT  
FHDGRSLPAGMLVSLQIYAIHRNPVWVDPEIFDPLRFSPENSSKRHSFAFPFAAGP  
RNCIGQNFAMNEMKVAVALTLKRFELSPDLSKPPLKQPQLVLRSKNGIHVYLKAS

>CYP4T8\_zebrafish\_458\_bp

MLLYGISPFVLSVNHVFALIFLACLLTVVKLLIVRRKGVKTMERFPGPPAHWLFQHVK  
EFRQDGHDLKIVKWMELYQFAFPLWFGPSLAVLNIIHPSYAKTILTTTEPKDDYAY  
KFFIPWLGDGLLVSTGQKWFRHRRLTPGFHYDVLKPYVKLISDSTKVMLDKWEVH  
SRSEESFELFKHVSLMTLDSIMKCAFSCNSNCQTDSGTNPYIQA VFDLCHLVNLRFRV



FPYHSKAIFHLSPHGYRFRKAASIAHNHTAEVIRKRKEVLKMEEEEQGIVKNRRYLDFL  
DILLSARDEHQQGLSDEDIRAEVDTFMFEGHDTTASGISWIFYNLACNPEHQEKCRQE  
IQQALDGDKTLEWEDLNKIPYTTMCIKESLRLHPPVPGISRKLTPLTFFDGRTVPEGC  
TIGVSIYGIHMNSTVWENPYKFDPLRFLPENANRSPHAFVPFSAGPRFVTRSV

>CYP4U1\_termite|5263306|gb|AAC03111\_2|\_CYP4U1\_termite|5263306|gb|AAC03111.2|\_f  
amily\_4\_cytochrome\_P450\_Coptotermes\_acinaciformis\_501\_bp

MLLVALGLLLACLLAVLFLNDFKTRSRMQLADKIPGPKALPVLGNLLDFGLRPDRYR  
ELVEGLIYKHGTIVRLWSGAYLIVILTEAKYVEALLSSTSQIDKAYTYRFVWPWLGS  
LLTSTGQALGNPPQAADSSFPLQGTREFRGCVQQKWKILVEKFSRHVNGPEFDVTPY  
MTLCALDNMSETSMGVTLNAQKDSSEYVRAIHSLGEIVFTRSGKPWYHSDTTFRLS  
TLGREQQKNLAILHSFTRSVIRSRKQELLVHLNNQSGEGVQNELGLKRRHAFLDLML  
QASQDGASLTDEEIREEVDTFMFEGHDTTTSALSFTMWCLAKYQDVQEKAVVELKQI  
FGDSTRDATFRDLQEMKYLEQVIKETLRLYPSVNCFRQLTENFTVGDYVNPAGANV  
WIYPYHLHRRPEYFPDPERFDPDRFLPENCVGRHPYCYVPFSAGPRNCIGQKFAILELK  
STISQVLRSEFKVIESDCNGNIRYKLDLFLRSASGLKVKLQPR

>CYP4V2\_human\_524\_bp

MAGLWLGLVWQKLLLWGAASAVSLAGASLVLSLLQRVASYARKWQQMRPIPTVA  
RAYPLVGHALLMKPDGREFFQIIEYTEEYRHMPLKLVVGPVPMVALYNAENVEG  
ILTSSKQIDKSSMYKFLEPWGLGLLTSTGNKWRSRKMLTPTFHFTILEDFLDIMNE  
QANILVKKLEKHINQEAFNCFYITLALDIICETAMGKNIGAQSNDDSEYVRAVYRM  
SEMIFRRIKMPWLWDLWYLMFKEGWEHKKSLQILHTFTNSVIAERANEMNANEDC  
RGDGRGSAPSKNKRRRAFLDLLSVTDDEGNRLSHEDIREEVDTFMFEGHDTTAAAIN  
WSLYLLGSNPEVQKKVDHELDDVKSDRPATVEDLKKLRYLECVIKETLRLFPSVPLF  
ARVSEDYFLTAGYRVLKGTEAVIIPYALHRDPRYFPNPEEFQPERFFPENAQGRHPY  
AYVPFSAGPRNCIGQKFAVMEEKTILSCILRHFWIESNQKREELGLEGLILRPSNGIWI  
KLRNADER

>CYP4V3\_mouse\_525\_bp

MLWLWLGLSGQKLLLWGAASAVSLAGATILISIFPMLVSYARKWQQMRSIPSVARA  
YPLVGHALYMKPNNAEFFQQLIYYTEEFRHLPIIKLWIGPVPLVALYKAENVEVILTSS  
KQIDKSFLYKFLQPWLGLGLLTSTGSKWRTRRKMLTPTFHFTILENFLDVMNEQANIL  
VNKLEKHVNQEAFNCFYITLCALDIICETAMGKNIGAQSNNDSEYVRTVYRMSDMI  
YRRMKMPWLWFDLWYLVFKEGRDHKRGLKCLHTFTNNVIAERVKERKAEEDWTG  
AGRGPISKNKRKAFLDLLSVTDEEGNRLSQEDIREEVDTFMFEGHDTTAAAINWSL  
YLLGTNPEVQRKVDQELDEVFGRSHRPVTLEDLKKLKYLDLCVIKETLRVFPSPVPLFAR  
SLSEDCEVGGYKVTKGTEAIIIPYALHRDPRYFPDPEEFRPERFFPENSQGRHPYAYVP  
FSAGPRNCIGQKFAVMEEKTILACILRQFWVESNQKREELGLAGDLILRPNNGIWIKL  
KRRHEDDP

>CYP4X1\_human|GenEMBL\_BC028102\_506\_bp

MEFSWLETRWARPFYLAFFVCLALGLLQAIKLYLRRQRLRLDLRPFAPPTHWFLGH  
QKFIQDDNMEKLEEIIEKYPRAFPFWIGPFQAFFCIYDPDYAKTLLSRTDPKSQYLQKF  
SPPLLGGKGLAALDGPKWQHRLLTPGFHFNILKAYIEVMAHSVKMMLDKWEKICST  
QDTSVEVYEHINSMSLDIIMKCAFSKETNCQTNSTHDPYAKAIFELSKIIFHRLYSLLY  
HSDIIFKLSPOGYRFQKLSRVLNQYTDIIQERKKSQAGVKQDNTPKRKYQDFLDIV  
LSAKDESGSSFSDIDVHSEVSTFLLAGHDTLAASISWILYCLALNPEHQERCREEVRGI  
LGDGSSITWDQLGEMSYTTMCIKETCRLIPAVPSISRDLKPLTFPDGCTLPAGITVVLS  
IWGLHHNPVWKNPKVFDPLRFSQENSQRHPYAYLPFSAGSRNCIGQEFAMIELKV  
TIALILLHFRVTPDPTRPLTFPNHFILKPKNGMYLHLKKL

>CYP4Z1human\_503\_bp

MEPSWLQELMAHPFLLLILLCMSLLLQVIRLYQRRRWMIRALHLFPAPPAHWFYGH  
KEFYVPKEFEVYHKLMEKYPCAVPLWVGPFMFFSVHDPDYAKILLKRQDPKSAVS  
HKILES WVGRGLVTLDGSKWKKHRQIVKPGFNISILKIFITMMSESVRMMLNKWEEHI  
AQNSRLELFQHVSLMTLDSIMKCAFHQSIQLDSTLDYLKAVFNLSKISNQRMNFL  
HHNDLVFKFSSQGQIFSKFNQELHQFTEKVIQDRKESLKDCLKQDTTQKRRWDFLDIL  
LSAKVENTKDFSEADLQAEVKTFFMAGHDTTSSAISWILYCLAKYPEHQQRCRDEIRE  
LLGDGSSITWEHLSQMPYTTMCIKECLRLYAPVVNISRLLDKPITFPDGRSLPAGITVFI

NIWALHHNPYFWEDPQVFNPLRFSRENSSEKIHYPYAFIPFSAGPRNCIGQHFAIIECKVA  
VALTLLRFKLAPDHSRPPQPVRQVVLKSKNGIHVFAKKV

>CYP4AA1\_Drosophila\_514\_bp

MHLRLLSPPQLERTTNLELCSILILLVISLSIYTFYATLNTYLRSVLLSLRLTGPPSLPFL  
GNCMLVTDKDLMRRCAGKAFDLYGSLVRIWVLLFPFFAVLEPEDLQVILSSKKHTNK  
VFFYRLMHNFLGDGLITSSGSKWSNHRRLIQPAFHNNLEKFIDTFVDASQSLYENLD  
AEAVGTEINIAKYVNNCVLDILNEAVLGVPIKKRGQDVAMMEDSPFRQGGKIMMPARF  
TQPWLLLDGIYHWTKMANDELNQQKRLNDFTRKMIQRRRQIQNNNNNGNSERKCLL  
DHMIEISESNRDFTEEDIVNEACTFMLAGQDSVGAAVAFTLFLLTQNPECQDRCVLEL  
ATIFEDSNRAPMTDLHEMRYMEMCIKEALRLYPSVPLIARKLGEEVRLAKHTLPAG  
SNVFICPYATHRLAHIYPDPEKQPERFSPENSENRHPYAFLPFSAGPRYCIGNRFAIME  
IKTIVSRLLSYQLLPVTGKTTIAATFRITLRASGGLWVRLKERDHPLIAH

>CYP4AB1\_fire\_ant\_463\_bp

MPRQHLLINLLFSLCDKYYPFRTWAFFEGFVSIRHPDDLEVILNSSTNIEKSRIYSVLHP  
WFGLGLLTSGGSKWHSRRKILTPTFFHFNILQQFVEILIEEGESMTNSLKNAGSTITKDL  
VPLISEHTLNAICETAMGTSLQGMNSVQQEYRKAVHRMGELFIYRLVRHWLISDWIF  
ALTSQGREQVKILKILHGFTNKIIAERKDYHKRTNGQYLKNFNQSIITDNEEIVGSKKK  
RLAMLDFLIYASQEGHLTDVDIREEVDTFMFEGHDTTSTSLCYTLALLAENKDIQDRV  
RQEVDLVMQENEGKLTIKSLQNLQYLERCIKESLRLYPSVYFISRITTEEAQLKSHLIP  
VGTIMHLHIYGVHRDPNFWPNPDVFDPRFLPENSRRNRHPYSYIPFSAGPRNCIGQRF  
AMLEMKAMIAPLIHNFCLPVDLLKNLRVGPDLVLRPLGGHRIKFIPIATKCI

>CYP4AB3\_honeybee\_513\_bp

MISAILFFIFLLATLHYFLLHHRKFGKMINLIPGPEPLPILGNIPTFHNISPSELWKFLTQL  
SKQYYPIYRMWTFLEAYVHICHPDDIETILGNIKFTKKGFGYKYLKPWFNTGLLTSSG  
HKWHVRRKILTSAFHFNVLRQFVDIFIEDAERLIKLESEEGIFVENLLQLTSEHTLNVI  
CETAMGTSLKNKEKFQYEYRKAVYNMGCIFANRIVKPFYFYDFFFNLSPEGWQQSK  
LLKILHNFTRKIIQERKEYHDKTNGRYLNDFHENINENDNNNDYNDFRKRRLAMLDL

LIEAHRNNKIDDEGIREEVDTFMFRGHDTTASFCFSIMLLAEHKEIQDRARAEIKAAIE  
ENGGKLNITVLQNLPLYLERCIKESLRLFPSVPRISRKLETSVKLSNYEIPSNTIINVNIFD  
THRDPKFWPNPNKFDPRFLPENSKKRHPYAYVPFSAGPRNCIGQRFAMLELKTYLG  
LLLYNYYFEPIDYLDVTFVSGIVLRLLENPVRMKFIPVKKIC

>CYP4Y1\_mussel|3452349|gb|AAC32835.1|\_cytochrome\_p450\_CYP4Y1\_Mytilus\_gallopro  
vincialis

DTFMFEGHDTTSAISWILYDLAKHPEYQKMCQNEVDKALENNPGFVKWEDLGKFE  
FLTQCIKEGMRLHSPVPLISRQSTKEFTLEGITFPPGTFFGINIYGLHHNPAVWTDPTKF  
DPDRFSKDNATKMSFAFTPFLPDQDCIGQKIA

>CYP4\_Meretrix|443429665|gb|AGC92781.1|\_cytochrome\_P450\_Meretrix\_meretrix

MKDVKTFLTEQNLTVSKILLGTLLEYIYLLIKFILYVHRLRKVFGDVPGPEKHWLYG  
NLHLLPSTNSHDRIMFGVSNCNTYIRYYVWWTTFAKTSLTVCHPETVKIVMKTSEPK  
PTGFMGIYRFGLPWLGEGLLIAGGKKWARSRLLTPAFHFDILKPYMAVYNDAADTL  
VGNLRRYAEKREKFEVFDYISRVTLDVILRCAFSYHTDCQKEQGVRHPYVKAVEEIA  
DEWNYRARKPWLYPDWIYFLTDRGRKFKRNCDYVHGVAEDVINQRKEALERSGKS  
DRKYLDFLDILLTARDDNNQGLTPLEIRNEVDTFMFEGHDTTASATSWILYSLAKHPE  
YQKKCQEEIDQLLQGRDIDDIEWSDIPKLEYLTMCIKEGMRDHSPVPFIQREFTHDFE  
LDGKTFPAGTTVSLHIFGLHHNKHVWENPMEFIPERFTKDNIKMDTFQFVPFSAGPR  
NCIGQHFAMNEEKVILSKLLRRYWFELDESHIVRRKVGAVMRAENGIYMYVTPRDV

>CYP4\_Ruditapes|268309234|gb|ACM16804.2|\_CYP450\_family\_4\_Ruditapes\_philippinaru  
m

MFGLSNCNTYKRYYYVWWTTFMKPSLSVCHPDTVKMIMKTSEPKPIGFMGIYRLGLP  
WLGEGLLIAGGKKWARARRLLTPAFHFDILKPYMSVYNDAADLLVGNLERYMEKK  
ERFEVFDYVSRATLDVIMRCAFSYQTDQCQKDKGTRHPYVQAVEEIADAWNYRARKP  
WLYPDWLYNMTRHGKQFRKNCDYVHTVAEDVIKQRKEALDKSRNSDRKYLDFLDI  
LLTAKDENGQGLTPLEIRNEVDTFMFEGHDTTASAIWILYSLAKYPEYQKKCQQEID  
ELLQGRDIDDIEWSDIPKLEYLTMCIKEGMRDHSPVPFIQREFTHDFEIDGKTFPAGTT

VSLHIFGLHHNKNVWENPMEFVPERFSKENIAKMDTFQFVPFSAGPRNCIGQHFAMN  
EEKVIISKLLRRYWFELDETHLVRRKIGAVMRAENGIYLYVVRPDL

>CYP4F22\_Crassostrea|405969246|gb|EKC34228.1|\_Cytochrome\_P450\_4F22\_Crassostrea\_  
gigas

MLITQKIYLYDTSIKICHDITASAISWILFSLAENSECQQKCPEVIDKVVSETKFGQLKW  
LAVISVVVHIFQLLIKLLRVKYAYHGLPEPLEDKHWLLGHLPIFSNKIAGQSVVDKFLE  
WTAKYPRMYVLWFGPFDARVVLNHPDPIKKILKTSDPKPVNFGQVYRHHGIPWLGEG  
LLIAGGAKWKRSRLLTPAFHFDILRPYVKIYKSCADILARNIEISVEKNESVEIFSLVS  
SCTLDIILQCAFSYKTDCQNFCGTIHPYISAVNEISATWNRNRAPWLHPDFIFYRTAE  
GKSFKAKCDYVHQVAEDVIDKRRNTLETQGISSQKYLDLFDILLTAKDENGKGMSKE  
DIRSEVDTFMFEGHDTTASAIWILYSLAENPECQRKCQEEIDKVISETKSGQLEWKDL  
GGLEYLTQCIKEGMRLHSPVPGILRDIQSPLREGDHEIPARTSVLISINGLHHNPTVWG  
KDHAQFKPERFSPENTEERDSFAFCPFSAGPRNCIGQNFAMSEERTVLATLLQRFTFSV  
DKTHKVEKQISAVMRARYGIKLF A APR

>CYP4F8\_Crassostrea|405969249|gb|EKC34231.1|\_Cytochrome\_P450\_4F8\_Crassostrea\_  
gigas

MADIFILGASTILVLVITHLFIKIIVKYTFWGFPESIYDKHWLLGHLPHIRHQGYLGQH  
FLDKIIEWTEKYPTMFLWIGPATARVVLNHPDSLKQILRTADPKPVGYGQAYRHGIP  
WLGEGLLIAGGAKWKRSRLLTPAFHFDILKPYVKVYKTCADQLVKNIQTFADRKES  
AEVFGVLVSGCTLDIILQCAFSYETDCQNILRNDNRYVTTVYEIATEWTRRNTCPWLYS  
DLFYFNTKMGKQFKSHCDYVHTVADDIIAKRRRALEDADLSERKYLDLFDILLTAKD  
GDGQGMSIEDIRSEVDTFLFEGHDTTASAIWILYSLAEHPEHQMKCQEEIDRVVSETE  
SGELEWNDLDRLEYLTQCIKEGMRLHSPVPGILRENQAPIKVDNHVIPTGSCLTISIYC  
LHHNPTVWGQDHMDFRPERFSKENVRKMDPFA YCPFSAGPRNCIGQNFAMAEK M  
VLAALLQRFTFSVDKTHMVEKLLAAVMRARNGIKLFASPR

>CYP4\_Cyphoma|189092910|gb|ACD75825.1|\_cytochrome\_P450\_family\_4\_Cyphoma\_  
gibbosum

MDLGFSSMSLTLQAVVVLVVTTLVVGGIKRLLRYRSYLKAMSLLPGETDHSWIWGD  
 LHKLRNMTSEQRISVFGKFTEKFPKFRFWLGPQANIVLLHPDTVKDLFKTADPKPF  
 GYQFGIPWLGEGLLIAGGSKWARSRLLSPAFHFDILKPYVKVGNEASDKLLEKVKK  
 YADKGESMEMYNNISLCTLDMIMRCAMSYSNDIQAKGESHPYVVAVSELADLLIQRI  
 RNPLAYNDFVYGLTKNGRRFKEQCHYVHGISEQIIQERQKILEREGPPKKRYLDFLDIL  
 LTAKDDTGTGLTPLEIRSEVDTFLEFGHDTTASAIWILYSLCQHPDIQEKVQQEIDTV  
 LKGRDSDEIEWSDLPKFEFMTMVIKEGMRLHCPVPFISRVTKPMILEGFSIPAGSVCT  
 IHIFNIHHNPVWVWDPWEFKPERFHPDNTKDRDSFAFVPFSAGPRNCIGQHFAMNEEK  
 VMLSRLRRYTFRLDPKYPVVRKMTAIMKTESGMRMFATPRTPTV

>CYP4\_Perinereis|297747794|gb|ADI52567.1|\_cytochrome\_P450\_family\_4\_protein\_Periner  
 eis\_aibuhitensis

MYRTWFIIGKAVNKFPGEVPEWPGYGNLHQSPGFNEKLILHMKEMATKFNRAWRQW  
 FGPFVPFITLCHPDTVKILAKTEEPKFTEGNSAYLLAQPWLGDGLLLTSGRKWKRNR  
 LLTPAFHFDILKSYISVYNEQSEILMKKWTEKCSKGESFDIQTVDVCLCTLSIILQCAFSY  
 GENIQEAGKRHPYAAAVLELSHLMVKRALNPLVRMSKFLYGLTSDGRLFFKHCDYV  
 HEVAKNVISHRRQALQENPEALKDKKYFDFLDILLQARDQDGTGLTDLEIRDEVDTF  
 LFEGHDTTASGISWTLYSLAKHPEFQKKAQQELDELLADRPNKWILWEDLNQLPYLT  
 MCIKESMRLWCPVPLISRQLSQPITIEGVTLPPHTIIDINIVALHHNPTVWGEDHDEYKP  
 DRFLPENINKMDNFAFLPFSAGPRNCIGQNFAMNEQKVTIARIIRFDLSVDESHPVQP  
 RPELVTRAIQGIKLFMKPR

## 9.2 PRILOG 2.

Filogenetsko stablo najveće vjerojatnosti, sa svim unutarnjim čvorištima i granama.  
 (Komprimirano filogenetsko stablo prikazano je na Slici 17.)



## 10. ŽIVOTOPIS

---



## 10 ŽIVOTOPIS

Sanda Ravlić rođena je 23.01.1981. u Derventi, država Bosna i Hercegovina. Uslijed ratog razdoblja seli se u Sutivan na otoku Braču, gdje je završila osnovnu te započela pohađati srednju školu. Pohađanje srednje škole nastavila je u Zagrebu, gdje je i završila XIII opću gimnaziju. 1999. godine upisala je studij biologije, smjer molekularna biologija, na Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakultetu u Zagrebu. Diplomirala je 2006. godine s diplomskim radom „Analiza genotoksičnosti metabolita DDT-a na kulturi ljudskih limfocita primjenom mikronukleus testa i komet testa“ pod vodstvom mentorice dr. sc. Verice Garaj – Vrhovac (Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb).

Od 10.07. 2007. zaposlena je kao znanstveni novak u Laboratoriju za Morsku ekotoksikologiju, u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju, gdje je pod vodstvom mentorice izv. prof. dr. sc. Maje Fanađel izradila doktorsku dizertaciju.

Aktivno je radila na brojnim domaćim i stranim projektima. Koautor je 5 znanstvenih radova, te brojnih priopćenja s domaćih i stranih znanstvenih skupova.

### POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

#### POGLAVLJA U KNJIZI

1. Gajski G, Gerić M, Ravlić S, Capuder Ž, Garaj-Vrhovac V (2011)  
“Presence of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) in Croatia and evaluation of its genotoxicity.” in: Perveen F (ed.) Insecticides - Pest Engineering. Rijeka-Wien, InTech, 117-150.

#### ORIGINALNI ZNANSTVENI RADOVI KOJE CITIRA CURRENT CONTENTS

1. M. Fafandjel, S. Ravlic, M. Smodlaka and N. Bihari  
“Deoxyribonucleases (DNases) in the cortex and endosome from the marine sponge *Tethya aurantium*.”, Russian Journal of Marine Biology, Volume 36 (2010), 5, 383 – 389.

2. Fafandel, Maja; Bihari, Nevenka; Smodlaka, Mirta; Ravlić, Sanda.  
“Heamocytes/ coelomocytes DNA content in five marine invertebrates: cell cycles and genome sizes”, *Biologia*. 63 (2008), 5; 730- 736.
3. V. Garaj- Vrhovac, G. Gajski and Sanda Ravlić  
“Efficacy of HUMN criteria for scoring the micronucleus assay in human lymphocytes exposed to a low concentration of p,p`- DDT” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2008) 41.
4. Gajski, G., Ravlic, S., Capuder, Z., Garaj- Vrhovac, V.  
“Use of sensitive methods for detection of DNA damage on human lymphocytes exposed to P, P` - DDT: Comet assay and new criteria for scoring micronucleus test” *Journal of Environmental Science and Health Part B* (2007) 42, 1-7

#### **ZNANSTVENI RADOVI U DRUGIM ČASOPISIMA**

1. Perić, Lorena; Smodlaka Tanković, Mirta; Ravlić, Sanda; Evaluation of marine water quality along North-Eastern Adriatic coast based on lysosomal membrane stability in mussels *Mytilus galloprovincialis* Lam.: A long term study. *Acta Adriatica* **53** (2012), 3; 457-466

#### **RADOVI U ZBORNICIMA SKUPOVA I ZBORNICMA SKUPOVA S MEĐUNARODNOM RECENZIJOM**

1. Ravlić, Sanda; Fafandel, Maja; Bihari, Nevenka.  
Micronuclei detection in mussel tissue:microscopy vs flow cytometry // *Abstracts of the EEMS 38th Annual Meeting Environmental mutagens and human health* / Franekić Čolić, J. ; Garaj-Vrhovec, V. (ur.).
2. Ravlić, Sanda; Smodlaka, Mirta; Bihari, Nevenka.  
Mussel DNase activity as a new biomarker for environmental contamination: response to model pollutants // *Rapp.Comm.int.Mer Medit.* / CIESM Scientific Committee (ur.).

Monaco : CIESM, 2010. 305-305 (poster,međunarodna recenzija,objavljeni rad,znanstveni).

3. Smodlaka, Mirta; Ravlić, Sanda.

Proliferative status determination of bentic invertebrates coelomocytes/hemocites // *Rapp.Comm.int.Mer Medit* / CIESM Scientific Committee (ur.).

Monaco : CIESM, 2010. 403-403 (poster,međunarodna recenzija,objavljeni rad,znanstveni).

4. Sanda Ravlić , Mirta Smodlaka.

“Micronuclei detection in mussel tissue”, Book of Abstracts – EMBO – European Molecular Biology Organization (Heidelberg, Germany); postersko priopćenje