

Modellierung von Cytochrom P450-Monooxygenasen

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Stephan Tatzel
aus Brühl

Hauptberichter: Prof. Dr. Rolf D. Schmid
Mitberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 2008

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2008

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Angabe der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig.
Man muß sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das
Mögliche getan hat.*

JOHANN WOLFGANG VON GOETHE, „*Italienreise*“ (1787)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid, MBA danke ich für die freundliche Aufnahme an seinem Institut und die Möglichkeit, meine Arbeit unter ausgezeichneten Arbeitsbedingungen durchführen zu können. Bei Herrn Apl. Prof. Dr. Jürgen Pleiss bedanke ich mich für die Überlassung des Promotionsthemas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die bei der Bearbeitung des Themas überlassenen Freiheiten. In der Zeit am Institut hatte ich die Gelegenheit viel, weit über die wissenschaftliche Arbeit hinaus, zu lernen.

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter H. Wolf möchte ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Koreferates und bei Herrn Prof. Dr. H. Bertagnoli für die Bereitschaft, den Prüfungsvorsitz zu übernehmen, bedanken.

Für die hilfsbereite und angenehme Arbeitsatmosphäre und hilfreiche Diskussionen danke ich den Mitglieder der Arbeitsgruppe Biokatalyse, insbesondere Frau Dr. Vlada Urlacher.

Besonderer Dank an meine beiden Diplomanden Herrn Alexander Seifert und Herrn Michael Krahn für ihre hervorragende wissenschaftliche Arbeit. Ferner danke ich Frau Dr. Sadhna Tyagi und Frau Dipti Mehta für ihre Mitarbeit. Frau Dr. Sandra Barth danke ich für die gemeinsame Anfangszeit bei der Bearbeitung des Projektes und die zahlreichen Hinweise und Hilfestellungen zu Beginn der Arbeit.

Den Kollegen aus der Arbeitsgruppe Bioinformatik gilt mein besonderer Dank für die stets kollegiale und hilfsbereite Zusammenarbeit während der gemeinsamen Zeit am Institut. Zu erwähnen sind insbesondere auch die ehemaligen Kollegen Herr Dr. Markus Fischer und Frau Dr. Sandra Barth. Die vielen gemeinsamen Unternehmungen und Erlebnisse werden unvergessen bleiben, insbesondere die immer sehr geselligen Sitzungen des Ältestenrates.

Im Verlauf der Arbeit kam es zu zahlreichen interessanten und erfolgreichen interdisziplinären Kooperationen mit verschiedenen Projektpartnern. Für die erfolgreiche Zusammenarbeit danke ich Herrn Dr. med. Felix Riepe von der Klinik für Allgemeine Pädiatrie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel. Darüber hinaus danke ich insbesondere den

Projektpartnern des HepatoSys - Kompetenznetzwerk „Systembiologie des Hepatozyten“ für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die Möglichkeit, interessante Einblicke in die Pharmakologie und den humanen Fremdstoffmetabolismus zu erhalten. Besonders danke ich Herrn Dr. Lothar Terfloth und Herrn Prof. Dr. Johann Gasteiger vom Computer-Chemie-Zentrum der Universität Erlangen-Nürnberg bzw. der Firma Molecular Networks für die vielzähligen, hilfreichen Diskussionen. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Zanger, Frau Dr. Tanja Saußele und Frau Dr. Kathrin Klein vom Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie (Stuttgart) für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Für die Finanzierung der Arbeit danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Projekt SCHM 1240/6-1) und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (0313080F, „HepatoSys – Kompetenznetzwerk Systembiologie des Hepatozyten“)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	7
Vorbemerkungen und Abkürzungen	13
1 Kurzzusammenfassung	15
2 Abstract	17
3 Einleitung	19
3.1 Cytochrom P450-Monooxygenasen	19
3.1.1 Nomenklatur	20
3.1.2 Strukturelle Aspekte der P450-Monooxygenasen	21
3.1.3 Konservierte Sequenzmotive	27
3.1.4 Katalysezyklus	30
3.1.5 Redoxpartner der P450-Monooxygenasen	33
3.1.6 Katalysierte Reaktionstypen und Substrate der P450-Monooxygenasen	35
3.1.7 Vorkommen und Funktion in biologischen Systemen	40
3.2 Cytochrom P450 BM-3 (CYP102A1)	43
3.3 Humane P450-Monooxygenasen	46
3.3.1 Humane P450-Enzyme im Arzneimittelmetabolismus	48
3.3.2 <i>In silico</i> Untersuchungen des Arzneimittelmetabolismus	50
3.3.3 Ursachen für inter- und intraindividuelle Unterschiede im Arzneimittelmetabolismus	54
3.4 Pharmakogenetik - Genetische Polymorphismen	55
3.4.1 <i>SNP</i> -Datenbanken	59
3.4.2 Nomenklatur der P450-Allele	59

3.4.3	Vorhersage der Effekte von Polymorphismen	60
4	Zielsetzung	63
5	Ergebnisse	65
5.1	Untersuchung des Einflusses der Mutationen F87A und F87V auf die Aktivität, Regio- und Stereoselektivität von P450 BM-3 gegenüber β-Ionon	65
5.1.1	Regioselektivität der Hydroxylierung von β -Ionon durch P450 BM-3	66
5.1.2	Untersuchung der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen durch <i>docking</i> -Simulationen	68
5.1.3	Flexibilität der Strukturen von P450 BM-3	69
5.1.4	MD-Simulationen von P450 BM-3 ohne Substrat	72
5.1.5	MD-Simulationen von P450 BM-3 mit β -Ionon	76
5.1.6	Experimentelle Untersuchung der Enantioselektivität von P450 BM-3 gegenüber β -Ionon	85
5.2	Isoformspezifische Regioselektivität der humanen Leber-CYPs 3A4 und 2D6	88
5.2.1	Systematische Analyse der Bindetaschenarchitektur von P450-Isoenzymen	88
5.2.2	Isoenzym-spezifischer Metabolismus von Dextromethorphan	90
5.2.3	Isoenzym-spezifischer Metabolismus von Sildenafil	95
5.2.4	Heuristisches Modell der isoformspezifischen Regioselektivität von CYP3A4 und CYP2D6	97
5.3	Untersuchung von genetischen Polymorphismen der Cytochrom P450-Monooxygenasen	114
5.3.1	Vorhersage des Effektes von Polymorphismen auf die Enzymaktivität	114

5.3.2	Untersuchung der Sequenz-Struktur-Funktions-Beziehungen von Varianten des murinen CYP21-Enzyms	130
5.3.3	Molekulare Ursache des kompletten Funktionsverlustes der natürlichen CYP2D6.62-Variante R441C	138
5.3.4	Systematische Analyse der Hämbindung in den bekannten P450-Strukturen	144
6	Diskussion	151
6.1	Untersuchung des Einflusses der Mutationen F87A und F87V auf die Aktivität, Regio- und Stereoselektivität von P450 BM-3 gegenüber β-Ionon	151
6.1.1	Regioselektivität	151
6.1.2	Aktivität	153
6.1.3	Flexibilität	154
6.1.4	Stereoselektivität	155
6.2	Isoformspezifische Regioselektivität der humanen Leber-CYPs 3A4 und 2D6	157
6.2.1	Die intrinsische Reaktivität	162
6.2.2	Sterische Zugänglichkeit der P450-Isoenzyme	167
6.2.3	Vergleich mit anderen Methoden	169
6.3	Untersuchung von genetischen Polymorphismen der Cytochrom P450-Monooxygenasen	176
6.3.1	Vorhersage des Effektes von Polymorphismen auf die Enzymaktivität	176
6.3.2	Untersuchung der Sequenz-Struktur-Funktions-Beziehungen von Varianten des murinen CYP21-Enzyms	181
6.3.3	Molekulare Ursache des kompletten Funktionsverlustes der natürlichen CYP2D6-Variante R441C / systematische Analyse der Hämbindung in den P450-Strukturen	184

7	Zusammenfassung und Ausblick	187
8	Material und Methoden	191
8.1	Theoretische Arbeiten	191
8.1.1	Verwendete Software und Datenbanken	191
8.1.2	Eingesetzte Hardware	192
8.1.3	Molekulares <i>docking</i>	192
8.1.4	Vorbereitung und Durchführung der <i>docking</i> -Simulationen	195
8.1.5	Theoretische Grundlagen molekulardynamischer Simulationen	195
8.1.6	Parametrisierung der Hämgruppe und des Substrates β -Ionon	199
8.1.7	Vorbereitung und Durchführung der MD-Simulationen	202
8.1.8	Analyse der Bindetaschenarchitektur	204
8.1.9	Abschätzung der intrinsischen Reaktivität	204
8.1.10	Abschätzung der sterischen Hinderung	204
8.1.11	Sequenzanalysen	205
8.1.12	Homologiemodellierung	208
8.2	Experimentelle Arbeiten	209
8.2.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	209
8.2.2	Medien und Stämme	210
8.2.3	Mikrobiologische Methoden	211
8.2.4	Oxidation von β -Ionon <i>in vivo</i>	211
8.2.5	GC/MS-Analytik	212

9	Anhang	215
9.1	Verwendete Sequenzen	215
9.2	Distanzmatrizen	223
9.3	Auswertung der MD-Simulationen	228
10	Literaturverzeichnis	231

Vorbemerkungen und Abkürzungen

Aus dem englischen Sprachgebrauch stammende Fachbegriffe, deren Übersetzung entweder keinen Sinn ergeben oder zu einem falschen Verständnis geführt hätte, wurden im Text kursiv dargestellt.

SI-Einheiten werden im Folgenden nicht gesondert aufgeführt und es wurden die Empfehlungen der NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) zur Abkürzung der Aminosäuren durch den Ein- und den Dreibuchstabencode befolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

17-OHP	17-Hydroxyprogesteron
21-OHD	21-Hydroxylase-Defizienz
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADME	<i>Absorption, distribution, metabolism and elimination</i> pharmakokinetischen Eigenschaften eines Wirkstoffes
BDE	Bindungsdissoziationsenergie
CPR	Cytochrom P450-Reduktase
CYP	Cytochrom P450-Monooxygenase
DFT	Dichtefunktionaltheorie
EC	<i>Enzyme commission (numbers)</i>
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
EM	<i>Extensive metabolizer</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavin-Mononukleotid
GC/MS	Kopplung eines Gaschromatographen (GC) mit einem Massenspektrometer (MS)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HTS	<i>High-throughput screening</i>
IM	<i>Intermediate metabolizer</i>

MD	Molekulardynamik
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
n.b.	nicht bestimmt
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat)
P450	Cytochrom P450-Monooxygenase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PM	<i>Poor metabolizer</i>
<i>RDF</i>	Deskriptor der radialen Verteilungsfunktion (<i>radial distribution function</i>)
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
<i>SNP</i>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SRS	<i>Substrate recognition site</i>
Standabw.	Standardabweichung
UM	<i>Ultrarapid metabolizer</i>

1 Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden computergestützte Modelle zur Vorhersage der Selektivität und Aktivität von P450-Monooxygenasen und dem Einfluss von Mutationen auf diese entwickelt. Die Arbeit konzentrierte sich auf zwei P450-Monooxygenase-Systeme, die bakterielle P450-Monooxygenase P450 BM-3 (CYP102A1) und die humanen P450-Enzyme des xenobiotischen Metabolismus.

Cytochrom P450 BM-3 ist ein interessantes Enzym für biotechnologische Anwendungen. Aufgrund der Fähigkeit zur selektiven Oxidation von chemischen Verbindungen ermöglicht P450 BM-3 interessante Anwendungen in der Enzymkatalyse im Bereich der „weißen Biotechnologie“. Darüber hinaus gewinnt P450 BM-3 als Modellsystem für humane P450-Monooxygenasen im Bereich der „roten Biotechnologie“ zunehmend an Bedeutung. Das Verständnis von Aktivität und Selektivität von P450-Monooxygenasen auf molekularer Ebene ist eine wichtige Voraussetzung für das rationale Proteindesign und die Verbesserung der Enzyme in Hinblick auf Aktivität, Spezifität und Selektivität. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch molekulardynamische Simulationen die Aktivität, Regio- und Stereoselektivität von Hydroxylierungsreaktionen vorhergesagt werden kann.

Humane P450-Monooxygenasen spielen eine zentrale Rolle im Metabolismus von Arzneimitteln und anderen Xenobiotika. Der Metabolismus ist ein zentraler Schritt für den Abbau bzw. die Aktivierung von Wirkstoffen. Die Vorhersage des bei Reaktion mit einem bestimmten Isoenzym zu erwartenden Metaboliten ist eine große Hilfe für die Wirkstoffentwicklung. Für die beiden bedeutendsten humanen P450-Enzyme CYP3A4 und CYP2D6 konnte ein einfaches, generelles und prädiktives Modell der Regioselektivität erstellt und erfolgreich an einem Datensatz aus Literaturdaten validiert werden.

Polymorphismen in den Genen der humanen Cytochrom P450-Monooxygenasen haben einen bedeutenden Einfluss auf den Metabolismus von Arzneimitteln. Es ist eine große Anzahl von Allelen bekannt aber für viele Allele ist keine Information über den Einfluss auf die Enzymaktivität verfügbar. Aufgrund der Bedeutung möglicher funktioneller Effekte der Allele für den Arzneimittelmetabolismus besteht ein großes Interesse an der Vorhersage des

Kurzzusammenfassung

Einfluss von Polymorphismen auf die Enzymaktivität. In der vorliegenden Arbeit konnte ein Modell entwickelt werden, das anhand einfacher Regeln erlaubt den Effekt von Mutationen auf die Enzymaktivität vorherzusagen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es durch die Analyse von Sequenz-Struktur-Funktion-Beziehungen möglich ist, die molekularen Grundlagen der Effekte von Mutationen auf die Enzymaktivität zu verstehen.

2 Abstract

Within this work computational models have been developed for the prediction of the selectivity and activity of cytochrome P450 monooxygenases and the influence of mutations on them. This work focuses on two P450 monooxygenase systems: The bacterial P450 monooxygenase P450 BM-3 (CYP102A1) and the human P450 enzymes, the latter participating in the xenobiotic drug metabolism.

Cytochrome P450 BM-3 is an interesting enzyme for biotechnological applications. Due to the possibility of the selective oxidation of chemical compounds, P450 BM-3 facilitates attractive applications in enzyme catalysis in industrial biotechnology. Furthermore, P450 BM-3 gains in importance as a model system for human P450 monooxygenases in the field of „red biotechnology“. The understanding of activity and selectivity of P450 monooxygenases on a molecular level is an important requirement for rational protein engineering and for the improvement of the enzymes with regard to activity, specificity, and selectivity. In the present thesis it was shown, that molecular dynamics simulation can be applied for the prediction of the activity, regio-, and stereoselectivity of P450 reactions.

Human P450 monooxygenases play an important role in the metabolism of drugs and other xenobiotics. The prediction of the site of metabolism is of considerable interest especially for drug development in the pharmaceutical industry. For the both most important human drug metabolising enzymes CYP3A4 and CYP2D6 a simple, general, and predictive model of the regioselectivity could be developed and validated using a substrate dataset from literature.

Polymorphisms in genes, coding for human P450 monooxygenases, have a significant influence on the drug metabolism. There is a multiplicity of SNPs known. Nevertheless, for the better part of these alleles no information about the influence of the mutants on enzyme activity is known. Due to the relevance of potential functional effects of the variants on the drug metabolism, there is great interest in the prediction of the effect of these mutations on enzyme activity. Within this work a model with simple rules was developed, which allows the prediction of the effect of SNPs on enzyme activity. Additionally it was shown, that sequence-structure-function-analysis facilitates a understanding of the molecular basis of mutant effects.

3 Einleitung

“The P450s are remarkable because there are so many of them and they do so many things.”

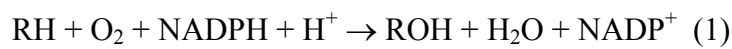
RONALD W. ESTABROOK

Im Folgenden werden die Grundlagen dieser Arbeit beschrieben. Neben einer Einführung zu Funktion, biochemischen Eigenschaften und Vorkommen der Cytochrom P450-Monooxygenasen (P450, CYPs) wird auf strukturelle Aspekte und die Modellierung der P450-Enzyme eingegangen. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wird auf der bakteriellen P450-Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* P450 BM-3 (CYP102A1) und deren Anwendung in der Biokatalyse liegen, mit Fragestellungen zur Aktivität, Regio- und Enantioselektivität und dem Einfluss von Mutationen. Einen zweiten Schwerpunkt werden die humanen P450 und insbesondere deren Beteiligung am xenobiotischen Metabolismus bilden, mit Fragestellungen zur Selektivität und dem Einfluss genetischer Polymorphismen auf die Aktivität der Enzyme. Dazu wird im letzten Teil der Einleitung auf die Bedeutung von Polymorphismen und Methoden zur Vorhersage des Einflusses von Polymorphismen auf die Aktivität von Enzymen eingegangen.

3.1 Cytochrom P450-Monooxygenasen

Mit Cytochrom P450-Monooxygenasen wird eine Enzymfamilie bezeichnet, die zur Klasse der Monooxygenasen (EC 1.14.x.y) gehört. Ihren Namen erhielt diese Proteinfamilie aufgrund des charakteristischen Absorptionsmaximums bei 450 nm im reduzierten kohlenstoffmonoxidgebundenen Zustand (P steht für Pigment). CYPs kommen praktisch ubiquitär in allen Lebensformen vor. Heute sind bereits über 6000 für CYPs codierende Gene

bekannt. Cytochrom P450-Enzyme oxidieren nicht aktivierte aliphatische oder aromatische Verbindungen mit Hilfe von Luftsauerstoff. Als Reduktionsmittel wird in mikrosomalen P450-Systemen das Coenzym NADPH benötigt, dessen Elektronen über eine Elektronentransportkette auf die oxidierte Form des Cytochrom P450 übertragen werden. Die Gesamtreaktion lässt sich durch folgende Redoxgleichung darstellen (1):



3.1.1 Nomenklatur

Die Bezeichnung Cytochrom P450 ist ein Begriff aus den Anfangsjahren der P450-Forschung.¹ Die Bezeichnung Cytochrome, wie sie für P450 (EC 1.14.x.y) verwendet wird, ist nicht ganz korrekt. Die bevorzugte Bezeichnung wäre Häm-Thiolat-Enzyme (NC-IUBMB).

Die Einteilung der P450-Gene in Genfamilien, Subfamilien und innerhalb einer Subfamilie in die entsprechenden Isoformen erfolgt aufgrund ihrer Sequenzhomologie auf Aminosäureebene. Ein systematisches System zur Nomenklatur der P450 wurde 1989 etabliert^{2,3} und seither regelmäßig aktualisiert.⁴⁻⁶ Die Bezeichnung der P450-Gene setzt sich aus der kursiven Abkürzung *CYP* (Cytochrom P450), einer Nummer, die die Familie bezeichnet, einem Buchstaben, der die Subfamilie bezeichnet sowie einer Nummer für das individuelle Gen zusammen. Beispielsweise bezeichnet *CYP3A4* das vierte Gen, das in der Subfamilie A der P450-Familie 3 entdeckt wurde. Eine besondere Konvention gilt für Gene, die für P450-Monooxygenasen aus Maus und *Drosophila* codieren. Diese werden durch eine kursive Bezeichnung in Kleinbuchstaben symbolisiert (z. B. *Cyp3a4*).

Für die entsprechenden Genprodukte (mRNA, cDNA, Proteine) werden dieselben Bezeichnungen in Großbuchstaben und nicht-kursiver Darstellung verwendet. Hierbei gibt es keine besondere Konvention für bestimmte Organismen. Die Bezeichnung neuer P450 und die Klassifizierung in Familien und Unterfamilien erfolgen anhand der Sequenzhomologie zu bereits bekannten P450-Sequenzen. Gene mit einer Aminosäuresequenzidentität > 40 % gehören zu einer P450-Familie, diejenigen mit einer Identität > 55 % gehören zur selben Subfamilie. Zur Nomenklatur der P450-Allele siehe Kapitel 3.4.2.

Die Nummerierungen der einzelnen Familien haben verschiedene Hintergründe. Zum Teil bezeichnen die Nummern die Positionen im Steroidgrundgerüst, die von den entsprechenden P450-Enzymen metabolisiert werden (z. B. Position 11, 17, 19, 21). Im ursprünglichen

Nomenklatorsystem waren 100 P450-Familien für Eukaryoten und eine unbegrenzte Zahl an Familien für Bakterien vorgesehen. Die ersten 100 Familien wurden aufgeteilt unter Tieren (*CYP1-50*), niederen Eukaryoten (*CYP51-70*) und Pflanzen (*CYP71-100*) (Tabelle 1). Aufgrund der schnell steigenden Anzahl neuer P450-Sequenzen reichte das System nicht mehr aus und musste um ein drei- und vierstelliges System erweitert werden (Bakterien *CYP101-299*, *CYP1001-2999*; Tiere *CYP301-499*, *3001-4999*; niedere Eukaryoten *CYP501-699*, *CYP5001-6999*; und Pflanzen *CYP 701-999*, *CYP7001-9999*).⁶

Tabelle 1: Nomenklatur der P450-Superfamilie.⁵

CYP	Spezies	Enzymfunktion
1-4	<i>Vertebrata</i>	Metabolismus von Xenobiotika
5	<i>Vertebrata</i>	Thromboxan-Biosynthese
6	<i>Insecta</i>	
7	<i>Vertebrata</i>	Steroid-Metabolismus
8	<i>Vertebrata</i>	Prostacyclin-Biosynthese
9	<i>Insecta</i>	
10	<i>Mollusca</i>	
11	<i>Vertebrata</i>	Steroid-Biosynthese
17	<i>Vertebrata</i>	Steroid-Biosynthese
19	<i>Vertebrata</i>	Steroid-Biosynthese
21	<i>Vertebrata</i>	Steroid-Biosynthese
24	<i>Vertebrata</i>	Vitamin D ₃ -Metabolismus
26	<i>Vertebrata</i>	Retinoid-Metabolismus
27	<i>Vertebrata</i>	Biosynthese der Gallensäure
52-70	<i>Fungi</i>	
71-100	<i>Plantae</i>	
101-118	<i>Bacteria</i>	

3.1.2 Strukturelle Aspekte der P450-Monooxygenasen

Die erste Struktur einer Cytochrom P450-Monooxygenase wurde 1987 durch die Röntgenstrukturanalyse von P450cam aus *Pseudomonas putida* (CYP101) aufgelöst. Lange Zeit waren nur Strukturen löslicher, mikrobieller P450 bekannt (P450cam, P450 BM-3,

P450terp, P450eryF, P450nor).⁷⁻¹¹ Eukaryotische Cytochrom P450-Enzyme sind membrangebunden und daher schwieriger zu kristallisieren. Im Jahr 2000 gelang es, die erste Struktur eines Säugetier-P450-Proteins aufzulösen, CYP2C5 aus *Oryctolagus cuniculus* (Kaninchen).¹² Zur Kristallisation des ersten Säuger-Proteins war es nötig, die Löslichkeit des Enzyms durch Entfernen des aminoterminalen Membranankers und Austausch der aminoterminalen Aminosäuresequenz zu erhöhen.¹³ Im Jahr 2003 wurde die erste Struktur eines humanen P450-Enzyms, CYP2C9, aufgelöst.¹⁴ Damit waren zu Beginn dieser Arbeit gerade einmal zwei Strukturen von Säuger-P450 bekannt, davon eine humane. In der Folgezeit gab es große Fortschritte bei der Kristallisation und Strukturaufklärung von eukaryotischen CYPs. In der Zwischenzeit sind die Strukturen von elf P450-Proteinen aus Säugern bekannt, darunter die Strukturen neun humaner CYPs. Insgesamt sind in der Protein Data Bank¹⁵ (PDB) (<http://www.pdb.org/>) aktuell 164 Proteinstrukturen von 31 verschiedenen P450-Proteinen abgelegt (Tabelle 2). Unter den 28 bereits abgelegten, aber noch unveröffentlichten Strukturen, befindet sich auch die erste Struktur eines pflanzlichen P450-Enzyms, CYP74A aus *Arabidopsis thaliana*.

Trotz der geringen Sequenzhomologie auf Aminosäureebene von teilweise unter 20 % zwischen den Mitgliedern verschiedener P450-Familien besitzen alle CYPs, deren Strukturen bisher aufgeklärt wurden, eine konservierte dreidimensionale Struktur (Abbildung 1).¹⁶ Die Struktur der CYPs ist hauptsächlich alpha-helikal (*class: mainly alpha*) mit einer orthogonalen Bündel-Struktur (*architecture: orthogonal bundle*) entsprechend der CATH-Klassifizierung.¹⁷ Die Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der allgemeinen Topologie von P450-Monooxygenasen anhand der Struktur von P450 BM-3. Allgemeine Aspekte der Struktur sind bei allen Cytochrom P450 ähnlich. Sie verfügen neben variablen Bereichen, die an der Substraterkennung und -bindung beteiligt sind, über einen gemeinsamen, strukturell stark konservierten Kern. Die höchste strukturelle Konservierung findet sich im Kern des Proteins rund um die prosthetische Hämgruppe und spiegelt den gemeinsamen Mechanismus von Elektronentransport und Sauerstoffaktivierung wider.

Tabelle 2: Übersicht über die bisher veröffentlichten Strukturen von P450-Enzymen. Wenn von einem Protein mehrere Strukturen aufgelöst wurden, ist jeweils der Eintrag der ersten Veröffentlichung angegeben.

CYP	frühere Bezeichnung	PDB-Eintrag	Jahr	Anzahl der Strukturen	Organismus	
CYP1A2		2HI4	2007	1	<i>Homo sapiens</i>	<i>Eucaryota / Mammalia</i>
CYP2A13		2P85	2007	1	<i>Homo sapiens</i>	<i>Eucaryota / Mammalia</i>
CYP2A6		1Z10	2005	6	<i>Homo sapiens</i>	<i>Eucaryota / Mammalia</i>
CYP2B4		1PO5	2003	3	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<i>Eucaryota / Mammalia</i>
CYP2C5		1DT6	2000	3	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<i>Eucaryota / Mammalia</i>
CYP2C8		1PQ2	2004	1	<i>Homo sapiens</i>	<i>Eucaryota / Mammalia</i>
CYP2C9		1OG2	2003	3	<i>Homo sapiens</i>	<i>Eucaryota / Mammalia</i>
CYP2D6		2F9Q	2005	1	<i>Homo sapiens</i>	<i>Eucaryota / Mammalia</i>
CYP2R1		2OJD	2007	1	<i>Homo sapiens</i>	<i>Eucaryota / Mammalia</i>
CYP3A4		1W0E	2004	6	<i>Homo sapiens</i>	<i>Eucaryota / Mammalia</i>
CYP8A1		2IAG	2006	1	<i>Homo sapiens</i>	<i>Eucaryota / Mammalia</i>
CYP51		1E9X	2000	6	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Bacteria</i>
CYP55A1	nor	1ROM	1997	18	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Eucaryota / Fungi</i>
CYP101	cam	2CPP	1987	49	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Bacteria</i>
CYP102A1	BM-3	2HPD	1993	21	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacteria</i>
CYP107A1	eryF	1OXA	1995	9	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	<i>Bacteria</i>
CYP107L1	pikC	2BVJ	2006	5	<i>Streptomyces venezuelae</i>	<i>Bacteria</i>
CYP108	terp	1CPT	1994	1	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Bacteria</i>
CYP119		1F4T	2000	5	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	<i>Archaea</i>
CYP119		1UE8	2004	1	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	<i>Archaea</i>
CYP121		1N40	2003	4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Bacteria</i>
CYP152A1	BS	1IZO	2003	1	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacteria</i>
CYP154A1		1ODO	2004	1	<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>Bacteria</i>
CYP154C1		1GWI	2003	1	<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>Bacteria</i>
CYP158A1		2DKK	2007	1	<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>Bacteria</i>
CYP158A2		1S1F	2005	5	<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>Bacteria</i>
CYP165B3	OxyB	1LFK	2002	3	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	<i>Bacteria</i>
CYP165C4	OxyC	1UED	2003	1	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	<i>Bacteria</i>
CYP167A1	epoK	1Q5E	2003	2	<i>Polyangium cellulorum</i>	<i>Bacteria</i>
CYP175A1		1N97	2003	2	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Bacteria</i>
CYP199A2		2FR7	2007	1	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	<i>Bacteria</i>
unveröffentlichte Strukturen:						
CYP74A		2PHQ 2PHS	2007		<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Plantae</i>

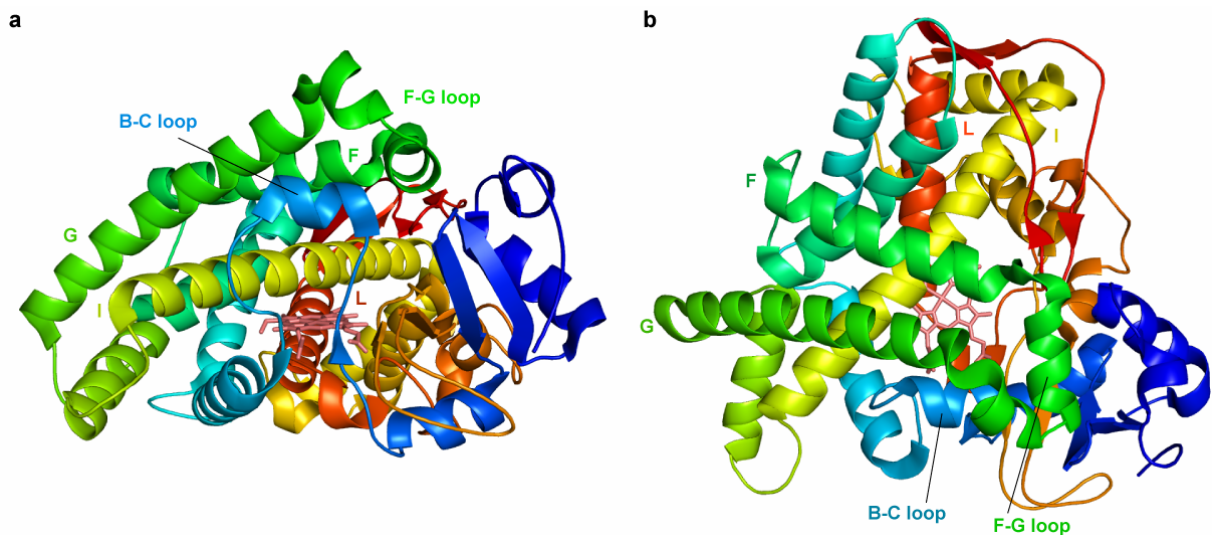


Abbildung 1: Zwei Ansichten der Kristallstruktur der P450-Monooxygenase CYP2C9 aus *Homo sapiens* (PDB-Eintrag 1OG2).¹⁴ Die linke Abbildung **a** zeigt eine Seitenansicht und die rechte Abbildung **b** zeigt eine Ansicht von der distalen Seite des Enzyms. Die Sekundärstruktur ist von blau (N-Terminus) nach rot (C-Terminus) eingefärbt und die Hämgruppe ist hellrot dargestellt. Zur besseren Visualisierung sind die *loop*-Bereiche geglättet dargestellt.

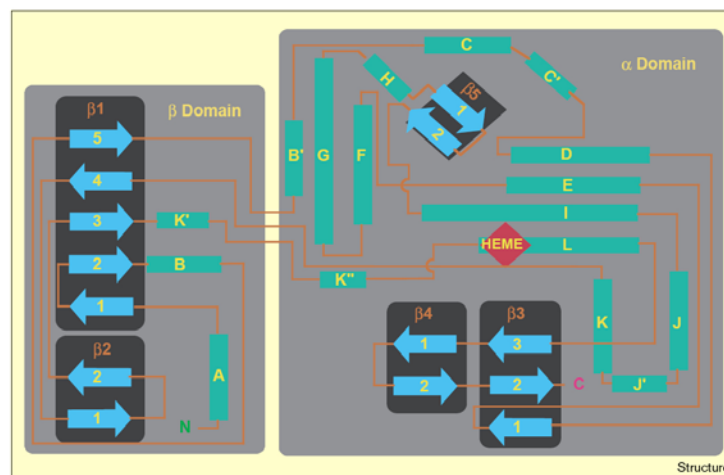


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Topologie von P450-Monooxygenasen anhand von P450 BM-3 (aus Peterson *et al.*¹⁸).

Der konservierte Kern besteht aus den vier aneinander gelagerten α -Helices D, E, I und L (*four-helix bundle*), den Helices J und K, zwei β -Faltblattstrukturen und einem *loop*, der als *meander-loop* bezeichnet wird (Abbildung 2).¹⁹ Die prosthetische Gruppe, das Eisen(III)-Protoporphyrin IX (Häm b)²⁰ befindet sich zwischen der distalen Helix I und der proximalen Helix L und ist über das Schwefelatom eines proximalen Cysteins an das Apoprotein gebunden. Dieser Cysteinatligand führt - im Gegensatz zu Hämproteinen mit anderen

proximalen Liganden (wie beispielsweise Histidin in Hämoglobinen oder Peroxidasen) - zur Ausbildung des charakteristischen Absorptionsmaximums bei 450 nm im reduzierten CO-gebundenen Zustand. Die negativen Ladungen der Propionatgruppen im Häm werden über Wasserstoffbrücken zu basischen Aminosäuren des Proteins stabilisiert. Der proximale, absolut konservierte Cysteinatligand des Hämeisens befindet sich in der benachbarten Cysteinat-Häm-Ligandenschleife. In diesem Bereich findet man ein in der P450-Superfamilie konserviertes Sequenzmotiv, die P450-Signatur: [FW] - [SGNH] - x - [GD] - {F} - [RKHPT] - {P} - C - [LIVMFAP] - [GAD] (PROSITE-pattern PS00086: *P450 cysteine heme-iron ligand signature*).²¹ Der F-G-Bereich (F-Helix, F-G-loop und G-Helix) senkrecht über der I-Helix ist ein wichtiges Strukturelement von CYPs. Die F- und G-Helices und der F-G-loop kontrollieren zusammen mit dem B-C-loop den Zugang zum aktiven Zentrum der P450-Monooxygenasen. CYPs aus Säugetieren haben einen relativ langen Einschub zwischen den beiden Helices F und G und in manchen Strukturen sind zwei zusätzliche Helices F' und G' vorhanden. Die Strukturen der Säugetier- und der mikrobiellen P450 sind sehr ähnlich, unterscheiden sich jedoch in einigen Details, die die Substratbindungseigenschaften und die Interaktionen mit den Redoxpartnern beeinflussen.²²

Säugetier-P450 sind membrangebundene Proteine, die mit einer N-terminalen Helix in der Membran verankert sind. Die meisten befinden sich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Einige Säugetier-CYPs jedoch, die an der Synthese endogener Substrate wie Sterole, Steroide und Gallensäuren beteiligt sind, befinden sich auf der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran. Experimentelle Untersuchungen zeigen nicht nur das Vorhandensein einer einzelnen Transmembranhelix, sondern deuten darauf hin, dass die Aminosäuren in der Umgebung der Transmembranhelix in die Membran eintauchen.^{13,23,24}

Die Vorhersage von hydrophoben Bereichen in der Proteinstruktur, welche in die Membran eintauchen können, zeigt, dass F-G-loop und N-Terminus des Proteins in Kontakt mit der Membran stehen (Abbildung 3). Dies steht in Übereinstimmung mit experimentellen Ergebnissen.²⁵ Durch den Kontakt des F-G-loop mit der Membran taucht ein möglicher Substratzugangskanal zum aktiven Zentrum in die Lipiddoppelschicht ein, was den Eintritt lipophiler Substrate erleichtern würde. Die veröffentlichten Strukturen der P450 geben erste Hinweise auf mögliche Substratzugangskanäle zur Bindetasche der Proteine. Es wäre denkbar, dass lipophile Substrate von der Membran her, durch einen Zugangskanal nahe dem F-G-loop, in das Enzym eindringen und die hydroxylierten, hydrophileren Produkte die Bindetasche durch einen anderen Ausgangskanal direkt ins Cytoplasma verlassen.¹²

Der Zugang von Substraten zum reaktiven Zentrum im Inneren der Proteinbindetasche und der Abgang der hydroxylierten Produkte sind ein wichtiger Aspekt bei der Untersuchung der molekularen Mechanismen der P450-Monooxygenasen. Neben den Hinweisen auf Zugangskanäle aus den Proteinstrukturen hat die Gruppe von Rebecca C. Wade einen erheblichen Beitrag zum Verständnis möglicher Wege aus dem aktiven Zentrum nach außen geleistet und eine Klassifikation der Zugangskanäle eingeführt.²⁶⁻³¹

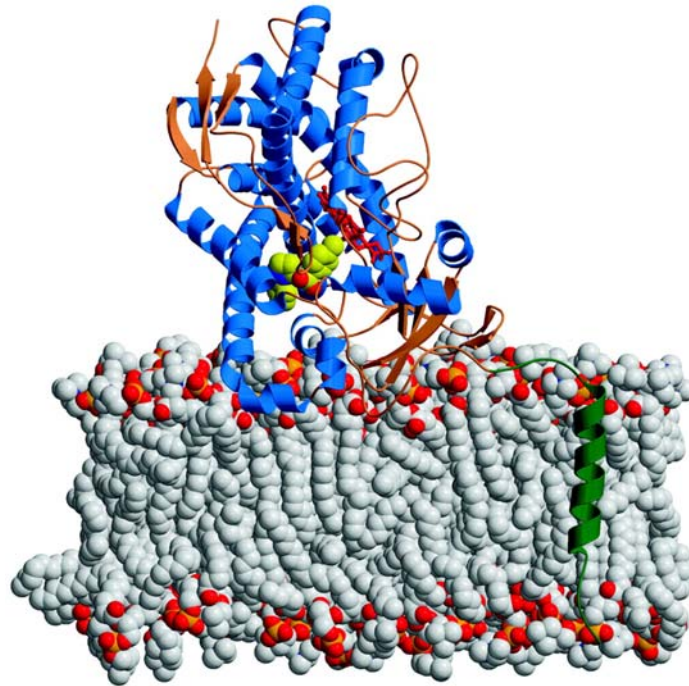


Abbildung 3: Modell der Bindung von CYP2C5 in einer Phospholipiddoppelschicht. Die N-terminale Transmembranhelix und die Linkerregion (grün) sind in der Kristallstruktur von CYP2C5 (PDB-Eintrag 1N6B) nicht vorhanden. Die Transmembranhelix wurde so modelliert, dass sie sich über die Membran erstreckt. Die Konformation der Linkerregion ist unbekannt und wurde zur besseren Visualisierung in einer ausgestreckten Konformation modelliert. Die hydrophobe Spitze des Proteins, bestehend aus den Helices F' und G' und dem Bereich N-terminal von Helix A, interagiert wahrscheinlich mit der Membran (aus Johnson³²).

Die Röntgenstruktur des Komplexes aus der P450 BM-3-Häm-domäne und der FMN-Reduktasedomäne zeigt eine Interaktion des Redoxpartners mit der proximalen Seite der Häm-domäne.³³ Mutageneseexperimente weisen auch bei Säugetier-P450 darauf hin, dass der Redoxpartner mit der proximalen Seite der P450 interagiert. Die Struktur der proximalen Seite der katalytischen P450-Domäne ist höher konserviert als die distale Oberfläche und wird größtenteils durch den Kern der P450-Struktur gebildet, der die Hämbindungsstelle enthält. Diese konservierte Architektur führt zu einer hohen Ähnlichkeit der Reduktase-

Bindungsstellen der funktionell divergenten P450-Enzyme.³² Im Fall der mikrosomalen P450 sind sowohl die P450-Monooxygenasen als auch die P450-Reduktase membrangebunden und diffundieren entlang der Membranoberfläche.³⁴

Die Substrate binden auf der distalen Seite der Hämgruppe. Die Substratbindung und -erkennung wird in erster Näherung durch sechs Substratbindungsstellen (*substrate recognition sites* SRS) vermittelt, die von Gotoh³⁵ aufgrund von Sequenzvergleichen identifiziert wurden und vom N-Terminus ausgehend mit 1-6 bezeichnet werden. Die Substratbindungsstellen (SRS) umfassen die B'-Helix (SRS1), Teile der Helices F (SRS2), G (SRS3) und I (SRS4), den β -Strang 4 im β -Faltblatt 1 (SRS5) und den *turn* im Strang 1 des β -Faltblatt 4 (SRS6) (Abbildung 4). Mutationen in diesen Bereichen können Auswirkungen auf die Substratspezifität von CYPs haben.³⁶⁻³⁸



Abbildung 4: Kristallstruktur der P450-Monooxygenase CYP2C9 aus *Homo sapiens* (PDB-Eintrag 1OG2).¹⁴ Die Substratbindestellen nach Gotoh³⁵ sind rot markiert.

3.1.3 Konservierte Sequenzmotive

Die Aminosäuresequenzidentität zwischen den Proteinen der P450-Superfamilie ist häufig sehr niedrig (< 20 %) und es gibt nur wenige konservierte Aminosäuren.¹⁹ Durch Sequenz-*alignments* konnten konservierte Sequenzmotive identifiziert werden, die hauptsächlich im carboxyterminalen Teil des Proteins lokalisiert sind.^{39,40} Bekannte CYP-Motive sind die prolinreiche Region am N-Terminus der CYPs, das EXXR-Motiv am C-terminalen Ende der

Helix K, das AGXXT-Motiv in der Helix I und die P450-Signatur mit dem funktionell essenziellen Cystein.

Das absolut konservierte EXXR-Motiv in der Helix K interagiert mit Aminosäuren im *meander-loop* und trägt möglicherweise zur Stabilisierung der Kernstruktur bei. Innerhalb der Helix I in der Nähe des Zentrums des Proteins befindet sich ein konserviertes Motiv mit der Konsensussequenz (G/A)GX(D/E)T. Das terminale Threonin dieses Motivs ist für die Aktivierung des Sauerstoffs verantwortlich.^{41,42} Die Cysteinat-Häm-Ligandenschleife auf der proximalen Seite des Häms enthält ein in der P450-Superfamilie konserviertes Sequenzmotiv, die P450-Signatur: [FW] - [SGNH] - x - [GD] - {F} - [RKHPT] - {P} - C - [LIVMFAP] - [GAD] (PROSITE-pattern PS00086: *P450 cysteine heme-iron ligand signature*).²¹ Diese Signatur enthält den absolut konservierten Cysteinatliganden des Hämeisens.

Die hochvariablen Bereiche der CYPs sind entweder mit dem aminoterminalen Anker, der Zielsteuerung (*targeting*) von membrangebundenen Proteinen oder der Substratbindung und -erkennung verknüpft. Bei den Regionen der Substratbindung und -erkennung, die sich im Bereich des Substratzugangskanals und des aktiven Zentrums befinden, handelt es sich um die sogenannten *substrate recognition sites* (SRS).³⁵ Andere Abweichungen spiegeln Unterschiede im Elektronentransport, den katalysierten Reaktionen oder der Membranlokalisation (Abbildung 5b) wider. Die meisten eukaryotischen P450 sind mit mikrosomalen Membranen verknüpft. Sie weisen meist einen Cluster von Prolinen (PPXP) auf.⁴³ Diesem Prolin-Cluster geht ein Cluster basischer Aminosäuren voraus („*halt-transfer signal*“). Die beiden Cluster bilden ein Gelenk zwischen dem hydrophoben aminoterminalen Membrananker und dem P450-Enzym (Abbildung 5a). Die mitochondrialen CYPs weisen neben einem aminoterminalen Signalpeptid zwei positive geladene Aminosäuren am Anfang der Helix L auf. Solch positive Ladungen findet man ebenfalls in löslichen bakteriellen P450 der Klasse I, die Ihre Elektronen von einem Ferredoxin beziehen.

Zur systematischen Analyse der Sequenz-Struktur-Funktions-Beziehungen der Cytochrom P450-Superfamilie steht eine in unserem Institut entwickelte Datenbank zur Verfügung. Die *Cytochrome P450 Engineering Database* (CYPED) (www.cyped.uni-stuttgart.de) enthält 6885 Sequenzen und 4014 Protein- sowie 161 Struktureinträge.⁴⁴ In der Datenbank wurden experimentelle Daten und Informationen über Mutationen und deren Effekte aufgenommen. Für Struktureinträge wurden Sekundärstrukturinformationen annotiert. Des Weiteren sind funktionell wichtige Aminosäuren und bekannte CYP-Motive annotiert.

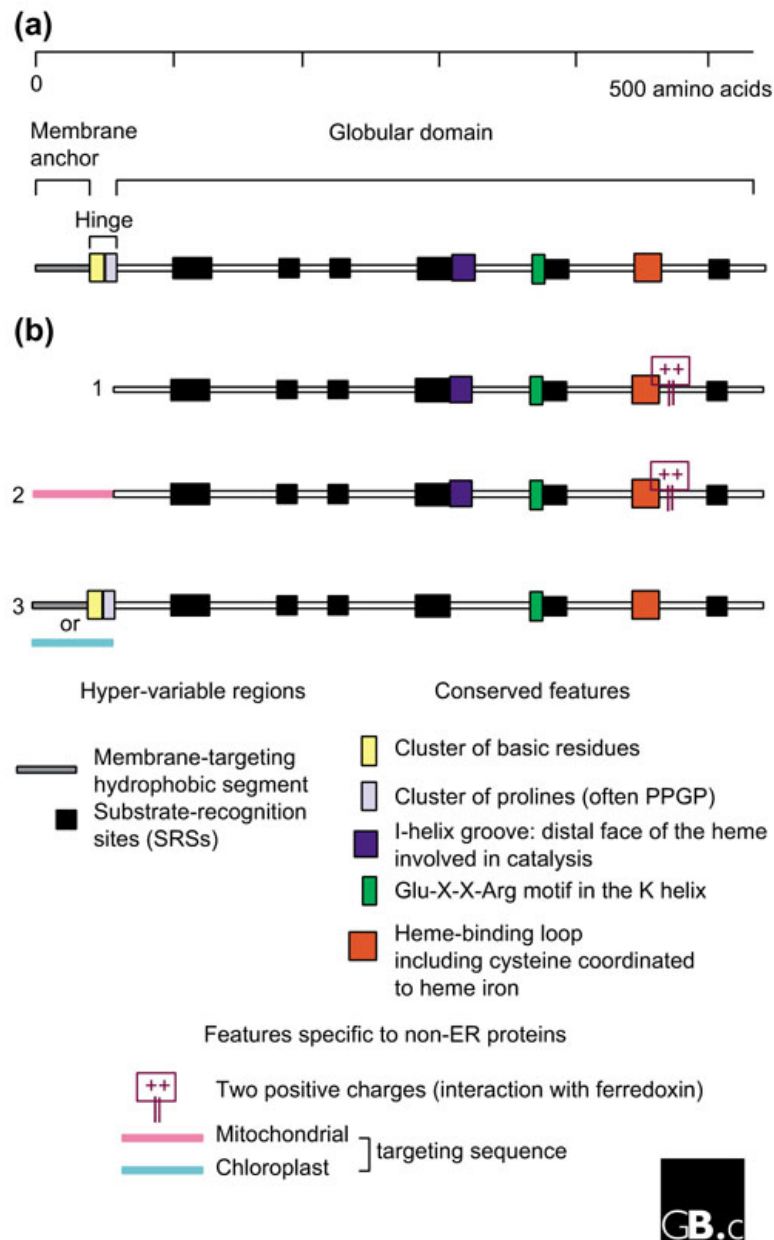


Abbildung 5: Aminosäuresequenz der P450-Proteine. **(a)** Typische Merkmale der am endoplasmatischen Retikulum gebundenen P450-Proteine. Die Funktion der einzelnen Domänen und Regionen ist im Text beschrieben. **(b)** Häufige Varianten des Aufbaus: 1, lösliche CYPs (Klasse I); 2, mitochondriale CYPs; 3, membrangebundene (Klasse III) (aus Werck-Reichhart *et al.*).¹⁹

3.1.4 Katalysezyklus

Die herausragende Funktion von Cytochrom P450-Monooxygenasen ist die Aktivierung von Luftsauerstoff und die anschließende Oxidation eines Substrats. Das zweite Atom des Luftsauerstoffs wird zu Wasser reduziert. Die Übertragung des Sauerstoffs durch P450 auf ein Substrat wird durch den in Abbildung 6 dargestellten Katalysezyklus erreicht.⁴⁵ Der seit seiner ersten Formulierung im Jahre 1968⁴⁶ immer weiter untersuchte Katalysezyklus ist heute in seinen wesentlichen Schritten allgemein anerkannt.

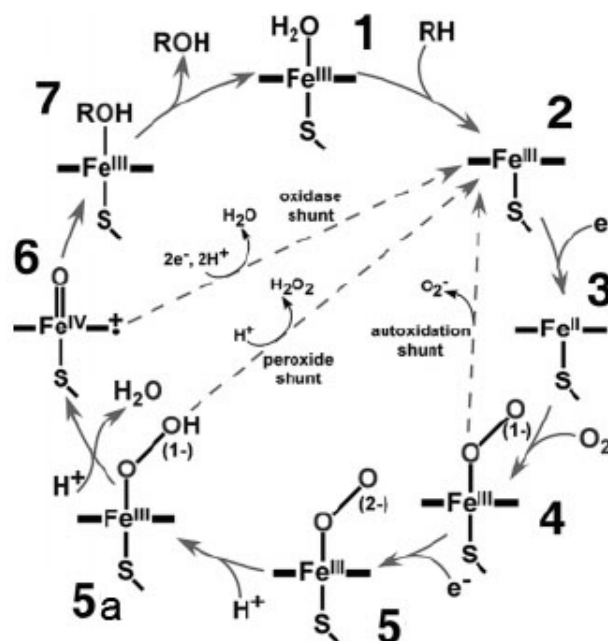


Abbildung 6: Katalysezyklus von P450-Monooxygenasen. Die beiden schwarzen Balken links und rechts des Eisenatoms symbolisieren das Porphyrinringsystem der Hämgruppe. Neben dem zu den Produkten führenden Katalysezyklus sind die prinzipiell zur Entkopplung von Substrat- und NADPH-Oxidation führenden Entkopplungsreaktionen („shunt pathways“) dargestellt (aus Denisov *et al.*¹⁶).

Im inaktiven, substratfreien Zustand liegt ein *low-spin* Fe^{III} (d^5 , $S=1/2$)-System **1** mit sechsfach koordiniertem Metall vor. Die vier äquatorialen Positionen des verzerrt oktaedrischen Eisenkomplexes sind dabei durch die Stickstoffatome des Protoporphyrin IX besetzt, während die axialen Positionen ein Cysteinat und ein Wassermolekül binden. Der Wasserligand liegt dabei an der Substratbindungsstelle und wird bei Substratbindung verdrängt. Dabei erfolgt der Übergang zum fünffach koordinierten *high-spin* Fe^{III} -Komplex **2**

mit unbesetzter Koordinationsstelle, wobei das Fe-Atom weit vom gewölbten Porphyrinring entfernt ist (ausgeprägte „*out-of-plane*“ Struktur). Es kommt zu einer Änderung des Redoxpotentials, das von ca. -300 auf -170 mV erhöht wird, sodass das aktive Zentrum leichter reduzierbar wird. Dies ist eine Folge des Übergangs vom annähernd oktaedrischen Ligandenfeld zur verzerrt quadratisch-planaren Koordination, die mit einem Übergang zum *high-spin* (d^5 , $S = 3/2$) Eisen(II) einhergeht. Dadurch wird die Entkopplung der NADPH-getriebenen Sauerstoffreduktion von der Oxidation des Substrats vermieden. Nur nach Substratbindung kann die Elektronenübertragung entlang des Potentialgradienten von NAD(P)H über die Elektronentransportkette auf das Hämeisen erfolgen. Ist diese Voraussetzung erfüllt, so erfolgt zunächst eine Einelektronenreduktion unter Bildung des *high-spin* Fe^{II}-Komplexes **3**. Dieser ist aufgrund seiner vier ungepaarten Elektronen ($S = 2$) und seiner „*out-of-plane*“ Struktur bestens zur hochaffinen Bindung von Triplett-Sauerstoff geeignet. Die nach Sauerstoffbindung entstehende *low-spin* Form **4** wurde isoliert und charakterisiert und enthält mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Fe^{III}-Superoxid mit „*in-plane*“-Koordination. Die Zustände **1** bis **4** konnten alle isoliert und spektroskopisch nachgewiesen werden.⁴⁷ Sobald der Sauerstoff gebunden ist, wird durch Aufnahme eines zweiten Elektrons ein *low-spin* Peroxo-Fe^{III}-Komplex **5** gebildet. Durch die Aufnahme zweier Protonen wird ein Sauerstoffatom zu Wasser reduziert und der reaktive Oxyferryl-Fe^{IV}-Komplex **6** bleibt zurück. Diese katalytische aktive Spezies wird oft als *compound I* bezeichnet und geht höchstwahrscheinlich über einen *rebound*-Mechanismus (Abbildung 7) über **7** in den Ausgangskomplex **1** über und setzt dabei das Produkt frei.

Abgesehen vom besprochenen Katalysezyklus existieren mindestens drei Wege, auf denen es zur Abdissoziation der aktivierten Sauerstoffspezies vom katalytisch aktiven Hämeisen kommen kann (Abbildung 6). Diese Reaktionen werden als „*shunt pathways*“ bezeichnet. Die am besten untersuchte Reaktion ist dabei der sogenannte „*peroxide shunt*“. Dabei wird in Gegenwart starker Oxidationsmittel wie Periodaten, organischen Peroxiden oder Wasserstoffperoxid der Peroxokomplex **5a** direkt aus dem substratgebundenen *high-spin* Komplex **2** erhalten. Diese Reaktion besitzt eine gewisse Relevanz für synthetische Prozesse, da sie ohne Einsatz des Cofaktors NAD(P)H zu den Reaktionsprodukten führt. Die Rückreaktion führt unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid von Intermediat **5a** zu **2**. Diese Abdissoziation von Peroxospezies vom aktiven Zentrum ist eine der drei Reaktionen, die zur Entkopplung der Substratoxidation von der NADPH-Oxidation führen können. Die beiden anderen Reaktionen sind einerseits der sogenannte *Autoxidations-shunt*, bei dem ausgehend von Komplex **4** durch die Abdissoziation von Superoxid der Komplex **2** entsteht, andererseits

kann Komplex **2** durch den sogenannten Oxidase-*shunt* aus **6** gebildet werden. Dabei wird Sauerstoff unter Verbrauch zweier Moleküle NAD(P)H komplett zu Wasser reduziert. Diese drei Reaktionstypen werden häufig als sogenannte Entkopplungsreaktionen zusammengefasst, da sie alle aus Sicht der Substratoxidation unproduktiv sind, aber trotzdem den Cofaktor NAD(P)H verbrauchen.

Die Hydroxylierung von C–H Gruppen durch Cytochrom P450-Monooxygenasen gehört zu den bestuntersuchten Reaktionen dieser Superfamilie.^{48,49} Die Hydroxylierung erfolgt in einem Zweischnittmechanismus. Der erste Schritt beinhaltet die Abstraktion eines Wasserstoffatoms aus dem Substratmolekül durch die $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ Spezies (*compound I*) **6**. Durch die homolytische Bindungsspaltung der C-H-Bindung entsteht ein Radikal im Substrat das im zweiten Schritt, dem sogenannten *rebound*-Schritt, an das $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-OH}$ -Intermediat bindet (Abbildung 7). Dies ergibt einen Fe^{III} -Alkohol-Komplex **7**, aus dem das hydroxylierte Produkt abdissoziieren kann.^{48,49}

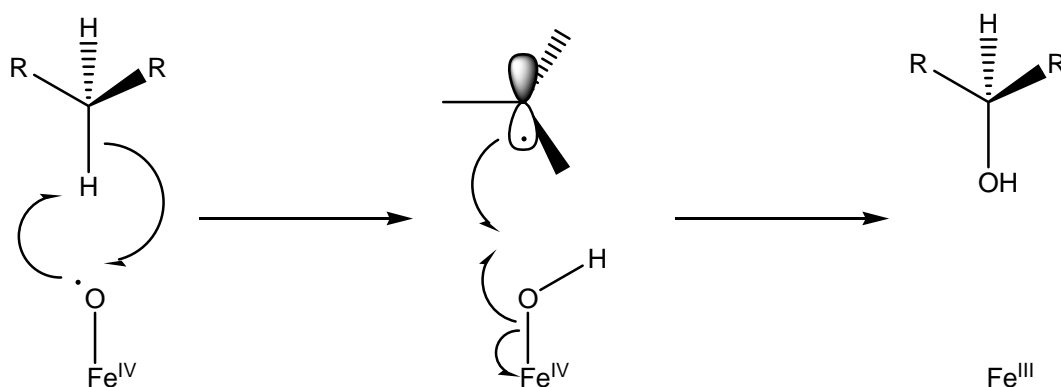


Abbildung 7: *Rebound*-Mechanismus der durch P450-Monooxygenasen katalysierten Hydroxylierungsreaktion.

Das intermediäre kohlenstoffzentrierte Radikal sollte unter Verlust der stereochemischen Information durch die Bindungsebene schwingen. Nur eine sehr schnelle Rekombination der Radikale kann die teilweise sehr hohe Enantioselektivität P450-vermittelter Oxidationen mit dem radikalischen Reaktionsmechanismus in Einklang bringen. Wahrscheinlich ist der entstandene Alkohol **7** vor seiner Abdissoziation noch kurzzeitig über das Sauerstoffatom an das Fe^{III} -Porphyrinsystem koordiniert.

Experimentelle Untersuchungen⁵⁰ und Dichtefunktionaltheorie (DFT)-Berechnungen⁵¹⁻⁵³ ergaben, dass die höchste Energiebarriere entlang dieses Reaktionspfades für den Schritt der Wasserstoffabstraktion beobachtet wird. Olsen *et al.* haben in einer aktuellen Arbeit die Aktivierungsenergien der Wasserstoffabstraktion verschiedener Substrate durch P450 mittels

DFT-Berechnungen untersucht.⁵⁴ Aus den mit DFT-Methoden berechneten Aktivierungsenergien konnte von Olsen *et al.* ein einfaches und prädiktives Modell zur Vorhersage der Aktivierungsenergien in Form einer Reaktivitätsreihe erstellt werden.⁵⁴ Den Kohlenstoffatomen konnten Aktivierungsenergien entsprechend ihrer Nachbaratome im Molekül zugeordnet werden: primäre Kohlenstoffatome (74 kJ/mol), sekundäre/tertiäre Kohlenstoffatome (61 kJ/mol), Kohlenstoffatome mit benachbarten sp^2 oder aromatischen Gruppen (53 kJ/mol), Ether/Thioether (47 kJ/mol) und Amine (30 kJ/mol). Die Aktivierungsenergien entsprechen der qualitativen Stabilität der Radikale.^{55,56} Neben einer radikalischen Reaktion, wie im Fall der aliphatischen Hydroxylierung, werden für andere Reaktionstypen, wie beispielsweise die aromatische Hydroxylierung, andere Mechanismen diskutiert.⁴⁸ DFT-Berechnungen von Bathelt *et al.* zur Aktivierungsenergie der aromatischen Hydroxylierung⁵⁷ ergaben Energien, die knapp unter denen der Hydroxylierung von C-H-Bindungen in Alkanen⁵⁸⁻⁶⁰ liegen. Dies steht im Einklang mit experimentell beobachteten Regioselektivitäten.⁶¹ Die Untersuchung von Substituenteneinflüssen auf die Hydroxylierung am Aromaten zeigte, dass sowohl elektronenziehende als auch elektronenschiebende Gruppen in der para-Position die Energiebarriere erniedrigen.⁶²

3.1.5 Redoxpartner der P450-Monooxygenasen

Entsprechend dem Katalysezyklus (Kapitel 3.1.4) ist zur Aktivierung des Sauerstoffs die sequentielle Übertragung zweier Elektronen auf das Eisenatom der Hämgruppe erforderlich. Cytochrom P450-Systeme sind gewöhnlich Multikomplex-Systeme, d. h. sie benötigen für ihre Reaktionen Cofaktoren wie NADPH oder NADH als Elektronenquelle und weitere Proteine zur Elektronenübertragung. Zur Elektronenübertragung zum richtigen Zeitpunkt im Reaktionszyklus dient ein fein abgestimmtes System von Oxidoreduktasen. Es sind unterschiedliche, für bestimmte P450-Monooxygenasen spezifische Elektronentransfersysteme mit unterschiedlichen Redoxpartnern beschrieben.⁶³

Gemeinsam ist allen Reduktasesystemen, dass die Reduktion des Hämeisens durch die Übertragung eines Elektronenpaars (Hydridions) von NAD(P)H auf eine NAD(P)H-Oxidoreduktase eingeleitet wird (Abbildung 8). Von dort fließen die Elektronen auf ein Elektronentransferprotein, das die Reduktion des Hämeisens der P450-Monooxygenase durch Eielektronenübertragungen katalysiert.

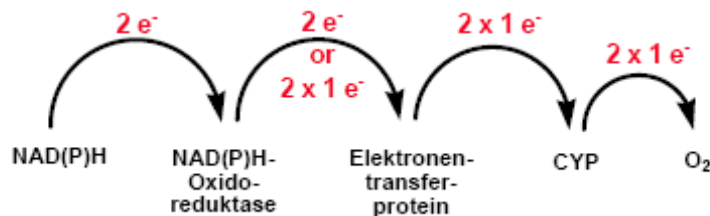


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Elektronentransfers in P450-Systemen.

In Abbildung 9 sind vier Klassen von Elektronentransportsystemen schematisch dargestellt. Die P450-Monooxygenasen der Klasse I (mitochondriale und die meisten bakteriellen P450; z. B. P450cam aus *Pseudomonas putida* CYP101A1) benötigen für den Elektronentransport zusätzlich zu einer NADPH- oder NADH-abhängigen Reduktase, die gewöhnlich FAD als prosthetische Gruppe trägt, ein 2Fe-2S-Ferredoxin-Enzym.⁶⁴ Der Redoxpartner der P450-Monooxygenasen der Klasse II (z. B. mikrosomale P450) ist eine FAD und FMN enthaltende membrangebundene Cytochrom P450-Reduktase (CPR).⁶⁵ Die P450 der Klasse III (z. B. CYP102A1) besitzen eine mit der P450-Domäne fusionierte FAD/FMN-Reduktasedomäne.⁶⁶ Die aminoterminalen Domäne enthält die Häm- und Substratbindungsstelle und in der carboxyterminalen Domäne, die als Reduktase fungiert, befinden sich FAD und FMN als prosthetische Gruppen und die NADPH-Bindungsstelle. Die P450-Monooxygenasen der Klasse IV enthalten eine über eine FMN-Domäne an die P450-Domäne fusionierte Eisen-Schwefel-NAD(P)H-Oxidase.⁶⁷ Außer diesen vier Klassen von P450-Redoxsystemen existiert eine ganze Reihe weiterer Wege des Elektronentransfers auf P450-Monooxygenasen.⁶⁸

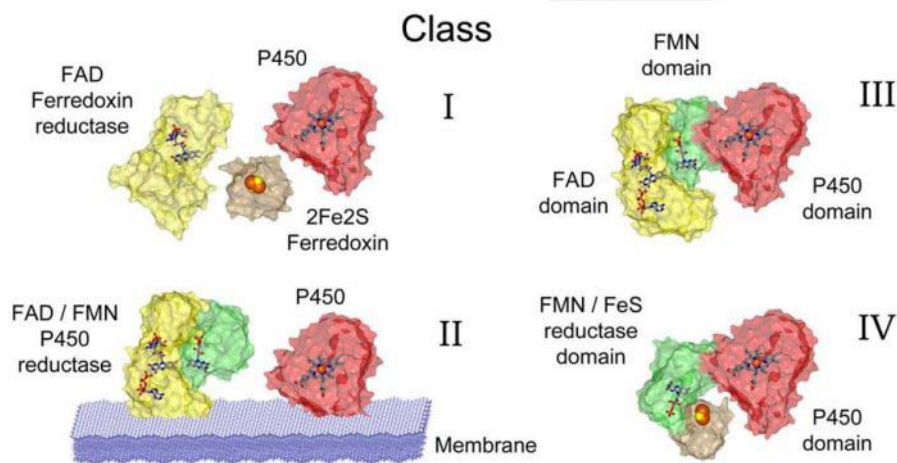


Abbildung 9: Verschiedene Elektronentransportsysteme von P450-Monooxygenasen nach S. K. Chapman (<http://www.chem.ed.ac.uk/chapman/p450.html>). Alle bekannten P450 sind Multikomplex-Systeme, die aus einer Häm- bzw. P450-Komponente mit zugehörigen Reduktase-Komponenten bestehen. Mitochondriale und die meisten bakteriellen P450 (Klasse I) sind Dreikomponentensysteme, bestehend aus einem P450, einem Ferredoxin und einer NADH-abhängigen, FAD-enthaltenden Ferredoxin-Reduktase. Die mikrosomalen P450 (Klasse II) sind Zweikomponentensysteme, die beide membrangebunden sind und aus einer NADPH-abhängigen Diflavin-Reduktase (FAD und FMN) und einer P450-Monooxygenase bestehen. Klasse III-P450, wie P450 BM3 aus *Bacillus megaterium*, sind Einkomponentensysteme und beinhalten dieselben Cofaktoren wie die Klasse II-P450, sie sind aber löslich und zu einer Polypeptidkette fusioniert. Klasse IV-P450, die kürzlich in *Rhodococcus* entdeckt wurden, sind ebenfalls lösliche Einkomponentenenzyme, die eine NADPH-abhängige, FMN-enthaltende Reduktase und ein Ferredoxin enthalten, die mit der Häm-domäne fusioniert sind.

3.1.6 Katalysierte Reaktionstypen und Substrate der P450-Monooxygenasen

Bemerkenswert ist sowohl die Diversität der von P450-Enzymen katalysierten Reaktionen, das breite Spektrum chemisch verschiedener Substrate, als auch ihre zum Teil hohe Selektivität und Spezifität. Neben Abbaureaktionen mit sehr breitem Substratspektrum wie bei den am xenobiotischen Metabolismus beteiligten P450, existieren beispielsweise im Stoffwechsel der Säuger hochselektive P450-Monooxygenasen, die an der Steroid- und Gallensäuresynthese beteiligt sind.

3.1.6.1 Katalysierte Reaktionstypen

Cytochrom P450-Enzyme gehören zu den vielseitigsten bekannten Redoxproteinen. Sie katalysieren mehr als 60 verschiedene chemische Reaktionen.⁶⁹ Neben der Hydroxylierung, Epoxidierung und Heteroatomoxidation (z. B. Sulfoxidation) kann die Oxidation zu instabilen Produkten (z. B. Halbacetalen) führen, die in Folgereaktionen zerfallen (Abbildung 10). So kommt es beispielsweise zur N- und O-Dealkylierung. Des Weiteren kommt eine Vielzahl weiterer, komplexerer P450-Reaktionen vor.^{70,71}

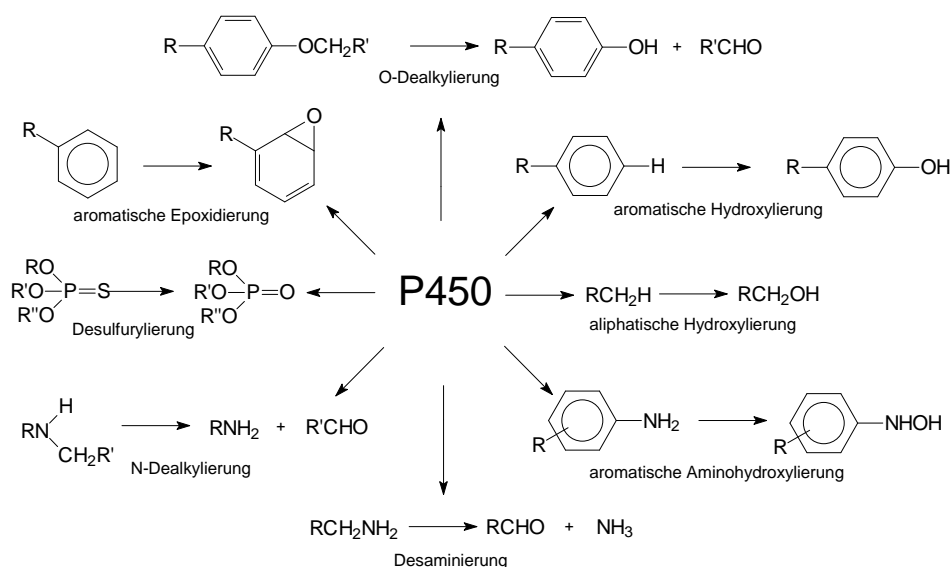


Abbildung 10: Übersicht über wichtige, von P450-Monooxygenasen katalysierte Reaktionen. Bei den Resten R, R' und R'' kann es sich um aromatische oder aliphatische Kohlenwasserstoffe, um Heteroaromaten oder Halogene handeln.

3.1.6.1.1 Oxidationen an Kohlenstoffatomen

P450-Enzyme hydroxylieren oder epoxidieren nichtaktivierte C–H-Bindungen und/oder C=C-Doppelbindungen in aliphatischen und aromatischen Systemen zu Alkoholen. Manche P450-Monooxygenasen können die im ersten Schritt gebildeten Alkohole zu Ketonen (bei sekundären Alkoholen) oder zu Aldehyden und sogar Carbonsäuren (im Falle von primären Alkoholen) oxidieren. Die selektive Hydroxylierung von nichtaktivierten C–H-Bindungen ist für die Biokatalyse⁷²⁻⁸¹ von besonderem Interesse. Diese Reaktionen sind chemisch häufig nicht möglich, jedoch synthetisch oft gewünscht.

3.1.6.1.2 Oxidationen an Stickstoff- und Schwefelatomen

P450-Enzyme oxidieren Aryl- und Acetylamine wie Benzidin, 4-Biphenylamin und 2-Acetaminofluoren am Stickstoffatom zu den korrespondierenden N-Hydroxiden, die häufig weiter zu Nitreniumionen reagieren (Abbildung 11).⁸²

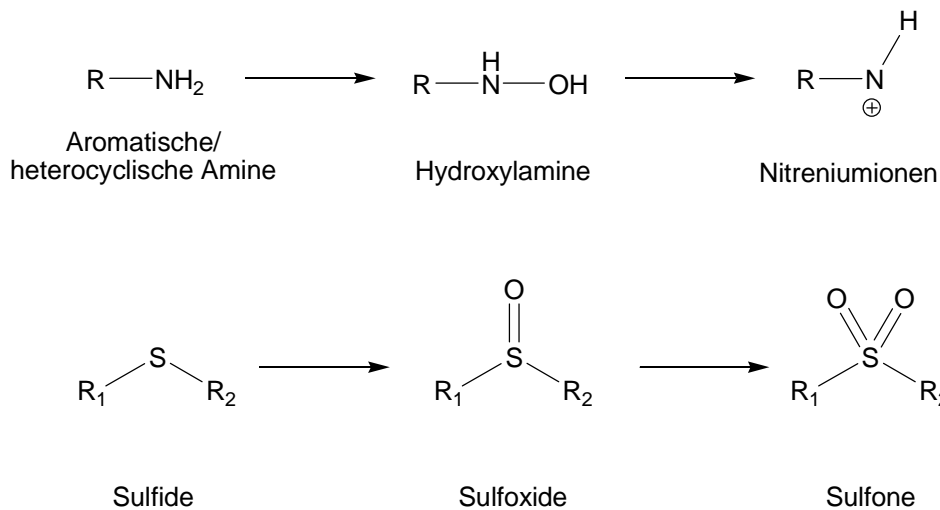


Abbildung 11: Durch P450-Monooxygenasen vermittelte Oxidationen an Stickstoff- und Schwefelatomen.

Aryl- und Alkylthioether werden durch P450-Monooxygenasen direkt am S-Atom zu Sulfoxiden oxidiert.⁸³ Die Oxidation bleibt jedoch häufig nicht auf der Stufe des Sulfoxids stehen; viele Sulfoxide werden zu den entsprechenden Sulfonverbindungen weiteroxidiert, die häufig cytotoxisch wirken.

3.1.6.1.3 Oxidative Dealkylierung

P450-Enzyme katalysieren die oxidative O-, N- und S-Dealkylierung.⁸⁴ Bei der Hydroxylierung von Kohlenstoffatomen in Nachbarstellung zu elektronenreichen Sauerstoff- oder Stickstoffatomen entstehen zunächst instabile Halbacetale (bzw. die analogen stickstoff- oder schwefelhaltigen Verbindungen), die in den zugrundeliegenden Alkohol (bzw. Amin oder Thiol) und einen Aldehyd zerfallen (Abbildung 12). Beispiele sind die O- und N-Dealkylierung von Dextromethorphan, Verapamil und Propafenon und die S-Dealkylierung von 6-Methylthiopurin zu 6-Methylpurin.

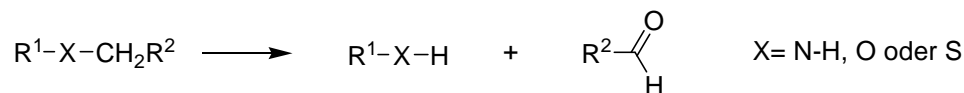


Abbildung 12: Durch P450-Monooxygenasen katalysierte oxidative Dealkylierung von sekundären Aminem, Ethern und Thioethern.

Neben der Dealkylierung an Heteroatomen ist auch die Demethylierung direkt an Kohlenstoffatomen beschrieben worden. So katalysieren die Sterol-14 α -Demethylasen der Familie CYP51 die oxidative Entfernung einer an ein quartäres Kohlenstoffatom gebundenen Methylgruppe. Bei dieser physiologisch wichtigen Reaktion handelt es sich um den ersten Schritt der Umwandlung von Lanosterol zu Cholesterol.⁸⁵

3.1.6.2 Substrate

Neben der breiten Diversität der Reaktionen, die von den P450-Enzymen katalysiert werden, verfügen die Enzyme auch über ein außergewöhnlich breites Substratspektrum^{61,86} chemisch verschiedener Verbindungen, welche sie zum Teil mit hoher Selektivität und Spezifität umsetzen.

Außer den am xenobiotischen Metabolismus beteiligten P450-Enzymen mit breitem Substratspektrum existieren im endogenen Stoffwechsel der Säuger hochselektive P450-Monooxygenasen, die an der Steroidsynthese beteiligt sind.

Gerade die am xenobiotischen Metabolismus beteiligten P450-Monooxygenasen besitzen zwar ein breites Substratspektrum, jedoch werden einzelne Substrate nicht von beliebigen Isoenzymen umgesetzt und je nach CYP-Isoenzym auch mit sehr unterschiedlicher Aktivität. Die Metabolisierung verläuft auch nicht willkürlich, sondern die Verbindungen werden meist selektiv oxidiert und zum Teil entstehen isoformspezifische Metabolite. Die in Abbildung 13 dargestellten Substrate von CYP3A4⁸⁷ verdeutlichen das breite Spektrum strukturell und chemisch verschiedener Substrate, die von einer Isoform umgesetzt werden können. Man erkennt aber auch die selektive Reaktion an spezifischen Positionen im Molekül.

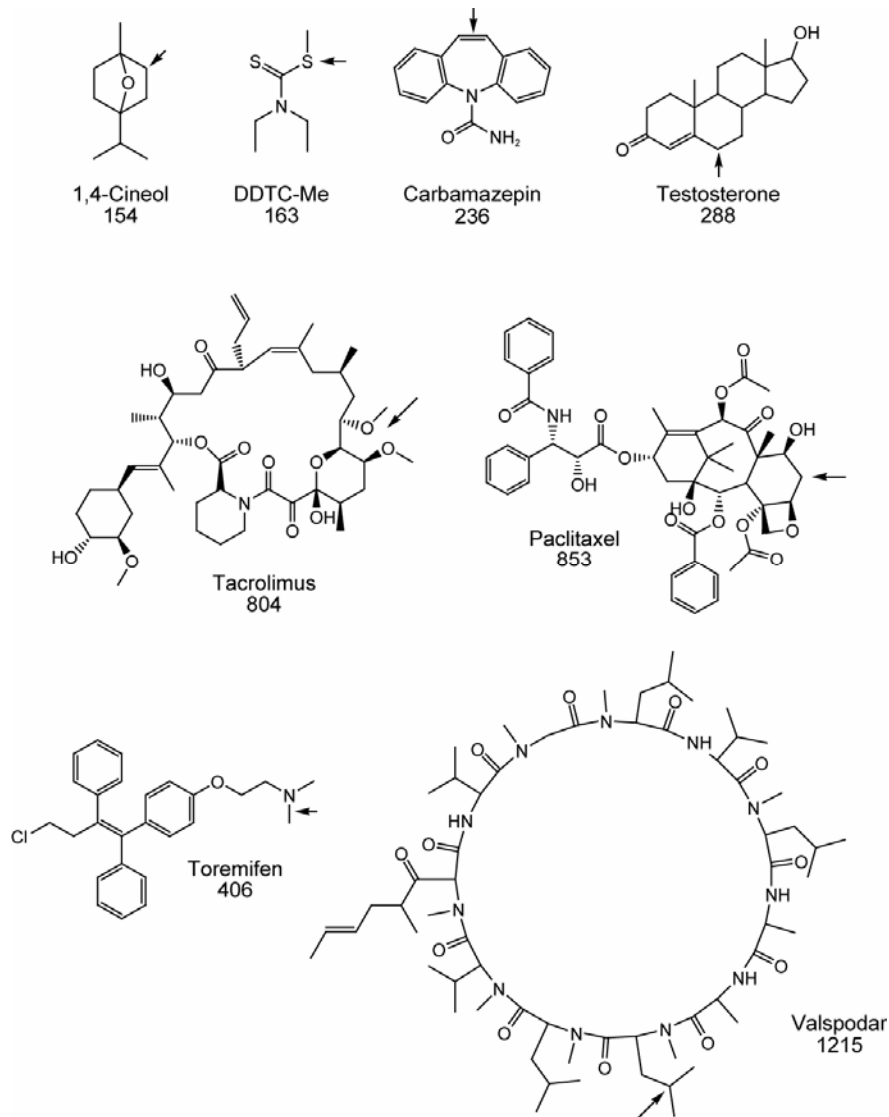


Abbildung 13: Substratspektrum von Cytochrom P450 3A4. Die Pfeile zeigen die Position des Substrates, die von CYP3A4 metabolisiert wird. Neben dem Namen ist die relative Molekülmasse der einzelnen Verbindungen angegeben.⁸⁷

Die isoformspezifische Metabolisierung eines Substrates ist in Abbildung 14 anhand des Dextromethorphan-Metabolismus dargestellt. Das Arzneimittel Dextromethorphan wird z. B. von CYP3A4 unter N-Demethylierung zu Methoxymorphinan metabolisiert. CYP2D6 hingegen katalysiert die O-Demethylierung von Dextromethorphan, wodurch dieses zu Dextrorphan metabolisiert wird. Anschließend kann in einem weiteren Metabolisierungsschritt der Metabolit Hydroxymorphinan gebildet werden. Dies geschieht durch N-Demethylierung von Dextrorphan mittels CYP3A4 bzw. durch O-Demethylierung von Methoxymorphinan mittels CYP2D6.⁸⁸

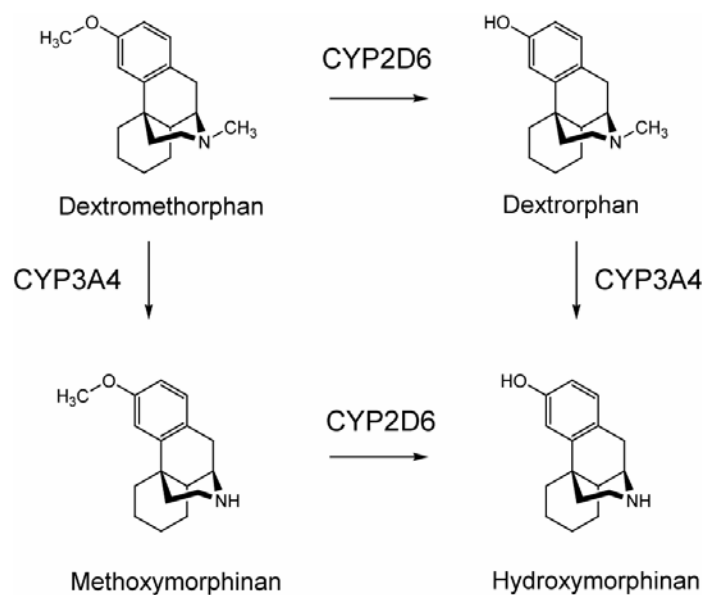


Abbildung 14: Metabolismus von Dextromethorphan.⁸⁸ CYP2D6 katalysiert bevorzugt die O-Demethylierung während CYP3A4 bevorzugt die N-Demethylierung katalysiert.

3.1.7 Vorkommen und Funktion in biologischen Systemen

Die Superfamilie der Cytochrom P450-Monooxygenasen ist eine der größten und funktionell diversesten Superfamilien. Cytochrom P450 kommen praktisch ubiquitär in allen Formen des Lebens vor und zeigen eine beeindruckende funktionelle Breite.³⁹ Cytochrom P450-Enzyme unterstützen den oxidativen, peroxidativen und reduktiven Metabolismus von endogenen und xenobiotischen Substraten, wie Umweltgiften, Agrochemikalien, Allelochemikalien, Steroiden, Prostaglandinen und Fettsäuren.

Die Superfamilie ist aufgrund der Genom-Sequenz-Projekte schnell angewachsen.⁶ Die Hauptquelle für Sequenzinformationen über P450 ist die Webseite *Nelson's Homepage* (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>), auf der aktuell über 6700 P450-Sequenzen aus den verschiedenen Reichen verzeichnet sind (Abbildung 15). Die Anzahl von Cytochrom P450 in verschiedenen Spezies ist sehr unterschiedlich. Sie reicht von drei P450 in *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe), 38 in *Neurospora crassa* (Pilz), 74 in *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm), bis zu 57 bei Menschen, 102 bei Mäusen und mehreren hundert in vielen Pflanzen. In *Escherichia coli* finden sich interessanterweise keine P450.

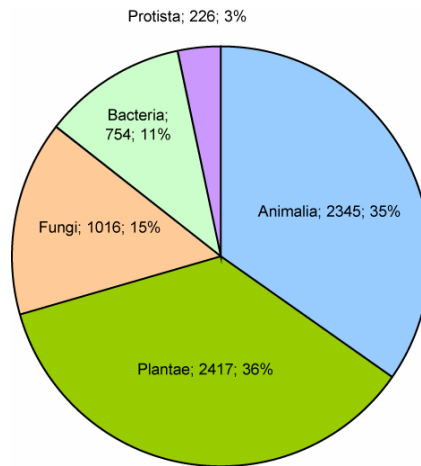


Abbildung 15: Aktuelle Verteilung der bekannten P450-Sequenzen (6758) über die biologischen Reiche. (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>; Stand: April 2007)

Mikrobielle P450 nehmen wichtige natürliche Funktionen ein und spielen eine wichtige Rolle in der biotechnologischen Anwendung.⁸⁹

In Bakterien (*Bacteria*) partizipieren CYPs⁹⁰ an der Biosynthese von Antibiotika wie Erythromycin und Mycinamicin und sie katalysieren Schlüsselreaktionen in der mikrobiologischen Bodensanierung (Bioremediation) durch den Abbau verschiedener Kohlenwasserstoffe.⁹¹ Die Möglichkeit, selektive Oxidationsreaktionen zu katalysieren, macht sie interessant für die Anwendung in der synthetischen Chemie.⁹²

Im Reich der Pilze (*Fungi*) wird z. B. CYP51 zur Synthese von Ergosterol benötigt. Darauf beruht die Entwicklung der ersten therapeutischen CYP-Inhibitoren. Azole (Triazole und Imidazole) werden als Fungizide und Antimykotika eingesetzt und wirken durch Hemmung von CYP51, wodurch das für den Pilz obligate Ergosterol nicht mehr in ausreichendem Maße gebildet werden kann.⁹³ Durch Veränderungen des Biosyntheseweges gelang die Produktion von Hydrocortison in einer Ganzzell-Biotransformation.⁹⁴

In Pflanzen (*Plantae*) haben Cytochrom P450-Enzyme einen weiten Funktionsbereich in der Katalyse von Reaktionen des Sekundärstoffwechsels, z. B. bei der Biosynthese von Phytohormonen, Blütenfarbstoffen und Phytoalexinen.⁹⁵⁻⁹⁷ P450 spielen eine Rolle im Lipidstoffwechsel, z. B. bei der Hydroxylierung von Fettsäuren⁹⁸ und in der Flavonoid-⁹⁹, Cumarin-¹⁰⁰, Alkaloid-¹⁰¹ und Terpenoid-Biosynthese, z. B. bei der Hydroxylierung von Geraniol, Limonen, Pinen und Campher.¹⁰²⁻¹⁰⁴

In den Arthropoden wie z. B. den Insekten (*Insecta*) haben Cytochrom P450-Monooxygenasen eine große Bedeutung im Stoffwechsel endogener Substanzen wie Juvenilhormonen, Ecdysteroiden und Pheromonen und damit beim Wachstum, der

Entwicklung und Fortpflanzung der Insekten.^{105,106} P450 spielen auch eine wichtige Rolle in der Detoxifikation exogener Substrate, beispielsweise natürlicher, pflanzlicher Allelochemikalien (Cumarine, Alkaloide, Nicotin) und synthetischer Insektizide.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ P450 haben eine wichtige Bedeutung im Gleichgewicht zwischen Pflanzen und Insekten, da sie von beiden angewandt werden, von den Pflanzen zur Synthese von Toxinen und von den Insekten zur Detoxifikation dieser Stoffe.⁹⁷

Säugetiere (*Mammalia*) exprimieren eine Vielzahl von P450-Enzymen. Die Proteine spielen eine zentrale Rolle im xenobiotischen Metabolismus,¹⁰⁹ in der Biosynthese von Steroiden,¹¹⁰ Gallensäuren,¹¹¹ Cholesterol,¹¹² dem Fettsäure-Metabolismus¹¹³ und der Umwandlung von Procarcinogenen und Promutagenen in schädliche genotoxische Verbindungen.¹¹⁴⁻¹¹⁹

3.2 Cytochrom P450 BM-3 (CYP102A1)

CYP102A1 (P450 BM-3) aus *Bacillus megaterium* wurde erstmals 1982 beschrieben.¹²⁰ CYP102A1 ist katalytisch autark, es handelt sich um ein lösliches Fusionsprotein, das aus einer einzigen Polypeptidkette mit einer P450-Häm-domäne mit 54 kDa und einer FAD/FMN-Reduktasedomäne mit 64 kDa besteht.¹²¹ Im Jahre 1993 gelang es, die P450-Domäne ohne Substrat⁸ und im Jahre 1997 mit Substrat¹²² zu kristallisieren. Aktuell sind in der *protein data bank* (PDB) 21 Kristallstrukturen von P450 BM-3 veröffentlicht (Tabelle 3). Neben Strukturen des Wildtyp-Enzyms mit¹²³ bzw. ohne^{8,33,122,124,125} Substrat und Strukturen verschiedener Mutanten mit¹²⁶ bzw. ohne¹²⁶⁻¹²⁹ Substrat ist eine Kristallstruktur der Häm-domäne im Komplex mit der FMN-Domäne der Reduktase veröffentlicht (Abbildung 16).³³ Des Weiteren gibt es in der PDB-Datenbank noch sechs bisher unveröffentlichte Einträge zu P450 BM-3, davon vier Strukturen von P450 BM-3 in Gegenwart von DMSO (PDB-Einträge 2J1M, 2J4S, 2J4V, 2J54).¹³⁰

Tabelle 3: Übersicht über die veröffentlichten Kristallstrukturen von CYP102A1.

	Wildtyp-Protein	Protein mit Mutation	Häm + FMN
ohne Substrat	6 Strukturen	10 Strukturen	1 Struktur
	1BU7, 1FAG, 1FAH, 2BMH, 2HPD, 2IJ2	1JME, 1POV, 1P0W, 1P0X, 1SMI, 1YQO, 1YQP, 1ZO4, 2IJ3, 2IJ4	1BVY
mit Substrat	2 Strukturen	2 Strukturen	
	1JPZ, 1ZO9	1SMJ, 1ZOA	

In der mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmten Struktur des Komplexes aus der P450 BM-3-Häm-domäne und der Reduktasedomäne konnte nur ein Teil der Reduktasedomäne aufgelöst werden. Nur die Struktur der FMN-Bindedomäne konnte bestimmt werden, die Struktur der restlichen Reduktasedomäne (der FAD-Bindedomäne) konnte nicht aufgelöst werden. Bis jetzt ist es nicht gelungen, das gesamte Protein zu kristallisieren. Allerdings wurde die Cytochrom-P450-Reduktase (CPR) der Ratte¹³¹ (PDB-Eintrag 1AMO), die ebenfalls FAD und FMN enthält, strukturell charakterisiert. Aufgrund der hohen Homologie beider Reduktasen lässt sich annehmen, dass die Strukturen und damit auch der katalytische

Mechanismus beider Enzyme äußerst ähnlich sind. Die beiden Domänen der CPR, die FMN-Bindedomäne und die FAD-Bindedomäne, sind durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden. Eine Überlagerung der FMN-Domäne der CPR mit der FMN-Domäne von P450 BM-3 führt zu einer Überlappung der CPR-FAD-Domäne mit der P450 BM-3-Häm-domäne. In der Struktur von P450 BM-3 liegt also offensichtlich eine andere Konformation der FAD-Domäne vor.

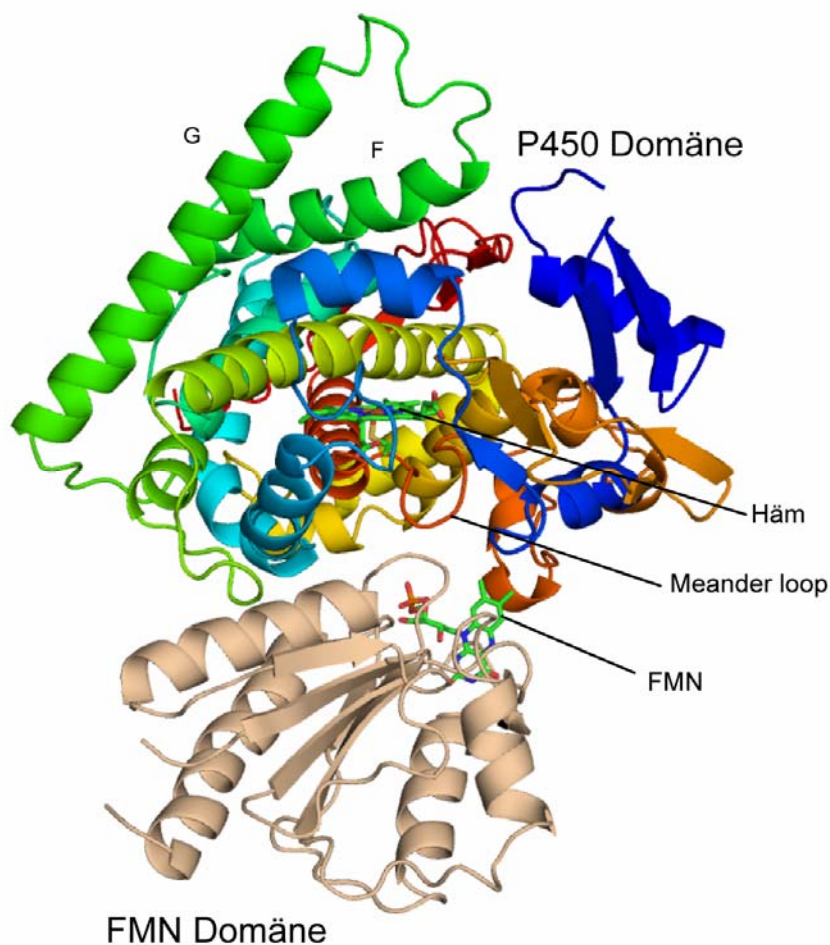


Abbildung 16: Kristallstruktur des Komplexes aus der Häm-domäne und der FMN-Bindedomäne von P450 BM-3 (PDB-Eintrag 1BVY).³³ Die P450-Domäne ist von blau (N-Terminus) nach rot (C-Terminus) eingefärbt. Die proximale FMN-Domäne ist beige gefärbt.

Als natürliche Substrate von CYP102A1 gelten Fettsäuren. Das Enzym katalysiert die subterminale Oxidation gesättigter und ungesättigter Fettsäuren mit einer Kettenlänge von zwölf bis 20 Kohlenstoffatomen. Im Vergleich zu P450-Fettsäurehydroxylasen eukaryotischen

Ursprungs ist CYP102A1 um den Faktor 100 bis 1000 aktiver. Außerdem ist Cytochrom P450 BM-3 wasserlöslich und besitzt eine relative hohe Stabilität. Dies alles macht das Enzym für technische Anwendungen der Enzymkatalyse in der pharmazeutischen und chemischen Industrie interessant.

Es wurden verschiedene Methoden des *protein-engineering* verwendet, um Eigenschaften wie Stabilität, Aktivität, Selektivität oder Spezifität der CYP102A1 durch Mutagenese zu verändern.¹³² Durch rationales Proteindesign und gerichtete Evolution konnte die Substratspezifität von P450 BM-3 verändert werden. Es gelang, die Spezifität gegenüber Fettsäuren hin zu kürzeren Kettenlängen der Fettsäuren zu verändern^{76,77} und das Substratspektrum auf die nicht natürlichen Substrate Naphthalin, n-Oktan, 8-Methylchinolin⁷⁹ und verschiedene polycyclische Aromaten¹³³ zu erweitern. Durch gerichtete Evolution mit Methoden wie Zufallsmutagenese (*error-prone PCR*) oder Rekombination von Genfragmenten (*gene shuffling*) konnte die Enzymaktivität^{78,134} und -stabilität¹³⁵ von P450 BM-3 erfolgreich erhöht werden. Des Weiteren konnte die Stabilität und Aktivität von P450 BM-3 in polaren organischen Lösungsmitteln gesteigert werden.¹³⁶ Durch Kombination von *error-prone PCR* and ortsgerichteter Mutagenese konnten P450 BM-3-Varianten erzielt werden, die unverzweigte Alkane der Kettenlänge C3 bis C10 regio- and enantioselektiv hydroxylieren können.⁷³

3.3 Humane P450-Monooxygenasen

Das menschliche Genom enthält 59 CYP-Gene und 61 Pseudogene (Stand: 24.01.2007; <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). Die Mehrzahl dieser Gene codiert für Proteine, die am Stoffwechsel und der Biosynthese endogener Substanzen wie Steroide,¹¹⁰ Gallensäuren,¹¹¹ Fettsäuren,¹¹³ Eicosanoide¹³⁷ und Vitamin D3¹³⁸ beteiligt sind. 15 Proteine sind hauptsächlich am Metabolismus der Xenobiotika beteiligt, 14 hauptsächlich am Metabolismus der Sterole (einschließlich Gallensäuren), vier oxidieren fettlösliche Vitamine und neun sind am Metabolismus der Fettsäuren und Eicosanoide beteiligt.¹³⁹ Die Substrate der restlichen 15 P450 sind noch unbekannt (Tabelle 4). Die 15 am Metabolismus von Arzneistoffen und anderen Xenobiotika beteiligten CYPs sind in der Pharmakologie und in der Arzneimittelentwicklung von Bedeutung. Viele der am xenobiotischen Metabolismus beteiligten Enzyme können auch Procarcinogene aktivieren.¹¹⁶

Tabelle 4: Klassifikation der humanen P450-Enzyme nach Substratklassen¹³⁹

Sterole	Xenobiotika	Fettsäuren	Eicosanoide	Vitamine	Unbekannt
1B1	1A1	2J2	4F2	24	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	26A1	2R1
7B1	2A6	4B1	4F8	26B1	2S1
8B1	2A13	4F12	5A1	27B1	2U1
11A1	2B6		8A1		2W1
11B1	2C8				3A43
11B2	2C9				4A22
17	2C18				4F11
19	2C19				4F22
21A2	2D6				4V2
27A1	2E1				4X1
39	2F1				4Z1
46	3A4				20
51	3A5				26C1
	3A7				27C1

Das Fehlen eines CYPs oder das Auftreten von Mutationen in einem an der Synthese von endogenen Substanzen wie Steroiden oder Vitaminen beteiligten CYPs kann zu einer Erbkrankheit führen und damit dramatische Auswirkungen haben.¹⁴⁰ Ein Mangel an CYP21 verursacht beispielsweise das Adrenogenitale Syndrom (AGS), auch als angeborene Nebennierenhyperplasie bezeichnet. Dabei handelt es sich um eine angeborene Störung der Steroidbiosynthese der Nebennierenrinde, verursacht durch einen erblich bedingten

Enzymdefekt. In über 95 % aller Fälle liegt ein Defekt des Enzyms 21-Hydroxylase (CYP21) vor, das an der Biosynthese von Cortisol und Aldosteron aus Cholesterol beteiligt ist.¹⁴¹ Einige weitere Krankheiten stehen im Zusammenhang mit Störungen in verschiedenen humanen CYPs, unter anderem Glaukom (CYP1B1)¹⁴² und Rachitis (CYP27B1).¹⁴³

Die 15 humanen CYPs, die am xenobiotischen Metabolismus beteiligt sind, kommen aus den Familien CYP1, CYP2 und CYP3. Die Mehrzahl von ihnen befindet sich im endoplasmatischen Retikulum der Leber. Im menschlichen Körper spielen sie eine zentrale Rolle in der Phase 1 des Arzneimittelmetabolismus. Unterschiede in der Expression der am xenobiotischen Metabolismus beteiligten CYPs haben keine so dramatischen Auswirkungen wie die Veränderungen bei den P450, die an der Biosynthese endogener Substanzen beteiligt sind. Dennoch kann die Expression großen Einfluss auf die Effektivität einer Therapie und die Arzneimittelnebenwirkungen haben.¹⁰⁹

Manche P450 sind etablierte *targets* der rationalen Wirkstoffforschung in der Arzneimittelentwicklung. CYP19A1 katalysiert die dreistufige Oxidation von Androgenen zu Östrogenen. Eine Verringerung der Expression von CYP19 ist bei östrogenabhängigen Tumoren wünschenswert.¹⁴⁴ Eine weiteres interessantes *target* ist CYP3A4 als hauptsächlich vorkommendes P450-Isoenzym der Leber und des Dünndarms. Es wird an der Entwicklung effektiver und sicherer Inhibitoren von CYP3A4 gearbeitet, um die Bioverfügbarkeit teurer Arzneimittel wie HIV-Protease-Inhibitoren zu erhöhen.

P450 spielen eine Rolle bei der Aktivierung von Procarcinogenen.¹¹⁴ CYP1A2, CYP2A6 und CYP1B1 aktivieren viele heterocyclische Amine, die bei der Pyrolyse von Lebensmitteln entstehen. Eine epidemiologische Studie zeigte Zusammenhänge zwischen hoher CYP1A2-Aktivität, häufigem Genuss von stark gegrilltem Fleisch und dem Ansteigen des Darmkrebsrisikos.¹¹⁵ CYP2A6, exprimiert im Gehirn und Hals, aktiviert Nitrosamine.¹¹⁸ Das in verschiedenen Geweben (Brust, Prostata, Eierstock) exprimierte CYP1B1 aktiviert zahlreiche Procarcinogene *in vitro*,^{116,119} beispielsweise Benzpyren.¹¹⁷

Säugetiere exprimieren viele P450 gleichzeitig in einer großen Anzahl von Geweben. Man konnte CYPs in nahezu allen Organen nachweisen, unter anderem in der Leber, Niere, Lunge, Nebenniere, den Keimdrüsen und dem Gehirn.¹⁴⁵ Besonders hohe Konzentrationen finden sich in der Leber, im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge. CYPs finden sich nicht nur in verschiedenen Zelltypen und Gewebearten, sondern auch in verschiedenen subzellulären Kompartimenten. Generell sind alle Säugetier-CYPs membrangebunden. Die zwei Hauptgruppen sind mikrosomale P450, die im endoplasmatischen Retikulum vorkommen, und mitochondriale P450, die in der inneren Membran der Mitochondrien vorkommen.

Mikrosomale Enzyme sind durch eine N-terminale Transmembranhelix in der Membran verankert.¹⁴⁶ Circa 90 % der CYP-Enzyme in der Leber befinden sich in der Membran der Mikrosomen, die restlichen in Mitochondrien.¹⁴⁷ Mitochondriale P450 sind in die Matrix der inneren mitochondrialen Membran orientiert. Fünf humane CYPs sind hauptsächlich in Mitochondrien lokalisiert (CYP11A1, 11B1, 11B2, 24A1, 27A1, 27B1) und an der Steroid- und Vitamin D₃-Biosynthese beteiligt. Die genaue Organisation der Cytochrom P450-Enzyme in der Membran des endoplasmatischen Retikulums ist nicht bekannt. Es gibt aber Hinweise darauf, dass zumindest einige P450 oligomere Komplexe bilden.^{148,149} Dies kann *in vivo*-Untersuchungen zufolge einen Einfluss auf die Substrataffinität und die Interaktion mit der P450-Reduktase haben.¹⁵⁰ Die P450-Enzyme im endoplasmatischen Retikulum interagieren alle mit einem einzelnen Flavoprotein, der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase (CPR), als Elektronendonator. Zusätzlich zu P450 und Reduktase wird manchmal, abhängig von Substrat oder Isoenzym, Cytochrom b₅ benötigt. Cytochrom b₅ kann beim Übertragen des zweiten Elektrons von NADPH zu P450 wichtig sein oder einen Beitrag zur allosterischen Regulation der Substratbindung an P450 leisten.^{151,152} Die mitochondrialen P450 benutzen eine Elektronentransportkette mit dem Eisen-Schwefel-Protein Adrenodoxin und dem Flavoprotein Adrenodoxin-Reduktase.

3.3.1 Humane P450-Enzyme im Arzneimittelmetabolismus

Bei den durch arzneimittelmetabolisierende Enzyme katalysierten Biotransformationsreaktionen wird zwischen Phase-1- und Phase-2-Reaktionen unterschieden. Phase-1-Reaktionen sind Funktionalisierungsreaktionen. Sie führen eine funktionelle Gruppe, z.B. durch Hydroxylierung, in das unpolare Molekül ein, oder legen entsprechende funktionelle Gruppen frei. Wichtige Phase-1-Reaktionen sind Oxidation, Reduktion, Hydrolyse und Hydratisierung. Phase-2-Reaktionen sind Konjugationsreaktionen, bei denen funktionelle Gruppen mit sehr polaren, negativ geladenen endogenen Molekülen (z. B. Glukuronsäure) gekoppelt werden. Wichtige Phase-2-Reaktionen sind die Glukuronidierung (mittels UDP-Glukuronosyltransferasen), Sulfatierung (mittels Sulfotransferasen), Methylierung, Acetylierung sowie die Konjugation mit Aminosäuren und Glutathion.

Cytochrom P450-Monooxygenasen sind die wichtigsten arzneimittelmetabolisierenden Enzyme. Sie sind für 75 % des Phase-1-Metabolismus beim Menschen verantwortlich. P450 katalysieren die Hydroxylierung von lipophilen Verbindungen. Die dabei entstehenden hydrophileren Verbindungen können anschließend leichter aus dem Körper exkretiert werden.

Die Aufnahme von Arzneimitteln in den menschlichen Körper und deren Ausscheidung werden zum Großteil durch die physikochemischen Eigenschaften der Moleküle bestimmt. Nach Aufnahme eines Arzneistoffes erfolgt die Resorption im Gastrointestinaltrakt. Dabei müssen die Verbindungen die Lipidschicht der Membranen überwinden. Dazu benötigen sie lipophile Eigenschaften. Die anschließende Ausscheidung erfolgt über die Niere. Dazu müssen hydrophobe Substrate zuvor vom Körper zu hydrophileren metabolisiert werden.

Die CYPs der Familien 1-3 sind für 70-80 % des Phase-1-Metabolismus der klinisch verwendeten Arzneimittel verantwortlich und sind am Metabolismus einer großen Anzahl von Xenobiotika beteiligt. Die wichtigsten am Arzneimittelmetabolismus beteiligten CYPs sind CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4.¹⁵³ Die Leber ist das Organ mit dem höchsten P450-Enzymgehalt des Organismus. Sie enthält 90-95 % der P450-Enzyme. 60-65 % des P450-Gehalts der Leber entfallen auf Enzyme, die den Arzneimittelmetabolismus katalysieren. Mit durchschnittlich 30 % des P450-Gehaltes ist die CYP3A-Subfamilie das wichtigste Cytochrom P450-Enzym. Die Isoform CYP1A2 macht etwa 15 %, die CYP2C-Subfamilie etwa 30 %, CYP2E1 etwa 10 % und CYP2A6, 2B6 und CYP2D6 jeweils etwa 5 % aus. Mindestens 50 % aller therapeutisch eingesetzten Arzneistoffe sind CYP3A-Substrate und ungefähr 20 % werden durch CYP2D6 metabolisiert. (Abbildung 17)

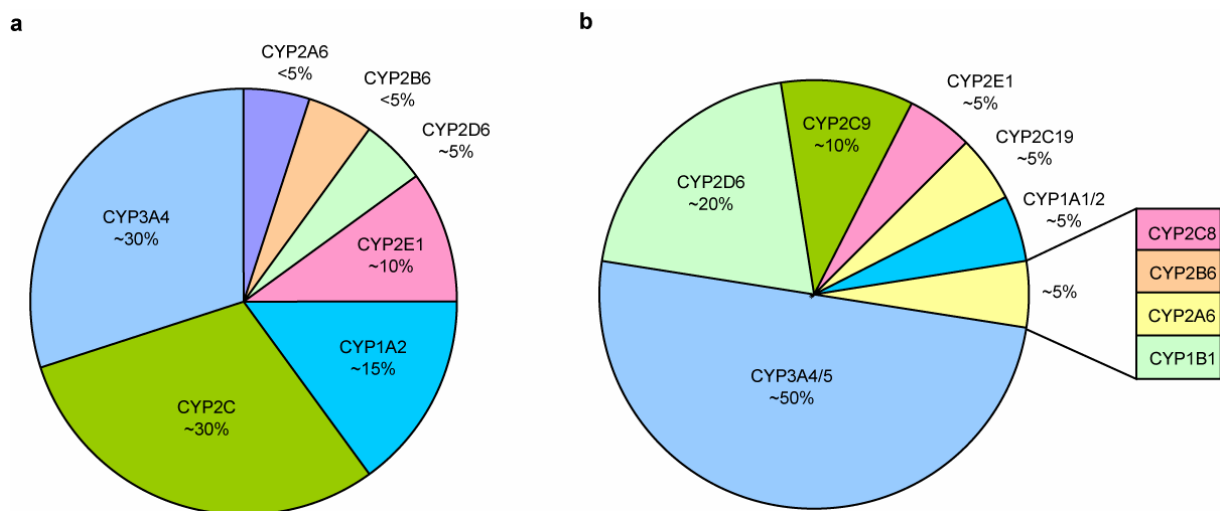


Abbildung 17: **a** Anteil der einzelnen P450-Enzyme am Gesamtgehalt der den Arzneimittelmetabolismus katalysierenden P450-Enzyme der Leber.¹⁵⁴ **b** Beteiligung der häufigsten humanen P450 am Phase-1-Metabolismus der im Jahre 2003 vermarkteten Arzneimittel.¹⁵⁵

3.3.2 *In silico* Untersuchungen des Arzneimittelmetabolismus

Die Wirkstoffforschung wurde in den letzten Jahren durch die Einführung von kombinatorischer Chemie, *Genomics*- und *Proteomics*-Technologien sowie die Bioinformatik grundlegend verändert. Die Möglichkeiten, neue *targets* für Krankheiten zu identifizieren und zu validieren haben sich dadurch deutlich verbessert. Die Entwicklung neuer Strategien und Technologien wie beispielsweise *in vitro*-basierter *high-throughput screening* (HTS)-Methoden¹⁵⁶ hat zu einem enormen Anstieg der Anzahl chemischer Verbindungen geführt, die durch die Pipeline der Wirkstoffforschung der pharmazeutischen Industrie laufen.¹⁵⁷ Die hohe Anzahl neuer Strukturen, die jedes Jahr entstehen, hat jedoch nicht zu dem erwarteten Anstieg neuer Arzneimittel auf dem Markt geführt. Nur ein Bruchteil der Wirkstoffkandidaten kann zu einem marktfähigen Medikament entwickelt werden. Dies führt zu einem zunehmenden Anstieg der Entwicklungskosten neuer Arzneimittel, die aktuellen Studien zufolge pro Medikament 800 Millionen bis 2 Milliarden US\$ betragen.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ Der Hauptgrund für den Entwicklungsstopp von Wirkstoffen sind ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften (Abbildung 18).¹⁶¹

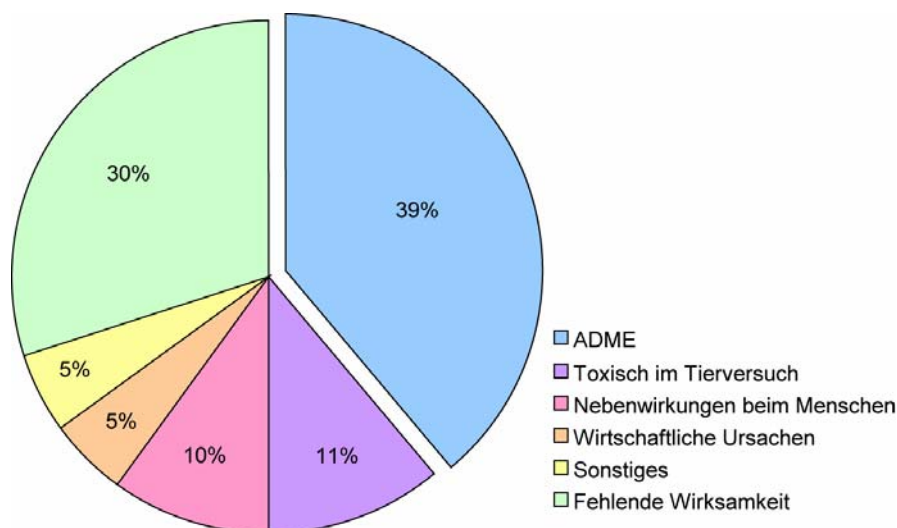


Abbildung 18: Ursachen für den Abbruch der Entwicklung neuer Wirkstoffe. Hauptursache sind ungünstige ADME-Eigenschaften.¹⁶¹

Aus diesen Gründen ist die Untersuchung der pharmakokinetischen Eigenschaften eines neuen Wirkstoffes zum Paradigma der Wirkstoffforschung geworden.¹⁶² Die pharmakologische Wirkung und Aktivität eines neuen Wirkstoffes (Pharmakodynamik) kann noch so hoch sein, wenn die pharmakokinetischen Eigenschaften des Substrates nicht

ausreichend sind. Eine Substanz muss vom Körper aufgenommen werden (*Absorption*), an die richtigen Stellen des Körpers verteilt werden (*Distribution*), in zweckmäßiger Weise metabolisiert werden (*Metabolism*) und schließlich eliminiert werden (*Elimination*). Die Untersuchung dieser ADME-Eigenschaften (*Absorption*, *Distribution*, *Metabolism* und *Elimination*) der Wirkstoffkandidaten wird zunehmend in ein frühes Stadium der Wirkstoffentwicklung integriert. Nach Einführung experimenteller *high-throughput in vitro*-Aktivitätsassays werden zunehmend computergestützte Methoden zum *in silico*-screening von virtuellen Substratbibliotheken hinsichtlich wichtiger ADME-Eigenschaften eingesetzt.¹⁶³⁻¹⁶⁷ Durch *in silico*-ADME-Untersuchungen sollen Wirkstoffe mit ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften bereits in einem frühen Stadium der Arzneimittelentwicklung erkannt und vermieden werden. Die Aufwendungen für *in silico*-Ansätze werden in den nächsten zehn bis 15 Jahren voraussichtlich bis zu 15 % der R&D-Aufwendungen ausmachen.¹⁶⁸

Um eine ADME-Analyse von *in silico*-Bibliotheken vor der chemischen Synthese ihrer Substrate zu ermöglichen, werden computergestützte Filter zur Vorhersage von pharmakokinetischen Eigenschaften benötigt.^{165,169,170} Durch das Entwerfen von virtuellen Substratbibliotheken und dem Testen dieser durch *in silico*-Modelle für ADME-Eigenschaften, kann eine privilegierte Bibliothek mit einem bevorzugten pharmazeutischen Profil und akzeptabler pharmakologischer Wirksamkeit mit Hilfe des Computers ausgewählt und anschließend synthetisiert werden. Dieses Vorgehen führt zu einer wissensbasierten Synthese von weniger Verbindungen, mit verbesserten Eigenschaften, als es durch serielle oder parallele Synthesen erreicht werden kann (Abbildung 19).

Ein zentraler Schritt im ADME-Ablauf ist der Metabolismus des Wirkstoffs. Der Metabolismus ist eine der kompliziertesten pharmakokinetischen Eigenschaften eines Wirkstoffes und sein Verständnis und die Vorhersage stellt eine besondere Herausforderung dar.¹⁷¹ Der Metabolismus eines Wirkstoffes beruht nicht nur auf seinen physikochemischen Eigenschaften, sondern ebenso auf den Eigenschaften der arzneimittelmetabolisierenden Enzyme. An dem Detoxifikationsvorgang ist eine Vielzahl von Enzymen beteiligt und einige der beteiligten Enzyme weisen Polymorphismen auf. Für Oxidationsreaktionen in der Phase-1 des Metabolismus spielen die Cytochrom P450-Isoenzyme eine zentrale Rolle¹⁰⁹ und die pharmazeutische Industrie konzentriert sich auf die Untersuchung des P450-abhängigen Metabolismus potentieller Wirkstoffkandidaten.¹⁷²

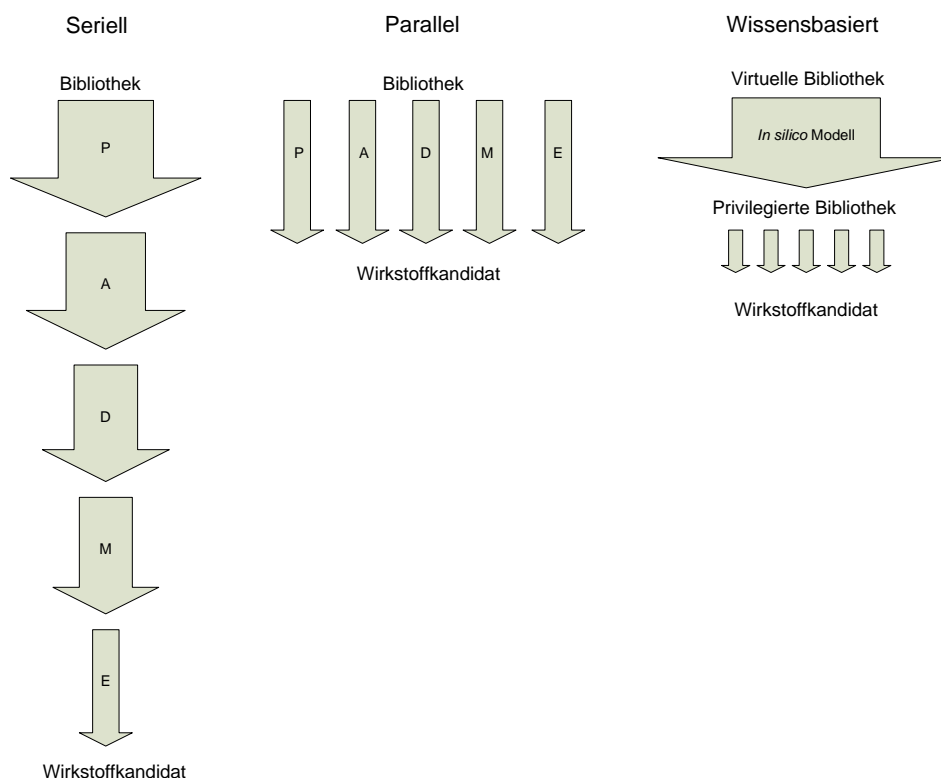


Abbildung 19: Bei der seriellen Auswahl der Wirkstoffkandidaten werden die pharmakologischen Eigenschaften (P) und die ADME-Eigenschaften nacheinander getestet. Bei der parallelen Auswahl werden die pharmakologischen und ADME-Eigenschaften gleichzeitig getestet und das komplette Wirkstoffprofil kann zur Auswahl des Kandidaten verwendet werden. Bei der wissensbasierten Anordnung wird eine virtuelle *in silico*-Bibliothek zunächst durch *in silico*-Modelle auf die pharmakologischen und ADME-Eigenschaften getestet. Basierend auf den Ergebnissen des virtuellen *screening* wird eine privilegierte Bibliothek synthetisiert, welche dann experimentell getestet wird.

Dabei müssen insbesondere die Stabilität der Wirkstoffmoleküle gegenüber den arzneimittelmetabolisierenden Enzymen, die Bildung toxischer Metabolite und Arzneimittel-Wechselwirkungen berücksichtigt werden. Wenn die Positionen des Substrates bekannt sind, an denen die Metabolisierung stattfindet, können labile Substrate stabilisiert werden und die Bildung toxischer Metabolite kann durch das Entfernen, Austauschen oder Schützen der entsprechenden Atomgruppe des Substrates verhindert werden. Ein *in silico*-Modell des Metabolismus kann bei der Optimierung von Leitstrukturen und im virtuellen *screening* eingesetzt werden, um den Effekt von Bioisosteren¹⁷³ oder Schutzgruppen vorherzusagen. Außerdem sind Kenntnisse über die Metabolismusposition essentiell für das Design von *prodrugs*, bei denen die pharmakologisch aktive Form des Wirkstoffs erst durch Metabolisierung im Körper freigesetzt wird.^{174,175}

Auch in der Analytik von Metaboliten sind *in silico*-Methoden von zunehmender Bedeutung. Die experimentelle Identifikation der Metabolite findet normalerweise mittels Flüssigchromatographie / Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS/MS) statt.^{176,177} Diese Technik erlaubt jedoch nur die Identifikation der Region des Moleküls, an der die Reaktion stattgefunden hat. Durch die Kombination der experimentellen Analytikmethoden mit der *in silico*-Vorhersage des Metabolismus könnten darüber hinaus einzelne Atome identifiziert werden, an denen die Reaktion stattgefunden hat.¹⁷⁸

Der *in vivo*-Metabolismus eines Wirkstoffes ist äußerst komplex. Die *in silico*-Vorhersage von *in vivo*-Metaboliten ist eine sehr interessante Aufgabenstellung, die aber aufgrund der großen Anzahl der beteiligten Stoffwechselwege eine Aufgabe für umfassende Expertensysteme wie regelbasierte Algorithmen ist.¹⁷⁹ In der Anfangsphase der Wirkstoffentwicklung konzentriert man sich auf *in vitro*-Assays tierischer und menschlicher Mikrosomen. Deshalb wäre eine *in silico*-Methode zum Verständnis des *in vitro*-Metabolismus eine große Hilfe für den Entwicklungsprozess neuer Wirkstoffe. Aufgrund der Bedeutung des Cytochrom P450-Enzymsystems für den Phase-1-Metabolismus von Arzneistoffen ist die Untersuchung dieses Enzymsystems ein wichtiger erster Schritt für das Verständnis des Gesamtmetabolismus.

In silico-Methoden zur Untersuchung des Metabolismus von Substraten können in zwei Klassen eingeteilt werden: spezifische (lokale) und umfassende (globale) Methoden.^{174,180} Unter globalen Methoden versteht man umfassende Expertensysteme, die das Ziel haben, den kompletten Metabolismus eines bestimmten Substrates darzustellen. Spezifische Systeme wenden sich an spezifische Enzyme oder spezifische Reaktionen des Metabolismus.

Globale Methoden durchsuchen z. B. bestehende Datenbanken (wissensbasierte Systeme) um Informationen über den Metabolismus bekannter Verbindungen mit ähnlichen Strukturen oder funktionellen Gruppen zu erhalten.¹⁷⁹ Es sind verschiedene regelbasierte Expertensysteme wie MetabolExpert, META und METEOR bekannt.^{174,181}

Spezifische Methoden sind prinzipiell für jegliches chemische System anwendbar. Jedes Modell behandelt aber nur eine Reaktion oder einen katalytischen Mechanismus. In der Literatur finden sich verschiedene Ansätze für die Untersuchung des P450 katalysierten Metabolismus.^{51,182-186} Die meisten der bisherigen Untersuchungen basieren auf quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR *Quantitative Structure-Activity Relationship*), Pharmakophormodellen, strukturbasierten (*docking*), reaktivitätsbasierten oder regelbasierten Methoden.¹⁷⁴ Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSARs) können auf strukturellen, physikochemischen und / oder quantenmechanischen Eigenschaften

basieren.^{187,188} Korrelationsanalysen werden mit Hilfe von statistischen Methoden wie multilinearen Regressionsanalysen, multivariaten Analysen und Methoden des unüberwachten Lernens (*unsupervised learning*) wie z. B. neuronalen Netzen oder genetischen Algorithmen, durchgeführt.^{189,190}

Aus dreidimensionalen QSAR (3D-QSAR)-Methoden wie z. B. CoMFA-Analysen (*Comparative Molecular Field Analysis*)^{191,192} können Pharmakophore erhalten werden. Pharmakophore erlauben Vorhersagen für neue Substrate, die dem Trainingsdatensatz strukturell verwandt sind. Das Programm GRID¹⁹³ benutzt beispielsweise molekulare Interaktionsfelder, um Parameter zu identifizieren, die die Ligand-Protein-Interaktionen beschreiben.

Molekulare *docking*-Methoden in Kombination mit entsprechenden *scoring*-Funktionen können zur Untersuchung von Ligand-Protein-Interaktionen benutzt werden. Es wurde versucht, mittels *docking*-Methoden die Position der Metabolisierung von CYP2D6-Substraten vorherzusagen.¹⁹⁴

Mit quantenmechanischen (QM) Berechnungen können Korrelationen zwischen dem Metabolismus und den Energiebarrieren der homolytischen C–H-Bindungsspaltung aufgestellt werden.⁵⁶

3.3.3 Ursachen für inter- und intraindividuelle Unterschiede im Arzneimittelmetabolismus

Die Kinetik und Dynamik eines Arzneistoffes im menschlichen Körper wird von Umweltfaktoren wie Rauchen, Alkoholkonsum und Ernährung, physiologischen Veränderungen wie Krankheiten und Entzündungen, Alter, Geschlecht, ethnischer Herkunft, Arzneimittelinteraktionen und genetischen Faktoren bestimmt. Der Hauptort der Variation ist der Arzneimittelabbau in der Leber. Dieser variiert nicht nur mit dem Alter und Geschlecht, sondern kann auch durch Arzneimittelinteraktionen (Enzyminhibition oder –induktion) oder genetische Polymorphismen arzneimittelabbauender Enzyme und Transporter verändert sein.

3.4 Pharmakogenetik - Genetische Polymorphismen

Der 1959 von dem Humangenetiker Friedrich Vogel geprägte Begriff der Pharmakogenetik umfasst genetische Defekte, die zu veränderten Arzneimittelreaktionen führen. Wenn diese Veränderungen bei mehr als 1 % der Bevölkerung auftreten, spricht man von Polymorphismen oder *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphism*). Die Anzahl der Polymorphismen, die in Genen der arzneimittelmetabolisierenden Enzyme gefunden werden, steigt ständig an. In vielen Fällen haben diese genetischen Faktoren einen Einfluss auf die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik eines Arzneimittels und beeinflussen dadurch die Wirkung des Wirkstoffs in Patienten eines bestimmten Genotyps.¹⁹⁵ Dadurch kommt es zu erheblichen interindividuellen und interethnischen Unterschieden im xenobiotischen Metabolismus und in der Wirkung von Arzneimitteln. Es ist bekannt, dass sowohl der Misserfolg einer Therapie, als auch das Auftreten von Arzneimittelnebenwirkungen bei bestimmten Populationen von Patienten eine genetische Komponente haben kann. So kann bei zwei Personen gleichen Gewichts und gleicher Arzneimitteldosierung die Höhe der Plasmakonzentration eines Wirkstoffes um das mehr als 1000-fache variieren.¹⁹⁶ Diese interindividuellen Abweichungen in der Wirkung eines Arzneimittels sind ein signifikantes klinisches Problem. In den USA verursachen Arzneimittelnebenwirkungen bei Patienten jährlich mehr als 2 Millionen Krankenhausaufenthalte aufgrund schwerer Nebenwirkungen und über 100 000 Todesfälle.¹⁹⁷ Die dadurch verursachten Kosten werden auf 100 Milliarden US\$ pro Jahr geschätzt. In Deutschland wird die Zahl arzneimittelbedingter Todesfälle auf 16 000, die ernster Nebenwirkungen auf jährlich über 120 000 Fälle geschätzt.¹⁹⁸

Zur Untersuchung dieser genetisch bestimmten Schwankungen im Arzneimittelmetabolismus sind zwei rasch wachsende Forschungsfelder entstanden: die Pharmakogenetik und die Pharmakogenomik. Dabei untersucht die Pharmakogenetik die Unterschiede des individuellen Ansprechens auf Arzneimittel aufgrund erblich bedingter Faktoren, vor allem in der klinischen Praxis. Die Pharmakogenomik widmet sich mehr der Erforschung neuer Wirkstoffe im Labor und versucht zu klären, welche Genunterschiede für den unterschiedlichen Abbau von Arzneimitteln oder für deren unterschiedliche Wirkung in verschiedenen Patienten verantwortlich sind.¹⁹⁹ Das Wissen über genetische Einflüsse auf den Arzneimittelmetabolismus hat dazu geführt, dass bei der Entwicklung neuer Arzneimittel und in der präklinischen Testphase neuer Wirkstoffe die Berücksichtigung genetischer Effekte auf den Metabolismus eine Standardkomponente geworden ist.²⁰⁰ Auch bei der Zulassung eines Arzneimittels spielen Fragen der genetischen Heterogenität der betroffenen

Patientenpopulation eine wichtige Rolle.²⁰¹ Die Pharmakogenetik hat das Potential, für jeden Patienten das spezifische Arzneimittel und die spezifische Dosis zu bestimmen, die individuell am effektivsten und sichersten ist (personalisierte Medizin).²⁰²

Der genetische Polymorphismus eines CYP-Enzyms wurde erstmals in den 1970er Jahren am Debrisoquin/Sparteïn-Polymorphismus des CYP2D6 entdeckt. L. Smith²⁰³ in London und M. Eichelbaum und H. Dengler²⁰⁴ in Bonn beobachteten unabhängig voneinander bei Teilnehmern einer Pharmakokinetikstudie unerwartete Nebenreaktionen auf diese beiden Arzneimittel. Nachfolgende Studien zeigten, dass beide Arzneimittel vom gleichen Enzym CYP2D6 metabolisiert werden. Seit diesen Entdeckungen wurde eine Vielzahl weiterer *CYP2D6*-Allele gefunden und deren Häufigkeit und funktionelle Auswirkung untersucht. In den folgenden Jahren wurden weitere Polymorphismen von Cytochrom P450-Genen entdeckt, unter anderem der Mephenytoin-Polymorphismus (*CYP2C19*)²⁰⁵ und der Phenytoin/Warfarin-Polymorphismus, verursacht durch Mutationen des *CYP2C9*-Gens.²⁰⁶

Die Mehrzahl der Reaktionen des Phase-1-Metabolismus erfolgt durch polymorphe Enzyme. Dies kann zu einer verminderten oder erhöhten katalytischen Aktivität oder zum kompletten Aktivitätsverlust führen. So profitieren Patienten mit bestimmten Allelen nicht von der Arzneimitteltherapie, da sie, verursacht durch multiple Gene oder durch Induktion der Genexpression, zur Gruppe der *ultrarapid metabolizer* gehören. Andere Patienten zeigen, aufgrund von Mutationen in arzneimittelmetabolisierenden Enzymen, einen sog. defizienten Metabolismus (*poor metabolizer, PM*) und es kann bei Arzneimitteln mit einem engen therapeutischen Fenster zu ernststen Nebenwirkungen kommen (Abbildung 20).²⁰⁷

Es bilden sich vier hauptsächliche Phänotypen:¹⁵³

- *poor metabolizer* (PMs): homozygot für das defekte Allel mit mangelnder Enzymfunktion
- *intermediate metabolizer* (IMs): heterozygot für das defekte Allel
- *extensive metabolizer* (EMs): zwei funktionelle Genkopien (Homozygot für das funktionierende Allel)
- *ultrarapid metabolizer* (UMs): mit mehr als zwei funktionierenden Genkopien

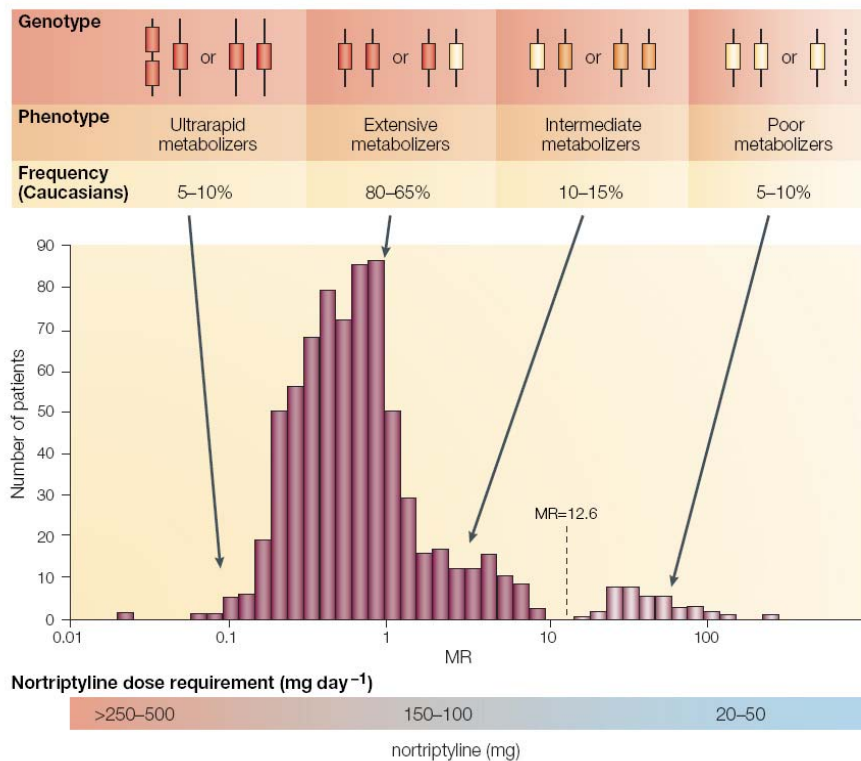


Abbildung 20: Genotyp-Phänotyp-Beziehungen am Beispiel des *CYP2D6*-Polymorphismus. Null-Allele des *CYP2D6*-Gens auf dem Chromosom 22 sind durch gelbe Kästchen dargestellt, funktionell normale Allele durch rote Kästchen, Allele mit verminderter Funktion durch orange Kästchen und Deletionen des *CYP2D6*-Gens durch eine gestrichelte Linie. Um dieselbe Plasmakonzentration des Antidepressivums Nortriptylin zu erreichen, benötigen *poor metabolizer* nur einen Bruchteil der Dosis der *extensive metabolizer*, *ultrarapid metabolizer* benötigen eine höhere Dosis (aus Meyer²⁰²).

Fehlende Enzymfunktion wird üblicherweise beobachtet, wenn das komplette Gen fehlt, aber auch bei Mutationen, die ein verändertes *splicing* verursachen, bei Stoppcodons, veränderten Startpunkten für die Transkription und bei einem Austausch von Aminosäuren, die zu einem Funktionsverlust des Enzyms führen. Außerdem können Mutationen in Regionen der Substraterkennung zu Enzymen mit veränderter Substratspezifität führen.

Aktuellen Daten zufolge spielen Polymorphismen in den P450-codierenden Genen bei der Behandlung mit Arzneimitteln in 20-30 % der Fälle eine Rolle. Die bedeutendsten polymorphen humanen Cytochrom P450-Enzyme *CYP2C9*, *CYP2C19* und *CYP2D6* metabolisieren ungefähr 40 % aller Arzneimittel auf dem Markt.^{208,209} Daraus ergibt sich, dass ungefähr 50 % des P450-Arzneimittelmetabolismus signifikant von Polymorphismen beeinflusst wird. Des Weiteren ist es wahrscheinlich, dass Polymorphismen in anderen P450-

Genen wie CYP2B6 und CYP3A4 für interindividuelle Unterschiede in der medikamentösen Therapie bedeutsam sein können.²¹⁰

CYP2D6 ist am Metabolismus von ungefähr 25 % der klinisch genutzten Arzneimittel beteiligt. Die benötigte Dosis zur Erreichung der gleichen Plasmakonzentration eines hauptsächlich von CYP2D6 metabolisierten Arzneimittels kann von Individuum zu Individuum um das 10 bis 30fache variieren. In Westeuropa tragen 6 % der Population mehr als zwei funktionelle Genkopien von CYP2D6 und sind *ultrarapid Metabolizer* für CYP2D6-Substrate.²¹¹ Bei diesen Personen ist aufgrund des zu schnellen Metabolismus kein Ansprechen der Therapie zu erwarten. 7 % der europäischen Population sind *poor Metabolizer*, hier sind bei normaler Dosierung zu hohe Plasmakonzentrationen des Wirkstoffs zu erwarten und es treten häufiger Nebenwirkungen auf. Durch Genotypisierung der CYP2D6 PMs und UMs könnte eine bessere Dosierung für 50–60 Millionen Patienten allein in Westeuropa erreicht werden. Dies wäre für 10 % aller Arzneimittel auf dem Markt relevant.

Im Gegensatz zu CYP2D6 liegt der Anteil der Bevölkerung, der kein CYP2C9 und CYP2C19 exprimiert, nur in der Größenordnung von 2–3 %. Allerdings zeigt ein aktueller *review* von Kirchheiner *et al.*,²⁰⁹ dass die Dosierung von Antikoagulantien (Blutgerinnungshemmern), Antidiabetika und Antiepileptika stark von dem entsprechenden CYP2C9-Genotyp abhängt. Außerdem sind 20–25 % der asiatischen Population PMs von CYP2C19.²¹² Des Weiteren wurde kürzlich ein häufiges CYP2C19-Allel charakterisiert, welches zu einer erhöhten Expression von CYP2C19 führt, was auf die Möglichkeit einer Unterdosierung eines großen Anteils der weißen und afrikanischen Population hindeutet.²¹³

Durch die große Anzahl von Genomsequenzierungsprojekten ist die Anzahl der bekannten *SNPs* rasant angestiegen und es sind mehrere Datenbanken entstanden, die Informationen über *SNPs* zur Verfügung stellen. Auch für die Gene der P450-Enzyme sind eine Vielzahl von *SNPs* bekannt. Für einen Großteil der Allele ist jedoch keine Information über den Einfluss auf die Enzymaktivität verfügbar. Aufgrund der Bedeutung möglicher funktioneller Effekte der Allele für den Arzneimittelmetabolismus wäre es vorteilhaft, zusätzliche Informationen über die Auswirkung dieser Allele zu erhalten. Es gibt verschiedene Methoden zur Vorhersage des Einflusses von Mutationen. Die Methoden können im Wesentlichen in sequenzbasierte Methoden und Methoden, die Strukturinformationen berücksichtigen, unterteilt werden.

3.4.1 SNP-Datenbanken

Es gibt eine Reihe verschiedener Datenbanken mit Informationen über *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), z. B. HGVBASE (<http://hgvdbase.cgb.ki.se/>),²¹⁴ dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>),²¹⁵ und JSPN Datenbank (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>).²¹⁶ Diese Datenbanken enthalten allerdings normalerweise keine Daten über die funktionellen Auswirkungen der SNPs. Des Weiteren gibt es viele falschpositive Einträge durch Fehler bei der Sequenzierung und durch die kleine Schnittmenge der Informationen in den verschiedenen Datenbanken.^{217,218} Diese Faktoren limitieren die Verwendbarkeit dieser Datenbanken. Aus diesen Gründen wurde für die Allele der humanen Cytochrom P450 eine eigene Datenbank erstellt. Seit 1999 gibt es die „*Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee*“ (<http://www.cypalleles.ki.se/>).²¹⁹⁻²²³ Es handelt sich um eine ständig aktualisierte Datenbank, in der alle humanen P450-Allele abgelegt werden, die für Enzyme des xenobiotischen Metabolismus codieren. In der Datenbank werden die Position der SNPs, ihre funktionellen Auswirkungen und ein Verweis auf die Primärliteratur abgelegt. Es werden vorrangig Allele publiziert, die die Proteinexpression oder -funktion verändern.

3.4.2 Nomenklatur der P450-Allele

Der Name des Gens und des Allels wird durch einen Asteriskus getrennt. Das Allel wird durch Zahlen und gegebenenfalls einen Buchstaben bezeichnet. (z. B. *CYP1A1*3*, *CYP2D6*10B*). Um mit einer eindeutigen Nummer bezeichnet zu werden, muss das neue Allel einen Nucleotidaustausch enthalten, der einen nachgewiesenen Effekt auf Transkription, *splicing*, Translation, posttranskriptionelle oder posttranslatorische Modifikationen hat oder zu mindestens einem Aminosäureaustausch führt. Weitere Nucleotidaustausche und Kombinationen von Nucleotidaustauschen in demselben Gen werden mit Buchstaben bezeichnet (z. B. **21A*, **21B*). Bei der Bezeichnung der entsprechenden Proteine wird zwischen dem Namen des Genproduktes und der Nummer ein Punkt eingefügt (z. B. *CYP2D6.2A*).²²⁴ Das Wildtyp-Allel ist definitionsgemäß die Sequenz des zuerst sequenzierten Allels und wird mit **1* bezeichnet. Das **1* Allel muss deshalb nicht notwendigerweise das häufigste Allele in jeder ethnischen Gruppe sein.²²²

3.4.3 Vorhersage der Effekte von Polymorphismen

Zum Verständnis der molekularen Grundlagen von Erkrankungen und zur Auswahl von *SNPs* für genetische Studien ist es wichtig, den Effekt von genetischen Veränderungen zu verstehen und Vorhersagen mit Hilfe von computergestützten Methoden durchführen zu können. *SNPs* können die Funktion von DNA, RNA und Proteinen verändern. Sie werden üblicherweise durch ihre Lage im Genom klassifiziert (Tabelle 5): *coding SNPs* (*cSNPs*), befinden sich innerhalb codierender Bereiche von Genen, *regulatory SNPs* (*rSNP*), befinden sich innerhalb regulatorischer Regionen von Genen. Bei *synonymous SNPs* (*sSNP*) handelt es sich um *SNPs* in Exons, die zu keinem Austausch der Aminosäure führen, *non-synonymous SNPs* (*nsSNP*) sind Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, und *intronic SNPs* (*iSNP*) sind Mutationen innerhalb von Introns. *Non-synonymous SNPs* (*nsSNPs*) verändern die Aminosäuresequenz des Proteinprodukts entweder durch den Austausch von Aminosäuren (*missense mutation*) oder durch Einführen eines Stoppcodons (*nonsense mutation*). Eine Variante kann außerdem die Expression oder Translation eines Genproduktes beeinflussen, entweder durch das Unterbrechen regulatorischer Regionen, oder durch das Stören des regulären *splicing* und der mRNA-Funktionalität. Dazu können *SNPs* in regulatorischen Regionen, *synonymous SNPs* und *intronic SNPs*, beitragen.²²⁵

Aufgrund der Hinweise, dass Erkrankungen am wahrscheinlichsten von *regulatory* und *coding SNPs* verursacht werden, gab es viele Bemühungen, die Funktion von *nsSNPs* vorherzusagen.²²⁶⁻²²⁸ Ziel ist es, zu verstehen, ob eine bestimmte Mutation von dem Enzym toleriert wird oder nicht.²²⁹ Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie ein *nsSNP* die Funktion eines Genproduktes beeinflussen kann. Der wahrscheinlichste Effekt ist ein teilweiser oder kompletter Verlust der Funktion des mutierten Genprodukts. Eine weniger wahrscheinliche Möglichkeit ist eine Steigerung der Funktion. Mooney *et al.* zeigten, dass mit Erkrankungen verknüpfte Mutationen im Allgemeinen dazu neigen, in konservierten Positionen aufzutreten.²³⁰ Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mit Krankheiten verknüpfte Mutationen evolutionär konserviert sind²³¹ und dass sie oft eine wichtige Rolle für die Proteinstruktur spielen.²³²

Tabelle 5: Klassifikation der *SNPs*.

<i>SNP</i>	<i>SNP</i>	Eigenschaft
<i>coding SNPs</i>	<i>cSNP</i>	Mutation innerhalb der codierenden Region eines Gens
<i>regulatory SNPs</i>	<i>rSNP</i>	Mutation innerhalb der regulatorischen Region eines Gens
<i>synonymous SNPs</i>	<i>sSNP</i>	Mutation im Exon eines Gens, die für die gleiche Aminosäure codiert (<i>silent mutation</i>)
<i>non-synonymous SNPs</i>	<i>nsSNP</i>	Mutation die zu einem Austausch der Aminosäure führt. <i>missense</i> Mutation: Verändert das Codon und codiert für eine andere Aminosäure. <i>nonsense</i> Mutation: Codiert für einen Stopp der Translation.
<i>intronic SNPs</i>	<i>iSNP</i>	Mutation innerhalb eines Introns

Es gibt verschiedene Ansätze zur Vorhersage des Einflusses von *nsSNPs*. Die Methoden benutzen unterschiedliche Eigenschaften, um den Einfluss einer Mutation vorherzusagen. Es werden sequenzbasierte Eigenschaften, physikochemische Eigenschaften der Aminosäuren, Eigenschaften der Proteinstruktur und evolutionäre Eigenschaften verwendet. Um vorherzusagen, ob eine Mutation toleriert wird, wird üblicherweise ein Trainingsdatensatz mit Mutationen erstellt, deren Auswirkung auf die Enzymaktivität bekannt ist.²²⁵

Die ersten Untersuchungen analysierten Mutationen mittels Sequenzeigenschaften, unter Verwendung der BLOSUM62-Matrix.²³³ BLOSUM62 berücksichtigt jedoch nicht den Sequenz- oder Strukturzusammenhang der Mutation, daher wurden weitere Methoden entwickelt, um positionsspezifische Abschätzungen der Konservierung und strukturelle Informationen zu berücksichtigen. Ng und Henikoff führten diese Untersuchungen durch die Entwicklung einer positionsspezifischen Bewertung der nichtkonservierten Mutationen mit ihrer Methode, *Sorting Intolerant From Tolerant* (SIFT), fort.^{234,235} Des Weiteren wurden Methoden entwickelt, die neben der sequenzbasierten, evolutionären Konservierung auch Strukturfaktoren mit einbeziehen.²³² Dazu wurden Proteinstruktur-Parameter benutzt, wie die Zugänglichkeit für Lösungsmittel, die Lage innerhalb der Sekundärstruktur und die Mitwirkung an Disulfidbrücken. Daneben wurden Methoden des maschinellen Lernens wie z.B. Entscheidungsbäume und *Support*-Vektor-Maschinen (SVM) zur Analyse auf der Basis struktureller und evolutionärer Eigenschaften verwendet.²³⁶

Zum Teil sind webbasierte Methoden zur Vorhersage der Einflüsse von Varianten verfügbar. Zwei Beispiele sind PolyPhen²³⁷ und SIFT²³⁵. PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>) verwendet zur Vorhersage, ob ein *nsSNP* die Proteinfunktion beeinflusst, eine umfangreiche Auswahl an Eigenschaften (sequenzbasierte, evolutionäre und strukturelle) und arbeitet am besten, wenn Strukturinformationen verfügbar sind. SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/>) kann

online zur Vorhersage intoleranter Mutationen verwendet werden und arbeitet mittels positionsspezifischer Informationen, die aus Sequenz-*alignments* abgeleitet werden. SIFT benötigt dazu nur die Aminosäuresequenz des Enzyms und Sequenzen von homologen Proteinen.

Darüber hinaus gibt es Datenbanken, die den Effekt codierender nsSNPs untersuchen (Tabelle 6). *SNPEffect* (<http://snpeffect.vib.be/>) analysiert den Effekt codierender nsSNPs und annotiert sie in drei Kategorien struktureller, funktioneller und chemischer Eigenschaften.²³⁸ Eine weitere Datenbank mit Annotationen zu den SNPs ist SNPs3D (<http://www.snps3d.org/>). Hier werden Informationen über die Struktur, alternatives *splicing* und evolutionäre Informationen zur Annotation verwendet.²³⁹

Tabelle 6: Übersicht über *SNP* Datenbanken.

Datenbank	Internetadresse		Referenz
Genomdatenbanken			
dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/		215
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html		240
GoldenPath	http://genome.ucsc.edu/	UCSC Genome Browser Database	241
HapMapConsortium	http://www.hapmap.org/		242
JSNP	http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/	A database of Japanese Single Nucleotide Polymorphisms	216
Mutationrepositories			
HGVBase	http://hgibase.cgb.ki.se/	Human Genome Variation Database	214
HGMD	http://www.hgmd.cf.ac.uk/	Human Gene Mutation Database	243
Swiss-Prot	http://expasy.org/sprot/		244

4 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei bedeutenden Gruppen von P450-Enzymen und deren Anwendung: bakterielle P450-Monooxygenasen, insbesondere die P450-Monooxygenase P450 BM-3 aus *Bacillus megaterium* (CYP102A1) und humane P450-Enzyme.

Aufgrund der Möglichkeit zur selektiven Oxidation von chemischen Verbindungen sind bakterielle P450-Monooxygenasen, wie P450 BM-3, interessante Enzyme für technische Anwendungen der Enzymkatalyse in der pharmazeutischen und chemischen Industrie (weiße Biotechnologie) und sie werden als Modellsysteme für humane P450-Monooxygenasen (rote Biotechnologie) eingesetzt. Das Verständnis von Aktivität und Selektivität von P450-Monooxygenasen auf molekularer Ebene ist eine wichtige Voraussetzung für das rationale Proteindesign und die Verbesserung der Enzyme in Hinblick auf Aktivität, Spezifität und Selektivität. Ziel der folgenden Untersuchungen war es, durch molekulare Modellierung den Einfluss von Mutanten von P450 BM-3 auf die Aktivität, Regio- und Stereoselektivität der Hydroxylierung des Substrates β -Ionon zu verstehen und vorherzusagen (Kapitel 5.1).

Humane P450-Monooxygenasen spielen eine bedeutende Rolle im xenobiotischen Metabolismus. Das Verständnis und die Vorhersage der bei der Metabolisierung eines Wirkstoffes gebildeten Metabolite ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Bei der Metabolisierung von Substraten können verschiedene Metabolite entstehen und häufig wird die Bildung von isoformspezifischen Metaboliten beobachtet. Im Folgenden sollen die molekularen Grundlagen dieser isoformspezifischen Regioselektivität untersucht werden. Ziel war es, ein generelles und prädiktives Modell der isoformspezifischen Regioselektivität von CYP3A4 und CYP2D6 zu entwickeln. Das Modell soll es dem Anwender anhand einfacher Regeln ermöglichen, die Position der Metabolisierung eines Substrates durch CYP3A4 und CYP2D6 vorherzusagen (Kapitel 5.2).

Polymorphismen in den humanen Cytochrom P450-Monooxygenasen haben einen bedeutenden Einfluss auf den Arzneimittelmetabolismus. Durch die große Anzahl von Genomsequenzierungsprojekten ist die Anzahl der bekannten *SNPs* rasant angestiegen und

auch für die Gene der P450-Enzyme sind eine Vielzahl von *SNPs* bekannt. Für einen Großteil der Allele ist jedoch keine Information über den Einfluss auf die Enzymaktivität verfügbar. Aufgrund der Bedeutung möglicher funktioneller Effekte der Allele für den Arzneimittelmetabolismus wäre es hilfreich, Informationen über die Auswirkung dieser Allele zu erhalten und es besteht ein großes Interesse an der Vorhersage des Einflusses von Mutationen auf die Enzymaktivität. Für die humanen Cytochrom P450-Monooxygenasen liegen für ungefähr 30 % der Allele experimentelle Daten über den Einfluss auf die Enzymaktivität vor. Für 70 % der Allele sind die funktionellen Auswirkungen der Mutationen nicht bekannt und es sollte ein Modell zur Vorhersage des Einflusses auf die Enzymfunktion entwickelt werden (Kapitel 5.3).

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung des Einflusses der Mutationen F87A und F87V auf die Aktivität, Regio- und Stereoselektivität von P450 BM-3 gegenüber β -Ionon

Ionone und deren Derivate, insbesondere Hydroxy-Ionone, sind wichtige Zwischenprodukte für die Synthese vieler Carotinoide.²⁴⁵ Ionon-Derivate bilden wichtige Aromabestandteile in Blütenduftstoffen^{246,247} und Insektenlockmitteln^{248,249} und helfen dadurch, die Bestäubung durch Insekten zu verbessern. Darüber hinaus sind Hydroxy- β -Ionone wichtige Verbindungen für die Synthese des Phytohormons Abscisinsäure.²⁵⁰ Diese Eigenschaften machen Ionone und insbesondere ihre Hydroxymetabolite interessant für die Duft- und Aromastoffindustrie und die chemische Synthese.

An unserem Institut wurde in der Arbeitsgruppe von V. Urlacher die Hydroxylierung von β -Ionon durch P450-Monooxygenasen untersucht. Der Wildtyp von P450 BM-3 aus *Bacillus megaterium* (CYP102A1) zeigt eine geringe Hydroxylierungsaktivität gegenüber β -Ionon ($< 1 \text{ min}^{-1}$). Der Austausch von Phenylalanin durch Valin an Position 87 führt zu einem mehr als 100fachen Anstieg der β -Ionon-Hydroxylierungsaktivität (115 min^{-1}). Die Mutante F87A zeigt eine Hydroxylierungsaktivität von 93 min^{-1} gegenüber β -Ionon.²⁵¹ Von der Dreifachmutante R47L Y51F F87V ist bekannt, dass sie eine mäßige Enantioselektivität zur Bildung von (*R*)-4-Hydroxy- β -Ionon zeigt (*ee* 39 %).²⁵¹ Alle untersuchten Mutanten wandeln β -Ionon regioselektiv in 4-Hydroxy- β -Ionon um (Abbildung 21).



Abbildung 21: P450 BM-3 katalysiert die Hydroxylierung von β -Ionon zu 4-Hydroxy- β -Ionon.

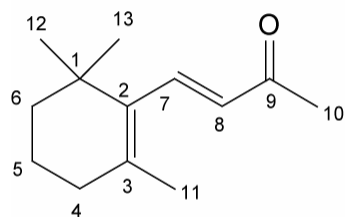
Ziel der folgenden Untersuchungen war es, durch molekulare Modellierung den Einfluss der Mutanten auf die Aktivität, Regio- und Stereoselektivität der β -Ionon-Hydroxylierung zu untersuchen.

5.1.1 Regioselektivität der Hydroxylierung von β -Ionon durch P450 BM-3

Alle bisher untersuchten P450 BM-3-Mutanten hydroxylieren β -Ionon selektiv in der 4-Position. Die Regioselektivität ist unabhängig von dem Einfluss von Mutationen und muss damit durch eine intrinsische Eigenschaft des Substrates bestimmt sein.

5.1.1.1 Intrinsische chemische Reaktivität von β -Ionon

Der Mechanismus der Hydroxylierung von C–H Gruppen durch Cytochrom P450-Monooxygenasen gehört zu den bestuntersuchten Reaktionsmechanismen dieser Superfamilie. Die höchste Energiebarriere entlang des Reaktionspfades wird für den Schritt der Wasserstoffabstraktion beobachtet.⁵⁰⁻⁵³ Deshalb ist es zur Abschätzung der intrinsischen Reaktivitäten des Substratmoleküls ausreichend, den Schritt der Wasserstoffabstraktion zu berücksichtigen. Zur Abschätzung der intrinsischen Reaktivitäten der einzelnen Positionen im β -Iononmolekül wurden die Bindungsdissociationsenergien (BDE) der C-H-Bindungen mit PETRA^{252,253} berechnet. Dies erlaubt höher reaktive Positionen von schwächer reaktiven Positionen zu unterscheiden.



Position	BDE(kJ/mol)
4	320
5	397
6	393
7/8	412
10	428
11	334
12/13	410

Abbildung 22: Die mittels PETRA berechneten Bindungsdissoziationsenergien der C-H-Bindungen an den entsprechenden Positionen im β -Iononmolekül.

Man erkennt, dass die C-H-Bindung an der Position 4 des β -Iononmoleküls die geringste Bindungsdissoziationsenergie (320 kJ/mol) aufweist und es sich damit um die reaktivste Position des Substrates handelt (Abbildung 22). Die Hydroxylierung verläuft über die Abstraktion eines Wasserstoffatoms vom Kohlenstoffatom 4. Das dabei an Position 4 entstehende Kohlenstoffradikal in allylischer Stellung ist durch die Konjugation mit zwei Doppelbindungen besonders stabilisiert. Zusätzlich handelt es sich um ein sekundäres Kohlenstoffradikal, welches, im Gegensatz zu einem möglichen primären Radikal an Position 11, besser stabilisiert ist. Bei der 4-Position des β -Iononmoleküls handelt es sich um die reaktivste Position des Moleküls, die, wie experimentell beobachtet, bevorzugt hydroxyliert wird. Damit eine Hydroxylierungsreaktion überhaupt stattfinden kann, muss das β -Iononmolekül in der Bindetasche des Enzyms mit der 4-Position in die Nähe der Hämgruppe gelangen. Für eine Wasserstoffabstraktion, den ersten Schritt der Hydroxylierungsreaktion, ist eine Distanz $< 5 \text{ \AA}$ zwischen dem Wasserstoffatom des Substrates und dem reaktiven Sauerstoffatom der Hämgruppe notwendig.²⁵⁴ Hierzu müssen die Enzym-Substrat-Wechselwirkungen zwischen dem P450 BM-3-Enzym und dem β -Iononmolekül untersucht werden.

5.1.2 Untersuchung der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen durch *docking*-Simulationen

Zur Untersuchung der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen von P450 BM-3 und β -Ionon wurden zunächst *docking*-Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurde, mittels der Software AutoDock, das Substrat β -Ionon in die Strukturen des Wildtyps und der beiden Mutanten F87A und F87V *gedockt*. Die Analyse der beobachteten Konformationen zeigt, dass sich im Falle der Mutante F87A für 424 der 500 *gedockten* β -Iononmoleküle (85 %) eine Konformation ergibt, in der die 4-Position des β -Iononmoleküls in einem Abstand von 3,5 Å zum reaktiven Sauerstoffatom der Hämgruppe liegt (Abbildung 23b). In der Wildtyp-Struktur von P450 BM-3 liegen entsprechende Konformationen des β -Iononmoleküls > 9 Å vom reaktiven Sauerstoffatom der Hämgruppe entfernt (Abbildung 23a). Für die Mutante F87V finden sich ebenfalls nur Konformationen, in denen sich die 4-Position des β -Iononmoleküls > 9 Å von der Hämgruppe entfernt befindet.

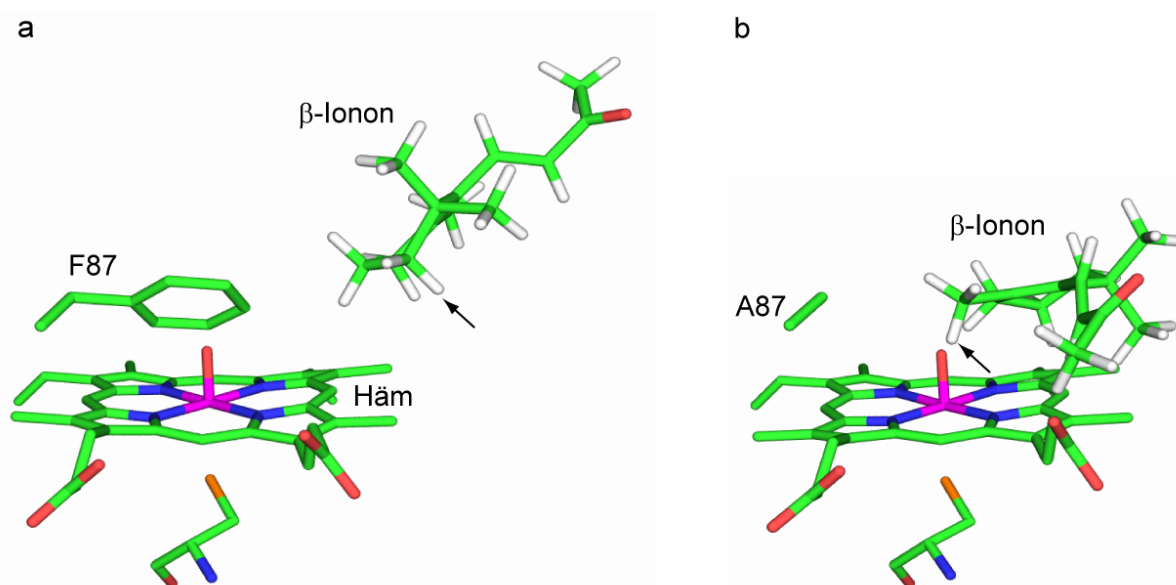


Abbildung 23: *Docking* von β -Ionon in die Struktur des Wildtyps von P450 BM-3 (a) und die Mutante F87A (b). Die 4-Position ist mit einem Pfeil markiert (PDB-Eintrag 1JPZ).

Die *docking*-Untersuchungen geben einen ersten Hinweis auf eine sterische Hinderung des Zugangs zur Hämgruppe durch Phe87. Die Analyse der Kristallstruktur von P450 BM-3 zeigt, dass die sperrige Aminosäure Phenylalanin den Zugang zur Hämgruppe blockiert und das β -Iononmolekül damit nicht in die Nähe der Hämgruppe gelangen kann (Abbildung 24). Nach dem Austausch der sperrigen Aminosäure Phenylalanin durch Alanin werden für das

β -Iononmolekül Konformationen beobachtet, die eine Hydroxylierung in der 4-Position ermöglichen. Die *docking*-Untersuchungen erklären die unterschiedliche Aktivität des Wildtyp-Enzyms und der Mutante F87A, sind jedoch nicht ausreichend für die Erklärung des Einflusses der Mutante F87V. Zur detaillierteren Untersuchung der Enzym-Substrat-Wechselwirkung und des Einflusses der Mutanten, unter Berücksichtigung der Flexibilität des Enzyms, wurden molekulardynamische Simulationen durchgeführt.

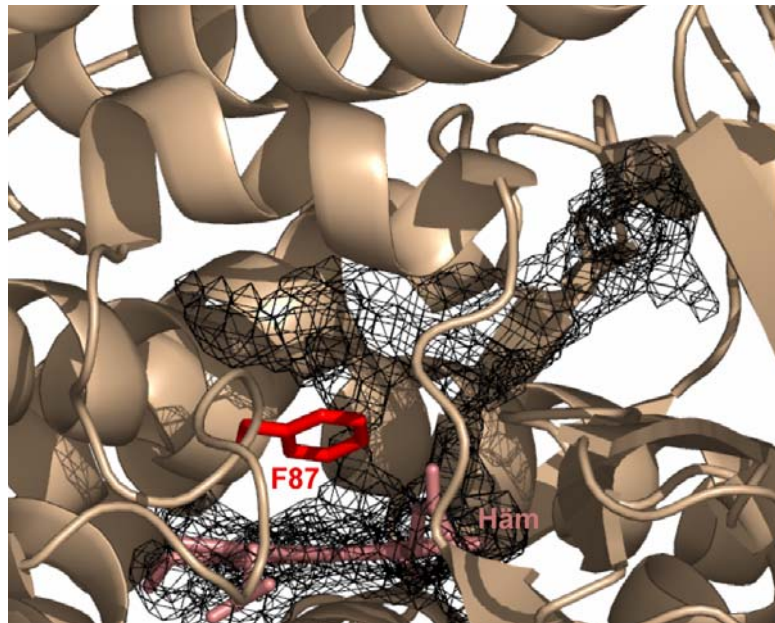


Abbildung 24: Bindetasche von P450 BM-3. Das schwarze Netz stellt die lösemittelzugängliche Oberfläche der Bindetasche dar. Man erkennt, wie die sperrige Aminosäure Phenylalanin den Zugang zur Hämgruppe blockiert. Die Bindetasche wurde mit dem Programm VOIDOO berechnet.

5.1.3 Flexibilität der Strukturen von P450 BM-3

Es sind 21 Kristallstrukturen von P450 BM-3 bekannt. Ein Vergleich der Strukturen zeigt Unterschiede in deren Konformation. Aus drei Strukturen mit unterschiedlichen Konformationen (PDB-Einträge 1BU7, 1FAG, 1BVY) wurde jeweils die Proteinkette A ausgewählt. Nach der Überlagerung der C_{α} -Atome ergeben sich RMSD-Werte zwischen 1,1 und 1,8 Å (Tabelle 7).

Ergebnisse

Tabelle 7: RMSD-Werte zwischen den Strukturen 1BU7, 1FAG, 1BVY nach Überlagerung der C_α-Atome.

PDB-Eintrag	1BU7	1FAG	1BVY
1BU7	X	1,2	1,1
1FAG		x	1,8
1BVY			x

Eine Überlagerung der drei Strukturen (Abbildung 25) und die Analyse der strukturellen Abweichungen zwischen den beiden Strukturen 1FAG und 1BVY durch Berechnung des RMSD für jede Aminosäure (Abbildung 26) zeigt, dass sich die Strukturen im Wesentlichen im Bereich der F- und G-Helix und des F-G-loop unterscheiden.

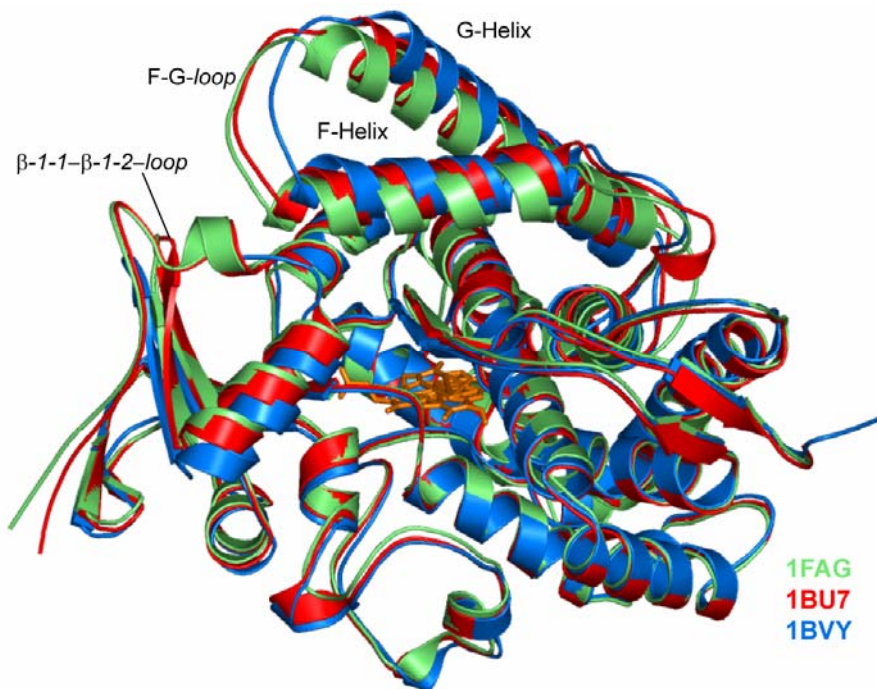


Abbildung 25: Überlagerung der Ketten A der drei Kristallstrukturen von P450 BM-3. PDB-Einträge: 1FAG (grün), 1BU7 (rot) und 1BVY (blau).

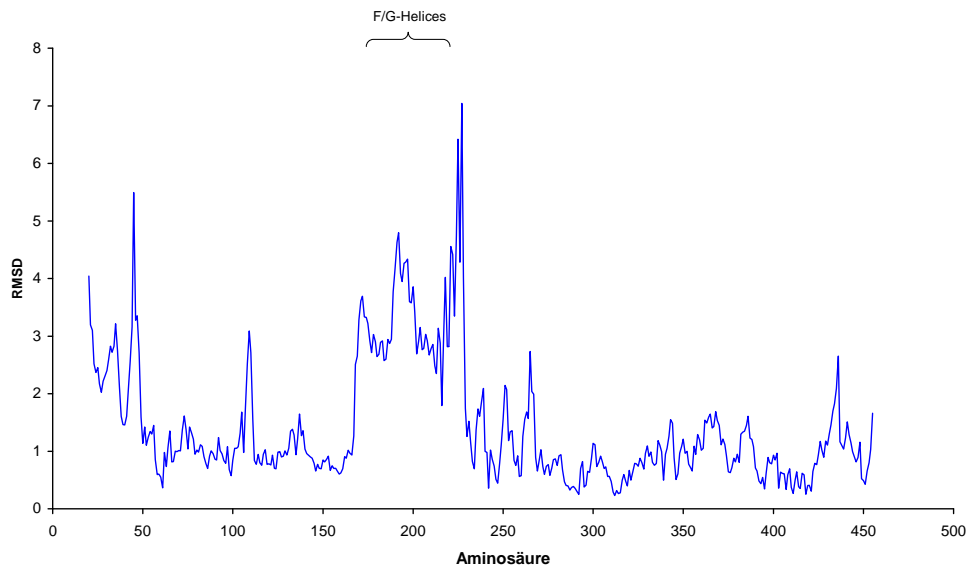


Abbildung 26: RMSD *per residue* zwischen der Kristallstruktur 1FAG und 1BVY.

Der F-G-loop bildet mit dem gegenüberliegenden β 1-1- β 1-2-loop (loop zwischen Strang 1 und Strang 2 des β -Faltblatts 1) den Eingangsbereich des Substratzugangschanals zum aktiven Zentrum im Inneren des Proteins. Die Konformation des F-G-loop bestimmt die Öffnung des Zugangskanals. Die Öffnung des Eingangs kann durch Messung der Distanz zwischen den C_{α} -Atomen der Aminosäuren P45 und A191 quantifiziert werden (Abbildung 27).

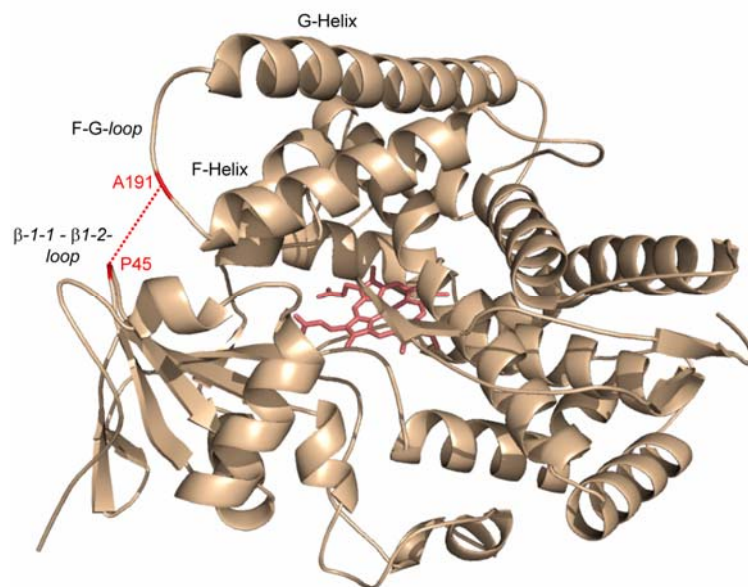


Abbildung 27: Die Öffnung des Eingangs kann durch Messung der Distanz zwischen den C_{α} -Atomen der Aminosäuren P45 und A191 quantifiziert werden.

Ein Vergleich der drei Kristallstrukturen 1BU7, 1FAG und 1BVY zeigt eine unterschiedliche Öffnung des Zugangskanals zwischen 7,3 und 16,1 Å (Tabelle 8).

Tabelle 8: Daten der drei verwendeten Kristallstrukturen.

PDB-Eintrag	Auflösung [Å]	Substrat in der Struktur	Distanz [Å] $C_{\alpha}P45 - C_{\alpha}Ala191$
1BU7	1,7		8,4
1FAG	2,7	Palmitoleinsäure	7,3
1BVY	2,0		16,1

5.1.4 MD-Simulationen von P450 BM-3 ohne Substrat

Unter Verwendung der Software AMBER wurden MD-Simulationen der drei Kristallstrukturen 1BU7, 1FAG und 1BVY ohne Substrat durchgeführt. Für jede Struktur wurden drei Simulationen, mit einer unterschiedlichen Verteilung der anfänglichen Startgeschwindigkeiten auf die Atome, durchgeführt. Die drei Strukturen zeigen während der Simulation eine unterschiedliche Abweichung von der Startstruktur. Zur Quantifizierung wurde im Verlauf der Simulation der RMSD-Wert zwischen der aktuellen Konformation und der Startstruktur (zu Beginn der Simulation) berechnet. Im Durchschnitt haben die drei Simulationen der Struktur 1BU7 die geringste Abweichung von der entsprechenden Startstruktur (Tabelle 9). In Abbildung 28 ist der zeitliche Verlauf der Abweichung von der Startstruktur für drei Simulationen aufgetragen.

Für die neun Simulationen ohne Substrat wurde die Öffnung des Substratzugangskanals während der Simulation untersucht (Tabelle 10, Abbildung 29). Die beiden Strukturen 1BU7 und 1FAG zeigen im Kristall beide einen geschlossenen Zugangskanal mit einer Öffnung von 8,4 Å bzw. 7,3 Å. Die Kristallstruktur 1BVY hingegen zeigt einen geöffneten Zugangskanal mit einer Öffnung von 16,1 Å. Während der Simulation beobachtet man Konformationsänderungen, die zu Öffnungs- und Schließbewegungen des Eingangskanals führen (Abbildung 29).

Tabelle 9: Statistische Auswertung der RMSD-Werte der *backbone*-Atome (*rmsd to first*) für die Simulationen der drei verschiedenen Kristallstrukturen von P450 BM-3 (1BU7, 1FAG, 1BVY). Ausgewertet wurde jeweils der Simulationszeitraum zwischen 1000 ps und 4000 ps.

Simulation	Min	Max	Mittel	Standabw.
1bu7_1	1,4	2,3	1,7	0,2
1bu7_2	1,3	1,8	1,5	0,1
1bu7_3	1,5	2,3	1,9	0,1
1bu7	1,3	2,3	1,7	0,2
1fag_1	1,5	2,2	1,9	0,1
1fag_2	1,5	2,0	1,7	0,1
1fag_3	1,6	2,2	1,9	0,1
1fag	1,5	2,2	1,8	0,1
1bvy_1	1,9	2,9	2,4	0,2
1bvy_2	1,7	2,5	2,2	0,2
1bvy_3	2,1	2,8	2,4	0,1
1bvy	1,7	2,9	2,3	0,2

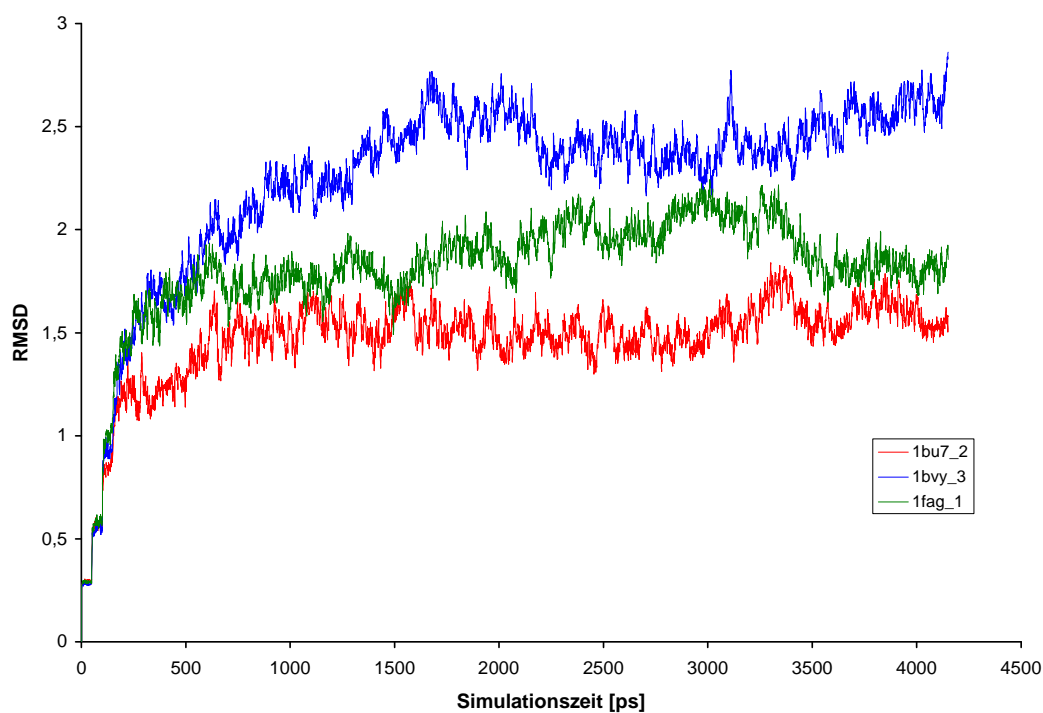


Abbildung 28: RMSD der *backbone*-Atome zwischen den Konformationen der Enzyme während der Simulation und der jeweiligen Startstruktur (*rmsd to first*).

Für 1FAG beobachtet man für zwei Simulationen (1fag_1 + 3) zwischen den beiden Aminosäuren P45 und Ala191 eine Distanz von ca. 7 Å. In der dritten Simulation (1fag_2) öffnet sich der Zugangskanal nach ca. 1500ps und man beobachtet einen Abstand von 10 - 12 Å. Am Ende der Simulation schließt sich der Kanal wieder (Abbildung 29b). Die Simulationen der Struktur 1BU7 zeigen zu Beginn eine Öffnungsbewegung des Eingangskanals (ca. 10 Å), danach schließt sich der Zugangskanal wieder und nach 3 ns Simulationszeit liegen alle Strukturen in der geschlossenen Konformation vor und es werden Distanzen von ca. 7 Å beobachtet (Abbildung 29a). Die Struktur 1BVY weist in der Kristallstruktur eine sehr große Öffnung des Kanals von 16,1 Å auf. Während einer Relaxationszeit von 1 – 2 ns beobachtet man für alle drei Simulationen eine Schließbewegung, die zunächst zu einer Öffnung von 10 bzw. 6 Å führt (Abbildung 29c). Nach 5 ns Simulationszeit liegen auch die Strukturen von 1BVY alle in der geschlossenen Konformation vor.

Unabhängig von der Startstruktur beobachtet man während der Simulationen ohne Substrat einen geschlossenen (6-7 Å) oder geöffneten Zugangskanal (10 - 12 Å) und es werden Übergänge zwischen diesen beiden Zuständen beobachtet. Nach 5 ns Simulationszeit liegen alle Strukturen in einer Konformation mit geschlossenem Zugangskanal vor.

Tabelle 10: Statistische Auswertung der Öffnung des Substratzugangskanals von P450 BM-3 anhand des Abstandes zwischen den C_α-Atomen der beiden Aminosäuren P45 und A191. Neben dem Abstand in der Kristallstruktur (PDB) sind der minimale und maximale Abstand, der Mittelwert und die Standardabweichung der Abstände für die einzelnen Simulationen angegeben.

	x	PDB	Min	Max	Mittel	Standabw.
1BU7_x		8,4				
	1		4,8	14,3	7,6	1,7
	2		5,1	11,6	7,3	1,3
	3		4,8	12,2	7,5	1,7
1FAG_x		7,3				
	1		4,8	10,3	6,6	0,8
	2		5,4	13,3	8,7	1,7
	3		5,0	10,5	6,7	0,7
1BVY_x		16,1				
	1		4,2	17,4	7,5	2,8
	2		5,3	23,7	11,7	3,9
	3		4,2	17,4	7,9	2,8

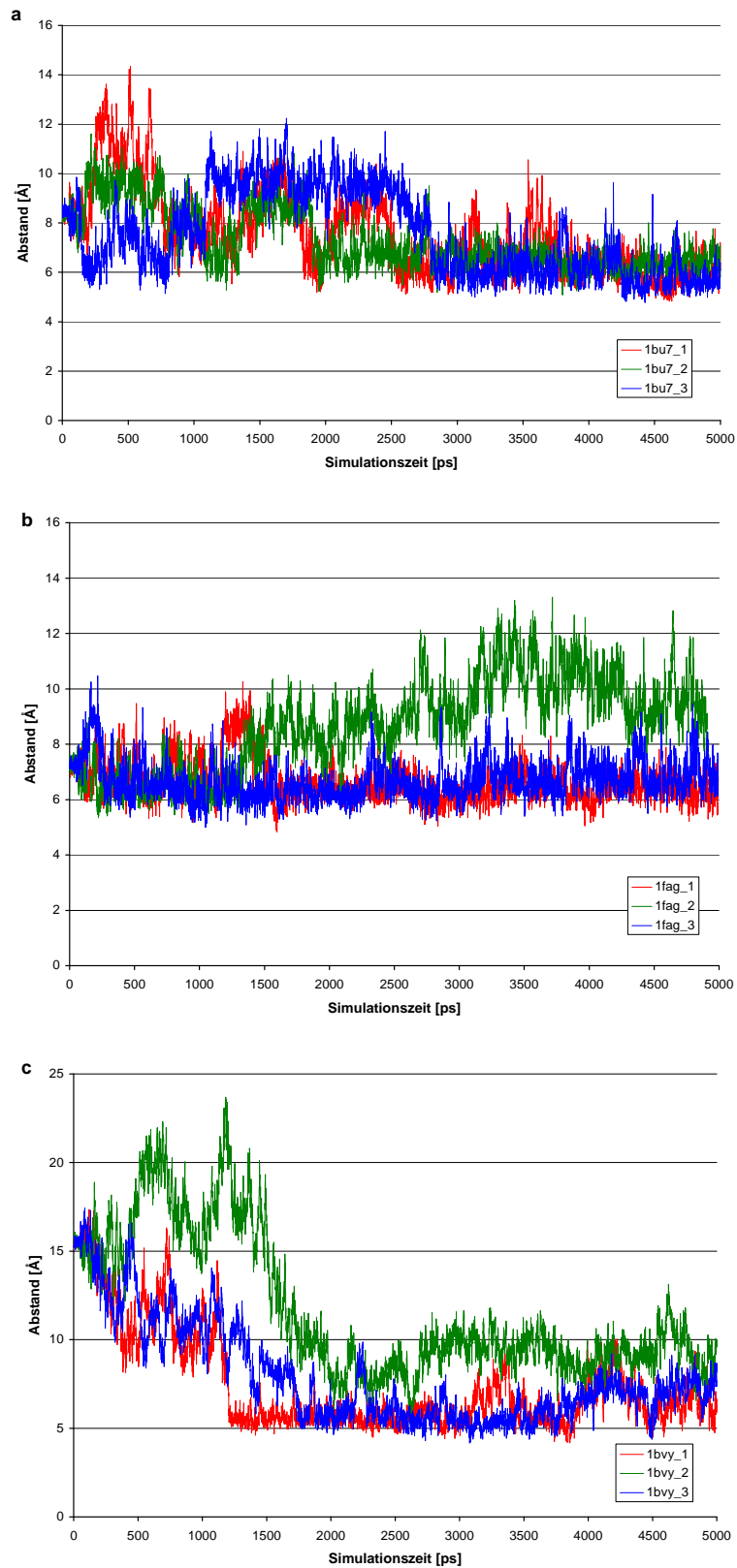


Abbildung 29: Verlauf der Öffnung des Substratzugangskanals während der Simulation. Es wurde der Abstand zwischen den C_{α} -Atomen der beiden Aminosäuren P45 und A191 während der Simulation gemessen.

5.1.5 MD-Simulationen von P450 BM-3 mit β -Ionon

Für die Simulationen mit Substrat wurde als Startstruktur die Struktur aus der Simulation 1BU7_1 nach 2 ns Simulationszeit verwendet. Die Simulation 1BU7_1 zeigt die geringste Abweichung von der Startstruktur und befindet sich nach 2 ns bereits in einem stabilen Gleichgewichtszustand (Abbildung 28). Für die Simulationen der Mutanten wurde die Aminosäure Phe87 *in silico* durch Ala und Val ausgetauscht. In die Strukturen des Wildtyp-Enzyms und der beiden Mutanten F87A und F87V wurde das Substrat β -Ionon *gedockt*. Nach dem *docking* wurde, ebenfalls mit AutoDock, eine Clusteranalyse der Substratkonformationen durchgeführt. Für die MD-Simulationen wurde für das Wildtyp-Enzym und die beiden Mutanten jeweils ein Enzym-Substrat-Komplex aus den drei bestbewerteten Clustern (die drei Cluster mit der niedrigsten Energie) ausgewählt. Es wurden also für das Wildtyp-Enzym und die Mutanten F87A und F87V jeweils drei Simulationen mit einer unterschiedlichen Startkonformation des β -Iononmoleküls durchgeführt. Die Simulationen wurden entsprechend als wt_1-3, F87A_1-3 und F87V_1-3 bezeichnet. Um ein effizienteres Durchsuchen des Konformationsraumes während der Simulationen zu ermöglichen, wurden von den Startstrukturen wt_1-3, F87A_3 und F87V_3 zusätzliche Simulationen mit einer anderen anfänglichen Geschwindigkeitsverteilung durchgeführt. Diese Simulationen sind entsprechend mit den Buchstaben a, b und c gekennzeichnet (Tabelle 11).

5.1.5.1 Analyse der Öffnung des Substratzugangskanals

Für die Simulationen mit Substrat wurde die Öffnung des Substratzugangskanals während der Simulation gemessen. (Abbildung 30 und Anhang 9.3). Die Startstrukturen der Simulationen weisen eine Öffnung des Eingangskanals von 7,8 Å auf. Während der Simulationen beobachtet man Öffnungs- und Schließbewegungen. Wie bei den Simulationen ohne Substrat beobachtet man im Gleichgewicht bevorzugt eine Distanz von 6 bis 7 Å bzw. 10 bis 12 Å. Für die Simulationen mit Substrat beobachtet man in einigen Fällen, beispielsweise in der Simulation F87A_1, zusätzlich eine Distanz von 14-16 Å (Abbildung 30b). Während man bei den Simulationen ohne Substrat nach 5 ns in allen neun Simulationen eine geschlossene Konformation des Eingangskanals beobachtet, beobachtet man bei den Simulationen mit Substrat jeweils zwölf geschlossene und zwölf geöffnete Konformationen.

Tabelle 11: Übersicht über die durchgeführten MD-Simulationen. Für die Simulationen ohne Substrat wurden für die Kristallstrukturen 1BU7, 1FAG und 1BVY jeweils drei Simulationen von 5 ns mit einer unterschiedlichen anfänglichen Geschwindigkeitsverteilung durchgeführt. Für die Simulationen mit dem Substrat β -Ionon wurden für das Wildtyp-Enzym und die beiden Mutanten jeweils drei Simulationen mit unterschiedlichen Konformationen des β -Ionons aus dem *docking* durchgeführt. Einige Simulationen wurden zusätzlich mit unterschiedlichen anfänglichen Geschwindigkeitsverteilungen durchgeführt. Diese Simulationen sind mit den Buchstaben a, b und c gekennzeichnet.

Enzym	Bezeichnung Simulation	Anzahl Simulationen	Simulationszeit [ns]
ohne Substrat		9	45
1bu7	1bu7_1	3	5
	1bu7_2		5
	1bu7_3		5
1fag	1fag_1	3	5
	1fag_2		5
	1fag_3		5
1bvy	1bvy_1	3	5
	1bvy_2		5
	1bvy_3		5
mit Substrat		24	144
Wildtyp	WT_1	12	6
	WT_2		6
	WT_3		6
	WT_1abc		6
	WT_2abc		6
	WT_3abc		6
	F87A		6
F87A_1	6		
F87A_2	6		
F87A_3	6		
F87V	F87A_3abc	6	6
	F87V_1		6
	F87V_2		6
	F87V_3		6
	F87V_3abc		6

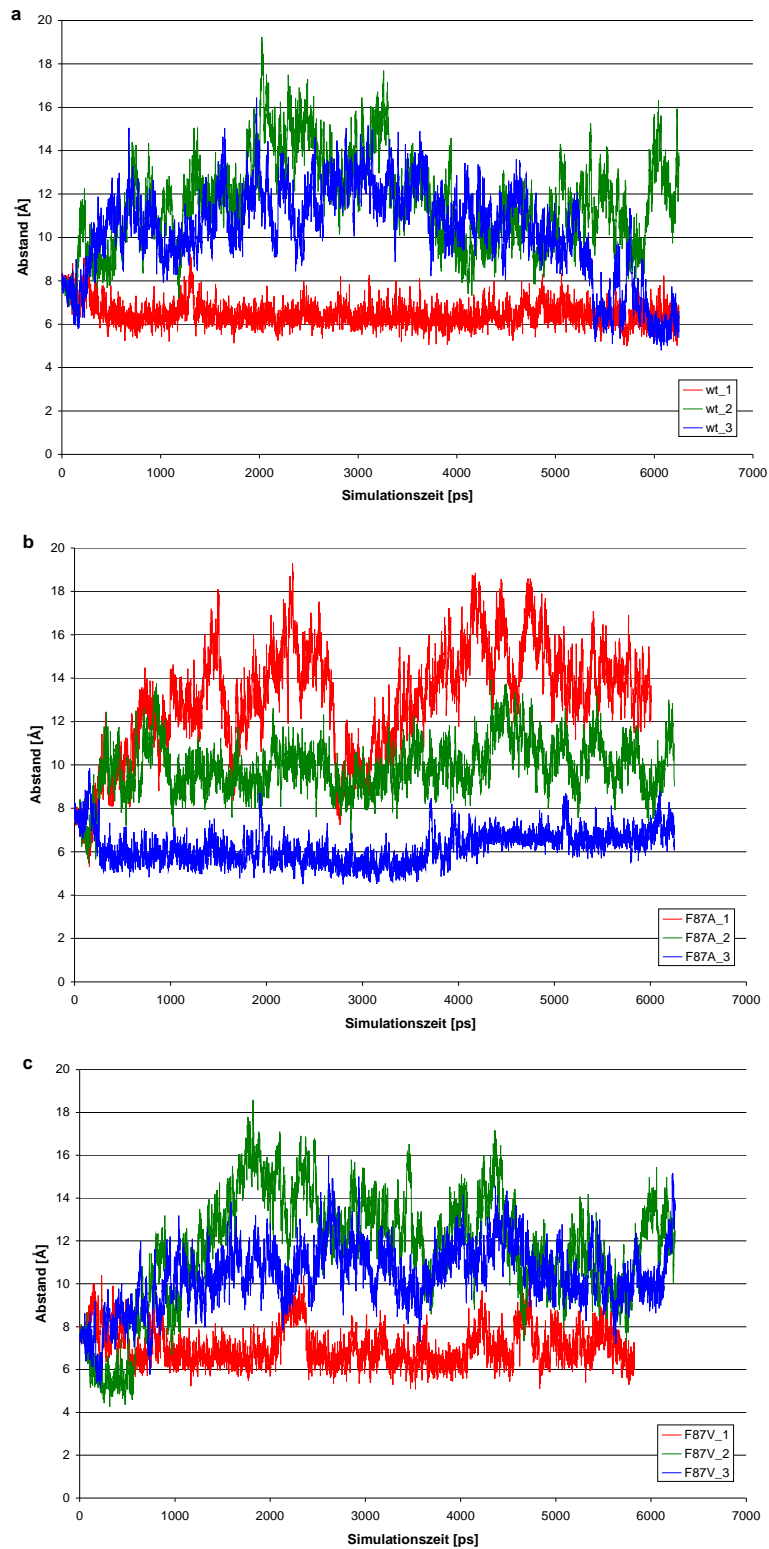


Abbildung 30: Verlauf der Öffnung des Substratzugangskanals während der Simulation. Es wurde der Abstand zwischen den C_{α} -Atomen der beiden Aminosäuren P45 und A191 während der Simulation gemessen.

5.1.5.2 Einfluss der Mutanten auf die Aktivität

Zur Untersuchung der unterschiedlichen Aktivität der Mutanten gegenüber der Hydroxylierung von β -Ionon zu 4-OH- β -Ionon wurde in den Simulationen die Distanz zwischen dem reaktiven Sauerstoffatom der Hämgruppe und den beiden Wasserstoffatomen H(16) und H(17) am Kohlenstoffatom C(14) des β -Iononmoleküls gemessen (Abbildung 31).

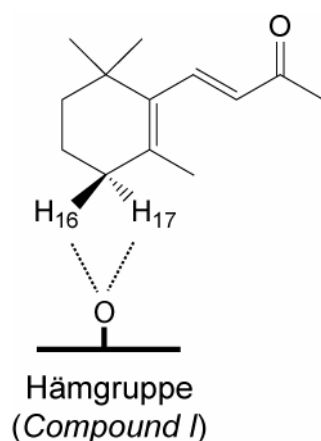


Abbildung 31: Distanz zwischen dem reaktiven Sauerstoffatom der Hämgruppe (*compound I*) und den beiden Wasserstoffatomen an Position 14 des β -Iononmoleküls.

Für die einzelnen Simulationen kann man einen unterschiedlichen Verlauf der Distanz zwischen dem Sauerstoffatom der Hämgruppe und den beiden Wasserstoffatomen an Position 14 des Substrates erkennen. Für drei Simulationen ist in Abbildung 32 der Verlauf der Distanzen während der Simulation dargestellt. In der Simulation F87A_1 befinden sich die beiden Wasserstoffatome 16 und 17 des β -Iononmoleküls zu Beginn der Simulation $> 8 \text{ \AA}$ entfernt von der Hämgruppe. Während der Simulation wandert das Substrat nur etwas in die Nähe der Hämgruppe, ist aber immer mindestens 6 \AA entfernt (Abbildung 32a). In der Simulation F87A_3a liegt das Substrat bereits in der Startstruktur des *docking* in einer Position nahe der Hämgruppe, die eine Hydroxylierung an der 4-Position ermöglicht. Während der Simulation verbleibt es 5 ns in der Nähe der Hämgruppe und wandert danach von der Hämgruppe weg (Abbildung 32b). In der Simulation F87A_3b nimmt das β -Ionon zu Beginn eine Konformation in der Nähe der Hämgruppe ein und entfernt sich dann nach 2 ns von der Hämgruppe, um sich nach weiteren 2 ns wieder zurückzubewegen (Abbildung 32c).

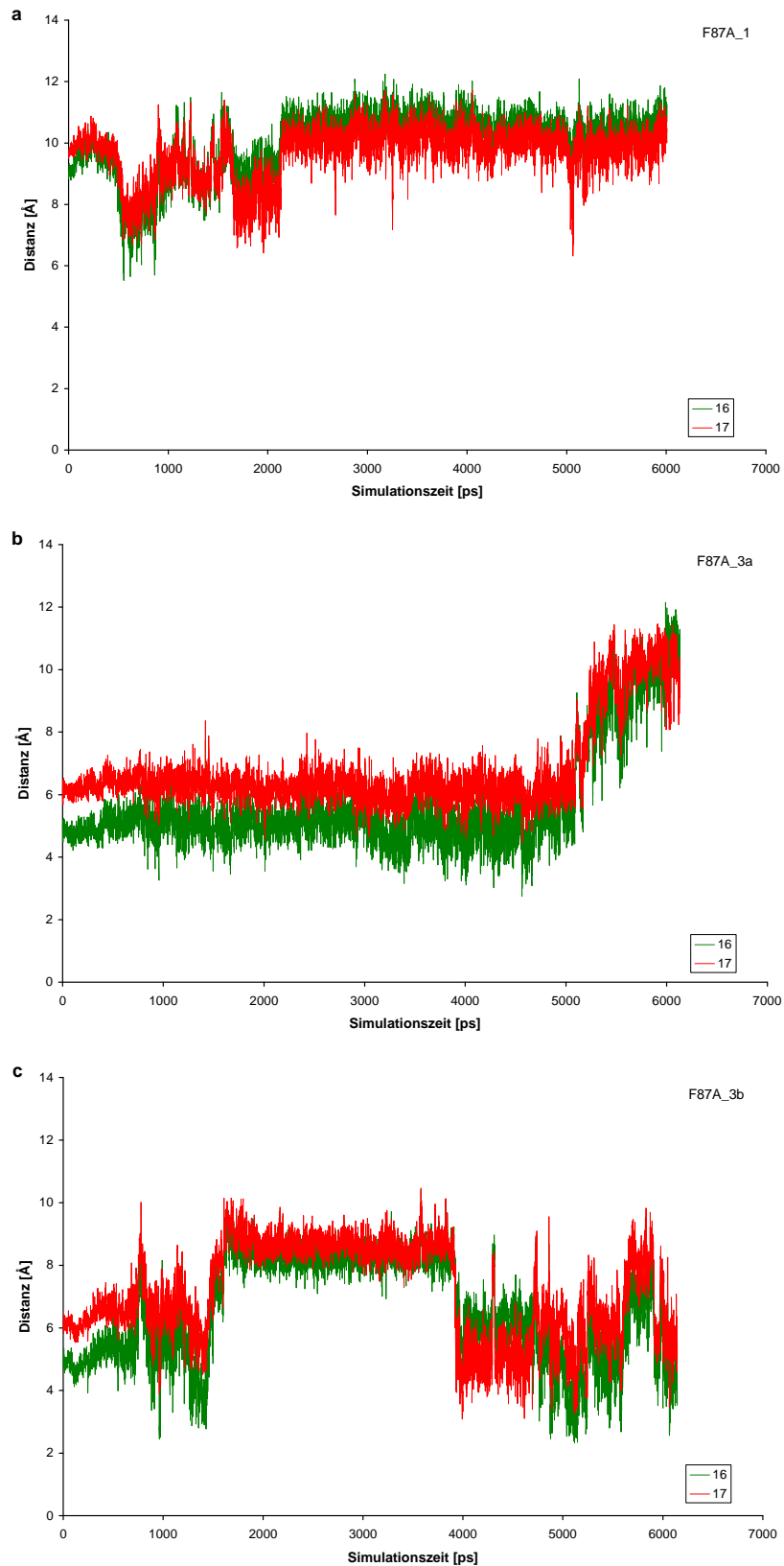


Abbildung 32: Verlauf der Distanz zwischen dem reaktiven Sauerstoffatom der Hämgruppe und den beiden Wasserstoffatomen 16 und 17 des Substrats β -Ionon während der MD-Simulationen F87A_1 (a), F87A_3a (b) und F87A_3b (c).

Damit eine Hydroxylierung an Position 4 des β -Iononmoleküls möglich ist, muss das Molekül mit einem der beiden Wasserstoffatome 16 bzw. 17 in die Nähe der Hämgruppe gelangen. Um eine Abstraktion des Wasserstoffatoms zu ermöglichen, ist ein Abstand von $< 5 \text{ \AA}$ nötig. Zur Analyse des Einflusses der Mutationen F87A und F87V auf die Enzymaktivität wurde die Häufigkeitsverteilung der Distanzen zwischen dem reaktiven Häm-Sauerstoffatom und den beiden Wasserstoffatomen 16 und 17 des β -Iononmoleküls berechnet (Abbildung 33). Man erkennt, dass Distanzen $< 5 \text{ \AA}$ bevorzugt für die Mutanten F87V und F87A auftreten und in den Simulationen des Wildtyp-Enzyms das Substrat nur sehr selten in die Nähe der Hämgruppe gelangt. Die kumulierte Häufigkeit der Distanzen bis 5 \AA beträgt für den Wildtyp 3 %, für die Mutante F87A 9 % und für die F87V 23 %. Das *ranking* der kumulierten Häufigkeit entspricht dem *ranking* der experimentell beobachteten Aktivitäten: Wildtyp ($< 1 \text{ min}^{-1}$) $<$ F87A (93 min^{-1}) $<$ F87V (115 min^{-1}).

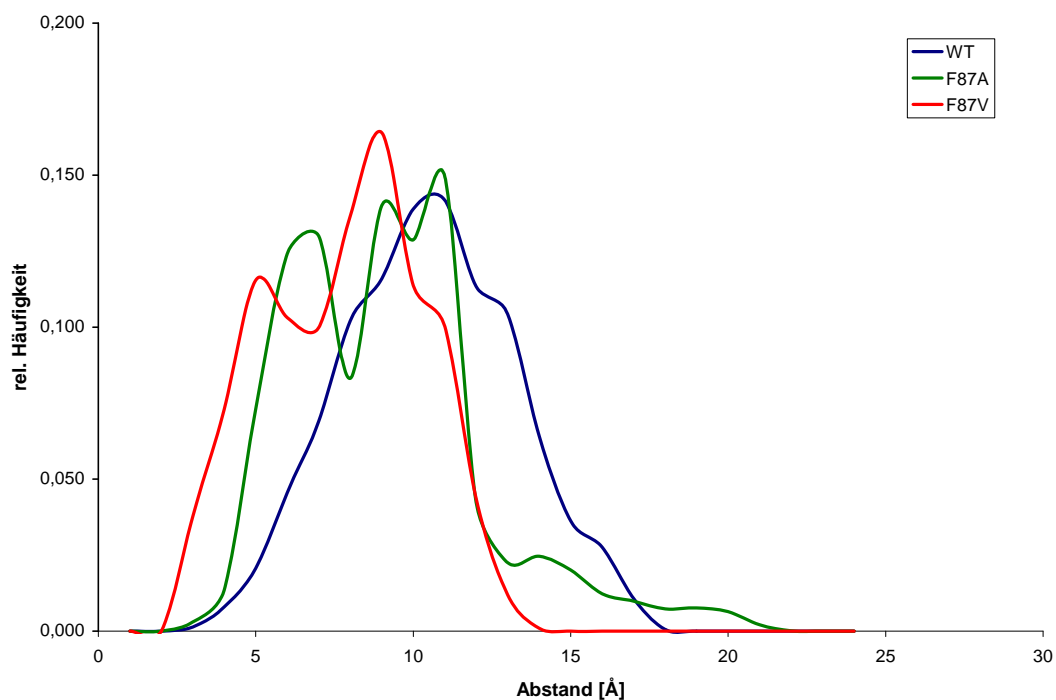


Abbildung 33: Häufigkeitsverteilung der Distanzen zwischen dem reaktiven Häm-Sauerstoffatom und den beiden Wasserstoffatomen 16 und 17 des β -Iononmoleküls. Für die Häufigkeitsverteilung wurden alle 24 Simulationen mit Substrat ausgewertet. (Wildtyp: blau, F87A: grün, F87V: rot)

5.1.5.3 Einfluss der Mutanten auf die Stereoselektivität

Bei dem Substrat β -Ionon handelt es um eine prochirale Verbindung. Das Molekül enthält ein prochirales Zentrum am Kohlenstoffatom C(4). Die Abstraktion eines der beiden enantiotopen Wasserstoffatome H(16) (*pro-S*) bzw. H(17) (*pro-R*) durch *compound I* führt im anschließenden *rebound*-Schritt zur Bildung des chiralen 4-Hydroxyproduktes. Die *in silico*-Untersuchungen erlauben es, zwischen den beiden Wasserstoffatomen H(16) und H(17) zu unterscheiden. Die Abstraktion des Wasserstoffatoms H(16) führt zur anschließenden Bildung von (*S*)-4-Hydroxy- β -Ionon, wohingegen die Abstraktion des Wasserstoffatoms H(17) zur Bildung von (*R*)-4-Hydroxy- β -Ionon führt (Abbildung 34).

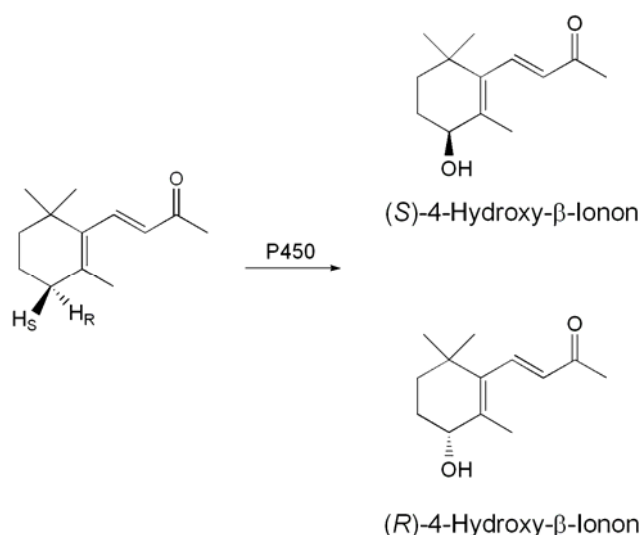


Abbildung 34: Die Abstraktion des Wasserstoffatoms H(16) (*pro-S*) durch *compound I* führt im Folgenden *rebound*-Schritt zur Bildung von (*S*)-4-Hydroxy- β -Ionon. Die Abstraktion des Wasserstoffatoms H(17) (*pro-R*) führt zur Bildung von (*R*)-4-Hydroxy- β -Ionon.

Die getrennte Analyse der Häufigkeitsverteilungen der Distanzen zwischen der Hämgruppe und den beiden Wasserstoffatomen H(16) bzw. H(17) zeigt Unterschiede für die beiden Mutanten und den Wildtyp. Für den Wildtyp zeigt sich für Distanzen $< 5 \text{ \AA}$ eine einheitliche Verteilung der Abstände zu dem Wasserstoffatom H(16) bzw. H(17) (Abbildung 35a). Aus der Modellierung ergibt sich somit für den Wildtyp keine Präferenz für die Bildung eines der beiden Enantiomeren. Für die Mutante F87V ergibt sich eine gehäufte Anzahl von Distanzen $< 5 \text{ \AA}$, die zur Abstraktion des Wasserstoffatoms H(17) und damit zur Bildung des (*R*)-Hydroxyproduktes führen (Abbildung 35b). Für F87A hingegen zeigt sich eine Präferenz für

die Abstraktion des Wasserstoffatoms H(17) und damit für die Bildung des (*S*)-Hydroxyproduktes (Abbildung 35c).

Experimentelle Daten zur Enantioselektivität waren lediglich für die Dreifachmutante R47L Y51F F87V bekannt. Sie zeigt eine mäßige Enantioselektivität zur Bildung von (*R*)-4-Hydroxy- β -Ionon mit einem Enantiomerenüberschuss von 39 %. Da die beiden Mutationen R47L und Y51F im Bereich des Substratzugangskanals (also weit entfernt vom aktiven Zentrum) liegen, sollten diese keinen Einfluss auf die Stereoselektivität der Reaktion haben und man erwartet für die Einfachmutante F87V eine mäßige Präferenz des (*R*)-Enantiomers. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der Modellierung. Nach dem Curtis-Hammett-Prinzip²⁵⁵ sollte das Verhältnis der beiden Enantiomeren in erster Annäherung die Energiedifferenz der beiden möglichen Konformeren im Übergangszustand widerspiegeln. Mittels der durchgeführten MD-Simulationen und der Analyse der Distanzen zwischen der Hämgruppe und den beiden Wasserstoffatomen H(16) und H(17) des β -Iononmoleküls wurden geometrische Faktoren und Konformationen des Eduktes berücksichtigt. Im Falle der Hydroxylierung von C–H Gruppen durch P450-Monooxygenasen ist der Schritt der Wasserstoffabstraktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.⁵⁰⁻⁵³ Man erwartet folglich einen sogenannten frühen, eduktähnlichen Übergangszustand. Damit sollte der Übergangszustand geometrisch ähnlich dem Edukt sein, welches in den Simulationen verwendet wurde. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten MD-Simulationen werden jedoch keine Übergangszustände berücksichtigt und es können keine quantitativen Enantiomerenüberschüsse vorhergesagt werden, sondern lediglich qualitative Verhältnisse der erwarteten Enantiomeren. Für die hier durchgeführten Simulationen erwartet man für die Mutante F87V eine höhere Selektivität für das (*R*)-Enantiomer im Vergleich zur F87A-Mutante. Darüber hinaus ist zu beachten, dass es sich bei einem mäßigen Enantiomerenüberschuss von 39 %, wie er für die Dreifachmutante R47L Y51F F87V experimentell beobachtet wurde, nur geringe Energieunterschiede auftreten. Darüber hinaus stehen für eine Einordnung der Modellierungsergebnisse keine experimentellen Daten über die Enantioselektivität des Wildtyp-Enzyms zur Verfügung, da der Wildtyp keine Aktivität gegenüber dem Substrat β -Ionon zeigt.

Zur Validierung der *in silico*-Ergebnisse wurde die Enantioselektivität der beiden Einfachmutanten F87A und F87V experimentell bestimmt. Aufgrund der experimentellen Daten der Dreifachmutante und den Ergebnissen der Modellierung erwartet man für die Mutante F87V eine Präferenz für das (*R*)-Enantiomer und für die F87A-Mutante eine im Vergleich zu F87V geringere (*R*)-Selektivität vorhergesagt.

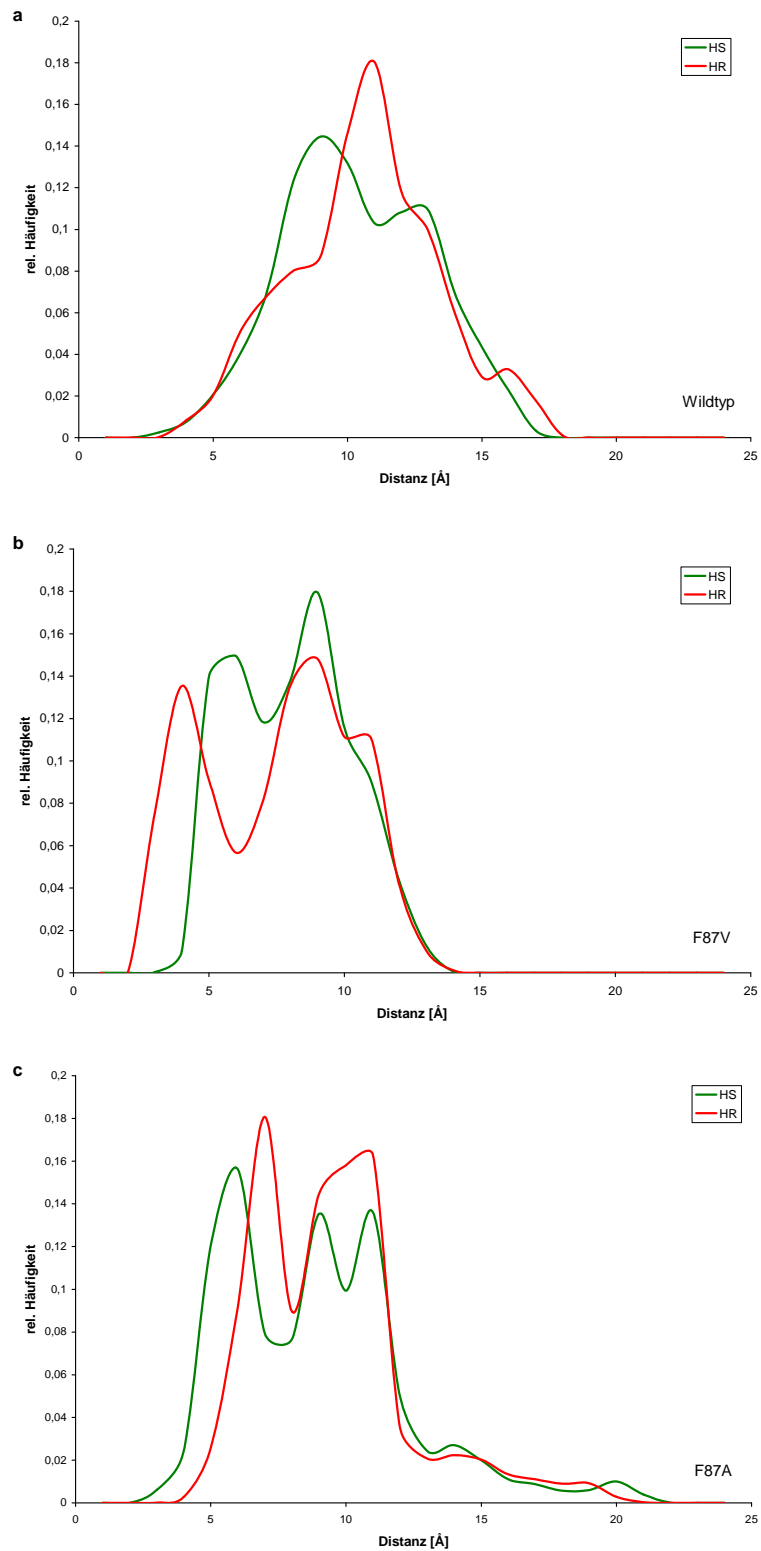


Abbildung 35: Häufigkeitsverteilung der Distanzen zwischen dem reaktiven Häm-Sauerstoffatom und den beiden Wasserstoffatomen H(16) und H(17) des β -Iononmoleküls für den Wildtyp (a), die Mutante F87V (b) und F87A (c). (Abstand zu H(16) (S): grün; Abstand zu H(17) (R): rot)

5.1.6 Experimentelle Untersuchung der Enantioselektivität von P450 BM-3 gegenüber β -Ionon

Die Umsetzung von β -Ionon durch die P450 BM-3-Mutanten F87A und F87V erfolgte in einer Ganzzellreaktion. Das Rohextrakt wurde mittels Diethylether extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und mittels GC/MS analysiert. Man erkennt neben dem Substrat-*peak* von β -Ionon einen weiteren *peak*, der als 4-OH- β -Ionon identifiziert werden konnte (Abbildung 36a). Das Produkt 4-OH- β -Ionon konnte chromatographisch über Kieselgel aus dem Rohextrakt abgetrennt werden (Abbildung 37). Die entsprechende GS/MS-Analyse zeigt das entsprechende aufgereinigte Produkt 4-OH- β -Ionon (Abbildung 36b).

Die Trennung der Enantiomere erfolgte in der Arbeitsgruppe von S. Laschat (Stuttgart)¹ mittels HPLC an einer chiralen Säule (Chiralcel OD-H-Säule). Als Standard für die HPLC-Analyse wurde ein racemisches Gemisch von chemisch synthetisiertem 4-OH- β -Ionon verwendet. Die Retentionszeiten und Integrale der beiden Signale der HPLC-Analyse sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die Zuordnung der Signale zu den beiden Enantiomeren erfolgte anhand von Literaturdaten²⁵⁶ und konnte durch Messung der optischen Drehwerte bestätigt werden. Die Mutante F87V zeigt eine mäßige Enantioselektivität zur Bildung von (*R*)-4-Hydroxy- β -Ionon mit einer optischen Reinheit von 30 %. Die Mutante F87A zeigt einen geringeren Enantiomerenüberschuss (*ee*) von 14 % für (*R*)-4-Hydroxy- β -Ionon. Dies entspricht der Vorhersage aus den MD-Simulationen über die qualitativen Enantiomerenverhältnisse der beiden Mutanten.

Die F87V-Einfachmutante liegt mit einem *ee* von 30 % für das (*R*)-Produkt in der Größenordnung der Dreifachmutante R47L Y51F F87V mit einem *ee* von 39 % für das (*R*)-Produkt. Die beiden Mutationen R47L und Y51F im Bereich des Substratzugangskanals zeigen also, wie erwartet, keinen Einfluss auf die Stereoselektivität der Reaktion.

¹ Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart

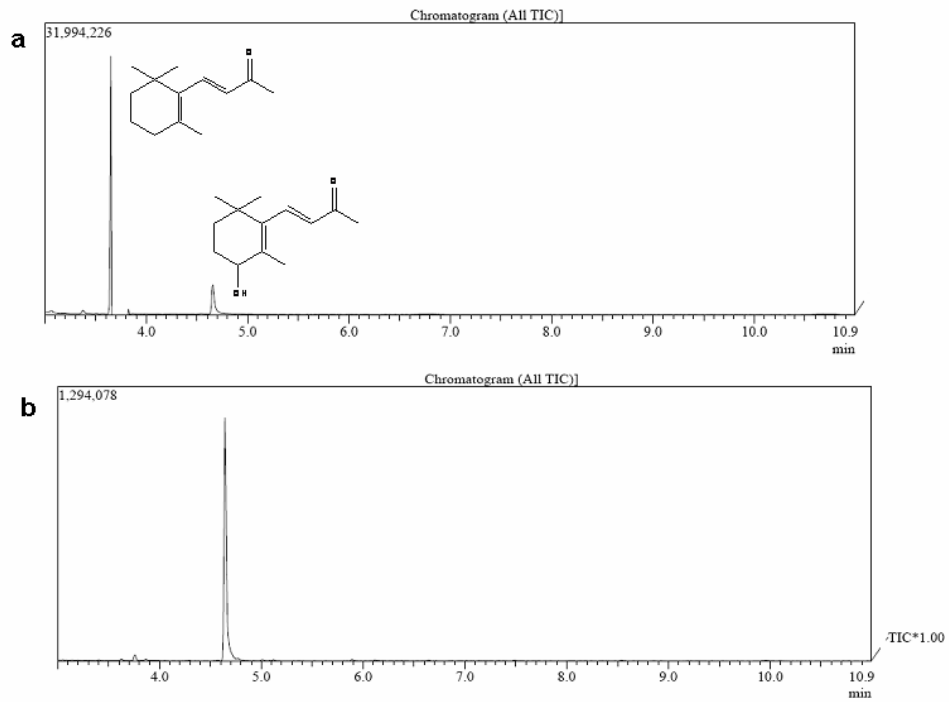


Abbildung 36: Gaschromatogramm der GC/MS-Analyse des Rohextraktes der Ganzzellreaktion von P450 BM-3 mit β -Ionon (a) und des aufgereinigten Produktes 4-OH- β -Ionon (b).

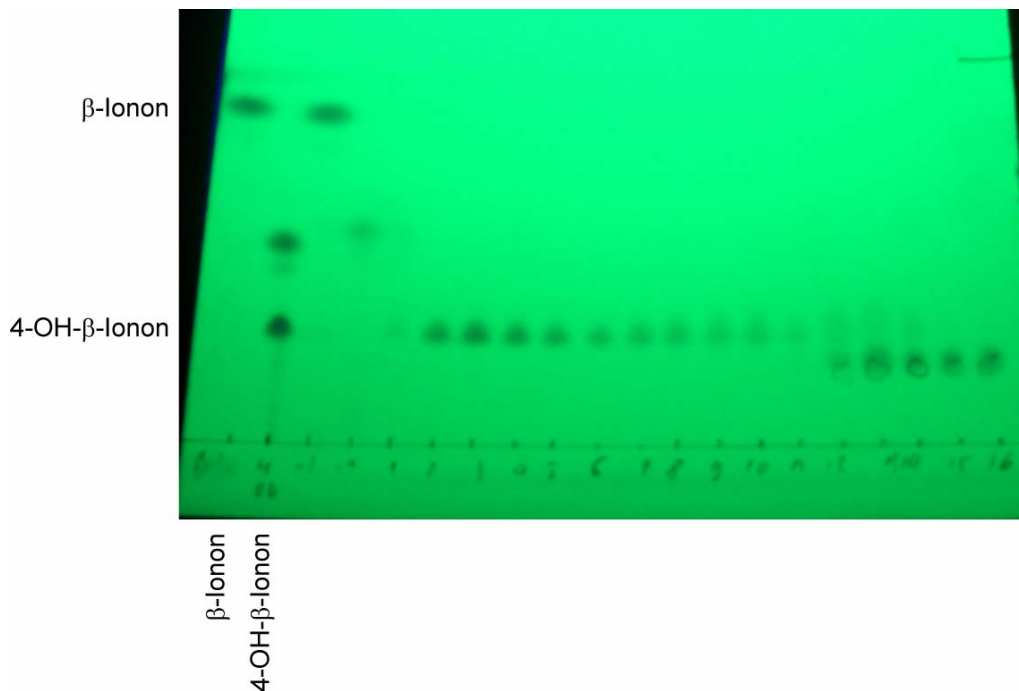


Abbildung 37: Aufreinigung des Rohextraktes der Ganzzellreaktion. 4-OH- β -Ionon konnte chromatographisch über Kieselgel (THF : PE 1:4) aus dem Rohextrakt abgetrennt werden.

Tabelle 12: Analyse der Enantiomeren von 4-OH- β -Ionon mittels HPLC an einer chiralen Säule. Es sind die Retentionszeiten und Integrale der beiden Signale angegeben. Die Zuordnung der Signale zu den beiden Enantiomeren erfolgte anhand von Literaturdaten und konnte durch Messung der optischen Drehung bestätigt werden. Es konnten aufgrund der Konzentration keine absoluten Drehwerte gemessen werden, jedoch konnte die Drehrichtung bestimmt werden. Für F87V wurde ein größerer Drehwert als für F87A beobachtet. (Literaturwerte: (-)-(R)-4-Hydroxy- β -Ionon $[\alpha]_D = +13^\circ$ (c=1,6; CHCl₃))²⁵⁷

	Peak A	Peak B	<i>Ee</i>	$[\alpha]_D$ (CHCl ₃)
Racemisches Gemisch	19,1 min 50 %	21,5 min 50 %		
F87A	17,9 min 43 %	20,2 min 57 %	<i>ee</i> 14 %	+ (R)-4-Hydroxy- β -Ionon
F87V	16,3 min 35 %	18,4 min 65 %	<i>ee</i> 30 %	++ (R)-4-Hydroxy- β -Ionon

Durch molekulare Modellierung konnte ein Modell des Einflusses der Mutanten auf die Aktivität, Regioselektivität und Stereoselektivität der Hydroxylierung von β -Ionon durch P450 BM-3 erstellt werden. Die hohe Regioselektivität der Hydroxylierung von β -Ionon wird durch die hohe intrinsische Reaktivität der 4-Position des β -Iononmoleküls bestimmt. Die unterschiedliche Aktivität der Mutanten konnte durch die molekulardynamischen Simulationen und eine statistische Auswertung der Abstände zwischen der reaktiven Position 4 des Moleküls und der Hämgruppe erklärt werden. Im Wildtyp-Enzym blockiert die sperrige Aminosäure Phenylalanin den Zugang zur Hämgruppe und erschwert den Zugang für Substrate. Die MD-Simulationen zeigten einen Einfluss der Mutationen auf die Enantioselektivität der β -Ionon-Hydroxylierung. Die experimentelle Untersuchung der Enantioselektivität zeigt für die Mutante F87V, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Modellierung, eine Präferenz für die Bildung des (R)-Enantiomeren. Für F87A beobachtet man einen Rückgang des Anteils des (R)-Enantiomeren gegenüber F87A. Dieser Trend lässt sich qualitativ durch die Modellierungsergebnisse erklären.

5.2 Isoformspezifische Regioselektivität der humanen Leber-CYPs 3A4 und 2D6

Die humanen P450-Monooxygenasen der Leber besitzen ein außergewöhnlich breites Substratspektrum chemisch verschiedener Verbindungen. Die verschiedenen Substrate werden jedoch zum Teil mit hoher Selektivität und Spezifität umgesetzt. Bei der Metabolisierung von Substraten können verschiedene Metabolite entstehen und häufig kann die Bildung isoformspezifischer Metabolite beobachtet werden. Das Arzneimittel Dextromethorphan, ein Hustenblocker (*Antitussivum*) aus der Gruppe der Opiate, ist ein solcher Wirkstoff, der isoenzym-spezifischer Metabolisierung durch CYP3A4 und CYP2D6 unterliegt.⁸⁸ CYP3A4 katalysiert bevorzugt die Demethylierung am Stickstoffatom, CYP2D6 hingegen die Demethylierung am Sauerstoffatom. Die molekularen Grundlagen dieser isoformspezifischen Regioselektivität sollen im Folgenden untersucht werden. Ziel ist es, ein generelles und prädiktives Modell der isoformspezifischen Regioselektivität von CYP3A4 und CYP2D6 zu entwickeln. Das Modell soll es dem Anwender anhand einfacher Regeln ermöglichen, die Position der Metabolisierung eines Substrates durch CYP3A4 und CYP2D6 vorherzusagen. Die Untersuchung der molekularen Grundlagen der Aktivität und Regioselektivität von P450 BM-3 gegenüber β -Ionon (Kapitel 5.1) ergab zwei wesentliche Einflüsse. Einerseits die intrinsische Reaktivität der einzelnen Positionen des Substrats und andererseits die Zugänglichkeit der reaktiven Hämgruppe in P450 BM-3. Dieses Ergebnis war der Ausgangspunkt für die Untersuchungen zur isoformspezifischen Regioselektivität. Es soll geprüft werden, in wieweit sich die für P450 BM-3 erzielten Ergebnisse, der Einfluss von Reaktivität und Zugänglichkeit, auf andere P450-Isoenzyme übertragen lassen.

5.2.1 Systematische Analyse der Bindetaschenarchitektur von P450-Isoenzymen

Eine systematische Analyse der Bindetaschenarchitektur verschiedener P450-Enzyme mittels VOIDOO wurde unter meiner Anleitung von Michael Krahn im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt.²⁵⁸ Die Analyse zeigte, dass die Form der Bindetasche und somit das für ein

potenzielles Substrat zur Verfügung stehende Volumen, durch vier Bereiche abgegrenzt wird. Hierzu gehören der B-C- und F-G-loop-Bereich, die I-Helix (SRS4) sowie der SRS5-Bereich (Abbildung 38).

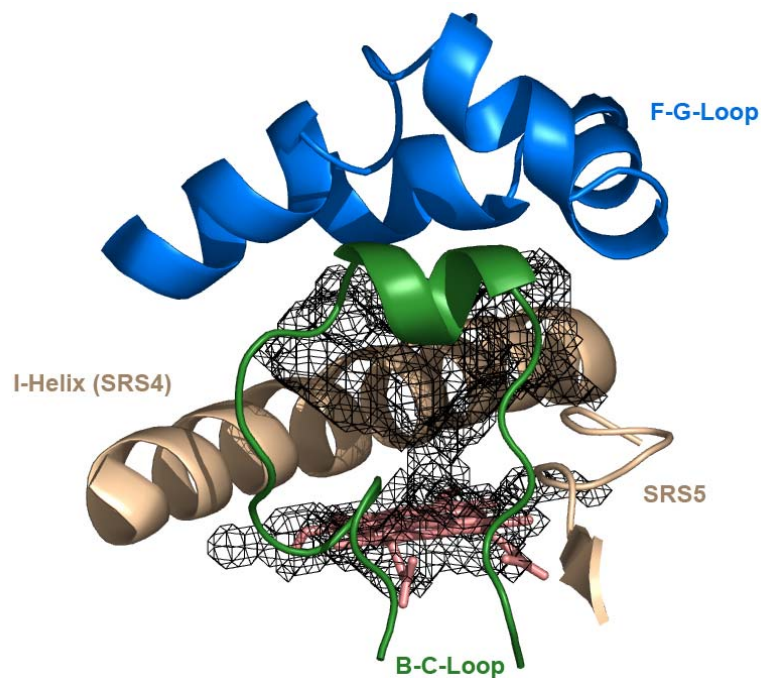


Abbildung 38: Bindetaschenarchitektur von P450 CYP2C9 (PDB-Eintrag 1OG5). Das Volumen der Bindetasche wird durch vier Bereiche der Proteinstruktur begrenzt: F-G-loop (blau) und B-C-loop (grün) sowie I-Helix (beige) und SRS5 (beige). Das Gitternetz visualisiert das für Wassermoleküle zugängliche Volumen der Bindetasche.

Molekulardynamische Simulationen zeigten eine starke Flexibilität sowohl im F-G- wie auch im B-C-loop-Bereich.²⁵⁹ Diese Bereiche gehören folglich nur indirekt zu den volumenbestimmenden Regionen und scheinen sich Substratgrößen in einem gewissen Maße anpassen zu können. Im Gegensatz hierzu gehören die I-Helix (SRS4) und der SRS5-Bereich zum definierten P450-Kern. In MD-Simulationen zeigten diese Bereiche nur eine sehr geringe Flexibilität und die Konformationen der Aminosäure-Seitenketten waren ausgesprochen rigide. Der Aminosäuretyp und insbesondere die Größe der Seitenketten scheinen volumenbegrenzende Faktoren darzustellen. Speziell im Bereich unmittelbar oberhalb der reaktiven Hämgruppe haben Seitenketten Einfluss auf die Zugänglichkeit zur Hämgruppe. Die voluminöse Bindetasche und die Hämgruppe selbst sind über einen Kanal verbunden, der durch die I-Helix und die Aminosäuren im Bereich der SRS5 begrenzt wird (Abbildung 38). Durch eine systematische Analyse der Bindetaschenarchitektur bekannter P450-Strukturen konnte der im SRS5-Bereich liegende β -Faltblattstrang (β 1-4) als maßgeblich für die

Hämzugänglichkeit identifiziert werden. Durch die in diesem Bereich vorkommenden Aminosäuren und die sich dadurch ausbildende Sekundärstruktur lassen sich Proteinstrukturen von P450-Monooxygenasen nach der Zugänglichkeit der reaktiven Hämgruppe klassifizieren. Die beiden Enzyme CYP2D6 und CYP3A4 können aufgrund der Zugänglichkeit zur Hämgruppe in verschiedenen Klassen eingeordnet werden. CYP2D6 gehört zur Klasse der CYPs mit einem engen Hämzugangskanal, während in CYP3A4 die Hämzugänglichkeit nicht eingeschränkt ist (Abbildung 39).

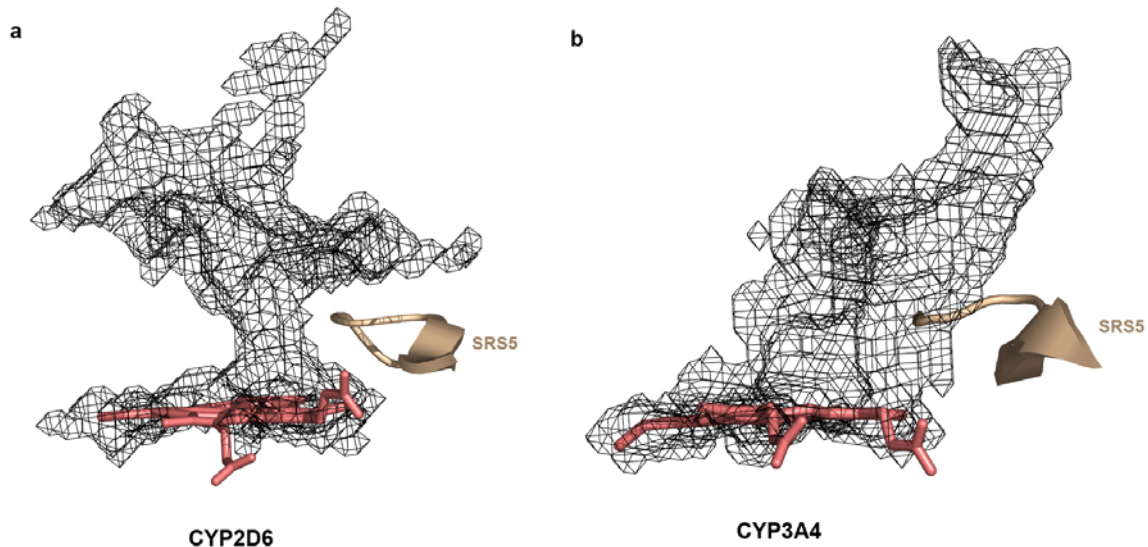


Abbildung 39: Architektur der Bindetaschen von CYP2D6 (a) und CYP3A4 (b). In CYP2D6 ist der Zugang zur Hämgruppe durch einen Zugangskanal begrenzt. In CYP3A4 hingegen ist der Zugang zur Hämgruppe sterisch nicht eingeschränkt.

5.2.2 Isoenzym-spezifischer Metabolismus von Dextromethorphan

Das Arzneimittel Dextromethorphan, ein *Antitussivum*, unterliegt isoenzym-spezifischer Metabolisierung durch CYP3A4 und CYP2D6.⁸⁸ CYP3A4 katalysiert bevorzugt die Demethylierung am Stickstoffatom und CYP2D6 bevorzugt die Demethylierung am Sauerstoffatom. Auf diese Weise wird Dextromethorphan im ersten Schritt von CYP3A4 zu Methoxymorphan und von CYP2D6 zu Dextrorphan metabolisiert. Anschließend kann in einem weiteren Metabolisierungsschritt der Metabolit Hydroxymorphan gebildet werden. Dies geschieht durch N-Demethylierung von Dextrorphan mittels CYP3A4 bzw. durch O-Demethylierung von Methoxymorphan mittels CYP2D6 (Abbildung 40).

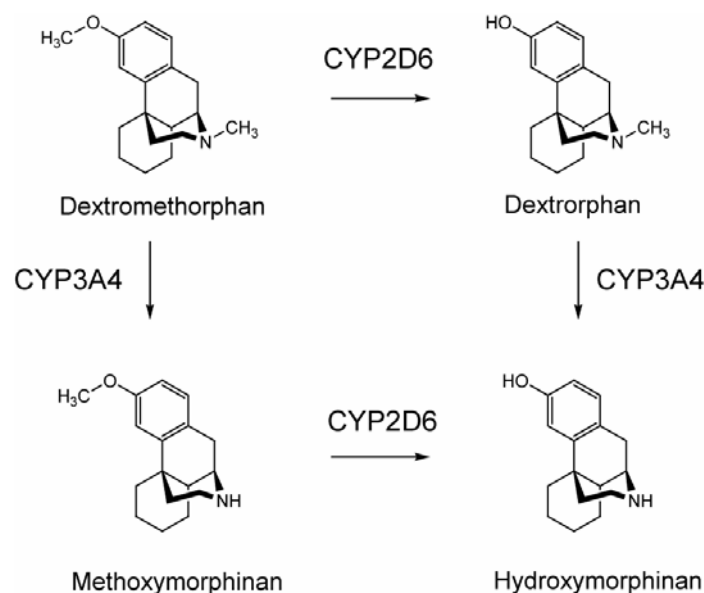
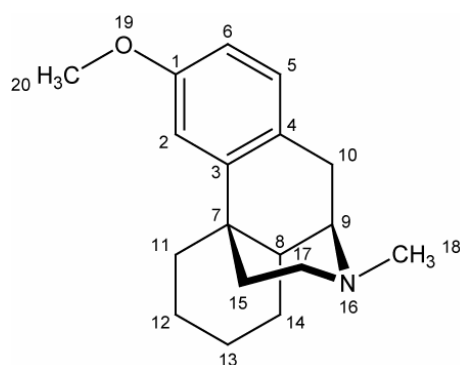


Abbildung 40: Die entstehenden Metabolite beim Metabolismus von Dextromethorphan durch die beiden Isoenzyme CYP3A4 und CYP2D6. CYP3A4 katalysiert bevorzugt die Demethylierung am Stickstoffatom, während CYP2D6 bevorzugt die Demethylierung am Sauerstoffatom katalysiert.⁸⁸

5.2.2.1 Chemische Reaktivität und sterische Zugänglichkeit von Dextromethorphan

Der Mechanismus der Hydroxylierung von C–H Gruppen durch Cytochrom P450-Monooxygenasen gehört zu den bestuntersuchten Reaktionsmechanismen dieser Superfamilie. Die höchste Energiebarriere entlang des Reaktionspfades wird für den Schritt der Wasserstoffabstraktion beobachtet. Deshalb ist es zur Abschätzung der intrinsischen Reaktivitäten des Substratmoleküls ausreichend, den Schritt der Wasserstoffabstraktion zu berücksichtigen. Zur Abschätzung der intrinsischen Reaktivitäten der einzelnen Positionen im Dextromethorphan-Molekül wurden die Bindungsdissoziationsenergien (BDE) der C-H-Bindungen mit PETRA^{252,253} berechnet. Dies erlaubt höher reaktive Positionen von schwächer reaktiven Positionen zu unterscheiden.



Position	Reaktion	BDE(kJ/mol)	$RDF_{3,5}$
9	Hydroxylierung	342	3,5
17	Hydroxylierung	354	2,8
18	N-Demethylierung	364	1,3
20	O-Demethylierung	418	0,6

Abbildung 41: Reaktivität und Zugänglichkeit im Dextromethorphan-Molekül. In der nebenstehenden Tabelle sind für die reaktivsten Positionen die BDE und die Werte des $RDF_{3,5}$ -Deskriptors aufgeführt.

Im Folgenden werden die theoretisch möglichen Reaktionspositionen betrachtet. Die reaktivste Position im Dextromethorphan-Molekül ist das Kohlenstoffatom 9 (Abbildung 41). Die BDE der zugehörigen C–H-Bindung beträgt 342 kJ/mol. Das bei der Reaktion entstehende tertiäre Kohlenstoffradikal in Nachbarstellung zum Stickstoffatom ist besonders stabilisiert. Bei der zweitreaktivsten Position handelt es sich um das C-Atom 17 (BDE 354 kJ/mol). Das entstehende sekundäre Radikal wird durch das nachbarständige Stickstoffatom stabilisiert. Nach der Hydroxylierung bildet sich ein cyclisches Halbaminale. Eine weitere reaktive Position ist das C-Atom 18 (BDE 364 kJ/mol). Die terminale Wasserstoffabstraktion führt zu einem primären Kohlenstoffradikal, das durch den benachbarten Stickstoff stabilisiert wird. Die anschließende Hydroxylierung der Methylgruppe in Nachbarstellung zum Stickstoffatom führt zu einem Halbaminale, das in einer Folgereaktion unter Demethylierung zum sekundären Amin weiterreagiert. Eine weitere, mit einer BDE von 418 kJ/mol jedoch weniger reaktive Position, ist das C-Atom 20 in Nachbarstellung zum Sauerstoffatom. Das entstehende C-Radikal wird durch das benachbarte Sauerstoffatom stabilisiert. Durch Hydroxylierung entsteht ein Halbacetal und unter anschließender Abspaltung der Methylgruppe entsteht ein Alkohol. Alle anderen C–H-Bindungen im Dextromethorphan-Molekül haben eine höhere BDE und sind damit weniger reaktiv. Man erkennt eine Korrelation zwischen der Stabilität der möglichen Radikale und der BDE und damit der Reaktivität. Neben der Reaktivität ist aber auch die sterische Zugänglichkeit der einzelnen Positionen im Molekül für eine Reaktion entscheidend. Als Maß für die sterische Zugänglichkeit wurde der RDF -Deskriptor verwendet. Es handelt sich um einen 3D-Deskriptor, der auf dem Prinzip der radialen Verteilungsfunktion (*radial distribution function RDF*) aufbaut.^{260,261} Zur Abschätzung der Zugänglichkeiten der einzelnen Positionen im Dextromethorphan-Molekül wurde jeweils der lokale $RDF_{3,5}$ -Deskriptor (für einen Radius

von 3,5 Å um die entsprechende Position des Moleküls) berechnet. Wie man anhand des berechneten $RDF_{3,5}$ erkennt (Abbildung 41), sind die beiden Positionen mit der höchsten Reaktivität, also Position 9 und 17, vom restlichen Molekül sterisch stark abgeschirmt. Eine Reaktion an diesen Positionen ist also aufgrund der sterischen Hinderung im Dextromethorphan-Molekül nicht möglich. Die Reaktionen an den beiden terminalen Positionen 18 und 20 hingegen sind sterisch möglich, wobei, bedingt durch die Form des Moleküls, die Position 20 (O-Demethylierung) sterisch besser zugänglich ist als die Position 18 (N-Demethylierung). Das Dextromethorphan-Molekül ist also durch zwei reaktive Seiten gekennzeichnet, auf der einen Seite befindet sich die O-Methyl-Gruppe, die weniger reaktiv aber besser zugänglich ist und auf der anderen Seite die N-Methyl-Gruppe, die reaktiver ist, aber auf der sperrigen Seite des Moleküls liegt (Abbildung 42).

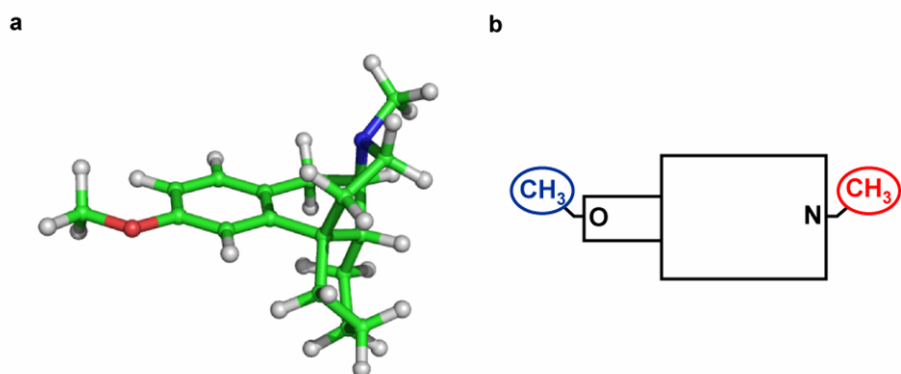


Abbildung 42: Das Dextromethorphan-Molekül. **a** dreidimensionale Struktur von Dextromethorphan. Die Atome und Bindungen sind nach Atomtyp gefärbt. Kohlenstoff (grün), Sauerstoff (rot), Stickstoff (blau) und Wasserstoff (weiß). **b** Schematische Darstellung der sterischen Verhältnisse im Dextromethorphan-Molekül. Positionen mit hoher Reaktivität sind rot, Positionen mit schwacher Reaktivität blau dargestellt.

Wenn man nun die Reaktion mit einem P450-Enzym betrachtet, ist zusätzlich die Zugänglichkeit der reaktiven Hämgruppe in der Proteinstruktur zu berücksichtigen. In CYP2D6 ist die Zugänglichkeit zur Hämgruppe über einen Zugangskanal begrenzt, in CYP3A4 hingegen ist die Zugänglichkeit zur Hämgruppe nicht eingeschränkt (Abbildung 43).

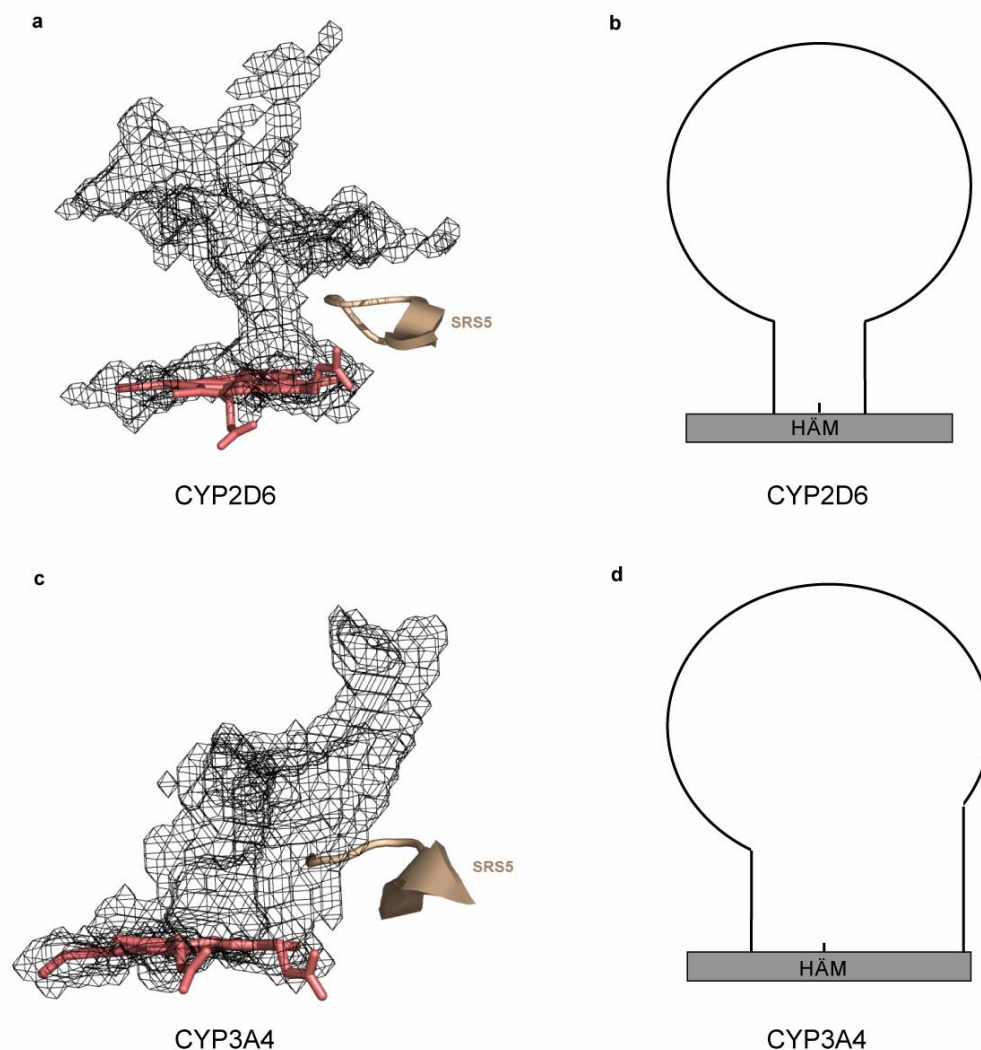


Abbildung 43: Architektur der Bindetaschen von CYP2D6 und CYP3A4. In CYP2D6 (a) ist der Zugang zur Hämgruppe durch einen Zugangskanal begrenzt. In CYP3A4 (c) hingegen ist der Zugang zur Hämgruppe sterisch nicht eingeschränkt. Schematische Darstellung der sterischen Verhältnisse der Bindetasche von CYP2D6 (b) und CYP3A4 (d).

In einem Enzym mit einem engen Zugangskanal (CYP2D6) ist die sterische Zugänglichkeit eingeschränkt und folglich werden besser zugängliche Positionen eines Moleküls bevorzugt umgesetzt. Bei einem Enzym wie CYP3A4 mit frei zugänglicher Hämgruppe hingegen spielen sterische Faktoren eine untergeordnete Rolle. Für das Dextromethorphan-Molekül bedeutet das, dass CYP2D6 aus sterischen Gründen bevorzugt die O-Demethylierung katalysiert. Bei CYP3A4 hingegen ist sowohl die O-Demethylierung als auch die N-Demethylierung sterisch möglich. Aufgrund der höheren Reaktivität ist jedoch die N-Demethylierung von Dextromethorphan bevorzugt (Abbildung 44). Dies stimmt qualitativ mit den experimentellen *in vitro*-Daten zum Dextromethorphan-Metabolismus überein.²⁶²

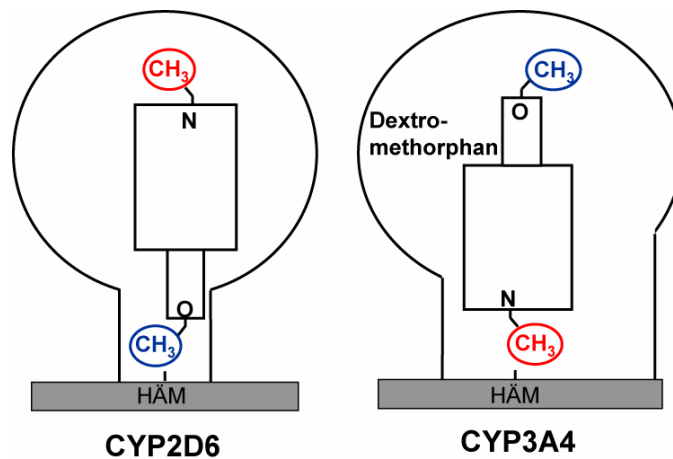


Abbildung 44: Schematische Darstellung zur Erklärung der Regioselektivität des Dextromethorphan-Metabolismus. Die sterischen Verhältnisse des Dextromethorphan-Moleküls und der beiden CYPs sind schematisch dargestellt. Positionen mit hoher Reaktivität sind rot, Positionen mit schwacher Reaktivität blau dargestellt. Die Analyse der Bindetaschenarchitektur zeigte für CYP2D6 einen Kanal zwischen der Bindetasche und der reaktiven Hämgruppe. Der Zugang zum Häm ist sterisch begrenzt und die Reaktion an der sterisch besser zugänglichen Position, die zur O-Demethylierung führt, läuft bevorzugt ab. In CYP3A4 hingegen ist die Hämgruppe frei zugänglich und es läuft bevorzugt die Reaktion an der chemisch reaktiveren Position des Dextromethorphan-Moleküls ab, die zur N-Demethylierung führt.

5.2.3 Isoenzym-spezifischer Metabolismus von Sildenafil

Das Arzneimittel Sildenafil, das zur Behandlung der erektilen Dysfunktion (Viagra[®]) und der pulmonal-arteriellen Hypertonie (Revatio[®]) eingesetzt wird, unterliegt ebenfalls der Metabolisierung durch CYP3A4 und CYP2D6. Beide Enzyme katalysieren die Demethylierung am Stickstoffatom des Piperazinrings und es kommt zu Bildung eines gemeinsamen Metaboliten (Abbildung 45).²⁶³

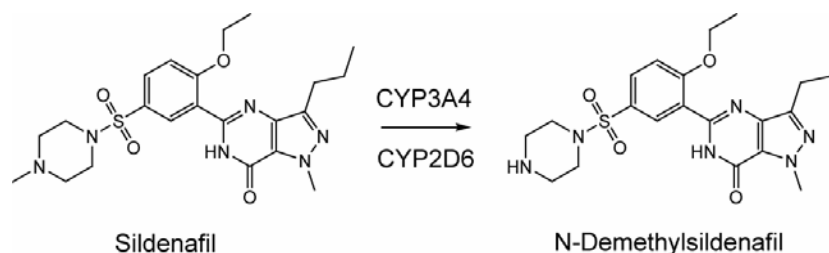


Abbildung 45: Metabolismus von Sildenafil. Sowohl CYP3A4 als auch CYP2D6 katalysieren die N-Demethylierung am Piperazinring des Sildenafils.

5.2.3.1 Chemische Reaktivität und sterische Zugänglichkeit von Sildenafil

Zur Abschätzung der Reaktivitäten der einzelnen Positionen im Sildenafil-Molekül wurden die Bindungsdissoziationsenergien (BDE) der C-H-Bindungen mit PETRA berechnet. Zur Quantifizierung der sterischen Hinderung der einzelnen Position wurde der lokale $RDF_{3,5}$ -Deskriptor berechnet (Abbildung 46).

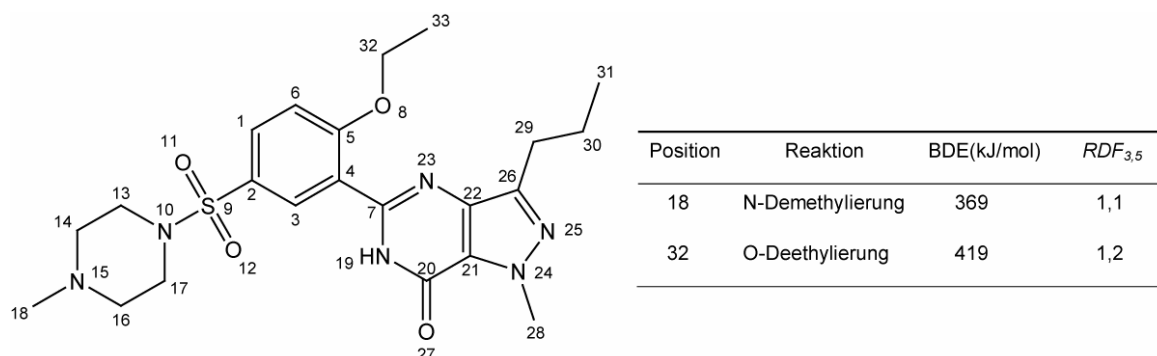


Abbildung 46: Reaktivität und Zugänglichkeit im Sildenafil-Molekül. In der nebenstehenden Tabelle sind für die reaktivsten Positionen die BDE und die Werte des $RDF_{3,5}$ -Deskriptors aufgeführt.

Die Radikalbildung am Kohlenstoffatom der Position 18 zeigt die geringste BDE (369 kJ/mol) und die Hydroxylierung und anschließende N-Demethylierung am Stickstoff des Piperazinrings besitzt folglich die höchste Reaktivität. Die O-Demethylierung an Position 32 zeigt eine geringere Reaktivität. Die sterische Zugänglichkeit der beiden Positionen ist in etwa vergleichbar. Dies erklärt die experimentell beobachtete Regioselektivität des Sildenafil-Metabolismus durch CYP3A4 und CYP2D6.²⁶³ Beide Enzyme katalysieren die N-Demethylierung an Position 18 (Abbildung 47), die sterisch gut zugänglich ist und die höchste Reaktivität aufweist.

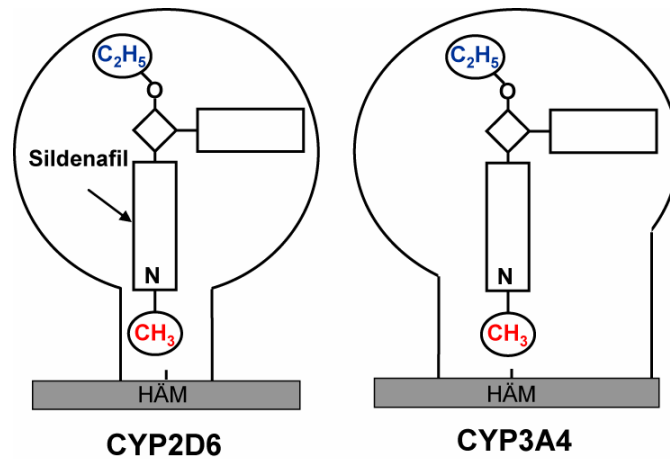


Abbildung 47: Schematische Darstellung zur Erklärung der Regioselektivität des Sildenafil-Metabolismus. Beide Enzyme katalysieren bevorzugt die Reaktion an der chemisch reaktivsten Position des Sildenafil, die sterisch gut zugänglich ist und zur N-Demethylierung führt.

5.2.4 Heuristisches Modell der isoformspezifischen Regioselektivität von CYP3A4 und CYP2D6

Die Untersuchungen der beiden Substrate Dextromethorphan und Sildenafil zeigten, dass für die Regioselektivität des von CYP3A4 und CYP2D6 katalysierten Metabolismus drei Einflüsse eine Rolle spielen:

1. Die intrinsische Reaktivität der einzelnen Positionen im Substratmolekül
2. Die intrinsische sterische Zugänglichkeit dieser Positionen im Substratmolekül
3. Die sterische Zugänglichkeit des Enzyms

Es sind also Regeln für die Abschätzung der intrinsischen Reaktivität und Zugänglichkeit der einzelnen Substratpositionen nötig.

5.2.4.1 Abschätzung der intrinsischen Reaktivitäten

Für die beiden Substrate Dextromethorphan und Sildenafil konnte gezeigt werden, dass die Berechnung der Bindungsdissoziationsenergien mittels PETRA eine Abschätzung der intrinsischen Reaktivität der einzelnen Positionen in den beiden Substraten erlaubt. Olsen *et al.*⁵⁴ führten DFT-Berechnungen zur Untersuchung der Aktivierungsenergien der P450-katalysierten Wasserstoffabstraktion von C-H-Bindungen durch. Den Kohlenstoffatomen konnten Aktivierungsenergien der Wasserstoffabstraktion entsprechend ihrer benachbarten funktionellen Gruppen zugeordnet werden. Daraus lässt sich ein einfaches, prädiktives Modell der Aktivierungsenergien erstellen und es lassen sich Reaktivitätsreihen für die Wasserstoffabstraktion durch P450-Enzyme aufstellen. Es ergeben sich zwei Einflüsse: die Anzahl der zusätzlichen Wasserstoffatome an dem Kohlenstoffatom der untersuchten C-H-Bindung (handelt es sich um ein primäres, sekundäres oder tertiäres Kohlenstoffatom?) und der Einfluss von funktionellen Gruppen in Nachbarstellung zum untersuchten Kohlenstoffatom. Die Reaktivität der Kohlenstoffatome nimmt von primären über sekundäre hin zu tertiären Kohlenstoffatomen zu. Darüber hinaus wird die Reaktivität der Wasserstoffabstraktion durch funktionelle Gruppen in Nachbarstellung des Kohlenstoffatoms beeinflusst und steigt in folgender Reihenfolge an: $sp^3 < sp^2$ (allylisch, benzyllisch, α -ständig zu Carbonylen) $< O / S < N$ (Abbildung 48). Daraus ergibt sich, dass eine C-H-Bindung in Nachbarstellung zu einem Stickstoffatom eine höhere Reaktivität aufweist als eine C-H-Bindung in Nachbarstellung zu einem Sauerstoffatom. Dies kann beispielsweise im Dextromethorphan-Molekül beobachtet werden, in dem die N-Demethylierung eine höhere Reaktivität aufweist als die O-Demethylierung. Andererseits ist die Reaktivität an einem tertiären Kohlenstoffatom mit benachbartem Stickstoffatom größer als an einem primären Kohlenstoffatom in Nachbarstellung zu einem Stickstoffatom.

In der Reaktivitätsreihe fehlt jedoch noch eine wichtige, von P450-Enzymen katalysierte Reaktion: die Hydroxylierung am Aromatenring. Die aromatische Hydroxylierung verläuft nach einem anderen Reaktionsmechanismus. Aus den DFT-Berechnungen von Bathelt *et al.* zur Aktivierungsenergie der aromatischen Hydroxylierung⁵⁷ ergeben sich Energien, die knapp unter denen der Hydroxylierung von C-H-Bindungen in Alkanen liegen. Das heißt, die aromatische Hydroxylierung lässt sich in der obigen Reaktivitätsreihe zwischen der Hydroxylierung benachbart zu sp^2 -Kohlenstoffatomen und der Hydroxylierung benachbart zu sp^3 -Kohlenstoffatomen einordnen.

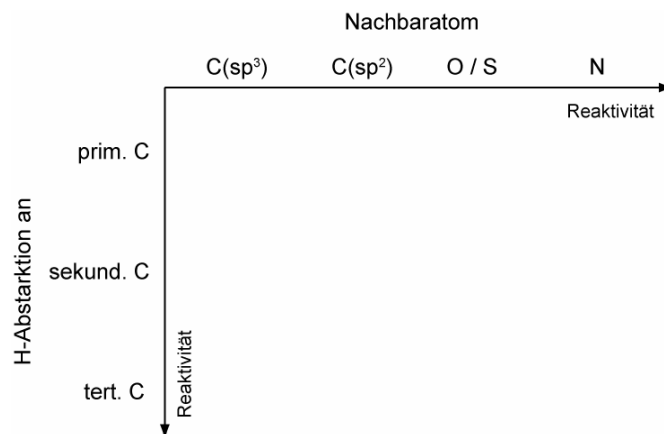


Abbildung 48: Abschätzung der Reaktivität der Wasserstoffabstraktion von C-H-Bindungen durch P450-Monooxygenasen.

5.2.4.2 Abschätzung der intrinsischen Zugänglichkeit

Für die Zugänglichkeit im Substrat spielt die Struktur und Form des Moleküls eine Rolle. Für die beiden Modellsubstrate Dextromethorphan und Sildenafil konnte gezeigt werden, dass der $RDF_{3,5}$ -Deskriptor eines Atoms als ein Maß für die Zugänglichkeit verwendet werden kann und damit die sterische Zugänglichkeit verschiedener Positionen in einem Molekül verglichen werden kann. Im Folgenden wird anhand des Medikaments Warfarin (ein *Antikoagulans*) gezeigt, dass die Berechnung des $RDF_{3,5}$ nicht in allen Fällen ausreichend ist, um die Zugänglichkeit zu erklären. Bei der Metabolisierung von Warfarin werden experimentell drei Reaktionen beobachtet: die Hydroxylierung an Position 5 und die aromatische Hydroxylierung an Position 12 und 21 (Abbildung 50 a). Die höchste Reaktivität zeigt die Reaktion am Kohlenstoffatom der Position 5, benachbart zum sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe. Die benachbarte Carbonylgruppe wirkt als Akzeptorsubstituent und stabilisiert das entstehende Radikal. Nach der Hydroxylierung kann sich eine intramolekulare Wasserstoffbrücke ausbilden, die zur Bildung eines Sechsrings führt und damit zur Stabilisierung beiträgt (Abbildung 49).

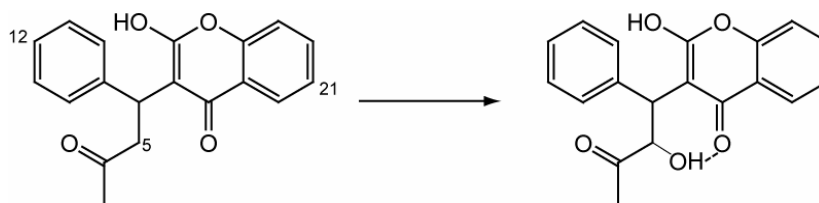


Abbildung 49: Nach Hydroxylierung am aktivierten Kohlenstoffatom 5 in Nachbarstellung zum sp^2 -Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe kann sich eine intramolekulare Wasserstoffbrücke ausbilden, die zur Bildung eines Sechsrings führt.

Die Reaktion an Position 5 wird aufgrund der schlechteren sterischen Zugänglichkeit ($RDF_{3,5} 2,4$) bevorzugt von CYP3A4 katalysiert. Die aromatischen Hydroxylierungen an Position 12 und 21 zeigen beide eine ähnliche Reaktivität und lokale Zugänglichkeit ($RDF_{3,5} 1,1$ und $1,0$). Position 21 wird wie erwartet von beiden Isoenzymen CYP3A4 und CYP2D6 umgesetzt, Position 12 hingegen nur von CYP3A4. Für die Unterschiede zwischen der Position 12 und 21 spielt die Form des Substrates eine entscheidende Rolle, die über die lokale Zugänglichkeit der beiden Positionen hinausgeht.

Der Zugangskanal zur Hämgruppe weist in CYP2D6 eine Tiefe von ungefähr $6-7 \text{ \AA}$ auf. Aufgrund der Abmessungen des Zugangskanals zur Hämgruppe in CYP2D6 und der Form- und Größenverhältnisse des Warfarins kann nur der Coumarin-Ring des Warfarin-Moleküls die Hämgruppe erreichen (Abbildung 50 c,d). Dabei ist die Reaktion an Position 21 in para-Stellung des Sauerstoffs substituenten bevorzugt. Eine Hydroxylierung durch CYP2D6 in Position 12 ist aufgrund der Geometrie des Warfarin-Moleküls nicht möglich (Abbildung 50 f). Während die lokale Zugänglichkeit der beiden Positionen 12 und 21 identisch ist, ist die Zugänglichkeit unter Betrachtung der Form des gesamten Moleküls unterschiedlich. Um die Betrachtung der Zugänglichkeit einzelner Positionen über die lokale Umgebung hinweg auszuweiten, muss bei der Berechnung des RDF -Deskriptors der Radius r der betrachteten Kugelsphäre, innerhalb derer das Volumen des umgebenden Moleküls berücksichtigt wird, vergrößert werden. In Abbildung 51 ist die Veränderung des RDF -Deskriptors mit Änderung des Kugelradius r für die drei Atome 5, 12 und 21 aufgetragen. Zur Berechnung des lokalen $RDF_{3,5}$ -Deskriptors wurde das Volumen zwischen der Kugel mit einem Radius $r=1,5 \text{ \AA}$ und der Kugel mit einem Radius $r=3,5 \text{ \AA}$ berechnet. Es ergibt sich ein $RDF_{3,5}$ von $2,4$ (Atom 5), $1,0$ (21) und $1,1$ (12). Das Kohlenstoffatom 5 ist sterisch am stärksten abgeschirmt und der RDF -Deskriptor ist für beliebige Radien r größer als der RDF -Deskriptor für die Kohlenstoffatome 12 und 21.

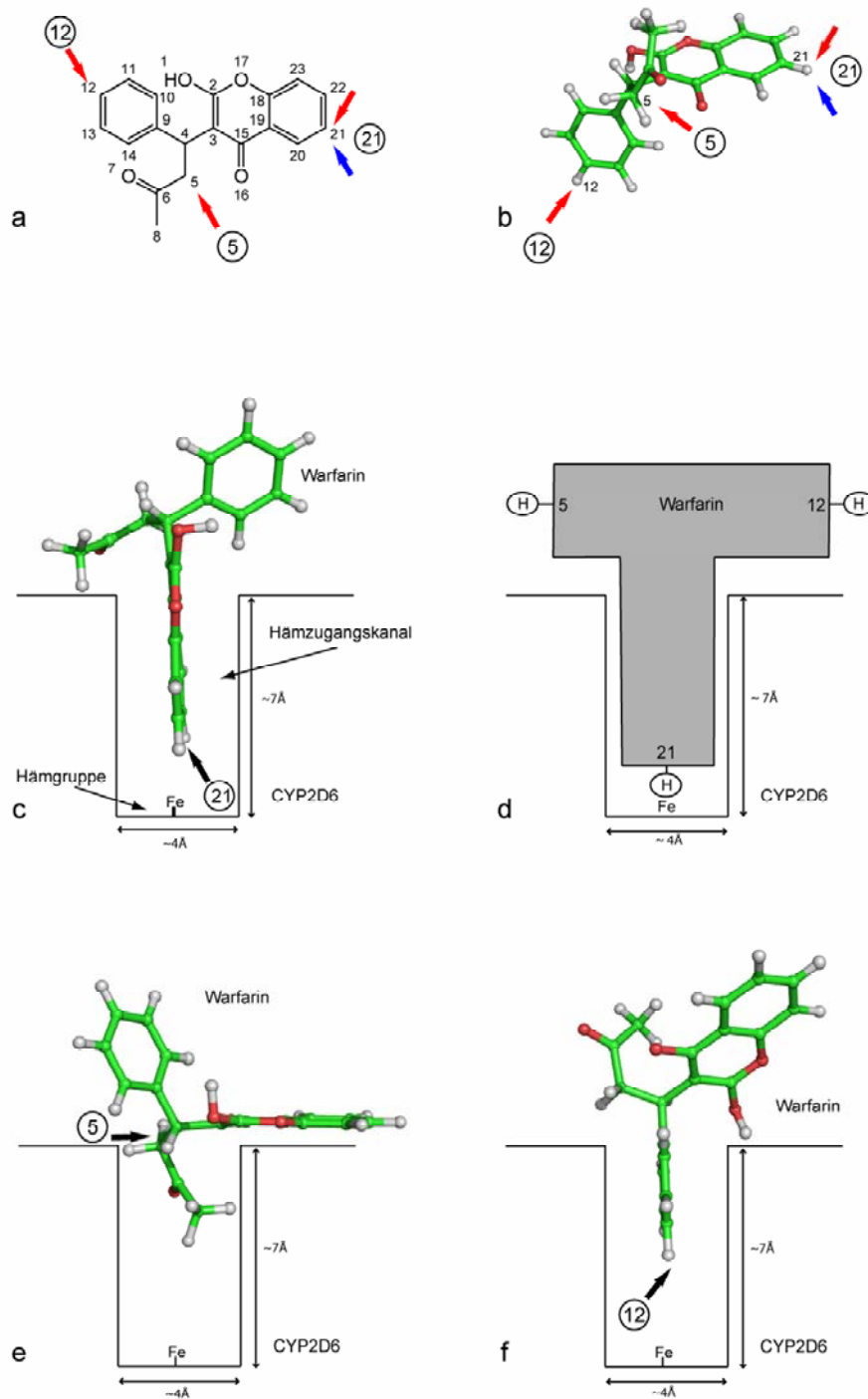


Abbildung 50: Schematische Darstellung zur Erklärung der Regioselektivität des Warfarin-Metabolismus. **a,b** Struktur von Warfarin, die Pfeile markieren die Position der Metabolisierung durch CYP3A4 (rot) und CYP2D6 (blau). **c,d,e,f** Schematische Darstellung der sterischen Verhältnisse in CYP2D6. Aufgrund der sterischen Verhältnisse kann CYP2D6 das Warfarin-Molekül nur am Kohlenstoffatom 21 hydroxylieren (**c,d**); eine Reaktion an Position 5 (**e**) und 12 (**f**) ist sterisch nicht möglich. Die Atome und Bindungen sind nach Atomtyp gefärbt. Kohlenstoff (grün), Sauerstoff (rot), Stickstoff (blau) und Wasserstoff (weiß).

Für die beiden Positionen 12 und 21 erkennt man jedoch, dass ab einem Radius r von 5,5 Å der Wert des RDF -Deskriptors an Position 12 deutlich stärker ansteigt als an Position 21 ($RDF_{6,0}$ 3,3 (12) 2,0 (21)). Die sterische Hinderung nimmt bei ansteigendem Kugelradius r aufgrund der Form des Moleküls an Atom 12 schneller zu als an Atom 21.

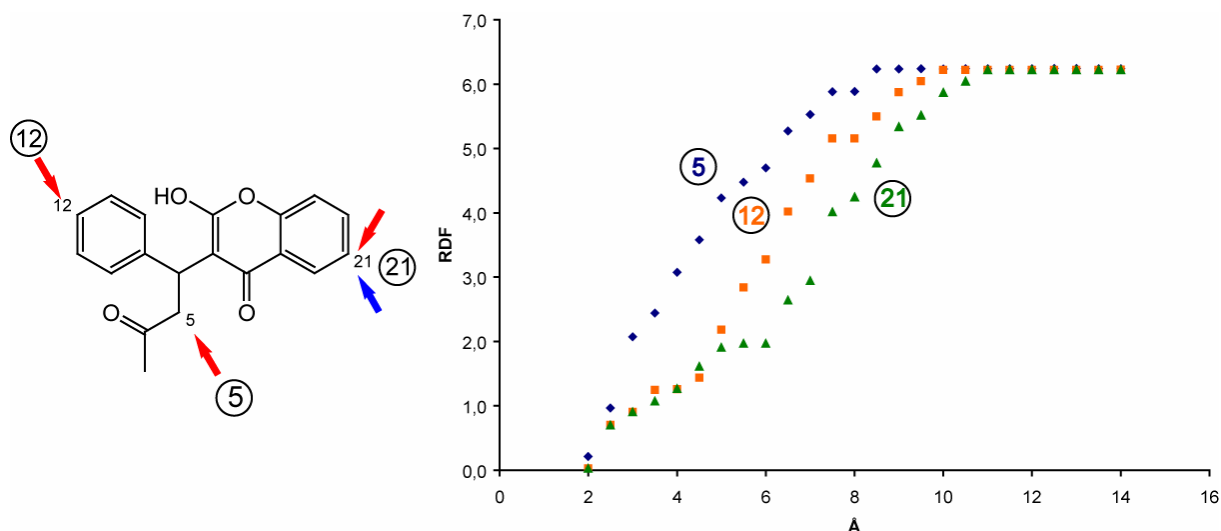


Abbildung 51: Berechnung der sterischen Zugänglichkeit der drei Atome 5, 12 und 21 im Warfarin-Molekül. In dem Diagramm ist der Verlauf des RDF -Deskriptors in Abhängigkeit vom Radius r der Verteilungsfunktion aufgetragen. Man erkennt die ähnliche lokale Zugänglichkeit der Positionen 12 und 21 bei einem Radius $r = 3,5$ Å. Durch Erhöhung des Kugelradius r sieht man die unterschiedliche Zugänglichkeit der beiden Positionen aufgrund der Form des Substrates. Die Position 12 ist schlechter zugänglich als die Position 21. Dies erklärt die experimentell ausschließlich beobachtete Hydroxylierung an Position 21.

Die Tiefe des Zugangskanals zur Hämgruppe in CYP2D6 beträgt ca. 6 Å. Deshalb können bei einem identischem $RDF_{3,5}$, durch Berechnung des $RDF_{6,0}$, Unterschiede in der Form des Moleküls berücksichtigt werden. Der $RDF_{6,0}$ für die Position 21 beträgt 2,0 und Warfarin wird an Position 21 von beiden Isoenzymen CYP3A4 und CYP2D6 umgesetzt. Die Position 12 hingegen ist, aufgrund der Form und Größenverhältnisse des Warfarin-Moleküls und des Zugangskanals, für CYP2D6 nicht zugänglich ($RDF_{6,0}$ 3,3) und wird folglich nur von dem Isoenzym CYP3A4 umgesetzt.

5.2.4.3 Heuristische Regeln zur Vorhersage der isoformspezifischen Regioselektivität von CYP3A4 und CYP2D6

Aus den bisherigen Untersuchungen ergeben sich folgende heuristische Regeln für das Modell der isoformspezifischen Regioselektivität der beiden Enzyme CYP3A4 und CYP2D6:

1. Abschätzung der intrinsischen **Reaktivität** der einzelnen Positionen anhand der aufgestellten Reaktivitätsreihe der Wasserstoffabstraktion.
2. Abschätzung der intrinsischen **Zugänglichkeit** der einzelnen Positionen anhand des *RDF_{3,5}*- Deskriptors.
3. Berücksichtigung der **Proteinstruktur** des katalysierenden Enzyms:
CYP3A4 weist keine Einschränkung der Hämzugänglichkeit auf.
CYP2D6 hat einen engen Zugangskanal zur Hämgruppe.
4. Vorhersage der bevorzugten Metabolisierungsposition:
CYP3A4 metabolisiert bevorzugt die reaktivsten Positionen.
CYP2D6 metabolisiert bevorzugt gut zugängliche Positionen.

Bevorzugt werden die Positionen eines Substrats metabolisiert, die die höchste Reaktivität aufweisen. Es muss jedoch die Zugänglichkeit der Atome beachtet werden, dabei kann zwischen nicht, schlecht und gut zugänglichen Positionen unterschieden werden. Nicht zugängliche Positionen sind vom Metabolismus ausgeschlossen. Bei den gut und schlecht zugänglichen Positionen ist die bevorzugte Hydroxylierungsposition abhängig vom Isoenzym und der Zugänglichkeit des reaktiven Zentrums. In CYP3A4 gibt es keine sterische Beschränkung des Zugangs zur Hämgruppe, folglich werden dort die Positionen mit der höchsten chemischen Reaktivität bevorzugt. In CYP2D6 hingegen, in dem der Zugang zur Hämgruppe über einen Kanal begrenzt ist, werden gut zugängliche Positionen bevorzugt. Wenn für eine Position des Moleküls mehrere, die Reaktivität erhöhende Effekte auftreten, ergibt sich eine Additivität dieser Effekte.

5.2.4.4 Validierung des Modells zur Vorhersage der Regioselektivität von CYP3A4 und CYP2D6

Zur Validierung des Modells wurde ein größerer Datensatz chemisch diverser Substrate ausgewählt. Ausgangspunkt für den Datensatz war die von Rendic publizierte Übersicht über humane P450-Enzyme und deren Substrate.⁶¹ Dort sind für über 3000 Reaktionen Informationen über das Substrat, das beteiligte CYP-Isoenzym, die katalysierte Reaktion und Referenzen zur experimentellen Originalliteratur angegeben. In dem Rendic-Datensatz finden sich 578 Substrate, an deren Metabolismus CYP3A4 beteiligt ist. CYP2D6 ist an der Umsetzung von 301 Substraten beteiligt. Eine Analyse der Daten ergab eine Schnittmenge von 31 Substraten, an deren Umsetzung sowohl CYP3A4 als auch CYP2D6 beteiligt ist. Beim Metabolismus eines Substrates können neben den hauptsächlich gebildeten Metaboliten weitere Metabolite entstehen, die nur zu einem geringen Anteil als Nebenprodukte auftreten. Bei der Auswahl des Datensatzes wurde darauf geachtet, dass die von den beiden CYPs 3A4 und 2D6 gebildeten Metabolite zu den Hauptmetaboliten des entsprechenden Substrates zählen. Nach genauerer Überprüfung des Datensatzes anhand der Originalliteratur wurden zwölf Substrate aus dem Datensatz entfernt, die zum Teil keine Substrate sondern Inhibitoren sind oder für deren Metabolismus die Enzyme CYP3A4 oder CYP2D6 keine oder nur eine geringe Relevanz haben. Diese Substrate werden hauptsächlich von anderen P450-Enzymen metabolisiert. Es verblieb also ein Datensatz von 19 Substraten zur Validierung des Regioselektivitätsmodells (Tabelle 13). Die strukturelle und chemische Diversität des verwendeten Datensatzes ist in Abbildung 52 dargestellt.

Tabelle 13: Auflistung der 31 Substrate aus dem Rendic-Datensatz,⁶¹ an deren Metabolismus CYP3A4 und CYP2D6 beteiligt sind. Der für die Validierung verwendete Datensatz bestand aus den 19 fett gedruckten Substraten.

Substrate für CYP3A4 und CYP2D6			
Bisoprolol	Halofantrin	<i>(Ritonavir)</i>	Tolterodin
<i>(Bufuralol)</i>	<i>(Haloperidol)</i>	Ropivacain	Tramadol
<i>(Coffein)</i>	<i>(Imipramin)</i>	<i>(Saquinavir)</i>	Tropisetron
Celecoxib	<i>(Indinavir)</i>	Sildenafil	Valdecoxib
Codein	<i>(Lidocain)</i>	Tamsulosin	Venlafaxin
Dextromethorphan	Loratadin	<i>(Terfenadin)</i>	Warfarin
Diltiazem	<i>(Omeprazol)</i>	Tergurid	<i>(Zotepin)</i>
Fluoxetin	Propafenon	<i>(Theophyllin)</i>	

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen können die Substrate des Validierungsdatensatzes in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Substrate der Gruppe I (Codein, Dextromethorphan, Diltiazem, Fluoxetin, Propafenon, Ropivacain, Tamsulosin, Tolterodin, Tramadol, Tropisetron, Venlafaxin, Warfarin) werden von CYP3A4 und CYP2D6 an verschiedenen Positionen im Molekül metabolisiert. Ein Beispiel ist das Dextromethorphan-Molekül, das eine schlechter zugängliche, reaktivere Position aufweist, die bevorzugt von CYP3A4 metabolisiert wird und eine besser zugängliche, weniger reaktive, die bevorzugt von CYP2D6 metabolisiert wird. Die Substrate der Gruppe II (Bisoprolol, Celecoxib, Halofantrin, Loratadin, Sildenafil, Tergurid, Valdecoxib) werden von beiden Isoformen an der gleichen Position umgesetzt. Ein Beispiel ist das Substrat Sildenafil, in dem die möglichen Reaktionsstellen gleich gut zugänglich sind und das folglich von beiden P450-Isoenzymen bevorzugt an der reaktivsten Position metabolisiert wird. Die Auswertung der 19 Substrate des Validierungsdatensatzes ist für die Substrate der Gruppe I in Tabelle 14 und für die Substrate der Gruppe II in Tabelle 15 zusammengefasst. Bei den Dealkylierungsreaktionen sind die Positionen des Moleküls markiert, an denen die Hydroxylierung erfolgt, die dann zu der nachfolgenden Dealkylierung führt.

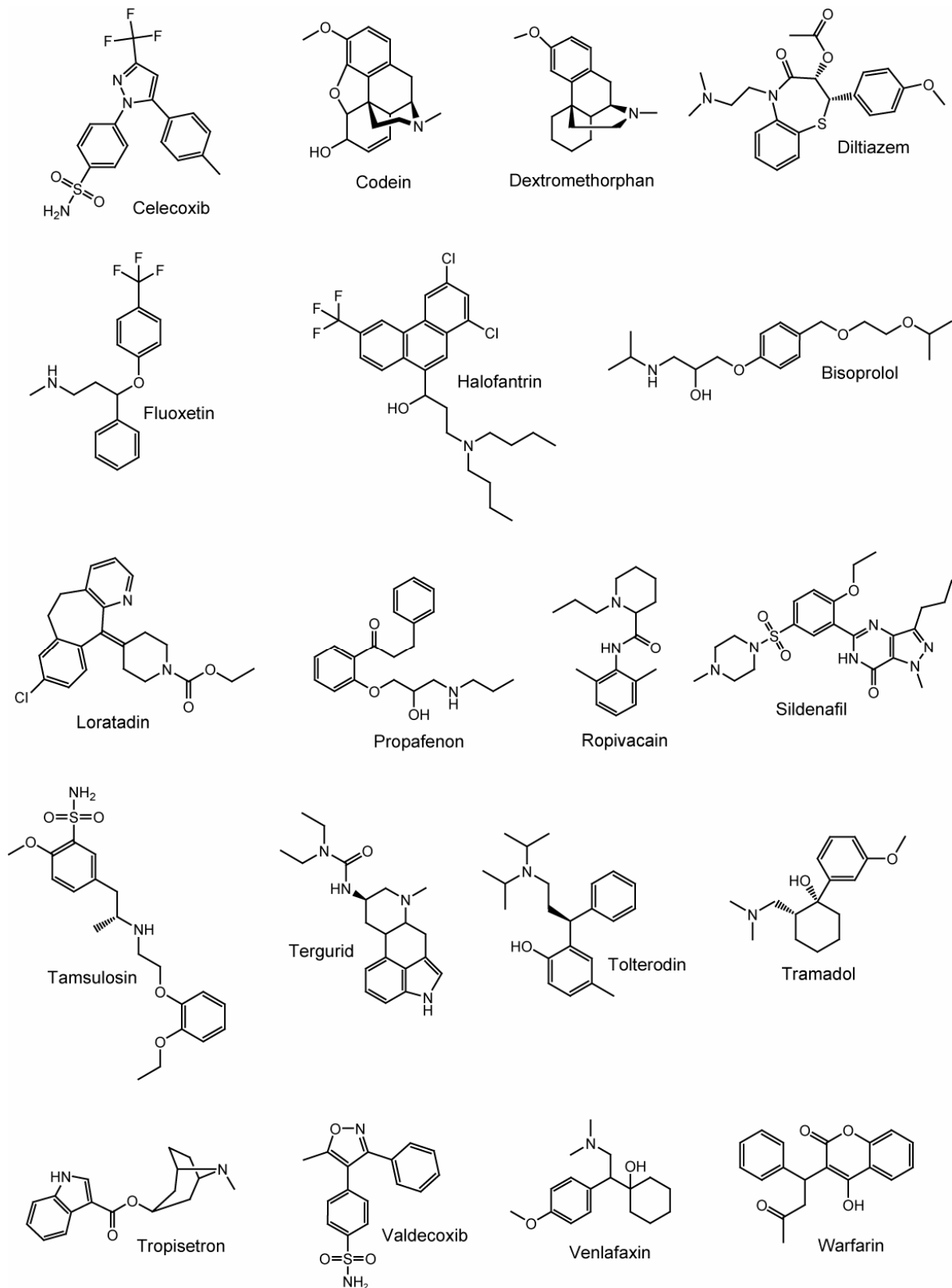


Abbildung 52: Strukturen der Verbindungen des Validierungsdatensatzes.

Zur Gruppe I des Validierungsdatensatzes gehören zwölf Substrate. Die Substrate **Codein**, **Dextromethorphan**, **Diltiazem**, **Tolterodin**, **Tramadol**, **Tropisetron** und **Venlafaxin** beinhalten alle eine reaktive Position (N-Demethylierung), die sterisch nicht so gut zugänglich ist, und bevorzugt von CYP3A4 umgesetzt wird, und eine weniger reaktive Position (O-Demethylierung (5x), allylische (1x) oder aromatische Hydroxylierung (1x)), die besser zugänglich ist und bevorzugt von CYP2D6 umgesetzt wird.

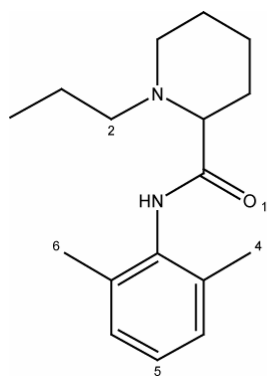
Das Substrat **Fluoxetin** enthält an Position 17 ein Kohlenstoffatom in Nachbarstellung zu einem Stickstoffatom. Dieses Kohlenstoffatom weist eine hohe Reaktivität auf, zudem ist die Position gut zugänglich und wird deshalb von beiden Isoenzymen umgesetzt. Durch Wasserstoffabstraktion an dem Kohlenstoffatom der Position 1 entsteht ein tertiäres Radikal in benzyli-scher Position, das zusätzlich durch das benachbarte O-Atom stabilisiert wird. An dieser Position kommt es zur Addition mehrerer stabilisierender Effekte und es ergibt sich eine erhöhte Reaktivität dieser Position. Experimentell wird eine Hydroxylierung an Position 1 beobachtet, die zu einer anschließenden Dealkylierung führt. Allerdings ist die Position deutlich schlechter zugänglich als das terminale Kohlenstoffatom 17 und die Reaktion wird deshalb bevorzugt von CYP3A4 katalysiert.

Die bevorzugten Reaktionen im **Propafenon**-Molekül sind die N-Dealkylierung in Position 2 und die aromatische Hydroxylierung in Position 12. Die Reaktivität der Position 12 im Benzolring ist durch den paraständigen Alkoxy-substituenten erhöht. Die Position 12 wird aufgrund der besseren Zugänglichkeit bevorzugt von CYP2D6 hydroxyliert. CYP3A4 hingegen katalysiert bevorzugt die N-Demethylierung an Position 22, welche die höhere Reaktivität aufweist, aber schlechter zugänglich ist.

Bei der Vorhersage des **Warfarin**-Metabolismus konnte gezeigt werden, dass es bei identischem lokalem $RDF_{3,5}$ zweier Positionen möglich ist durch Berechnung des $RDF_{6,0}$ Unterschiede in der Form des Moleküls zu berücksichtigen (Kapitel 5.2.4.2).

Ähnliches gilt für das Molekül **Ropivacain** (Abbildung 53). Die reaktivste Position ist das Kohlenstoffatom 2 in Nachbarstellung zum Stickstoffatom. Diese Position ist sterisch schlechter zugänglich ($RDF_{3,5}$ 2,4) und wird bevorzugt von CYP3A4 umgesetzt. Das aromatische Kohlenstoffatom 5 ist besser zugänglich ($RDF_{3,5}$ 0,9) und wird folglich bevorzugt von CYP2D6 umgesetzt. Daneben gibt es noch zwei benzyli-sche Kohlenstoffatome in Position 4 und 6. Die Zugänglichkeit dieser beiden Positionen hängt von der Konformation des Piperidinderivat-Substituenten ab und der $RDF_{3,5}$ liegt zwischen 1,0 und 1,7. Damit sind die Substituenten in etwa gleich gut zugänglich wie die aromatische Position 5. Die Form des Substrates erlaubt eine Hydroxylierung in Position 5 durch CYP2D6, aber die Positionen 4

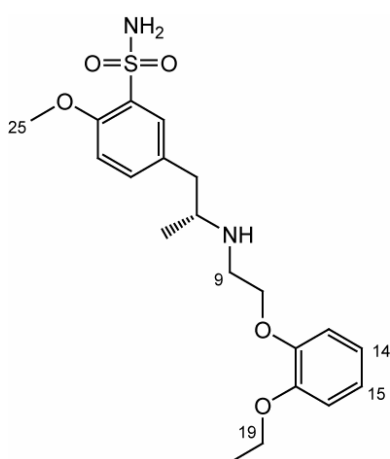
und 6 sind für einen Angriff durch CYP2D6 kaum erreichbar. Unter Berücksichtigung des RDF-Deskriptors bei einem Radius von 6 Å ist dies gut zu erkennen ($RDF_{6,0}$ 3,0 (5) 4,5/5,9 (6,4)). Auch für das Molekül Ropivacain können drei Positionen (4, 5 und 6), ähnlicher lokaler Zugänglichkeit in ihrer globalen Zugänglichkeit durch Berechnen des $RDF_{6,0}$ -Deskriptors für einen Kugelradius von 6 Å unterschieden werden.



Position	Reaktion	$RDF_{3,5}$	$RDF_{6,0}$
2	N-Deethylierung	2,4	5,6
6 / 4	benzyl. Hydroxylierung	1,0 / 1,7	4,5 / 5,9
5	arom. Hydroxylierung	0,9	3,0

Abbildung 53: Zugänglichkeiten der reaktivsten Positionen im Ropivacain-Molekül.

Bei der Metabolisierung von **Tamsulosin** werden experimentell vier Reaktionen beobachtet (Abbildung 54).²⁶⁴ CYP3A4 katalysiert die O-Deethylierung an der o-Ethoxyphenoxy-Gruppe (Position 19) und die N-Dealkylierung an Position 9, CYP2D6 katalysiert die O-Demethylierung an der Benzolsulfonamid-Gruppe (Position 25) und die aromatische Hydroxylierung am o-Ethoxyphenoxy-Ring (Position 14).



Position	Reaktion	$RDF_{3,5}$	RDF_6
9	N-Dealkylierung	1,7	5,4
19	O-Deethylierung	1,2	3,3
25	O-Demethylierung	0,6	2,7
14	arom. Hydroxylierung	1,1	3,2

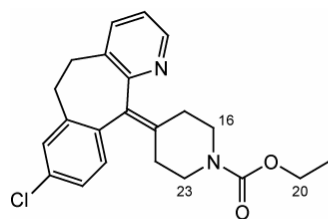
Abbildung 54: Sterische Zugänglichkeit im Tamsulosin-Molekül.

Die N-Dealkylierung weist die höchste Reaktivität auf, das Kohlenstoffatom 9 ist jedoch sterisch nur schlecht zugänglich ($RDF_{3,5}$ 1,7), folglich wird die Reaktion bevorzugt von CYP3A4 metabolisiert. Das Kohlenstoffatom an Position 25 ist am leichtesten zugänglich ($RDF_{3,5}$ 0,6) und die entsprechende O-Demethylierung wird bevorzugt von CYP2D6 katalysiert. Dies stimmt mit dem aufgestellten Regioselektivitätsmodell überein. Die Reaktion an Position 14 (aromatische Hydroxylierung) wird bevorzugt von CYP2D6 und die Reaktion an Position 19 (O-Deethylierung) wird bevorzugt von CYP3A4 umgesetzt. Die beiden Positionen 14 und 19 zeigen jedoch dieselbe lokale Zugänglichkeit ($RDF_{3,5}$ 1,1 bzw. 1,2). Auch bei Berechnung des $RDF_{6,0}$ zeigt sich kein Unterschied in der Zugänglichkeit zwischen den beiden Positionen (Abbildung 54). Die beiden Positionen 14 und 19 lassen sich mit den aufgestellten Regeln des Regioselektivitätsmodells nicht unterscheiden.

Zur Gruppe II des Validierungsdatensatzes (Tabelle 15) gehören sieben Substrate. In den Substraten **Celecoxib**, **Halofantrin**, **Sildenafil**, **Tergurid** und **Valdecoxib** ist die reaktivste Position auch gut zugänglich, es wird demzufolge von beiden Isoenzymen bevorzugt an der reaktivsten Position hydroxyliert. Es entsteht jeweils ein gemeinsamer Metabolit beider Isoformen.

Das **Bisoprolol**-Molekül wird sowohl von CYP3A4 als auch von CYP2D6 umgesetzt. Dabei entsteht jeweils der Metabolit der Deisopropylierung am Sauerstoffatom²⁶⁵⁻²⁶⁸ obwohl aufgrund der ähnlichen Zugänglichkeit der beiden Positionen die Reaktion an der reaktiveren Isopropylgruppe am Stickstoff zu erwarten wäre. Das in der Arbeit entwickelte Regioselektivitätsmodell führt zu einer falschen Vorhersage.

Das **Loratadin**-Molekül wird von CYP2D6 und CYP3A4 an der Position 20 hydroxyliert, was zu anschließender O-Demethylierung führt. Aufgrund des Regioselektivitätsmodells erwartet man, dass Loratadin von CYP3A4 an der Position mit der höchsten Reaktivität (Position 16 bzw. 17; $RDF_{3,5}$ 2,0), benachbart zum Stickstoffatom, hydroxyliert wird. Von CYP2D6 wird die Hydroxylierung an der sterisch besser zugänglichen Position 20 ($RDF_{3,5}$ 1,1), benachbart zum Sauerstoffatom vorhergesagt (Abbildung 55). Das Regioselektivitätsmodell führt zu einer falschen Vorhersage für die Regioselektivität von CYP3A4.

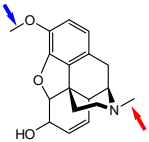
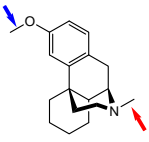
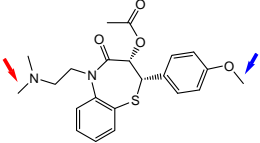
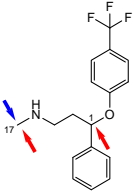
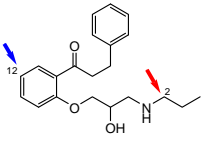
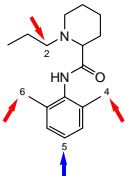


Position	Reaktion	$RDF_{3,5A}$
16	Hydroxylierung	2,0
23	Hydroxylierung	2,0
20	O-Demethylierung	1,1

Abbildung 55: Sterische Zugänglichkeit im Loratadin-Molekül.

Das Modell der Regioselektivität des von CYP3A4 und CYP2D6 katalysierten Metabolismus wurde anhand eines Validierungsdatensatzes überprüft. Von den 19 im Datensatz enthaltenen Substraten konnte für 16 Verbindungen (84 %) die experimentell beobachtete Regioselektivität anhand des erstellten Regioselektivitätsmodells richtig erklärt werden. Für das Substrat Tamsulosin lassen sich die beiden Positionen 14 und 19 mit den aufgestellten Regeln des Regioselektivitätsmodells nicht unterscheiden. Für das Substrat Bisoprolol sagt das Modell die falschen Metabolite voraus und für Loratadin wird der Metabolit von CYP3A4 falsch vorausgesagt.

Tabelle 14: Substrate der Gruppe I des Validierungsdatensatzes, die von CYP3A4 und 2D6 an verschiedenen Positionen metabolisiert werden. Neben dem Substrat ist die bevorzugte Metabolisierungsreaktion von CYP3A4 und 2D6 angegeben. Die Zugänglichkeit der entsprechenden Hydroxylierungspositionen ist durch den $RDF_{3,5}$ ($RDF_{6,0}$) angegeben. Die bevorzugten Metabolisierungspositionen sind in der Strukturformel durch Pfeile markiert: CYP3A4 (rot) CYP2D6 (blau).

Substrat	CYP3A4	RDF	CYP2D6	RDF
Codein				
	N-Demethylierung	1,4	O-Demethylierung	0,6
Dextromethorphan				
	N-Demethylierung	1,4	O-Demethylierung	0,6
Diltiazem				
	N-Demethylierung	1,4	O-Demethylierung	0,6
Fluoxetin				
	N-Demethylierung O-Dealkylierung	0,8 2,7	N-Demethylierung	0,8
Propafenon				
	N-Dealkylierung	1,9	arom. Hydroxylierung	1,1
Ropivacain				
	N-Dealkylierung Benzyl. Hydroxylierung	2,4 1,0 (4,5)	arom. Hydroxylierung	0,9 (3,0)

Ergebnisse

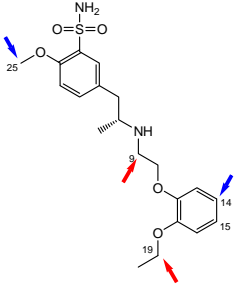
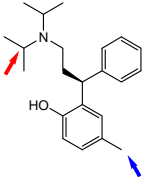
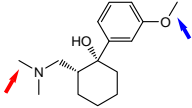
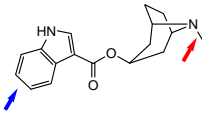
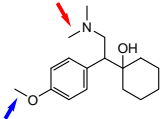
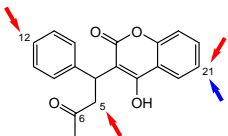
Substrat	CYP3A4	RDF	CYP2D6	RDF
Tamsulosin*				
	O-Deethylierung N-Dealkylierung	1,2 1,7	O-Demethylierung arom. Hydroxylierung	0,6 1,1
*Position 14 + 19 lässt sich im Modell nicht unterscheiden.				
Tolterodin				
	N-Dealkylierung	2,6	Benzyl. Hydroxylierung	0,8
Tramadol				
	N-Demethylierung	1,6	O-Demethylierung	0,6
Tropisetron				
	N-Demethylierung	1,5	arom. Hydroxylierung	1,0
Venlafaxin				
	N-Demethylierung	1,6	O-Demethylierung	0,6
Warfarin				
	arom. Hydroxylierung Hydroxylierung α - ständig zur Carbonylgruppe arom. Hydroxylierung	1,0 (3,3) 2,5 1,1 (2,0)	arom. Hydroxylierung	1,1 (2,0)

Tabelle 15: Substrate der Gruppe II des Validierungsdatensatzes, die von CYP3A4 und CYP2D6 an der gleichen Position metabolisiert werden. Neben dem Substrat ist die bevorzugte Metabolisierungsreaktion der beiden Isoformen angegeben. Die bevorzugte Metabolisierungsposition ist in der Strukturformel durch einen Pfeil markiert. Für die mit einem * markierten Substrate sagt das Modell eine falsche Regioselektivität voraus. Die Vorhersagen des Modells sind in den entsprechenden Strukturformeln durch farbige Pfeile markiert: CYP3A4 (rot) CYP2D6 (blau).

Substrat	CYP3A4 / CYP2D6	Substrat	CYP3A4 / CYP2D6
Bisoprolol*	O-Dealkylierung	Sildenafil	N-Demethylierung
Celecoxib	Benzyl. Hydroxylierung	Tergurid	N-Dealkylierung
Halofantrin	N-Dealkylierung	Valdecoxib	Benzyl. Hydroxylierung
Loratadin*	O-Demethylierung		

5.3 Untersuchung von genetischen Polymorphismen der Cytochrom P450-Monooxygenasen

Durch die große Anzahl von Genomsequenzierungsprojekten ist die Anzahl der bekannten *SNPs* rasant angestiegen und auch für die Gene der P450-Enzyme sind eine Vielzahl von *SNPs* bekannt. Die CYPAllel-Datenbank²¹⁹⁻²²³ (<http://www.cypalleles.ki.se/>) enthält die bekannten Allele der humanen Cytochrom P450-Monooxygenasen. Für einen Großteil der Allele sind jedoch keine experimentellen Daten über den Einfluss auf die Enzymaktivität verfügbar. Aufgrund der Bedeutung möglicher funktioneller Effekte der Allele für den Arzneimittelmetabolismus wäre es hilfreich, Informationen über die Auswirkung dieser Allele zu erhalten. Es besteht ein großes Interesse an der Vorhersage des Einflusses von Mutationen auf die Enzymaktivität. Für Cytochrom P450-Monooxygenasen liegen für ungefähr 30 % der Allele experimentelle Daten über den Einfluss auf die Enzymaktivität vor. Folglich ist für 70 % der Allele der Einfluss der Mutationen nicht bekannt.²²³

5.3.1 Vorhersage des Effektes von Polymorphismen auf die Enzymaktivität

Um den Effekt von Polymorphismen auf die Enzymfunktion der Cytochrom P450-Enzyme vorherzusagen, wurde eine Konservierungsanalyse der Aminosäuresequenzen der entsprechenden P450-Subfamilien durchgeführt. Hierzu wurden aus der an unserem Institut erstellten CYP450-Sequenzdatenbank (CYPED) die Proteinsequenzen der entsprechenden Subfamilien ausgewählt. Nach der Erstellung des Multisequenz-*alignments* mittels CLUSTALW, wurde mit Hilfe des Programms AL2CO die Konservierung jeder einzelnen Position im *alignment* berechnet. Man erwartet, dass Mutationen an einer höher konservierten Position einen Einfluss auf die Proteinfunktion haben, wohingegen die Mutationen an einer niedriger konservierten Position von dem Protein toleriert werden. In Abbildung 56 ist ein Ausschnitt aus dem *alignment* der Subfamilie CYP2C abgebildet. Für jede Aminosäureposition des *alignments* ist zusätzlich der mittels AL2CO berechnete Konservierungswert der entsprechenden Position im *alignment* angegeben. Man erkennt die

unterschiedliche Konservierung der einzelnen Positionen im *alignment*. Der Konservierungswert hängt neben der Konservierung im *alignment* auch von dem Aminosäuretyp und der natürlichen Häufigkeit der entsprechenden Aminosäure ab. Hierzu wird bei der Berechnung des Konservierungswertes die BLOSUM62-Mutationsmatrix berücksichtigt.²³³ An der Position der Aminosäure 166 in CYP2C9 beobachtet man im *alignment* für alle Sequenzen die absolut konservierte Aminosäure Prolin und es ergibt sich ein hoher Konservierungswert von 7,0. Die Position 152 im *alignment* ist ebenfalls in allen Sequenzen konserviert. Hier tritt jedoch die Aminosäure Leucin auf, was zu einem Konservierungswert von 4,0 führt. Für die in Abbildung 56 angegebenen Sequenzbereiche sind zwei Varianten des CYP2C9-Enzyms beschrieben. Das Allel *CYP2C9*12* codiert für eine Variante mit dem Aminosäureaustausch P489S. Die Mutation des konservierten (7,0) Prolin zu einem Serin führt zum Verlust der Enzymaktivität. Die Variante CYP2C9.8 (R150H) betrifft einen Aminosäureaustausch an einer weniger konservierten Position (0,6). Die Mutation an dieser Position hat keinen Einfluss auf die Enzymaktivität.

Das alleinige Berücksichtigen des Konservierungswertes ist jedoch nicht ausreichend für eine erfolgreiche Konservierungsanalyse. Die beiden Varianten CYP2B6.6 (Q172H, K262R) und 2B6.7 (Q172H, K262R, R487C) weisen eine interessante Eigenschaft auf. Beide Varianten tragen die Mutation K262R. Die Position 262 hat einen hohen Konservierungswert im *alignment* (4,6). Trotzdem zeigen beide Varianten eine normale CYP2B6-Enzymaktivität. Wenn man das *alignment* der CYP2B-Subfamilie an der entsprechenden Position analysiert, erkennt man, dass die Position hoch konserviert ist, jedoch in allen Sequenzen außer CYP2B6 ein Arginin auftritt (Abbildung 57).

```

CYP2B6_Homo_sapiens          HSVEKHRETLDPSAPKDLIDTYLLHMEKEKSNAH 280
CYP2B11_Canis_familiaris    RMVEKHRETLDPSAPRDFIDAYLIRMDKEKAEPS 280
CYP2B29_Mesocricetus_auratus HSVEKHRVNMDASNPRDFIDTYLLRMEKEKSNPH 280
CYP2B9_Mus_musculus         HSVEKHKATLDPSAPRDYIDTYLLRMEKEKSNHN 280
CYP2B10_Mus_musculus        HSVERHKATLDPSVPRDFIDYLLRMEKEKSNQN 280
CYP2B13_Mus_musculus        HRVEKHRASLDPSEPRDFIDTYLLRMEKEKSNHN 280
CYP2B19_Mus_musculus        HSVEKHRATLDPSAPRDFIDTYLLRMEKEKSNHH 281
CYP2B4_Oryctolagus_cuniculus QSVKHRATLDPSNPRDFIDVYLLRMEKDKSDPS 280
CYP2B2_Rattus_norvegicus    HIVEKHRATLDPSAPRDFIDTYLLRMEKEKSNHH 280
CYP2B3_Rattus_norvegicus    HSVENHRATLDPNAPRDFIDTFLLHMEKEKLNHY 280
CYP2B12_Rattus_norvegicus   HIVEKHRATLDPSAPRDFIDTYLLRMEKEKSNHH 281
CYP2B15_Rattus_norvegicus   HSVEKHRATLDPNTPRDFINTYLLRMEKEKSNHH 281
CYP2BX_Xenopus_laevis       DEAKSHRDTLDANCPDFIDCFILRMEEEKINPD 283
CYP2BX_Xenopus_laevis       DEAKSHKATLDANCPDFIDCFILKMEEEKINPN 284
CYP2BX_Xenopus_laevis       EIVTTHEETLDENSPRDYIDCFILKMRQEGNVN 281
.   * . . : * . * : * : * : * : * :

```

Abbildung 57: Ausschnitt aus dem *alignment* der Subfamilie CYP2B.

Die Mutation K262R in CYP2B6.6 und CYP2B6.7 führt also dazu, dass die Aminosäure Lysin zu der in den restlichen Sequenzen der Subfamilie hoch konservierten Aminosäure Arginin mutiert wird. Deshalb führt die Mutation an dieser hoch konservierten Position nicht zu einem Aktivitätsverlust. Es müssen bei der Analyse der Konservierung also zusätzlich zum Konservierungswert auch die Aminosäuren an der entsprechenden Position im *alignment* berücksichtigt werden. Für Mutationen wie die hier beobachteten, in denen zu einer im *alignment* an dieser Position hoch konservierten Aminosäure mutiert wird, wird kein Einfluss auf die Enzymaktivität beobachtet. Die entsprechende Variante wird als aktiv definiert. Wenn in einer Variante weitere Mutationen auftreten, wird die Mutation an der Position mit der nächsthöchsten Konservierung berücksichtigt. Damit wird für die beiden Varianten CYP2B6.6 und CYP2B6.7 der Konservierungswert 1,9 der Aminosäure Q172 berücksichtigt.

Für die systematische Konservierungsanalyse wurden die Varianten der für den Arzneimittelmetabolismus bedeutendsten P450-Enzyme CYP2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 und 3A5 ausgewählt. Die CYPAllel-Datenbank enthält eine große Anzahl verschiedener *SNPs* der einzelnen Isoenzyme. Für die vorliegende Untersuchung wurden nur *non-synonymous SNPs* (nsSNPs) ausgewählt, die in codierenden Bereichen der Gene liegen. Des Weiteren wurden für die Erstellung des Modells nur nsSNPs ausgewählt, die einen experimentellen Einfluss auf die Enzymaktivität zeigen. Varianten, die zu einem veränderten *splicing* führen, wurden nicht berücksichtigt. Die trivialen Fälle, in denen die Mutation zu einer *nonsense mutation* oder zur Deletion eines Basenpaares und damit zu einem *frameshift* führt, wurden ebenfalls nicht berücksichtigt (Abbildung 58).

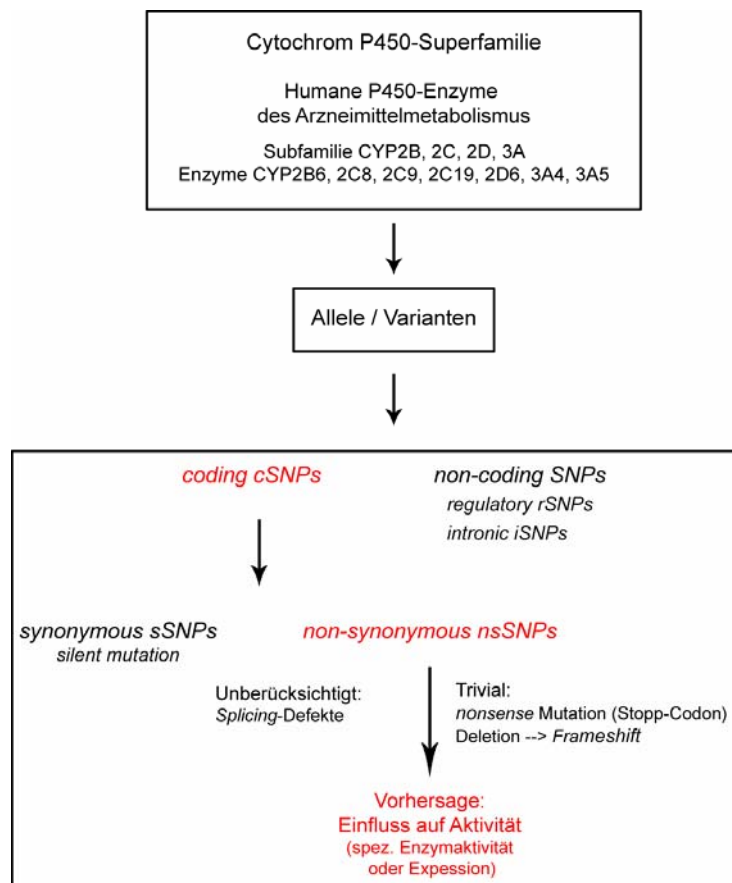


Abbildung 58: Auswahl der *SNPs* für die Untersuchungen.

Für die systematische Analyse der Polymorphismen der Isoenzyme CYP2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 und 3A5 wurden aus den Sequenzen der CYPED-Datenbank familienspezifische *alignments* der Subfamilien CYP2B, CYP2C, CYP2D und CYP3A

erstellt und anschließend die Konservierung der einzelnen Aminosäurepositionen in den jeweiligen *alignments* berechnet. Für die untersuchten Isoenzyme sind in der CYPAllel-Datenbank 56 Allele abgelegt, die mindestens einen *nsSNP* in einem codierenden Bereich tragen, der nicht das *splicing* beeinflusst und zu denen experimentelle Daten über die Enzymaktivität vorliegen. Von diesen 56 Allelen liegen für vier Allele von CYP2D6 (*2, *12, *17, *41A) widersprüchliche Aktivitätsdaten vor. Alle vier Varianten tragen den Aminosäureaustausch Arg gegen Cys an der niedrig konservierten Position 296 (2,0). Für CYP2D6.2 wird eine normale Enzymaktivität angegeben, während für die Varianten CYP2D6.12, .17 und .41A eine verringerte Enzymaktivität gemessen wurde. Diese vier Allele können somit nicht berücksichtigt werden. Es sind also für 52 Varianten eindeutige Aktivitätsdaten vorhanden. Diese Varianten können aufgrund ihrer Enzymaktivität eingeteilt werden. Die eine Gruppe enthält 45 Varianten, bei denen die Mutation zu einem Rückgang oder Verlust der Enzymaktivität führt. Dies sind Varianten, deren Aktivität in der Datenbank mit *decreased/reduced* oder *none* angegeben ist. Die andere Gruppe enthält sieben Varianten, bei denen die Mutationen keinen Einfluss auf die Aktivität zeigen oder zu einem Anstieg der Enzymaktivität führen (annotierte Aktivität: *increased* oder *normal*). Für alle Varianten wurden die Konservierungswerte der entsprechenden Aminosäurepositionen im jeweiligen familienspezifischen Sequenz-*alignment* bestimmt. Wenn bei einem Allel mehrere Mutationen auftreten, wurde jeweils der Aminosäureaustausch betrachtet, dessen Position die höchste Konservierung im *alignment* aufweist.

Um die absoluten Werte der Konservierung der verschiedenen Subfamilien miteinander vergleichen zu können, müssen die Subfamilien eine ähnliche Diversität der Sequenzen aufweisen. Die Diversität der Sequenzen in den einzelnen Subfamilien lässt sich anhand der Distanzmatrix errechnen, die von CLUSTALW zur Erstellung des Multisequenz-*alignments* erzeugt wird. In der Matrix werden die Distanzen aus dem paarweisen *alignments* aller Sequenzen abgelegt. Die Distanz-/Similaritäts-Matrizen der untersuchten Subfamilien sind im Anhang 9.2 dargestellt. Durch Berechnung der RMSD-Werte (*root mean square deviation*) der Distanzen kann die Diversität der Sequenzen in den einzelnen Subfamilien bestimmt werden. Die RMSD-Werte der untersuchten Subfamilien zeigen eine sehr ähnliche Diversität der Sequenzen in den einzelnen Subfamilien (Tabelle 16). Aufgrund der ähnlichen Diversität der Sequenzen innerhalb der verschiedenen Subfamilien kann man die absoluten Konservierungswerte der einzelnen Subfamilien miteinander vergleichen. Die untersuchten Subfamilien können also gemeinsam ausgewertet werden.

Tabelle 16: RMSD der Distanzen aus dem paarweisen *alignment* der Sequenzen der Subfamilien CYP2B, CYP2C, CYP2D und CYP3A.

Subfamilie	RMSD
CYP2B	0,36
CYP2C	0,36
CYP2D	0,36
CYP3A	0,34

Neben der Konservierung wurde für jeden Aminosäureaustausch zusätzlich die Distanz aus der BLOSUM62-Matrix bestimmt. Dadurch erhält man einen quantitativen Wert für die Ähnlichkeit der Aminosäure vor und nach der Mutation. In Abbildung 59 sind für die sieben aktiven und 45 inaktiven Varianten der untersuchten Subfamilien die Konservierung und die Distanzwerte aus der BLOSUM62-Matrix aufgetragen.

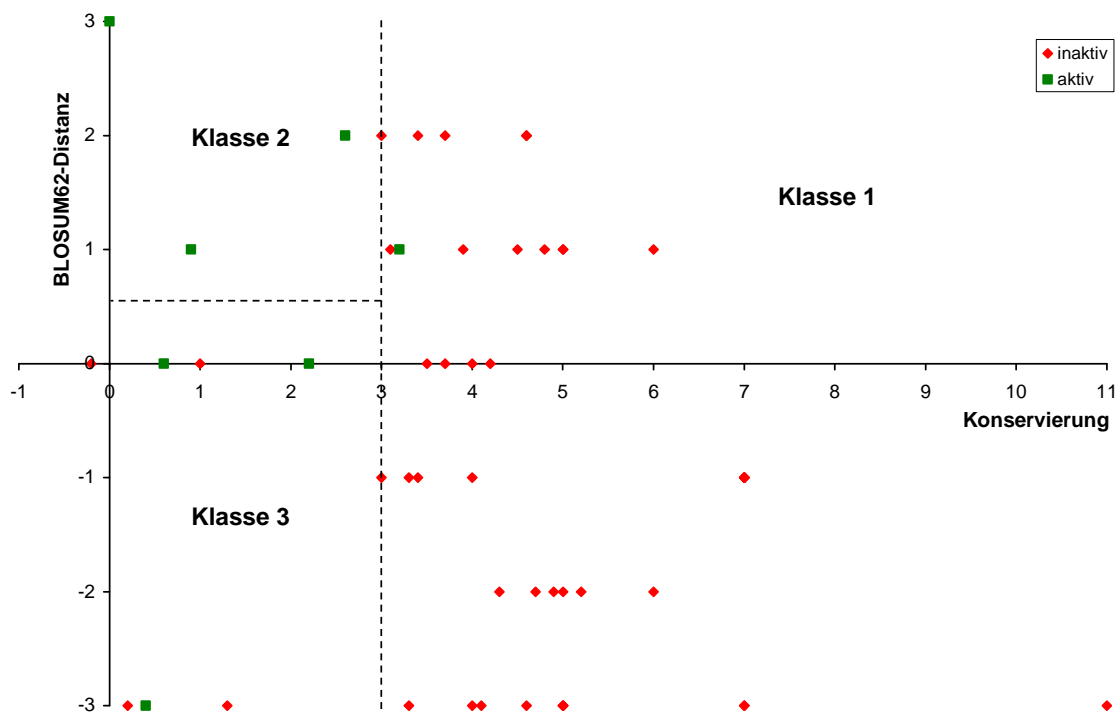


Abbildung 59: Klassifikation der untersuchten Varianten aufgrund der experimentell gemessenen Enzymaktivität, des Konservierungswertes der betreffenden Aminosäureposition im familienspezifischen Alignment und der BLOSUM62-Distanz des Aminosäureaustausches. Varianten, die experimentell aktiv sind, sind grün dargestellt, inaktive Varianten rot. Die Varianten konnten in drei Klassen eingeteilt werden.

Anhand dieser Analyse konnten die Varianten nun in drei Klassen eingeteilt werden. Die Klasse 1 enthält Varianten mit Mutationen an Positionen mit einer Konservierung $\geq 3,0$. Es befinden sich 42 Varianten in Klasse 1. Von diesen sind 41 Varianten experimentell inaktiv. Die inaktive Variante CYP2B6.8 (K139E) trägt beispielsweise eine Mutation an der Position 139 mit dem Konservierungswert 6,0 und der Wert der BLOSUM-Distanzmatrix für den Aminosäureaustausch Lys zu Glu beträgt 1. Die Variante CYP2D6.35 ist ein Ausreißer in der Klasse 1. Die Variante zeigt trotz einer Konservierung von 3,2 eine normale Enzymaktivität.

Die Klasse 2 enthält Varianten an Positionen mit einer Konservierung $< 3,0$ und einer BLOSUM-Distanz ≥ 1 . Die Klasse 2 enthält drei Varianten, die *in vitro* alle eine normale Enzymaktivität zeigen. Die Mutation L17I in CYP2C19 betrifft eine Position mit einem Konservierungswert von 2,6. Bei dem Austausch Leu gegen Ile betrifft zwei ähnliche Aminosäuren und hat einen Wert von 2 in der BLOSUM-Distanzmatrix.

Die übrigen Varianten bilden die Klasse 3. Die Klasse 3 enthält Varianten an Positionen mit einer Konservierung $< 3,0$ und BLOSUM-Distanz < 1 . Diese Klasse enthält sieben Varianten von denen drei aktiv und vier inaktiv sind.

Für die untersuchten Varianten zeigt sich eine Korrelation zwischen der Konservierung der mutierten Aminosäureposition in der Subfamilie und der Enzymaktivität. Mutationen an Positionen mit einem Konservierungswert $\geq 3,0$ sind inaktiv, unabhängig von dem betreffenden Aminosäureaustausch (Klasse 1). Dies entspricht der Erwartung, dass Mutationen an einer höher konservierten Position einen Einfluss auf die Proteinfunktion haben.

Bei Mutationen an Positionen mit einem Konservierungswert $< 3,0$ spielt der Aminosäureaustausch eine Rolle. Wenn der Aminosäureaustausch an einer Position niedriger Konservierung ($< 3,0$) zu einer ähnlichen Aminosäure (BLOSUM-Distanz ≥ 1) erfolgt, wird dieser von dem Protein toleriert und man beobachtet eine normale Enzymaktivität (Klasse 2). Wenn der Aminosäureaustausch jedoch zu einer unähnlichen Aminosäure mit einer BLOSUM-Distanz < 1 erfolgt wird dies in manchen Fällen vom Enzym toleriert, in anderen Fällen nicht (Klasse 3). Die beiden Varianten CYP2C9.13 und 3A4.18 beinhalten beispielsweise beide den Aminosäureaustausch Leu gegen Pro (BLOSSUM62-Distanz: -3) an einer niedrig konservierten Position (2C9.13 (0,2) und 3A4.18 (0,4)). Während die Mutation von CYP3A4 toleriert wird, ist die Variante CYP2C9.13 inaktiv.

Ausgehend von dieser Analyse können nun Vorhersagen für die Varianten mit unbekannter Enzymaktivität durchgeführt werden.

Aus den Konservierungsanalysen der *SNPs* mit bekannter experimenteller Aktivität konnten drei einfache Regeln abgeleitet werden, mit Hilfe derer der Einfluss von Mutationen auf die Enzymaktivität der P450-Monooxygenasen vorhergesagt werden kann:

1. Für die Mutationen der zu untersuchenden Variante wird der Konservierungswert der mutierten Aminosäureposition im familienspezifischen Alignment berechnet.
2. Bei Varianten mit mehreren Mutationen wird die Mutation an der höchst konservierten Position berücksichtigt.
3. Wenn die Mutation an einer konservierten Position zu einem Aminosäureaustausch zu der konservierten Aminosäure hin erfolgt, wird die Variante als aktiv definiert und gegebenenfalls die Mutation mit der zweithöchsten Konservierung berücksichtigt.
4. Für die Mutationen wird die Distanz aus der BLOSUM62-Matrix berücksichtigt.
5. Mutationen an Positionen mit einer Konservierung $\geq 3,2$ werden nicht toleriert. Mutationen an Positionen mit einer Konservierung $< 3,0$ und einer BLOSUM-Distanz ≥ 1 werden toleriert.
Für Mutationen an Positionen mit einer Konservierung $< 3,0$ und einer BLOSUM-Distanz < 1 kann der Effekt der Mutation nicht vorhergesagt werden.

Ausgehend von diesen in der vorliegenden Arbeit entwickelten Regeln kann nun für die Allele der CYPAllel-Datenbank, deren Enzymaktivität nicht bekannt ist, eine Vorhersage des Einflusses der Mutationen auf die Enzymaktivität durchgeführt werden und die entsprechenden Enzymvarianten können als aktiv oder inaktiv klassifiziert werden. Tabelle 17 bis Tabelle 23 zeigen eine Übersicht über die ns*SNPs* der Isoenzyme CYP2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 und 3A5 aus der CYPAllel-Datenbank. Für ns*SNPs* mit bekannter experimenteller Enzymaktivität ist diese angegeben. Für alle anderen *SNPs* sollte die Enzymaktivität vorhergesagt werden.

In der CYPAllel-Datenbank liegen 95 Allele mit ns*SNPs* vor, deren Enzymaktivität bisher nicht bestimmt wurde. Für diese Varianten wurden nun, anhand der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Regeln, Vorhersagen über die Enzymaktivität durchgeführt.

In der Abbildung 60 sind für die Varianten die berechneten Konservierungswerte und die Distanzwerte aus der BLOSUM62-Matrix aufgetragen.

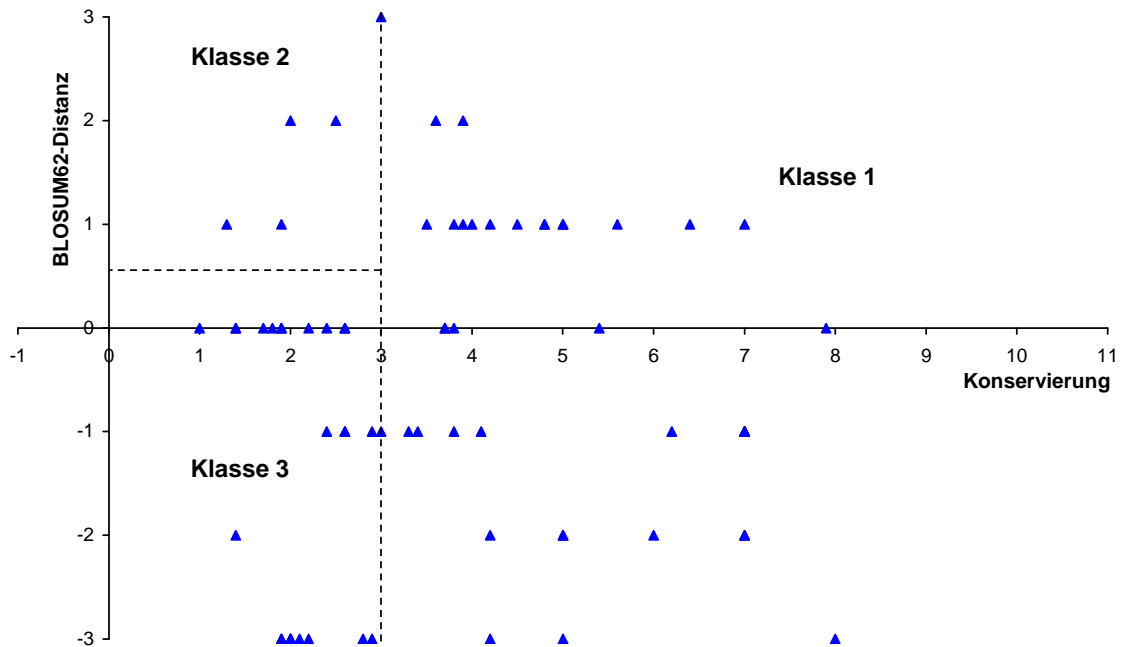


Abbildung 60: Klassifikation der Varianten mit experimentell unbestimmter Aktivität zur Vorhersage der Aktivität.

Alle Varianten mit Mutationen an konservierten Positionen ($\geq 3,0$) haben einen Einfluss auf die Enzymaktivität. Die Klasse 1 beinhaltet 57 Varianten. Für die zwölf Varianten der Klasse 2 an Positionen mit einer Konservierung $< 3,0$ und einem Aminosäureaustausch mit einer BLOSUM-Distanz $\geq 1,0$ wird eine normale Enzymaktivität vorhergesagt.

Für Varianten der Klasse 3, die den Austausch von Aminosäuren an Positionen betreffen, die eine Konservierung $< 3,0$ und einem Aminosäureaustausch mit einer BLOSUM-Distanz $< 1,0$ aufweisen, kann keine eindeutige Vorhersage über den Einfluss auf die Enzymaktivität getroffen werden. Dies betrifft in der vorliegenden Untersuchung 26 Varianten. Von den 95 Varianten mit bisher nicht bestimmter Enzymaktivität konnte für 69 Varianten (73 %) eine Vorhersage durchgeführt werden. Von diesen 69 Varianten wurden 83 % als inaktiv und 17 % als aktiv vorhergesagt. Damit sind für 121 Allele (82 %) der untersuchten Subfamilien in der CYPAllel-Datenbank experimentelle Daten oder Vorhersagen für die Enzymaktivität vorhanden. Von diesen 121 Allelen sind 81 % inaktiv bzw. als inaktiv vorhergesagt.

Ergebnisse

Tabelle 17: Übersicht über die untersuchten Allele von CYP2B6. Wenn in einem Allel mehrere Mutationen auftreten, ist die Mutation an der höchstkonservierten Position fett markiert. Alle Varianten oberhalb der roten Linie gehören zur Klasse 1 und sind inaktiv. Alle Varianten zwischen der roten und grünen Linie gehören zu Klasse 2 und sind aktiv. Für die Varianten unterhalb der grünen Linie kann der Einfluss der Mutation auf die Enzymaktivität nicht vorhergesagt werden (Klasse 3). Für Varianten ohne experimentell bestimmte Aktivität wurde die Aktivität aufgrund der Klassifizierung vorhergesagt und die Varianten sind farbig markiert: Klasse 1 (rot), Klasse 2 (grün) und Klasse 3 (blau). In den Varianten CYP2B6.4, .6 und .7 führt die Mutation an der Position 262 zu einem Aminosäureaustausch von Lys zu Arg, welches im *alignment* an der entsprechenden Position hoch konserviert ist. Die Mutation ist orange markiert und der Konservierungswert wurde als 0,0 definiert.

Allel (CYP2B6)	Variante	Mutationen	experimentelle Aktivität	Konservierung	BLOSUM
<i>CYP2B6*21</i>	CYP2B6.21	P428T	Decr.	7,0	-1
<i>CYP2B6*8</i>	CYP2B6.8	K139E	Decr.	6,0	1
n.b.	CYP2B6.P167A	P167A		5,0	-1
<i>CYP2B6*12</i>	CYP2B6.12	G99E	Decr.	5,0	-2
<i>CYP2B6*19</i>	CYP2B6.19	Q172H; K262R; R336C	Decr.	5,0	-3
<i>CYP2B6*13A+B</i>	CYP2B6.13	K139E ; Q172H; K262R	Decr./Reduced	5,0	1
<i>CYP2B6*16</i>	CYP2B6.16	K262R ; I328T	Decr.	4,6	2
<i>CYP2B6*20</i>	CYP2B6.20	T168I; Q172H; K262R	Decr.	4,6	2
<i>CYP2B6*14</i>	CYP2B6.14	R140Q	Decr./Reduced	4,5	1
<i>CYP2B6*18</i>	CYP2B6.18	I328T	Decr.	4,0	-1
n.b.	CYP2B6.I328T	I328T		4,0	-1
<i>CYP2B6*25</i>	CYP2B6.25	Q485L		3,4	-2
<i>CYP2B6*27</i>	CYP2B6.27	M198T	Decr./Reduced	3,4	-1
<i>CYP2B6*17A+B</i>	CYP2B6.17	T26S; D28G ; R29T		3,4	-1
<i>CYP2B6*24</i>	CYP2B6.24	G476D		3,3	-1
<i>CYP2B6*15A+B</i>	CYP2B6.15	I391N	Decr.	3,3	-3
<i>CYP2B6*11A+B</i>	CYP2B6.11	M46V	Decr.	3,1	1
<i>CYP2B6*23</i>	CYP2B6.23	M459V		2,4	1
<i>CYP2B6*6A-C</i>	CYP2B6.6	Q172H ; K262R		1,9	0
<i>CYP2B6*7A+B</i>	CYP2B6.7	Q172H ; K262R ; R487C		1,9	0
<i>CYP2B6*9</i>	CYP2B6.9	Q172H		1,9	0
<i>CYP2B6*4A-D</i>	CYP2B6.4	K262R		0,0	0
<i>CYP2B6*3</i>	CYP2B6.3	S259R		2,9	-1
<i>CYP2B6*10</i>	CYP2B6.10	Q21L; R22C		2,2	-3
<i>CYP2B6*2A+B</i>	CYP2B6.2	R22C		1,0	-3
<i>CYP2B6*5A-C</i>	CYP2B6.5	R487C		0,4	-3

Tabelle 18: Übersicht über die untersuchten Allele von CYP2C8.

Allel (CYP2C8)	Variante	Mutationen	experimentelle Aktivität	Konservierung	BLOSUM
<i>CYP2C8*10</i>	CYP2C8.10	K383N		5,0	0
<i>CYP2C8*8</i>	CYP2C8.8	R186G	Decreased/Reduced	4,7	-2
<i>CYP2C8*4</i>	CYP2C8.4	I264M		3,9	1
<i>CYP2C8*3</i>	CYP2C8.3	K399R ; R139K	Decreased/Reduced	3,7	-2
<i>CYP2C8*9</i>	CYP2C8.9	K247R		3,6	2
n.b.	CYP2C8.I244V	I244V		2,6	3
<i>CYP2C8*2</i>	CYP2C8.2	I269F	Increased	2,2	0
<i>CYP2C8*6</i>	CYP2C8.6	G171S		2,0	0

Tabelle 19: Übersicht über die untersuchten Allele von CYP2C19.

Allel (CYP2C19)	Variante	Mutationen	experimentelle Aktivität	Konservierung	BLOSUM
<i>CYP2C19*8</i>	CYP2C19.8	W120R	None	11,0	-3
n.b.	CYP2C19.W212C	W212C/C/X		7,9	-2
<i>CYP2C19*10</i>	CYP2C19.10	P227L ; I331V	Decreased/Reduced	7,0	-3
n.b.	CYP2C19.F168L	F168L		5,0	0
<i>CYP2C19*5A</i>	CYP2C19.5A	R433W	None	5,0	-3
<i>CYP2C19*5B</i>	CYP2C19.5B	R433W ; I331V	None	5,0	-3
<i>CYP2C19*6</i>	CYP2C19.6	R132Q ; I331V	None	4,8	1
<i>CYP2C19*16</i>	CYP2C19.16	R442C		4,2	-3
<i>CYP2C19*9</i>	CYP2C19.9	R144H ; I331V	(Decreased/Reduced)	4,0	0
<i>CYP2C19*13</i>	CYP2C19.13	R410C ; I331V		3,6	-3
<i>CYP2C19*1B+C</i>	CYP2C19.1B	I331V	Normal	0,0	3
<i>CYP2C19*15</i>	CYP2C19.15	I331V ; I19L		2,6	2
<i>CYP2C19*18</i>	CYP2C19.18	I331V ; R329H		1,7	0
<i>CYP2C19*19</i>	CYP2C19.19	I331V ; S51G		0,9	0
<i>CYP2C19*11</i>	CYP2C19.11	I331V ; R150H		0,6	0
n.d.	CYP2C19.M74T	M74T		1,4	-1
<i>CYP2C19*14</i>	CYP2C19.14	I331V ; L17P		2,6	-3

Tabelle 20: Übersicht über die untersuchten Allele von CYP2C9.

Allel (CYP2C9)	Variante	Mutationen	experimentelle Aktivität	Konservierung	BLOSUM
<i>CYP2C9*9</i>	CYP2C9.9	H251R		8,0	0
<i>CYP2C9*12</i>	CYP2C9.12	P489S	Decr./Reduced	7,0	-1
<i>CYP2C9*21</i>	CYP2C9.21	P30L		7,0	-3
<i>CYP2C9*17</i>	CYP2C9.17	P382S		6,4	-1
<i>CYP2C9*20</i>	CYP2C9.20	G70R		6,0	-2
<i>CYP2C9*22</i>	CYP2C9.22	N41D		5,6	1
n.b.	CYP2C9.Y358C	Y358C		5,4	-2
<i>CYP2C9*24</i>	CYP2C9.24	E354K		5,0	1
<i>CYP2C9*19</i>	CYP2C9.19	Q454H		5,0	0
<i>CYP2C9*18</i>	CYP2C9.18	D397A ; I359L	Decr./Reduced	4,9	-2
<i>CYP2C9*28</i>	CYP2C9.28	Q214L	Decr./Reduced	4,3	-2
<i>CYP2C9*16</i>	CYP2C9.16	T299A	Decr./Reduced	4,2	0
<i>CYP2C9*11A+B</i>	CYP2C9.11	R335W	Decr./Reduced	4,1	-3
n.b.	CYP2C9.L413P	L413P		4,0	-3
<i>CYP2C9*2A-C</i>	CYP2C9.2	R144C	Decr./Reduced	4,0	-3
<i>CYP2C9*23</i>	CYP2C9.23	V76M		3,9	1
<i>CYP2C9*14</i>	CYP2C9.14	R125H	Decr./Reduced	3,7	0
<i>CYP2C9*3A +B</i>	CYP2C9.3	I359L	Decr./Reduced	3,4	2
<i>CYP2C9*4</i>	CYP2C9.4	I359T		3,4	-1
<i>CYP2C9*26</i>	CYP2C9.26	T130R	Decr./Reduced	3,3	-1
<i>CYP2C9*5</i>	CYP2C9.5	D360E	Decr./Reduced	3,0	2
n.b.	CYP2C9.L17I	L17I	Normal	2,6	2
<i>CYP2C9*7</i>	CYP2C9.7	L19I		2,6	2
<i>CYP2C9*8</i>	CYP2C9.8	R150H	Increased	0,6	0
<i>CYP2C9*30</i>	CYP2C9.30	A477T	Decr./Reduced	-0,2	0
<i>CYP2C9*29</i>	CYP2C9.29	P279T		1,4	-1
<i>CYP2C9*10</i>	CYP2C9.10	E272G		2,2	-2
<i>CYP2C9*27</i>	CYP2C9.27	R150L		0,6	-2
<i>CYP2C9*13</i>	CYP2C9.13	L90P	Decr./Reduced	0,2	-3

Tabelle 21: Übersicht über die untersuchten Allele von CYP2D6. Varianten, bei denen für dieselben Mutationen widersprüchliche Aktivitätsdaten annotiert sind, sind gelb unterlegt. Allele, deren experimentelle Aktivitäten nicht mit der Vorhersage übereinstimmen, sind grau unterlegt.

Allel (CYP2D6)	Variante	Mutationen	experimentelle Aktivität	Konservierung	BLOSUM
<i>CYP2D6*10A,B,D</i>	CYP2D6.10	P34S ; S486T	Decr./Reduced	7,0	-1
<i>CYP2D6*14A</i>	CYP2D6.14A	P34S ; G169R; R296C; S486T	None	7,0	-1
<i>CYP2D6*36</i> Single	CYP2D6.36	P34S ; P469A; T470A; H478S; G479A; F481V; A482S; S486T	None	7,0	-1
<i>CYP2D6*37</i>	CYP2D6.37	P34S ; R201H; S486T		7,0	-1
<i>CYP2D6*47</i>	CYP2D6.47	R25W; P34S ; S486T		7,0	-1
<i>CYP2D6*49</i>	CYP2D6.49	P34S ; F120I; S486T		7,0	-1
<i>CYP2D6*52</i>	CYP2D6.52	P34S ; E418K		7,0	-1
<i>CYP2D6*54</i>	CYP2D6.54	P34S ; T261I; S486T		7,0	-1
<i>CYP2D6*57</i>	CYP2D6.57	P34S ; R62W; P469A; T470A; H478S; G479A; F481V; A482S; S486T		7,0	-1
n.b.		W152G/R/R		6,8	-2
<i>CYP2D6*61</i>	CYP2D6.61	S486T		6,2	1
<i>CYP2D6*7</i>	CYP2D6.7	H324P	None	5,2	-2
<i>CYP2D6*51</i>	CYP2D6.51	R296C; E334A ; S486T		5,0	-1
<i>CYP2D6*50</i>	CYP2D6.50	E156A		5,0	-1
<i>CYP2D6*14B</i>	CYP2D6.14B	G169R ; R296C; S486T		4,8	-2
n.d.	CYP2D6.G169E	G169E		4,8	-2
n.d.	CYP2D6.E278K	E278K		4,8	1
<i>CYP2D6*62</i>	CYP2D6.62	R441C	None	4,6	-3
<i>CYP2D6*55</i>	CYP2D6.55	R296C; K404Q ; S486T		4,5	1
<i>CYP2D6*27</i>	CYP2D6.27	E410K		4,2	1
<i>CYP2D6*32</i>	CYP2D6.32	R296C; E410K ; S486T		4,2	1
<i>CYP2D6*25</i>	CYP2D6.25	R343G		4,1	-2
<i>CYP2D6*29</i>	CYP2D6.29	V136M; R296C; V338M ; S486T		3,9	1
<i>CYP2D6*26</i>	CYP2D6.26	I369T		3,8	-1
<i>CYP2D6*28</i>	CYP2D6.28	V7M ; Q151E; R296C; S486T		3,7	1
<i>CYP2D6*43</i>	CYP2D6.43	R26H		3,7	0
<i>CYP2D6*46</i>	CYP2D6.46	R26H ; E155K; R296C; S486T		3,7	0
<i>CYP2D6*31</i>	CYP2D6.31	R296C; R440H ; S486T		3,5	0
<i>CYP2D6*35</i>	CYP2D6.35	V11M ; R296C; S486T	Normal	3,2	1
<i>CYP2D6*53</i>	CYP2D6.53	F120I; A122S		3,0	1
<i>CYP2D6*24</i>	CYP2D6.24	I297L		2,1	2
n.b.	CYP2D6.H478Y	H478Y		1,4	2
<i>CYP2D6*45A+B</i>	CYP2D6.45	E155K ; R296C; S486T		2,8	1
<i>CYP2D6*33</i>	CYP2D6.33	A237S	Normal	0,9	1
<i>CYP2D6*39</i>	CYP2D6.39	S486T		0,8	1
<i>CYP2D6*48</i>	CYP2D6.48	A90V		1,4	0

Ergebnisse

<i>CYP2D6*23</i>	CYP2D6.23	A85V		1,3	0
n.b.	CYP2D6.M279K	M279K		2,5	-1
n.b.	CYP2D6.L231P	L231P		2,2	-3
<i>CYP2D6*2A-M</i>	CYP2D6.2	R296C ; S486T	Normal	2,0	-3
<i>CYP2D6*12</i>	CYP2D6.12	G42R; R296C ; S486T	None	2,0	-3
<i>CYP2D6*17</i>	CYP2D6.17	T107I; R296C ; S486T	Decr./Reduced	2,0	-3
<i>CYP2D6*34</i>	CYP2D6.34	R296C		2,0	-3
<i>CYP2D6*41A</i>	CYP2D6.41	R296C ; S486T	Decr./Reduced	2,0	-3
<i>CYP2D6*22</i>	CYP2D6.22	R28C		1,8	-3

Tabelle 22: Übersicht über die untersuchten Allele von CYP3A4.

Allel (CYP3A4)	Variante	Mutationen	experimentelle Aktivität	Konservierung	BLOSUM
<i>CYP3A4*13</i>	CYP3A4.13	P416L	Decreased/Reduced	7,0	-3
<i>CYP3A4*5</i>	CYP3A4.5	P218R		7,0	-2
<i>CYP3A4*17</i>	CYP3A4.17	F189S	Decreased/Reduced	6,0	-2
<i>CYP3A4*7</i>	CYP3A4.7	G56D		6,0	-1
<i>CYP3A4*3</i>	CYP3A4.3	M445T		5,0	-1
<i>CYP3A4*8</i>	CYP3A4.8	R130Q	Decreased/Reduced	5,0	1
n.b.	CYP3A4.K96E	K96E		5,0	1
<i>CYP3A4*16A+B</i>	CYP3A4.16	T185S	Decreased/Reduced	3,9	1
<i>CYP3A4*14</i>	CYP3A4.14	L15P		3,8	-3
<i>CYP3A4*12</i>	CYP3A4.12	L373F	Decreased/Reduced	3,5	0
<i>CYP3A4*19</i>	CYP3A4.19	P467S		3,3	-1
<i>CYP3A4*4</i>	CYP3A4.4	I118V		3,1	3
<i>CYP3A4*10</i>	CYP3A4.10	D174H		3,0	-1
<i>CYP3A4*11</i>	CYP3A4.11	T363M	Decreased/Reduced	3,0	-1
<i>CYP3A4*9</i>	CYP3A4.9	V170I		2,9	3
<i>CYP3A4*15A+B</i>	CYP3A4.15	R162Q		2,4	1
n.b.	CYP3A4.S252A	S252A		1,4	1
<i>CYP3A4*2</i>	CYP3A4.2	S222P		1,9	-1
n.b.	CYP3A4.I431T	I431T		1,6	-1
<i>CYP3A4*18A+B</i>	CYP3A4.18	L293P	Increased	0,4	-3

Tabelle 23: Übersicht über die untersuchten Allele von CYP3A5.

Allel (CYP3A5)	Variante	Mutationen	experimentelle Aktivität	Konservierung	BLOSUM
n.b.	CYP3A5.S100Y	S100Y		3,8	-2
n.b.	CYP3A5.D277E	D277E		3,3	2
<i>CYP3A5*4</i>	CYP3A5.4	Q200R		1,9	1
<i>CYP3A5*2</i>	CYP3A5.2	T398N		1,0	0
<i>CYP3A5*9</i>	CYP3A5.9	A337T	Decreased/Reduced	1,0	0
<i>CYP3A5*8</i>	CYP3A5.8	R28C	Decreased/Reduced	1,3	-3

5.3.2 Untersuchung der Sequenz-Struktur-Funktions- Beziehungen von Varianten des murinen CYP21-Enzyms

Nebennierenrindensteroid (Corticosteroide) werden im menschlichen Körper durch drei miteinander verknüpfte enzymatische Biosynthesewege synthetisiert, welche zur Bildung von Mineralocorticoiden, Glucocorticoiden und Androgenen führen (Abbildung 61).¹⁴¹ Für jedes an der Biosynthese der Nebennierenrindenhormone beteiligte Enzym wurden erblich bedingte Defekte beschrieben. Die häufigste Ursache der angeborenen Nebennierenrindenhyperplasie ist ein Enzymdefekt der 21-Hydroxylase (CYP21A), der für 30-95 % der Fälle verantwortlich ist.²⁶⁹ 21-OHD (21-Hydroxylase-Defizienz) führt zu einer unzureichenden Cortisolbiosynthese und in 2/3 der Fälle zusätzlich zu einer verminderten Aldosteronbiosynthese. Durch die verminderte oder fehlende Bildung von Cortisol kommt es zu einer verminderten Rückkoppelung von Cortisol auf die Hypophyse (fehlender negativer Feedback). Als Folge wird vermehrt ACTH (adrenocorticotropes Hormon) aus dem Hypophysenvorderlappen ausgeschüttet. ACTH ist ein tropher Faktor und führt zur Vergrößerung der Nebennierenrinde (Hyperplasie), stimuliert aber auch die Enzyme der Cortisolbiosynthese. Bei eingeschränkter Funktion der 21-Hydroxylase entstehen vermehrt Vorstufen von Cortisol, zum Beispiel 17-Hydroxyprogesteron (17-OHP), die zu Androgenen wie dem Testosteron weiter metabolisiert werden (Abbildung 61). Dies kann zu einer Virilisierung („Vermännlichung“) der äußeren Genitalien führen.

Steroid 21-Hydroxylase (CYP21A) ist ein mikrosomales Cytochrom P450-Enzym, welches die 21-Hydroxylierung von 17-Hydroxyprogesteron und Progesteron zu 11-Deoxycortisol und 11-Deoxycorticosteron katalysiert.²⁷⁰ CYP21 besteht aus 494 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 52 kDa.²⁷¹ Das Gen, welches für das humane CYP21 (*CYP21A2*) codiert, befindet sich im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) auf dem Chromosom 6p21.3. Ein nichtfunktionelles Pseudogen (*CYP21A1-P*) befindet sich ungefähr 30 kb entfernt. *CYP21A2* und *CYP21A1-P* bestehen jeweils aus 10 Exons und weisen 98 % Sequenzidentität auf. *CYP21A1-P* trägt mehrere inaktivierende Mutationen. Mutationen, die 21-Hydroxylase-Mangel (21-OHD) verursachen, sind meistens die Folge komplexer Rekombinationen zwischen *CYP21A2* and *CYP21A1-P*.²⁷²

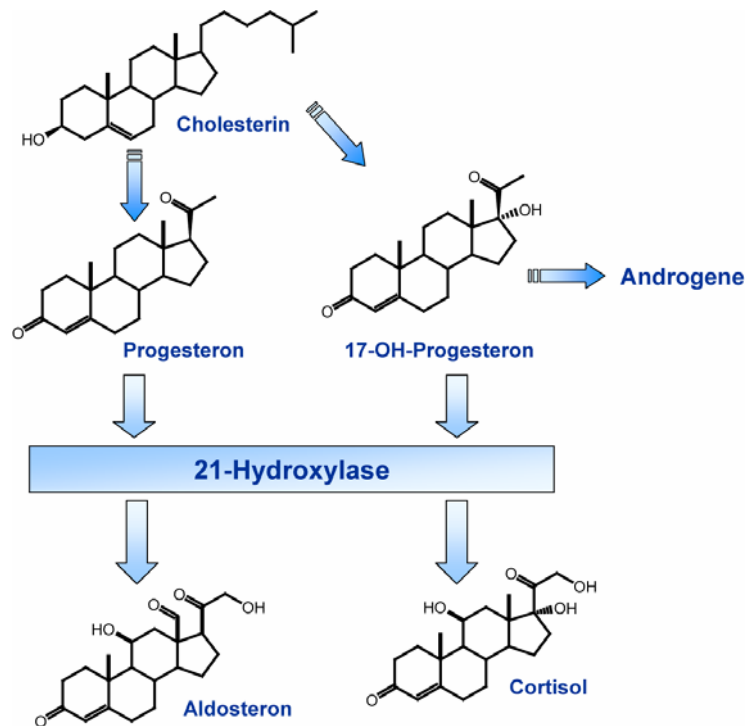


Abbildung 61: Vereinfachtes Schema der Steroidhormonbiosynthese in der Nebennierenrinde.²⁷³

Der Mausstamm H-2^{aw18} zeigt typische Eigenschaften von 21-OHD. Anhand einer detaillierten Analyse der Veränderungen auf Nukleotid-Ebene wurde untersucht, ob dieses Tiermodell, welches das einzig verfügbare ist, zur Untersuchung der angeborenen Nebennierenhyperplasie beim Menschen verwendet werden kann. Dazu wurde von der Arbeitsgruppe von G. Sippel (Kiel)^[2] eine detaillierte Analyse des *Cyp21*-Locus durchgeführt um die genetischen Ursachen von 21-OHD in H-2^{aw18} Mäusen zu untersuchen. Neben mehreren pseudogenspezifischen Punktmutationen wurden verschiedene neue *missense* Mutationen und eine *nonsense* Mutation beobachtet und es wurde für jede Punktmutation die *in vitro*-Enzymaktivität gemessen. Die experimentellen Daten aus der Arbeitsgruppe Sippel sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Die Struktur-Funktions-Beziehungen der beobachteten Varianten wurden durch eine Sequenzkonservierungsanalyse und die Modellierung der dreidimensionalen Struktur des murinen CYP21-Enzyms (CYP21A1 aus *Mus musculus*) untersucht.

^[2] Abteilung pädiatrische Endokrinologie, Klinik für allgemeine Pädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Christian-Albrechts-Universität Kiel

Tabelle 24: Kinetische Konstanten für CYP21 Wildtyp und Mutanten. (Daten: Arbeitsgruppe G. Sippel)²⁷⁴

	K_M (μM)	V_{MAX} ($\mu mol\ mg^{-1}\ min^{-1}$)	V_{MAX}/K_M
WT	1,0 ± 0,3	3,2 ± 0,3	3,2
R238Q	2,0 ± 1,2	3,6 ± 0,7	1,8
R346H	NC	NC	NC
R361H	2,4 ± 1,5	3,2 ± 0,8	1,3
A362V	1,4 ± 0,6	2,5 ± 0,4	1,7
R400C	NC	NC	NC
P458L	0,9 ± 0,4	2,5 ± 0,3	2,8
I462F	NC	NC	NC
L464F	4,6 ± 3,4	1,0 ± 0,4	0,2
P465L	1,0 ± 0,5	3,2 ± 0,4	3,2
Q470X	NC	NC	NC

Um den Einfluss der Mutationen zu untersuchen, wurde eine Konservierungsanalyse durchgeführt. Die Subfamilie CYP21A enthielt mit nur sieben Sequenzeinträgen zu wenige Sequenzen für eine Konservierungsanalyse. Deshalb wurden nach einer Homologiesuche mittels BLAST die 20 Sequenzen der nächst ähnlichen Subfamilie CYP17A hinzugenommen. Die mit dem Programm AL2CO berechneten Konservierungswerte zeigten eine ausgedehnte Variationsbreite der Konservierung: R361 (0,0), P458 (0,4), P465 (0,7), R238 (1,8), A362 (2,3), L464 (2,4), Q470 (2,5), I462 (3,1), R346 (4,3), R400 (4,5). Die Konservierung reichte von 8 aus 30 Sequenzen (R361) bis zu 29 aus 30 Sequenzen (R400).

Es ist keine experimentelle 3-D-Struktur der CYP21-Hydroxylase verfügbar. Deshalb wurde zur Analyse der Position der Mutationen in der Struktur ein 3-D-Strukturmodell des murinen Cyp21-Proteins (GenBank NM_009995)²⁷⁵ erstellt. Als *template* wurden die 3-D-Strukturen von vier homologen Säugetier-P450 verwendet. Die Strukturen von CYP2C5 aus *Oryctolagus cuniculus* (PDB-Eintrag 1N6B)²⁷⁶, CYP2B4 aus *Oryctolagus cuniculus* (PDB-Eintrag 1PO5)²⁷⁷, CYP2C9 aus *Homo sapiens* (PDB-Eintrag 1OG5)¹⁴ und CYP2C8 aus *Homo sapiens* (PDB-Eintrag 1PQ2)²⁷⁸ wurden aus der PDB-Datenbank ausgewählt.¹⁵ Das Sequenz-*alignment* von Cyp21 mit vier Säugetier-P450 bekannter Struktur zeigt, dass funktionell wichtige Aminosäuren der P450-Enzyme im *alignment* konserviert sind (Abbildung 62).

Cyp21a1 MLLPGLLLLLLLLLLAGTRWLWGQWK-LRKLHLLRLAPGFLHFL 41
CYP2C5 -----MAKKTSSKGLPPGPTFPPIIGNILQID
CYP2B4 -----MAKKTSSKGLPPGSPPLPVLGNLLQMD
CYP2C9 -----MAKKTSSKGR-PPGPTPLPVIGNILQIG
CYP2C8 -----MAKKTSSKGLPPGPTPLPIIGNMLQID
* * : : : . : * : *

CYP21a1 QPNLPIYLLGLTQKLGPIYRIRLGLQDVVVLNSNRTIEEALIQKWVDFAG 91
CYP2C5 AKDISKSLTKFSECYGPVFTVYLGMPKTVVVLHGVEAVKEALVDLGEFAG
CYP2B4 RKGLLRSLRLREKYGDVFTVYLSRPPVVLCTDAIREALVDQAEAFSG
CYP2C9 IKDISKSLTNLSKVYGPVFTVYFGLKPIVVLHGVEAVKEALIDLGEFAG
CYP2C8 VKDICKSFTNFASKVYGPVFTVYFGMNPVVFHGVEAVKEALIDNGEEFSG
. : : : * : : : * . * : : . : : * : : * : *

CYP21a1 RPHM---LNGKMDLDSLGDYSLMWWKAKKLSRSALM-LGM-RDSMEPLI 136
CYP2C5 RGSVPPILEKVKSLGIAFSN-AKTWKEMRRLSLMTRNFGMGKRSIEDRI
CYP2B4 RGIKAVVDPVIFQGYGVIFAN-GERWRALRRFSLATMRDFGMGKRSVEERI
CYP2C9 RGIPLAERANRFGFIVFSN-GKKWKEIRRFSLMTRNFGMGKRSIEDRV
CYP2C8 RGNSPISQRITKGLGISSN-GKRWKEIRRFSLMTRNFGMGKRSIEDRV
* . : . : . * : : : * : : * : * : * : *

CYP21a1 EQLTQEFCEMRQAQAGTPVAIHKEFSFLTCSIISCLTFGD---KDSTLV 182
CYP2C5 QEEARCLVEELRKTNASPCDPTFILGCAPCNVICSVIFHNRFDYKDEEFL
CYP2B4 QEEARCLVEELRKSAGALLDNTLLFHSITSNIICSVIFGKRFYKDPVFL
CYP2C9 QEEARCLVEELRKTASPCDPTFILGCAPCNVICSVIFHNRFDYKDEEFL
CYP2C8 QEEAHCLVEELRKTASPCDPTFILGCAPCNVICSVVVFQKRFYKDNQFL
: : : : * : * . : : : * : : * . * : * : *

CYP21a1 QTLHDCVQDLLQAWNHSIQILTIIP-LLRFLPNPGLQKQIQESRDHI 231
CYP2C5 KLMESEHENVLLGTPW-LQVYNNFPALLDYFPGIHKTLKNADYIKNFI
CYP2B4 RLDDLDFQSFSLISSFS-SQVFEFSGFLKHPGTHRQIYRNLQEINTFI
CYP2C9 NLMEKLNENIEILSSPW-IQVYNNFPALLDYFPGTHNKLKNVAFMKSFI
CYP2C8 TLMKRFNENFRILNSPW-IQVCNFPPLIDCFPGTHNKLKNVALTRSYI
. : . : . * : : : * . : : . : *

CYP21a1 VKQQLK^RHKESLVAGQWKMDIDYMLQGVQKQDQKDEERLHEGHVHMSVV 281
CYP2C5 M-EKVKEHQKLLDVNNPRDFIDCFLIKMEQENN---LEFTLESV-IAVS
CYP2B4 G-QSVEKHRATLDPSNPRDFIDVYLLRMEKDKSDPSSEFHHQNL-LTVL
CYP2C9 L-EKVKEHQESMDMNNPQDFIDCFLMKMEKEKHNPSEFTIESELE-NTAV
CYP2C8 R-EKVKEHQASLDVNNPRDFIDCFLIKMEQEKDNQKSEFNIEENLV-GTAV
. : : : * : : : * : : * : : * : : * : : *

CYP21a1 DLFIGGTETTTATLSWAVAFLLHHPEIQKRLQAEIDLKLGPGSQLLYRNR 331
CYP2C5 DLFGAGTETTTSTTLRYSLLLLLKHPEVAARVQEEIERVIGRHRSPCMQDR
CYP2B4 SLFFAGTETTTSTTLRYGFLMLKYPHVTERVQKEIEQVIGSHRPPALDDR
CYP2C9 DLFGAGTETTTSTTLRYALLLLLLKHPEVTAKVQEEIERVIGRHRSPCMQDR
CYP2C8 DLFVAGTETTTSTTLRYGFLLLLLKHPEVTAKVQEEIDHVIIGRHRSPCMQDR
. * . * : : * : : * : : * : : * : : * : : *

CYP21a1 MQLPLLMTAIAEVLRLRPVPLALPHRAT^RASSISGYDIPKDMVIIPNIQ 381
CYP2C5 SRMPYTDAVIHEIQRFIDLLPTNLPHAVTRDVRFRNYFIPKGTDIITSLT
CYP2B4 AKMPYTDAVIHEIQRLGDLIPFGVPHTVTKDTQFRGYVVPKNTVEFVPLS
CYP2C9 SHMPYTDAVVHEVQRYIDLLPTSLPHAVTCDIKFRNYLIPKGTTLISLT
CYP2C8 SHMPYTDAVVHEIQRYSDLVPTGVPHAVTTDTKFRNYLIPKGTTIMALLT
: : * * : : * : * : : * : * : * : * : * : *

CYP21a1 GANLDEM^VWELPSKFWPDR^FLEPGKNRTPS---FGCGARVCLGEPLAR 427
CYP2C5 SVLHDEKAFPNPKVFDPGHFLDESGNFKSDYFMPFSAGKRCVGEGLAR
CYP2B4 SALHDPRYFETPNTFNPFGHFLDANGALKRNEGFMFSLGKRICLGEGLAR
CYP2C9 SVLHDNKEFFPNPEMFDPHHFLDEGGNFKSKYFMPFSAGKRICVGEALAG
CYP2C8 SVLHDDKEFFPNPIFDPGHFLDKNGNFKSDYFMPFSAGKRICAGEGLAR
. . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

CYP21a1 LE^LLVV^LARLLQAFTLLPPPDTLPSLQPPYAG^INL^PIPPF^QVRLQPRN 477
CYP2C5 MELFLFLTSILQNFKLQSLVEPKDLDTAVVNGFVSV-PSYQLCFIPI-
CYP2B4 TELFLF^TTILQNF^SIASPV^PEDIDLTPRESGVGNV-PSYQIRFLAR-
CYP2C9 MELFLFLTSILQNFNLKSLVDPK^NLD^TTPV^VNGFASV^P-PFYQLCFIPIV-
CYP2C8 MELFLFL^TTILQNF^NLKSV^DDLK^NLNT^TAV^TK^GIV^SLP-PSYQICFIPIV-
* * : : * : * : * : * : * : *

Abbildung 62: Multisequenz-*alignment* der Aminosäuresequenz der murinen CYP21a1 mit den Sequenzen der *template*-Proteine, die für die Homologiemodellierung verwendet wurden. Die Nummerierung entspricht der CYP21a1-Sequenz. Die Positionen der untersuchten Mutationen sind gelb markiert. Konservierte, spezifische P450-Aminosäuren sind grau markiert (das konservierte Thr 290 in der I-Helix, das konservierte EXXR-Motiv mit den Aminosäuren Glu 343 und Arg 346 in der Helix K und das konservierte Cys420, der fünfte Ligand des Hämeisens).

Der PROSA-Qualitäts-Check zeigt, dass das Modell der murinen CYP21 von guter Qualität ist. Sämtliche Interaktionsenergien der Aminosäuren mit dem restlichen Protein sind negativ (Abbildung 63) und ähnlich der Energien der *template*-Strukturen. Der PROSA-Z-score des Modells ist ebenfalls ähnlich denen der *templates*.

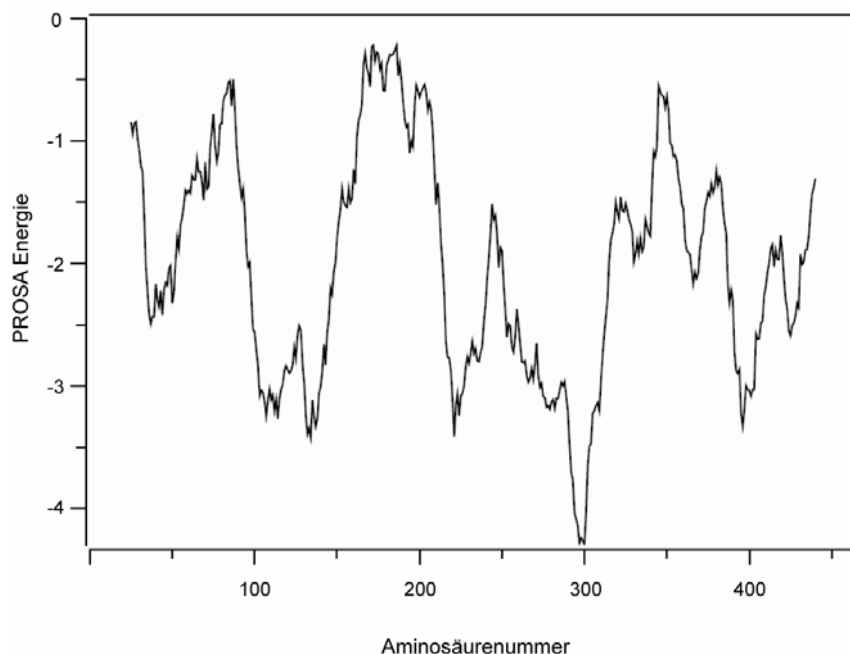


Abbildung 63: PROSA 2003-Energie-Plot des Cyp21-Modells. Das Diagramm repräsentiert die Interaktionsenergien der Aminosäuren; negative Werte entsprechen stabilen Regionen des Proteins.

Das erstellte Homologiemodell des murinen CYP21-Enzyms erlaubt es, die Positionen der Mutationen in der 3-D-Struktur zu bestimmen. Die Mutationen liegen in der Substratbindetasche, im Bereich der mutmaßlichen Redoxpartner-Interaktionsoberfläche oder in anderen, funktionell nicht relevanten Bereichen des Proteins (Abbildung 64).

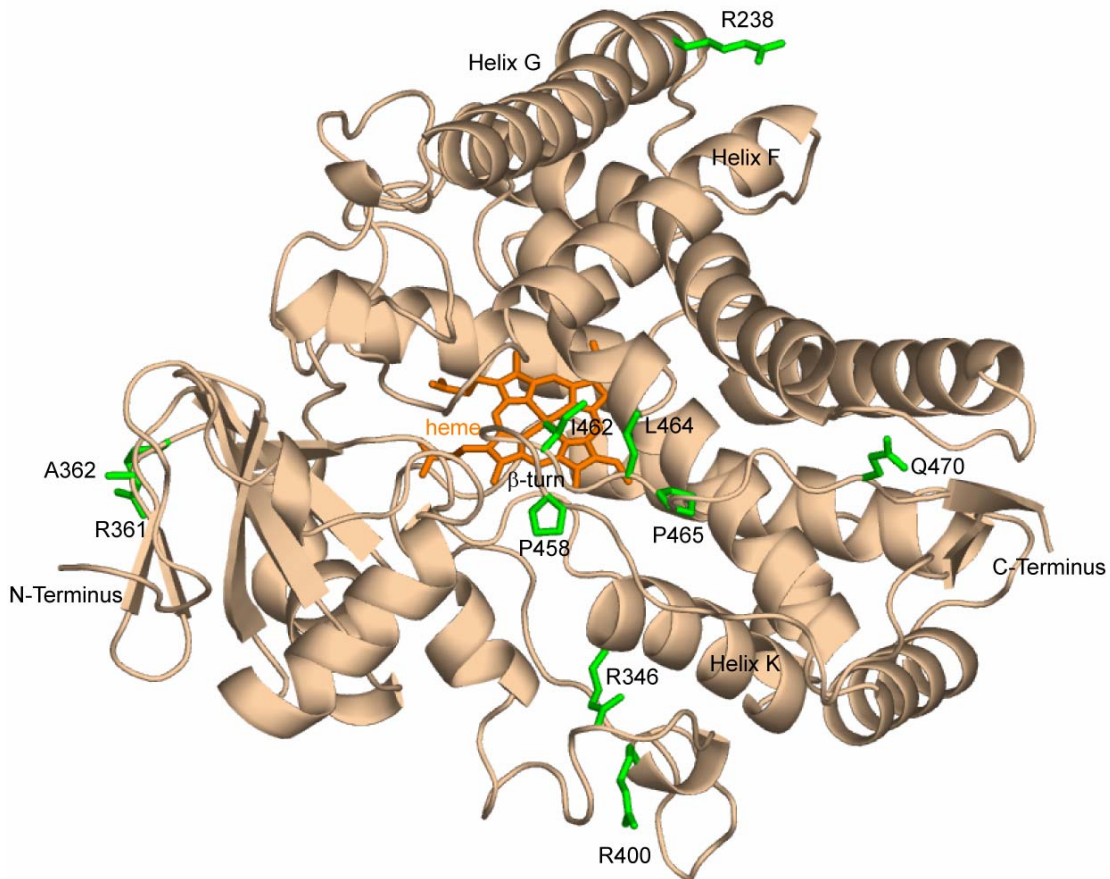


Abbildung 64: Struktur des CYP21-Modells. Die untersuchten Aminosäuren sind grün dargestellt. Die Hämgruppe ist orange dargestellt.

Durch Kombination der Konservierungsanalyse mit der Analyse der Position der Mutationen in der Proteinstruktur und den Mutageneseexperimenten war es möglich, die Mutationen in drei Klassen einzuteilen: Die Klasse I enthält Mutationen, die zu einem geringfügigen Rückgang der Enzymaktivität führen. Die Klassen II und III enthalten Mutationen, die einen deutlichen Rückgang ($> 70\%$) der Aktivität verursachen. Die Varianten der Klasse II erniedrigen den V_{MAX} -Wert, während die Mutanten der Klasse III den K_M -Wert erhöhen (Abbildung 65). Bei der Variante Q470X handelt es sich um eine besondere Mutation, da sie ein vorzeitiges Stoppcodon an einer konservierten Position einführt. Das Fehlen von 17 Aminosäuren des C-terminalen Teils des Proteins führt zum totalen Verlust der Enzymaktivität.

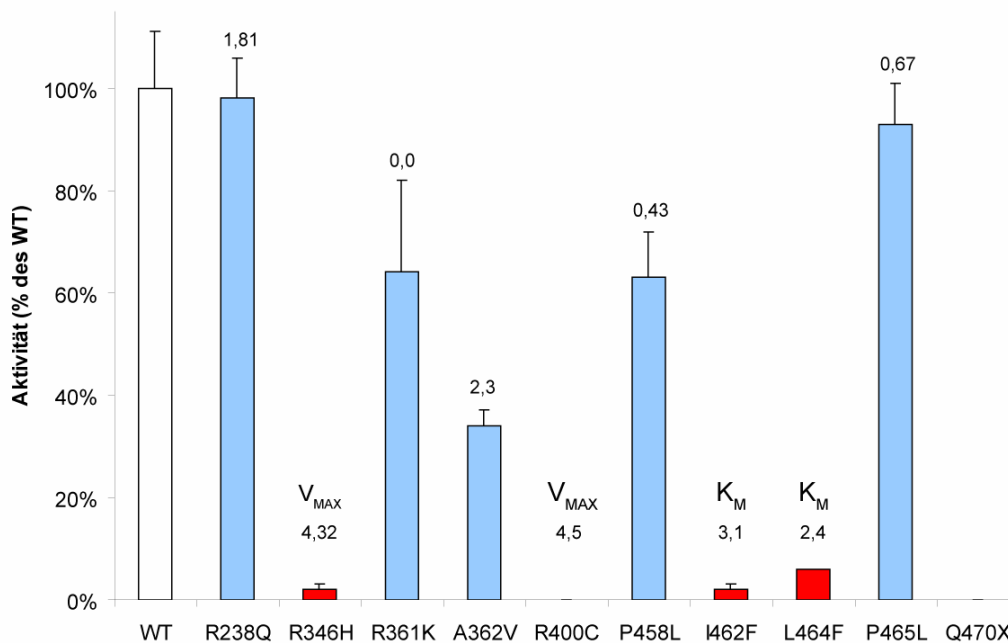


Abbildung 65: 21-Hydroxylase Aktivität der CYP21A1-Mutanten (COS-7 Zellen). Die Aktivität der Mutanten ist in Prozent der Wildtyp-Aktivität angegeben. Die Aktivitätsdaten der Mutanten sind entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu Klasse I (blau) bzw. Klasse II + III (rot) farbig markiert. Darüber hinaus sind die Konservierungswerte angegeben und der Rückgang der Aktivität aufgrund von K_M bzw. V_{MAX} . (Daten: Arbeitsgruppe G. Sippel)²⁷⁴

Die Klasse I enthält fünf Mutationen (R238Q, P465L, R361K, A362V und P458L). Alle fünf Mutationen betreffen Positionen, die im *alignment* eine niedrige Konservierung zwischen 0,0 und 2,3 aufweisen. Dies ist konsistent mit dem geringen Einfluss dieser Mutanten auf die Enzymaktivität.

Die Varianten R238Q and P465L haben fast keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. Aminosäure R238 befindet sich am C-terminalen Ende der Helix G auf der Oberfläche des Proteins und hat keinen Kontakt mit funktionell wichtigen Regionen des Proteins. Die Aminosäure P465 liegt auf der C-terminalen Seite der Substraterkennungsstelle 6 (SRS6). Die drei Mutationen R361K, A362V und P458L zeigen eine Restaktivität von 34-64 % (Abbildung 65). R361 und A362 liegen beide in der β -Faltblattdomäne auf der Proteinoberfläche, ohne Kontakt zu katalytisch bedeutsamen Aminosäuren. P458 befindet sich in der SRS6, ist aber von der Hämgruppe weg gerichtet und deshalb nicht Teil der Bindungsstelle von CYP21.

Die vier Mutationen der Klasse II und III (R346H, R400C, I462F, L464F) zeigen im Vergleich zur Klasse I höhere Konservierungswerte zwischen 2,4 und 4,5. Dies ist konsistent mit dem deutlichen Rückgang der 21-Hydroxylase-Aktivität durch die Mutationen. Für die Unterscheidung zwischen den Mutationen, die von dem Enzym toleriert werden und denjenigen, die nicht toleriert werden, ergibt sich ein Konservierungsgrenzwert von 2,4. Für die Familien CYP2B, 2C, 2D und 3A lag der Grenzwert der Konservierung bei 3,0 (Kapitel 5.3.1). Die Unterschiede in den Konservierungsgrenzwerten ergeben sich durch eine unterschiedliche Diversität der Sequenzen in den Subfamilien. Die Subfamilien CYP2B, 2C, 2D und 3A zeigten alle eine ähnliche Diversität (RMSD 0,34-0,36). Im Falle der Sequenzen der Subfamilien CYP17A und 21A ergibt sich eine größere Diversität (RMSD 0,56).

Die Klasse II enthält zwei Mutationen R346H und R400C, welche beide eine sehr geringe Restaktivität zeigen. R346 ist Teil des hochkonservierten EXXR-Motivs in der Helix K. R400 befindet sich im *meander-loop* auf der proximalen Seite der Hämgruppe auf der mutmaßlichen Redoxpartner-Interaktionsseite. Beide Aminosäuren sind Teil der ERR-Triade, einem Motiv des 21-Hydroxylase-Proteins. Die mögliche Funktion von R346 and R400 in der Interaktion mit Redoxpartnern und im Elektronentransfer ist konsistent mit dem Verlust der Aktivität dieser Mutationen aufgrund eines Rückgangs des V_{MAX} -Wertes, was auf einen weniger effizienten Elektronentransfer zur Hämgruppe hindeutet.

Die Klasse III enthält zwei Mutationen I462F und L464F, die beide eine sehr geringe Aktivität aufweisen. Die beiden Mutationen befinden sich in der SRS6. Eine Mutation an dieser Stelle beeinträchtigt die Substratbindung. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Verlust der Aktivität in diesen Mutationen aufgrund eines erhöhten K_M -Wertes. Die höheren Konservierungswerte der entsprechenden Positionen im *alignment* sind konsistent mit der Position in funktionell wichtigen Regionen.

5.3.3 Molekulare Ursache des kompletten Funktionsverlustes der natürlichen CYP2D6.62-Variante R441C

Die Arbeitsgruppe U. Zanger (Stuttgart)^[3] konnte in einer Genotyp- / Phänotyp-Korrelationsstudie²⁷⁹ eine neue genetische Variante von *CYP2D6* beobachten, die in einer Person mit unerklärter, niedriger CYP2D6-Aktivität gefunden wurde. Durch Sequenzierung und Haplotypanalyse konnte gezeigt werden, dass es sich um ein neues Allel *62 handelt, das zu einer neuen Variante mit dem Aminosäureaustausch R441C führt. Die Variante zeigt eine geringe Häufigkeit in der weißen Bevölkerung (< 0,1 %). Zur Analyse der funktionellen Auswirkungen wurde das CYP2D6.62-Protein *in vitro* exprimiert. Die Menge an exprimiertem Protein entspricht in etwa der Menge des Wildtyp-Enzyms, das CO-Differenzspektrum zeigt jedoch keine Absorption bei 450 nm. Des Weiteren konnten durch Messung der Enzymaktivität mit Propafenon keine hydroxylierten Metabolite nachgewiesen werden. Im Folgenden sollen die molekularen Grundlagen des kompletten Funktionsverlustes der Variante untersucht werden.

Die Analyse der CYP2D6-Kristallstruktur (PDB-Eintrag 2F9Q)²⁸⁰ und der Aminosäuresequenzvergleich mit anderen P450-Monooxygenasen zeigte, dass die Aminosäure 441 in einem *loop* N-terminal der Helix L liegt. Die Position 441 ist die zweite Aminosäure N-terminal des absolut konservierten Cys443 und liegt innerhalb des konservierten Sequenzmotivs der P450-Signatur: [FW] - [SGNH] - x - [GD] - {F} - [RKHPT] - {P} - C - [LIVMFAP] - [GAD] (PROSITE-pattern PS00086: *P450 cysteine heme-iron ligand signature*).

Das Hämeisen ist durch Cys443 gebunden (Abbildung 66a) und die Hämgruppe ist in der Hämbindetasche durch Wasserstoffbrücken zwischen den Carboxylatgruppen der beiden Hämpropionate und den Seitenketten der Aminosäuren Arg101, Trp128, Arg132, His376, Ser437 und Arg441 verankert. (Abbildung 66b)

^[3] Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie, Stuttgart

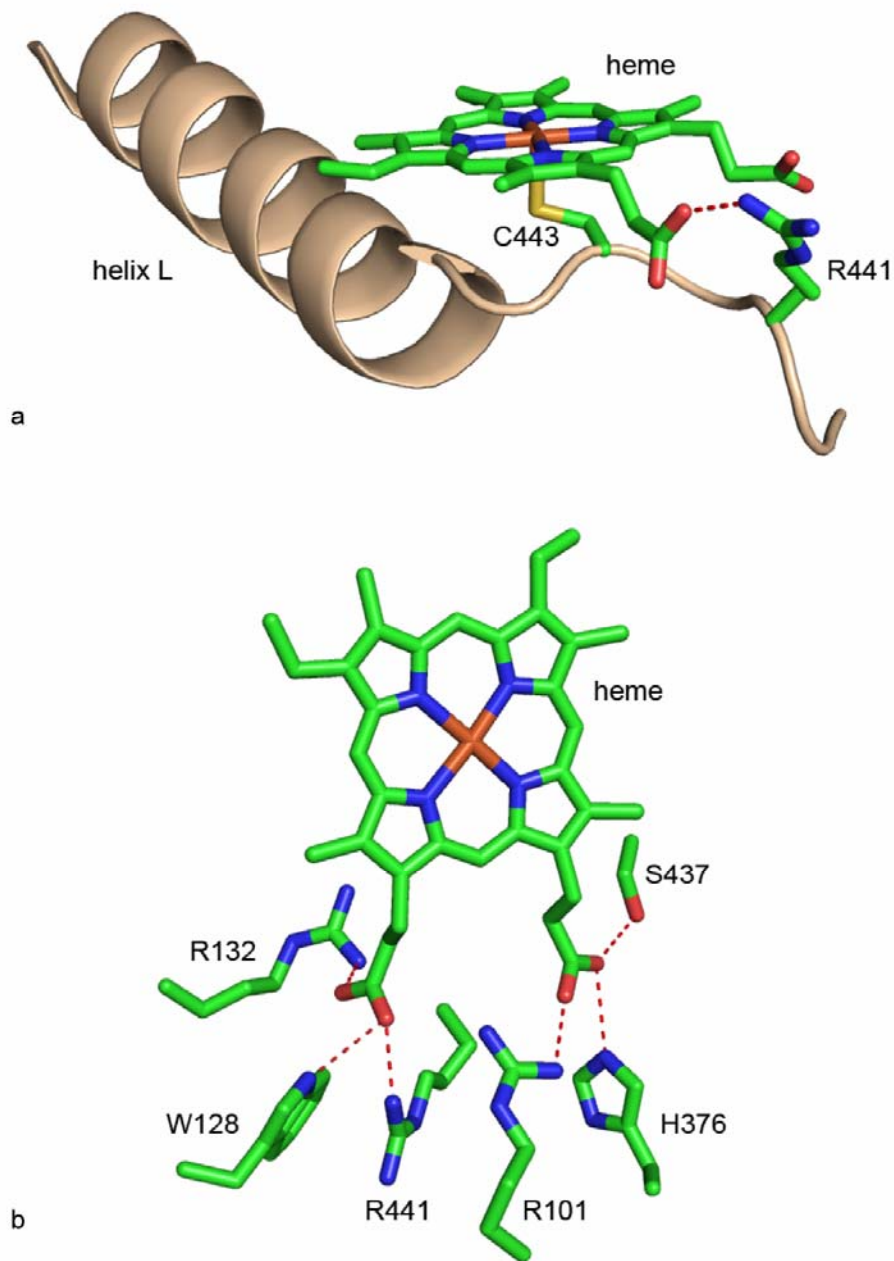


Abbildung 66: Struktur der Häm-Binderegion von CYP2D6 (PDB-Eintrag 2F9Q). Die Hämgruppe wird durch Cys443 gebunden (**a**) und über Wasserstoffbrücken in der Bindetasche verankert (**b**). Die Seitenkette von Arg441 interagiert mit der Carboxylatgruppe des D-Ring-Propionats der Hämgruppe.

Die Tatsache, dass es sich bei R441C um ein Nullallel handelt, deutet auf eine essentielle Rolle der Aminosäure R441 innerhalb der P450-Signatur hin. Alle Enzyme der P450-Superfamilie verfügen über das konservierte Sequenzmotiv der P450-Signatur und die Mutation von Arg441 zu Cystein in CYP2D6 widerspricht dem konservierten PROSITE-*pattern* [RKHPT] an dieser Position. Obwohl alle P450-Enzyme über den gleichen Reaktionszyklus der Hämasktivierung und der Substratoxidation verfügen, ist Position Cys443 (CYP2D6) die einzige Position in der P450-Signatur, an der nur eine Aminosäure vorgefunden wird. An allen anderen Positionen werden mehrere Aminosäuren beobachtet, teilweise mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften wie Arg, Lys, His, Pro, Thr an Position 441. Diese niedrige Konservierung in einer funktionell bedeutenden Region ist überraschend. Zur Untersuchung der Konservierung der P450-Signatur in der CYP2D-Subfamilie wurde ein *alignment* der 22 homologen Sequenzen der CYP2D-Subfamilie durchgeführt und anschließend die Sequenzkonservierungswerte berechnet (Tabelle 25). Es zeigt sich, dass nicht nur die Position Cys443 hoch konserviert ist, sondern auch weitere Aminosäuren des Motivs (Tabelle 25). Durch Analyse des *alignments* konnte eine familienspezifische CYP2D-P450-Signatur erstellt werden: F - S - A - G - [RHP] - R - [ASVI] - C - L - G (Tabelle 25). In der Subfamilie CYP2D ist das Motiv höher konserviert als in der kompletten Superfamilie. Es wird erwartet, dass die Mutation irgendeiner dieser konservierten Positionen nicht toleriert wird, und zu einem inaktiven Protein führt.

Tabelle 25: P450-Signatur (P450 *cyteine heme-iron ligand signature*; PROSITE: PS00086) der P450-Superfamilie und die familienspezifischen *pattern* der CYP-Subfamilien. x: beliebige Aminosäure (AS); eckige Klammern: erlaubte AS an dieser Position; geschweifte Klammern: verbotene AS an dieser Position.

PS00086	[FW]	[SGNH]	X	[GD]	{F}	[RKHPT]	{P}	C	[LIVMFAP]	[GAD]
Position (CYP2D6)	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445
CYP2D	F	S	A	G	[RHP]	R	[ASVI]	C	L	G
Konservierungs-Score (CYP2D)	6.0	4.0	4.0	6.0	3.4	5.0	1.6	9.0	4.0	6.0
CYP1A	F	G	[ML]	G	[KR]	R	[KRQ]	C	[IV]	G
CYP2C	F	S	[ATISL]	G	[KR]	R	[IAMYSK]	C	[VAMPLP]	G
CYP3A	F	G	[NTASLID]	G	P	R	N	C	[ILV]	[GD]
CYP7A	F	G	S	G	[AV]	T	[IK]	C	P	G
CYP11A+B	F	G	F	G	[VMAS]	R	Q	C	[LVI]	G
CYP19A	F	G	[FSC]	G	P	R	[SAG]	C	[VAI]	G
CYP8A	W	G	A	G	[HR]	[NH]	[QHA]	C	[LI]	G

Abbildung 67 zeigt eine Übersicht über natürlich vorkommende P450-Varianten, bei denen ein Aminosäureaustausch an der zu Arg441 (CYP2D6) homologen Position beobachtet wurde. Unter diesen zeigen sowohl die Variante R433W von CYP2C19 (*5 Allel)²⁸¹ als auch die Variante R448H von CYP11B1²⁸² einen kompletten Verlust der *in vivo*-Enzymaktivität gegenüber S-Mephenytoin und Cortisol. Für die Mutation zu Tryptophan in CYP2C19 wird ein Verlust der Aktivität vorhergesagt, da Tryptophan nicht in dem PROSITE-*pattern* an dieser Position [RKHPT] enthalten ist. Histidin hingegen ist in dem *pattern* enthalten, was folglich darauf hindeutet, dass dieses *pattern* nicht zuverlässig prädiktiv ist.

CYP1A2.8 (R456H)	451...	F	G	M	G	K	H	R	C	I	G	inaktiv
CYP2C19.5 (R433W)	428...	F	S	A	G	K	W	I	C	V	G	inaktiv
CYP2D6.1 (R441)	436...	F	S	A	G	R	R	A	C	L	G	aktiv
CYP2D6 (R441C)	436...	F	S	A	G	R	C	A	C	L	G	inaktiv
CYP7A1 (T442)	437...	F	G	S	G	A	T	I	C	P	G	aktiv
CYP11B1 (R448H)	443...	F	G	F	G	M	H	Q	C	L	G	inaktiv
CYP19 (R435C)	430...	F	G	F	G	P	C	G	C	A	G	inaktiv

Abbildung 67: Sequenz-*alignment* natürlicher humaner Cytochrom P450-Monooxygenase-Varianten. Es ist die Region um die Aminosäure R441 (rot markiert) von CYP2D6.1 dargestellt. Neben den Sequenzen ist die experimentelle Enzymaktivität angegeben. Die Aminosäuren (AS) sind folgendermaßen markiert: identische AS: weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund; Block identischer AS: weiße Buchstaben auf dunkelgrauem Hintergrund; ähnliche AS: schwarze Buchstaben auf grauem Hintergrund.

Zur Untersuchung der Aktivität dieser Varianten wurde die Konservierung der Aminosäuren in verschiedenen P450-Familien analysiert und es wurden für die Subfamilien CYP1A, 2C, 3A, 7A, 11A+B und 19A familienspezifische P450-Signaturen erstellt (Tabelle 25). Ein Vergleich der Signaturen zeigt offensichtliche Unterschiede der familienspezifischen *pattern* der verschiedenen homologen Subfamilien. Im Allgemeinen scheint in Säugetier-Subfamilien die Aminosäure Arginin an der Position, die Arg441 in CYP2D6 entspricht, hoch konserviert zu sein. Die Subfamilie CYP7A enthält an dieser Position jedoch ein konserviertes Threonin.²⁸³ Das familienspezifische *pattern* der Familie CYP11 zeigt nur ein Arginin an dieser Position und erklärt dadurch den Verlust der Aktivität, wenn Arg448 in CYP11B1 durch ein Histidin ersetzt wird.

Eine andere natürlich vorkommende humane Variante, CYP1A2.8 (R456H), lässt sich ebenfalls besser durch das familienspezifische *pattern* beschreiben. Dem PROSITE-*pattern* zufolge kommen an Position 456 in CYP1A2.8 sowohl die Aminosäure Arg als auch His vor.

In dem familienspezifischen *pattern* der Subfamilie CYP1A findet sich an der Position 456 ein hochkonserviertes Arginin. Dies erklärt die experimentell beobachtete Aktivität der Variante CYP1A2.8. Die Variante zeigt normale Proteinmengen, ist jedoch funktionell inaktiv, hauptsächlich aufgrund des fehlenden Hämeinbaus.²⁸⁴

Übereinstimmend mit der Tatsache, dass Cystein weder Teil des CYP19-Familien- noch des PROSITE-*pattern* ist, zeigt die CYP19-Variante R435C nur eine sehr geringe Restaktivität (1 % des Wildtyp).²⁸⁵ Durch die Verwendung familienspezifischer *pattern* ist es möglich, den Effekt einer Mutation auf die Enzymaktivität richtig vorherzusagen.

Die Untersuchung der natürlich vorkommenden P450-Varianten der Abbildung 67 zeigte, dass eine erfolgreiche Vorhersage des Einflusses der Mutationen nur aufgrund familienspezifischer Analysen möglich ist. Anhand des PROSITE-*pattern* der Superfamilie können die Effekte der Mutationen nicht erklärt werden.

5.3.4 Systematische Analyse der Hämbindung in den bekannten P450-Strukturen

Die familienspezifische Analyse der natürlich vorkommenden P450-Varianten, bei denen ein Aminosäureaustausch an der zu Arg441 (CYP2D6) homologen Position beobachtet wurde, hat gezeigt, dass diese Position hoch konserviert ist (Kapitel 5.3.3). Mutationen an dieser hochkonservierten Position zeigten alle einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität. Die experimentellen Befunde zur Aktivität der Varianten deuten auf eine wichtige Rolle dieser Aminosäure in der Hämbindung hin. In fast allen untersuchten Subfamilien findet sich an der entsprechenden Position ein konserviertes Arginin. In der Subfamilie CYP7A findet jedoch ein konserviertes Threonin und in der Subfamilie CYP8A ein Histidin bzw. Asparagin. Das Vorkommen dieser unterschiedlichen Aminosäuren ist überraschend. Die Position besitzt offensichtlich eine wichtige Funktion in P450-Enzymen und ist beispielsweise an der Hämbindung beteiligt. Aus diesem Grund würde man eine höhere Konservierung der Position auch zwischen den einzelnen Subfamilien erwarten. Es gibt offensichtlich familienspezifische Unterschiede in der Hämbindung.

Interessant ist in diesem Zusammenhang ein Enzym der Familie 8 der Cytochrom P450-Monooxygenasen, die humane Prostacyclin-Synthase (PGIS; CYP8A1). Die Prostacyclin-Synthase (EC 5.3.99.4) katalysiert die Isomerisierung von Prostaglandin H₂ (PGH₂) zu Prostacyclin (PGI₂). Obwohl PGIS ein Absorptionsspektrum aufweist, das typisch für Cytochrom P450-Monooxygenasen ist, zeigt PGIS keine Monooxygenaseaktivität und benötigt keine externe Elektronenquelle, um die Enzymreaktion einzuleiten.²⁸⁶ Die Kristallstruktur der PGIS (PDB-Eintrag 2IAG)²⁸⁷ zeigt eine typische P450-Faltung. Ein *alignment* mit anderen P450-Enzymen zeigt jedoch beträchtliche Sequenzunterschiede zu diesen. Die Analyse der 10 Sequenzen der Subfamilie CYP8A ergab folgende familienspezifische Konsensussequenz für die P450-Signatur: W - G - A - G - [HR] - [NH] - [QHA] - C - [LI] - G. Die zu der Position 441 in CYP2D6 korrespondierende Aminosäure Asparagin439 in CYP8A1 widerspricht dem PROSITE-*pattern* (Tabelle 25). Die Analyse des Sequenz-*alignments* und die Ergebnisse der Proteincharakterisierung²⁸⁷ deuten darauf hin, dass PGIS im Hinblick auf Hämbindung und Umgebung des aktiven Zentrums kein typisches P450-Enzym ist.

Um Unterschiede der verschiedenen P450-Monooxygenasen in der Hämbindung zu untersuchen, wurde eine systematische Analyse aller bekannten P450-Strukturen

durchgeführt. Die prosthetische Gruppe der P450-Monooxygenasen, das Eisen(III)-Protoporphyrin IX (Häm b) befindet sich zwischen der distalen Helix I und der proximalen Helix L und ist über das Schwefelatom eines proximalen Cysteins an das Apoprotein gebunden (Abbildung 68). Der proximale, absolut konservierte Cysteinatligand des Hämeisens befindet sich in der benachbarten Cysteinat-Häm-Ligandenschleife. Des Weiteren können die negativ geladenen Carboxylatgruppen der beiden Propionatseitenketten des Häms Wasserstoffbrücken zu basischen Aminosäuren des Proteins ausbilden. In den meisten P450-Strukturen zeigen die beiden Propionatgruppen entweder auf die proximale Seite des Häms oder eine Gruppe auf die proximale und die andere auf die distale Seite. Des Weiteren bilden die Propionatgruppen jeweils zwei bis drei Wasserstoffbrücken mit Aminosäuren des Proteins aus.

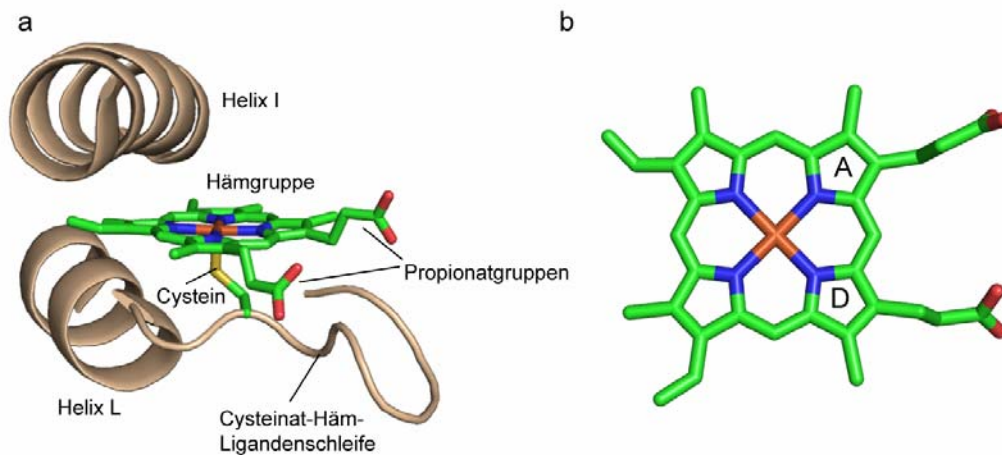


Abbildung 68: Die Hämgruppe befindet sich zwischen den beiden Helices I und L und wird über das Schwefelatom eines proximalen Cysteins an das Apoprotein gebunden (a). Die beiden Propionatgruppen werden entsprechend der Nomenklatur der Hämringe als A- bzw. D-Propionat bezeichnet (b).

In der Kristallstruktur von CYP2D6 (PDB-Eintrag 2F9Q)²⁸⁰ ist die Hämgruppe an das Cystein 433 des Apoproteins gebunden. Die Carboxylatgruppe des D-Ring-Propionats bildet Wasserstoffbrücken mit den Aminosäuren Arg101, Trp128, Arg132 und Arg 441 aus. Das A-Ring-Propionat interagiert mit den Aminosäuren Arg101, His376 und Ser437 (Abbildung 69). Die beiden Propionatgruppen zeigen auf die proximale Seite der Hämgruppe (Abbildung 71a).

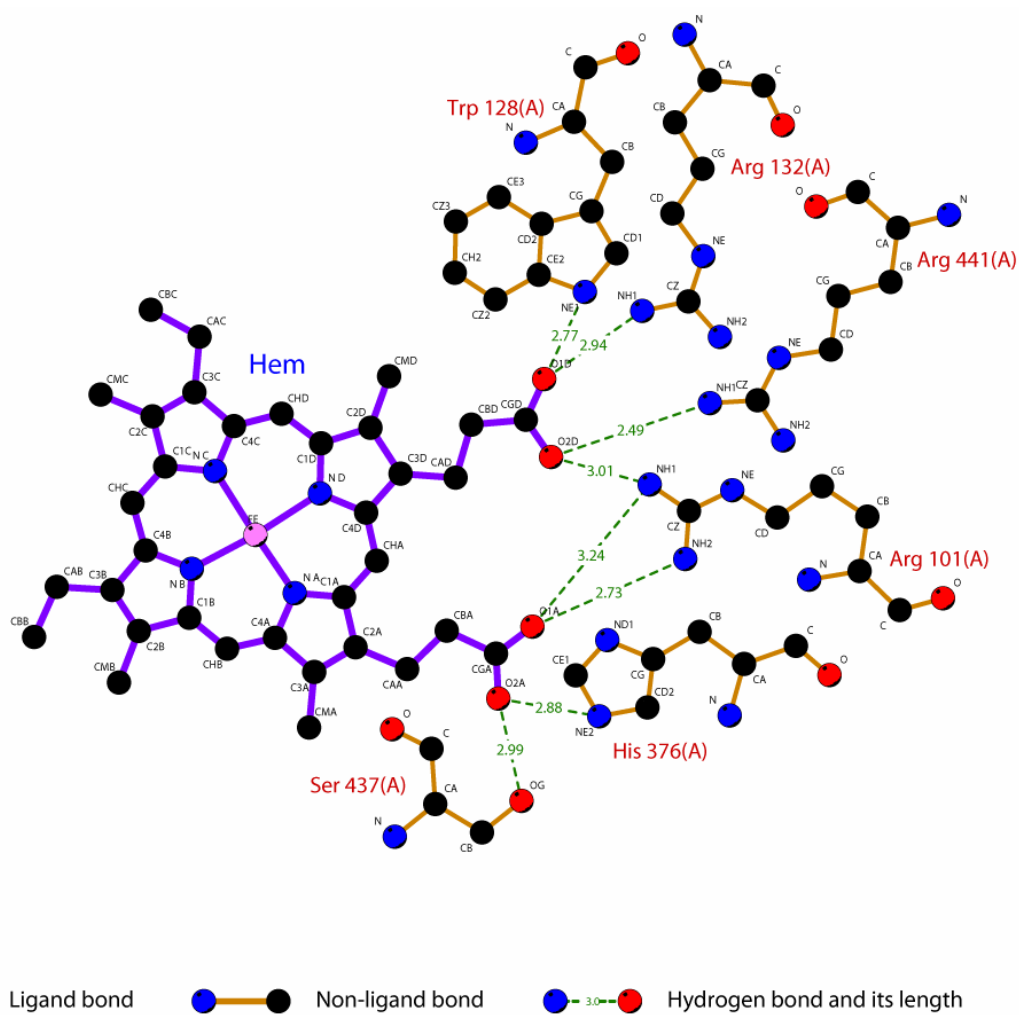
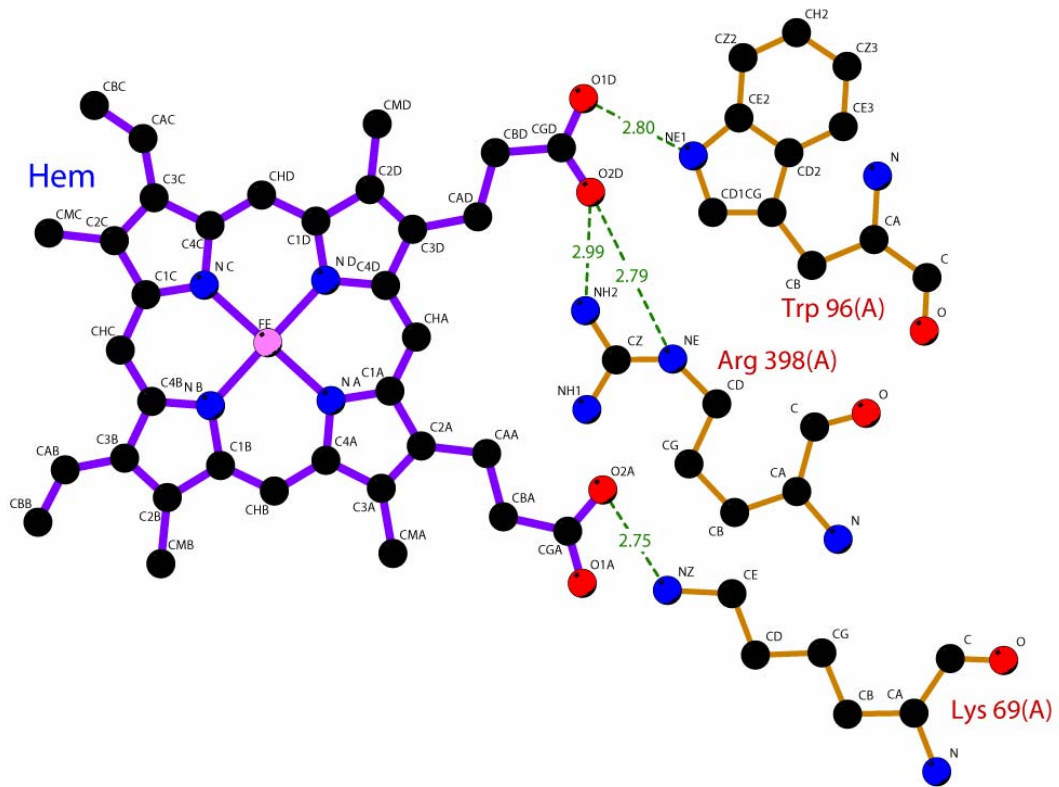


Abbildung 69: Interaktionen der Hämgruppe in CYP2D6 mit Aminosäuren des Apoproteins (PDB-Eintrag 2F9Q). Die schematische Darstellung wurde mit dem Programm LIGPLOT²⁸⁸ erstellt.

In der Struktur von CYP102A1 (P450 BM-3) (PDB-Eintrag 1BU7)³³ beobachtet man Wasserstoffbrücken zwischen dem D-Ring-Propionat und den Aminosäuren Trp96 und Arg398. Das A-Ring-Propionat interagiert mit Lys 69 (Abbildung 70). Das D-Ring-Propionat zeigt auf die proximale Seite der Hämgruppe, das A-Ring-Propionat hingegen auf die distale Seite der Hämgruppe (Abbildung 71b).



Key

- Ligand bond
- Non-ligand bond
- \cdots ● Hydrogen bond and its length

Abbildung 70: Interaktionen der Hämgruppe in CYP102A1 mit Aminosäuren des Apoproteins (PDB-Eintrag 1BU7). Die schematische Darstellung wurde mit dem Programm LIGPLOT²⁸⁸ erstellt.

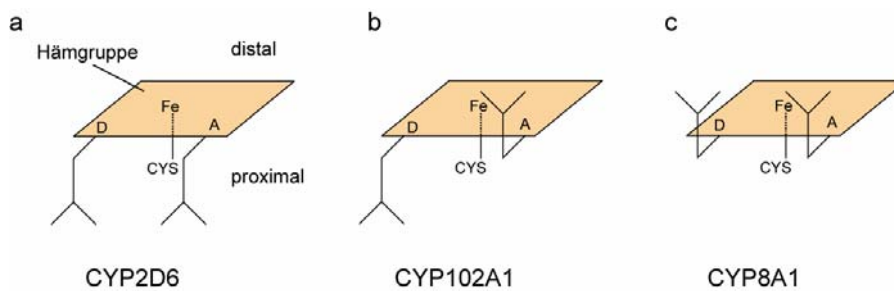


Abbildung 71: Schematische Darstellung der Konformationen der Hämpropionatgruppen verschiedener P450-Monooxygenasen.

Die beiden in der Kristallstruktur von CYP8A1 (PDB-Eintrag 2IAG) aufgelösten Monomere zeigen eine unterschiedliche Konformation der Propionatgruppen, wobei jeweils beide Propionatgruppen auf die distale Seite zeigen (Abbildung 71c). Das A-Ring-Propionat bildet in beiden Monomeren eine Wasserstoffbrücke mit dem Proteinbackbone jeweils unterschiedlicher Aminosäuren über ein Wassermolekül aus. Das D-Ring-Propionat zeigt in beiden Monomeren keine Interaktionen mit dem Protein. In einem Monomer gibt es eine indirekte Interaktion über ein Wassermolekül mit der Seitenkette von Asn439 (Abbildung 72). Es gibt also in CYP8A1 keine direkten Interaktionen der Hämpropionatgruppen mit dem Apoprotein.

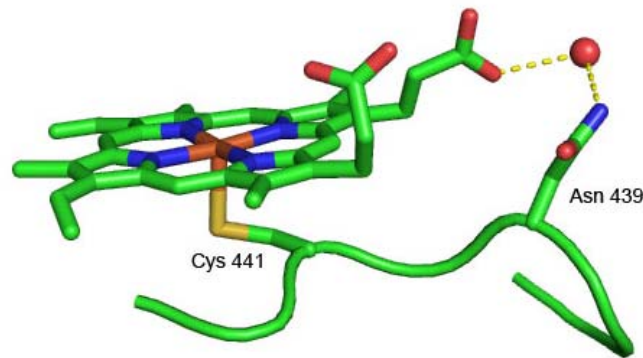


Abbildung 72: Interaktionen der Hämgruppe in CYP8A1 mit Asn439 über ein Wassermolekül.

Die Analyse der bekannten P450-Strukturen zeigt, dass die Propionatgruppe am D-Ring der Hämgruppe mehr direkte Interaktionen mit dem Apoprotein aufweist als das A-Ring-Propionat (Tabelle 26). In dem Sequenz-*alignment* der P450-Strukturen (Tabelle 26) erkennt man vier Positionen der Häminteraktion, die in den meisten Strukturen konserviert sind. Das A-Propionat bildet entweder eine Interaktion mit der Aminosäure Arg oder His (z. B. His376 in CYP2D6). Das D-Ring-Propionat bildet drei konservierte Interaktionen mit Aminosäuren des Proteins. An der ersten Interaktion ist entweder die Aminosäure His, Trp oder Gln beteiligt (z. B. Trp128 in CYP2D6). An der zweiten Interaktion ist entweder die Aminosäure Arg oder Lys beteiligt (z. B. Arg132 in CYP2D6) und die dritte Interaktion wird zwischen der Aminosäure Arg oder His und der Carboxylatgruppe des D-Propionatrestes beobachtet (z. B. Arg441 in CYP2D6). Die Position, welche der Aminosäure Arg441 in CYP2D6 entspricht, ist neben dem Cystein (als konserviertem axialem Hämliganden) die einzige in allen Strukturen konservierte Position, die mit der Hämgruppe interagiert.

In den eukaryotischen P450-Enzymen tritt eine zusätzliche Interaktion mit der Hämgruppe auf. Ein konserviertes Arginin (z. B. Arg101 in CYP2D6) interagiert mit beiden Propionatgruppen des Häms. Darüber hinaus gibt es familienspezifische Interaktionen. So weisen alle Strukturen der P450-Familie CYP2 eine zusätzliche Interaktion mit einem Serin auf (z. B. Ser437 in CYP2D6). In den Strukturen von CYP154A1, CYP145C1 und CYP158A2 aus *Streptomyces coelicolor* beobachtet man ein konserviertes Tyrosin, das mit dem A-Ring-Propionat interagiert. Die Struktur des Proteins CYP8A1 weist keine direkten Interaktionen zwischen dem Apoprotein und den Propionatresten der Hämgruppe auf.

Die Analyse der Konformationen der Propionatreste zeigt, dass in den meisten bakteriellen P450-Strukturen der Propionatrest am D-Ring auf die proximale Seite der Hämgruppe zeigt, während der Propionatrest am A-Ring auf die distale Seite zeigt (Tabelle 26). Lediglich in vier Enzymen (CYP108, CYP152A1, CYP154A1 und CYP158A2) zeigen beide Propionatreste auf die proximale Seite der Hämgruppe. In den eukaryotischen Säugetier-P450-Enzymen hingegen weisen in allen Strukturen die beiden Propionatgruppen auf die proximale Seite der Hämgruppe. Die Struktur des Enzyms CYP8A1, das keine direkten Interaktionen mit dem Apoprotein aufweist, ist die einzige bisher beobachtete P450-Struktur, in der beide Propionatreste auf die distale Seite der Hämgruppe weisen (Abbildung 71).

Die Strukturanalyse der bekannten P450-Strukturen hat gezeigt, dass es Unterschiede in der Hämbindung der einzelnen P450 gibt und es wurden familienspezifische Interaktionen beobachtet. Bei der zu Arg441 (CYP2D6) homologen Position handelt es sich um die einzige Aminosäureposition, die in allen Strukturen mit den Propionatresten der Hämgruppe interagiert. Dies deutet darauf hin, dass diese Position eine besondere Bedeutung für die Interaktion mit der Hämgruppe hat.

Die Sequenzuntersuchung hat gezeigt, dass an dieser Position in vielen CYP-Familien eine positiv geladene Aminosäure hochkonserviert ist. Interessanterweise ist eine entsprechende Aminosäure nicht in der kompletten CYP-Superfamilie konserviert. Enzyme, die an dieser Position keine positiv geladene Aminosäure aufweisen, wie beispielsweise die CYP7 α -Hydroxylase,²⁸³ welche ein Threonin an der entsprechenden Position aufweist, müssen einen anderen Mechanismus der Hämstabilisierung aufweisen. Das Enzym CYP8A1 hingegen zeigt keine direkten Interaktionen der Hämpropionatgruppen mit dem Apoprotein und weist auch keine Monooxygenaseaktivität auf.

Ergebnisse

Tabelle 26: Übersicht über die Interaktionen der Hämpropionatgruppen mit dem Apoprotein für die bisher bekannten Kristallstrukturen. Für jede Struktur ist die Konformation der beiden Propionatgruppen am Hämring D und A angegeben (d: distal, p: proximal). In dem *alignment* der Sequenzen sind die Aminosäuren, die direkte Interaktionen mit den Propionatgruppen ausüben, farblich markiert (grün: Interaktionen mit dem A-Ring-Propionat, rot: Interaktionen mit dem D-Ring-Propionat, türkis: Interaktionen mit beiden Propionatgruppen). Das konservierte Cystein, der axiale Ligand des Hämeisens, ist gelb markiert.

PDB	CYP	Organismus	D	A
1I08	CYP119	Sulfobolus soifactarius	p	d
1UE8	CYP119	Sulfobolus tokodaii	p	d
1E9X	CYP51	Mycobacterium tuberculosis	p	d
1UYU	CYP101	Pseudomonas putida	p	d
1BU7	CYP102A1	Bacillus megaterium	p	d
1EGY	CYP107A1	Saccharopolyspora erythraea	p	d
2C7X	CYP107L1	Streptomyces venezuelae	p	d
1CPT	CYP108	Pseudomonas sp.	p	d
1N40	CYP121	Mycobacterium tuberculosis	p	d
1IZO	CYP152A1	Bacillus subtilis	p	d
1ODO	CYP154A1	Streptomyces coelicolor	p	d
1GWI	CYP154C1	Streptomyces coelicolor	p	d
1TR3	CYP158A2	Streptomyces coelicolor	p	d
1LFK	CYP165B3	OxyB	p	d
1UED	CYP165C4	OxyC	p	d
1Q5E	CYP167A1	Polyangium cellulosum	p	d
1N97	CYP175A1	Thermus thermophilus	p	d
2FR7	CYP199A2	Rhodospirillum rubrum	p	d
1XQD	CYP55A1	Fusarium oxysporum	p	d
2H14	CYP1A2	Homo sapiens	p	d
1Z11	CYP2A6	Homo sapiens	p	d
1SUO	CYP2B4	Oryctolagus cuniculus	p	d
1NR6	CYP2C5	Oryctolagus cuniculus	p	d
1PQ2	CYP2C8	Homo sapiens	p	d
1OG2	CYP2C9	Homo sapiens	p	d
2F9Q	CYP2D6	Homo sapiens	p	d
2WJD	CYP2R1	Homo sapiens	p	d
1W0G	CYP3A4	Homo sapiens	p	d
2IAG	CYP8A1	Homo sapiens	p	d

PDB	CYP	Organismus	D	A
1I08	CYP119	Sulfobolus soifactarius	p	d
1UE8	CYP119	Sulfobolus tokodaii	p	d
1E9X	CYP51	Mycobacterium tuberculosis	p	d
1UYU	CYP101	Pseudomonas putida	p	d
1BU7	CYP102A1	Bacillus megaterium	p	d
1EGY	CYP107A1	Saccharopolyspora erythraea	p	d
2C7X	CYP107L1	Streptomyces venezuelae	p	d
1CPT	CYP108	Pseudomonas sp.	p	d
1N40	CYP121	Mycobacterium tuberculosis	p	d
1IZO	CYP152A1	Bacillus subtilis	p	d
1ODO	CYP154A1	Streptomyces coelicolor	p	d
1GWI	CYP154C1	Streptomyces coelicolor	p	d
1TR3	CYP158A2	Streptomyces coelicolor	p	d
1LFK	CYP165B3	OxyB	p	d
1UED	CYP165C4	OxyC	p	d
1Q5E	CYP167A1	Polyangium cellulosum	p	d
1N97	CYP175A1	Thermus thermophilus	p	d
2FR7	CYP199A2	Rhodospirillum rubrum	p	d
1XQD	CYP55A1	Fusarium oxysporum	p	d
2H14	CYP1A2	Homo sapiens	p	d
1Z11	CYP2A6	Homo sapiens	p	d
1SUO	CYP2B4	Oryctolagus cuniculus	p	d
1NR6	CYP2C5	Oryctolagus cuniculus	p	d
1PQ2	CYP2C8	Homo sapiens	p	d
1OG2	CYP2C9	Homo sapiens	p	d
2F9Q	CYP2D6	Homo sapiens	p	d
2WJD	CYP2R1	Homo sapiens	p	d
1W0G	CYP3A4	Homo sapiens	p	d
2IAG	CYP8A1	Homo sapiens	p	d

PDB	CYP	Organismus	D	A
1I08	CYP119	Sulfobolus soifactarius	p	d
1UE8	CYP119	Sulfobolus tokodaii	p	d
1E9X	CYP51	Mycobacterium tuberculosis	p	d
1UYU	CYP101	Pseudomonas putida	p	d
1BU7	CYP102A1	Bacillus megaterium	p	d
1EGY	CYP107A1	Saccharopolyspora erythraea	p	d
2C7X	CYP107L1	Streptomyces venezuelae	p	d
1CPT	CYP108	Pseudomonas sp.	p	d
1N40	CYP121	Mycobacterium tuberculosis	p	d
1IZO	CYP152A1	Bacillus subtilis	p	d
1ODO	CYP154A1	Streptomyces coelicolor	p	d
1GWI	CYP154C1	Streptomyces coelicolor	p	d
1TR3	CYP158A2	Streptomyces coelicolor	p	d
1LFK	CYP165B3	OxyB	p	d
1UED	CYP165C4	OxyC	p	d
1Q5E	CYP167A1	Polyangium cellulosum	p	d
1N97	CYP175A1	Thermus thermophilus	p	d
2FR7	CYP199A2	Rhodospirillum rubrum	p	d
1XQD	CYP55A1	Fusarium oxysporum	p	d
2H14	CYP1A2	Homo sapiens	p	d
1Z11	CYP2A6	Homo sapiens	p	d
1SUO	CYP2B4	Oryctolagus cuniculus	p	d
1NR6	CYP2C5	Oryctolagus cuniculus	p	d
1PQ2	CYP2C8	Homo sapiens	p	d
1OG2	CYP2C9	Homo sapiens	p	d
2F9Q	CYP2D6	Homo sapiens	p	d
2WJD	CYP2R1	Homo sapiens	p	d
1W0G	CYP3A4	Homo sapiens	p	d
2IAG	CYP8A1	Homo sapiens	p	d

6 Diskussion

6.1 Untersuchung des Einflusses der Mutationen F87A und F87V auf die Aktivität, Regio- und Stereoselektivität von P450 BM-3 gegenüber β -Ionon

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass es unter Berücksichtigung der intrinsischen chemischen Reaktivität eines Substrates möglich ist, durch molekulardynamische Simulationen eine Modellierung des Einflusses von Mutationen auf die Aktivität, Regio- und Stereoselektivität von Cytochrom P450-Monooxygenasen vorzunehmen.

6.1.1 Regioselektivität

Die Hydroxylierung von β -Ionon zeigt eine hohe Regioselektivität und es wird von allen untersuchten Mutanten von P450 BM-3 ausschließlich das 4-Hydroxyprodukt gebildet. Durch Berechnung der BDE der C-H-Bindung konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Position 4 des β -Iononmoleküls um die reaktivste Position innerhalb des Moleküls handelt (BDE 320 kJ/mol). Das dabei entstehende sekundäre, allylische Radikal steht in Konjugation mit zwei Doppelbindungen und ist dadurch besonders stabilisiert.

Für die Reaktivitätsuntersuchung von β -Ionon muss der Reaktionsmechanismus der Hydroxylierung von aliphatischen C-H-Gruppen berücksichtigt werden.^{48,49} Die Hydroxylierung der C-H-Bindungen erfolgt in einem Zwei-Schritt-Mechanismus. Der erste Schritt beinhaltet die Abstraktion eines Wasserstoffatoms aus dem Substratmolekül durch die $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ Spezies (*compound I*). Dabei entsteht ein Radikal im Substrat, das im zweiten Schritt,

dem sogenannten *rebound*-Schritt, an das Fe^{IV}-OH-Intermediat bindet. Dies ergibt einen Fe^{III}-Alkohol-Komplex, aus dem das hydroxylierte Produkt abdissoziieren kann. Dichtefunktionaltheorie (DFT)-Berechnungen ergaben, dass die höchste Energiebarriere entlang dieses Reaktionspfades für den Schritt der Wasserstoffabstraktion beobachtet wird.⁵¹⁻⁵³ Diese Berechnungen werden durch experimentelle Befunde gestützt.⁵⁰ Somit ist es zur Berechnung der Reaktivität ausreichend, den Schritt der Wasserstoffabstraktion zu berücksichtigen.

Bei radikalischen Reaktionen ist die Energie zur homolytischen Bindungsspaltung und Radikalbildung ein Maß für die Reaktivität. Die Bindungsdissoziationsenergie der Bindungsspaltung $R-H \rightarrow R\cdot + \cdot H$ reflektiert einerseits die Stärke der Bindung und andererseits die Stabilität des entstehenden Radikals.²⁸⁹ Es gibt viele Einflüsse der Struktur von $R\cdot$ auf die Bindungsdissoziationsenergie. Die Bindungsdissoziationsenergie einer $C_{sp^n}-H$ -Bindung ist im Wesentlichen nur von n abhängig, wobei für die BDE gilt: $n = 3 < n = 2 < n = 1$. Erzeugt man Radikale $R^1R^2R^3C\cdot$ durch Brechen der C-H-Bindung in Molekülen vom Typ $R^1R^2R^3C-H$, so zeigt sich, dass die Dissoziationsenergien der C-H-Bindung abhängig von den Substituenten R^1 , R^2 und R^3 sind. Diese Unterschiede können vollständig über die Effekte der Substituenten R^1 , R^2 und R^3 auf die Stabilität der gebildeten Radikale $R^1R^2R^3C\cdot$ interpretiert werden. Eine Variation von R von einem Ethyl- über Vinyl- zu einem Phenylrest führt zu einer Abnahme der Bindungsdissoziationsenergie. Die entstehenden allylischen oder benzyllischen Radikale werden durch Konjugation mit den benachbarten C=C-Doppelbindungen stabilisiert. Kohlenstoffradikale können durch weitere Substituenten stabilisiert werden. Wechselwirkungen des SOMO (*Single Occupied Molecular Orbital*) mit Orbitalen der Substituenten können zu einer Erhöhung der Stabilität führen. Sowohl Akzeptor- (-COR, -COOR, SO₂R, -NO₂, -CN) als auch Donor-Substituenten (-OMe, -OR, -NR₂, -F) können mit ihren π - bzw. π^* -Orbitalen mit dem SOMO des Kohlenstoffradikals wechselwirken und so zu einer Stabilisierung beitragen. Auch durch Hyperkonjugation mit σ -Bindungen, beispielsweise einer CH₃-Gruppe, kann eine Stabilisierung erreicht werden. Dies erklärt den Effekt von Alkylsubstituenten auf die Radikalstabilität. Mit zunehmender Substitution am radikalischen Kohlenstoffatom steigt durch Hyperkonjugation die Stabilität des Radikals. Dies führt zu folgender Stabilisierungsreihe: primäres < sekundäres < tertiäres Kohlenstoffradikal. Bei Radikalen mit einem an das Radikalzentrum gebundenen Heteroatom mit freien Elektronenpaaren stabilisieren die freien Elektronenpaare des Heteroatoms die Radikalzentren umso besser, je leichter das Heteroatom sie zur Verfügung stellt. Deshalb

stabilisiert der Stickstoff in Aminen benachbarte Kohlenstoffradikale besser als der Sauerstoff in Ethern.

6.1.2 Aktivität

Die Aktivität der P450-Mutanten wird durch die Zugänglichkeit der Hämgruppe in den Mutanten beeinflusst. Durch die *docking*-Simulationen konnte gezeigt werden, dass die sperrige Aminosäure Phenylalanin an Position 87 den Zugang zur Hämgruppe blockiert. Die Hydroxylierungsreaktion des Wildtyps zeigt dementsprechend eine sehr geringe Aktivität ($< 1 \text{ min}^{-1}$). Nach dem Austausch von Phenylalanin gegen Alanin ist die Hämgruppe besser zugänglich und für über 80 % der β -Iononmoleküle ergibt sich eine Konformation, die eine Hydroxylierung in der 4-Position erlaubt. Dies erklärt die fast 100fach höhere Aktivität der Mutante F87A (93 min^{-1}). Für die Mutante F87V erhielt man in den *docking*-Simulationen jedoch keine Konformation des Substrates, die eine Hydroxylierung in 4-Position ermöglichen würde. Ein Problem hierbei ist die Rigidität der Proteinstruktur während des *dockings*. Die fehlende Berücksichtigung der Enzymflexibilität, insbesondere der Seitenketten ist ein generelles Problem von *docking*-Simulationen.^{290,291} In *docking*-Simulationen von P450 BM-3 mit dem Substrat Phenanthren konnte im Rahmen meiner Diplomarbeit gezeigt werden,²⁹² dass schon die kleine Konformationsänderung einer Seitenkette, z. B. durch Drehung des Phenylrestes von Phe87 um 90° , einen bedeutenden Einfluss auf das Ergebnis der *docking*-Simulationen haben kann. Das bedeutet, dass nach der *in silico*-Mutation von Phe87 zu Valin das Ergebnis der *docking*-Simulationen entscheidend von der Konformation der Aminosäure Valin abhängen kann.

Molekulardynamische Simulationen erlauben die Untersuchung von Substrat-Enzym-Wechselwirkungen unter Berücksichtigung der Dynamik des Systems und wurden für eine Vielzahl von Systemen erfolgreich eingesetzt.²⁹³⁻²⁹⁵ Zur Untersuchung der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen wurden MD-Simulationen des Enzym-Substrat-Komplexes von β -Ionon mit dem Wildtyp-Enzym und den beiden Mutanten F87A und F87V durchgeführt. Für jeden Komplex wurden drei bis neun Simulationen mit unterschiedlichen Startbedingungen durchgeführt. Die Verwendung von unterschiedlichen Startkonformationen des Substrates bzw. unterschiedlichen Startgeschwindigkeiten der Atome erlaubt ein möglichst vollständiges Durchsuchen des Konformationsraumes während der Simulationen und die Verwendung vieler MD-Simulationen erlaubt ein besseres Durchsuchen des Konformationsraumes als die

Verwendung einer einzelnen MD-Simulation.²⁹⁶ Im Verlauf der Simulation wurde jede Picosekunde die Distanz zwischen dem reaktiven Sauerstoffatom der Hämgruppe und den beiden Wasserstoffatomen an der Position 14 des β -Iononmoleküls gemessen. In den Startstrukturen der MD-Simulationen, die aus den *docking*-Simulationen erhalten wurden, lagen die Substrate in unterschiedlichen Orientierungen und an unterschiedlichen Positionen in der Bindetasche der Proteinstrukturen. Neben Simulationen, in denen das β -Iononmolekül von Anfang an in der Nähe der Hämgruppe lag, wurden auch Simulationen beobachtet, in denen sich das β -Iononmolekül während der Simulation von einer entfernten Position an die Hämgruppe annäherte. Die Simulationen waren folglich unabhängig von der Startkonformation und es konnte eine statistische Mittelwertbildung über alle Simulationen durchgeführt werden. Die statistische Auswertung erlaubte die Berechnung einer Häufigkeitsverteilung der Abstände für das Wildtyp-Enzym und die beiden Mutanten. Die Berechnung der kumulierten Häufigkeit für alle Distanzen unterhalb des Grenzwertes von 5 Å erlaubte eine Korrelation mit den experimentell bestimmten Hydroxylierungsaktivitäten. Der Einfluss der Mutanten auf die Hydroxylierungsaktivität kann durch die Häufigkeit, wie oft die Wasserstoffatome der Position 4 nahe genug an dem reaktiven Sauerstoffatom der Hämgruppe liegen, erklärt werden.

6.1.3 Flexibilität

Im Laufe der mehrere Nanosekunden dauernden MD-Simulationen steigt die RMS-Abweichung des Protein-*backbone* gegenüber der Startstruktur auf 1,5 bis 3,5 Å. Diese strukturellen Fluktuationen sind sehr mäßig für ein Protein dieser Größe und Eigenschaften in einem Zeitraum von Nanosekunden und zeigen die hohe dynamische Stabilität des Proteins während der Simulation.²⁹⁷ P450-Enzyme zeigen eine starke Flexibilität besonders in dem den Substratzugang beeinflussenden F-G-Bereich. Schon in den verschiedenen Kristallstrukturen von P450 BM-3 erkennt man deutliche Unterschiede in der Öffnung des Eingangskanals. Während der Simulationen beobachtet man sowohl geöffnete als auch geschlossene Konformationen des Eingangskanals und Übergänge zwischen den beiden Konformationen. Für die Simulationen der Struktur 1BVY, die in der Kristallstruktur einen außergewöhnlich weit geöffneten Eingangskanal aufweist, beobachtet man eine Schließbewegung des Substratzugangskanals und die gemessenen Distanzen erreichen nach einer kurzen Equilibrierungsphase die Werte der anderen Simulationen. Die Ergebnisse der Simulationen

sind also unabhängig von der verwendeten Startstruktur. Eine geöffnete und geschlossene Konformation des Eingangskanals wurde ebenfalls in MD-Simulationen von P450 BM-3 durch Paulsen *et al.*²⁹⁸ und Chang *et al.*²⁹⁹ beobachtet. Während ihrer kurzen, 200 ps dauernden Simulationen wurden keine Übergänge zwischen den beiden Konformationen beobachtet. Die Zeitspanne dieser Simulationen war zu kurz, um einen Übergang zwischen den beiden Konformationen zu beobachten.

Die geöffnete und geschlossene Konformation konnte nicht nur für die Simulationen der verschiedenen Kristallstrukturen beobachtet werden, sondern auch für die Simulationen mit dem *gedockten* Substrat β -Ionon. Während man bei den Simulationen ohne Substrat nach 5 ns Simulationszeit in allen neun Simulationen eine geschlossene Konformation des Eingangskanals beobachtet, zeigen die Simulationen mit Substrat keine Präferenz und jeweils zwölf Simulationen zeigen eine geschlossene und zwölf Simulationen eine geöffnete Konformation.

Dies steht im Gegensatz zu der bisherigen Ansicht, dass die Substratbindung zu einem Schließen des Substratzugangskanals führt.²⁹⁹ In ihrer Simulation benutzten Chang *et al.* eine Fettsäure, das natürliche Substrat von P450 BM-3. Sie beobachteten elektrostatische Interaktionen mit geladenen oder polaren Aminosäuren im Eingangskanal. Insbesondere Arg47, Ser72 und Tyr51 bildeten Wasserstoffbrücken mit der polaren Carboxylgruppe der Fettsäure. Chang *et al.* vermuteten, dass das beobachtete Schließen des Eingangskanals durch eine Bewegung der Aminosäuren Arg47 and Ser72 verursacht wird, um die Interaktion mit der Fettsäure zu verbessern.

Das Verhalten der Enzymstruktur scheint abhängig von dem gebundenen Substrat zu sein. Im Falle von β -Ionon handelt es sich um ein Substrat mit anderen biochemischen Eigenschaften und einer anderen Größe und Form, das im Gegensatz zu den Fettsäuren nicht mit den polaren Aminosäuren des Enzyms interagieren kann.

6.1.4 Stereoselektivität

Bei dem Substrat β -Ionon handelt es um eine prochirale Verbindung und die Abstraktion eines der beiden enantiotopen Wasserstoffatome H(16) (*pro-S*) bzw. H(17) (*pro-R*) führt zur Bildung des chiralen 4-Hydroxyproduktes. Die *in silico*-Untersuchungen erlauben es, zwischen den beiden Wasserstoffatomen zu unterscheiden. Die experimentelle Untersuchung der Stereoselektivität zeigte für die Mutante F87V, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen

der Modellierung, eine Präferenz für die Bildung des (*R*)-Enantiomeren. Für F87A konnte man einen Rückgang des Anteils des (*R*)-Enantiomeren gegenüber der Reaktion mit F87V beobachten. Dieser Trend ließ sich qualitativ durch die Modellierungsergebnisse erklären. Nach dem Curtis-Hammett-Prinzip²⁵⁵ sollte das Verhältnis der beiden Enantiomeren in erster Annäherung die Energiedifferenz der beiden möglichen Konformeren im Übergangszustand widerspiegeln. Dabei ist zu beachten, dass durch die Analyse der MD-Simulationen ausschließlich Interaktionen mit dem Edukt berücksichtigt werden. Es werden keine Übergangszustände berücksichtigt und es können keine quantitativen Enantiomerenüberschüsse vorhergesagt werden, sondern lediglich qualitative Verhältnisse der beiden Enantiomeren. Es ist jedoch bekannt, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Hydroxylierung von C–H Gruppen durch P450-Monooxygenasen der Schritt der Wasserstoffabstraktion ist.⁵⁰⁻⁵³ Deshalb erwartet man einen frühen, eduktähnlichen Übergangszustand, der geometrisch ähnlich dem Edukt ist. Folglich konnten die Simulationen mit dem Edukt β -Ionon erfolgreich zur Modellierung der qualitativen Verhältnisse der gebildeten Enantiomeren, bei der Reaktion mit den P450 BM-3-Mutanten F87A und F87V, eingesetzt werden.

6.2 Isoformspezifische Regioselektivität der humanen Leber-CYPs 3A4 und 2D6

Der Metabolismus stellt einen zentralen Schritt im ADME-Ablauf eines Wirkstoffes dar und ist zugleich eine der kompliziertesten pharmakokinetischen Eigenschaften. Sein Verständnis und die Vorhersage stellt eine besondere Herausforderung dar.¹⁷¹ Für die Untersuchung des P450-katalysierten Metabolismus eines Wirkstoffes müssen verschiedene Selektivitäten berücksichtigt werden: (1) Isoformspezifität: Welche Isoenzyme sind für den Metabolismus eines Wirkstoffes verantwortlich? (2) Regioselektivität: Welche Positionen im Molekül werden von den entsprechenden Isoformen angegriffen? Es handelt sich dabei um verschiedene Fragestellungen, die unterschiedliche Herangehensweisen verlangen. In der vorliegenden Untersuchung wurde ausschließlich die Regioselektivität des Metabolismus untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Regioselektivität von P450-katalysierten Reaktionen mittels molekulardynamischer Simulationen zu untersuchen.²⁵⁹ Entsprechende Simulationen wurden in der vorliegenden Arbeit für das bakterielle P450 BM-3 und das Substrat β -Ionon durchgeführt. Des Weiteren konnte von Alexander Seifert, in einer von mir betreuten Diplomarbeit, erfolgreich die Regioselektivität des Metabolismus von Warfarin durch das humane P450-Enzym CYP2C9 mittels MD-Simulationen untersucht werden.³⁰⁰ Derartige Untersuchungen sind jedoch zu rechen- und zeitaufwendig, um sie für eine große Anzahl von Wirkstoffkandidaten durchzuführen. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, die molekularen Grundlagen der Regioselektivität zu analysieren und daraus einfache Regeln zu entwickeln, mit deren Hilfe dann der Metabolismus beliebiger Substrate vorhergesagt werden kann. Dazu wurde die isoformspezifische Regioselektivität des von CYP3A4 und CYP2D6 katalysierten Metabolismus untersucht. Die beiden Isoenzyme CYP3A4 und CYP2D6 sind die bedeutendsten Isoenzyme für den Metabolismus der auf dem Markt befindlichen Arzneimittel und metabolisieren zusammen ca. 70 % dieser Arzneimittel.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein einfaches, rationales, generelles und prädiktives Modell zur Regioselektivität des von CYP3A4 und CYP2D6 katalysierten Metabolismus erstellt und erfolgreich an einem Datensatz aus Literaturdaten validiert werden. Für die Regioselektivität spielen drei Einflüsse eine Rolle:

1. Die intrinsische Reaktivität der einzelnen Positionen im Substratmolekül
2. Die intrinsische sterische Zugänglichkeit dieser Positionen im Substratmolekül
3. Die sterische Zugänglichkeit des Enzyms

Bevorzugt werden die Positionen eines Substrats metabolisiert, die die höchste Reaktivität aufweisen. Es muss jedoch die intrinsische sterische Zugänglichkeit der Substratpositionen und der Isoenzyme berücksichtigt werden. In CYP3A4 gibt es keine sterische Beschränkung des Zugangs zur Hämgruppe, folglich werden dort die Positionen mit der höchsten chemischen Reaktivität bevorzugt. In CYP2D6 hingegen, in dem der Zugang zur Hämgruppe über einen Kanal begrenzt ist, werden bevorzugt gut zugängliche Positionen umgesetzt. Es war das Ziel möglichst einfache Regeln aufzustellen, anhand derer die Positionen der Metabolisierung in einem Substrat erklärt werden können. Für die intrinsische Zugänglichkeit im Substrat spielt sowohl die Struktur als auch die Form des Moleküls eine Rolle. Zur Quantifizierung der Zugänglichkeit eines Atoms konnte erfolgreich der lokale $RDF_{3,5}$ -Deskriptor angewandt werden. Durch Berechnung des $RDF_{6,0}$ -Deskriptors ist es darüber hinaus auch möglich, die Form des Moleküls zu berücksichtigen. Zur Abschätzung der intrinsischen Reaktivität der verschiedenen Positionen eines Moleküls konnte aus Literaturdaten eine Reaktivitätsreihe erstellt werden, die es erlaubt, neben der Oxidation von aliphatischen Verbindungen auch die Oxidation aromatischer Verbindungen zu berücksichtigen. Das Modell konnte erfolgreich anhand eines Datensatzes von 19 Substraten validiert werden.

Zur Validierung des Modells der isoformspezifischen Regioselektivität von CYP3A4 und CYP2D6 wird ein Datensatz chemisch diverser Substrate benötigt, über den experimentelle *in vitro*-Daten vorliegen. Wie auch bereits andere Gruppen gezeigt haben,^{301,302} ist es eine Herausforderung, einen solchen Satz verlässlicher experimenteller Daten aus der Literatur zu extrahieren. Die experimentellen Literaturdaten werden in verschiedenen Labors mit unterschiedlichen Messmethoden bestimmt. Teilweise werden Enzymkinetiken von rekombinant exprimierten CYPs gemessen, teilweise werden nur indirekte

Aktivitätsmessungen mit Mikrosomenlösungen und CYP-spezifischen Inhibitoren durchgeführt. Oft sind die experimentellen Literaturdaten unvollständig und es finden sich zum Teil widersprüchliche Angaben über die entstehenden Metabolite. Des Weiteren haben die betrachteten Isoenzyme zum Teil keine oder nur eine geringe Relevanz für den Metabolismus des Substrates und das Substrat wird hauptsächlich durch andere CYPs metabolisiert, oder es handelt es sich bei genauerer Überprüfung der Literaturdaten bei einer Substanz nicht um ein Substrat, sondern um einen Inhibitor. Aufgrund der Bedeutung des Datensatzes für die Validierung des Modells wurde besonderer Wert auf die sorgfältige Auswahl der Daten gelegt. Für den Validierungsdatensatz wurden nur Substrate verwendet, an deren Metabolismus die beiden Isoenzyme CYP3A4 und CYP2D6 maßgeblich beteiligt sind. Ein entsprechender Datensatz wurde aus der von Rendic publizierten Übersicht über humane P450-Enzyme und deren Substrate erstellt.⁶¹ Dort sind für über 3000 Reaktionen Informationen über das Substrat, das beteiligte CYP-Isoenzym, die katalysierte Reaktion und Referenzen zur experimentellen Originalliteratur angegeben. Es wurden 31 Substrate, an deren Umsetzung sowohl CYP3A4 als auch CYP2D6 beteiligt ist, gefunden. Aufgrund der angesprochenen Problematik, die den experimentellen Literaturdaten zu Grunde liegt, wurden die Literaturdaten der 31 Substrate anhand der Originalliteratur überprüft. Daraufhin wurden zwölf Substrate aus dem Datensatz entfernt:

Für Ritonavir³⁰³ und Saquinavir³⁰⁴ fanden sich keine eindeutigen und konsistenten Daten über die Regioselektivität des Metabolismus. Im Falle von Bufuralol³⁰⁵, Coffein³⁰⁵, Haloperidol³⁰⁶, Imipramin^{307,308}, Indinavir³⁰⁹, Lidocain³¹⁰, Omeprazol³¹¹, Theophyllin³⁰⁵ und Zotepin³¹² haben CYP3A4 und/oder CYP2D6 keine oder nur eine geringe Relevanz für den Metabolismus und die Substrate werden hauptsächlich durch andere CYPs metabolisiert. Terfenadin hingegen ist ein guter Inhibitor, aber ein schlechtes Substrat für CYP2D6.³¹³ Es verblieb demnach ein Datensatz mit 19 Substraten zur Validierung des Regioselektivitätsmodells.

Von den 19 im Datensatz enthaltenen Substraten konnte für 16 Verbindungen (84 %) die experimentell beobachtete Regioselektivität anhand des erstellten Regioselektivitätsmodells erklärt werden. Für das Substrat Bisoprolol stimmt die Vorhersage des Modells nicht mit den experimentellen Daten überein und es zeigen sich Limitierungen des einfachen Modells. Bei der Metabolisierung von Bisoprolol bildet sich mit beiden Isoenzymen ein gemeinsamer Metabolit (das Produkt der O-Demethylierung). Aufgrund des Modells wird jedoch die N-Demethylierung vorhergesagt, welche bei gleicher Zugänglichkeit eine höhere Reaktivität aufweist.

Im Falle des Substrates Tamsulosin katalysiert CYP3A4 bevorzugt die N-Dealkylierung an Position 9, welche die höchste intrinsische Reaktivität und die geringste sterische Zugänglichkeit aufweist. Die Position 25 ist am besten zugänglich und die O-Demethylierung an dieser Position wird folglich bevorzugt von CYP2D6 katalysiert. Dieser experimentelle Befund steht im Einklang mit den Vorhersagen des Modells. Es werden experimentell jedoch noch zwei weitere Metabolite beobachtet. Die beiden Atome 14 und 19 des Moleküls sind beide gleich zugänglich und lassen sich mit den aufgestellten Regeln nicht unterscheiden. Die beiden Atome werden aber dennoch von unterschiedlichen Isoenzymen umgesetzt. CYP3A4 katalysiert die O-Deethylierung an Position 19, während CYP2D6 die aromatische Hydroxylierung an Position 14 katalysiert. Es gibt jedoch experimentelle Hinweise darauf, dass die O-Deethylierung an Position 19 auch von CYP2D6 katalysiert wird.²⁶⁴ Des Weiteren tritt auch ein Metabolit auf, bei dem die aromatische Ringposition 15 hydroxyliert ist. Für die Bildung dieses Metaboliten sind jedoch die beteiligten Isoenzyme nicht bekannt. Dabei ist zu beachten, dass sich bei der aromatischen Hydroxylierung an Position 14 bzw. 15, nach der Addition von *compound I*, ein intermediäres Epoxid bilden kann. Aus einem Epoxid, an dem die beiden Kohlenstoffatome 14 und 15 beteiligt sind, kann sich bei der anschließenden Epoxidöffnung entweder das 14-Hydroxy- oder das 15-Hydroxy-Produkt bilden. Betrachtet man nur die resultierenden Metabolite, lässt sich also nicht mehr sagen, ob der Angriff ursprünglich an Position 14 oder 15 stattgefunden hat.³¹⁴

Das Regioselektivitätsmodells sagt voraus, dass Loratadin von CYP3A4 an der Position mit der höchsten Reaktivität (Position 16 bzw. 17), benachbart zum Stickstoffatom, hydroxyliert wird. Für CYP2D6 wird die Hydroxylierung an der Position 20, benachbart zum Sauerstoffatom vorhergesagt. Experimentell wird Loratadin jedoch sowohl von CYP2D6 als auch von CYP3A4 an der Position 20 hydroxyliert. Dies führt zur anschließenden O-Deethylierung. Der pharmakologisch aktive Hauptmetabolit von Loratadin ist Descarboethoxyloratadin.³¹⁵ Descarboethoxyloratadin bildet sich nach der P450-katalysierten O-Deethylierung von Loratadin durch Abspaltung von CO₂ (Abbildung 73). Die Abspaltung von Kohlenstoffdioxid könnte als treibende Kraft einen Einfluss auf die Bildung des O-Deethyl-Produktes haben und damit die Hydroxylierung von Loratadin durch CYP3A4 an der weniger reaktiven Position 20 erklären.

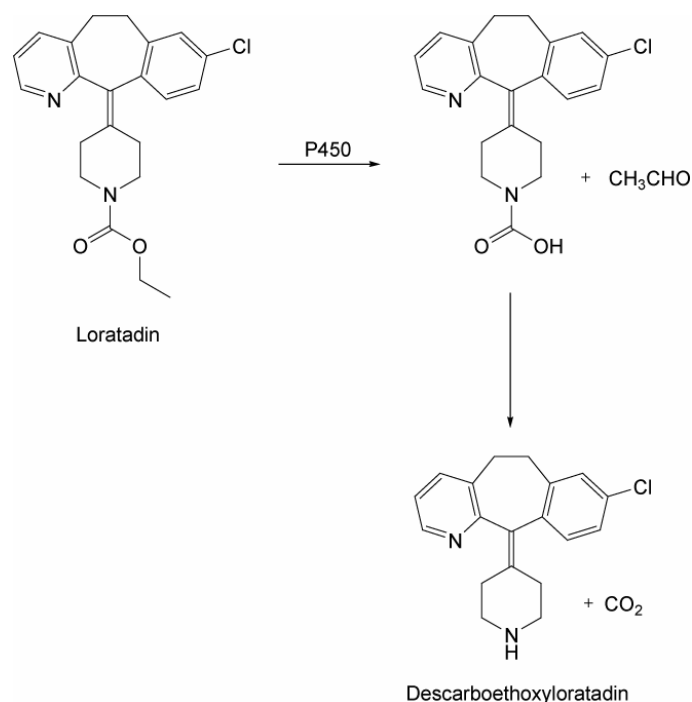


Abbildung 73: Metabolismus von Loratadin. Nach der Hydroxylierung von Loratadin durch CYP3A4 bzw. CYP2D6 und der anschließenden Deethylierung kommt es zur Abspaltung von CO₂ und es bildet sich der pharmakologisch aktive Hauptmetabolit Descarboethoxyloratadin.³¹⁵

Eine Analyse des Datensatzes nach den von den beiden Isoenzymen katalysierten Reaktionen ergab für CYP3A4 eine eindeutige Präferenz für die N-Dealkylierung (Tabelle 27). Über 50 % der katalysierten Reaktionen führen zu einer Dealkylierung am Stickstoffatom. Für CYP2D6 hingegen tritt eine eher gleichmäßige Verteilung über die verschiedenen Reaktionstypen auf, wobei 40 % der Reaktionen zur O-Dealkylierung führen. Dies korreliert mit dem Ergebnis des vorliegenden Modells, dass CYP3A4 bevorzugt die reaktivste Position im Substrat hydroxyliert. In allen Substraten, in denen eine entsprechende hochreaktive Aminogruppe auftritt, katalysiert CYP3A4 die N-Dealkylierung. Die einzige Ausnahme bildet das Molekül Bisoprolol. Von CYP2D6 hingegen wird bevorzugt die am besten zugängliche Position umgesetzt. Die Zugänglichkeit wird jedoch durch die Struktur und Form des Substrates bestimmt, folglich gibt es für CYP2D6 keine so ausgeprägte Präferenz eines bestimmten Reaktionstyps.

Tabelle 27: Häufigkeit der experimentell beobachteten Reaktionen der Substrate des Validierungsdatensatzes.

Reaktion	CYP3A4		CYP2D6	
N-Dealkylierung	14	56 %	4	20 %
O-Dealkylierung	4	16 %	8	40 %
allylische / benzyllische Hydroxylierung	5	20 %	3	15 %
aromatische Hydroxylierung	2	8 %	5	25 %

Im Folgenden werden die beiden für die Regioselektivität entscheidenden Einflüsse, die intrinsische Reaktivität der Substrate und die Zugänglichkeit der P450-Isoenzyme näher diskutiert.

6.2.1 Die intrinsische Reaktivität

Für die Reaktivitätsuntersuchung ist es nötig, sich detailliert mit den möglichen Reaktionsmechanismen auseinanderzusetzen. Cytochrom P450-Enzyme katalysieren verschiedene Reaktionen mit unterschiedlichen Mechanismen.⁴⁸ Dabei gehört der Mechanismus der Hydroxylierung von aliphatischen C-H-Gruppen zu den bestuntersuchten Reaktionsmechanismen.^{48,49} Im Folgenden werden die spezifischen Einflüsse der P450-katalysierten Reaktionen diskutiert. Die intrinsischen Reaktivitäten verschiedener Atomgruppen wurden durch quantenmechanische (QM) Methoden basierend auf Hartree-Fock, semiempirischen oder DFT-Methoden berechnet. Des Weiteren wurden Reaktivitäten über die Stabilität der entstehenden Radikale,³¹⁶ aus dem Ionisierungspotential der Radikale, über die HOMO-Energien (*highest occupied molecular orbital*)^{55,56,317} oder aus der Dichte des HOMO an den verschiedenen Atomen³¹⁸ abgeschätzt. Weiterentwickelte Methoden verwenden die direkte Abschätzung der Aktivierungsenergien für die Wasserstoffabstraktion mittels vereinfachter Modelle von *compound I*.^{55,56,319} In letzter Zeit ist es möglich geworden, Aktivierungsenergien mit DFT-Methoden unter Berücksichtigung eines kompletten Modells der aktiven Porphyrin-Spezies *compound I* zu berechnen. Damit lassen sich annähernd quantitative Ergebnisse erhalten.^{49,58,320} Solche Berechnungen sind jedoch sehr zeitaufwendig, besonders für Moleküle von der Größe eines typischen Arzneistoffs. Allerdings können diese Methoden benutzt werden, um Verfahren zur Abschätzung von Reaktivitäten zu entwickeln und zu kalibrieren. Ein erster solcher Ansatz ist im Jahr 2004 von der Arbeitsgruppe von

Shaik publiziert worden. Es wurden jedoch nur wenige Substrate ohne externe Validierung verwendet.⁵² In einer kürzlich publizierten Arbeit von Olsen *et al.* wurden diese Untersuchungen ausgeweitet. Es wurden DFT-Berechnungen mit einem kompletten Modell des *compound I* durchgeführt und Aktivierungsenergien für die Wasserstoffabstraktion von 24 Substraten berechnet.⁵⁴ Die Substrate umfassten primäre, sekundäre und tertiäre aliphatische Kohlenstoffatome, die sich benachbart zu Stickstoff-, Sauerstoff-, Schwefelatomen, sp^3 -hybridisierten, sp^2 -hybridisierten und aromatischen Kohlenstoffatomen befanden. Den Kohlenstoffatomen können Aktivierungsenergien der Wasserstoffabstraktion entsprechend ihrer benachbarten funktionellen Gruppen zugeordnet werden. Daraus lässt sich ein einfaches, prädiktives Modell der Aktivierungsenergien erstellen. Die durchschnittlichen Aktivierungsenergien betragen: für primäre Kohlenstoffatome in sp^3 -Umgebung 74 kJ/mol. Für sekundäre oder tertiäre Kohlenstoffatome in sp^3 Umgebung 61 kJ/mol. Für reaktive Kohlenstoffatome mit benachbarten aromatischen oder sp^2 -hybridisierten Atomen 53 kJ/mol (allylisch, benzyllisch, α -ständig zu Carbonylen), für reaktive Kohlenstoffatome mit benachbarten O- oder S-Atomen 47 kJ/mol und mit benachbarten N-Atomen 30 kJ/mol. Diese Einteilung entspricht der qualitativen Stabilität der Radikale.^{55,56} Diese Energien stellen einen konsistenten Satz von Abschätzungen der intrinsischen Reaktivität für verschiedene Substrate dar. Aus dieser Untersuchung ergibt sich eine Korrelation der berechneten Aktivierungsenergien mit den Bindungsdissoziationsenergien. Die Korrelation gilt allerdings nur für Positionen in den Substraten, die benachbart zum reaktiven Zentrum keine sp^2 -hybridisierten oder aromatischen Gruppen aufweisen. Für Positionen im Molekül mit benachbarten sp^2 -hybridisierten oder aromatischen Gruppen kann folglich eine Reaktivitätsberechnung über die Berechnung der Bindungsdissoziationsenergie nicht zuverlässig vorgenommen werden. Die alleinige Berücksichtigung der BDE ist also für eine Reaktivitätsabschätzung nicht ausreichend.⁵⁴

Eine weitere wichtige Reaktion der P450-Enzyme stellt die aromatische Hydroxylierung dar.⁴⁸ Benzol ist eines der stabilsten Moleküle gegenüber Oxidationsreaktionen. Die homolytische Spaltung einer C-H-Bindung im Benzol ist schwierig. Die Bindungsdissoziationsenergie von 111 kcal/mol liegt deutlich über den Werten für aliphatische Alkane. Außerdem besitzt Benzol ein sehr hohes Redoxpotential, was die Bildung eines Radikalkations durch einen Einelektronen-Oxidationsprozess schwierig macht. Somit kann die P450-katalysierte Oxidation von Benzol zu Phenol weder, wie bei aliphatischen Hydroxylierungen, aus einer Wasserstoff-Abstraktion resultieren, noch durch

eine Eielektronenoxidation katalysiert werden.⁴⁸ Im Gegensatz zum Mechanismus der P450-katalysierten aliphatischen Hydroxylierung, zu dem es umfangreiche experimentelle^{321,322} und theoretische^{51,58-60,323,324} Arbeiten gibt, ist der Mechanismus der aromatischen Hydroxylierung wesentlich weniger gut untersucht.⁵⁷ Für die Oxidation der Aromaten zu Phenolen wurden verschiedene Mechanismen postuliert.^{48,325}

Frühe Studien von Jerina *et al.*^{326,327} an den *National Institutes of Health (NIH)* kamen zu dem Schluss, dass Arenoxide unabdingbare Zwischenprodukte der aromatischen Hydroxylierung sind. Der Grund für diese Annahme war die Beobachtung der sogenannten *NIH-Umlagerung*.^{328,329} Bei der Umlagerung des gebildeten Arenoxids zum Phenol wandert ein Wasserstoffatom von der Hydroxylierungsposition an das benachbarte Kohlenstoffatom (Abbildung 74).

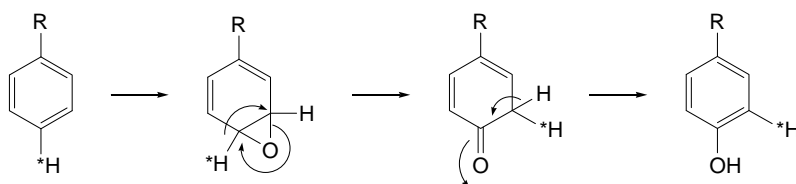


Abbildung 74: *NIH-Umlagerung*: Bei der Umlagerung des Arenoxids zum Phenol wandert ein Wasserstoffatom von der Hydroxylierungsposition an das benachbarte Kohlenstoffatom.

Neuere experimentelle Hinweise^{318,330} deuten auf einen alternativen Mechanismus hin, der nicht über ein Epoxidzwischenprodukt läuft. In diesem nichtkonzertierten Reaktionsablauf, addiert die Fe^{IV} -Oxyl-Spezies *compound I* an ein Kohlenstoffatom des aromatischen Rings und es bildet sich ein tetraedrischer σ -Übergangskomplex der radikalischen oder carbokationischen Charakter haben kann. Durch Umlagerung dieses σ -Komplexes können sich als Folgeprodukte Phenole, Ketone oder Epoxide bilden, die dann gegebenenfalls weiter umlagern (Abbildung 75).

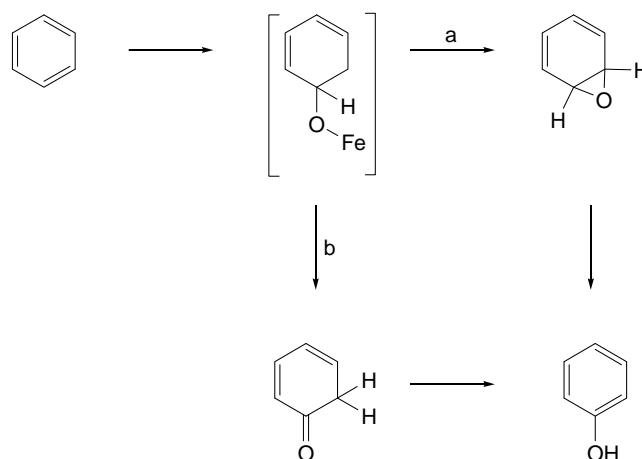


Abbildung 75: Nichtkonzertierter Mechanismus der aromatischen Oxidation. *compound I* addiert an ein Kohlenstoffatom des aromatischen Rings. Dabei bildet sich ein tetraedrischer σ -Übergangskomplex mit radikalischem oder carbokationischem Charakter, der zu unterschiedlichen Folgeprodukten umlagern kann.

Dieser nichtkonzertierte Mechanismus ist ebenfalls konsistent mit der Wanderung eines Wasserstoffatoms von der Hydroxylierungsposition an das benachbarte Kohlenstoffatom.^{70,331} Das kationische Intermediat kann entweder selbstständig oder durch Elektronenübertragung aus dem radikalischen Intermediat gebildet werden. (Abbildung 76). Ein solches Kation an der meso-Position induziert eine Wasserstoffumlagerung ohne Bildung eines Arenoxids. Dieser Mechanismus wurde für die Umlagerung von Deuterium in der P450-katalysierten Hydroxylierung von deuterierten Warfarinderivaten beobachtet.³³²

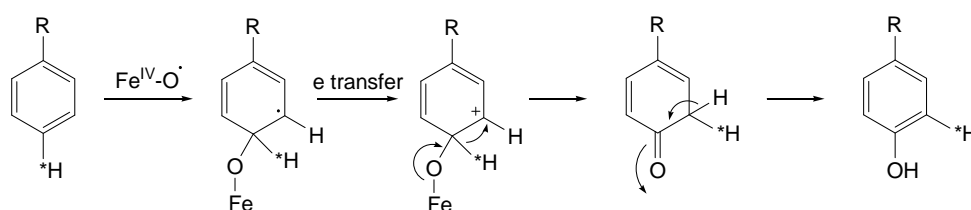


Abbildung 76: Mechanismus der Bildung eines kationischen Intermediats aus dem radikalischen Intermediat und anschließende Umlagerung eines Wasserstoffatoms.

Die experimentellen Beobachtungen werden durch theoretische Untersuchungen gestützt,³³³⁻³³⁵ die eine konzertierte Epoxidierung als ersten Schritt der aromatischen Hydroxylierung ausschließen. Während die aliphatische Hydroxylierung über eine radikalische Zwischenstufe abläuft, ist nicht eindeutig, ob das tetraedrische Zwischenprodukt in der aromatischen Hydroxylierung radikalische oder kationische Eigenschaften hat. Erste semiempirische

Berechnungen³³⁶ des Reaktionsmechanismus ergaben nur qualitative Erkenntnisse. In neueren Arbeiten von Bathelt *et al.* wurde der Mechanismus der P450-katalysierten Hydroxylierung von Aromaten und der Einfluss von Substituenteneffekten auf die Reaktivität mittels DFT-Berechnungen in einem realistischen Porphyrin-Modellsystem untersucht.^{57,62} Für den ersten Schritt des Mechanismus der aromatischen Hydroxylierung, die Addition von *compound I* an das Substrat, wurden deutliche Reaktionsbarrieren für Benzol und substituierte Benzole gefunden. Die vergleichsweise geringen Energiebarrieren für die nachfolgenden Umlagerungen der Addukte zum Epoxid-, Keton- oder Phenolprodukt weisen darauf hin, dass die Addition von *compound I* der geschwindigkeits- und reaktivitätsbestimmende Schritt ist. Der energieärmste Übergangszustand zeigt vermischte kationische und radikalische Eigenschaften. Als Zwischenprodukte können sowohl mehr kationische als auch mehr radikalische Komplexe gebildet werden. Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass in der polarisierenden Umgebung eines Proteins die Hydroxylierung von Benzol wahrscheinlich eher über kationische Zwischenprodukte verläuft, da gezeigt wurde, dass diese durch Lösungsmittel stabilisiert werden und rasch zum Produkt umlagern. Zur Untersuchung von Substituenteneffekten wurden die Übergangszustände für die Addition von *compound I* an die meta- und para-Position einer Auswahl von substituierten Benzolen bestimmt. Die Berechnungen zeigten, dass die intrinsische Reaktivität der Hydroxylierung in para-Position sowohl durch elektronenziehende als auch durch elektronenschiebende Substituenten erhöht wird. Das wird durch experimentelle Untersuchungen an einem synthetischen Modell von *compound I* gestützt.³³⁷ Die Aktivierungsenergien der aromatischen Hydroxylierung liegen in der Größenordnung der Epoxidierung von Ethen³²³ und etwas niedriger als für die Hydroxylierung von C–H-Bindungen in Alkanen.⁵⁸⁻⁶⁰

Aus den experimentellen Untersuchungen und den theoretischen DFT-Berechnungen zum Reaktionsmechanismus der aliphatischen⁵⁴ und aromatischen⁶² Hydroxylierung durch P450 kann eine konsistente, gemeinsame Reaktivitätsskala für beide Reaktionsmechanismen erstellt werden. Mit Hilfe dieser Reaktivitätsskala ist es möglich, die intrinsischen Reaktivitäten der verschiedenen Positionen im Molekül abzuschätzen. Substituenteneinflüsse auf die Reaktivität der aliphatischen Hydroxylierung können über den Einfluss auf die Radikalstabilität berücksichtigt werden. Die Untersuchung von Substituenteneinflüssen auf die Hydroxylierung am Aromaten zeigte, dass sowohl elektronenziehende als auch elektronenschiebende Substituenten in der para-Position die Energiebarriere erniedrigen.⁶² Für aromatische Hydroxylierungen erstellten Bathelt *et al.* aus den Eigenschaften des

Übergangszustands und den berechneten Aktivierungsbarrieren der untersuchten Reihe von einfachsubstituierten Benzolen eine quantitative Struktur-Reaktivitäts-Beziehung (QSAR), um den Effekt einzelner Substituenten zu analysieren und ein prädiktives Modell der intrinsischen Reaktivitäten zu erstellen.⁶² Ein Zwei-Parameter-Ansatz, der radikalische³³⁸ und kationische³³⁹ σ -Hammett-Konstanten³⁴⁰ verwendet, führte zu einer linearen Beziehung mit den berechneten Reaktionsbarrieren für die Addition von *compound I* an acht unterschiedlich substituierte Benzole. Mittels Hammett-Konstanten können somit Vorhersagen über den Einfluss von Substituenten gemacht werden. Des Weiteren wurde eine theoretische Skala auf Basis der Bindungsdissoziationsenergien der Hydroxy-Addukte entwickelt. Dadurch kann die Struktur-Reaktivitäts-Beziehung auf Substituenten erweitert werden, für die keine experimentellen Hammett-Konstanten verfügbar sind. Mittels dieser Beziehung kann der Einfluss von beliebigen Substituenten vorhergesagt werden, ohne die Notwendigkeit von experimentellen Deskriptoren.⁶²

6.2.2 Sterische Zugänglichkeit der P450-Isoenzyme

Um den Einfluss des Enzyms auf die Regioselektivität zu untersuchen, wurde eine systematische Analyse der Bindetaschenarchitektur der P450-Enzyme durchgeführt. Die in der Literatur gefundenen Angaben zu den Volumina der Bindetaschen von Cytochrom P450-Monooxygenasen schwanken stark.²⁵ Die beiden sehr ähnlichen CYP3A4-Strukturen (PDB-Einträge 1TQN und 1W0E) unterscheiden sich beispielsweise in den Volumina ihrer Bindetaschen um den Faktor zwei:^{341,342} 1386 \AA^3 gegenüber 520 \AA^3 . Diese Abweichungen entstehen infolge unterschiedlicher Algorithmen für die Berechnung des Volumens und durch die unterschiedliche Definition der Bindetasche. Eine einheitliche Definition der CYP-Bindetaschen ist schwierig, da unterschiedliche Anteile des Zugangskanals als Teil der Bindetasche berücksichtigt werden können. Des Weiteren zeigen die P450-Enzyme eine hohe Flexibilität. Die Flexibilität wurde experimentell durch herkömmliche Spektroskopiemethoden in Kombination mit Störeinflüssen (wie hohem Druck und Temperatur)^{343,344} und durch Resonanz-Raman-Spektroskopie nachgewiesen.³⁴⁵ Die Kompressibilität der P450-Bindetaschen zeigt sich durch Verschiebungen der Soret-Bande unter Druck.³⁴⁶ In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen ist bekannt, dass verschiedene CYPs durch hohen Druck leicht zu inaktiven P450-Formen denaturieren.^{347,348} Durch Kristallstrukturanalysen^{277,349,350} der kürzlich veröffentlichten Proteinstrukturen von Säugetier P450-Enzymen und durch isotherme Titrationskalometrie³⁵¹ konnte gezeigt werden, dass die

Bindung von Liganden bemerkenswerte Konformationsänderungen der Proteinstrukturen auslösen kann.³⁵² So zeigt die Struktur des substratgebundenen CYP3A4 (PDB-Eintrag 2J0D) eine nach oben geklappte F-G-*loop*-Region und dadurch eine Vergrößerung des Volumens der Bindetasche gegenüber der substratfreien Struktur von 950 \AA^3 auf ca. 2000 \AA^3 .³⁵³ Molekulardynamische Simulationen zeigten neben dem strukturell konservierten Proteinkern eine starke Flexibilität sowohl im F-G- wie auch im B-C-*loop*-Bereich.²⁵⁹ Durch positionsspezifische Mutagenese konnte gezeigt werden, dass diese Regionen an der Substratspezifität beteiligt sind.³⁵⁴⁻³⁵⁶ Die Untersuchungen sind konsistent mit der Ansicht, dass diese Flexibilität der Enzyme zumindest zum Teil Grundlage der breiten Substratspezifität des Katalysators ist.³⁵² Mit Hilfe der an unserem Institut entwickelten P450-Datenbank (CYPED) wurde eine systematische Analyse der *loop*-Längen des B-C- und F-G-*loops* aller CYPs mit bekannter Struktur durchgeführt. Um den Zusammenhang zwischen der Sequenz und der Substratspezifität zu untersuchen, wurden für jedes CYP die experimentell bekannten Substrate der entsprechenden homologen Familie analysiert. Die Größe der bevorzugten Substrate der CYPs korreliert mit den berechneten *loop*-Längen. Diese *loops* sind nicht direkt an der Substratbindung beteiligt, sind jedoch Teil des Substratzugangskanals und könnten daher als größenabhängige Filter für die Substrate wirken.²⁵⁸

Die systematische Analyse der Bindetaschenarchitektur verschiedener P450-Enzyme mittels der Software VOIDOO³⁵⁷ zeigte, dass die Form der Bindetasche und somit das für ein potentiell Substrat zur Verfügung stehende Volumen, durch vier Bereiche abgegrenzt wird. Hierzu gehören der B-C- und F-G-*loop*-Bereich, die I-Helix (SRS4) sowie der SRS5-Bereich. Durch die starke Flexibilität sowohl im F-G- wie auch im B-C-*loop*-Bereich²⁵⁹ gehören diese Bereiche nur indirekt zu den volumenbestimmenden Regionen und scheinen sich Substratgrößen in einem gewissen Maße anpassen zu können. Im Gegensatz hierzu gehören die I-Helix (SRS4) und der SRS5-Bereich zum definierten P450-Kern. In MD-Simulationen²⁵⁹ zeigten diese Bereiche nur eine sehr geringe Flexibilität und die Konformationen der Aminosäure-Seitenketten waren ausgesprochen rigide. Das entscheidende Ergebnis der systematischen Bindetaschenanalyse ist die Erkenntnis, dass die voluminöse Bindetasche und die Hämgruppe selbst über einen rigiden Kanal miteinander verbunden sind, der durch die I-Helix und die Aminosäuren im Bereich der SRS5 begrenzt wird. Durch die systematische Bindetaschenanalyse lassen sich die Proteinstrukturen von P450-Monooxygenasen nach der Zugänglichkeit der reaktiven Hämgruppe klassifizieren. CYP2D6 gehört zur Klasse der CYPs mit einem engen Hämzugangskanal, während in CYP3A4 die Hämzugänglichkeit nicht eingeschränkt ist.

Die hohe Flexibilität der Substratbindetasche besonders im F-G- wie auch im B-C-loop-Bereich²⁵⁹ erklärt das breite Substratspektrum der P450-Enzyme. Die flexiblen B-C- und F-G-loops der CYPs sind nicht direkt an der Substratbindung beteiligt. Sie sind jedoch Teil des Substratzugangskanals und könnten daher als größenabhängige Filter für die Substrate wirken.²⁵⁸ Der rigide Kern der Proteinstruktur hingegen vermittelt die Regioselektivität durch die Beeinflussung des Substratzugangs zur Hämgruppe.

6.2.3 Vergleich mit anderen Methoden

In der Literatur sind verschiedene Ansätze zur *in silico*-Vorhersage des Metabolismus beschrieben. Es gab Versuche, den durch Cytochrom P450-Monooxygenasen katalysierten Metabolismus eines Substrates allein aufgrund der Reaktivitäten der einzelnen Positionen im Molekül zu erklären.^{51,53-56,58,62,186,314,335,358,359} Die Untersuchungen zeigten jedoch, dass die alleinige Berücksichtigung der chemischen Reaktivität nicht ausreicht, um die Regioselektivität zu verstehen.³⁶⁰ Es folgten Arbeiten, in denen zusätzlich die Zugänglichkeit der einzelnen Atome eines Substrates berücksichtigt wurde. Die *solvent accessible surface* der Wasserstoffatome wurde als Maß für die intrinsische Zugänglichkeit der einzelnen Positionen im Molekül verwendet. Durch Kombination der Aktivierungsenergien der Wasserstoffabstraktion mit der *solvent accessible surface* konnten für verschiedene Substrate die Atome aufgrund ihrer Anfälligkeit für den Metabolismus durch CYP3A4 angeordnet werden.^{54,186} Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist für CYP3A4 die Regioselektivität der Hydroxylierung durch die Reaktivität der einzelnen Positionen eines Substrates bestimmt und wird nicht durch das Enzym beeinflusst. Für andere Enzyme (z. B. CYP2D6) zeigte sich jedoch, dass neben der intrinsischen Reaktivität der Substrate auch die Zugänglichkeit des Substrates zu reaktiven Hämgruppe des Enzyms berücksichtigt werden muss. In dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Modell konnte der *RDF*-Deskriptor erfolgreich zur Berechnung der intrinsischen Zugänglichkeiten einzelner Atome der Substrate angewandt werden. Der Vorteil des *RDF*-Deskriptors gegenüber Methoden, die auf der Berechnung der *solvent accessible surface* beruhen, liegt in der Berücksichtigung der umgebenden 3D-Struktur des Substrates. Neben der lokalen Zugänglichkeit einzelner Atome kann zusätzlich die Form des Substrates berücksichtigt werden. Dies spielt bei der Berücksichtigung der Zugänglichkeit gegenüber der Hämgruppe des Enzyms eine entscheidende Rolle.

Cruciani *et al.* entwickelten MetaSite, eine Methode, die neben der Position der Metabolisierung auch die beteiligten CYPs vorhersagen soll.³⁶¹ MetaSite berücksichtigt die strukturelle Komplementarität zwischen der Bindetasche des Enzyms und dem Liganden sowie die Reaktivität des Liganden. Um das Enzym und den Liganden zu vergleichen, werden zwei Deskriptorensätze berechnet, ein Satz von Deskriptoren für das Enzym und ein weiterer Satz von Deskriptoren für das Substrat. Beide Deskriptorensätze basieren auf flexiblen molekularen Interaktionsfeldern, die mit Hilfe des Programms GRID¹⁹³ erstellt werden. Daraus ergibt sich jeweils ein chemischer Fingerabdruck für das Substrat und das Enzym. Die Deskriptorensätze werden benutzt, um das Enzym und das Substrat mit Hilfe einer Ähnlichkeitsanalysemethode zu vergleichen. Auf dieser Grundlage werden alle Atome im Molekül entsprechend ihrer Zugänglichkeit zur Hämgruppe abgestuft. Die Zugänglichkeit eines Atoms *i* beschreibt die Interaktion zwischen dem P450-Enzym und dem Liganden, wenn der Ligand so in der Bindetasche positioniert ist, dass er mit dem entsprechenden Atom *i* zur Hämgruppe zeigt. Zusätzlich wird ein Reaktivitätsfaktor verwendet, der die Reaktivität des Atoms gegenüber der P450-Oxidation durch Wasserstoffabspaltung berücksichtigt. Zur Reaktivitätsabschätzung wurden vorab mittels DFT-Berechnungen die chemischen Reaktivitäten für einen diversen Datensatz berechnet und gespeichert. Nach Fragmentierung der Substrate können nun den einzelnen Fragmenten intrinsischen Reaktivitäten zugeordnet werden. Aus der Zugänglichkeit und der Reaktivität ergibt sich die Wahrscheinlichkeit des Atoms *i*, Position der Metabolisierung zu sein. Es wird eine Rangliste aller Atome eines Substrates erstellt, entsprechend ihrer Wahrscheinlichkeit, Ort der Metabolisierung zu sein. Um metabolisiert werden zu können, muss ein Atom *i* signifikante Zugänglichkeits- und Reaktivitätskomponenten zeigen.

Es sind mehrere Untersuchungen zur Vorhersagefähigkeit von MetaSite publiziert worden.^{180,301,361-364} Je nach Untersuchung finden sich durchschnittlich 77-85 % der experimentell bestimmten Metabolismuspositionen unter den zwei bis fünf höchstgerankten Positionen der Rangliste. Unter den höchstgerankten Positionen befinden sich folglich jedoch auch viele falsch positive Ergebnisse.¹⁸⁰ Die Untersuchungen ergaben, dass die Zugänglichkeit die mit Abstand bedeutendste Komponente der MetaSite-Methode ist und 80 % der experimentellen Ergebnisse erklärt.³⁶¹ Daraus ergibt sich für die Reaktivität nur ein begrenzter Einfluss. Für CYP3A4 zeigt MetaSite den höchsten Reaktivitätsanteil im Vergleich zu den anderen P450-Isoenzymen. Jedoch ist auch bei CYP3A4 die Berücksichtigung des Enzyms weiterhin der positionsbestimmende Faktor (relative Bedeutung der Zugänglichkeits- und Reaktivitätskomponente 65 % : 35 %).³⁶¹ Für sterisch gut zugängliche P450 wie CYP3A4

konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch gezeigt werden, dass die Regioselektivität nur durch die intrinsische Reaktivität und Zugänglichkeit der einzelnen Substratpositionen beeinflusst wird und dass das Enzym keinen Einfluss auf die Regioselektivität hat. In der Literatur findet sich die Vorstellung, in CYP3A4 könnten die Substrate aufgrund der großen Bindetasche von CYP3A4 mehr als eine Orientierung in der Bindetasche annehmen und der Angriff von CYP3A4 auf eine Ligandenposition sei hauptsächlich durch die chemische Reaktivität dieser Ligandenposition bestimmt.³⁶¹ In der vorliegenden Untersuchung konnte durch Identifikation eines Zugangskanals zur Hämgruppe gezeigt werden, dass nicht die Größe der Bindetasche, sondern die Form und vor allem die Zugänglichkeit der Hämgruppe für die Regioselektivität entscheidend ist. MetaSite verwendet flexible molekulare Interaktionsfelder. Bei Benutzung von statischen Interaktionsfeldern sinkt die Vorhersageleistung der Methode um 15-20 %. Die Annahme ist, dass die Cytochrom P450-Enzyme die Seitenkettenflexibilität nutzen um, wenn nötig, mehr Platz bereitzustellen, um sich an die Größe der Substrate anzupassen oder um die Substrate näher an die Hämgruppe auszurichten.³⁶¹ Die Vorhersage von Seitenkettenbewegungen aufgrund der Seitenkettenflexibilität oder Substratbindung scheint essentiell zu sein, um die CYP-Substrat-Interaktionen richtig zu erarbeiten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass für die Regioselektivität einer P450-katalysierten Reaktion die Flexibilität der Proteine unerheblich ist. Zwar konnte durch MD-Simulationen eine starke Flexibilität der lösungsmittelzugänglichen Helices und *loop*-Regionen insbesondere der B-C- und der F-G-*loops* gezeigt werden und diese Regionen begrenzen auch die Bindetasche der P450-Enzyme. Die Regioselektivität der Enzyme wird jedoch durch einen rigiden Kanal beeinflusst, der die Zugänglichkeit zur Hämgruppe begrenzt. Für die Untersuchung von Interaktionen von Liganden mit CYPs mag die Berücksichtigung der Flexibilität wichtig sein. Für die Frage der Regioselektivität konnte aber gezeigt werden, dass die Berücksichtigung von Interaktionen nicht notwendig ist. Die Regioselektivität wird alleine durch die intrinsische Reaktivität und Zugänglichkeit der einzelnen Positionen des Moleküls und durch die sterische Zugänglichkeit der Hämgruppe der CYP-Enzyme beeinflusst.

MetaSite untersucht zusätzlich zur Regioselektivität auch die Substratspezifität und sagt für ein Substrat die am Metabolismus beteiligten CYPs voraus. Für die Frage der Spezifität könnte die Berücksichtigung von Interaktionen wichtig sein. Wir betrachteten die Frage der Regioselektivität jedoch getrennt von der Frage der Spezifität und auch die Untersuchungen von Caron *et al.* zu MetaSite kamen zu dem Ergebnis, dass MetaSite am besten mit vorherigem experimentellen Wissen über die beteiligten CYPs funktioniert.¹⁸⁰ Sie kamen zu dem Schluss, dass die Ergebnisse von MetaSite kritisch von menschlichen Experten

abhängen, welche die Vorhersagen mit experimentellen Ergebnisse vergleichen, die Ähnlichkeiten und Unterschiede interpretieren und daraus entsprechende Schlussfolgerungen ableiten können.¹⁸⁰ Bei der Berücksichtigung von Interaktionen muss auch zusätzlich die Abhängigkeit der elektrostatischen Interaktionen von den Protonierungszuständen der Substrate und der Aminosäuren des Enzyms berücksichtigt werden.³⁶⁵ Dies spielt für das in dieser Arbeit entwickelte Modell keine Rolle.

In der Literatur sind weitere *in silico*-Methoden zur Untersuchung des Metabolismus beschrieben (siehe Kapitel 3.3.2). Diese Methoden weisen alle gewisse Limitierungen auf. Regelbasierte Expertensysteme wie beispielsweise MetabolExpert, META und METEOR^{174,181} berücksichtigen weder das Enzym noch die 3D-Struktur der Substrate. Das Ergebnis hängt stark von der Art und Anzahl der Regeln, dem Trainingsdatensatz, der Qualität der Literaturdaten und dem Einfluss der Reaktivität, Orientierung und Zugänglichkeit ab. Die Methoden erzeugen oft sehr viele falsch positive Ergebnisse und können andererseits oft wichtige Stoffwechselwege nicht richtig vorhersagen.

Die meisten spezifischen Untersuchungen basieren auf quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR *Quantitative Structure-Activity Relationship*), Pharmakophormodellen, strukturbasierten (*docking*), reaktivitätsbasierten oder regelbasierten Methoden.¹⁷⁴ Aufgrund der großen Diversität der von den Enzymen der P450-Superfamilie katalysierten Reaktionen und des breiten Substratspektrums ist die Anwendung klassischer QSAR-Methoden schwierig, da hierfür ein einheitlicher Reaktionsmechanismus und chemisch und strukturell ähnliche Substrate benötigt werden.³⁶¹ Auf Pharmakophoren basierende Methoden^{184,185} sind abhängig vom Trainingsdatensatz und ergeben ein statisches Bild der Substraterkennung und Reaktion, bei dem weder die Reaktivität noch die genaue Geometrie der P450-Bindetasche eine Rolle spielen. Molekulare *docking*-Methoden zur Untersuchung von Ligand-Protein-Interaktionen sind durch unpräzise *scoring*-Funktionen und die hohe Flexibilität der Cytochrom P450-Strukturen beeinflusst und konnten bisher nicht zu einer Verbesserung der Vorhersagen beitragen.³⁶¹ Methoden, die sich auf die quantenmechanische *ab initio*- oder semiempirische Berechnung der Reaktivitäten von Substratmolekülen stützen,^{51,184,186} sind sehr rechenaufwendig, langsam und berücksichtigen weder die Substrat-Enzym-Wechselwirkung noch die Orientierung und Zugänglichkeit der Substrate.

Aufgrund der besonderen Bedeutung von Pharmakophormodellen in der Literatur soll im Folgenden näher auf einige Beispiele eingegangen werden. Für die Substrate einiger CYPs,

insbesondere CYP2D6,³⁶⁶ wurden Pharmakophore vorgeschlagen, welche die Regioselektivität der Oxidation durch die Orientierung der Substrate im aktiven Zentrum, beeinflussen.³⁶⁷ Für andere CYPs (wie CYP3A4) konnte kein ersichtlicher Pharmakophor identifiziert werden.³⁶⁸

Der Hauptpharmakophor der CYP2D6-Substrate besteht aus einem basischen Stickstoffatom, das bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegt. Die Metabolisierung der Substrate wird an einer Position 5 bzw. 7 Å vom Stickstoffatom entfernt beobachtet.^{369,370} Modellierungen der CYP2D6-Struktur haben gezeigt, dass die Aminosäure Asp301 mit dem basischen Stickstoffatom der Substrate interagiert.³⁷¹⁻³⁷³ Dieser Befund wurde durch positionsgerichtete Mutagenese experimentell gestützt.³⁷⁴⁻³⁷⁶ Das basische Stickstoffatom der Substrate wechselwirkt entweder direkt über elektrostatische Interaktionen mit den Sauerstoffatomen der Carboxylatgruppen der Aspartat-Seitenkette oder über Wasserstoffbrücken.³⁷⁷ Neuere Modellierungen zeigten jedoch eine vorwiegend strukturelle Funktion von Asp301 und Mutationen führen zu Störungen der strukturellen Integrität des aktiven Zentrums,¹⁹⁴ was einen indirekten Einfluss auf die Substratbindung hat.³⁷⁶ Die Carboxylatgruppe des Asp301 bildet Wasserstoffbrücken mit den *backbone*-Amiden der beiden Aminosäuren Val119 und Phe120 im flexiblen *B-C-loop* aus. Die strukturellen Einflüsse sind konsistent mit dem Befund, dass Mutationen von Asp301 zu einem weniger stabilen Protein führen.^{376,378} Des Weiteren haben Mutageneseexperimente von Asp301 gezeigt, dass die Entfernung der negativen Ladung an dieser Position den Einbau von Häm in das Protein und dadurch die Menge am Holoprotein vermindert.^{374,376} Darüber hinaus spielt Asp301 möglicherweise zusammen mit einem konservierten Threonin in der I-Helix eine Rolle im Protonentransfer, ähnlich dem Asp318 in CYP1A2 der Ratte³⁷⁹ und dem Asp251 des bakteriellen CYP101.^{380,381}

Aus Modellierungen^{184,194,382} und durch Mutageneseexperimente^{378,383} wurde mit Glu216 eine weitere potentielle Aminosäure für die Bindung basischer Substrate identifiziert. Glu216 befindet sich in der F-Helix in der SRS2.

Allerdings weisen das Dogma eines Pharmakophors und die elektrostatische Interaktion des basischen Stickstoffs mit Aminosäuren von CYP2D6 einige Widersprüche auf.³⁸³ Obwohl der basische Stickstoff als charakteristisches Merkmal der CYP2D6-Substrate betrachtet wird, wurde eine Reihe von CYP2D6-Substraten identifiziert, die kein basisches Stickstoffatom aufweisen, beispielsweise Aminopyrin,³⁸⁴ Progesteron³⁸⁵ und Spirosulfonamid.³⁸⁶ Des Weiteren werden einige CYP2D6-Substrate durch N-Dealkylierung oxidiert, beispielsweise

Deprenyl^{387,388} und Fluoxetin¹⁸⁴. Es wurde postuliert, dass Phe481 an der Bindung von Aminen beteiligt ist, die N-dealkyliert werden.¹⁸⁴ Positionsgerichtete Mutageneseexperimente haben jedoch die Funktion dieser Aminosäure nicht bestätigt.³⁸⁹

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die regioselektive Oxidation von CYP2D6-Substraten nur durch die Reaktivität der Substratpositionen und die Zugänglichkeit der Hämgruppe beeinflusst wird. Interaktionen mit dem Enzym spielen dabei keine Rolle. Eine Analyse des verwendeten Validierungsdatensatzes zeigt, dass dieser sowohl „klassische“ CYP2D6-Substrate mit basischem Stickstoffatom (z. B. Propafenon), Substrate ohne Stickstoff (z.B. Warfarin) als auch Substrate, bei denen CYP2D6-katalysierte N-Dealkylierungen auftreten (Bsp: Fluoxetin), enthält. Für all diese Substrate können anhand des entwickelten Regioselektivitätsmodells die experimentell beobachteten Metabolite erfolgreich vorhergesagt werden. Für das Substrat Fluoxetin ist beispielsweise, unter Berücksichtigung des Pharmakophormodells, die para-Position des aromatischen Ringes die wahrscheinlichste Metabolisierungsposition.¹⁸⁴ Dieser Metabolit ist jedoch bisher experimentell nicht nachgewiesen worden. CYP2D6 katalysiert jedoch die N-Demethylierung von Fluoxetin³⁹⁰ was in Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit entwickelten Modell steht. Auch für die Substrate Deprenyl, Aminopyrin, Progesteron und Spirosulfonamid können die experimentell beobachteten Metabolite mit dem hier entwickelten Regioselektivitätsmodell erklärt werden.

Eine Vielzahl der CYP2D6-Substrate weist neben dem basischen Stickstoffatom einen aromatischen Rest auf. Modellierungen führten zu der Hypothese, dass Phe120 an der Bindung des aromatischen Restes der Substrate über π - π -Wechselwirkungen beteiligt ist.^{194,383,391} Die Mutation von Phenylalanin zu Alanin zeigt einen Einfluss auf die Regioselektivität des Dextromethorphan-Metabolismus und führt zu einem Anstieg des N-Demethyl-Produktanteils des Dextromethorphan-Metabolismus.³⁹² Neben den Interaktionen mit aromatischen Resten wurden vor allem auch sterische Effekte vermutet. Die Analyse der Bindetasche von CYP2D6 zeigt, dass Phe120 im Bereich des rigiden Zugangskanals zur Hämgruppe liegt und die Mutation der sperrigen Aminosäure Phenylalanin zu Alanin den Zugangskanal vergrößert. Durch die bessere Zugänglichkeit der Hämgruppe kann es zu einem Anstieg des N-Demethyl-Produktanteils des Dextromethorphan-Metabolismus kommen. Dies steht im Einklang mit dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Regioselektivitätsmodell.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein einfaches, generelles und prädiktives Modell zur Regioselektivität der beiden bedeutendsten P450-Enzyme CYP3A4 und CYP2D6 erstellt werden und erfolgreich an einem Datensatz aus Literaturdaten validiert werden. Unter Berücksichtigung der intrinsischen Reaktivität und Zugänglichkeit der einzelnen Substratpositionen und der Zugänglichkeit der Isoenzyme konnte ein rationales Modell erstellt werden. Dieses Modell beruht im Gegensatz zu empirischen Modellen, wie dem kürzlich von Sheridan *et al.* veröffentlichten QSAR-Ansatz,³⁰¹ auf den molekularen Grundlagen der Regioselektivität und enthält damit Informationen über den Mechanismus der Regioselektivität (Warum wird eine bestimmte Position metabolisiert?). Durch die Verwendung des *RDF*-Deskriptors zu Quantifizierung der intrinsischen Zugänglichkeit der Substratome kann zusätzlich auch die Form des Substrates berücksichtigt werden. Das Modell ist nicht auf einen Reaktionsmechanismus beschränkt, sondern es können sowohl aliphatische als auch aromatische Hydroxylierungen berücksichtigt werden. Durch die Verwendung einer einfachen Reaktivitätsreihe ist es möglich, die Reaktivität beliebiger Substratpositionen ohne aufwendige QM-Berechnungen abzuschätzen. Die Flexibilität der P450-Enzyme führt zu keiner Einschränkung des Modells, da gezeigt werden konnte, dass der für die Regioselektivität als entscheidend identifizierte Kanal zwischen der Bindetasche und der Hämgruppe äußerst rigide ist. Das Modell beschäftigt sich ausschließlich mit der Fragestellung der Regioselektivität des Metabolismus. Die Frage der Isoformspezifität (von welchem CYP wird ein Substrat umgesetzt?) wird dabei nicht betrachtet. Das Modell der Regioselektivität kann später mit einem Modell der Isoformspezifität kombiniert werden. Die MetaSite-Methode versucht sowohl die Isoformspezifität als auch die Regioselektivität des Metabolismus eines Substrates zu berücksichtigen. Die Untersuchungen von Caron *et al.* zeigten jedoch, dass MetaSite am besten mit vorherigem experimentellen Wissen über die beteiligten CYPs funktioniert.¹⁸⁰ Für das vorliegende Regioselektivitätsmodell müssen keine Interaktionen des Substrates mit dem Enzym berücksichtigt werden und es ist damit unabhängig von Pharmakophormodellen und den Protonierungszuständen der Substrate und des Enzyms.

6.3 Untersuchung von genetischen Polymorphismen der Cytochrom P450-Monooxygenasen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass für Cytochrom P450-Monooxygenasen der Effekt von *SNPs* auf die Enzymaktivität mittels einer Konservierungsanalyse von Multisequenz-*alignments* der Subfamilien vorhergesagt werden kann. Darüber hinaus konnte anhand der beiden Beispiele, des murinen CYP21-Enzyms und eines neuen Allels des humanen CYP2D6, gezeigt werden, dass detaillierte Untersuchungen der molekularen Grundlagen der Effekte von Mutationen auf die Enzymaktivität durch die Analyse von Sequenz-Struktur-Funktion-Beziehungen möglich sind. Dabei können strukturelle Effekte auftreten, die Substratbindung, die Redoxpartner-Interaktionsoberfläche oder die Katalyse (z. B. der Elektronenfluss) können durch Mutationen beeinträchtigt werden, oder die Veränderung der Membran-Protein-Grenzfläche kann eine Rolle spielen.

6.3.1 Vorhersage des Effektes von Polymorphismen auf die Enzymaktivität

In der vorliegenden Arbeit konnte ein generelles und prädiktives Modell mit einfachen Regeln zur Vorhersage des Einflusses von Polymorphismen auf die Aktivität von Cytochrom P450-Monooxygenasen entwickelt werden. Das Modell beruht auf der familienspezifischen Konservierungsanalyse der P450-Subfamilien. Die Konservierungsanalyse von Aminosäuren in Multisequenz-*alignments* kann verwendet werden, um den Einfluss von Mutationen auf die Enzymaktivität zu untersuchen. Proteine innerhalb einer Superfamilie haben normalerweise das gleiche Faltungsmuster und besitzen ähnliche Funktionen. Diese strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten spiegeln sich in konservierten Mustern des *alignments* wider. Positionen, die funktionell oder strukturell bedeutsam sind, neigen dazu höher konserviert zu sein. Methoden zur Analyse der Konservierung von Aminosäuren in Multisequenz-*alignments* wurden für verschiedene Proteinfamilien angewandt, um ihre Rolle in der Erhaltung des Faltungsmusters und der Funktion zu analysieren.^{393,394} Die Konservierungsanalyse von Multisequenz-*alignments* wurde auch zur Vorhersage des Einflusses von *SNPs* auf die

Proteinfunktion verwendet.^{234,235} Dabei wurde die Sequenzähnlichkeit verwendet, um vorherzusagen, ob ein Aminosäureaustausch in einem Protein die Funktion beeinflusst. Die Methode basiert auf der Annahme, dass wichtige Aminosäuren innerhalb der Sequenz einer Proteinfamilie konserviert sind und Mutationen von Aminosäuren, die innerhalb einer Familie konserviert sind, die Proteinfunktion beeinflussen.

Für die vorliegende Untersuchung wurden *SNP*-Daten aus der humanen CYPAllel-Datenbank verwendet. Es gibt eine Reihe weiterer Datenbanken mit Informationen über *SNPs*.²¹⁴⁻²¹⁶

Diese Datenbanken enthalten allerdings normalerweise keine Daten über die funktionellen Auswirkungen der *SNPs*. Des Weiteren gibt es viele falschpositive Einträge durch Fehler bei der Sequenzierung und durch die kleine Schnittmenge der Informationen in den verschiedenen Datenbanken.^{217,218} Alle diese Faktoren limitieren die Verwendbarkeit dieser Datenbanken. Für die Untersuchungen wurden die für den Arzneimittelmetabolismus bedeutendsten Isoformen CYP2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 und 3A5 ausgewählt.¹⁵³ In der Datenbank sind alle bisher bekannten *SNPs* der humanen CYPs abgelegt. Für die Analyse wurden nur *nsSNPs* ausgewählt, die in codierenden Regionen der P450-Gene liegen. *nsSNPs*, die einen Einfluss auf das *splicing* haben, wurden nicht berücksichtigt. *nsSNPs*, deren Einfluss auf die Aktivität trivial ist, wurden bei der Analyse ebenfalls nicht berücksichtigt. Dazu zählen *nonsense* Mutationen, die zu einem Stoppcodon führen, und Deletionen, die einen *frameshift* verursachen. Sowohl *nonsense* Mutationen als auch Deletionen haben die Inaktivierung des Enzyms zur Folge. Für vier Allele von CYP2D6 (*2, *12, *17, *41A) wurden in der CYPAllel-Datenbank widersprüchliche Aktivitätsdaten annotiert. Diese vier Allele wurden deshalb für die Analyse nicht berücksichtigt. Es verbleiben 52 Allele, für die die funktionelle Auswirkung der Mutation bekannt ist. Für diese Varianten wurde eine familienspezifische Konservierungsanalyse durchgeführt. Neben der Konservierung wurde für jeden Aminosäureaustausch zusätzlich die Distanz aus der BLOSUM62-Matrix bestimmt.

Aufgrund der Konservierung und der BLOSUM-Distanzen konnten die Varianten in drei Klassen eingeteilt werden.

Die Klasse 1 enthält Varianten mit Mutationen an Positionen mit einer Konservierung $\geq 3,0$. Es befinden sich 42 Varianten in Klasse 1. Von diesen sind 41 Varianten (98 %) experimentell inaktiv. Dies entspricht der Erwartung, dass Mutationen an einer höher konservierten Position einen Einfluss auf die Proteinfunktion haben.

Die Klasse 2 enthält Varianten an Positionen mit einer Konservierung $< 3,0$ und einer BLOSUM-Distanz ≥ 1 . Die Klasse 2 enthält drei Varianten, die *in vitro* alle eine normale Enzymaktivität zeigen. D.h. Mutationen an Positionen mit einer geringeren Konservierung

(< 3,0) werden toleriert, wenn der Aminosäureaustausch zu einer ähnlichen Aminosäure hin erfolgt (BLOSUM-Distanz ≥ 1).

Die übrigen Varianten bilden die Klasse 3. Die Klasse 3 enthält Varianten an Positionen mit einer Konservierung < 3,0 und BLOSUM-Distanz < 1. Diese Klasse enthält sieben Varianten von denen drei aktiv und vier inaktiv sind. Mutationen an Positionen mit einer geringen Konservierung (< 3,0), die zu einem Aminosäureaustausch mit einer unähnlichen Aminosäure erfolgen (BLOSUM-Distanz < 1), werden in manchen Fällen toleriert und in anderen nicht toleriert. Die beiden Varianten CYP2C9.13 und 3A4.18 beinhalten beispielsweise beide den Aminosäureaustausch Leu gegen Pro (BLOSSUM62-Distanz: -3) an einer niedrig konservierten Position (2C9.13 (0,2) und 3A4.18 (0,4)). Während die Mutation von CYP3A4 toleriert wird, ist die Variante CYP2C9.13 inaktiv. Beim Austausch einer Aminosäure gegen eine unähnliche Aminosäure an einer nicht konservierten Position kann es zu lokalen Effekten in der Enzymstruktur kommen oder aber auch zu langreichweitigen Wechselwirkungen, die von dem Enzym nicht toleriert werden.

Ausgehend von dieser Analyse konnten einfache Regeln erstellt werden, anhand derer nun Vorhersagen für die Varianten mit unbekannter Enzymaktivität durchgeführt werden können. Mutationen an Positionen mit einer Konservierung $\geq 3,2$ werden nicht toleriert (Klasse 1). Mutationen an Positionen mit einer Konservierung < 3,0 und einer BLOSUM-Distanz ≥ 1 werden toleriert (Klasse 2). Für Mutationen an Positionen mit einer Konservierung < 3,0 und einer BLOSUM-Distanz < 1 kann der Effekt der Mutation nicht vorhergesagt werden (Klasse 3).

In der CYPAllel-Datenbank liegen 95 Allele mit nsSNPs vor, deren Enzymaktivität bisher nicht bestimmt wurde. Anhand der aufgestellten Regeln konnten diese Allele klassifiziert und ihr Effekt auf die Enzymaktivität vorhergesagt werden. Die Klasse 1 beinhaltet 57 Varianten, die als aktiv vorhergesagt werden, die Klasse 2 enthält zwölf Varianten, deren Enzymaktivität inaktiv vorhergesagt wird. Für Varianten der Klasse 3 kann keine eindeutige Vorhersage über den Einfluss auf die Enzymaktivität getroffen werden. Dies betrifft in der vorliegenden Untersuchung 26 Varianten. Von den 95 Varianten mit bisher nicht bestimmter Enzymaktivität konnte für 69 Varianten (73 %) eine Vorhersage durchgeführt werden. Dies ist eine große Hilfestellung beispielsweise für die Auswahl von Varianten für experimentelle Studien.

Die richtige Auswahl der Sequenzen der einzelnen Subfamilien ist eine entscheidende Voraussetzung für die familienspezifische Analyse. Neben einer vollständigen Sammlung aller bekannten P450-Sequenzen ist vor allem eine eindeutige Klassifikation der Sequenzen in Familien und Subfamilien Voraussetzung für derartige familienspezifische Untersuchungen.

Durch die institutseigene CYPED-Sequenzdatenbank steht eine relationale Datenbank mit einer entsprechenden Klassifikation der P450-Superfamilie zur Verfügung, die derartige Untersuchungen erst ermöglicht.⁴⁴

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die alleinige Betrachtung des Konservierungswertes nicht ausreicht, um alle Mutationen zu erklären. Die Allele CYP2B6*6, *7 und *4 beinhalten die Mutation K262R an einer hoch konservierten Position (4,6) und die Allele CYP2C19*1, *11, *14, *15, *18, *19 beinhalten die Mutation I311V, ebenfalls an einer hoch konservierten Position (3,7). Trotz der Mutation an einer hoch konservierten Position bleibt die Enzymfunktion erhalten. Die Analyse der Aminosäuren an den entsprechenden Positionen in den Multisequenz-*alignments* der Subfamilien zeigt, dass durch die Mutation die an dieser Position eine hoch konservierte Aminosäure eingeführt wird und dadurch die Konservierung erhalten bleibt. Neben dem Konservierungswert müssen also auch die an der Position vorhandenen Aminosäuren im *alignment* berücksichtigt werden.

Es gibt verschiedene Ansätze zur Vorhersage des Einflusses von nsSNPs und die Methoden verwenden unterschiedliche Eigenschaften, um den Einfluss einer Mutation vorherzusagen.²²⁵

Neben sequenzbasierten Ansätzen^{234,235} wurden Methoden entwickelt, die auch Strukturfaktoren mit einbeziehen.²³² Es sind zwei webbasierte Methoden zur Vorhersage der Einflüsse von Varianten verfügbar, PolyPhen²³⁷ und SIFT²³⁵. PolyPhen verwendet zur Vorhersage, ob ein nsSNP die Proteinfunktion beeinflusst, eine umfangreiche Auswahl an Eigenschaften (sequenzbasierte, evolutionäre und strukturelle) und arbeitet am besten, wenn Strukturinformationen verfügbar sind. SIFT kann online zur Vorhersage intoleranter Mutationen verwendet werden und arbeitet mittels positionsspezifischer Informationen, die aus Sequenz-*alignments* abgeleitet werden. SIFT benötigt dazu nur die Aminosäuresequenz des Enzyms und Sequenzen von homologen Proteinen. Darüber hinaus gibt es Datenbanken wie SNPeffect²³⁸ und SNPs3D²³⁹, die den Effekt von codierenden nsSNPs untersuchen. Im Gegensatz zu diesen webbasierten, automatisierten Analysen liegt der Vorteil der in dieser Arbeit verwendeten Methode in der spezifischen Analyse für die Cytochrom P450-Superfamilie. Erst die Verwendung der institutseigenen CYPED-Sequenzdatenbank mit der umfangreichen Anzahl an Sequenzen und der eindeutigen Klassifikation in die einzelnen Familien und Subfamilien ermöglichte die familienspezifischen Konservierungsanalysen und eine Klassifikation der Varianten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass neben dem Konservierungswert auch der Aminosäureaustausch und die an der Position vorhandenen Aminosäuren im *alignment* berücksichtigt werden müssen.

Die vorliegende Untersuchung ist die erste systematische Analyse des Einflusses von *SNPs* auf die Enzymfunktion von CYPs des xenobiotischen Metabolismus. Bisher gab es nur vereinzelte Untersuchungen, von Polymorphismen in einzelnen P450-Genen. Mornet *et al.* haben beispielsweise die Rolle von *missense* Mutationen im humanen CYP21-Gen untersucht³⁹⁵ und Tsigelny *et al.* haben die Struktur-Funktions-Beziehungen von *SNPs* untersucht, die CYPs des Östrogen-Metabolismus betreffen.³⁹⁶

6.3.2 Untersuchung der Sequenz-Struktur-Funktions- Beziehungen von Varianten des murinen CYP21-Enzyms

Die Steroid-21-Hydroxylase (CYP21) spielt eine Schlüsselrolle in der Nebennierenrindens-steroidsynthese. Eine unzureichende Aktivität dieses Enzyms, die durch verschiedene Genveränderungen verursacht werden kann, ist für eine der häufigsten angeborenen Fehlfunktionen im Stoffwechsel des Menschen verantwortlich.¹⁴¹

Bisher ist keine experimentell bestimmte 3-D-Struktur eines Säugetier Cyp21-Enzyms verfügbar. Für das humane CYP21-Protein sind zwei Strukturmodelle veröffentlicht basierend auf der Struktur der bakteriellen P450-Enzyme P450cam³⁹⁷ bzw. P450 BM-3.³⁹⁵ Modelle von Säugetier-P450 auf der Grundlage von bakteriellen P450 sind von begrenzter Anwendbarkeit. Röntgenstrukturanalysen^{14,276-278} offenbarten signifikante strukturelle Unterschiede zwischen Säugetier- und bakteriellen P450-Enzymen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das 3-D-Modell des murinen CYP21-Proteins ausgehend von Strukturen der Säugetier-P450 erstellt. Dieses Modell wurde dann verwendet, um den Einfluss einzelner Mutationen auf die Enzymaktivität zu untersuchen. In dem *alignment*, das zur Homologiemodellierung verwendet wurde, liegen funktionell wichtige Aminosäuren, die in Cytochrom P450-Enzymen hoch konserviert sind, an übereinstimmenden Positionen im *alignment*. Dies belegt, dass das *alignment*, der entscheidende Schritt beim Erstellen eines Homologiemodells, zuverlässig über die gesamte Sequenz erstellt wurde. Um den Einfluss von Mutationen auf die Enzymaktivität zu verstehen, wurde als weiterer Ansatz eine Konservierungsanalyse der Aminosäurepositionen in dem Multisequenz-*alignment* der Subfamilie CYP21A und CYP17A durchgeführt. Durch Kombination der Konservierungsanalyse mit der Analyse der Position der Mutationen in der Proteinstruktur war es möglich, die Mutationen aufgrund ihrer Effekte auf die Enzymaktivität in drei Klassen einzuteilen:

Klasse-I-Mutationen

Da die Aminosäure Glutamin an Position 238 im Cyp21-Protein der BALB/c Mäuse vorkommt, handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen *silent* Polymorphismus.²⁷⁵ Obwohl sich die Aminosäure in einem Teil der Helix F befindet, der die Substratbindetasche formt, scheint der Aminosäureaustausch R238Q die Architektur des Enzyms nicht zu beeinflussen und die *in vitro*-Aktivität beider Proteine ist ähnlich.³⁵ Sowohl der pseudogenspezifische Aminosäureaustausch R361K als auch der Austausch A362V zeigen eine Restenzymaktivität.

Entsprechend dem 3-D-Modell liegen die Aminosäuren R361 und A362 innerhalb der β -Faltblattdomäne. Die β -Faltblattdomäne befindet sich auf der Proteinoberfläche und weist keinen Kontakt zu katalytisch wichtigen Aminosäuren auf.^{35,122} Die Position der Aminosäuren in Kombination mit einem unbedeutenden Aminosäureaustausch (Arginin zu Lysin an Position 361 und Alanin zu Valin an Position 362) trägt zu der verbleibenden Aktivität der Varianten bei. Die beiden Varianten P458L and P465L wurden ebenfalls in dem Pseudogen *Cyp21a2-p* gefunden.²⁷⁵ Die beiden Punktmutationen liegen beide in dem β -turn, der die SRS6 enthält und an der Substratspezifität beteiligt ist.³⁹⁸ In dem dreidimensionalen Modell ist jedoch keine der Mutationen in Kontakt mit der SRS6 und alle Varianten zeigen folglich 21-Hydroxylase Aktivität. Alle fünf Aminosäuren zeigen eine geringe Konservierung. Dies ist konsistent mit dem geringen Einfluss auf die Enzymaktivität.

Klasse-II-Mutationen

Die beiden Mutationen R346H und R400C inaktivieren die Proteinfunktion aufgrund ineffizienten Elektronenflusses zur Hämgruppe. Die erste Variante geht aus dem Pseudogen hervor, die zweite Mutation ist eine *de novo* Mutation. Beide Mutationen liegen in dem Motiv der ERR-Triade des 21-Hydroxylase-Proteins. Die murine Aminosäure R346 entspricht der humanen Aminosäure R354.³⁹⁹ Übereinstimmend mit dem Verlust der Aktivität für die murine R346H-Mutante sind zwei inaktivierende Aminosäureaustausche der Aminosäure R354 beim Menschen beschrieben.^{400,401} Die murine Aminosäure R400 entspricht der Aminosäure R408 in dem humanen CYP21-Protein.³⁹⁹ Der Austausch von Arginin durch Cystein (R408C) ist für zwei Geschwister mit der *salt wasting* Form der 21-Hydroxylase-Defizienz beschrieben.⁴⁰² Die Autoren folgern aus der Kombination von R408C mit einer inaktivierenden *splice-site*-Mutation, dass R408C zu einem starken Rückgang der Enzymaktivität führt. Dieser Befund stimmt mit der fehlenden Aktivität der murinen R400C-Mutante überein. Aus dem vorliegenden Homologiemodell ergibt sich, dass R346 und R400 Teil des ERR-Motivs sind.⁴⁰³ Des Weiteren ist R346 Teil des hochkonservierten EXXR-Motivs. Das EXXR-Motiv bildet zusammen mit Aminosäuren des *meander-loops* eine Gruppe geladener Aminosäuren auf der proximalen Seite des Proteins, die ein Wasserstoffbrückennetzwerk ausbilden und die Proteinstruktur stabilisieren.⁴⁰³ Das EXXR-Motiv ist in der P450-Superfamilie hoch konserviert und alle Mutationen einer der Aminosäuren des ERR-Motivs, die bisher in verschiedenen P450-Enzymen beschrieben wurden, führten zu einem kompletten Verlust der Aktivität.⁴⁰⁴⁻⁴⁰⁸ Dies steht in Übereinstimmung mit dem Einfluss der Mutationen R346H und R400C auf das murine CYP21-Enzym.

Klasse-III-Mutationen

Bei den Mutationen I462F, L464F und Q470X scheint es sich um *de novo* Mutationen zu handeln, die in dem Pseudogen nicht nachweisbar sind. Diese zusätzlichen Mutationen befinden sich ebenfalls in der β -turn-Region im SRS6-Bereich. Für das humane CYP21A2-Gen sind keine entsprechenden Variationen beschrieben. Die hohen Konservierungswerte der Aminosäuren I462, L464 und Q470 unterstreichen die Bedeutung der SRS6 für die Enzymaktivität. Variationen der konservierten Aminosäuren I462 und L464, die sich in der SRS6 befinden, scheinen die SRS6 komplett zu inaktivieren, während Veränderungen in weniger konservierten Bereichen, wie beispielsweise P465 in derselben Region der Proteinstruktur, die Enzymaktivität nicht beeinflussen. Das vorzeitige Stoppcodon an der konservierten Position Q470 innerhalb des β -turn inaktiviert das Enzym komplett. Dies steht in Übereinstimmung mit verschiedenen carboxyterminalen Stopp-Mutationen im humanen CYP21 Enzym.^{409,410} Alle Mutationen der Klasse II und III zeigen hohe Konservierungswerte. Dies ist konsistent mit ihrer Position in funktionell wichtigen Regionen und einem deutlichen Rückgang der 21-Hydroxylase Aktivität.

Die Kombination der molekularen Modellierung mit der positionsspezifischen Mutagenese ist eine nützliche Methode, um die Rolle einzelner Mutationen zu untersuchen. Das hier erstellte Homologiemodell des murinen Cyp21 bietet eine gute Grundlage für weitergehende Untersuchungen der Effekte von Polymorphismen auf die Aktivität des Enzyms.

6.3.3 Molekulare Ursache des kompletten Funktionsverlusts der natürlichen CYP2D6-Variante R441C / systematische Analyse der Hämbindung in den P450-Strukturen

Durch die Analyse der Proteinstruktur von CYP2D6, das *in vitro* gemessenen CO-Differenzspektrum und die Enzymaktivitäten konnte gezeigt werden, dass R441 eine wichtige Rolle in der Hämbindung spielt und eine Mutation an dieser Position die Bindung und den Einbau der Hämgruppe beeinflussen kann. Die systematische Analyse aller bekannten P450-Strukturen hat gezeigt, dass es sich bei dieser Position um die einzige absolut konservierte Aminosäureposition handelt, die mit den Propionatresten der Hämgruppe interagiert. Dies deutet darauf hin, dass diese Position eine besondere Bedeutung über die Bindung der Hämgruppe hinaus hat.

Aus der Struktur des Komplexes der P450 BM-3-Hämdomäne mit der FMN-Bindedomäne der Reduktase von P450 BM-3 ist bekannt, dass die FMN-Domäne mit der C- und L-Helix und der Cysteinat-Häm-Ligandenschleife interagiert.³³ Das Peptid mit den korrespondierenden Aminosäuren L421-C433 (CYP2D6) stellt einen direkten *through-bond* Elektronentransferweg vom FMN zum Häm zur Verfügung. Alternativ ist ein Elektronenfluss durch *space jumps* über die *backbone*- und Seitenkettenatome verschiedener Aminosäuren einschließlich Arg441 (CYP2D6) möglich. Des Weiteren wurde die Interaktion der Hämpropionatgruppen mit dem Protein mittels FT-IR-Spektroskopie untersucht. Kariakin *et al.* konnten für die isolierte Domäne von P450 BM-3 und den Komplex mit der FMN-Domäne unterschiedliche Protonierungszustände der Carboxylatgruppen der Hämpropionate nachweisen.⁴¹¹ Mindestens eine der Wasserstoffbrücken zwischen den Propionaten und dem Apoprotein scheint bei der Interaktion der FMN-Domäne mit der Hämdomäne gespalten zu werden. Die Kristallstruktur des P450 BM-3/FMN-Komplexes deutet darauf hin, dass es sich dabei um die Wasserstoffbrücke zu der dem Arg441 (CYP2D6) entsprechenden Aminosäure handelt.⁴¹¹ Eine kurzzeitige Spaltung der Wasserstoffbrücke scheint die Struktur des Proteins nicht zu destabilisieren. Die Spaltung der Wasserstoffbrücke infolge der Interaktion mit der Reduktase deutet darauf hin, dass eine Konformationsänderung der Aminosäure Arg411 für den Elektronentransfer zur Hämgruppe erforderlich ist.

Elektronenspinresonanzspektroskopische Untersuchungen von P450cam (CYP101) zeigten ebenfalls Hinweise auf die Beteiligung der Propionatgruppen am intramolekularen

Elektronentransfer.⁴¹² QM/MM Untersuchungen von P450cam zeigten, dass die Interaktionen der Propionatgruppen mit dem Protein wichtig zur Stabilisierung des Übergangszustandes sind.^{324,413} In den Kristallen der katalytischen Intermediate von P450cam kann man Unterschiede zwischen dem aktiven Protein mit gebundenen Sauerstoffliganden und dem Protein ohne Sauerstoffliganden beobachten. Die Abstände der Propionatgruppen zu den interagierenden Aminosäuren des Proteins unterscheiden sich.⁴¹⁴ Es gibt weitere Hinweise auf die Bedeutung der Hämpropionate für den Elektronentransport in CYP101. Mit der Bindung der Putidaredoxin-Reduktase wurden strukturelle Änderungen beobachtet und diese Konformationsänderungen könnten an dem Elektronentransfer beteiligt sein.⁴¹⁵⁻⁴¹⁷ Änderungen im IR-Spektrum konnten Umlagerungen der Propionat-Salzbrücken zugeordnet werden.^{418,419} Darüber hinaus gibt es, durch Kombination von theoretischen Untersuchungen und Mutagenesestudien, Hinweise darauf, dass das Elektron von der Reduktase zum Arg112 wandert, welches an der Interaktion zu den Hämpropionaten beteiligt ist.⁴²⁰

Diese zahlreichen Studien, die sich sowohl auf experimentelle als auch theoretische Beobachtungen stützen, zeigen die aktive Rolle der Hämpropionate in der Regulation des Elektronenflusses zum Eisenatom der Hämgruppe und in der Regulation der biochemischen Eigenschaften der Hämgruppe.⁴²¹ All diese Studien zeigen, dass die Propionatgruppen nicht nur als Ankerpunkt für die Hämbindung dienen, sondern aktiv die elektronischen Eigenschaften beeinflussen. So könnten die schwachen Interaktionen zwischen den Propionatgruppen und dem Apoprotein in CYP8A1 ein Grund für die unzulängliche Monooxygenaseaktivität des Proteins sein. Theoretische Berechnungen haben gezeigt, dass diese Interaktionen entscheidend für die Abstraktion des Wasserstoffatoms aus dem Substrat durch *compound I* sind, der letzten Stufe der Hydroxylierung.³²⁴

In dem P450-Enzym CYP1A2 aus der Ratte wurde eine Reihe von Aminosäuren identifiziert, die eine Rolle in der Reduktaseinteraktion spielen.⁴⁰⁷ Interessanterweise gehören dazu die Aminosäuren Leucin und Arginin, welche direkte Nachbarn der hier untersuchten Position 441 sind. Die PM-Variante CYP2D6.31 (R440H) betrifft ebenfalls eine dieser Positionen und es konnte gezeigt werden, dass die Mutation die Interaktion mit der FMN-Domäne der Reduktase stört.⁴²²

Es deutet viel darauf hin, dass die Aminosäure Arg441 in CYP2D6 ebenfalls sowohl für die Hämstabilisierung als auch für den Elektronentransport wichtig ist. Aus diesem Grund ist eine positiv geladene Aminosäure an dieser Position in vielen CYP-Familien hochkonserviert. Interessanterweise ist eine entsprechende Aminosäure nicht in der kompletten CYP-

Superfamilie konserviert, wie man anhand des PROSITE-*pattern* erkennt. Enzyme, die an dieser Position keine positiv geladene Aminosäure aufweisen, wie beispielsweise die CYP7a-Hydroxylase,²⁸³ welche ein Threonin an der entsprechenden Position aufweist, müssen einen anderen Elektronentransferweg zur Hämgruppe aufweisen und einen anderen Mechanismus der Hämstabilisierung. Offensichtlich unterscheiden sich die Wege des Elektronentransfers in den einzelnen P450-Familien und es kommt zu familienspezifischem Elektronentransfer.

Bei CYP2D6*62 (R441C) handelt es sich um ein seltenes, natürlich vorkommendes Nullallel von CYP2D6. R441 scheint essentiell für die Hämbindung und die enzymatische Funktion von CYP2D6 zu sein. Die Rolle der Aminosäure in anderen P450-Monooxygenasen scheint abhängig von der Sequenz zu sein und kann die Störung der Interaktion mit der P450-Reduktase beinhalten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Vorhersage des Einflusses der Mutationen nur aufgrund familienspezifischer Analysen möglich ist. Anhand des PROSITE-*pattern* der Superfamilie können die Effekte der Mutationen nicht erklärt werden.

7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden computergestützte Modelle zur Selektivität und Aktivität von P450-Monooxygenasen und dem Einfluss von Mutationen auf diese entwickelt. Die Arbeit konzentrierte sich auf zwei P450-Monooxygenase-Systeme, die bakterielle P450-Monooxygenase P450 BM-3 (CYP102A1) und die humanen P450-Enzyme des xenobiotischen Metabolismus.

Cytochrom P450 BM-3 ist ein interessantes Enzym für biotechnologische Anwendungen. Aufgrund der Fähigkeit zur selektiven Oxidation von chemischen Verbindungen ermöglicht P450 BM-3 interessante Anwendungen in der Enzymkatalyse im Bereich der „weißen Biotechnologie“.⁴²³⁻⁴²⁵ Darüber hinaus gewinnt P450 BM-3 als Modellsystem für humane P450-Monooxygenasen im Bereich der „roten Biotechnologie“ zunehmend an Bedeutung.^{426,427} Einige aktuelle Arbeiten zeigen, dass P450 BM-3 durch Mutationen Aktivitäten gegenüber typischen humanen P450-Substraten aufweist.⁴²⁸⁻⁴³⁰ Das Verständnis von Aktivität und Selektivität von P450-Monooxygenasen auf molekularer Ebene ist eine wichtige Voraussetzung für das rationale Proteindesign und die Verbesserung der Enzyme in Hinblick auf Aktivität, Spezifität und Selektivität. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Kombination von MD-Simulationen mit den intrinsischen Reaktivitäten der möglichen Hydroxylierungspositionen der Substrate die Aktivität, Regio- und Stereoselektivität der Hydroxylierungsreaktion vorhergesagt werden kann. Die Untersuchung der molekularen Grundlagen der Aktivität und Regioselektivität ergab zwei wesentliche Einflüsse: die intrinsische Reaktivität der einzelnen Positionen des Substrates und die Zugänglichkeit der reaktiven Hämgruppe in der Bindetasche des P450-Enzyms. Dieses Ergebnis war der Ausgangspunkt für die Untersuchungen zur isoformspezifischen Regioselektivität von humanen P450-Monooxygenasen.

Humane P450-Monooxygenasen spielen eine zentrale Rolle im Metabolismus der Xenobiotika und der Metabolismus ist ein zentraler Schritt im ADME-Ablauf eines Wirkstoffes und zugleich eine der kompliziertesten pharmakokinetischen Eigenschaften. Die Vorhersage des bei Reaktion mit einem bestimmten Isoenzym zu erwartenden Metaboliten

wäre eine große Hilfe für die Wirkstoffentwicklung. Wie für P450 BM-3 gezeigt werden konnte, ist es möglich, die Regioselektivität von P450-katalysierten Reaktionen mittels molekulardynamischer Simulationen zu untersuchen. Derartige Untersuchungen sind jedoch zu rechen- und zeitaufwändig, um sie für eine große Anzahl von Substraten durchzuführen. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, die molekularen Grundlagen der Regioselektivität zu analysieren und daraus einfache Regeln zu entwickeln, mit deren Hilfe dann der Metabolismus beliebiger Substrate vorhergesagt werden kann. Es konnte ein einfaches, generelles und prädiktives Modell zur Regioselektivität der beiden bedeutendsten P450-Enzyme CYP3A4 und CYP2D6 erstellt werden und erfolgreich an einem Datensatz aus Literaturdaten validiert werden. Unter Berücksichtigung der intrinsischen Reaktivität und Zugänglichkeit der einzelnen Substratpositionen und der Zugänglichkeit der Isoenzyme ist es möglich, die Metabolisierungsposition von CYP2D6- und CYP3A4-Substraten vorherzusagen. Das Modell beschäftigt sich ausschließlich mit der Fragestellung der Regioselektivität des Metabolismus. Die Frage der Isoformspezifität (von welchem CYP wird ein Substrat umgesetzt?) wird dabei nicht betrachtet. Es handelt sich um verschiedene Fragestellungen, die unterschiedliche Herangehensweisen verlangen.¹⁸⁰ Das Regioselektivitätsmodell wird aktuell auf die beiden Isoenzyme CYP2C9 und CYP2B6 erweitert und in einer Zusammenarbeit mit der Firma Molecular Networks GmbH^[4] mit einem dort entwickelten Modell der Isoformspezifität³⁰² zu einem gemeinsamen Gesamtmodell zur Vorhersage der Isoformspezifität und der Regioselektivität kombiniert. Einen bedeutenden Einfluss auf den Metabolismus von Arzneimitteln haben Polymorphismen in den Genen der humanen Cytochrom P450-Monooxygenasen. Es sind eine Vielzahl von *SNPs* bekannt. Für einen Großteil der Allele ist jedoch keine Information über den Einfluss auf die Enzymaktivität verfügbar. Aufgrund der Bedeutung möglicher funktioneller Effekte der Allele für den Arzneimittelmetabolismus besteht ein großes Interesse an der Vorhersage des Einflusses von Mutationen auf die Enzymaktivität. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass für Cytochrom P450-Monooxygenasen der Effekt von *SNPs* auf die Enzymaktivität mittels einer Konservierungsanalyse von Multisequenz-*alignments* der Subfamilien vorhergesagt werden kann. Darüber hinaus konnte anhand der beiden Beispiele, des murinen CYP2I1-Enzyms und eines neuen Allels des humanen CYP2D6, gezeigt werden, dass detaillierte Untersuchungen der molekularen Grundlagen der Effekte von Mutationen auf

⁴ Prof. Dr. Johann Gasteiger, Molecular Networks GmbH, Henkestraße 91, 91052 Erlangen, Germany

die Enzymaktivität durch die Analyse von Sequenz-Struktur-Funktion-Beziehungen möglich sind. Dabei können strukturelle Effekte auftreten, die Substratbindung, die Redoxpartner-Interaktionsoberfläche oder die Katalyse (z. B. der Elektronenfluss) können durch Mutationen beeinträchtigt werden, oder die Veränderung der Membran-Protein-Grenzfläche kann eine Rolle spielen.

Die Berücksichtigung der verschiedenen P450-Isoformen mit ihren unterschiedlichen Regioselektivitäten einerseits und des Einflusses von Polymorphismen auf den Metabolismus andererseits, führt zu einer hohen kombinatorischen Komplexität des Metabolismus einer Substanz.⁴³¹ Die beiden in der vorliegenden Arbeit entwickelten Modelle, das isoformspezifische Regioselektivitätsmodell und das Modell zur Vorhersage des Einflusses von *SNPs* auf die Funktion von P450-Enzymen, können im *in silico* Wirkstoff-*screening* eingesetzt werden. In der frühen Phase der Medikamentenentwicklung sind schnelle und einfache Methoden nötig, zur Implementierung als Filter und zur Anreicherung von Bibliotheken, beim *screening* nach Wirkstoffkandidaten (Abbildung 77).^{171,432}

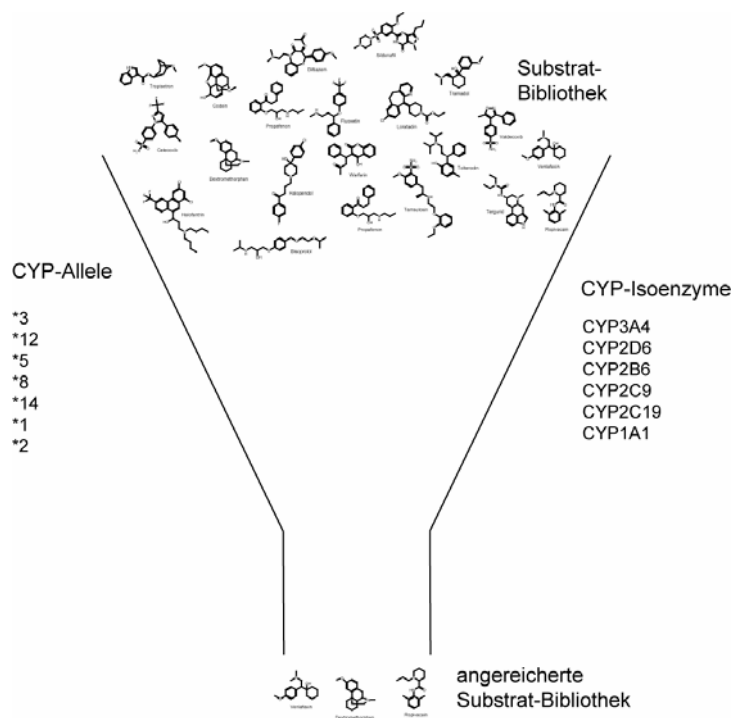


Abbildung 77: Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Modelle können als Filter zur Anreicherung von virtuellen Substratbibliotheken beim *in silico*-*screening* verwendet werden.

Später, wenn einzelne Wirkstoffkandidaten und präzise experimentelle Daten vorhanden sind, können dann auch molekulare Modellierungen auf Basis umfangreicher Struktur-Sequenz-Funktions-Untersuchungen durchgeführt werden, wie es in der vorliegenden Arbeit für ausgewählte Beispiele gezeigt werden konnte. Es können beispielsweise Enzym-Substrat-Wechselwirkungen unter Verwendung molekulardynamischer Simulationen durchgeführt werden, oder der Einfluss von *SNPs* auf die Struktur und/oder Funktion des Enzyms kann durch molekulare Modellierung untersucht werden.

8 Material und Methoden

8.1 Theoretische Arbeiten

8.1.1 Verwendete Software und Datenbanken

Tabelle 28: Übersicht über die verwendete Software und Datenbanken.

Software / Datenbank	Verwendung	URL	Referenz
Software			
Al2CO	Sequenzkonservierungs-Analyse		433
AMBER 7	Molekulardynamische Simulationen		434
AutoDock 3	<i>Docking</i>		435
BLAST	Suche nach homologen Sequenzen		436
CLUSTALW	Multisequenz- <i>alignment</i>		437
DeepView	Visualisierung von Proteinstrukturen		438
SwissPDBViewer			
Gaussian98	<i>Ab initio</i> Berechnungen		439
LIGPLOT	Visualisierung von Protein-Ligand Interaktionen		288
MCCE	Berechnung von pK_a -Werten der Aminosäuren		440
Modeller 6v2	Homologie-Modellierung		441
PETRA	Berechnung physikochemischer Eigenschaften von Molekülen		252,253
PROSA 2003	Qualitätskontrolle von Homologiemodellen		442
PyMOL	Visualisierung von Proteinstrukturen		443
T-Coffee	Multisequenz- <i>alignment</i>		444
VMD	Visualisierung von Proteinstrukturen		445
VOIDOO	Bindetaschenanalyse von Proteinstrukturen		357

Datenbanken

CYPED	P450-Sequenzdatenbank	http://www.cyped.uni-stuttgart.de/	44
NCBI	Sequenz-/Literaturrecherche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	
PDB Protein Data Bank	Proteinstruktur-Datenbank	http://www.pdb.org/	15
PROSITE	Proteindomänen-Datenbank	http://www.expasy.ch/prosite/	21
PubChem	Datenbank organischer Verbindungen	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/	
SWISS-PROT	Proteinsequenz-Datenbank	http://expasy.org/sprot/	446

8.1.2 Eingesetzte Hardware

Sämtliche Simulationen wurden auf dem institutseigenen BioCortex PC-*cluster* ("*biology by computational research techniques and experiments*") durchgeführt. Es handelt sich um einen Linux-*cluster* mit 128 *nodes* und 256 Prozessoren.

8.1.3 Molekulares *docking*

Ein zentrales Prinzip, auf dem letztlich sämtliche Prozesse in lebenden Organismen beruhen, ist die molekulare Erkennung (*molecular recognition*). Unter molekularer Erkennung versteht man die zeitweilige (nicht kovalente), bzw. die permanente (kovalente) Bindung zweier Moleküle aneinander. Grob unterschieden wird dabei nach der Größe der beteiligten Bindungspartner. Zum einen beobachtet man die Anlagerung zweier Proteine aneinander (Protein-Protein-*docking*). Zum anderen kommt die Anlagerung einer niedermolekularen Substanz an ein Protein in vielfältiger Weise vor (Protein-Ligand-*docking*). Moleküle erkennen einander anhand ihrer Oberflächen- und Feld-Eigenschaften. Die Anlagerung zweier Moleküle ist erfolgreich, falls eine gute Komplementarität bzw. Kompatibilität sowohl der Geometrie als auch der physikochemischen Eigenschaften gegeben ist.

8.1.3.1 Grundlagen des Protein-Ligand-*docking*

Wenn die Struktur eines Zielproteins bekannt ist, werden im rationalen Wirkstoffdesign meist *docking*-Methoden angewandt, um die Passgüte von Liganden zum Rezeptor zu bestimmen. Eine *docking*-Methode muss für einen Liganden zunächst den Bindungsmodus identifizieren um sodann die Komplementarität zwischen Ligand und Rezeptor bewerten zu können. Dabei sollte die Flexibilität des Liganden beachtet werden, weshalb Methoden benötigt werden, die den großen Suchraum möglicher Konformationen und Orientierungen (Konformationsraum)

effizient durchmustern. Außerdem muss eine geeignete Funktion (*scoring*-Funktion) zur Bewertung der vorgeschlagenen Geometrien angewandt werden, die im Idealfall auch für den relativen Vergleich der Passgüte unterschiedlicher Liganden geeignet sein sollte. Wichtige Voraussetzung für diese Schritte ist die Wahl einer geeigneten Strukturrepräsentation. Im Folgenden wird ein Überblick über die in gängigen *docking*-Methoden angewandten Verfahren gegeben.

8.1.3.2 Strukturrepräsentation des Konformationsraumes des Proteins

Die Art der Strukturrepräsentation spielt für die Wahl der zur Einpassung und Bewertung verfolgten Strategie eine entscheidende Rolle. Generell kann zwischen abstrakten Deskriptoren und atomarer Darstellung unterschieden werden, wobei häufig abstrakte Deskriptoren zur vereinfachten Beschreibung des Rezeptors angewandt werden. So wird das Bindetaschenvolumen beispielsweise im Programm DOCK⁴⁴⁷⁻⁴⁴⁹ durch Kugeln beschrieben, die mit geeigneten physikochemischen Eigenschaften besetzt sind. In GOLD^{450,451} werden Vektoren zur Repräsentation der gerichteten Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen als Startpunkt für das *docking* verwendet und in FlexX^{452,453} werden die funktionellen Gruppen der Bindungstasche durch Wechselwirkungspunkte mit assoziierten Wechselwirkungseigenschaften in Form von Kugeln, Kugelkappen, Kugelschichten oder sphärischen Rechtecken dargestellt. AutoDock^{435,454,455} repräsentiert die Bindetasche zwar in atomarer Auflösung, berechnet jedoch zunächst auf einem Gitter sterische und elektrostatische Wechselwirkungsenergien, die zur schnelleren Bewertung der gefundenen Orientierungen dienen.

8.1.3.3 Durchsuchen des Konformationsraumes

Verfahren zum Durchsuchen des Raumes möglicher Ligandenkonformationen und -orientierungen lassen sich grob in geometrische und kombinatorische Methoden sowie energiegetriebene Verfahren einteilen. In allen Fällen wird eine Bewertungsfunktion optimiert, welche die Bindungsenergie repräsentieren soll. Geometrische oder kombinatorische Methoden umfassen die Suche nach komplementären Kombinationen von Wechselwirkungszentren in *hash*-Tabellen (z. B. in FlexX), mittels Cliques-Such-Technik (DOCK) oder durch genetische Algorithmen (GOLD). Auf einer Energiefunktion beruhende Verfahren verwenden Minimierungsmethoden für starre Körper (DOCK) oder Monte-Carlo-

Methoden, häufig verbunden mit *simulated annealing* (z.B. AutoDock). In AutoDock ist neben der oben erwähnten Monte-Carlo-Methode auch ein genetischer Algorithmus implementiert.

8.1.3.4 Bewertungsfunktionen

Die meisten der genannten Methoden (z. B. GOLD, DOCK) verwenden zur Bewertung der erhaltenen Komplexe traditionelle Kraftfeldterme. Häufig werden diese direkt dem Kraftfeld AMBER⁴⁵⁶ oder CHARMM⁴⁵⁷ entnommen. Die Lennard-Jones- und Coulomb-Terme werden in einigen Ansätzen leicht abgewandelt, um beispielsweise in GOLD durch Verwendung eines 8-4-Potentials eine geringere sterische Abstoßung zu erreichen oder um durch Hinzufügen eines Terms für Wasserstoffbrückenbindungen diese Bindungen besser zu repräsentieren (z. B. in GOLD und AutoDock). In FlexX wird dagegen eine modifizierte Version der Bewertungsfunktion von Böhm⁴⁵⁸ verwendet, um durch die in den empirischen Termen enthaltenen entropischen Beiträge die Freie Bindungsenthalpie zu bewerten, anstatt lediglich Bindungsenergien zu berechnen. Dieser Versuch, freie Enthalpien zu berücksichtigen, liegt auch der von Gohlke *et al.*⁴⁵⁹ entwickelten wissensbasierten Bewertungsfunktion zugrunde. AutoDock benutzt ebenfalls empirische Terme zur Berechnung der freien Bindungsenthalpie.

8.1.3.5 Berücksichtigung der Flexibilität

Ein wichtiges Problem beim Einpassen von Liganden in Bindetaschen ist die Berücksichtigung der Flexibilität von Ligand und Rezeptor. Während die ersten *docking*-Programme (z. B. DOCK) sowohl Rezeptor als auch Ligand als rigide betrachtet haben, wird der Ligandenflexibilität von den meisten neueren Programmen entweder durch Vorberechnung möglicher Ligandenkonformationen (z. B. in neueren Versionen von Dock),⁴⁶⁰ durch Berücksichtigung der drehbaren Bindungen im Algorithmus (z. B. in GOLD und AutoDock) oder durch inkrementellen Aufbau des Liganden aus rigiden Fragmenten in der Bindetasche (z. B. in FlexX und einer weiteren neueren Dock-Version)⁴⁶¹ Rechnung getragen.

8.1.4 Vorbereitung und Durchführung der *docking*-Simulationen

Für das *docking* wurden die Koordinaten der Polymerkette A der P450 BM-3-Struktur 1BU7 verwendet.³³ Die Aminosäure Phe87 wurde *in silico* zu Valin und Alanin mutiert. Um die Enzymstrukturen des Wildtyp-Enzyms und der beiden Mutanten für das *docking* mit AutoDock⁴³⁵ vorzubereiten, wurden alle Wassermoleküle entfernt und es wurden Ladungen mittels AMBER⁴³⁴ zugewiesen, unter Verwendung des Cornell *et al.* Kraftfeldes.⁴⁶²

Solvatations-Parameter wurden den Proteinen mittels des AddSol-Programms von AutoDock zugewiesen. Mittels AutoGrid wurde ein Gitternetz mit 126 Gitterpunkten in jeder Raumrichtung und einem Abstand der Gitterpunkte von 0,15 Å erstellt. Das Gitternetz wurde auf das aktive Zentrum von P450 BM-3 zentriert und das Volumen des Gitters war groß genug, um die komplette Bindetasche von P450 BM-3 zu umschließen.

Die Rotations- und Torsionsfreiheitsgrade für den Liganden β -Ionon wurden automatisch durch das Programm AutoTors festgelegt. Für das *docking* wurde der genetische Algorithmus von AutoDock verwendet. Die Anzahl der Generationen wurde auf 27000 festgelegt. Es wurden 500 *docking*-Simulationen durchgeführt mit einer maximalen Anzahl von $1,5 \cdot 10^6$ Energieberechnungen. Nach dem *docking* wurde eine Clusteranalyse der Konformationen durchgeführt. Das Clustering beruht auf den RMSD-Abweichungen der Atome der gedockten Liganden.

8.1.5 Theoretische Grundlagen molekulardynamischer Simulationen

Die molekulardynamische Simulation (MD-Simulation) ist eine der wichtigsten Methoden zur theoretischen Untersuchung biologischer Moleküle. Es ist äußerst schwierig, wenn nicht unmöglich, die Dynamik biologischer Moleküle direkt auf molekularer Ebene zu verfolgen. Mittels MD-Simulationen wird versucht ein Modell des zu untersuchenden Moleküls zu erstellen, welches einerseits dessen dynamische Eigenschaften nachahmt und andererseits makroskopisch betrachtet werden kann. Diese computergestützte Methode berechnet das zeitabhängige Verhalten eines molekularen Systems und erlaubt es, Erkenntnisse über die komplexen und dynamischen Prozesse zu gewinnen, die in biologischen Systemen auftreten. MD-Simulationen ermöglichen somit detaillierte Aussagen über die Struktur, Dynamik und Thermodynamik biologischer Moleküle und deren Wechselwirkungen beispielsweise mit

Substraten. Bei MD-Simulationen wird ein biologisches Molekül vereinfacht gesehen, als ein Netzwerk von untereinander durch Federn verbundene Kugeln betrachtet. Die Federn sind mit einer Kraftkonstante versehen und die Kugeln tragen Punktladungen in ihrem Mittelpunkt. Der Radius einer Kugel entspricht dabei dem Van-der-Waals Radius des entsprechenden Atoms. Damit lassen sich gebundene sowie nicht gebundene Wechselwirkungen zwischen den Kugeln beschreiben, welche im Allgemeinen unter dem Begriff „Kraftfeld“ zusammengefasst sind. Die Positionen und Geschwindigkeiten der einzelnen Atome über einen bestimmten Simulationszeitraum bezeichnet man als Trajektorie. Sie wird durch Integration der Newton-Bewegungsgleichung erhalten.

8.1.5.1 Kraftfelder

Es stehen eine Vielzahl von Kraftfeldern für MD-Simulationen verschiedener Systeme zur Verfügung. Alle Kraftfelder berücksichtigen in Form von Kraftfeldgleichungen die Energie der bindenden sowie nicht bindenden Wechselwirkungen zwischen den Atomen. Unter den bindenden Wechselwirkungen werden dabei die Bindungslänge zwischen zwei Atomen, der Bindungswinkel zwischen drei Atomen und der Torsionswinkel zwischen zwei Ebenen zusammengefasst. Nicht bindende Wechselwirkungen setzen sich zusammen aus Van-der-Waals-Wechselwirkungen, die durch das Lennard-Jones-Potential beschrieben werden und elektrostatischen Kräften, denen ein Coulomb-Potential zu Grunde liegt. Die potentielle Energie des Systems ergibt sich aus der Summe der Einzelgleichungen des jeweiligen Kraftfeldes. In dieser Arbeit wurde das im AMBER Programmpaket enthaltene Kraftfeld parm99 verwendet,^{462,463} welches für Proteine und Nukleinsäuren gut geeignet ist.

8.1.5.2 Integration der Newton-Bewegungsgleichung

Das zweite Newton'sche Gesetz der Bewegung (2) beschreibt den Zusammenhang zwischen der auf ein Atom mit der Masse m_i wirkenden Kraft F_i und der daraus für das Atom resultierenden Beschleunigung a_i .

$$F_i = m_i a_i \quad (2)$$

Die Kraft F_i entspricht darüber hinaus dem negativen Gradienten der potentiellen Energie in Bezug auf die Änderung der Atomposition (3).

$$F_i = -\frac{dE_{pot}}{dr_i} \quad (3)$$

Gleichung (4) drückt die Beziehung zwischen der potentiellen Energie und der Positionsänderung der Atome als Funktion der Zeit aus:

$$-\frac{dE_{pot}}{dr_i} = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (4)$$

Mit Hilfe der Atommassen und der aus den Kraftfeldgleichungen bekannten potentiellen Energie ist es nun möglich, die Position und Geschwindigkeit für jedes Atom über eine Reihe diskreter Zeitintervalle zu bestimmen. Die Zeitintervalle müssen dabei so eng gewählt werden, dass auch die Bewegungen mit der höchsten Frequenz abgebildet werden. Diese stellen in biologischen Systemen die Streckschwingungen der an Kohlenstoff oder Sauerstoff gebundenen Wasserstoffe dar ($f_{\max}^{-1} \sim 10$ fs).

8.1.5.3 Temperatur- und Druckkopplung

Biologische Vorgänge finden meistens bei konstanter Temperatur und konstantem Druck statt, weshalb MD-Simulationen von biologischen Makromolekülen ebenfalls unter diesen Bedingungen durchgeführt werden. Die Temperatur des Systems steht dabei über die kinetische Energie mit den Geschwindigkeiten der Atome in Beziehung. Weicht die Temperatur an einem bestimmten Zeitpunkt von der vorgegebenen Referenztemperatur ab, so wird in den nachfolgenden Zeitschritten die Geschwindigkeit der Atome durch einen in jedem Zeitschritt neu berechneten Faktor reskaliert und damit die Temperatur über eine gewisse Relaxationszeit wieder an den Referenzwert angeglichen. Die Regulation der Temperatur entspricht der Kopplung an ein virtuelles Wärmebad (Berendsen-Methode).⁴⁶⁴ Durch die Wahl der Relaxationszeit kann eine enge oder lose Kopplung an das Wärmebad erfolgen. Die Regulation des Drucks erfolgt analog zur Regulation der Temperatur. An Stelle der Geschwindigkeiten der Atome werden die interatomaren Atomabstände reskaliert, sodass eine gezielte Veränderung des Simulationsvolumens erreicht wird.

8.1.5.4 Periodische Randbedingungen

Die MD-Simulationen von P450 BM-3 wurden in der vorliegenden Arbeit in explizitem Wasser durchgeführt. Dazu wurde das Protein in einer Wasserbox mit der Form eines *truncated octahedron* (14-seitiger Polyeder mit acht sechseckigen und sechs viereckigen Seitenflächen) simuliert, welche periodische Randbedingungen aufwies. Alle Atome innerhalb der Wasserbox werden in alle drei Raumrichtungen unendlich oft repliziert. Sobald ein Atom die Grenze der Box überschreitet, tritt es auf der gegenüberliegenden Seite wieder in die Box ein. Dadurch kann das zu simulierende System klein gehalten werden und es wird Rechenzeit eingespart. Um elektrostatische Interaktionen des Proteins mit sich selbst in der benachbarten Wasserbox zu vermeiden, muss die Gesamtladung des Systems neutral sein und die Schichtdicke des Lösungsmittels um das Protein ausreichend groß gewählt werden.

8.1.5.5 Langreichweitige elektrostatische Wechselwirkungen (*Particle-Mesh-Ewald-Algorithmus*)

Bei der Berechnung des elektrostatischen Potentials bzw. der Coulomb-Energie werden alle Ladungen innerhalb der Zelle und zusätzlich die Ladungen in den periodischen Nachbarzellen berücksichtigt. Diese Berechnungen sind sehr aufwendig, deshalb verwendet man bei MD-Simulationen häufig Particle-Mesh-Ewald-Algorithmen (PME-Methode). Der Geschwindigkeitszuwachs der PME-Methode beruht auf einer Umformulierung der Ladungsverteilung und der Aufteilung der Coulomb-Summe in zwei schnell konvergierende Summen. Zu den realen Punktladungen wird jeweils eine gaußförmige, abschirmende Ladungsverteilung addiert und das elektrostatische Potential berechnet. Um die Abweichungen durch die abschirmenden Gaußladungen zu korrigieren, führt man eine weitere gaußförmige Ladungsverteilung mit entgegengesetztem Vorzeichen ein. Das elektrostatische Potential aus der Ladungsverteilung kann als Fourierreihe effizient mittels Fast-Fourier-Transformation berechnet werden.

8.1.6 Parametrisierung der Hämgruppe und des Substrates β -Ionon

Für die Hämgruppe und das Substratmolekül β -Ionon mussten Kraftfeldparameter wie Atomladungen, Bindungslängen, Bindungswinkel, Torsionswinkel usw. ermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine von Florian Barth⁴⁶⁵ an unserem Institut parametrisierte Hämgruppe im reaktiven Oxyferryl-Zustand (*Compound I*) verwendet.²⁵⁹

8.1.6.1 Erstellung der Struktur und Geometrieoptimierung

Die Substratmoleküle wurden mit GaussView, der graphischen Benutzeroberfläche von Gaussian 98⁴³⁹ aufgebaut (Abbildung 78). Die Geometrieoptimierung in Gaussian 98 benutzt den Berny-Algorithmus der auf einem früheren Programm von Schlegel⁴⁶⁶ beruht und redundante interne Koordinaten⁴⁶⁷ zur Minimierung benutzt. Die *ab initio*-Berechnung wurde mit der Hartree-Fock-Methode und dem Polarisationsbasissatz 6-31G(d)⁴⁶⁸ durchgeführt.

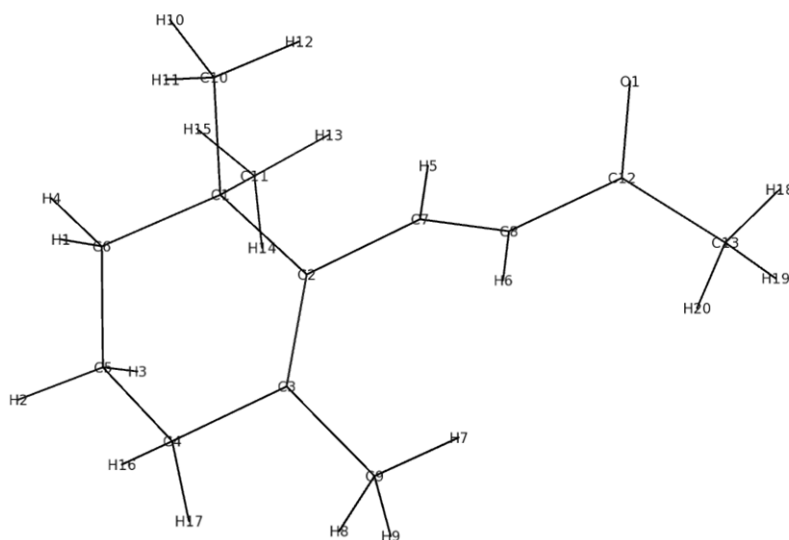


Abbildung 78: Minimierte Struktur des β -Iononmoleküls mit den Atomnamen.

8.1.6.2 Elektrostatisches Potential (Ladungsberechnung)

Anschließend wurde das elektrostatische Potential (ESP) ebenfalls *ab initio* mit dem Basissatz 6-31G(d) in Gaussian 98 berechnet. Aus dem quantenmechanisch berechneten Potential der Moleküloberfläche wurden mittels dem AMBER⁴³⁴ beigefügten Programm RESP (*restrained electrostatic potential*) atomzentrierte Punktladungen berechnet (Tabelle 29).^{469,470} Hierbei wird jedem Atom eine Ladung zugeordnet, sodass das quantenmechanisch berechnete Potential des Moleküls wiedergegeben wird.

Tabelle 29: Berechnete Atomladungen von β -Ionon.

Atomname	Atomtyp	Ladung	Atomname	Atomtyp	Ladung
O1	O	-0.576	H1	HC	0.038
C1	CT	0.490	H2	HC	0.024
C2	CF	-0.263	H3	HC	0.024
C3	CP	0.220	H4	HC	0.038
C4	CT	-0.186	H5	HA	0.130
C5	CT	-0.019	H6	HA	0.181
C6	CT	-0.137	H7	HC	0.109
C7	CF	-0.024	H8	HC	0.109
C8	CP	-0.404	H9	HC	0.109
C9	CT	-0.394	H10	HC	0.106
C10	CT	-0.459	H11	HC	0.106
C11	CT	-0.459	H12	HC	0.106
C12	C	0.755	H13	HC	0.106
C13	CT	-0.378	H14	HC	0.106
			H15	HC	0.106
			H16	HC	0.070
			H17	HC	0.070
			H18	HC	0.098
			H19	HC	0.098
			H20	HC	0.098

8.1.6.3 Parameter für Bindungslängen, Bindungswinkel und Torsionen

Parameter für Bindungslängen und -winkel des Substrates, welche nicht im verwendeten Kraftfeld vorkommen, wurden aus ähnlichen, bereits im Kraftfeld vorkommenden Parametern abgeschätzt (Tabelle 30).

Tabelle 30: Kraftfeldmodifikationen für β -Ionen.

Kraftfeldparameter		
Atommassen		
CP	12.01	
CF	12.01	
Bindungslängen	k_l [kcal/(mol·Å ²)]	l_0 [Å]
C-CP	469.0	1.490
CF-CF	469.0	1.490
CF-CP	549.0	1.330
CF-CT	317.0	1.540
CF-HA	367.0	1.080
CP-CT	317.0	1.520
CP-HA	367.0	1.080
Winkel	k_θ [kcal/(mol·rad ²)]	θ_0 [rad]
C-CP-HA	50.0	113.76
C-CP-CF	63.0	125.17
CF-CT-CT	63.0	110.44
CT-CP-CT	63.0	112.29
CF-CF-CP	63.0	126.00
CF-CF-CT	63.0	114.15
CF-CF-HA	50.0	115.42
CF-CP-HA	50.0	121.07
CF-CP-CT	63.0	125.13
CP-CT-CT	63.0	114.04
CP-C-O	80.0	119.41
CP-C-CT	63.0	119.93
CP-CF-HA	50.0	118.50
CP-CT-HC	35.0	110.31
CP-CF-CT	63.0	123.32

8.1.7 Vorbereitung und Durchführung der MD-Simulationen

8.1.7.1 MD-Simulationen der P450 BM-3-Strukturen ohne Substrat

Für die MD-Simulationen ohne Substrat wurden drei verschiedene Kristallstrukturen von P450 BM-3 aus der PDB-Datenbank¹⁵ ausgewählt. Die Struktur mit dem PDB-Eintrag 1BU7, mit einer Auflösung von 1,65 Å.³³, die Struktur 1BVY (2,03 Å)³³ und die Struktur 1FAG (2,70 Å).¹²² Für alle MD-Simulationen wurden die Koordinaten aus der Polymerkette A der Kristallstrukturen verwendet. Kristallwasser und Substrate wurden aus den Kristallstrukturen entfernt. Die MD-Simulationen wurden mit AMBER 7.0 durchgeführt,⁴³⁴ unter Verwendung des Cornell *et al.* Kraftfelds⁴⁶² mit dem parm99 Parameter-Set.⁴⁶³ Der Protonierungszustand der titrierbaren Seitenketten bei pH 7 wurde mit der MCCE-Methode (*multiconformational continuum electrostatics method*) bestimmt.⁴⁴⁰ Aufgrund der Ergebnisse der MCCE-Berechnungen wurden drei Asparaginsäuren für die Simulation protoniert (Asp151, Asp242 und Asp250). Die fehlenden Wasserstoffatome wurden mittels AMBER hinzugefügt.⁴³⁴ Das simulierte Proteinsystem bestand aus 455 Aminosäuren und 7394 Atomen (PDB-Einträge: 1BU7, 1FAG) bzw. 435 Aminosäuren und 7077 Atomen (1BVY). Um die Gesamtladung des Systems für die Simulation zu neutralisieren, wurden elf (1BU7, 1FAG) bzw. zwölf (1BVY) Natriumionen hinzugefügt.

Das System wurde in einer Wasserbox in Form eines *truncated octahedron* mit expliziten Wassermolekülen simuliert. Es wurde das TIP3P-Wassermodell verwendet.⁴⁷¹ Der Abstand zwischen der Wand der Box und dem nächsten Atom betrug 12 Å und es wurde ein *closeness argument* von 0,42 verwendet. Dies führte für die drei Systeme zu 17072 (1BU7), 14951 (1BVY) und 16816 (1FAG) Wassermolekülen. Die Systeme wurden durch 1000 Schritte der *steepest descent*-Methode und 1000 Schritte der *conjugate gradient*-Methode energieminiert, um das System zu relaxieren. Nach der Minimierung wurden die Temperatur auf 310 K und der Druck auf 1 bar unter *restraint*-Bedingungen eingestellt. Zunächst wurden alle Atome mit einer *restraint*-Konstanten von 10 kcal/mol über einen Zeitraum von 50 ps festgehalten. Die *restraint*-Konstante wurde schrittweise nach jeweils 50 ps auf 1 und 0,1 kcal/mol reduziert. Nach der *restraint*-Phase wurden die Simulationen für 5 ns unter konstanter Temperatur und konstantem Druck durchgeführt (NPT). Dabei wurden periodischen Randbedingungen verwendet. Die Temperatur und der Druck wurden durch Kopplung an ein Wärmebad mittels des Berendsen-Algorithmus⁴⁶⁴ konstant gehalten. Die

kovalent gebundenen Wasserstoffatome wurden mittels des SHAKE-Algorithmus behandelt⁴⁶⁴ und es wurde ein Zeitschritt von 1 fs verwendet. Elektrostatische Interaktionen wurden durch die *Particle-Mesh-Ewald*-Methode berücksichtigt.⁴⁷² Die Simulationen wurden mittels des PMEMD-Moduls durchgeführt.⁴⁷³ Für jede der drei Strukturen wurden drei Simulationen mit einer unterschiedlichen Verteilung der anfänglichen Startgeschwindigkeiten auf die Atome durchgeführt. Die Analyse der Trajektorien erfolgte mittels verschiedener Programme des AMBER 7.0-Paketes.⁴³⁴

8.1.7.2 MD-Simulationen von P450 BM-3 mit dem Substrat β -Ionon

Für die Simulation von P450 BM-3 mit dem Substrat β -Ionon wurde das β -Iononmolekül in eine Konformation von P450 BM-3 aus der MD-Simulation ohne Substrat *gedockt*. Die Koordinaten des P450 BM-3-Enzyms für das *docking* wurden aus der MD-Simulation *IBU7_2* nach 2 ns erhalten. Es wurden zwei *in silico*-Mutanten F87A und F87V erstellt. Um die Seitenkettenkonformationen zu relaxieren, wurden der Wildtyp und die beiden erstellten Mutanten energieminiert. Für das *docking* von β -Ionon in die Strukturen wurden die zuvor beschriebenen *docking*-Parameter verwendet (siehe Kapitel 8.1.4). Nach dem *docking* wurde eine Clusteranalyse der Konformationen durchgeführt und für die MD-Simulationen der drei Enzym-Substrat-Komplexe des Wildtyp-Enzyms und der beiden Mutanten wurde jeweils eine Konformation aus den drei bestbewerteten Clustern ausgewählt. Die Vorbereitungen der MD-Simulationen waren identisch zu den Simulationen ohne Substrat.

Nach der Minimierung wurden sowohl die Proteinatome als auch die Substratome mit einer *restraint*-Kraft von 10 kcal/mol über einen Zeitraum von 50 ps festgehalten. Die *restraint*-Kraft auf die Proteinatome wurde über einen Zeitraum von jeweils 50 ps schrittweise auf 1 und 0,1 kcal/mol reduziert. Die Atome des Substrates wurden weiterhin mit einer konstanten *restraint*-Kraft von 10 kcal/mol festgehalten. Nach insgesamt 150 ps *restraint*-Phase wurde keine *restraint*-Kraft auf das Protein ausgeübt, und die *restraint*-Kraft auf die Substratome wurde über einen Zeitraum von jeweils 200 ps schrittweise von 10 über 1 auf 0,1 kcal/mol reduziert. Nach einer Gesamtzeit von 750 ps Simulationszeit wurde das System ohne *restraint*-Kräfte behandelt und die Simulationen wurden über einen Zeitraum von 6 ns unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie die Simulationen ohne Substrat.

8.1.8 Analyse der Bindetaschenarchitektur

Zur Volumenberechnung und Identifizierung der Bindungstaschenarchitektur wurde das Programm VOIDOO verwendet.³⁵⁷ Bis auf folgende Parameter wurden die Standardparameter von VOIDOO verwendet.

probe radius: 1,4Å³ - 1,6Å³

Van-der-Waals *growth factor*: 1,1

grid spacing : 0,75Å

8.1.9 Abschätzung der instrinsischen Reaktivität

Bindungsdissoziationsenergien (BDE) wurden mit Hilfe des Programms PETRA abgeschätzt. PETRA basiert auf einer empirischen Methode, die in dem Arbeitskreis von J. Gasteiger entwickelt wurde.^{252,253}

8.1.10 Abschätzung der sterischen Hinderung

Steinhauer und Gasteiger entwickelten einen 3D-Deskriptor, der auf der Idee der radialen Verteilungsfunktion (*radial distribution function* RDF) aufbaut.^{260,261} Dieser Deskriptor basiert auf der Abstandsverteilung in der geometrischen Darstellung eines Moleküls. Vereinfacht gesagt handelt es sich bei der radialen Verteilungsfunktion eines Atom-Ensembles um eine Art Wahrscheinlichkeitsverteilung der einzelnen interatomaren Abstände und die radiale Verteilungsfunktion eines Ensembles von N Atomen kann als Wahrscheinlichkeitsverteilung interpretiert werden, ein Atom innerhalb eines kugelförmigen Volumens vom Radius r zu finden.⁴⁷⁴ Der RDF Deskriptor wird berechnet nach:

$$g(r) = f \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N e^{-(r-r_{ij})^2} \quad (4)$$

wobei f ein Skalierungsfaktor ist, N ist die Anzahl der Atome im Molekül und r_{ij} ist die Distanz zwischen den Atomen i und j ; $g(r)$ wird normalerweise als diskrete Funktion berechnet aus einer Anzahl diskreter Punkte innerhalb definierter Intervalle. Man kann den

RDF-Deskriptor auch auf einen bestimmten Abstandsbereich beschränken um spezifische Informationen im 3-D Strukturraum darzustellen. So kann man ein Maß für die sterische Hinderung im Molekül erhalten (Abbildung 79).

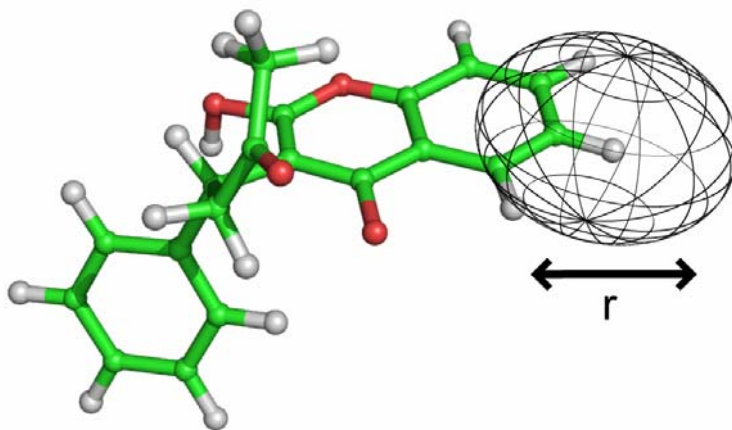


Abbildung 79: RDF-Deskriptor als Maß für die sterische Hinderung im Molekül. Durch Variation des Radius r kann die sterische Hinderung in einem bestimmten Bereich des Moleküls berechnet werden.

8.1.11 Sequenzanalysen

8.1.11.1 Sequenz-alignments

Sequenz-alignments stellen die Grundlage aller Sequenzanalysen dar. Das einfachste alignment, ein paarweises alignment, besteht aus zwei Sequenzen, die aufgrund der Position ihrer Nukleotide bzw. Aminosäuren aneinander ausgerichtet werden. Dabei ist es das Ziel, möglichst viele identische Positionen an den entsprechenden Positionen der zu vergleichenden Sequenzen zu finden. Die Bewertung dieses Vergleichs erfolgt mit Hilfe einer Substitutionsmatrix.

Das Multisequenz-alignment, also die gleichzeitige Analyse mehrerer Sequenzen, liefert im Vergleich zum paarweisen Sequenz-alignment Information zur Aminosäureverteilung an einzelnen Positionen. Alle Multisequenz-alignments wurden mit CLUSTALW bzw. T-Coffee unter Verwendung der Standardparameter durchgeführt.⁴³⁷

8.1.11.2 Substitutionsmatrizen

Die Sequenzidentität zwischen zwei unterschiedlichen Proteinsequenzen bezieht sich auf die Anzahl identischer Aminosäuren in den fortlaufenden Positionen einer bestimmten Sequenz (die Beispielsequenz 1: „TPGWVAI“ besitzt 100% Sequenzidentität zu der Beispielsequenz 2 „TPGWVAI“). Eine Sequenzähnlichkeit wiederum bezieht sich auf gewisse biochemische Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren und steht in Abhängigkeit der verwendeten Substitutionsmatrix.

Die Identität und Ähnlichkeit von Sequenzen sind entscheidende Parameter bei der Erstellung von *alignments*. Anhand dieser Parameter lässt sich eine Aussage über die Homologie der Sequenzen machen. Die Identität ist ein Maß für die Anzahl der identischer Positionen eines *alignment*. Die Ähnlichkeit hängt von der verwendeten Substitutionsmatrix ab. In Substitutionsmatrizen werden allen möglichen Aminosäurepaaren Werte zugeordnet, die sich nach der Ähnlichkeit der Aminosäuren richten (Abbildung 80).

Die BLOSUM-Matrix (*blocks substitution matrix*) (Abbildung 80) wurde von Jorja und Steven Henikoff entwickelt⁴⁷⁵ und basiert auf einem lokalen *alignment*. Für jede Matrix wurden *alignments* von Sequenzen verwendet, die eine gewisse Identität aufweisen. Die Matrix BLOSUM62 wurde mit einem *alignment* aus Sequenzen mit 62 % Identität berechnet.

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

Abbildung 80: BLOSUM62-Substitutionsmatrix.

8.1.11.3 Aminosäurekonservierung

Für die Berechnung der Aminosäure Konservierung C innerhalb der P450-Subfamilien wurde der in AL2CO implementierte Algorithmus verwendet.⁴³³ Es wurde die *sum of pairs* Methode mit ungewichteten Aminosäurehäufigkeiten gewählt. Die Konservierung C wurde nicht normalisiert. Die Methode verwendet Informationen über Mutationen aus Substitutionsmatrizen, um stereochemische Variationen innerhalb einer Spalte eines *alignments* zu bewerten. Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurde die BLOSUM62-Matrize gewählt. Die *alignments* der Subfamilien wurden mit CLUSTALW erstellt. Dabei wurden nur Sequenzen mit einer Identität $< 90\%$ verwendet.

Die Berechnung der Konservierung erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurden ungewichtete Aminosäurehäufigkeiten bestimmt:

$$f_a(i) = \frac{n_a(i)}{n(i)} \quad (5)$$

$n_a(i)$ entspricht der Anzahl der Sequenzen, für die Position i mit Aminosäure a besetzt ist und $n(i)$ entspricht der Anzahl der Sequenzen im *alignment*, für die die Position i besetzt ist (ein *gap* an dieser Position wird nicht berücksichtigt):

$$n(i) = \sum_{a=1}^{20} n_a(i) \quad (6)$$

Im zweiten Schritt wurde die Konservierung C aus den Aminosäurehäufigkeiten mit der *sum of pairs* Methode berechnet:

$$C(i) = \sum_{a=1}^{20} \sum_{b=1}^{20} f_a(i) f_b(i) S_{ab} \quad (7)$$

wobei S_{ab} dem Wert der BLOSUM62-Matrize für das Aminosäurepaar ab entspricht. Die Konservierung C ist größer für Positionen, die mit ähnlichen Aminosäuren besetzt sind. Da die diagonalen Werte der Substitutionsmatrizen nicht identisch sind, unterscheidet sich die Konservierung C für invariante Positionen in Abhängigkeit von der Art der Aminosäure. Im Fall der BLOSUM62-Matrize wird der höchste Wert von 11 für Tryptophan erreicht.

8.1.11.4 Suche nach homologen Sequenzen (BLAST)

BLAST (*basic local alignment search tool*) ist ein heuristischer Suchalgorithmus, der 1990 am NCBI entwickelt wurde.⁴³⁶ Heuristische Verfahren sind eine Annäherung an die Berechnung von Sequenz-*alignments* mit dem Smith & Waterman-⁴⁷⁶ oder Needleman & Wunsch-Algorithmus.⁴⁷⁷ Sie ermöglichen es, innerhalb kurzer Zeit ganze Datenbanken nach ähnlichen Sequenzen zu durchsuchen.

8.1.12 Homologiemodellierung

Homologiemodellierung ist eine Methode um die Tertiärstruktur eines Proteins ausgehend von der Aminosäuresequenz zu modellieren. Die Struktur des Proteins wird vorhergesagt, indem seine Sequenz (*target*) mit der Sequenz eines homologen Proteins bekannter Struktur (*template*) verglichen wird. Der erste Schritt der Homologiemodellierung ist die Erstellung eines verlässlichen Sequenz-*alignments*, sodass äquivalente Aminosäuren beider Proteine übereinstimmen. Die Qualität des *alignments* ist ein entscheidender Faktor für die Qualität des zu erstellenden Homologiemodells. Je niedriger die Identität zwischen den Sequenzen des *templates* und des *targets* ist, umso schwieriger ist es ein verlässliches *alignment* zu erstellen und umso schwieriger wird es folglich, ein qualitativ gutes Homologiemodell zu erhalten. Aufgrund des *alignments* wird die Struktur der *targets* nach Vorgabe der *template*-Struktur festgelegt. Insertionen oder Deletionen von Aminosäuren, welche hauptsächlich in den variablen *loop*-Regionen der Proteine vorkommen, werden anschließend eingefügt und es erfolgt eine Energieminimierung der erstellten Struktur.

Die in dieser Arbeit verwendeten Homologiemodelle wurden mit dem Programm Modeller 6v2,⁴⁴¹ unter Verwendung der Standardparameter, erstellt. Eine Qualitätskontrolle der erstellten Homologiemodelle wurde mittels des Programms PROSA 2003 durchgeführt.⁴⁴²

8.2 Experimentelle Arbeiten

8.2.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

8.2.1.1 Geräte

Tabelle 31: Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschränke	
WTE	Binder, Tuttlingen
UM500	Memmert, Schwabach
GC/MS	
GC/MS QP2010	Shimadzu Deutschland, Duisburg
Waage	
MC1 Research RC 210 D	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge	
Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments
Rotoren	
SS-34, SLA-3000	Sorvall, Langenselbold
Polarimeter	
Perkin Elmer 241MC	Perkin Elmer, USA

8.2.1.2 Chemikalien

Tabelle 32: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Aceton, Kieselgel, Seesand	Riedel-deHaën, Seelze
Agar, Ampicillin, Diethylether, Dimethylsulfoxid (DMSO), Hefeextrakt, Magnesiumsulfat, Natriumchlorid, Petrolether, THF, Trypton	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

8.2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 33: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Pipettenspitzen, Petrischalen rund 9.4 cm Ø	Greiner Labortechnik, Nürtingen
PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml	
Reaktions-Gefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg (D)
GC-Rollrandflaschen, µ-Einsätze und PTFE-Septen	WICOM GmbH, Heppenheim

8.2.2 Medien und Stämme

8.2.2.1 Medien

LB (Luria-Bertani) Medium (low salt)

Trypton.....10 g
Hefeextrakt.....5 g
NaCl.....5 g
H₂O.....ad 1 l

⇒ mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.

Festes Medium enthält zusätzlich noch 15 g/l Agar. Zur Selektion von Transformanden wird dem Medium Ampicillin zugesetzt. 1 ml Ampicillin mit der Konzentration 100 mg/ml in 1 Liter Lösung ergibt eine Endkonzentration von 100 µg/ml.

8.2.2.2 Bakterienstämme

Tabelle 34: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
E.coli DH5 α	deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(r _k m _k), recA1, relA1, supE44, thi-1, Δ (lacZYA-argFV169), ϕ 80lacZ Δ M15, F ⁻	Nal ^R	478

8.2.3 Mikrobiologische Methoden

8.2.3.1 Stammhaltung auf festen Nährböden

Die Stämme lässt man auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum bei 37 °C über Nacht anwachsen. Danach werden die Platten bei 10 °C gelagert.

8.2.3.2 Anzucht in Flüssigmedien (Übernachtskulturen)

5 ml LB-Vorkulturen mit entsprechendem Selektionsantibiotikum werden mit Einzelkolonien von Agarplatten angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

8.2.3.3 Expression im Schüttelkolben

Aus den Übernachtskulturen wurden durch Animpfen im Verhältnis 1:40 200 ml LB-Kulturen in 1000 ml Erlenmeyerkolben erstellt, welche im Schüttler bei 37 °C inkubiert wurden und bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert wurden. Danach wurde zur Induktion der Expression für 3 h bei 42 °C inkubiert.

8.2.4 Oxidation von β -Ionon *in vivo*

Nach Induktion der Expression wurden je Kolben 250 μ l β -Ionon-Lösung (286 mg in 1 ml DMSO) zugegeben und bei 30°C für vier Tage inkubiert bei 133 Umdrehungen/min.

8.2.4.1 Extraktion des Edukt-/Produktgemisches.

Nach vier Tagen erfolgte die Extraktion des Reaktionsgemisches mittels Diethylether. Nach dem Einrotieren des Diethylethers wurde über MgSO_4 getrocknet. Eine GC/MS-Analyse zeigte ein Gemisch von β -Ionon und 4-Hydroxy- β -ionon.

8.2.4.2 Abtrennen des Produktes 4-Hydroxy- β -Ionon

Das Produkt 4-OH- β -Ionon konnte chromatographisch über Kieselgel aus dem Rohextrakt abgetrennt werden. Dazu wurde ein Lösemittelgemisch THF:PE (1:4) verwendet. Die entsprechende GS/MS-Analyse zeigt das aufgereinigte Produkt 4-OH- β -Ionon.

8.2.4.3 Trennung der Enantiomeren

Die Trennung der Enantiomeren erfolgte in der Arbeitsgruppe von S. Laschat mittels HPLC an einer chiralen Säule (Chiralcel OD-H-Säule) nach Celik *et al.*²⁵⁶. Als Standard wurde ein Racemat von chemisch synthetisiertem 4-OH- β -Ionon verwendet, das nach Haag *et al.* synthetisiert wurde.²⁵⁷ Die Zuordnung der HPLC-Signale zu den beiden Enantiomeren erfolgte anhand von Literaturdaten²⁵⁶ und konnte durch Messung der optischen Drehwerte bestätigt werden.

8.2.5 GC/MS-Analytik

Für die Analyse von Edukten und Produkten der untersuchten Reaktionen wurden die im Folgenden angegebene Kapillartrennsäule, GC-Ofenprogramme und sonstigen Einstellungen verwendet:

Gerät: Shimadzu GC/MS QP2010

Trägergas: Helium

Säule: 30 m FS-Supreme (Innendurchmesser 0.25 mm, Filmdicke 0.25 μM ,

Polydimethylsiloxan mit 5 % Phenylanteil)

Detektor: Massenspektrometer

Trägergasgeschwindigkeit: 30 cm s⁻¹

Injektortemperatur: 250°C

Interface: 285°C

Ofenprogramm:

1) 150 °C isotherm 1 min

2) 20 °C min⁻¹ von 150 bis 250 °C

3) 250 °C isotherm 5 min

MS-Einstellungen:

Intervall zwischen Aufnahme der Spektren: 0.5 s

Start m/z: 70

End m/z : 250

9 Anhang

9.1 Verwendete Sequenzen

Tabelle 35: Die verwendeten Sequenzen der P450-Subfamilie CYP1A.

	Sequence ID (CYPED)	Protein	Organismus	Accession Code
1	2447	CYP1AX	<i>Ammodytes marinus</i>	CAC34284
2	2436	CYP1AX	<i>Anguilla anguilla</i>	AAL99904
3	2440	CYP1A9	<i>Anguilla anguilla</i>	AAL99905
4	2457	CYP1A1	<i>Bos taurus</i>	AAP31898
5	2368	CYP1AX	<i>Callithrix jacchus</i>	BAA33790
6	2326	CYP1A1	<i>Canis familiaris</i>	P56590
7	2375	CYP1A2	<i>Canis familiaris</i>	P56592
8	2343	CYP1A1	<i>Cavia porcellus</i>	BAA01794
9	2380	CYP1A2	<i>Cavia porcellus</i>	AAB70866
10	2438	CYP1A1	<i>Chaetodon capistratus</i>	Q92039
11	2346	CYP1A1	<i>Cricetulus griseus</i>	JS0746
12	2431	CYP1A1	<i>Danio rerio</i>	AAL54873
13	2441	CYP1A1	<i>Dicentrarchus labrax</i>	P79716
14	2426	CYP1AX	<i>Fundulus heteroclitus</i>	AAD01809
15	2402	CYP1A5	<i>Gallus gallus</i>	P79761
16	5917	CYP1A4	<i>Gallus gallus</i>	NP_990478
17	5914	CYP1A2	<i>Halichoerus grypus</i>	CAF18540
18	2357	CYP1A2	<i>Homo sapiens</i>	P05177
19	2310	CYP1A1	<i>Homo sapiens</i>	CAA26458
20	2428	CYP1A1	<i>Limanda limanda</i>	O42430
21	2415	CYP1AX	<i>Lithognathus mormyrus</i>	AAK69390
22	2408	CYP1A1	<i>Liza aurata</i>	O42231
23	2394	CYP1A2	<i>Mesocricetus auratus</i>	P24453
24	2453	CYP1A1	<i>Microgadus tomcod</i>	AAB00082
25	2383	CYP1A2	<i>Mus musculus</i>	P00186

26	2412	CYP1A3	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	AAD45966
27	2439	CYP1A1	<i>Opsanus tau</i>	Q92095
28	2353	CYP1A1	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1307202A
29	2373	CYP1A2	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	CAA32066
30	5920	CYP1AX	<i>Oryzias latipes</i>	AAP68769
31	2328	CYP1A1	<i>Ovis aries</i>	P56591
32	2450	CYP1A1	<i>Pagrus major</i>	P98181
33	2350	CYP1A1	<i>Rattus norvegicus</i>	CAA35039
34	5919	CYP1AX	<i>Rivulus marmoratus</i>	AAQ16634
35	2449	CYP1AX	<i>Scophthalmus maximus</i>	CAC34401
36	2323	CYP1A1	<i>Sus scrofa</i>	BAB85660
37	5918	CYP1AX	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	CAG03127
38	2400	CYP1AX	<i>Xenopus laevis</i>	BAA37080

Tabelle 36: Die verwendeten Sequenzen der P450-Subfamilie CYP2B.

	Sequence ID (CYPED)	Protein	Organismus	Accession Code
1	1_2222	CYP2B6	<i>Homo sapiens</i>	P20813
2	3_2491	CYP2B11	<i>Canis familiaris</i>	P24460
3	7_2750	CYP2B29	<i>Mesocricetus auratus</i>	AAP04405
4	8_2775	CYP2B9	<i>Mus musculus</i>	P12790
5	9_2671	CYP2B10	<i>Mus musculus</i>	P12791
6	10_2783	CYP2B13	<i>Mus musculus</i>	NP_031839
7	11_2701	CYP2B19	<i>Mus musculus</i>	O55071
8	13_2526	CYP2B4	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	P00178
9	16_2637	CYP2B2	<i>Rattus norvegicus</i>	P04167
10	17_2826	CYP2B3	<i>Rattus norvegicus</i>	P13107
11	18_2757	CYP2B12	<i>Rattus norvegicus</i>	P33272
12	19_2734	CYP2B15	<i>Rattus norvegicus</i>	BAB72140
13	20_2774	CYP2BX	<i>Laevis laevis</i>	AAH60328
14	21_2782	CYP2BX	<i>Xenopus laevis</i>	AAH45126
15	22_6964	CYP2BX	<i>Xenopus laevis</i>	AAH77850

Tabelle 37: Die verwendeten Sequenzen der P450-Subfamilie CYP2C.

	Sequence ID (CYPED)	Protein	Organismus	Accession Code
1	1_2468	CYP2C8	<i>Homo sapiens</i>	NP_000761
2	2_2604	CYP2C9	<i>Homo sapiens</i>	NP_000762
3	3_2576	CYP2C18	<i>Homo sapiens</i>	NP_000763
4	4_2557	CYP2C19	<i>Homo sapiens</i>	NP_000760
5	5_2805	CYP2C21	<i>Canis familiaris</i>	P56594
6	6_2937	CYP2C41	<i>Canis familiaris</i>	O62671
7	9_5939	CYP2C45	<i>Gallus gallus</i>	NP_001001752
8	14_2717	CYP2C25	<i>Mesocricetus auratus</i>	Q08078
9	17_2743	CYP2C28	<i>Mesocricetus auratus</i>	P33265
10	18_2807	CYP2C29	<i>Mus musculus</i>	Q64458
11	19_2916	CYP2C37	<i>Mus musculus</i>	P56654
12	20_2852	CYP2C38	<i>Mus musculus</i>	P56655
13	22_2954	CYP2C40	<i>Mus musculus</i>	P56657
14	23_6974	CYP2C44	<i>Mus musculus</i>	DAA05332
15	24_2905	CYP2C55	<i>Mus musculus</i>	NP_082365
16	25_6992	CYP2C65	<i>Mus musculus</i>	AAI18515
17	32_2837	CYP2C1	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	P00180
18	33_2761	CYP2C2	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	P00181
19	34_2738	CYP2C3	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	P00182
20	35_2896	CYP2C4	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	P11371
21	37_2675	CYP2C14	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	P17666
22	39_2974	CYP2C30	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Q29510
23	41_2753	CYP2C11	<i>Rattus norvegicus</i>	P08683
24	42_2911	CYP2C7	<i>Rattus norvegicus</i>	P05179
25	44_2968	CYP2C12	<i>Rattus norvegicus</i>	P11510
26	45_2948	CYP2C13	<i>Rattus norvegicus</i>	P20814
27	46_2902	CYP2C23	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_114027
28	49_2986	CYP2C70	<i>Rattus norvegicus</i>	P19225
29	50_5940	CYP2C33	<i>Sus scrofa</i>	NP_999579
30	51_2652	CYP2C49	<i>Sus scrofa</i>	BAB85664
31	52_7096	CYP2C8	<i>Xenopus tropicalis</i>	AAH75298

Tabelle 38: Die verwendeten Sequenzen der P450-Subfamilie CYP2D.

	Sequence ID (CYPED)	Protein	Organismus	Accession Code
1	1_2224	CYP2D6	<i>Homo sapiens</i>	P10635
2	2_2573	CYP2D14	<i>Bos taurus</i>	Q01361
3	5_2680	CYP2D15	<i>Canis familiaris</i>	Q29473
4	6_2742	CYP2D16	<i>Cavia porcellus</i>	Q64403
5	9_2703	CYP2D20	<i>Mesocricetus auratus</i>	Q9QYG5
6	11_2872	CYP2D28	<i>Mesocricetus auratus</i>	Q9QUJ1
7	12_7157	CYP2D9	<i>Mus musculus</i>	AAH94015
8	13_2899	CYP2D11	<i>Mus musculus</i>	P24457
9	14_2674	CYP2D22	<i>Mus musculus</i>	NP_062797
10	15_7155	CYP2D26	<i>Mus musculus</i>	Q8CIM7
11	16_2892	CYP2DX	<i>Mus musculus</i>	BAC37440
12	17_2881	CYP2D10	<i>Mus musculus</i>	AAH10989
13	18_2725	CYP2D13	<i>Mus musculus</i>	NP_598456
14	20_2891	CYP2DX	<i>Mus spretus</i>	AAC52246
15	21_2601	CYP2D23	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	JE0258
16	24_2769	CYP2D1	<i>Rattus norvegicus</i>	AAA41001
17	25_2707	CYP2D3	<i>Rattus norvegicus</i>	P12938
18	26_2614	CYP2D4	<i>Rattus norvegicus</i>	P13108
19	29_2786	CYP2D26	<i>Rattus norvegicus</i>	P10634
20	30_2626	CYP2D25	<i>Sus scrofa</i>	O46658
21	31_2796	CYP2D6	<i>Xenopus laevis</i>	AAH54243
22	32_5952	CYPX	<i>Xenopus laevis</i>	AAH73607

Tabelle 39: Die verwendeten Sequenzen der P450-Subfamilie CYP3A.

	Sequence ID (CYPED)	Protein	Organismus	Accession Code
1	1_2231	CYP3A4	<i>Homo sapiens</i>	NP_059488
2	2_3018	CYP3A5	<i>Homo sapiens</i>	P20815
3	3_3010	CYP3A7	<i>Homo sapiens</i>	P24462
4	4_3036	CYP3A43	<i>Homo sapiens</i>	Q9HB55
5	5_7272	CYP3A5	<i>Bos taurus</i>	AAI02567
6	6_3063	CYP3A28	<i>Bos taurus</i>	P79102
7	7_3008	CYP3A21	<i>Callithrix jacchus</i>	O18993
8	8_3022	CYP3A12	<i>Canis familiaris</i>	P24463
9	10_3080	CYP3A14	<i>Cavia porcellus</i>	Q64417
10	15_3107	CYP3A30	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Q9PVE8
11	16_3105	CYP3A37	<i>Gallus gallus</i>	CAB62060
12	19_5970	CYP3A66	<i>Macaca mulatta</i>	AAT49270
13	20_7294	CYP3A80	<i>Meleagris gallopavo</i>	ABE28023
14	21_3100	CYP3A10	<i>Mesocricetus auratus</i>	Q64148
15	22_3093	CYP3A31	<i>Mesocricetus auratus</i>	O70537
16	23_3051	CYP3A11	<i>Mus musculus</i>	Q64459
17	24_3034	CYP3A13	<i>Mus musculus</i>	Q64464
18	25_3085	CYP3A16	<i>Mus musculus</i>	Q64481
19	26_3073	CYP3A25	<i>Mus musculus</i>	O09158
20	28_3091	CYP3A44	<i>Mus musculus</i>	NP_796354
21	29_3111	CYP3A27	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	O42563
22	31_3032	CYP3A6	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	P11707
23	32_3109	CYP3A40	<i>Oryzias latipes</i>	Q98T91
24	34_3047	CYP3A1	<i>Rattus norvegicus</i>	P04800
25	35_3057	CYP3A2	<i>Rattus norvegicus</i>	P05183
26	39_7287	CYP3A62	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001019403
27	40_3030	CYP3A29	<i>Sus scrofa</i>	P79401
28	41_3029	CYP3A39	<i>Sus scrofa</i>	NP_999587

Tabelle 40: Die verwendeten Sequenzen der P450-Subfamilie CYP7A.

	Sequence ID (CYPED)	Protein	Organismus	Accession Code
1	3338	CYP7A1	<i>Cricetulus griseus</i>	P46634
2	3341	CYP7AX	<i>Danio rerio</i>	AAH54571
3	3321	CYP7A1	<i>Homo sapiens</i>	P22680
4	3335	CYP7A1	<i>Mus musculus</i>	Q64505
5	3337	CYP7A1	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	AAA74382
6	3327	CYP7A1	<i>Rattus norvegicus</i>	P18125
7	3325	CYP7AX	<i>Rattus rattus</i>	CAB57878
8	3339	CYP7A1	<i>Sus scrofa</i>	O46491
9	5992	CYP7AX	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	CAG11640

Tabelle 41: Die verwendeten Sequenzen der P450-Subfamilien CYP11A+B.

	Sequence ID (CYPED)	Protein	Organismus	Accession Code
1	3382	CYP11A1	<i>Capra hircus</i>	P79153
2	3401	CYP11A1	<i>Danio rerio</i>	AAM81210
3	3407	CYP11A1	<i>Dasyatis americana</i>	Q92045
4	3367	CYP11A1	<i>Equus caballus</i>	O46515
5	3393	CYP11AX	<i>Gallus gallus</i>	BAA18920
6	3395	CYP11AX	<i>Ictalurus punctatus</i>	AAC16550
7	3373	CYP11A1	<i>Mesocricetus auratus</i>	Q9EPT4
8	5999	CYP11A1	<i>Mus musculus</i>	AAH68264
9	3397	CYP11A1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Q07217
10	3369	CYP11AX	<i>Rattus norvegicus</i>	P14137
11	3365	CYP11A1	<i>Sus scrofa</i>	P10612
12	6000	CYP11AX	<i>Taeniopygia guttata</i>	AAT46359
13	6001	CYP11AX	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	CAF98341
14	3410	CYP11BX	<i>Anura</i>	AAB47004
15	3417	CYP11BX	<i>Cricetinae</i>	AAB31349
16	3447	CYP11BX	<i>Cricetinae</i>	AAB47144
17	3406	CYP11B1	<i>Bos taurus</i>	BAA00127
18	3441	CYP11B1	<i>Cavia porcellus</i>	2117400
19	3411	CYP11BX	<i>Cavia porcellus</i>	AAD01633
20	3368	CYP11B1	<i>Homo sapiens</i>	P15538
21	3431	CYP11B2	<i>Mus musculus</i>	P15539
22	3434	CYP11BX	<i>Mus musculus</i>	B41552
23	6002	CYP11B1	<i>Rattus norvegicus</i>	BAA00988
24	3389	CYP11B1	<i>Sus scrofa</i>	Q29552

Tabelle 42: Die verwendeten Sequenzen der P450-Subfamilien CYP17A+21A.

	Sequence ID (CYPED)	Protein	Organismus	Accession Code
1	1_3478	CYP17AX	<i>Cricetinae</i>	AAB36192
2	2_3476	CYP17AX	<i>Peromyscus leucopus</i>	AAL12229
3	3_3484	CYP17A1	<i>Mus musculus</i>	P27786
4	4_3480	CYP17A1	<i>Rattus norvegicus</i>	CAA49470
5	5_3473	CYP17AX	<i>Cavia</i>	AAB33048
6	6_3475	CYP17AX	<i>Bison bison</i>	AAG02227
7	7_3485	CYP17A1	<i>Sus scrofa</i>	CAA77878
8	8_3462	CYP17A1	<i>Equus caballus</i>	BAA06350
9	9_3465	CYP17A1	<i>Felis catus</i>	Q9GMC8
10	10_3456	CYP17A1	<i>Homo sapiens</i>	AAA52140
11	11_3490	CYP17AX	<i>Danio rerio</i>	AAP41821
12	12_3491	CYP17A1	<i>Ictalurus punctatus</i>	O73853
13	13_3487	CYP17AX	<i>Anguilla japonica</i>	AAR88432
14	14_3499	CYP17A2	<i>Monopterus albus</i>	AAP57513
15	15_3502	CYP17A1	<i>Oryzias latipes</i>	BAA13253
16	16_3495	CYP17A1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	P30437
17	17_3497	CYP17A1	<i>Rana dybowskii</i>	O57525
18	18_3488	CYP17AX	<i>Xenopus laevis</i>	AAG42003
19	19_3489	CYP17A1	<i>Gallus gallus</i>	P12394
20	20_3498	CYP17A1	<i>Squalus acanthias</i>	Q92113
21	23_3605	CYP21A1	<i>Ovis aries</i>	348374
22	24_3604	CYP21A3	<i>Sus scrofa</i>	P15540
23	25_3609	CYP21AX	<i>Canis lupus familiaris</i>	BAA92821
24	26_3599	CYP21A2	<i>Homo sapiens</i>	BAB70774
25	28_3623	CYP21AX	<i>Homo sapiens</i>	CAA41710
26	29_3622	CYP21AX	<i>Mus musculus</i>	BAA24437
27	30_3621	CYP21A1	<i>Rattus norvegicus</i>	AAD05573

Tabelle 43: Die verwendeten Sequenzen der P450-Subfamilie CYP19A.

	Sequence ID (CYPED)	Protein	Organismus	Accession Code
1	3578	CYP19AX	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	AAP23236
2	3528	CYP19AX	<i>Alligator mississippiensis</i>	AAK31803
3	3510	CYP19AX	<i>Bos taurus</i>	AAA62244
4	3507	CYP19AX	<i>Callithrix jacchus</i>	AAK58465
5	3547	CYP19A1	<i>Carassius auratus</i>	P79690
6	3574	CYP19AX	<i>Carassius auratus</i>	AAC14013
7	6006	CYP19AX	<i>Cynops pyrrhogaster</i>	BAD12119
8	3556	CYP19B	<i>Danio rerio</i>	AAG12245
9	3544	CYP19AX	<i>Dasyatis sabina Atlantic</i>	AAF04617
10	3551	CYP19AX	<i>Dicentrarchus labrax</i>	AAM95455
11	6011	CYP19AX	<i>Epinephelus akaara</i>	AAS58447
12	6013	CYP19AX	<i>Epinephelus akaara</i>	AAS58448
13	3580	CYP19B	<i>Halichoeres tenuispinis</i>	AAR37047
14	3586	CYP19AX	<i>Halichoeres tenuispinis</i>	AAR37048
15	3581	CYP19AX	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	CAC36394
16	2245	CYP19A	<i>Homo sapiens</i>	P11511
17	3561	CYP19A1	<i>Ictalurus punctatus</i>	Q92111
18	3584	CYP19AX	<i>Ictalurus punctatus</i>	AAL14612
19	6009	CYP19AX	<i>Monopterus albus</i>	AAS94314
20	3548	CYP19AX	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CAC84575
21	3566	CYP19AX	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1806325A
22	3549	CYP19AX	<i>Oreochromis mossambicus</i>	AAD31030
23	3588	CYP19AX	<i>Oreochromis niloticus</i>	AAB16814
24	3509	CYP19AX	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	CAA92574
25	3550	CYP19AX	<i>Oryzias latipes</i>	AAP83449
26	3568	CYP19AX	<i>Oryzias latipes</i>	Q92087
27	3559	CYP19AX	<i>Pimephales promelas</i>	CAC38767
28	3540	CYP19AX	<i>Pleurodeles waltl</i>	AAM95462
29	6007	CYP19AX	<i>Rana rugosa</i>	BAD21352
30	3527	CYP19AX	<i>Rattus norvegicus</i>	P22443
31	3557	CYP19AX	<i>Silurus meridionalis</i>	AAP83133
32	3585	CYP19AX	<i>Silurus meridionalis</i>	AAP83132
33	3516	CYP19A3	<i>Sus scrofa</i>	P79304
34	3526	CYP19A2	<i>Sus scrofa</i>	AAB61697
35	3530	CYP19A1	<i>Taeniopygia guttata</i>	Q92112
36	3529	CYP19AX	<i>Trachemys scripta</i>	AAG09376
37	3539	CYP19AX	<i>Xenopus laevis</i>	BAA90529

9.2 Distanzmatrizen

Tabelle 44: Distanz-/Similaritäts-Matrix der CYP2B-Sequenzen.

Subfamilie CYP2B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 1_2222_CYP2B6_Homo_sapiens		78,0	74,1	71,3	75,8	71,1	74,7	77,4	74,9	67,2	72,1	71,9	46,7	46,8	48,5
2 3_2491_CYP2B11_Canis_familiaris	0,220		73,1	71,5	75,4	72,3	73,9	79,2	74,1	67,6	71,3	70,9	49,5	49,2	51,3
3 7_2750_CYP2B29_Mesocricetus_	0,259	0,269		74,7	79,2	74,9	76,8	74,3	80,0	70,9	74,1	73,9	49,2	47,9	49,7
4 8_2775_CYP2B9_Mus_musculus	0,287	0,285	0,253		83,7	89,4	79,6	72,5	80,2	77,0	78,0	76,8	46,7	48,3	47,2
5 9_2671_CYP2B10_Mus_musculus	0,242	0,246	0,208	0,163		82,9	81,9	77,2	88,8	75,6	78,8	79,2	48,6	47,7	49,9
6 10_2783_CYP2B13_Mus_musculus	0,289	0,277	0,251	0,106	0,171		79,4	72,3	80,2	76,2	77,8	77,2	46,9	46,6	48,7
7 11_2701_CYP2B19_Mus_musculus	0,253	0,261	0,232	0,204	0,181	0,206		76,2	82,5	74,5	87,2	86,4	49,9	48,4	48,9
8 13_2526_CYP2B4_Oryctolagus_	0,226	0,208	0,257	0,275	0,228	0,277	0,238		77,2	68,8	72,9	74,3	49,0	48,9	50,3
9 16_2637_CYP2B2_Rattus_norvegicus	0,251	0,259	0,200	0,198	0,112	0,198	0,175	0,228		76,6	79,8	80,7	51,2	49,3	51,5
10 17_2826_CYP2B3_Rattus_norvegicus	0,328	0,324	0,291	0,230	0,244	0,238	0,255	0,312	0,234		71,5	71,5	46,9	47,0	45,6
11 18_2757_CYP2B12_Rattus_norvegicus	0,279	0,287	0,259	0,220	0,212	0,222	0,128	0,271	0,202	0,285		89,6	48,5	48,6	48,7
12 19_2734_CYP2B15_Rattus_norvegicus	0,281	0,291	0,261	0,232	0,208	0,228	0,136	0,257	0,193	0,285	0,104		48,2	48,3	48,7
13 20_2774_CYP2BX_Xenopus_laevis	0,533	0,505	0,508	0,533	0,514	0,531	0,501	0,510	0,488	0,531	0,515	0,518		80,0	53,8
14 21_2782_CYP2BX_Xenopus_laevis	0,532	0,508	0,521	0,517	0,523	0,534	0,516	0,511	0,507	0,530	0,514	0,517	0,200		54,9
15 22_6964_CYP2BX_Xenopus_laevis	0,515	0,487	0,503	0,528	0,501	0,513	0,511	0,497	0,485	0,544	0,513	0,513	0,462	0,451	

Tabelle 45: Distanz-/Similaritäts-Matrix der CYP2C-Sequenzen.

Subfamilie CYP2C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31				
1_1_2488_CYP2C8_Homo_sapiens	78.0	77.1	78.2	66.5	70.8	57.8	74.7	73.5	71.2	68.2	71.6	65.1	60.2	71.8	72.9	71.5	71.4	65.6	73.3	73.7	62.8	73.7	62.8	73.7	68.6	64.5	64.9	58.4	60.5	61.8	75.5	45.4			
2_2_2604_CYP2C9_Homo_sapiens	0.220	81.8	91.4	69.0	75.3	58.0	76.5	75.7	73.1	72.0	66.1	61.8	74.3	75.5	74.4	72.2	68.9	77.4	74.3	64.2	76.1	71.6	66.5	66.9	59.2	62.4	63.1	78.2	43.4						
3_3_2576_CYP2C18_Homo_sapiens	0.229	0.182	80.8	69.4	75.5	56.9	76.9	76.9	76.5	73.5	74.1	66.5	60.2	76.1	74.7	76.5	73.7	67.7	77.4	77.3	64.4	77.1	71.0	67.6	68.2	58.2	61.8	61.2	80.2	44.4					
4_4_2587_CYP2C19_Homo_sapiens	0.218	0.086	0.192	70.0	74.8	57.3	76.9	74.9	74.7	72.2	71.8	66.1	62.2	72.7	74.7	71.6	68.5	72.2	74.7	74.6	74.7	64.6	71.6	65.7	63.2	61.6	61.0	58.5	67.9	59.8	70.6	43.4			
5_5_2805_CYP2C1_Canis_familiaris	0.335	0.310	0.306	0.300	69.8	57.1	67.8	64.9	66.7	65.5	66.3	60.6	58.1	65.3	64.1	67.5	65.1	74.5	67.6	67.4	71.6	65.7	63.2	61.6	61.0	58.5	67.9	59.8	70.6	43.4					
6_6_2937_CYP2C41_Canis_familiaris	0.292	0.247	0.245	0.252	0.302	55.4	71.8	70.8	71.0	70.8	67.7	66.1	61.8	69.1	70.3	71.2	69.7	68.6	72.6	72.8	64.8	70.3	66.9	65.8	65.8	66.9	58.9	61.1	60.7	77.7	43.9				
7_9_5939_CYP2C45_Gallus_gallus	0.422	0.420	0.431	0.427	0.429	0.446	56.1	55.7	57.1	54.3	54.1	49.8	55.3	54.1	55.7	55.8	55.5	55.8	56.7	55.3	51.1	56.1	51.6	50.8	50.0	55.1	54.0	56.1	58.4	47.6					
8_14_2717_CYP2C25_Mesocricetus	0.253	0.235	0.231	0.231	0.322	0.282	0.439	71.2	85.5	76.5	80.6	68.6	60.4	71.6	72.2	71.9	69.4	65.8	74.7	72.2	63.2	74.5	79.6	68.8	69.8	57.6	62.8	60.4	74.5	44.4					
9_17_2745_CYP2C28_Mesocricetus	0.265	0.243	0.231	0.251	0.351	0.292	0.443	0.288	69.6	69.8	69.4	63.9	59.2	84.9	69.8	73.7	70.8	65.0	72.7	74.7	62.0	73.5	65.9	63.3	70.0	70.8	58.2	61.3	58.8	72.7	44.6				
10_18_2807_CYP2C29_Mus_musculus	0.288	0.243	0.235	0.253	0.333	0.290	0.429	0.145	0.304	76.9	84.7	69.0	60.4	71.2	73.1	70.6	69.2	64.2	73.9	70.8	62.2	73.5	62.2	73.5	83.3	70.0	70.8	58.2	61.3	58.8	72.7	43.8			
11_19_2916_CYP2C37_Mus_musculus	0.318	0.269	0.265	0.278	0.345	0.292	0.457	0.235	0.302	0.231	74.3	71.4	59.4	69.6	70.0	70.4	68.2	62.8	72.3	71.2	61.3	71.4	70.0	71.0	72.7	56.7	59.7	58.0	72.2	43.4					
12_20_2852_CYP2C38_Mus_musculus	0.284	0.280	0.259	0.282	0.337	0.323	0.459	0.194	0.306	0.153	0.257	70.0	58.6	70.0	68.6	69.4	66.9	61.8	71.0	70.0	60.5	71.4	79.8	69.4	70.2	57.6	59.1	60.0	70.8	42.1					
13_22_2954_CYP2C40_Mus_musculus	0.349	0.339	0.335	0.339	0.394	0.339	0.502	0.314	0.361	0.310	0.286	0.300	52.7	64.9	63.7	62.5	62.2	58.9	62.6	64.1	58.5	64.6	68.2	77.8	79.6	50.4	55.6	53.9	66.1	40.4					
14_23_6974_CYP2C44_Mus_musculus	0.398	0.382	0.398	0.378	0.419	0.384	0.447	0.396	0.408	0.396	0.406	0.414	0.473	58.4	61.4	60.0	58.6	59.1	61.2	59.8	55.0	61.0	56.3	54.3	55.5	84.4	53.0	74.7	62.0	43.4					
15_24_2905_CYP2C55_Mus_musculus	0.282	0.257	0.239	0.273	0.347	0.309	0.459	0.284	0.151	0.288	0.304	0.300	0.351	0.416	70.0	74.0	70.2	64.6	72.7	74.1	62.0	75.7	66.7	64.1	64.9	55.9	60.7	58.0	73.7	43.8					
16_25_6992_CYP2C65_Mus_musculus	0.271	0.245	0.253	0.243	0.359	0.297	0.443	0.278	0.302	0.269	0.300	0.314	0.363	0.386	0.300	70.0	66.7	66.5	72.5	66.8	61.8	71.4	68.0	62.4	63.3	58.0	61.3	62.2	73.7	43.8					
17_32_2837_CYP2C1_Oryctolagus	0.285	0.256	0.235	0.258	0.325	0.288	0.442	0.281	0.263	0.294	0.296	0.306	0.375	0.400	0.260	0.300	84.0	64.9	73.4	83.3	63.5	71.7	65.8	62.1	63.3	57.5	61.6	59.8	75.2	43.2					
18_33_2761_CYP2C2_Oryctolagus	0.286	0.278	0.263	0.284	0.349	0.303	0.445	0.306	0.292	0.308	0.318	0.331	0.378	0.414	0.298	0.333	0.160	65.0	70.8	81.2	63.4	70.2	64.3	61.6	62.7	57.1	59.1	59.8	74.1	42.3					
19_34_2738_CYP2C3_Oryctolagus	0.344	0.311	0.323	0.315	0.255	0.314	0.442	0.342	0.350	0.358	0.372	0.382	0.411	0.409	0.354	0.335	0.351	0.350	66.9	66.7	74.8	66.3	61.1	59.3	58.1	56.2	67.7	58.7	69.5	43.4					
20_35_2896_CYP2C4_Oryctolagus	0.267	0.226	0.226	0.228	0.324	0.274	0.433	0.253	0.273	0.261	0.277	0.290	0.374	0.388	0.273	0.275	0.266	0.292	0.331	74.3	63.0	73.5	69.6	64.9	66.1	58.3	61.5	60.2	74.7	43.4					
21_37_2875_CYP2C14_Oryctolagus	0.263	0.257	0.227	0.253	0.326	0.272	0.447	0.278	0.253	0.292	0.288	0.300	0.359	0.402	0.259	0.312	0.167	0.188	0.333	0.257	84.8	74.9	66.9	64.5	66.3	57.6	61.3	60.4	76.3	43.4					
22_39_2974_CYP2C30_Oryctolagus	0.372	0.358	0.356	0.354	0.284	0.362	0.489	0.368	0.380	0.378	0.387	0.395	0.415	0.450	0.380	0.382	0.365	0.366	0.252	0.370	0.352	63.6	60.3	58.7	58.3	54.4	63.6	56.0	64.8	41.0					
23_41_2753_CYP2C11_Rattus_norvegicus	0.263	0.239	0.229	0.253	0.343	0.297	0.439	0.255	0.265	0.266	0.286	0.354	0.390	0.243	0.286	0.283	0.298	0.337	0.265	0.251	0.364	69.2	65.7	65.7	59.0	59.7	60.8	74.1	43.4						
24_42_2911_CYP2C7_Rattus_norvegicus	0.314	0.284	0.290	0.280	0.368	0.331	0.484	0.204	0.341	0.167	0.300	0.202	0.318	0.437	0.333	0.320	0.342	0.357	0.389	0.304	0.331	0.397	0.308	69.0	69.4	55.3	58.5	56.3	68.2	41.7					
25_44_2968_CYP2C12_Rattus_norvegicus	0.355	0.335	0.324	0.322	0.384	0.342	0.492	0.312	0.367	0.300	0.290	0.306	0.222	0.457	0.359	0.376	0.379	0.384	0.407	0.351	0.355	0.413	0.343	0.310	80.0	52.4	55.8	52.7	64.9	41.1					
26_45_2948_CYP2C13_Rattus_norvegicus	0.351	0.331	0.318	0.333	0.390	0.331	0.500	0.302	0.347	0.292	0.273	0.298	0.204	0.445	0.351	0.367	0.367	0.373	0.419	0.339	0.337	0.417	0.343	0.306	0.200	52.4	56.2	54.5	65.7	40.5					
27_46_2902_CYP2C23_Rattus_norvegicus	0.416	0.408	0.418	0.402	0.435	0.411	0.449	0.424	0.433	0.418	0.433	0.424	0.496	0.156	0.441	0.420	0.425	0.429	0.438	0.417	0.424	0.456	0.410	0.447	0.476	0.476	50.9	73.9	59.4	42.3					
28_49_2896_CYP2C70_Rattus_norvegicus	0.395	0.376	0.382	0.382	0.321	0.389	0.460	0.372	0.411	0.387	0.403	0.409	0.444	0.470	0.393	0.387	0.384	0.409	0.323	0.385	0.387	0.364	0.403	0.405	0.442	0.438	0.491	55.8	62.4	41.8					
29_50_5940_CYP2C33_Sus_scrofa	0.382	0.369	0.368	0.373	0.402	0.393	0.439	0.396	0.422	0.412	0.420	0.400	0.461	0.253	0.420	0.378	0.402	0.402	0.413	0.398	0.396	0.440	0.392	0.437	0.473	0.455	0.261	0.442	61.8	43.1					
30_51_2652_CYP2C49_Sus_scrofa	0.245	0.218	0.198	0.224	0.284	0.223	0.416	0.255	0.255	0.273	0.278	0.339	0.360	0.263	0.263	0.380	0.263	0.248	0.259	0.305	0.253	0.237	0.350	0.259	0.318	0.351	0.343	0.406	0.376	0.382	45.2				
31_52_7096_CYP2C8_Xenopus_tropicalis	0.546	0.566	0.556	0.560	0.566	0.561	0.524	0.556	0.564	0.554	0.566	0.579	0.596	0.566	0.562	0.562	0.568	0.577	0.566	0.566	0.590	0.566	0.590	0.566	0.589	0.589	0.577	0.562	0.569	0.548					

Tabelle 46: Distanz-/Similaritäts-Matrix der CYP2D-Sequenzen.

Subfamilie CYP2D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1_1_2224_CYP2D6_Homo_sapiens	0,220	0,245	0,245	0,274	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260	0,244	0,332	0,378	0,388	0,352	0,276	0,270	0,145	0,245	0,294	0,310	0,308
2_2_2573_CYP2D14_Bos_taurus		0,220	0,245	0,274	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260	0,244	0,332	0,378	0,388	0,352	0,276	0,270	0,145	0,245	0,294	0,310	0,308
3_5_2880_CYP2D15_Canis_familiaris			0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260	0,244	0,332	0,378	0,388	0,352	0,276	0,270	0,145	0,245	0,294	0,310	0,308
4_6_2742_CYP2D16_Cavia_porcellus				0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260	0,244	0,332	0,378	0,388	0,352	0,276	0,270	0,145	0,245	0,294	0,310
5_9_2703_CYP2D20_Mesocricetus					0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260	0,244	0,332	0,378	0,388	0,352	0,276	0,270	0,145	0,245	0,294
6_11_2872_CYP2D28_Mesocricetus						0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260	0,244	0,332	0,378	0,388	0,352	0,276	0,270	0,145	0,245
7_12_7157_CYP2D9_Mus_musculus							0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260	0,244	0,332	0,378	0,388	0,352	0,276	0,270	0,145
8_13_2899_CYP2D11_Mus_musculus								0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260	0,244	0,332	0,378	0,388	0,352	0,276	0,270
9_14_2674_CYP2D22_Mus_musculus									0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260	0,244	0,332	0,378	0,388	0,352	0,276
10_15_7155_CYP2D26_Mus_musculus										0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260	0,244	0,332	0,378	0,388	0,352
11_16_2892_CYP2DX_Mus_musculus											0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260	0,244	0,332	0,378	0,388
12_17_2881_CYP2D10_Mus_musculus												0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260	0,244	0,332	0,378
13_18_2725_CYP2D13_Mus_musculus													0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260	0,244	0,332
14_20_2891_CYP2DX_Mus_spretus														0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260	0,244
15_21_2601_CYP2D23_Oryctolagus															0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318	0,260
16_24_2769_CYP2D1_Rattus_norvegicus																0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362	0,318
17_25_2707_CYP2D3_Rattus_norvegicus																	0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349	0,362
18_26_2614_CYP2D4_Rattus_norvegicus																		0,220	0,245	0,268	0,300	0,288	0,349
19_29_2786_CYP2D26_Rattus_norvegicus																			0,220	0,245	0,268	0,300	0,288
20_30_2626_CYP2D25_Sus_scrofa																				0,220	0,245	0,268	0,300
21_31_2796_Xenopus_laevis																					0,220	0,245	0,268
22_32_5952_Xenopus_laevis																						0,220	0,245

Tabelle 47: Distanz-/Similaritäts-Matrix der CYP3A-Sequenzen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28			
Subfamilie CYP3A																															
1 1_2231_CYP3A4_Homo_sapiens	84,3	88,3	75,7	77,1	72,4	89,7	79,5	72,0	59,4	59,2	83,7	59,0	67,2	70,0	72,8	75,3	70,6	71,2	69,6	54,7	75,8	56,5	73,6	72,2	71,6	76,5	75,9				
2 2_3018_CYP3A5_Homo_sapiens	0,157	81,7	75,7	75,9	72,5	84,5	78,3	70,9	57,3	58,9	91,4	59,3	67,9	68,7	73,1	74,5	70,1	71,1	70,1	53,2	75,2	55,6	72,5	70,9	73,6	75,9	74,9				
3 3_3010_CYP3A7_Homo_sapiens	0,117	0,183	71,2	75,3	69,4	85,5	75,0	69,6	57,8	58,4	79,9	57,2	64,2	67,4	70,2	72,2	68,2	67,4	67,0	53,3	73,1	55,3	70,6	69,4	69,8	72,8	71,2				
4 4_3036_CYP3A43_Homo_sapiens	0,243	0,243	0,288	70,0	67,8	75,7	73,0	64,4	53,3	56,0	75,1	55,6	61,6	62,6	64,6	67,4	63,0	66,4	62,8	51,3	71,3	51,5	63,8	63,6	67,0	68,2	68,0				
5 5_7272_CYP3A5_Bos_taurus	0,229	0,241	0,247	0,300	79,1	75,1	77,5	70,4	58,6	60,8	75,3	57,6	65,8	68,0	69,4	70,4	68,0	68,6	67,4	54,7	74,7	57,1	69,6	68,2	68,4	79,5	78,1				
6 6_3063_CYP3A28_Bos_taurus	0,276	0,275	0,306	0,322	0,209	72,0	76,3	65,8	59,0	71,2	57,3	63,8	64,6	67,0	70,2	64,6	67,4	63,4	54,4	71,1	55,5	65,6	64,2	69,2	78,5	76,5					
7 7_3008_CYP3A21_Calithrix_jacchus	0,103	0,155	0,145	0,243	0,249	0,280	78,1	70,8	59,8	61,6	83,1	60,2	67,6	69,0	72,8	75,0	69,4	71,4	69,4	55,3	75,6	57,3	72,2	71,4	71,2	74,6	73,8				
8 8_3022_CYP3A12_Canis_familiaris	0,205	0,217	0,250	0,270	0,225	0,237	0,219	68,8	57,6	59,8	76,1	59,2	67,0	67,0	70,4	73,8	67,8	68,2	68,4	56,3	75,6	57,1	69,6	69,4	73,8	79,9	80,5				
9 10_3080_CYP3A14_Cavia_porcellus	0,290	0,291	0,304	0,356	0,296	0,342	0,292	0,312	55,4	56,6	69,0	55,0	66,6	70,0	70,2	68,6	67,8	69,2	66,8	51,7	71,9	54,5	70,6	68,8	68,0	68,4	68,0				
10 15_3107_CYP3A30_Fundulus_	0,406	0,427	0,422	0,467	0,414	0,435	0,402	0,424	0,446	57,4	58,4	58,6	55,0	55,6	55,7	56,6	53,2	56,0	53,0	72,6	57,4	86,1	56,5	55,3	57,0	57,6	58,0				
11 16_3105_CYP3A37_Gallus_gallus	0,408	0,411	0,416	0,440	0,392	0,410	0,384	0,402	0,434	0,426	60,0	60,0	55,8	55,8	57,3	59,8	56,3	57,8	55,7	57,9	59,8	56,6	57,9	56,9	57,9	61,0	60,2				
12 19_5970_CYP3A66_Macaca_mulatta	0,163	0,086	0,201	0,249	0,247	0,288	0,169	0,239	0,310	0,416	0,400	58,8	66,8	69,6	72,6	74,0	69,6	69,6	69,6	70,4	74,8	73,8	70,4	74,8	73,8						
13 20_7294_CYP3A80_Meleagris_	0,410	0,407	0,428	0,444	0,424	0,427	0,398	0,408	0,450	0,414	0,400	0,412	54,6	56,2	57,7	58,8	54,7	57,2	56,7	55,2	58,4	60,1	57,1	56,9	57,9	58,4	59,4				
14 21_3100_CYP3A10_Mesocricetus_	0,328	0,321	0,358	0,384	0,342	0,362	0,324	0,330	0,334	0,450	0,442	0,332	0,454	66,4	69,2	67,8	66,8	80,5	67,0	53,1	65,9	54,9	68,8	66,6	67,2	65,4	65,2				
15 22_3093_CYP3A31_Mesocricetus_	0,300	0,313	0,326	0,374	0,320	0,354	0,310	0,330	0,300	0,444	0,442	0,304	0,438	0,336	81,0	68,6	76,0	67,4	77,6	52,1	69,3	54,3	81,6	81,0	68,4	66,8	67,0				
16 23_3051_CYP3A11_Mus_musculus	0,272	0,269	0,298	0,354	0,306	0,330	0,272	0,296	0,298	0,443	0,427	0,274	0,423	0,308	0,190	71,0	87,3	70,2	89,9	51,8	72,1	54,6	87,3	85,3	68,8	68,8	67,8				
17 24_3034_CYP3A13_Mus_musculus	0,247	0,255	0,278	0,326	0,296	0,298	0,250	0,262	0,314	0,414	0,402	0,260	0,412	0,322	0,314	0,290	66,8	69,8	67,4	55,3	73,1	58,6	70,6	69,8	78,5	71,4	72,0				
18 25_3085_CYP3A16_Mus_musculus	0,294	0,299	0,318	0,370	0,320	0,354	0,306	0,322	0,322	0,466	0,437	0,304	0,453	0,332	0,240	0,127	0,332	67,6	86,5	51,0	68,5	52,4	83,5	81,7	65,0	67,0	66,0				
19 26_3073_CYP3A25_Mus_musculus	0,288	0,289	0,326	0,336	0,314	0,326	0,286	0,318	0,308	0,440	0,422	0,304	0,428	0,195	0,326	0,298	0,302	0,324	68,6	53,1	67,5	54,5	70,4	67,8	69,2	67,8	67,6				
20 28_3091_CYP3A44_Mus_musculus	0,304	0,299	0,330	0,372	0,326	0,366	0,306	0,316	0,332	0,470	0,443	0,302	0,433	0,330	0,224	0,101	0,326	0,135	0,314	50,0	68,3	52,4	83,3	81,9	66,0	65,8	64,8				
21 29_3111_CYP3A27_Oncomyrmex_	0,453	0,468	0,467	0,487	0,453	0,456	0,447	0,437	0,483	0,274	0,421	0,451	0,448	0,469	0,479	0,482	0,447	0,490	0,469	0,500	54,5	72,3	53,2	53,4	53,3	55,1	56,3				
22 31_3032_CYP3A6_Ornycotlagus_	0,242	0,248	0,269	0,287	0,253	0,289	0,244	0,244	0,281	0,426	0,402	0,250	0,416	0,341	0,307	0,279	0,269	0,315	0,325	0,317	0,455	55,8	71,3	68,7	71,9	72,9	72,9				
23 32_3109_CYP3A40_Ornycotlagus_	0,435	0,444	0,447	0,485	0,429	0,445	0,427	0,429	0,455	0,139	0,434	0,437	0,399	0,451	0,457	0,454	0,414	0,476	0,455	0,476	0,277	0,442	54,2	54,4	55,8	57,5	58,8				
24 34_3047_CYP3A1_Rattus_norvegicus	0,264	0,275	0,294	0,362	0,304	0,344	0,278	0,304	0,294	0,435	0,421	0,278	0,429	0,312	0,184	0,127	0,294	0,165	0,296	0,167	0,468	0,287	0,468	88,9	70,2	69,0	68,6				
25 35_3057_CYP3A2_Rattus_norvegicus	0,278	0,291	0,306	0,364	0,318	0,358	0,286	0,306	0,312	0,447	0,431	0,292	0,431	0,334	0,190	0,147	0,302	0,183	0,322	0,181	0,466	0,313	0,456	0,111	68,0	67,2	67,4				
26 39_7287_CYP3A62_Rattus_norvegicus	0,284	0,264	0,302	0,330	0,316	0,308	0,288	0,262	0,320	0,430	0,421	0,296	0,421	0,328	0,316	0,312	0,215	0,350	0,308	0,340	0,467	0,281	0,442	0,298	0,320	70,6	70,6				
27 40_3030_CYP3A29_Sus_scrofa	0,235	0,241	0,272	0,318	0,205	0,215	0,254	0,201	0,316	0,424	0,390	0,252	0,416	0,346	0,332	0,312	0,286	0,330	0,322	0,342	0,449	0,271	0,425	0,310	0,328	0,294	88,9				
28 41_3029_CYP3A39_Sus_scrofa	0,241	0,251	0,288	0,320	0,219	0,235	0,262	0,195	0,320	0,420	0,398	0,262	0,406	0,348	0,330	0,322	0,280	0,340	0,324	0,352	0,437	0,271	0,412	0,314	0,326	0,294	0,111				

Tabelle 48: Distanz-/Similaritäts-Matrix der CYP17A+21A-Sequenzen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27								
Subfamilie CYP17A+21A																																			
1_1_3478_CYP17AX_Cricetinae	0,175	82,5	77,1	76,9	69,3	65,8	62,2	70,3	68,3	68,5	44,9	44,4	46,5	44,2	45,7	45,5	44,6	46,1	47,2	47	31,1	30,6	30	31,1	23,5	30,6	31,3								
2_2_3476_CYP17AX_Peromyscus leucopus			78,6	78,2	69,4	65,3	61,4	68,6	68	69,4	45,5	44,3	47,8	44,4	46,1	45,1	45,8	46,4	48,3	46,1	31,2	30,9	30,1	29,4	22,7	30,3	31,3								
3_3_3484_CYP17A1_Mus musculus				83,2	68	62,5	59,4	67,3	64,9	66,5	45,1	43,7	45	44,3	45,6	46,4	45	46,6	46,5	44,9	30,6	30,5	30,1	29,6	21,8	30,4	30,2								
4_4_3480_CYP17A1_Rattus norvegicus					88,4	64,3	61,2	69	65,9	68,2	46,9	44,1	46,6	43,9	47,3	46,4	45	46,8	48,1	45,7	30,6	30,3	30,3	30,2	21,8	31	31,7								
5_5_3473_CYP17AX_Cavia						63,8	60,7	69,1	67,5	70,1	46,4	44,4	47,3	44,4	46,1	45,9	48,1	46,1	45,4	45,4	30,6	29,2	28,5	28,6	20,4	29,3	30,4								
6_6_3475_CYP17AX_Bison bison							76	73,8	74	70,7	45,5	45	47,1	46,4	47,2	45,7	45,9	46,9	47,2	47	30,7	31,2	28,7	30,2	21,20	29,20	30,3								
7_7_3485_CYP17A1_Sus scrofa								67,1	69,7	65,3	44,7	43,3	46,2	42,8	43,8	43,8	44,8	45,1	45,8	45,5	30,7	31	28,7	29,4	22,1	30,4	31,1								
8_8_3462_CYP17A1_Equus caballus									80,7	79,1	50	49	52,1	48,2	49,3	49,3	48,9	49,5	50,2	47,8	31,6	31,3	30,4	30,4	22,3	30,1	31								
9_9_3465_CYP17A1_Felis catus										77,6	49,2	48,2	51,9	47,8	47	48,3	48,5	49,3	49,2	47,4	32,2	32,2	30,8	31,3	23,5	31	32,4								
10_10_3456_CYP17A1_Homo sapiens											48	46,4	48,5	46,6	46,3	47,3	46,1	48,1	47,2	45,8	30,8	30,7	28,5	28,9	20,1	29,7	30,6								
11_11_3490_CYP17AX_Danio rerio												79,6	75,6	69,9	68,3	73,3	66,9	66,4	64,1	61,1	32	33,4	31,5	31,8	22,5	30,1	31,1								
12_12_3491_CYP17A1_Ictalurus punctatus													75,4	69,8	69,8	73,2	65,4	64,9	63,1	59,6	32,5	33,7	31,4	31,9	21,6	28,9	29,5								
13_13_3487_CYP17AX_Anguilla japonica														70,9	72,9	74,2	67,5	65,2	66,5	61,7	33,3	34,2	32,5	31,6	23,2	31,6	32								
14_14_3499_CYP17A2_Monopterus albus															76,3	76	61,3	61,6	61,3	57	32,3	33,3	30,9	31,7	23,7	29,4	30,8								
15_15_3502_CYP17A1_Oryzias latipes																75,6	62,6	61,6	64,3	57,1	31,1	33,2	30,7	30,4	21	29,2	29,7								
16_16_3495_CYP17A1_Oncorhynchus mykiss																	62,4	63,1	60	31,3	32,5	30,5	30,9	21,6	29	30,5									
17_17_3497_CYP17A1_Rana dybowskii																		77,1	66,3	58,3	31,5	32,4	30,5	29,8	22,2	30,4	30,4								
18_18_3488_CYP17AX_Xenopus laevis																			67,7	57,8	32,2	32,8	31,9	30,8	21,8	29,9	29,7								
19_19_3489_CYP17A1_Gallus gallus																				58,2	34,9	34,9	34,2	33	24,9	31,5	32,4								
20_20_3498_CYP17A1_Squalus acanthias																					31,8	32,8	31,4	30,3	21,8	29,3	29,5								
21_23_3605_CYP21A1_Ovis aries																								87,4	81,1	78	64,9	70	69,7						
22_24_3604_CYP21A3_Sus scrofa																								80,8	78,2	65,7	71,2	70							
23_25_3609_CYP21AX_Canis lupus familiaris																																			
24_26_3599_CYP21A2_Homo sapiens																																			
25_28_3623_CYP21AX_Homo sapiens																																			
26_29_3622_CYP21AX_Mus musculus																																			
27_30_3621_CYP21A1_Rattus norvegicus																																			

9.3 Auswertung der MD-Simulationen

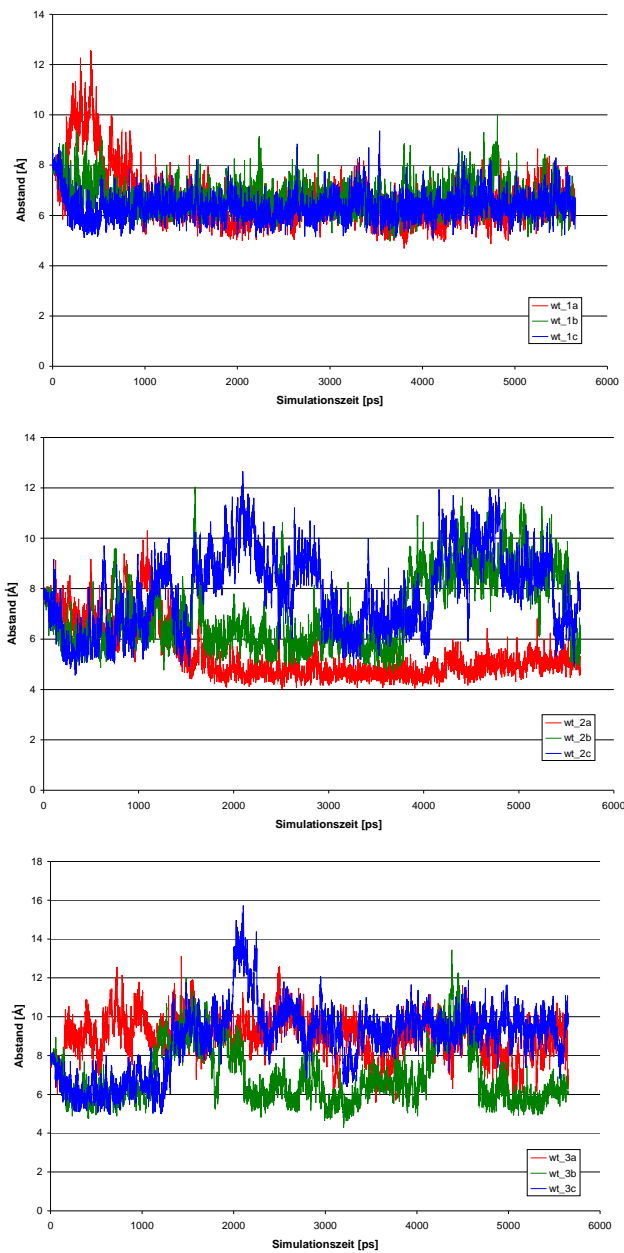


Abbildung 81: Verlauf der Öffnung des Substratzugangskanals während der Simulationen des Wildtyp-Enzyms mit dem Substrat β -Ionon. Es wurde der Abstand zwischen den C α -Atomen der beiden Aminosäuren P45 und A191 während der Simulation gemessen.

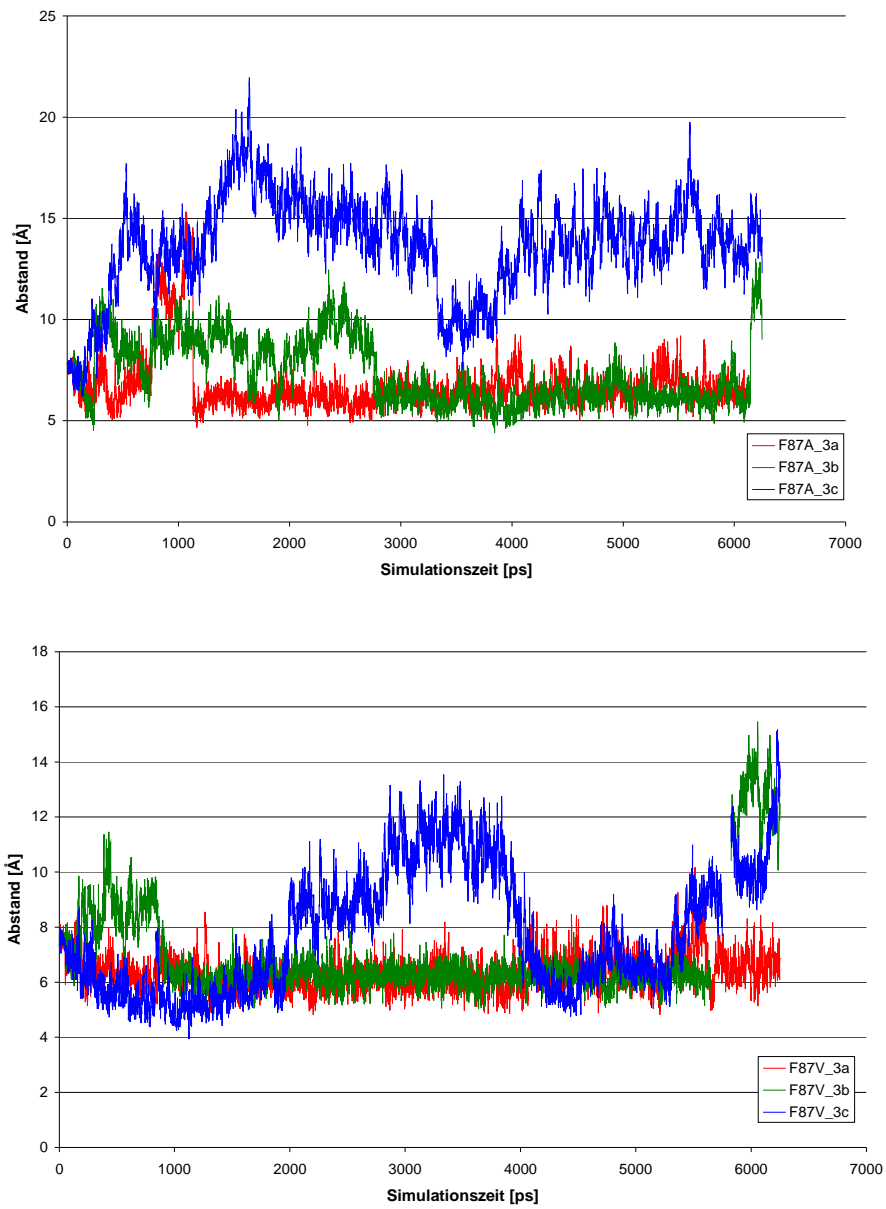


Abbildung 82: Verlauf der Öffnung des Substratzugangskanals während der Simulationen der Mutanten F87A und F87V mit dem Substrat β -Ionon. Es wurde der Abstand zwischen den C_{α} -Atomen der beiden Aminosäuren P45 und A191 während der Simulation gemessen.

10 Literaturverzeichnis

1. Omura, T.; Sato, R., A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* **1962**, 237, 1375-1376.
2. Nebert, D. W.; Nelson, D. R.; Feyereisen, R., Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica* **1989**, 19, 10, 1149-1160.
3. Nebert, D. W.; Nelson, D. R.; Adesnik, M.; Coon, M. J.; Estabrook, R. W.; Gonzalez, F. J.; Guengerich, F. P., et al., The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA* **1989**, 8, 1, 1-13.
4. Nelson, D. R.; Kamataki, T.; Waxman, D. J.; Guengerich, F. P.; Estabrook, R. W.; Feyereisen, R.; Gonzalez, F. J., et al., The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* **1993**, 12, 1, 1-51.
5. Nelson, D. R.; Koymans, L.; Kamataki, T.; Stegeman, J. J.; Feyereisen, R.; Waxman, D. J.; Waterman, M. R., et al., P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **1996**, 6, 1, 1-42.
6. Nelson, D. R., Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods Mol Biol* **2006**, 320, 1-10.
7. Poulos, T. L.; Finzel, B. C.; Howard, A. J., High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J Mol Biol* **1987**, 195, 3, 687-700.
8. Ravichandran, K. G.; Boddupalli, S. S.; Hasemann, C. A.; Peterson, J. A.; Deisenhofer, J., Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science* **1993**, 261, 5122, 731-736.
9. Hasemann, C. A.; Ravichandran, K. G.; Peterson, J. A.; Deisenhofer, J., Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* **1994**, 236, 4, 1169-1185.
10. Cupp-Vickery, J. R.; Poulos, T. L., Structure of cytochrome P450eryF involved in erythromycin biosynthesis. *Nat Struct Biol* **1995**, 2, 2, 144-153.
11. Park, S. Y.; Shimizu, H.; Adachi, S.; Nakagawa, A.; Tanaka, I.; Nakahara, K.; Shoun, H., et al., Crystal structure of nitric oxide reductase from denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*. *Nat Struct Biol* **1997**, 4, 10, 827-832.

12. Williams, P. A.; Cosme, J.; Sridhar, V.; Johnson, E. F.; McRee, D. E., Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell* **2000**, *5*, *1*, 121-131.
13. Cosme, J.; Johnson, E. F., Engineering microsomal cytochrome P450 2C5 to be a soluble, monomeric enzyme. Mutations that alter aggregation, phospholipid dependence of catalysis, and membrane binding. *J Biol Chem* **2000**, *275*, *4*, 2545-2553.
14. Williams, P. A.; Cosme, J.; Ward, A.; Angove, H. C.; Matak Vinkovic, D.; Jhoti, H., Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* **2003**, *424*, *6947*, 464-468.
15. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N., et al., The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **2000**, *28*, *1*, 235-242.
16. Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I., Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev* **2005**, *105*, *6*, 2253-2277.
17. Orengo, C. A.; Michie, A. D.; Jones, S.; Jones, D. T.; Swindells, M. B.; Thornton, J. M., CATH--a hierarchic classification of protein domain structures. *Structure* **1997**, *5*, *8*, 1093-1108.
18. Peterson, J. A.; Graham, S. E., A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes P450. *Structure* **1998**, *6*, *9*, 1079-1085.
19. Werck-Reichhart, D.; Feyereisen, R., Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* **2000**, *1*, *6*, REVIEWS3003.
20. Reedy, C. J.; Gibney, B. R., Heme protein assemblies. *Chem Rev* **2004**, *104*, *2*, 617-649.
21. Hulo, N.; Bairoch, A.; Bulliard, V.; Cerutti, L.; De Castro, E.; Langendijk-Genevaux, P. S.; Pagni, M., et al., The PROSITE database. *Nucleic Acids Res* **2006**, *34*, *Database issue*, D227-230.
22. Williams, P. A.; Cosme, J.; Sridhar, V.; Johnson, E. F.; McRee, D. E., Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features. *J Inorg Biochem* **2000**, *81*, *3*, 183-190.
23. Bridges, A.; Gruenke, L.; Chang, Y. T.; Vakser, I. A.; Loew, G.; Waskell, L., Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* **1998**, *273*, *27*, 17036-17049.
24. Shank-Retzlaff, M. L.; Raner, G. M.; Coon, M. J.; Sligar, S. G., Membrane topology of cytochrome P450 2B4 in Langmuir-Blodgett monolayers. *Arch Biochem Biophys* **1998**, *359*, *1*, 82-88.

-
25. Otyepka, M.; Skopalik, J.; Anzenbacherova, E.; Anzenbacher, P., What common structural features and variations of mammalian P450s are known to date? *Biochim Biophys Acta* **2007**, 1770, 3, 376-389.
 26. Cojocaru, V.; Winn, P. J.; Wade, R. C., The ins and outs of cytochrome P450s. *Biochim Biophys Acta* **2007**, 1770, 3, 390-401.
 27. Schleinkofer, K.; Sudarko; Winn, P. J.; Ludemann, S. K.; Wade, R. C., Do mammalian cytochrome P450s show multiple ligand access pathways and ligand channelling? *EMBO Rep* **2005**, 6, 6, 584-589.
 28. Wade, R. C.; Winn, P. J.; Schlichting, I.; Sudarko, A survey of active site access channels in cytochromes P450. *J Inorg Biochem* **2004**, 98, 7, 1175-1182.
 29. Winn, P. J.; Ludemann, S. K.; Gauges, R.; Lounnas, V.; Wade, R. C., Comparison of the dynamics of substrate access channels in three cytochrome P450s reveals different opening mechanisms and a novel functional role for a buried arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, 8, 5361-5366.
 30. Ludemann, S. K.; Lounnas, V.; Wade, R. C., How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 1. Random expulsion molecular dynamics investigation of ligand access channels and mechanisms. *J Mol Biol* **2000**, 303, 5, 797-811.
 31. Ludemann, S. K.; Lounnas, V.; Wade, R. C., How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 2. Steered molecular dynamics and adiabatic mapping of substrate pathways. *J Mol Biol* **2000**, 303, 5, 813-830.
 32. Johnson, E. F., The 2002 Bernard B. Brodie Award lecture: deciphering substrate recognition by drug-metabolizing cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* **2003**, 31, 12, 1532-1540.
 33. Sevrioukova, I. F.; Li, H.; Zhang, H.; Peterson, J. A.; Poulos, T. L., Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96, 5, 1863-1868.
 34. Li, D. N.; Pritchard, M. P.; Hanlon, S. P.; Burchell, B.; Wolf, C. R.; Friedberg, T., Competition between cytochrome P-450 isozymes for NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase affects drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* **1999**, 289, 2, 661-667.
 35. Gotoh, O., Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* **1992**, 267, 1, 83-90.
 36. Lindberg, R. L.; Negishi, M., Alteration of mouse cytochrome P450coh substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue. *Nature* **1989**, 339, 6226, 632-634.
 37. Lindberg, R. L.; Negishi, M., Modulation of specificity and activity in mammalian cytochrome P-450. *Methods Enzymol* **1991**, 202, 741-752.

38. Hanioka, N.; Gonzalez, F. J.; Lindberg, N. A.; Liu, G.; Gelboin, H. V.; Korzekwa, K. R., Site-directed mutagenesis of cytochrome P450s CYP2A1 and CYP2A2: influence of the distal helix on the kinetics of testosterone hydroxylation. *Biochemistry* **1992**, 31, 13, 3364-3370.
39. Danielson, P. B., The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab* **2002**, 3, 6, 561-597.
40. Mestres, J., Structure conservation in cytochromes P450. *Proteins* **2005**, 58, 3, 596-609.
41. Poulos, T. L.; Finzel, B. C.; Gunsalus, I. C.; Wagner, G. C.; Kraut, J., The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J Biol Chem* **1985**, 260, 30, 16122-16130.
42. Poulos, T. L., Cytochrome P450. *Curr Opin Struct Biol* **1995**, 5, 6, 767-774.
43. Kemper, B., Structural basis for the role in protein folding of conserved proline-rich regions in cytochromes P450. *Toxicol Appl Pharmacol* **2004**, 199, 3, 305-315.
44. Fischer, M.; Knoll, M.; Sirim, D.; Wagner, F.; Funke, S.; Pleiss, J., The Cytochrome P450 Engineering Database: A Navigation and Prediction Tool for the Cytochrome P450 Protein Family. *Bioinformatics* **2007**, 23, 15, 2015-2017.
45. Makris, T. M.; Denisov, I. G.; Schlichting, I.; Sligar, S. G., Activation of Molecular Oxygen by Cytochrome P450. In *Cytochrome P450 : Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Ortiz de Montellano, P. R., Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2005; pp 149-182.
46. Katagiri, M.; Ganguli, B. N.; Gunsalus, I. C., A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation. *J Biol Chem* **1968**, 243, 12, 3543-3546.
47. Andersson, L. A.; Dawson, J. H., EXAFS Spectroscopy of Heme-Containing Oxygenases and Peroxidases. *Structure and Bonding* **1991**, 74, 1-40.
48. Meunier, B.; de Visser, S. P.; Shaik, S., Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chem Rev* **2004**, 104, 9, 3947-3980.
49. Shaik, S.; Kumar, D.; de Visser, S. P.; Altun, A.; Thiel, W., Theoretical perspective on the structure and mechanism of cytochrome P450 enzymes. *Chem Rev* **2005**, 105, 6, 2279-2328.
50. Guengerich, F. P.; Krauser, J. A.; Johnson, W. W., Rate-limiting steps in oxidations catalyzed by rabbit cytochrome P450 1A2. *Biochemistry* **2004**, 43, 33, 10775-10788.
51. de Visser, S. P.; Ogliaro, F.; Sharma, P. K.; Shaik, S., What factors affect the regioselectivity of oxidation by cytochrome p450? A DFT study of allylic hydroxylation and double bond epoxidation in a model reaction. *J Am Chem Soc* **2002**, 124, 39, 11809-11826.

-
52. de Visser, S. P.; Kumar, D.; Cohen, S.; Shacham, R.; Shaik, S., A predictive pattern of computed barriers for C-h hydroxylation by compound I of cytochrome p450. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 27, 8362-8363.
53. Kumar, D.; de Visser, S. P.; Sharma, P. K.; Cohen, S.; Shaik, S., Radical clock substrates, their C-H hydroxylation mechanism by cytochrome P450, and other reactivity patterns: what does theory reveal about the clocks' behavior? *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 6, 1907-1920.
54. Olsen, L.; Rydberg, P.; Rod, T. H.; Ryde, U., Prediction of activation energies for hydrogen abstraction by cytochrome P450. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49, 22, 6489-6499.
55. Korzekwa, K. R.; Jones, J. P.; Gillette, J. R., Theoretical studies on cytochrome P-450 mediated hydroxylation: a predictive model for hydrogen atom abstractions. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 19, 7042-7046.
56. Jones, J. P.; Mysinger, M.; Korzekwa, K. R., Computational models for cytochrome P450: a predictive electronic model for aromatic oxidation and hydrogen atom abstraction. *Drug Metab Dispos* **2002**, 30, 1, 7-12.
57. Bathelt, C. M.; Ridder, L.; Mulholland, A. J.; Harvey, J. N., Aromatic hydroxylation by cytochrome P450: model calculations of mechanism and substituent effects. *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 49, 15004-15005.
58. Ogliaro, F.; Harris, N.; Cohen, S.; Filatov, M.; de Visser, S. P.; Shaik, S., A Model "Rebound" Mechanism of Hydroxylation by Cytochrome P450: Stepwise and Effectively Concerted Pathways, and Their Reactivity Patterns. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 37, 8977-8989.
59. Yoshizawa, K.; Kamachi, T.; Shiota, Y., A theoretical study of the dynamic behavior of alkane hydroxylation by a compound I model of cytochrome P450. *J Am Chem Soc* **2001**, 123, 40, 9806-9816.
60. Kamachi, T.; Yoshizawa, K., A theoretical study on the mechanism of camphor hydroxylation by compound I of cytochrome p450. *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 15, 4652-4661.
61. Rendic, S., Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* **2002**, 34, 1-2, 83-448.
62. Bathelt, C. M.; Ridder, L.; Mulholland, A. J.; Harvey, J. N., Mechanism and structure-reactivity relationships for aromatic hydroxylation by cytochrome P450. *Org Biomol Chem* **2004**, 2, 20, 2998-3005.
63. McLean, K. J.; Sabri, M.; Marshall, K. R.; Lawson, R. J.; Lewis, D. G.; Clift, D.; Balding, P. R., et al., Biodiversity of cytochrome P450 redox systems. *Biochem Soc Trans* **2005**, 33, Pt 4, 796-801.

64. Sevrioukova, I. F.; Li, H.; Poulos, T. L., Crystal structure of putidaredoxin reductase from *Pseudomonas putida*, the final structural component of the cytochrome P450cam monooxygenase. *J Mol Biol* **2004**, 336, 4, 889-902.
65. Murataliev, M. B.; Feyereisen, R.; Walker, F. A., Electron transfer by diflavin reductases. *Biochim Biophys Acta* **2004**, 1698, 1, 1-26.
66. Narhi, L. O.; Fulco, A. J., Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* **1987**, 262, 14, 6683-6690.
67. Roberts, G. A.; Celik, A.; Hunter, D. J.; Ost, T. W.; White, J. H.; Chapman, S. K.; Turner, N. J., et al., A self-sufficient cytochrome p450 with a primary structural organization that includes a flavin domain and a [2Fe-2S] redox center. *J Biol Chem* **2003**, 278, 49, 48914-48920.
68. Munro, A. W.; Girvan, H. M.; McLean, K. J., Cytochrome P450--redox partner fusion enzymes. *Biochim Biophys Acta* **2007**, 1770, 3, 345-359.
69. Estabrook, R. W., The remarkable P450s: a historical overview of these versatile heme protein catalysts. *Faseb J* **1996**, 10, 2, 202-204.
70. Guengerich, F. P., Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* **2001**, 14, 6, 611-650.
71. Isin, E. M.; Guengerich, F. P., Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochim Biophys Acta* **2007**, 1770, 3, 314-329.
72. Lentz, O.; Feenstra, A.; Habicher, T.; Hauer, B.; Schmid, R. D.; Urlacher, V. B., Altering the regioselectivity of cytochrome P450 CYP102A3 of *Bacillus subtilis* by using a new versatile assay system. *Chembiochem* **2006**, 7, 2, 345-350.
73. Peters, M. W.; Meinhold, P.; Glieder, A.; Arnold, F. H., Regio- and Enantioselective Alkane Hydroxylation with Engineered Cytochromes P450 BM-3. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 44, 13442-13450.
74. Maurer, S. C.; Schulze, H.; Schmid, R. D.; Urlacher, V., Immobilisation of P450 BM-3 and an NADP⁺ cofactor recycling system: Towards a technical application of heme-containing monooxygenases in fine chemical synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2003**, 345, 6+7, 802-810.
75. Glieder, A.; Farinas, E. T.; Arnold, F. H., Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nat Biotechnol* **2002**, 20, 11, 1135-1139.
76. Li, Q. S.; Schwaneberg, U.; Fischer, M.; Schmitt, J.; Pleiss, J.; Lutz-Wahl, S.; Schmid, R. D., Rational evolution of a medium chain-specific cytochrome P-450 BM-3 variant. *Biochim Biophys Acta* **2001**, 1545, 1-2, 114-121.
77. Lentz, O.; Li, Q. S.; Schwaneberg, U.; Lutz-Wahl, S.; Fischer, P.; Schmid, R. D., Modification of the fatty acid specificity of cytochrome P450 BM-3 from *Bacillus*

-
- megaterium by directed evolution: a validated assay. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001**, 15, 4-6, 123-133.
78. Farinas, E. T.; Schwaneberg, U.; Glieder, A.; Arnold, F. H., Directed evolution of a cytochrome P450 monooxygenase for alkane oxidation. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2001**, 343, 6+7, 601-606.
79. Appel, D.; Lutz-Wahl, S.; Fischer, P.; Schwaneberg, U.; Schmid, R. D., A P450 BM-3 mutant hydroxylates alkanes, cycloalkanes, arenes and heteroarenes. *J Biotechnol* **2001**, 88, 2, 167-171.
80. Li, Q. S.; Schwaneberg, U.; Fischer, P.; Schmid, R. D., Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst. *Chemistry* **2000**, 6, 9, 1531-1536.
81. Graham-Lorence, S.; Truan, G.; Peterson, J. A.; Falck, J. R.; Wei, S.; Helvig, C.; Capdevila, J. H., An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxygenase. *J Biol Chem* **1997**, 272, 2, 1127-1135.
82. Bondon, A.; Macdonald, T. L.; Harris, T. M.; Guengerich, F. P., Oxidation of cycloalkylamines by cytochrome P-450. Mechanism-based inactivation, adduct formation, ring expansion, and nitrene formation. *J Biol Chem* **1989**, 264, 4, 1988-1997.
83. Watanabe, Y.; Numata, T.; Iyanagi, T.; Oae, S., Enzymatic Oxidation of Alkyl Sulfides by Cytochrome-P-450 and Hydroxyl Radical. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1981**, 54, 4, 1163-1170.
84. Karki, S. B.; Dinnocenzo, J. P., On the mechanism of amine oxidations by P450. *Xenobiotica* **1995**, 25, 7, 711-724.
85. Waterman, M. R.; Lepesheva, G. I., Sterol 14 alpha-demethylase, an abundant and essential mixed-function oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, 338, 1, 418-422.
86. Rendic, S.; Di Carlo, F. J., Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* **1997**, 29, 1-2, 413-580.
87. Bu, H. Z., A literature review of enzyme kinetic parameters for CYP3A4-mediated metabolic reactions of 113 drugs in human liver microsomes: structure-kinetics relationship assessment. *Curr Drug Metab* **2006**, 7, 3, 231-249.
88. Jacqz-Aigrain, E.; Funck-Brentano, C.; Cresteil, T., CYP2D6- and CYP3A-dependent metabolism of dextromethorphan in humans. *Pharmacogenetics* **1993**, 3, 4, 197-204.
89. Kelly, S. L.; Kelly, D. E.; Jackson, C. J.; Warrilow, A. G. S.; Lamb, D. C., The Diversity and Importance of Microbial Cytochromes P450. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, 3rd ed.; Ortiz de Montellano, P. R., Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2005; pp 585-618.

90. Cryle, M. J.; Stok, J. E.; De Voss, J. J., Reactions catalyzed by bacterial cytochromes P 450. *Australian Journal of Chemistry* **2003**, 56, 8, 749-762.
91. van Beilen, J. B.; Funhoff, E. G., Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**, 74, 1, 13-21.
92. Urlacher, V.; Schmid, R. D., Biotransformations using prokaryotic P450 monooxygenases. *Curr Opin Biotechnol* **2002**, 13, 6, 557-564.
93. Ferreira, M. E.; Colombo, A. L.; Paulsen, I.; Ren, Q.; Wortman, J.; Huang, J.; Goldman, M. H., et al., The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* **2005**, 43 Suppl 1, S313-319.
94. Szczebara, F. M.; Chandelier, C.; Villeret, C.; Masurel, A.; Bourot, S.; Duport, C.; Blanchard, S., et al., Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat Biotechnol* **2003**, 21, 2, 143-149.
95. Bolwell, G. P.; Bozak, K.; Zimmerlin, A., Plant cytochrome P450. *Phytochemistry* **1994**, 37, 6, 1491-1506.
96. Schuler, M. A., Plant Cytochrome P450 Monooxygenases. *Critical Reviews in Plant Sciences* **1996**, 15, 3, 235 - 284.
97. Schuler, M. A., The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiol* **1996**, 112, 4, 1411-1419.
98. Salaun, J. P.; Simon, A.; Durst, F., Specific induction of lauric acid w-hydroxylase by clofibrate, diethylhexylphthalate and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in higher plants. *Lipids* **1986**, 21, 12, 776-779.
99. Hagemann, M. L.; Heller, W.; Grisebach, H., Induction and characterization of a microsomal flavonoid 3'-hydroxylase from parsley cell cultures. *Eur J Biochem* **1983**, 134, 3, 547-554.
100. Wendorff, H.; Matern, U., Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. Microsomal conversion of (+)marmesin into psoralen. *Eur J Biochem* **1986**, 161, 2, 391-398.
101. Stadler, R.; Zenk, M. H., The purification and characterization of a unique cytochrome P-450 enzyme from *Berberis stolonifera* plant cell cultures. *J Biol Chem* **1993**, 268, 2, 823-831.
102. Meijer, A. H.; De Waal, A.; Verpoorte, R., Purification of the cytochrome P-450 enzyme geraniol 10-hydroxylase from cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Journal of Chromatography* **1993**, 635, 2, 237-249.
103. Karp, F.; Mihaliak, C. A.; Harris, J. L.; Croteau, R., Monoterpene biosynthesis: specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*), and perilla (*Perilla frutescens*) leaves. *Arch Biochem Biophys* **1990**, 276, 1, 219-226.

-
104. Petroski, R. J.; McCormick, S. P., *Secondary Metabolite Biosynthesis and Metabolism*. Plenum Press: New York, 1992; p 253.
105. Feyereisen, R., Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol* **1999**, 44, 507-533.
106. Scott, J. G.; Wen, Z., Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Manag Sci* **2001**, 57, 10, 958-967.
107. Scott, J. G.; Liu, N.; Wen, Z., Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **1998**, 121, 1-3, 147-155.
108. Scott, J. G., Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* **1999**, 29, 9, 757-777.
109. Guengerich, F. P., Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv* **2003**, 3, 4, 194-204.
110. Waterman, M. R.; Keeney, D. S., Signal transduction pathways combining peptide hormones and steroidogenesis. *Vitam Horm* **1996**, 52, 129-148.
111. Russell, D. W.; Setchell, K. D., Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* **1992**, 31, 20, 4737-4749.
112. Stromstedt, M.; Rozman, D.; Waterman, M. R., The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol 14 alpha-demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. *Arch Biochem Biophys* **1996**, 329, 1, 73-81.
113. Sharma, R. K.; Doig, M. V.; Lewis, D. F.; Gibson, G. G., Role of hepatic and renal cytochrome P-450 IVA1 in the metabolism of lipid substrates. *Biochem Pharmacol* **1989**, 38, 20, 3621-3629.
114. Mueller, G. C.; Miller, J. A., The metabolism of methylated aminoazo dyes. II. Oxidative demethylation by rat liver homogenates. *J Biol Chem* **1953**, 202, 2, 579-587.
115. Lang, N. P.; Butler, M. A.; Massengill, J.; Lawson, M.; Stotts, R. C.; Hauer-Jensen, M.; Kadlubar, F. F., Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1994**, 3, 8, 675-682.
116. Shimada, T.; Hayes, C. L.; Yamazaki, H.; Amin, S.; Hecht, S. S.; Guengerich, F. P.; Sutter, T. R., Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* **1996**, 56, 13, 2979-2984.
117. Shimada, T.; Gillam, E. M.; Oda, Y.; Tsumura, F.; Sutter, T. R.; Guengerich, F. P.; Inoue, K., Metabolism of benzo[a]pyrene to trans-7,8-dihydroxy-7, 8-dihydrobenzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 1B1 and purified liver epoxide hydrolase. *Chem Res Toxicol* **1999**, 12, 7, 623-629.

118. Ding, X.; Kaminsky, L. S., Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2003**, 43, 149-173.
119. Shimada, T., Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet* **2006**, 21, 4, 257-276.
120. Narhi, L. O.; Fulco, A. J., Phenobarbital induction of a soluble cytochrome P-450-dependent fatty acid monooxygenase in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* **1982**, 257, 5, 2147-2150.
121. Li, H. Y.; Darwish, K.; Poulos, T. L., Characterization of recombinant *Bacillus megaterium* cytochrome P-450 BM-3 and its two functional domains. *J Biol Chem* **1991**, 266, 18, 11909-11914.
122. Li, H.; Poulos, T. L., The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat Struct Biol* **1997**, 4, 2, 140-146.
123. Haines, D. C.; Tomchick, D. R.; Machius, M.; Peterson, J. A., Pivotal role of water in the mechanism of P450BM-3. *Biochemistry* **2001**, 40, 45, 13456-13465.
124. Li, H.; Poulos, T. L., Modeling protein-substrate interactions in the heme domain of cytochrome P450(BM-3). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1995**, 51, Pt 1, 21-32.
125. Yeom, H.; Sligar, S. G.; Li, H.; Poulos, T. L.; Fulco, A. J., The role of Thr268 in oxygen activation of cytochrome P450BM-3. *Biochemistry* **1995**, 34, 45, 14733-14740.
126. Joyce, M. G.; Girvan, H. M.; Munro, A. W.; Leys, D., A single mutation in cytochrome P450 BM3 induces the conformational rearrangement seen upon substrate binding in the wild-type enzyme. *J Biol Chem* **2004**, 279, 22, 23287-23293.
127. Ost, T. W.; Munro, A. W.; Mowat, C. G.; Taylor, P. R.; Pesseguiro, A.; Fulco, A. J.; Cho, A. K., et al., Structural and spectroscopic analysis of the F393H mutant of flavocytochrome P450 BM3. *Biochemistry* **2001**, 40, 45, 13430-13438.
128. Ost, T. W.; Clark, J.; Mowat, C. G.; Miles, C. S.; Walkinshaw, M. D.; Reid, G. A.; Chapman, S. K., et al., Oxygen activation and electron transfer in flavocytochrome P450 BM3. *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 49, 15010-15020.
129. Clark, J. P.; Miles, C. S.; Mowat, C. G.; Walkinshaw, M. D.; Reid, G. A.; Daff, S. N.; Chapman, S. K., The role of Thr268 and Phe393 in cytochrome P450 BM3. *J Inorg Biochem* **2006**, 100, 5-6, 1075-1090.
130. Kuper, J.; Wong, T. S.; Roccatano, D.; Wilmanns, M.; Schwaneberg, U., Understanding a Mechanism of Organic Cosolvent Inactivation in Heme Monooxygenase P450 BM-3. *J Am Chem Soc* **2007**.

-
131. Wang, M.; Roberts, D. L.; Paschke, R.; Shea, T. M.; Masters, B. S.; Kim, J. J., Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, 94, 16, 8411-8416.
 132. Urlacher, V. B.; Schmid, R. D., Protein engineering of the cytochrome P450 monooxygenase from *Bacillus megaterium*. *Methods Enzymol* **2004**, 388, 208-224.
 133. Carmichael, A. B.; Wong, L. L., Protein engineering of *Bacillus megaterium* CYP102. The oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Eur J Biochem* **2001**, 268, 10, 3117-3125.
 134. Cirino, P. C.; Arnold, F. H., A self-sufficient peroxide-driven hydroxylation biocatalyst. *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, 42, 28, 3299-3301.
 135. Salazar, O.; Cirino, P. C.; Arnold, F. H., Thermostabilization of a cytochrome p450 peroxygenase. *Chembiochem* **2003**, 4, 9, 891-893.
 136. Seng Wong, T.; Arnold, F. H.; Schwaneberg, U., Laboratory evolution of cytochrome p450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents. *Biotechnol Bioeng* **2004**, 85, 3, 351-358.
 137. Smith, W. L.; Marnett, L. J.; DeWitt, D. L., Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther* **1991**, 49, 3, 153-179.
 138. Okuda, K.; Usui, E.; Ohyama, Y., Recent progress in enzymology and molecular biology of enzymes involved in vitamin D metabolism. *J Lipid Res* **1995**, 36, 8, 1641-1652.
 139. Guengerich, F. P., Cytochrome P450: what have we learned and what are the future issues? *Drug Metab Rev* **2004**, 36, 2, 159-197.
 140. Nebert, D. W.; Russell, D. W., Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* **2002**, 360, 9340, 1155-1162.
 141. White, P. C.; Speiser, P. W., Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* **2000**, 21, 3, 245-291.
 142. Sarfarazi, M., Recent advances in molecular genetics of glaucomas. *Hum Mol Genet* **1997**, 6, 10, 1667-1677.
 143. Sakaki, T.; Kagawa, N.; Yamamoto, K.; Inouye, K., Metabolism of vitamin D3 by cytochromes P450. *Front Biosci* **2005**, 10, 119-134.
 144. Brodie, A. M., Aromatase inhibition and its pharmacologic implications. *Biochem Pharmacol* **1985**, 34, 18, 3213-3219.
 145. Seliskar, M.; Rozman, D., Mammalian cytochromes P450--importance of tissue specificity. *Biochim Biophys Acta* **2007**, 1770, 3, 458-466.

146. Bar-Nun, S.; Kreibich, G.; Adesnik, M.; Alterman, L.; Negishi, M.; Sabatini, D. D., Synthesis and insertion of cytochrome P-450 into endoplasmic reticulum membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1980**, 77, 2, 965-969.
147. Nelson, D. R.; Zeldin, D. C.; Hoffman, S. M.; Maltais, L. J.; Wain, H. M.; Nebert, D. W., Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* **2004**, 14, 1, 1-18.
148. Kawato, S.; Gut, J.; Cherry, R. J.; Winterhalter, K. H.; Richter, C., Rotation of cytochrome P-450. I. Investigations of protein-protein interactions of cytochrome P-450 in phospholipid vesicles and liver microsomes. *J Biol Chem* **1982**, 257, 12, 7023-7029.
149. Schwarz, D.; Pirrwitz, J.; Ruckpaul, K., Rotational diffusion of cytochrome P-450 in the microsomal membrane-evidence for a clusterlike organization from saturation transfer electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch Biochem Biophys* **1982**, 216, 1, 322-328.
150. Dean, W. L.; Gray, R. D., Relationship between state of aggregation and catalytic activity for cytochrome P-450LM2 and NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem* **1982**, 257, 24, 14679-14685.
151. Pompon, D., Rabbit liver cytochrome P-450 LM2: roles of substrates, inhibitors, and cytochrome b5 in modulating the partition between productive and abortive mechanisms. *Biochemistry* **1987**, 26, 20, 6429-6435.
152. Epstein, P. M.; Curti, M.; Jansson, I.; Huang, C. K.; Schenkman, J. B., Phosphorylation of cytochrome P450: regulation by cytochrome b5. *Arch Biochem Biophys* **1989**, 271, 2, 424-432.
153. Ingelman-Sundberg, M., Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2004**, 369, 1, 89-104.
154. Shimada, T.; Yamazaki, H.; Mimura, M.; Inui, Y.; Guengerich, F. P., Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **1994**, 270, 1, 414-423.
155. Evans, W. E.; Relling, M. V., Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* **1999**, 286, 5439, 487-491.
156. van de Waterbeemd, H., High-throughput and in silico techniques in drug metabolism and pharmacokinetics. *Curr Opin Drug Discov Devel* **2002**, 5, 1, 33-43.
157. Rodrigues, A. D., Preclinical drug metabolism in the age of high-throughput screening: an industrial perspective. *Pharm Res* **1997**, 14, 11, 1504-1510.

-
158. DiMasi, J. A., The value of improving the productivity of the drug development process: faster times and better decisions. *Pharmacoeconomics* **2002**, 20 Suppl 3, 1-10.
159. DiMasi, J. A.; Hansen, R. W.; Grabowski, H. G., The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* **2003**, 22, 2, 151-185.
160. Adams, C. P.; Brantner, V. V., Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars? *Health Aff (Millwood)* **2006**, 25, 2, 420-428.
161. Kennedy, T., Managing the drug discovery/development interface. *Drug Discovery Today* **1997**, 2, 10, 436-444.
162. Hodgson, J., ADMET--turning chemicals into drugs. *Nat Biotechnol* **2001**, 19, 8, 722-726.
163. Boobis, A.; Gundert-Remy, U.; Kremers, P.; Macheras, P.; Pelkonen, O., In silico prediction of ADME and pharmacokinetics. Report of an expert meeting organised by COST B15. *Eur J Pharm Sci* **2002**, 17, 4-5, 183-193.
164. Lombardo, F.; Gifford, E.; Shalaeva, M. Y., In silico ADME prediction: data, models, facts and myths. *Mini Rev Med Chem* **2003**, 3, 8, 861-875.
165. van de Waterbeemd, H.; Gifford, E., ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov* **2003**, 2, 3, 192-204.
166. Wilson, A. G. E.; White, A. C.; Mueller, R. A., Role of predictive metabolism and toxicity modeling in drug discovery - a summary of some recent advancements. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **2003**, 6, 1, 123-128.
167. Beresford, A. P.; Segall, M.; Tarbit, M. H., In silico prediction of ADME properties: are we making progress? *Curr Opin Drug Discov Devel* **2004**, 7, 1, 36-42.
168. Rostami-Hodjegan, A.; Tucker, G. T., Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, 6, 2, 140-148.
169. Clark, D. E.; Grootenhuis, P. D., Progress in computational methods for the prediction of ADMET properties. *Curr Opin Drug Discov Devel* **2002**, 5, 3, 382-390.
170. Modi, S., Computational approaches to the understanding of ADMET properties and problems. *Drug Discov Today* **2003**, 8, 14, 621-623.
171. Crivori, P.; Poggesi, I., Computational approaches for predicting CYP-related metabolism properties in the screening of new drugs. *Eur J Med Chem* **2006**, 41, 7, 795-808.
172. Bertrand, M.; Jackson, P.; Walther, B., Rapid assessment of drug metabolism in the drug discovery process. *Eur J Pharm Sci* **2000**, 11 Suppl 2, S61-72.

173. Kier, L. B.; Hall, L. H., Bioisosterism: quantitation of structure and property effects. *Chem Biodivers* **2004**, 1, 1, 138-151.
174. Testa, B.; Balmat, A. L.; Long, A., Predicting drug metabolism: Concepts and challenges. *Pure and Applied Chemistry* **2004**, 76, 5, 907-914.
175. Testa, B., Prodrug research: futile or fertile? *Biochem Pharmacol* **2004**, 68, 11, 2097-2106.
176. Kantharaj, E.; Tuytelaars, A.; Proost, P. E.; Ongel, Z.; Van Assouw, H. P.; Gilissen, R. A., Simultaneous measurement of drug metabolic stability and identification of metabolites using ion-trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, 17, 23, 2661-2668.
177. Cai, Z.; Sinhababu, A. K.; Harrelson, S., Simultaneous quantitative cassette analysis of drugs and detection of their metabolites by high performance liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2000**, 14, 18, 1637-1643.
178. Anari, M. R.; Baillie, T. A., Bridging cheminformatic metabolite prediction and tandem mass spectrometry. *Drug Discov Today* **2005**, 10, 10, 711-717.
179. Kulkarni, S. A.; Zhu, J.; Blechinger, S., In silico techniques for the study and prediction of xenobiotic metabolism: a review. *Xenobiotica* **2005**, 35, 10-11, 955-973.
180. Caron, G.; Ermondi, G.; Testa, B., Predicting the oxidative metabolism of statins: An application of the MetaSite (R) algorithm. *Pharmaceutical Research* **2007**, 24, 3, 480-501.
181. Testa, B.; Balmat, A. L.; Long, A.; Judson, P., Predicting drug metabolism--an evaluation of the expert system METEOR. *Chem Biodivers* **2005**, 2, 7, 872-885.
182. Korzekwa, K. R.; Grogan, J.; DeVito, S.; Jones, J. P., Electronic models for cytochrome P450 oxidations. *Adv Exp Med Biol* **1996**, 387, 361-369.
183. Lewis, D. F.; Dickins, M.; Eddershaw, P. J.; Tarbit, M. H.; Goldfarb, P. S., Cytochrome P450 substrate specificities, substrate structural templates and enzyme active site geometries. *Drug Metabol Drug Interact* **1999**, 15, 1, 1-49.
184. de Groot, M. J.; Ackland, M. J.; Horne, V. A.; Alex, A. A.; Jones, B. C., A novel approach to predicting P450 mediated drug metabolism. CYP2D6 catalyzed N-dealkylation reactions and qualitative metabolite predictions using a combined protein and pharmacophore model for CYP2D6. *J Med Chem* **1999**, 42, 20, 4062-4070.
185. Jones, B. C.; Hawksworth, G.; Horne, V. A.; Newlands, A.; Morsman, J.; Tute, M. S.; Smith, D. A., Putative active site template model for cytochrome P450C9 (tolbutamide hydroxylase). *Drug Metab Dispos* **1996**, 24, 2, 260-266.
186. Singh, S. B.; Shen, L. Q.; Walker, M. J.; Sheridan, R. P., A model for predicting likely sites of CYP3A4-mediated metabolism on drug-like molecules. *J Med Chem* **2003**, 46, 8, 1330-1336.

-
187. Testa, B.; Crivori, P.; Reist, M.; Carrupt, P. A., The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples. *Perspectives in Drug Discovery and Design* **2000**, 19, 1, 179-211.
188. Hansch, C.; Mekapati, S. B.; Kurup, A.; Verma, R. P., QSAR of cytochrome P450. *Drug Metab Rev* **2004**, 36, 1, 105-156.
189. Penzotti, J. E.; Landrum, G. A.; Putta, S., Building predictive ADMET models for early decisions in drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel* **2004**, 7, 1, 49-61.
190. Korolev, D.; Balakin, K. V.; Nikolsky, Y.; Kirillov, E.; Ivanenkov, Y. A.; Savchuk, N. P.; Ivashchenko, A. A., et al., Modeling of human cytochrome p450-mediated drug metabolism using unsupervised machine learning approach. *J Med Chem* **2003**, 46, 17, 3631-3643.
191. Ekins, S.; Stresser, D. M.; Williams, J. A., In vitro and pharmacophore insights into CYP3A enzymes. *Trends Pharmacol Sci* **2003**, 24, 4, 161-166.
192. Poso, A.; Gynther, J.; Juvonen, R., A comparative molecular field analysis of cytochrome P450 2A5 and 2A6 inhibitors. *J Comput Aided Mol Des* **2001**, 15, 3, 195-202.
193. Goodford, P. J., A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem* **1985**, 28, 7, 849-857.
194. Kirton, S. B.; Kemp, C. A.; Tomkinson, N. P.; St-Gallay, S.; Sutcliffe, M. J., Impact of incorporating the 2C5 crystal structure into comparative models of cytochrome P450 2D6. *Proteins* **2002**, 49, 2, 216-231.
195. Oscarson, M., Pharmacogenetics of drug metabolising enzymes: importance for personalised medicine. *Clin Chem Lab Med* **2003**, 41, 4, 573-580.
196. Ingelman-Sundberg, M., Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med* **2001**, 250, 3, 186-200.
197. Lazarou, J.; Pomeranz, B. H.; Corey, P. N., Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *Jama* **1998**, 279, 15, 1200-1205.
198. Schönhöfer, P., Klinik-basierte Erfassung Arzneimittel-bedingter Erkrankungen im Pharmakovigilanz-System. *Arzneimitteltherapie* **1999**, 17, 83-86.
199. WHO, Progress in pharmacogenetics and pharmacogenomics. *WHO Drug Information* **2002**, 16, 1, 17-20.
200. Pillans, P. I., Increasing relevance of pharmacogenetics of drug metabolism in clinical practice. *Intern Med J* **2001**, 31, 8, 476-478.

201. Shah, R. R., Pharmacogenetics in drug regulation: promise, potential and pitfalls. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2005**, 360, 1460, 1617-1638.
202. Meyer, U. A., Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet* **2004**, 5, 9, 669-676.
203. Mahgoub, A.; Idle, J. R.; Dring, L. G.; Lancaster, R.; Smith, R. L., Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* **1977**, 2, 8038, 584-586.
204. Eichelbaum, M.; Spannbrucker, N.; Steincke, B.; Dengler, H. J., Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol* **1979**, 16, 3, 183-187.
205. De Morais, S. M.; Wilkinson, G. R.; Blaisdell, J.; Meyer, U. A.; Nakamura, K.; Goldstein, J. A., Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol Pharmacol* **1994**, 46, 4, 594-598.
206. Sullivan-Klose, T. H.; Ghanayem, B. I.; Bell, D. A.; Zhang, Z. Y.; Kaminsky, L. S.; Shenfield, G. M.; Miners, J. O., et al., The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* **1996**, 6, 4, 341-349.
207. Ingelman-Sundberg, M.; Rodriguez-Antona, C., Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2005**, 360, 1460, 1563-1570.
208. Kirchheiner, J.; Nickchen, K.; Bauer, M.; Wong, M. L.; Licinio, J.; Roots, I.; Brockmoller, J., Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry* **2004**, 9, 5, 442-473.
209. Kirchheiner, J.; Brockmoller, J., Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* **2005**, 77, 1, 1-16.
210. Ozdemir, V.; Kalowa, W.; Tang, B. K.; Paterson, A. D.; Walker, S. E.; Endrenyi, L.; Kashuba, A. D., Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics* **2000**, 10, 5, 373-388.
211. Ingelman-Sundberg, M., Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* **2005**, 5, 1, 6-13.
212. Ingelman-Sundberg, M.; Oscarson, M.; McLellan, R. A., Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* **1999**, 20, 8, 342-349.
213. Sim, S. C.; Risinger, C.; Dahl, M. L.; Aklillu, E.; Christensen, M.; Bertilsson, L.; Ingelman-Sundberg, M., A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther* **2006**, 79, 1, 103-113.

-
214. Fredman, D.; Siegfried, M.; Yuan, Y. P.; Bork, P.; Lehvaslaiho, H.; Brookes, A. J., HGVbase: a human sequence variation database emphasizing data quality and a broad spectrum of data sources. *Nucleic Acids Res* **2002**, 30, 1, 387-391.
215. Sherry, S. T.; Ward, M. H.; Kholodov, M.; Baker, J.; Phan, L.; Smigielski, E. M.; Sirotkin, K., dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* **2001**, 29, 1, 308-311.
216. Hirakawa, M.; Tanaka, T.; Hashimoto, Y.; Kuroda, M.; Takagi, T.; Nakamura, Y., JSNP: a database of common gene variations in the Japanese population. *Nucleic Acids Res* **2002**, 30, 1, 158-162.
217. Marsh, S.; Kwok, P.; McLeod, H. L., SNP databases and pharmacogenetics: great start, but a long way to go. *Hum Mutat* **2002**, 20, 3, 174-179.
218. Mitchell, A. A.; Zwick, M. E.; Chakravarti, A.; Cutler, D. J., Discrepancies in dbSNP confirmation rates and allele frequency distributions from varying genotyping error rates and patterns. *Bioinformatics* **2004**, 20, 7, 1022-1032.
219. Ingelman-Sundberg, M.; Daly, A. K.; Oscarson, M.; Nebert, D. W., Human cytochrome P450 (CYP) genes: recommendations for the nomenclature of alleles. *Pharmacogenetics* **2000**, 10, 1, 91-93.
220. Ingelman-Sundberg, M.; Oscarson, M., Human CYP allele database: submission criteria procedures and objectives. *Methods Enzymol* **2002**, 357, 28-36.
221. Ingelman-Sundberg, M.; Oscarson, M.; Daly, A. K.; Garte, S.; Nebert, D. W., Human cytochrome P-450 (CYP) genes: a web page for the nomenclature of alleles. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2001**, 10, 12, 1307-1308.
222. Oscarson, M.; Ingelman-Sundberg, M., CYPalleles: a web page for nomenclature of human cytochrome P450 alleles. *Drug Metab Pharmacokinet* **2002**, 17, 6, 491-495.
223. Sim, S. C.; Ingelman-Sundberg, M., The human cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee Web site: submission criteria, procedures, and objectives. *Methods Mol Biol* **2006**, 320, 183-191.
224. Daly, A. K.; Brockmoller, J.; Broly, F.; Eichelbaum, M.; Evans, W. E.; Gonzalez, F. J.; Huang, J. D., et al., Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics* **1996**, 6, 3, 193-201.
225. Mooney, S., Bioinformatics approaches and resources for single nucleotide polymorphism functional analysis. *Brief Bioinform* **2005**, 6, 1, 44-56.
226. Chakravarti, A., It's raining SNPs, hallelujah? *Nat Genet* **1998**, 19, 3, 216-217.
227. Syvanen, A. C.; Landegren, U.; Isaksson, A.; Gyllensten, U.; Brookes, A., First International SNP Meeting at Skokloster, Sweden, August 1998. Enthusiasm mixed with scepticism about single-nucleotide polymorphism markers for dissecting complex disorders. *Eur J Hum Genet* **1999**, 7, 1, 98-101.

228. Collins, F. S.; Guyer, M. S.; Charkravarti, A., Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* **1997**, *278*, 5343, 1580-1581.
229. Bowie, J. U.; Reidhaar-Olson, J. F.; Lim, W. A.; Sauer, R. T., Deciphering the message in protein sequences: tolerance to amino acid substitutions. *Science* **1990**, *247*, 4948, 1306-1310.
230. Mooney, S. D.; Klein, T. E., The functional importance of disease-associated mutation. *BMC Bioinformatics* **2002**, *3*, 24.
231. Chasman, D.; Adams, R. M., Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms: structure-based assessment of amino acid variation. *J Mol Biol* **2001**, *307*, 2, 683-706.
232. Sunyaev, S.; Ramensky, V.; Bork, P., Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends Genet* **2000**, *16*, 5, 198-200.
233. Cargill, M.; Altshuler, D.; Ireland, J.; Sklar, P.; Ardlie, K.; Patil, N.; Shaw, N., et al., Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* **1999**, *22*, 3, 231-238.
234. Ng, P. C.; Henikoff, S., Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* **2001**, *11*, 5, 863-874.
235. Ng, P. C.; Henikoff, S., SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* **2003**, *31*, 13, 3812-3814.
236. Krishnan, V. G.; Westhead, D. R., A comparative study of machine-learning methods to predict the effects of single nucleotide polymorphisms on protein function. *Bioinformatics* **2003**, *19*, 17, 2199-2209.
237. Ramensky, V.; Bork, P.; Sunyaev, S., Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* **2002**, *30*, 17, 3894-3900.
238. Reumers, J.; Schymkowitz, J.; Ferkinghoff-Borg, J.; Stricher, F.; Serrano, L.; Rousseau, F., SNPeffect: a database mapping molecular phenotypic effects of human non-synonymous coding SNPs. *Nucleic Acids Res* **2005**, *33*, Database issue, D527-532.
239. Yue, P.; Melamud, E.; Moul, J., SNPs3D: candidate gene and SNP selection for association studies. *BMC Bioinformatics* **2006**, *7*, 166.
240. Hubbard, T. J.; Aken, B. L.; Beal, K.; Ballester, B.; Caccamo, M.; Chen, Y.; Clarke, L., et al., Ensembl 2007. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35*, Database issue, D610-617.
241. Karolchik, D.; Baertsch, R.; Diekhans, M.; Furey, T. S.; Hinrichs, A.; Lu, Y. T.; Roskin, K. M., et al., The UCSC Genome Browser Database. *Nucleic Acids Res* **2003**, *31*, 1, 51-54.

-
242. International_HapMap_Consortium, A haplotype map of the human genome. *Nature* **2005**, 437, 7063, 1299-1320.
243. Stenson, P. D.; Ball, E. V.; Mort, M.; Phillips, A. D.; Shiel, J. A.; Thomas, N. S.; Abeyasinghe, S., et al., Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* **2003**, 21, 6, 577-581.
244. The_UniProt_Consortium, The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* **2007**, 35, Database issue, D193-197.
245. Eschenmoser, W.; Uebelhart, P.; Eugster, C. H., Synthesis and Chirality of the Enantiomeric 6-Hydroxy-Alpha-Ionones and of Cis and Trans-5,6-Dihydroxy-5,6-Dihydro-Beta-Ionones. *Helvetica Chimica Acta* **1981**, 64, 8, 2681-2690.
246. Sefton, M. A.; Skouroumounis, G. K.; Massywestropp, R. A.; Williams, P. J., Norisoprenoids in Vitis-Vinifera White Wine Grapes and the Identification of a Precursor of Damascenone in These Fruits. *Australian Journal of Chemistry* **1989**, 42, 12, 2071-2084.
247. Eugster, C. H.; Markifischer, E., The Chemistry of Rose Pigments. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1991**, 30, 6, 654-672.
248. Donaldson, J. M. I.; McGovern, T. P.; Ladd, T. L., Floral Attractants for Cetoniinae and Rutelinae (Coleoptera, Scarabaedae). *Journal of Economic Entomology* **1990**, 83, 4, 1298-1305.
249. McQuate, G. T.; Peck, S. L., Enhancement of attraction of alpha-ionol to male *Bactrocera latifrons* (Diptera : Tephritidae) by addition of a synergist, cade oil. *Journal of Economic Entomology* **2001**, 94, 1, 39-46.
250. Oritani, T.; Yamashita, K., Biological activity and structure of abscisic acid. *Kagaku to Seibutsu* **1984**, 22, 1, 21-28.
251. Urlacher, V. B.; Makhsumkhanov, A.; Schmid, R. D., Biotransformation of b-ionone by engineered cytochrome P450 BM-3. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, 70, 1, 53-59.
252. Gasteiger, J.; Marsili, M.; Hutchings, M. G.; Saller, H.; Loew, P.; Roese, P.; Rafeiner, K., Models for the representation of knowledge about chemical reactions. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1990**, 30, 4, 467-476.
253. Ihlenfeldt, W. D.; Gasteiger, J., Hash codes for the identification and classification of molecular structure elements. *Journal of Computational Chemistry* **1994**, 15, 8, 793-813.
254. Feenstra, K. A.; Starikov, E. B.; Urlacher, V. B.; Commandeur, J. N.; Vermeulen, N. P., Combining substrate dynamics, binding statistics, and energy barriers to rationalize regioselective hydroxylation of octane and lauric acid by CYP102A1 and mutants. *Protein Sci* **2007**, 16, 3, 420-431.

255. Seeman, J. I., Effect of conformational change on reactivity in organic chemistry. Evaluations, applications, and extensions of Curtin-Hammett Winstein-Holness kinetics. *Chem. Rev.* **1983**, 83, 2, 83-134.
256. Celik, A.; Flitsch, S. L.; Turner, N. J., Efficient terpene hydroxylation catalysts based upon P450 enzymes derived from actinomycetes. *Org Biomol Chem* **2005**, 3, 16, 2930-2934.
257. Haag, A.; Eschenmoser, W.; Eugster, C. H., Synthesis of (-)-(R)-4-Hydroxy-Beta-Ionone and (-)-(5r,6s)-5-Hydroxy-4,5-Dihydro-Alpha-Ionone from (-)-(S)-Alpha-Ionone. *Helvetica Chimica Acta* **1980**, 63, 1, 10-15.
258. Krahn, M. Die P450 Engineering Database - systematische Analyse familienspezifischer Eigenschaften und der Sequenz-Struktur-Funktionsbeziehungen von Cytochrom P450 Monooxygenasen. Diplomarbeit, Universität Stuttgart, Stuttgart, 2005.
259. Seifert, A.; Tatzel, S.; Schmid, R. D.; Pleiss, J., Multiple molecular dynamics simulations of human p450 monooxygenase CYP2C9: the molecular basis of substrate binding and regioselectivity toward warfarin. *Proteins* **2006**, 64, 1, 147-155.
260. Gasteiger, J.; Sadowski, J.; Schuur, J.; Selzer, P.; Steinhauer, L.; Steinhauer, V., Chemical information in 3D space. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1996**, 36, 5, 1030-1037.
261. Gasteiger, J.; Schuur, J.; Selzer, P.; Steinhauer, L.; Steinhauer, V., Finding the 3D structure of a molecule in its IR spectrum. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1997**, 359, 1, 50-55.
262. Yue, Q. Y.; Sawe, J., Different effects of inhibitors on the O- and N-demethylation of codeine in human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol* **1997**, 52, 1, 41-47.
263. Warrington, J. S.; Shader, R. I.; von Moltke, L. L.; Greenblatt, D. J., In vitro biotransformation of sildenafil (Viagra): identification of human cytochromes and potential drug interactions. *Drug Metab Dispos* **2000**, 28, 4, 392-397.
264. Kamimura, H.; Oishi, S.; Matsushima, H.; Watanabe, T.; Higuchi, S.; Hall, M.; Wood, S. G., et al., Identification of cytochrome P450 isozymes involved in metabolism of the alpha1-adrenoceptor blocker tamsulosin in human liver microsomes. *Xenobiotica* **1998**, 28, 10, 909-922.
265. Buhring, K. U.; Sailer, H.; Faro, H. P.; Leopold, G.; Pabst, J.; Garbe, A., Pharmacokinetics and metabolism of bisoprolol-14C in three animal species and in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* **1986**, 8 Suppl 11, S21-28.
266. Schwartz, H.; Licht, R. E.; Radunz, H. E., Microbial metabolism of the beta-adrenoreceptor antagonist bisoprolol. *Appl Microbiol Biotechnol* **1993**, 40, 2-3, 382-385.
267. Horikiri, Y.; Suzuki, T.; Mizobe, M., Stereoselective metabolism of bisoprolol enantiomers in dogs and humans. *Life Sci* **1998**, 63, 13, 1097-1108.

-
268. Horikiri, Y.; Suzuki, T.; Mizobe, M., Pharmacokinetics and metabolism of bisoprolol enantiomers in humans. *J Pharm Sci* **1998**, *87*, 3, 289-294.
269. Therrell, B. L., Jr.; Berenbaum, S. A.; Manter-Kapanke, V.; Simmank, J.; Korman, K.; Prentice, L.; Gonzalez, J., et al., Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase- deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics* **1998**, *101*, 4 Pt 1, 583-590.
270. Kominami, S.; Hara, H.; Ogishima, T.; Takemori, S., Interaction between cytochrome P-450 (P-450C21) and NADPH-cytochrome P- 450 reductase from adrenocortical microsomes in a reconstituted system. *J Biol Chem* **1984**, *259*, 5, 2991-2999.
271. Higashi, Y.; Yoshioka, H.; Yamane, M.; Gotoh, O.; Fujii-Kuriyama, Y., Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, 9, 2841-2845.
272. Donohoue, P. A.; van Dop, C.; McLean, R. H.; White, P. C.; Jospe, N.; Migeon, C. J., Gene conversion in salt-losing congenital adrenal hyperplasia with absent complement C4B protein. *J Clin Endocrinol Metab* **1986**, *62*, 5, 995-1002.
273. Schlaghecke, R.; Kornely, E., Adrenale Enzymdefekte und Intersexualität. *Der Urologe B* **1997**, *27*, 1, 24-29.
274. Riepe, F. G.; Tatzel, S.; Sippell, W. G.; Pleiss, J.; Krone, N., Congenital adrenal hyperplasia: the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency in H-2(aw18) mice. *Endocrinology* **2005**, *146*, 6, 2563-2574.
275. Chaplin, D. D.; Galbraith, L. J.; Seidman, J. G.; White, P. C.; Parker, K. L., Nucleotide sequence analysis of murine 21-hydroxylase genes: mutations affecting gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, 24, 9601-9605.
276. Wester, M. R.; Johnson, E. F.; Marques-Soares, C.; Dansette, P. M.; Mansuy, D.; Stout, C. D., Structure of a substrate complex of mammalian cytochrome P450 2C5 at 2.3 Å resolution: evidence for multiple substrate binding modes. *Biochemistry* **2003**, *42*, 21, 6370-6379.
277. Scott, E. E.; He, Y. A.; Wester, M. R.; White, M. A.; Chin, C. C.; Halpert, J. R.; Johnson, E. F., et al., An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 23, 13196-13201.
278. Schoch, G. A.; Yano, J. K.; Wester, M. R.; Griffin, K. J.; Stout, C. D.; Johnson, E. F., Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8. Evidence for a peripheral fatty acid binding site. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 10, 9497-9503.
279. Griese, E. U.; Zanger, U. M.; Brudermanns, U.; Gaedigk, A.; Mikus, G.; Morike, K.; Stuken, T., et al., Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics* **1998**, *8*, 1, 15-26.

280. Rowland, P.; Blaney, F. E.; Smyth, M. G.; Jones, J. J.; Leydon, V. R.; Oxbrow, A. K.; Lewis, C. J., et al., Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J Biol Chem* **2006**, 281, 11, 7614-7622.
281. Ibeanu, G. C.; Blaisdell, J.; Ghanayem, B. I.; Beyeler, C.; Benhamou, S.; Bouchardy, C.; Wilkinson, G. R., et al., An additional defective allele, CYP2C19*5, contributes to the S-mephenytoin poor metabolizer phenotype in Caucasians. *Pharmacogenetics* **1998**, 8, 2, 129-135.
282. Curnow, K. M.; Slutsker, L.; Vitek, J.; Cole, T.; Speiser, P. W.; New, M. I.; White, P. C., et al., Mutations in the CYP11B1 gene causing congenital adrenal hyperplasia and hypertension cluster in exons 6, 7, and 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, 10, 4552-4556.
283. Nishimoto, M.; Noshiro, M.; Okuda, K., Structure of the gene encoding human liver cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *Biochim Biophys Acta* **1993**, 1172, 1-2, 147-150.
284. Saito, Y.; Hanioka, N.; Maekawa, K.; Isobe, T.; Tsuneto, Y.; Nakamura, R.; Soyama, A., et al., Functional analysis of three CYP1A2 variants found in a Japanese population. *Drug Metab Dispos* **2005**, 33, 12, 1905-1910.
285. Ito, Y.; Fisher, C. R.; Conte, F. A.; Grumbach, M. M.; Simpson, E. R., Molecular basis of aromatase deficiency in an adult female with sexual infantilism and polycystic ovaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, 24, 11673-11677.
286. Wang, L. H.; Chen, L., Organization of the gene encoding human prostacyclin synthase. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**, 226, 3, 631-637.
287. Chiang, C. W.; Yeh, H. C.; Wang, L. H.; Chan, N. L., Crystal structure of the human prostacyclin synthase. *J Mol Biol* **2006**, 364, 3, 266-274.
288. Wallace, A. C.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M., LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* **1995**, 8, 2, 127-134.
289. Brückner, R., *Reaktionsmechanismen*. Spektrum: Heidelberg, 2004.
290. Mohan, V.; Gibbs, A. C.; Cummings, M. D.; Jaeger, E. P.; DesJarlais, R. L., Docking: successes and challenges. *Curr Pharm Des* **2005**, 11, 3, 323-333.
291. Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J., Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins* **2006**, 65, 1, 15-26.
292. Tatzel, S. Untersuchung von Enzym-Substrat-Wechselwirkungen mit Hilfe von Dockingsimulationen. Diplomarbeit, Universität Stuttgart, Stuttgart, 2003.
293. Vangunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C., Computer-Simulation of Molecular-Dynamics - Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1990**, 29, 9, 992-1023.
294. Karplus, M.; McCammon, J. A., Molecular dynamics simulations of biomolecules (vol 9, pg 646, 2002). *Nature Structural Biology* **2002**, 9, 10, 788-788.

-
295. Moraitakis, G.; Purkiss, A. G.; Goodfellow, J. M., Simulated dynamics and biological macromolecules. *Reports on Progress in Physics* **2003**, 66, 3, 383-406.
296. Villa, A.; Fan, H.; Wassenaar, T.; Mark, A. E., How sensitive are nanosecond molecular dynamics simulations of proteins to changes in the force field? *J Phys Chem B* **2007**, 111, 21, 6015-6025.
297. Hess, B., Convergence of sampling in protein simulations. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **2002**, 65, 3 Pt 1, 031910.
298. Paulsen, M. D.; Ornstein, R. L., Dramatic differences in the motions of the mouth of open and closed cytochrome P450BM-3 by molecular dynamics simulations. *Proteins* **1995**, 21, 3, 237-243.
299. Chang, Y. T.; Loew, G. H., Molecular dynamics simulations of P450 BM3--examination of substrate-induced conformational change. *J Biomol Struct Dyn* **1999**, 16, 6, 1189-1203.
300. Seifert, A. Molekulardynamische Untersuchungen zur Substratspezifität der humanen Cytochrom P450 Monooxygenase 2C9. Diplomarbeit, Universität Stuttgart, Stuttgart, 2004.
301. Sheridan, R. P.; Korzekwa, K. R.; Torres, R. A.; Walker, M. J., Empirical regioselectivity models for human cytochromes P450 3A4, 2D6, and 2C9. *J Med Chem* **2007**, 50, 14, 3173-3184.
302. Terfloth, L.; Bienfait, B.; Gasteiger, J., Ligand-Based Models for the Isoform Specificity of Cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 Substrates. *J Chem Inf Model* **2007**, 47, 4, 1688-1701.
303. Kumar, G. N.; Rodrigues, A. D.; Buko, A. M.; Denissen, J. F., Cytochrome P450-mediated metabolism of the HIV-1 protease inhibitor ritonavir (ABT-538) in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **1996**, 277, 1, 423-431.
304. Fitzsimmons, M. E.; Collins, J. M., Selective biotransformation of the human immunodeficiency virus protease inhibitor saquinavir by human small-intestinal cytochrome P4503A4: potential contribution to high first-pass metabolism. *Drug Metab Dispos* **1997**, 25, 2, 256-266.
305. Shimada, T.; Gillam, E. M.; Sutter, T. R.; Strickland, P. T.; Guengerich, F. P.; Yamazaki, H., Oxidation of xenobiotics by recombinant human cytochrome P450 1B1. *Drug Metab Dispos* **1997**, 25, 5, 617-622.
306. Pan, L. P.; Wijnant, P.; De Vriendt, C.; Rosseel, M. T.; Belpaire, F. M., Characterization of the cytochrome P450 isoenzymes involved in the in vitro N-dealkylation of haloperidol. *Br J Clin Pharmacol* **1997**, 44, 6, 557-564.
307. Koyama, E.; Chiba, K.; Tani, M.; Ishizaki, T., Reappraisal of human CYP isoforms involved in imipramine N-demethylation and 2-hydroxylation: a study using microsomes obtained from putative extensive and poor metabolizers of S-

- mephenytoin and eleven recombinant human CYPs. *J Pharmacol Exp Ther* **1997**, 281, 3, 1199-1210.
308. Yang, T. J.; Krausz, K. W.; Sai, Y.; Gonzalez, F. J.; Gelboin, H. V., Eight inhibitory monoclonal antibodies define the role of individual P-450s in human liver microsomal diazepam, 7-ethoxycoumarin, and imipramine metabolism. *Drug Metab Dispos* **1999**, 27, 1, 102-109.
309. Koudriakova, T.; Iatsimirskaia, E.; Utkin, I.; Gangl, E.; Vouros, P.; Storozhuk, E.; Orza, D., et al., Metabolism of the human immunodeficiency virus protease inhibitors indinavir and ritonavir by human intestinal microsomes and expressed cytochrome P4503A4/3A5: mechanism-based inactivation of cytochrome P4503A by ritonavir. *Drug Metab Dispos* **1998**, 26, 6, 552-561.
310. Imaoka, S.; Yamada, T.; Hiroi, T.; Hayashi, K.; Sakaki, T.; Yabusaki, Y.; Funae, Y., Multiple forms of human P450 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Systematic characterization and comparison with those of the rat. *Biochem Pharmacol* **1996**, 51, 8, 1041-1050.
311. Abelo, A.; Andersson, T. B.; Antonsson, M.; Naudot, A. K.; Skanberg, I.; Weidolf, L., Stereoselective metabolism of omeprazole by human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **2000**, 28, 8, 966-972.
312. Shiraga, T.; Kaneko, H.; Iwasaki, K.; Tozuka, Z.; Suzuki, A.; Hata, T., Identification of cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of zotepine, an antipsychotic drug, in human liver microsomes. *Xenobiotica* **1999**, 29, 3, 217-229.
313. Jones, B. C.; Hyland, R.; Ackland, M.; Tyman, C. A.; Smith, D. A., Interaction of terfenadine and its primary metabolites with cytochrome P450 2D6. *Drug Metab Dispos* **1998**, 26, 9, 875-882.
314. Dowers, T. S.; Rock, D. A.; Rock, D. A.; Perkins, B. N.; Jones, J. P., An analysis of the regioselectivity of aromatic hydroxylation and N-oxygenation by cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **2004**, 32, 3, 328-332.
315. Yumibe, N.; Huie, K.; Chen, K. J.; Snow, M.; Clement, R. P.; Cayen, M. N., Identification of human liver cytochrome P450 enzymes that metabolize the nonsedating antihistamine loratadine. Formation of descarboethoxyloratadine by CYP3A4 and CYP2D6. *Biochem Pharmacol* **1996**, 51, 2, 165-172.
316. Collins, J. R.; Loew, G. H., Theoretical study of the product specificity in the hydroxylation of camphor, norcamphor, 5,5-difluorocamphor, and pericyclocamphanone by cytochrome P-450cam. *J Biol Chem* **1988**, 263, 7, 3164-3170.
317. Jones, J. P.; Korzekwa, K. R., Predicting the rates and regioselectivity of reactions mediated by the P450 superfamily. *Methods Enzymol* **1996**, 272, 326-335.
318. Rietjens, I. M.; Soffers, A. E.; Veeger, C.; Vervoort, J., Regioselectivity of cytochrome P-450 catalyzed hydroxylation of fluorobenzenes predicted by calculated frontier orbital substrate characteristics. *Biochemistry* **1993**, 32, 18, 4801-4812.

-
319. de Groot, M. J.; Donne-Op den Kelder, G. M.; Commandeur, J. N.; van Lenthe, J. H.; Vermeulen, N. P., Metabolite predictions for para-substituted anisoles based on ab initio complete active space self-consistent field calculations. *Chem Res Toxicol* **1995**, *8*, 3, 437-443.
320. Yoshizawa, K.; Shiota, Y.; Kagawa, Y., Energetics for the oxygen rebound mechanism of alkane hydroxylation by the iron-oxo species of cytochrome p450. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2000**, *73*, 12, 2669-2673.
321. Newcomb, M.; Hollenberg, P. F.; Coon, M. J., Multiple mechanisms and multiple oxidants in P450-catalyzed hydroxylations. *Arch Biochem Biophys* **2003**, *409*, 1, 72-79.
322. Manchester, J. I.; Dinnocenzo, J. P.; Higgins, L. A.; Jones, J. P., A New Mechanistic Probe for Cytochrome P450: An Application of Isotope Effect Profiles. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 21, 5069-5070.
323. de Visser, S. P.; Ogliaro, F.; Harris, N.; Shaik, S., Multi-state epoxidation of ethene by cytochrome P450: a quantum chemical study. *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 13, 3037-3047.
324. Guallar, V.; Baik, M. H.; Lippard, S. J.; Friesner, R. A., Peripheral heme substituents control the hydrogen-atom abstraction chemistry in cytochromes P450. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 12, 6998-7002.
325. Guengerich, F. P., Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions. *Arch Biochem Biophys* **2003**, *409*, 1, 59-71.
326. Jerina, D. M.; Daly, J. W.; Witkop, B.; Zaltzman-Nirenberg, P.; Udenfriend, S., The role of arene oxide-oxepin systems in the metabolism of aromatic substrates. 3. Formation of 1,2-naphthalene oxide from naphthalene by liver microsomes. *J Am Chem Soc* **1968**, *90*, 23, 6525-6527.
327. Jerina, D. M.; Daly, J. W., Arene oxides: a new aspect of drug metabolism. *Science* **1974**, *185*, 151, 573-582.
328. Guroff, G.; Daly, J. W.; Jerina, D. M.; Renson, J.; Witkop, B.; Udenfriend, S., Hydroxylation-induced migration: the NIH shift. Recent experiments reveal an unexpected and general result of enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Science* **1967**, *157*, 796, 1524-1530.
329. Koerts, J.; Soffers, A. E.; Vervoort, J.; De Jager, A.; Rietjens, I. M., Occurrence of the NIH shift upon the cytochrome P450-catalyzed in vivo and in vitro aromatic ring hydroxylation of fluorobenzenes. *Chem Res Toxicol* **1998**, *11*, 5, 503-512.
330. Korzekwa, K. R.; Swinney, D. C.; Trager, W. F., Isotopically labeled chlorobenzenes as probes for the mechanism of cytochrome P-450 catalyzed aromatic hydroxylation. *Biochemistry* **1989**, *28*, 23, 9019-9027.

331. Vannelli, T.; Hooper, A. B., NIH shift in the hydroxylation of aromatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. Evidence against an arene oxide intermediate. *Biochemistry* **1995**, 34, 37, 11743-11749.
332. Darbyshire, J. F.; Iyer, K. R.; Grogan, J.; Korzekwa, K. R.; Trager, W. F., Substrate probe for the mechanism of aromatic hydroxylation catalyzed by cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* **1996**, 24, 9, 1038-1045.
333. Zakhariyeva, O.; Grodzicki, M.; Trautwein, A. X.; Veeger, C.; Rietjens, I., Molecular orbital study of the hydroxylation of benzene and monofluorobenzene catalysed by iron-oxoporphyrin pi cation radical complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **1996**, 1, 3, 192-204.
334. Zakhariyeva, O.; Grodzicki, M.; Trautwein, A. X.; Veeger, C.; Rietjens, I., Molecular orbital study of porphyrin-substrate interactions in cytochrome P450 catalysed aromatic hydroxylation of substituted anilines. *Biophysical Chemistry* **1998**, 73, 3, 189-203.
335. de Visser, S. P.; Shaik, S., A proton-shuttle mechanism mediated by the porphyrin in benzene hydroxylation by cytochrome p450 enzymes. *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 24, 7413-7424.
336. Korzekwa, K.; Trager, W.; Gouterman, M.; Spangler, D.; Loew, G., Cytochrome P450 mediated aromatic oxidation: a theoretical study. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 14, 4273-4279.
337. Safari, N.; Bahadoran, F.; Hoseinzadeh, M. R.; Ghiasi, R., Cytochrome P-450 model reaction: effects of substitution on the rate of aromatic hydroxylation. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2000**, 4, 3, 285-291.
338. Creary, X.; Mehrsheikhmohammadi, M. E.; McDonald, S., Methylene cyclopropane Rearrangement as a Probe for Free-Radical Substituent Effects - Sigma-Values for Commonly Encountered Conjugating and Organometallic Groups. *Journal of Organic Chemistry* **1987**, 52, 15, 3254-3263.
339. Taylor, R., *Electrophilic aromatic substitution*. Wiley: Chichester, 1990.
340. Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W., A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters. *Chemical Reviews* **1991**, 91, 2, 165-195.
341. Yano, J. K.; Wester, M. R.; Schoch, G. A.; Griffin, K. J.; Stout, C. D.; Johnson, E. F., The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *J Biol Chem* **2004**, 279, 37, 38091-38094.
342. Williams, P. A.; Cosme, J.; Vinkovic, D. M.; Ward, A.; Angove, H. C.; Day, P. J.; Vonrhein, C., et al., Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science* **2004**, 305, 5684, 683-686.
343. Lange, R.; Frank, J.; Saldana, J. L.; Balny, C., Fourth derivative UV-spectroscopy of proteins under high pressure .1. Factors affecting the fourth derivative spectrum of the

-
- aromatic amino acids. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **1996**, 24, 5, 277-283.
344. Mozhaev, V. V.; Heremans, K.; Frank, J.; Masson, P.; Balny, C., High pressure effects on protein structure and function. *Proteins* **1996**, 24, 1, 81-91.
345. Anzenbacher, P.; Hudecek, J., Differences in flexibility of active sites of cytochromes P450 probed by resonance Raman and UV-Vis absorption spectroscopy. *J Inorg Biochem* **2001**, 87, 4, 209-213.
346. Jung, C.; Hui Bon Hoa, G.; Davydov, D.; Gill, E.; Heremans, K., Compressibility of the heme pocket of substrate analogue complexes of cytochrome P-450cam-CO. The effect of hydrostatic pressure on the Soret band. *Eur J Biochem* **1995**, 233, 2, 600-606.
347. Davydov, D. R.; Halpert, J. R.; Renaud, J. P.; Hui Bon Hoa, G., Conformational heterogeneity of cytochrome P450 3A4 revealed by high pressure spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, 312, 1, 121-130.
348. Anzenbacherova, E.; Bec, N.; Anzenbacher, P.; Hudecek, J.; Soucek, P.; Jung, C.; Munro, A. W., et al., Flexibility and stability of the structure of cytochromes P450 3A4 and BM-3. *Eur J Biochem* **2000**, 267, 10, 2916-2920.
349. Scott, E. E.; White, M. A.; He, Y. A.; Johnson, E. F.; Stout, C. D.; Halpert, J. R., Structure of mammalian cytochrome P450 2B4 complexed with 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 1.9-A resolution: insight into the range of P450 conformations and the coordination of redox partner binding. *J Biol Chem* **2004**, 279, 26, 27294-27301.
350. Zhao, Y.; White, M. A.; Muralidhara, B. K.; Sun, L.; Halpert, J. R.; Stout, C. D., Structure of microsomal cytochrome P450 2B4 complexed with the antifungal drug bifonazole: insight into P450 conformational plasticity and membrane interaction. *J Biol Chem* **2006**, 281, 9, 5973-5981.
351. Muralidhara, B. K.; Negi, S.; Chin, C. C.; Braun, W.; Halpert, J. R., Conformational flexibility of mammalian cytochrome P450 2B4 in binding imidazole inhibitors with different ring chemistry and side chains. Solution thermodynamics and molecular modeling. *J Biol Chem* **2006**, 281, 12, 8051-8061.
352. Guengerich, F. P., A malleable catalyst dominates the metabolism of drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, 37, 13565-13566.
353. Ekroos, M.; Sjogren, T., Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, 37, 13682-13687.
354. Klose, T. S.; Ibeanu, G. C.; Ghanayem, B. I.; Pedersen, L. G.; Li, L.; Hall, S. D.; Goldstein, J. A., Identification of residues 286 and 289 as critical for conferring substrate specificity of human CYP2C9 for diclofenac and ibuprofen. *Arch Biochem Biophys* **1998**, 357, 2, 240-248.
355. Haining, R. L.; Jones, J. P.; Henne, K. R.; Fisher, M. B.; Koop, D. R.; Trager, W. F.; Rettie, A. E., Enzymatic determinants of the substrate specificity of CYP2C9: role of

- B'-C loop residues in providing the pi-stacking anchor site for warfarin binding. *Biochemistry* **1999**, 38, 11, 3285-3292.
356. Niwa, T.; Kageyama, A.; Kishimoto, K.; Yabusaki, Y.; Ishibashi, F.; Katagiri, M., Amino acid residues affecting the activities of human cytochrome P450 2C9 and 2C19. *Drug Metab Dispos* **2002**, 30, 8, 931-936.
357. Kleywegt, G. J.; Jones, T. A., Detection, delineation, measurement and display of cavities in macromolecular structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1994**, 50, Pt 2, 178-185.
358. Yin, H.; Anders, M. W.; Korzekwa, K. R.; Higgins, L.; Thummel, K. E.; Kharasch, E. D.; Jones, J. P., Designing safer chemicals: predicting the rates of metabolism of halogenated alkanes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, 24, 11076-11080.
359. Lewin, J. L.; Cramer, C. J., Rapid quantum mechanical models for the computational estimation of C-H bond dissociation energies as a measure of metabolic stability. *Mol Pharm* **2004**, 1, 2, 128-135.
360. de Graaf, C.; Vermeulen, N. P.; Feenstra, K. A., Cytochrome p450 in silico: an integrative modeling approach. *J Med Chem* **2005**, 48, 8, 2725-2755.
361. Cruciani, G.; Carosati, E.; De Boeck, B.; Ethirajulu, K.; Mackie, C.; Howe, T.; Vianello, R., MetaSite: understanding metabolism in human cytochromes from the perspective of the chemist. *J Med Chem* **2005**, 48, 22, 6970-6979.
362. Zhou, D. S.; Afzelius, L.; Grimm, S. W.; Andersson, T. B.; Zauhar, R. J.; Zamora, I., Comparison of methods for the prediction of the metabolic sites for CYP3A4-mediated metabolic reactions. *Drug Metabolism and Disposition* **2006**, 34, 6, 976-983.
363. Afzelius, L.; Arnby, C. H.; Broo, A.; Carlsson, L.; Isaksson, C.; Jurva, U.; Kjellander, B., et al., State-of-the-art tools for computational site of metabolism predictions: Comparative analysis, mechanistical insights, and future applications. *Drug Metabolism Reviews* **2007**, 39, 1, 61-86.
364. Kjellander, B.; Masimirembwa, C. M.; Zamora, I., Exploration of Enzyme-Ligand Interactions in CYP2D6 & 3A4 Homology Models and Crystal Structures Using a Novel Computational Approach. *J Chem Inf Model* **2007**.
365. Miller, G. P.; Hanna, I. H.; Nishimura, Y.; Guengerich, F. P., Oxidation of phenethylamine derivatives by cytochrome P450 2D6: the issue of substrate protonation in binding and catalysis. *Biochemistry* **2001**, 40, 47, 14215-14223.
366. Ekins, S.; de Groot, M. J.; Jones, J. P., Pharmacophore and three-dimensional quantitative structure activity relationship methods for modeling cytochrome p450 active sites. *Drug Metab Dispos* **2001**, 29, 7, 936-944.
367. Arimoto, R., Computational models for predicting interactions with cytochrome p450 enzyme. *Curr Top Med Chem* **2006**, 6, 15, 1609-1618.

-
368. Wrighton, S. A.; Schuetz, E. G.; Thummel, K. E.; Shen, D. D.; Korzekwa, K. R.; Watkins, P. B., The human CYP3A subfamily: practical considerations. *Drug Metab Rev* **2000**, 32, 3-4, 339-361.
369. Wolff, T.; Distlerath, L. M.; Worthington, M. T.; Groopman, J. D.; Hammons, G. J.; Kadlubar, F. F.; Prough, R. A., et al., Substrate specificity of human liver cytochrome P-450 debrisoquine 4-hydroxylase probed using immunochemical inhibition and chemical modeling. *Cancer Res* **1985**, 45, 5, 2116-2122.
370. Meyer, U. A.; Gut, J.; Kronbach, T.; Skoda, C.; Meier, U. T.; Catin, T.; Dayer, P., The molecular mechanisms of two common polymorphisms of drug oxidation--evidence for functional changes in cytochrome P-450 isozymes catalysing bufuralol and mephenytoin oxidation. *Xenobiotica* **1986**, 16, 5, 449-464.
371. Islam, S. A.; Wolf, C. R.; Lennard, M. S.; Sternberg, M. J. E., A 3-Dimensional Molecular Template for Substrates of Human Cytochrome-P450 Involved in Debrisoquine 4-Hydroxylation. *Carcinogenesis* **1991**, 12, 12, 2211-2219.
372. Koymans, L. M.; Vermeulen, N. P.; Baarslag, A.; Donne-Op den Kelder, G. M., A preliminary 3D model for cytochrome P450 2D6 constructed by homology model building. *J Comput Aided Mol Des* **1993**, 7, 3, 281-289.
373. Lewis, D. F., Three-dimensional models of human and other mammalian microsomal P450s constructed from an alignment with P450102 (P450bm3). *Xenobiotica* **1995**, 25, 4, 333-366.
374. Ellis, S. W.; Hayhurst, G. P.; Smith, G.; Lightfoot, T.; Wong, M. M.; Simula, A. P.; Ackland, M. J., et al., Evidence that aspartic acid 301 is a critical substrate-contact residue in the active site of cytochrome P450 2D6. *J Biol Chem* **1995**, 270, 49, 29055-29058.
375. Mackman, R.; Tschirret-Guth, R. A.; Smith, G.; Hayhurst, G. P.; Ellis, S. W.; Lennard, M. S.; Tucker, G. T., et al., Active-site topologies of human CYP2D6 and its aspartate-301 --> glutamate, asparagine, and glycine mutants. *Arch Biochem Biophys* **1996**, 331, 1, 134-140.
376. Hanna, I. H.; Kim, M. S.; Guengerich, F. P., Heterologous expression of cytochrome P450 2D6 mutants, electron transfer, and catalysis of bufuralol hydroxylation: the role of aspartate 301 in structural integrity. *Arch Biochem Biophys* **2001**, 393, 2, 255-261.
377. Koymans, L.; Vermeulen, N. P.; van Acker, S. A.; te Koppele, J. M.; Heykants, J. J.; Lavrijsen, K.; Meuldermans, W., et al., A predictive model for substrates of cytochrome P450-debrisoquine (2D6). *Chem Res Toxicol* **1992**, 5, 2, 211-219.
378. Paine, M. J.; McLaughlin, L. A.; Flanagan, J. U.; Kemp, C. A.; Sutcliffe, M. J.; Roberts, G. C.; Wolf, C. R., Residues glutamate 216 and aspartate 301 are key determinants of substrate specificity and product regioselectivity in cytochrome P450 2D6. *J Biol Chem* **2003**, 278, 6, 4021-4027.

379. Ishigooka, M.; Shimizu, T.; Hiroya, K.; Hatano, M., Role of Glu318 at the putative distal site in the catalytic function of cytochrome P450d. *Biochemistry* **1992**, 31, 5, 1528-1531.
380. Gerber, N. C.; Sligar, S. G., Catalytic Mechanism of Cytochrome-P-450 - Evidence for a Distal Charge Relay. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114, 22, 8742-8743.
381. Gerber, N. C.; Sligar, S. G., A role for Asp-251 in cytochrome P-450cam oxygen activation. *J Biol Chem* **1994**, 269, 6, 4260-4266.
382. de Groot, M. J.; Ackland, M. J.; Horne, V. A.; Alex, A. A.; Jones, B. C., Novel approach to predicting P450-mediated drug metabolism: development of a combined protein and pharmacophore model for CYP2D6. *J Med Chem* **1999**, 42, 9, 1515-1524.
383. Guengerich, F. P.; Hanna, I. H.; Martin, M. V.; Gillam, E. M., Role of glutamic acid 216 in cytochrome P450 2D6 substrate binding and catalysis. *Biochemistry* **2003**, 42, 5, 1245-1253.
384. Niwa, T.; Sato, R.; Yabusaki, Y.; Ishibashi, F.; Katagiri, M., Contribution of human hepatic cytochrome P450s and steroidogenic CYP17 to the N-demethylation of aminopyrine. *Xenobiotica* **1999**, 29, 2, 187-193.
385. Hiroi, T.; Kishimoto, W.; Chow, T.; Imaoka, S.; Igarashi, T.; Funae, Y., Progesterone oxidation by cytochrome P450 2D isoforms in the brain. *Endocrinology* **2001**, 142, 9, 3901-3908.
386. Guengerich, F. P.; Miller, G. P.; Hanna, I. H.; Martin, M. V.; Leger, S.; Black, C.; Chauret, N., et al., Diversity in the oxidation of substrates by cytochrome P450 2D6: lack of an obligatory role of aspartate 301-substrate electrostatic bonding. *Biochemistry* **2002**, 41, 36, 11025-11034.
387. Grace, J. M.; Kinter, M. T.; Macdonald, T. L., Atypical metabolism of deprenyl and its enantiomer, (S)-(+)-N,α-dimethyl-N-propynylphenethylamine, by cytochrome P450 2D6. *Chem Res Toxicol* **1994**, 7, 3, 286-290.
388. Coutts, R. T.; Su, P.; Baker, G. B., Involvement of CYP2D6, CYP3A4, and other cytochrome P-450 isozymes in N-dealkylation reactions. *J Pharmacol Toxicol Methods* **1994**, 31, 4, 177-186.
389. Hayhurst, G. P.; Harlow, J.; Chowdry, J.; Gross, E.; Hilton, E.; Lennard, M. S.; Tucker, G. T., et al., Influence of phenylalanine-481 substitutions on the catalytic activity of cytochrome P450 2D6. *Biochem J* **2001**, 355, Pt 2, 373-379.
390. Hamelin, B. A.; Turgeon, J.; Vallee, F.; Belanger, P. M.; Paquet, F.; LeBel, M., The disposition of fluoxetine but not sertraline is altered in poor metabolizers of debrisoquin. *Clin Pharmacol Ther* **1996**, 60, 5, 512-521.
391. Venhorst, J.; ter Laak, A. M.; Commandeur, J. N.; Funae, Y.; Hiroi, T.; Vermeulen, N. P., Homology modeling of rat and human cytochrome P450 2D (CYP2D) isoforms

-
- and computational rationalization of experimental ligand-binding specificities. *J Med Chem* **2003**, 46, 1, 74-86.
392. Keizers, P. H.; Lussenburg, B. M.; de Graaf, C.; Mentink, L. M.; Vermeulen, N. P.; Commandeur, J. N., Influence of phenylalanine 120 on cytochrome P450 2D6 catalytic selectivity and regiospecificity: crucial role in 7-methoxy-4-(aminomethyl)-coumarin metabolism. *Biochem Pharmacol* **2004**, 68, 11, 2263-2271.
393. Friedberg, I.; Margalit, H., Persistently conserved positions in structurally similar, sequence dissimilar proteins: roles in preserving protein fold and function. *Protein Sci* **2002**, 11, 2, 350-360.
394. Qamra, R.; Taneja, B.; Mande, S. C., Identification of conserved residue patterns in small beta-barrel proteins. *Protein Eng* **2002**, 15, 12, 967-977.
395. Mornet, E.; Gibrat, J. F., A 3D model of human P450c21: study of the putative effects of steroid 21-hydroxylase gene mutations. *Hum Genet* **2000**, 106, 3, 330-339.
396. Tsigelny, I. F.; Kotlovyi, V.; Wasserman, L., SNP analysis combined with protein structure prediction defines structure-functional relationships in cancer related cytochrome P450 estrogen metabolism. *Curr Med Chem* **2004**, 11, 5, 525-538.
397. Lin, D.; Zhang, L. H.; Chiao, E.; Miller, W. L., Modeling and mutagenesis of the active site of human P450c17. *Mol Endocrinol* **1994**, 8, 3, 392-402.
398. Uno, T.; Yokota, H.; Imai, Y., Replacing the carboxy-terminal 28 residues of rabbit liver P-450 (laurate (omega-1)-hydroxylase) with those of P-450 (testosterone 16 alpha-hydroxylase) produces a new stereospecific hydroxylase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **1990**, 167, 2, 498-503.
399. Martineau, I.; Belanger, A.; Tchernof, A.; Tremblay, Y., Molecular cloning and expression of guinea pig cytochrome P450c21 cDNA (steroid 21-hydroxylase) isolated from the adrenals. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2003**, 86, 2, 123-132.
400. Krone, N.; Braun, A.; Roscher, A. A.; Knorr, D.; Schwarz, H. P., Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**, 85, 3, 1059-1065.
401. Lobato, M. N.; Ordonez-Sanchez, M. L.; Tusie-Luna, M. T.; Meseguer, A., Mutation analysis in patients with congenital adrenal hyperplasia in the Spanish population: identification of putative novel steroid 21- hydroxylase deficiency alleles associated with the classic form of the disease. *Hum Hered* **1999**, 49, 3, 169-175.
402. Billerbeck, A. E.; Mendonca, B. B.; Pinto, E. M.; Madureira, G.; Arnhold, I. J.; Bacheaga, T. A., Three novel mutations in CYP21 gene in Brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab* **2002**, 87, 9, 4314-4317.

403. Hasemann, C. A.; Kurumbail, R. G.; Boddupalli, S. S.; Peterson, J. A.; Deisenhofer, J., Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* **1995**, 3, 1, 41-62.
404. Yoshikawa, K.; Noguti, T.; Tsujimura, M.; Koga, H.; Yasukochi, T.; Horiuchi, T.; Go, M., Hydrogen bond network of cytochrome P-450cam: a network connecting the heme group with helix K. *Biochim Biophys Acta* **1992**, 1122, 1, 41-44.
405. Kitamura, M.; Buczko, E.; Dufau, M. L., Dissociation of hydroxylase and lyase activities by site-directed mutagenesis of the rat P45017 alpha. *Mol Endocrinol* **1991**, 5, 10, 1373-1380.
406. Chen, S.; Zhou, D., Functional domains of aromatase cytochrome P450 inferred from comparative analyses of amino acid sequences and substantiated by site-directed mutagenesis experiments. *J Biol Chem* **1992**, 267, 31, 22587-22594.
407. Shimizu, T.; Tateishi, T.; Hatano, M.; Fujii-Kuriyama, Y., Probing the role of lysines and arginines in the catalytic function of cytochrome P450d by site-directed mutagenesis. Interaction with NADPH-cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* **1991**, 266, 6, 3372-3375.
408. Furuya, H.; Shimizu, T.; Hirano, K.; Hatano, M.; Fujii-Kuriyama, Y.; Raag, R.; Poulos, T. L., Site-directed mutageneses of rat liver cytochrome P-450d: catalytic activities toward benzphetamine and 7-ethoxycoumarin. *Biochemistry* **1989**, 28, 17, 6848-6857.
409. Stikkelbroeck, N. M.; Hoefsloot, L. H.; de Wijs, I. J.; Otten, B. J.; Hermus, A. R.; Sijm, A. A., CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. *J Clin Endocrinol Metab* **2003**, 88, 8, 3852-3859.
410. Wedell, A.; Luthman, H., Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. *Hum Mol Genet* **1993**, 2, 5, 499-504.
411. Kariakin, A.; Davydov, D.; Peterson, J. A.; Jung, C., A new approach to the study of protein-protein interaction by FTIR: complex formation between cytochrome P450BM-3 heme domain and FMN reductase domain. *Biochemistry* **2002**, 41, 46, 13514-13525.
412. Schunemann, V.; Lenzian, F.; Jung, C.; Contzen, J.; Barra, A. L.; Sligar, S. G.; Trautwein, A. X., Tyrosine radical formation in the reaction of wild type and mutant cytochrome P450cam with peroxy acids: a multifrequency EPR study of intermediates on the millisecond time scale. *J Biol Chem* **2004**, 279, 12, 10919-10930.
413. Guallar, V.; Friesner, R. A., Cytochrome P450CAM enzymatic catalysis cycle: a quantum mechanics/molecular mechanics study. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 27, 8501-8508.

-
414. Schlichting, I.; Berendzen, J.; Chu, K.; Stock, A. M.; Maves, S. A.; Benson, D. E.; Sweet, R. M., et al., The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Science* **2000**, *287*, 5458, 1615-1622.
415. Sjodin, T.; Christian, J. F.; Macdonald, I. D.; Davydov, R.; Unno, M.; Sligar, S. G.; Hoffman, B. M., et al., Resonance Raman and EPR investigations of the D251N oxycytochrome P450cam/putidaredoxin complex. *Biochemistry* **2001**, *40*, 23, 6852-6859.
416. Nagano, S.; Shimada, H.; Tarumi, A.; Hishiki, T.; Kimata-Ariga, Y.; Egawa, T.; Suematsu, M., et al., Infrared spectroscopic and mutational studies on putidaredoxin-induced conformational changes in ferrous CO-P450cam. *Biochemistry* **2003**, *42*, 49, 14507-14514.
417. Pochapsky, S. S.; Pochapsky, T. C.; Wei, J. W., A model for effector activity in a highly specific biological electron transfer complex: the cytochrome P450(cam)-putidaredoxin couple. *Biochemistry* **2003**, *42*, 19, 5649-5656.
418. Contzen, J.; Jung, C., Changes in secondary structure and salt links of cytochrome P-450cam induced by photoreduction: a Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochemistry* **1999**, *38*, 49, 16253-16260.
419. Contzen, J.; Jung, C., Step-scan time-resolved FTIR spectroscopy of cytochrome P-450cam carbon monoxide complex: a salt link involved in the ligand-rebinding process. *Biochemistry* **1998**, *37*, 13, 4317-4324.
420. Roitberg, A. E.; Holden, M. J.; Mayhew, M. P.; Kurnikov, I. V.; Beratan, D. N.; Vilker, V. L., Binding and electron transfer between putidaredoxin and cytochrome P450cam. Theory and experiments. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 35, 8927-8932.
421. Guallar, V.; Olsen, B., The role of the heme propionates in heme biochemistry. *J Inorg Biochem* **2006**, *100*, 4, 755-760.
422. Allorge, D.; Breant, D.; Harlow, J.; Chowdry, J.; Lo-Guidice, J. M.; Chevalier, D.; Cauffiez, C., et al., Functional analysis of CYP2D6.31 variant: homology modeling suggests possible disruption of redox partner interaction by Arg440His substitution. *Proteins* **2005**, *59*, 2, 339-346.
423. Eiben, S.; Kaysser, L.; Maurer, S.; Kuhnel, K.; Urlacher, V. B.; Schmid, R. D., Preparative use of isolated CYP102 monooxygenases -- a critical appraisal. *J Biotechnol* **2006**, *124*, 4, 662-669.
424. Urlacher, V. B.; Eiben, S., Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol* **2006**, *24*, 7, 324-330.
425. Guengerich, F. P., Cytochrome P450 enzymes in the generation of commercial products. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, 5, 359-366.

426. Yun, C. H.; Kim, K. H.; Kim, D. H.; Jung, H. C.; Pan, J. G., The bacterial P450 BM3: a prototype for a biocatalyst with human P450 activities. *Trends Biotechnol* **2007**, *25*, 7, 289-298.
427. Di Nardo, G.; Fantuzzi, A.; Sideri, A.; Panicco, P.; Sassone, C.; Giunta, C.; Gilardi, G., Wild-type CYP102A1 as a biocatalyst: turnover of drugs usually metabolised by human liver enzymes. *J Biol Inorg Chem* **2007**, *12*, 3, 313-323.
428. van Vugt-Lussenburg, B. M.; Stjernschantz, E.; Lastdrager, J.; Oostenbrink, C.; Vermeulen, N. P.; Commandeur, J. N., Identification of critical residues in novel drug metabolizing mutants of cytochrome P450 BM3 using random mutagenesis. *J Med Chem* **2007**, *50*, 3, 455-461.
429. Otey, C. R.; Bandara, G.; Lalonde, J.; Takahashi, K.; Arnold, F. H., Preparation of human metabolites of propranolol using laboratory-evolved bacterial cytochromes P450. *Biotechnol Bioeng* **2006**, *93*, 3, 494-499.
430. Landwehr, M.; Hochrein, L.; Otey, C. R.; Kasrayan, A.; Backvall, J. E.; Arnold, F. H., Enantioselective alpha-hydroxylation of 2-arylacetic acid derivatives and buspirone catalyzed by engineered cytochrome P450 BM-3. *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 18, 6058-6059.
431. Wilke, R. A.; Reif, D. M.; Moore, J. H., Combinatorial pharmacogenetics. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, *4*, 11, 911-918.
432. Ekins, S.; Mestres, J.; Testa, B., In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *Br J Pharmacol* **2007**.
433. Pei, J.; Grishin, N. V., AL2CO: calculation of positional conservation in a protein sequence alignment. *Bioinformatics* **2001**, *17*, 8, 700-712.
434. Case, D. A.; Pearlman, D. A.; Caldwell, J. W.; Cheatham III, T. E.; Wang, J.; Ross, W. S.; Simmerling, C. L., et al. *AMBER 7*, University of California: San Francisco, 2002.
435. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* **1998**, *19*, 14, 1639-1662.
436. Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J., Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **1990**, *215*, 3, 403-410.
437. Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **1994**, *22*, 22, 4673-4680.
438. Guex, N.; Peitsch, M. C., SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 15, 2714-2723.

-
439. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J., J. A., et al. *Gaussian 98*, Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2004.
440. Georgescu, R. E.; Alexov, E. G.; Gunner, M. R., Combining conformational flexibility and continuum electrostatics for calculating pK(a)s in proteins. *Biophys J* **2002**, 83, 4, 1731-1748.
441. Sali, A.; Blundell, T. L., Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **1993**, 234, 3, 779-815.
442. Sippl, M. J., Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* **1993**, 17, 4, 355-362.
443. DeLano, W. L. *The PyMOL Molecular Graphics System* DeLano Scientific: Palo Alto, CA, USA, 2002.
444. Notredame, C.; Higgins, D. G.; Heringa, J., T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **2000**, 302, 1, 205-217.
445. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K., VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **1996**, 14, 1, 33-38, 27-38.
446. Boeckmann, B.; Bairoch, A.; Apweiler, R.; Blatter, M. C.; Estreicher, A.; Gasteiger, E.; Martin, M. J., et al., The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res* **2003**, 31, 1, 365-370.
447. Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E., A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions. *Journal of Molecular Biology* **1982**, 161, 2, 269-288.
448. Shoichet, B. K.; Bodian, D. L.; Kuntz, I. D., Molecular Docking Using Shape Descriptors. *Journal of Computational Chemistry* **1992**, 13, 3, 380-397.
449. Oshiro, C. M.; Kuntz, I. D., Characterization of receptors with a new negative image: Use in molecular docking and lead optimization. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **1998**, 30, 3, 321-336.
450. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C., Molecular Recognition of Receptor-Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation. *Journal of Molecular Biology* **1995**, 245, 1, 43-53.
451. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R., Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology* **1997**, 267, 3, 727-748.
452. Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G., A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *Journal of Molecular Biology* **1996**, 261, 3, 470-489.

453. Kramer, B.; Rarey, M.; Lengauer, T., Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins-Structure Function and Genetics* **1999**, 37, 2, 228-241.
454. Goodsell, D. S.; Olson, A. J., Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing. *Proteins-Structure Function and Genetics* **1990**, 8, 3, 195-202.
455. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Huey, R.; Olson, A. J., Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: Parallel applications of AutoDock 2.4. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1996**, 10, 4, 293-304.
456. Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Nguyen, D. T.; Case, D. A., An All Atom Force-Field for Simulations of Proteins and Nucleic-Acids. *Journal of Computational Chemistry* **1986**, 7, 2, 230-252.
457. Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M., Charmm - a Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *Journal of Computational Chemistry* **1983**, 4, 2, 187-217.
458. Böhm, H. J., The Development of a Simple Empirical Scoring Function to Estimate the Binding Constant for a Protein Ligand Complex of Known 3-Dimensional Structure. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1994**, 8, 3, 243-256.
459. Gohlke, H.; Hendlich, M.; Klebe, G., Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology* **2000**, 295, 2, 337-356.
460. Wang, J.; Kollman, P. A.; Kuntz, I. D., Flexible ligand docking: A multistep strategy approach. *Proteins-Structure Function and Genetics* **1999**, 36, 1, 1-19.
461. Makino, S.; Kuntz, I. D., Automated flexible ligand docking method and its application for database search. *Journal of Computational Chemistry* **1997**, 18, 14, 1812-1825.
462. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C., et al., A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules (vol 117, pg 5179, 1995). *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 9, 2309-2309.
463. Wang, J. M.; Cieplak, P.; Kollman, P. A., How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of Computational Chemistry* **2000**, 21, 12, 1049-1074.
464. Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C., Numerical-Integration of Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints - Molecular-Dynamics of N-Alkanes. *Journal of Computational Physics* **1977**, 23, 3, 327-341.
465. Barth, F., Heme force field parameter. In 2003; p persönliche Mitteilung.
466. Schlegel, H. B., Optimization of Equilibrium Geometries and Transition Structures. *Journal of Computational Chemistry* **1982**, 3, 2, 214-218.

-
467. Peng, C. Y.; Ayala, P. Y.; Schlegel, H. B.; Frisch, M. J., Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *Journal of Computational Chemistry* **1996**, *17*, *1*, 49-56.
468. Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A., Self-Consistent Molecular-Orbital Methods .9. Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. *Journal of Chemical Physics* **1971**, *54*, *2*, 724-&.
469. Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W. D.; Kollman, P. A., A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges - the Resp Model. *Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, *40*, 10269-10280.
470. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Kollman, P. A., Application of Resp Charges to Calculate Conformational Energies, Hydrogen-Bond Energies, and Free-Energies of Solvation. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, *21*, 9620-9631.
471. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L., Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *Journal of Chemical Physics* **1983**, *79*, *2*, 926-935.
472. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L., Particle Mesh Ewald - an N.Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, *12*, 10089-10092.
473. Duke, R. E.; Pedersen, L. *PMEMD 3*, University of North Carolina-Chapel Hill: 2003.
474. Hemmer, M. C.; Steinhauer, V.; Gasteiger, J., Deriving the 3D structure of organic molecules from their infrared spectra. *Vibrational Spectroscopy* **1999**, *19*, *1*, 151-164.
475. Henikoff, S.; Henikoff, J. G., Amino-Acid Substitution Matrices from Protein Blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89*, *22*, 10915-10919.
476. Smith, T. F.; Waterman, M. S., Identification of Common Molecular Subsequences. *Journal of Molecular Biology* **1981**, *147*, *1*, 195-197.
477. Needleman .Sb; Wunsch, C. D., A General Method Applicable to Search for Similarities in Amino Acid Sequence of 2 Proteins. *Journal of Molecular Biology* **1970**, *48*, *3*, 443-&.
478. Hanahan, D., Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **1983**, *166*, *4*, 557-580.

