



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
ÁREA BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Diciembre 2019

Tesis para la obtención del grado en
Doctor en Ciencias Químicas

**Desarrollo bioinformático y modelado *in-silico*
para el análisis del ajuste inducido en las
enzimas citocromo P450**

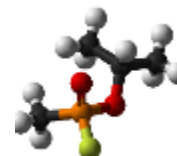
PRESENTA:

MC. Biol. Israel Quiroga Montes

Director de Tesis:

D. en C. Thomas Scior

Laboratorio de Simulación Molecular, Posgrado de Ciencias
Químicas, BUAP



ABREVIATURAS

CYP	Citocromo P450
PPC	Fenprocumón
ER	Retículo Endoplásmico
WFN	Warfarina
MSA	Alineamiento múltiple de secuencias
SoM	Sitio de metabolización de los sustratos
FF	Campo de fuerza
VKOR	Epóxido reductasa de vitamina K
KO	Vitamina K epoxidada
PDB	Base de datos de proteínas
MD	Dinámica molecular
MM	Mecánica molecular
FLP	Flurbiprofeno
RMSD	Desviación de la raíz cuadrada de la media
M(s)	Metabolito(s)
S(s)	Sustrato(s)
AD4	AutoDock 4.2
ABC	Área Bajo la Curva

Contenido

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 ACTIVIDAD, SELECTIVIDAD Y SITIOS DE METABOLISMO	6
1.2 IMPORTANCIA FARMACOLÓGICA Y METABOLISMO DE LOS LIGANDOS EN ESTE ESTUDIO	7
1.2.1 Metabolitos hidroxilados reportados de fenpropumón.....	8
1.3 RELACIÓN ESTRUCTURAL DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS CYP2C9 Y CYP3A4.	10
3.1.1 Asa B-C: su papel en la actividad de los CYPs.....	16
1.4 EFECTO DEL AJUSTE INDUCIDO EN MODELOS <i>IN-SILICO</i>	17
1.5 MODELOS COMPUTACIONALES EN LA ACTIVIDAD DE ENIMAS CYP	19
2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS.....	24
2.1 OBJETIVO GENERAL	25
2.1.1 Objetivos particulares	25
3 MATERIAL Y MÉTODOS	25
3.1 MATERIAL (HARDWARE).....	25
3.2 MATERIAL (SOFTWARE).....	26
3.2.1 Swiss-Pdb Viewer (SPDBV).....	26
3.2.2 VEGA ZZ	26
3.2.3 Discovery Studio 4.0 Client	27
3.2.3 UCSF Chimera.....	27
3.2.4 AutoDock Tools.....	27
3.2.5 Autodock 4.2	27
3.2.6 BioX 4.6.....	28
3.2.7 Yeti 8.3.....	28
3.2.8 Sybyl FlexX.....	28

3.2.9 NAMD	29
3.2.10 VMD.....	29
3.2.11 Gaussian.....	29
3.3 MÉTODOS	30
3.3.1 Selección de estructuras cristalográficas	30
3.3.2 Parametrización de ligandos.....	31
3.3.3 Acoplamiento molecular y refinamiento de complejos.....	31
3.3.4 Parametrización de dinámica molecular	32
3.3.5 Sistemas de CYP3A4 para evaluación del ajuste inducido	33
3.3.6 Generación de sistemas de CYP2C9 y CYP3A4 para evaluación de la actividad sobre fenprocumón.....	34
3.3.7 Descriptores y quimiometría para la evaluación de ajuste inducido.....	34
3.3.8 Análisis de resultados de ajuste inducido.....	35
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1 MODELADO DE SITIOS DE METABOLISMO DE FENPROCUMÓN	36
4.1.1 Acoplamiento molecular y refinamiento de complejos	37
4.2 SIMULACIÓN DE AJUSTE INDUCIDO PARA EL CITOCROMO P450 3A4 BASADO EN OBSERVACIONES EXPERIMENTALES	47
4.3 SIMULACIÓN DEL METABOLISMO DE FENPROCUMÓN POR ENZIMAS CYPS.....	57
4.3.1 Diferencias dinámicas y estructurales de CYP2C9 con y sin PPC en el sitio activo	57
4.3.2 Efecto de la membrana en la estructura y dinámica de CYP2C9	60
4.3.3 Comparación de la estructura enzimática antes y después del ingreso del sustrato al sitio activo	64
4.4 PATRONES DE HIDROXILACIÓN DE CYP3A4 Y CYP2C9 SOBRE FENPROCUMÓN.....	71
5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	77
6 SUPLEMENTOS	81

6.1	Árbol filogenético de los CYPs humanos.....	81
6.2	Redimiendo de producción de metabolitos de WFN y PPC.....	82
6.3	Comparación intervalos de movimiento CYP3A4 en modelos de estudio.....	83
6.4	Campos de fuerza utilizados.....	84
7	REFERENCIAS.....	85

1 INTRODUCCIÓN

La familia **Citocromos P450** (CYP) es la principal responsable de la primera fase del metabolismo de los compuestos externos de un organismo (xenobiótico), como las toxinas y los fármacos [1]. Por este motivo, el estudio de la actividad de estas enzimas se ha convertido en uno de los principales intereses de la industria farmacéutica. Los citocromos P450 (CYP450, por sus siglas en inglés) comprenden a una amplia familia, son enzimas generalmente monooxigenasas microsómicas del hígado con un **grupo protésico hemo** que catalizan diversos tipos de reacciones de biotransformación hepática [1, 2, 3]. Como en el caso de otros grupos protésicos, el hemo está unido no covalentemente a su apoproteína. A veces se les conoce como isoenzimas, una terminología bastante inapropiada porque no siempre comparten la misma reacción catalítica, mecanismos ni sustratos. Sin embargo, el nombre P450 de estas proteínas se atribuyó adecuadamente aludiendo al pico máximo de absorción espectral visible de 450 nm observada después de la reducción química y la exposición al gas de monóxido de carbono para la caracterización analítica [4]. Las reacciones de biotransformación incluyen reacciones de oxidación aromática y alifática, desalquilación N y O, oxidación S y N, formación de sulfóxido/sulfonas, desaminación oxidativa, desulfuración y deshalogenación [5, 6]. Normalmente utilizan NADH o NADPH como donador de electrones para llevar a cabo su actividad [7].

La gran mayoría de los **sustratos de los CYPs** son sustancias hidrofóbicas difíciles de eliminar directamente a través de la orina; y por consiguiente, tienden a acumularse causando intoxicación [8, 9]. La naturaleza hidrofóbica de los sustratos de los CYPs provoca que estos se queden inmersos en la membrana del Retículo Endoplásmico (ER). Después, el sustrato debe ingresar al sitio activo de los CYPs, el cual se encuentra en el ectodominio de la proteína. Esto suscita un paso crítico en la actividad de estas enzimas [1]. Una vez en el sitio activo, una serie de pasos de óxido reducción provocan la hidroxilación del sustrato haciéndolo un poco más soluble en agua y expulsándolo definitivamente de la membrana [1, 4]. La adición de este grupo funcional sirve además de anclaje para la siguiente fase de metabolización. El oxígeno sirve como aceptor para generar un enlace éter con radicales altamente hidrófilos y con pesos moleculares más grandes como glutatión, ácido glucurónico, sulfato, o un grupo acetilo; lo cual facilita la eliminación del xenobiótico del organismo [1].

La **monohidroxilación** es un posible mecanismo de biotransformación en grupos aromáticos o incluso alifáticos con un enlace carbono-hidrógeno inerte. El mecanismo a través de un epóxido intermedio también ha sido descrito en la literatura especializada [10, 11, 12]. El hierro (Fe III) es el centro metálico de su sistema de anillo de porfirina que funciona como un cofactor para la catálisis [13, 14]. Las estructuras cristalográficas de la

enzima muestran que el ion metálico central (Fe III) se encuentra en geometría de coordinación octaédrica. Los cuatro átomos situados en posición ecuatorial son los nitrógenos de los cuatro grupos pirrol en el sistema de porfirina cíclica formando ángulos de 90° entre sí. Un grupo tiolato aniónico de una cisteína del CYP constituye el quinto sitio de coordinación para formar una geometría piramidal cuadrada. El sexto átomo de coordinación axial restante puede ser un oxígeno (el cual puede pertenecer a oxígeno molecular, dióxido de carbono o incluso agua) que a su vez se encuentra cerca del **sitio de metabolismo del sustrato (SoM)** para la hidroxilación o la epoxidación del sustrato. El complejo sustrato-enzima resultante se acopla con un proceso de transferencia de oxígeno donde el Fe III del hemo es esencialmente electrofílico [15].

Para el **mecanismo de hidroxilación** del sustrato se necesita que el Fe III catiónico se reduce a Fe II antes de su recepción de oxígeno molecular (O₂), (**pasos 1, 2 y 3 Figura Mecanismo**) [16]. Se asume que el O₂ se convierte en una especie de bioxígeno radical. Durante el intercambio de electrones con O₂, el hierro recupera su estado de oxidación inicial como Fe III (**pasos 4 y 5 en Figura Mecanismo**). La oxigenación del sustrato, principalmente por epoxidación e hidroxilación, no tiene lugar hasta que una especie activada de monooxígeno (u oxo) se coordina con Fe IV formando un grupo hemo radical catiónico (**paso 5 en Figura Mecanismo**). El complejo altamente inestable reacciona rápidamente con átomos de carbono inertes de las cadenas alquílicas o anillos arilo de los sustratos. El complejo libera mayores cantidades de energía potencial, proporcionando la energía de activación de Arrhenius para alcanzar un estado de transición en una ruta de coordinación hiperdimensional definida (tunelizando). Aunque el mecanismo exacto todavía está bajo un debate sustancial, es seguro decir que dobles enlaces en alquenos o anillos aromáticos pueden sufrir fácilmente reacciones de transferencia de oxígeno (oxigenación). La hidroxilación aromática se explica mejor por una vía radical. Korzekwa, Swinney y Trager demostraron en estudios metabólicos de isótopos que la epoxidación directa de un anillo de arilo es muy poco probable [17]. En cambio, se puede suponer que un intermedio tetraédrico temprano (**paso 6 en Figura Mecanismo**) conduce rápidamente a un epóxido de arilo inestable (**paso 7a en Figura Mecanismo**) o areno (**paso 7b en Figura Mecanismo**). Como paso final, ambos convergen en un mismo producto, un metabolito monohidroxilado (**paso 8 en Figura Mecanismo**) [4].

Durante la **etapa de reacción central de la hidroxilación del CYP**, el oxígeno electrófilo interactúa con una porción de hidrocarburo del sustrato para formar un enlace carbono-oxígeno. La formación de enlaces es seguida rápidamente por una etapa transitoria para permitir que el oxígeno conecte el átomo de carbono adyacente. Estudios con deuterio en el Instituto Nacional de Salud, EE. UU., demostraron que el hidrógeno, marcado con deuterio, se desplaza a la posición "orto" adyacente del anillo. El "grupo saliente" en el

reordenamiento (**NIH shift**) es el átomo de hidrógeno original en la posición "orto" en condiciones de reacción básicas, o el hidrógeno marcado con deuterio en un medio ácido. Es de destacar que el llamado NIH *shift* también funciona bien con pequeños sustituyentes orgánicos distintos del hidrógeno (como el deuterio) [18]. El NIH *shift* es asistido por el átomo de hidrógeno adyacente en presencia de un solo par de electrones del átomo de oxígeno, que termina con la inserción del grupo hidroxilo en el átomo de carbono del SoM (**Figura Mecanismo**).

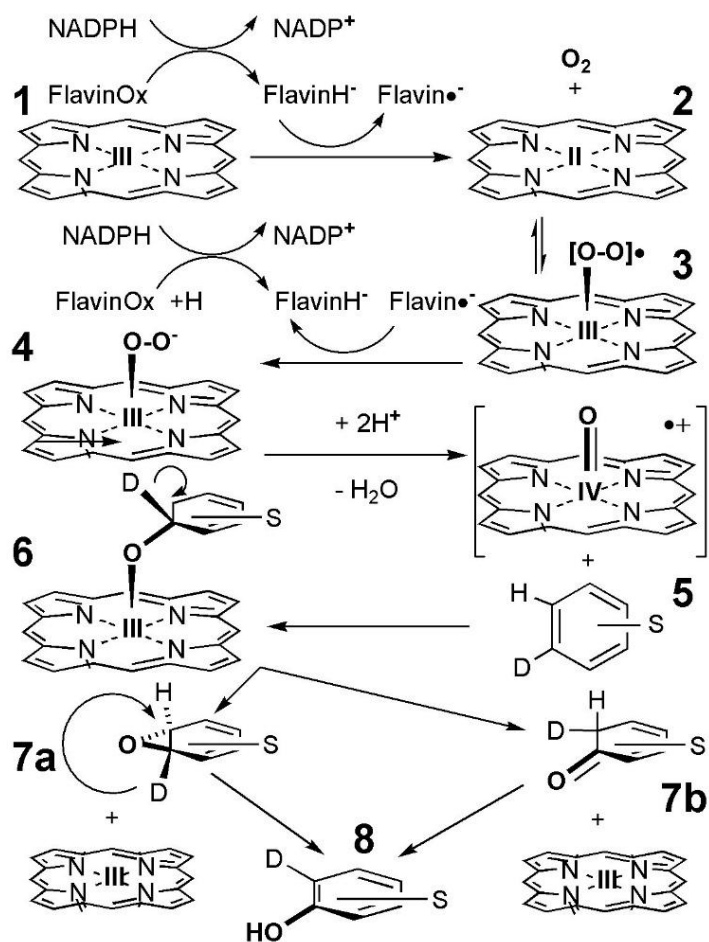


Figura Mecanismo. Recuperado de Figura 2 en [16]. Visión establecida sobre el mecanismo bioquímico de la hidroxilación aromática mediante el citocromo P450 oxigenasas que contienen hemo, representado por su sistema de anillo de protoporfirina. La etapa 7 se ramifica pasando a través de un intermedio de expóxido (7a) o de cetona (7b) del sustrato aromático (S). El átomo de hidrógeno del desplazamiento de los NIH (flechas cíclicas en los pasos 7a o 6 que conducen a 7b) se marcó como "D" (experimentos con isótopos de deuterio [76]). La oxigenación aromática requiere la asistencia de coenzimas de flavina y cofactores NADPH. Su catión central de hierro está marcado por sus estados de oxidación (II, III o IV). El producto (8) engloba metabolitos de fenprocoumon o warfarina hidroxilados entre otros fármacos con una subestructura de arilo común (5).

El **NADPH⁺** es indispensable para la transferencia de electrones, y por tanto, para llevarse a cabo la hidroxilación del sustrato. Sin embargo, no existe una clara evidencia que demuestre la interacción directa de los CYPs con NADPH o NADH. Los electrones fluyen de dichas moléculas a través del acoplamiento con una enzima llamada **NADPH-P450 oxidoreductasa** (CYPOR) o por la enzima **citocromo B₅** [19, 20]. La interacción entre estas enzimas es facilitada por la membrana del retículo endoplásmico, a la cual están ancladas. Esto demuestra la importancia de las interacciones proteína-proteína en la actividad de las CYPs. Tanto la membrana como las enzimas acopladas son vitales para que un CYP lleve a cabo su función. Debido a que la función de una enzima está relacionada directamente con su

estructura; las interacciones moleculares presentes en la actividad de un CYP pueden cambiar su estructura altamente flexible mejorando su actividad.

La **estructura de las enzimas CYPs** ya ha sido ampliamente caracterizada [21]. Están formadas por 400 a 500 aminoácidos aproximadamente. La mayoría de CYPs presenta un ectodominio globular anclada a la membrana del retículo endoplásmico de los hepatocitos por un α -hélice transmembranal (TM-helix) [22, 23]. La mayoría presenta 13 α -hélices nombradas de la "A" a la "L" según su orden de aparición del extremo amino al carboxilo. En algunas ocasiones, los CYPs presentan α -hélices intermedias; como es el caso de CYP2C9, que presenta α -hélices entre la hélice K y L, a estas hélices se les denomina hélice-K' y hélice-K'' [24]. Además, presentan 4 hojas- β nombradas de 1 al 4, siguiendo el mismo criterio que las hélices. La hélice-I es la hélice más larga y mayormente conservada en la superfamilia CYP. Atraviesa de extremo a extremo el dominio globular y forma parte del sitio activo. Durante la actividad enzimática, la hélice-I entra en interacción directa con el sustrato y el grupo hemo [21]. El **sitio activo** esta "enterrado" en el ectodominio de la proteína y tiene formas, química y volúmenes específicos de cada tipo de CYP [25] (**Figura StrCYP**).

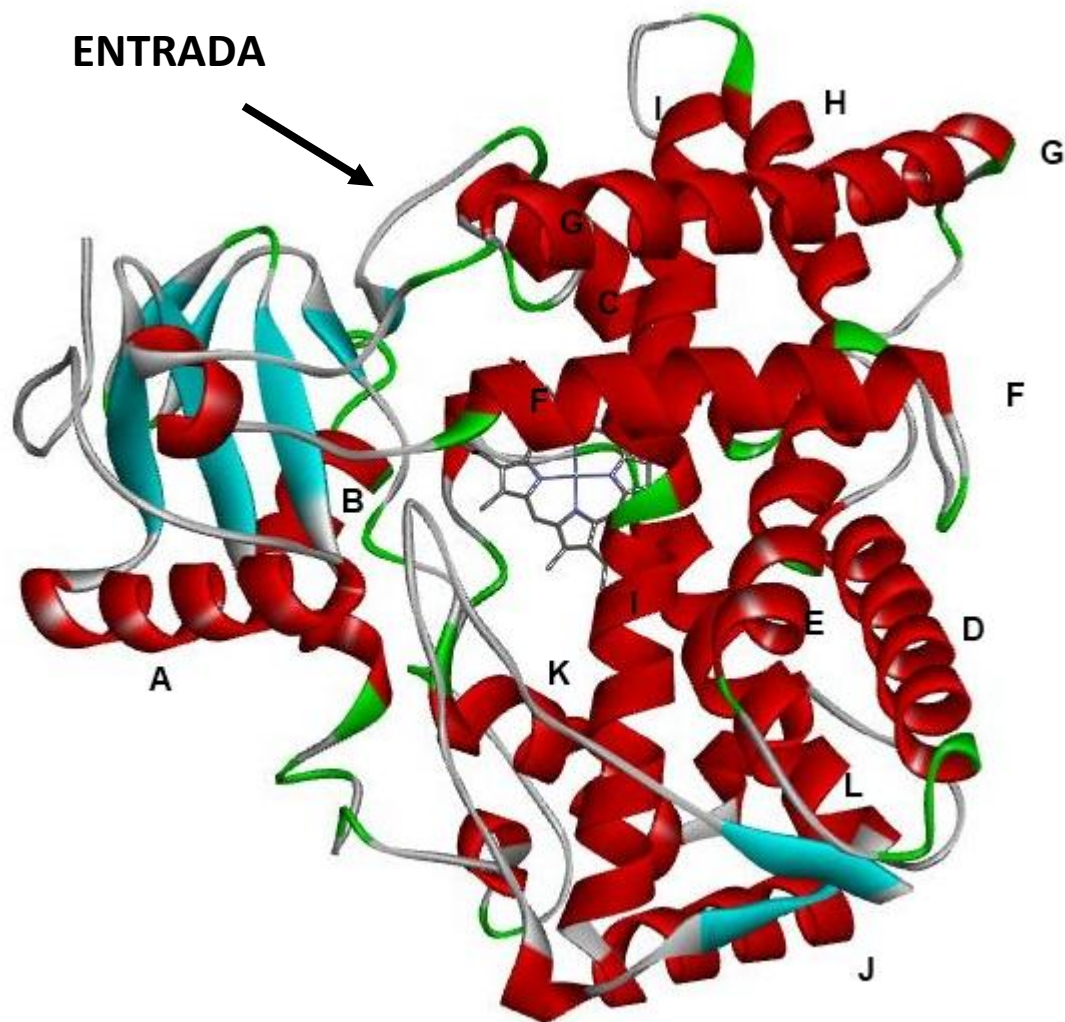


Figura StrCYP. CYP2C9 con la identidad de sus alfa-hélices marcadas. Basado en el trabajo cristalográfico con código PDB 1R9O. Las hélices están esquematizadas de color rojo, las hojas beta de color azul, los giros verdes y las asas blanco. Al fondo se aprecia al grupo hemo (gris) que puede ser usado como referencia del sitio catalítico de la enzima. CYP2C9 tiene la estructura general de los CYP450 con 12 alfa-hélices fácilmente definidas y sub-alfa-hélices intermedias de las principales. Se señala con una flecha el sitio de entrada del sustrato a través del asa B-C.

En la actualidad, se conocen diversos estudios que confirman que las **propiedades de la membrana** modifican el mecanismo de unión CYP-sustrato [22, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32]. Uno de los primeros estudio realizados en 2010 mediante métodos *in-silico*, encontró dos orientaciones predominantes del complejo CYP2C9-membrana; ambas consistentes con experimentos [22]. En dicho trabajo, junto con Denisov en 2012, mostraron que el asa F-G, asa B-C y el dominio β cercano al extremo amino sufren modificaciones estructurales al

interactuar con la membrana y participan en la unión y entrada del sustrato al sitio activo de los CYPs [26]. Además, ellos encontraron diversos túneles en los cuales el sustrato podría ingresar al sitio activo de CYP2C9 y se comprobó la acción estabilizadora de la membrana en la apertura de estos túneles. Sin embargo, el promedio de apertura de túneles más grandes es de 2.4 Å aproximadamente. Desde ese trabajo en 2010, no se ha encontrado un modelo similar que simule el ingreso de algún sustrato a la cavidad de CYP2C9 desde la membrana. Es de destacar que en ese mismo trabajo no se simuló el ingreso del sustrato a la cavidad, ni el modelo proteína-membrana-sustrato; en cambio, se simuló el modelo proteína-membrana-producto (sustrato hidroxilado).

1.1 ACTIVIDAD, SELECTIVIDAD Y SITIOS DE METABOLISMO

Dada la naturaleza quiral de los aminoácidos (isómeros L para plantas y animales superiores) no es sorprendente que la hidroxilación de sustratos quirales (R- o S-) por enzimas CYPs resulte en **estereoselectividad** (preferencias de una sobre otra), o incluso por estereoespecificidad (actividad sobre solo uno de los dos). En términos más generales, los fármacos racémicos, como warfarina y fenprocumón, se metabolizan de forma estereoselectiva; es decir, los isómeros de fármacos R- o S- interactúan con las enzimas CYP con diferentes afinidades, modos de unión o velocidades de reacción. Lo cual, conduce a distintas rutas metabólicas para producir diversos metabolitos en diferentes cantidades. La **regioselectividad** surge aquí como consecuencia de los múltiples modos de unión, que dan como resultado un patrón estructural de distintos SoMs de un mismo fármaco [1, 33].

Actualmente, el 90% de los fármacos de uso común se metabolizan por diferentes enzimas de tipo CYPs: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4. De los cuales, aproximadamente el 75% de fármacos se metaboliza solo entre las enzimas CYP3A4 y CYP2C9 [34, 13]. Estas dos enzimas metabolizan un grupo notablemente diverso de sustratos endógenos, así como xenobióticos (exógenos), nutrientes, ingredientes de plantas, toxinas microbianas o drogas sintéticas. La capacidad de metabolizar a una gran cantidad de sustratos diferentes en diferentes SoMs es gracias al fenómeno de ajuste inducido. Aquí restringimos la búsqueda bibliográfica en casos relacionados con la biotransformación de fármacos mediante la hidroxilación de solo algunos sustratos específicos de interés; como lo son: warfarina (WFN), fenprocumón (PPC), flurbiprofeno (FLP) y ritonavir (RIT). La enzima hepática miembro de la familia de citocromos P450 CYP2C9 es la mayor responsable del metabolismo de PPC seguida por la enzima CYP3A4 [35, 33]. Warfarina es el fármaco estructural y farmacológicamente más relacionado con PPC. Flurbiprofeno y ritonavir son sustratos naturales con los que fueron cristalizadas las enzimas CYP2C9 y CYP3A4 (códigos PDB: 1R9O y 3NXU respectivamente) [24, 36].

1.2 IMPORTANCIA FARMACOLÓGICA Y METABOLISMO DE LOS LIGANDOS EN ESTE ESTUDIO

Fenprocumón (PPC) es uno de los **anticoagulantes orales** derivados de la 4-hidroxicumarina más utilizados a nivel mundial [37]. Los receptores de anticoagulantes orales muestran una gran variabilidad en los riesgos de sangrado. La hemorragia es un efecto secundario de los pacientes hospitalizados en tratamiento anticoagulante que se produce con una frecuencia de entre el 15 y el 20 por ciento [38]. La biotransformación dañada y la eliminación de pacientes frágiles pueden contribuir al riesgo variable de sangrado conocido como riesgo hemorrágico por los anticoagulantes cumarínicos. Actúa inhibiendo la actividad de la enzima epóxido reductasa de vitamina K (VKOR). La reducción de vitamina K oxidada es esencial para la síntesis de los factores de coagulación II, VII, IX y X [39, 40]. Estos factores de coagulación necesitan de la carboxilación de glutamato mediada por vitamina K. La modificación postraducciona inusual de este aminoácido es necesario para la actividad de estos factores de coagulación. Una vez llevada a cabo la carboxilación de glutamato, la vitamina K es oxidada y debe ser reducida a su forma original para participar nuevamente en la síntesis de los factores de coagulación [41, 42]. Debido a que no tienen ningún efecto en los factores de coagulación carboxilados ya en circulación, los anticoagulantes cumarínicos no producen un efecto anticoagulante inmediato; y por lo tanto, el efecto anticoagulante está relacionado directamente con su vida media [37].

PPC es usado de forma eficiente para la profilaxis y tratamiento de los trastornos debidos a trombosis [43]. Sin embargo, la exposición prolongada a este fármaco puede provocar trastornos hemorrágicos [44]. El estudio de la eliminación de PPC después de haber llevado a cabo su actividad pero antes de que pueda llegar a causar algún daño es de especial interés en el área médica. La enzima hepática miembro de la familia de citocromos P450 CYP2C9 es la mayor responsable del metabolismo de PPC [35, 33].

Warfarina (WFN) está relacionado estructural y farmacológicamente con Fenprocumón (PPC). Ambos pertenecen a la clase de 4-hidroxicumarina de los medicamentos anticoagulantes orales. Mecánicamente, el fenprocumón y la warfarina inhiben la carboxilación del glutamato, dependiente de la vitamina K, para formar un inusual derivado de aminoácido postraducciona que se necesita en muchos factores de la indumentaria de la sangre para modular la unión del calcio [39, 40].

WFN y PPC son compuestos sintéticos quirales con un solo átomo de carbono asimétrico. Ambos fármacos se utilizan comercialmente como racematos, aunque se sabe que clínicamente la forma S- siempre actúa más fuerte que el isómero R- correspondiente cuando se analiza como agentes anticoagulantes [35, 45, 39]. En teoría, ya sea por razones

farmacodinámicas (mejor afinidad con la proteína dirigida al mecanismo de coagulación), farmacocinéticas (mejor biodisponibilidad y distribución o menor tasa de metabolismo y eliminación) o ambas, podrían causar una actividad más fuerte para los respectivos formas S-. Las formas de dosificación comercial administran fármacos racémicos, aunque la investigación académica ha aclarado que los enantiómeros R- mostraron invariablemente mayores tasas de biotransformación hepática con respecto a sus isómeros S-. A pesar de su similitud química, el metabolismo de PPC y WFN diverge [45, 46].

La única diferencia estructural entre PPC y WFN es la decoración de la cadena lateral del cuerpo 4-hidroxycumarinico. WFN posee una cadena lateral de acetoniolo unida al átomo de carbono quiral, mientras que PPC muestra una cadena lateral de etilo más corta. Existen tres principios fundamentales con respecto al reconocimiento del sustrato: (1) Los cambios en el comportamiento tautomérico reflejan las diferencias metabólicas basadas en CYP2C9 entre PPC y WFN (consulte la Figura 2 y la Figura 3 en [45], así como la Figura 1 en [47]) [48]. (2) Los cambios en la cadena lateral de PPC en comparación con WFN explican el destino metabólico divergente entre PPC y WFN. Debido a la cadena lateral más grande y ramificada unida al carbono quiral, WFN no puede acceder a la hendidura estrecha en el lado distal del grupo hemo (consulte la Figura 1 en [49]). Se realizaron estudios de dinámica molecular para demostrar en términos teóricos la existencia de un mecanismo de ajuste inducido, es decir, reordenamientos de la cadena principal y lateral de un CYP ligando en comparación con su forma no ligada (apo-forma) [49]. (3) Se encontraron fármacos con diferente tamaño y forma y, sin embargo, se unieron al sitio activo del mismo CYP (por ejemplo, CYP2C5, códigos PDB: 1NR6 [50], 1N6B [50], 1DT6 [51]).

Es de destacar que WFN posee más estados tautoméricos que PPC. Los diferentes comportamientos electrónicos impactan en el reconocimiento del sustrato de una manera en que los tautómeros (largos y fuertes) se unen o interactúan con los residuos de CYP2C9. Los derivados metoxílicos de PPC se sintetizaron para "congelarlo" en ciertas formas tautoméricas y también fueron reconocidos como sustratos de hidroxilación por las enzimas CYP [45].

1.2.1 Metabolitos hidroxilados reportados de fenprocumón.

En 1999 se informó la hidroxilación regioselectiva de 4-hidroxycumarina por CYP2C9: las dos formas enantioméricas de PPC se encontraron hidroxiladas en las posiciones 6, 7, 8 y 4' [45]. A nivel molecular, se descubrió que el CYP2C9 constituye la principal enzima para la hidroxilación de PPC en el tejido hepático [33, 52]. Esta enzima actúa como un catalizador principal de la hidroxilación de **6-OH-PPC** y **7-OH-PPC** para ambos enantiómeros (**Figura PPC**) [45]. Sin embargo, hay más biocatalizadores involucrados en la hidroxilación de **4'-OH-PPC**, **6-OH-PPC** y **7-OH-PPC** de ambos enantiómeros [33]. En cuanto a la estereoselectividad,

CYP2C9 y CYP3A4 constituyen los principales catalizadores de la hidroxilación S- y R-PPC; mientras que CYP2C8 cataliza parcialmente la hidroxilación S-4'-OH-PPC. En el hígado, se ha encontrado que el papel de CYP2C9 también es de la mayor importancia para la biotransformación del enantiómero más potente de los anticoagulantes orales S-warfarina y su derivado nitro R- y S-acenocumarol [52, 35]. La actividad de CYP2C9 para fármacos cae en el orden: warfarina > acenocumarol > fenprocumón [35].

En 2005 Kammerer y Ufer, et al. [53] demostraron que R-PPC era detectable en concentraciones más altas que su enantiómero S-PPC en muestras de sangre. Aparentemente R-PPC es menos metabolizado. En buenas condiciones, Ufer y colaboradores revelaron en experimentos cinéticos que la tasa de hidroxilación en S-7-OH-PPC era extremadamente alta [33, 54]. Además, se detectaron dos nuevos metabolitos monohidroxilado nunca antes reportados. Un metabolito identificado posteriormente por métodos *in-silico* como **10-OH-PPC** [55] y otro identificado en el estudio de Kammerer como **2'-OH-PPC** con cantidades en el cromatograma similares a 7-OH-PPC (ver Figura 2 en [39]). El caso más intrigante corresponde al metabolito 2'-OH-PPC, el cual no se logró modelar el modo de unión con CYP2C9 que permita su producción; lo anterior, es una de las motivaciones de hacer el presente estudio. El metabolito **8-OH-PPC** reportado por Tragger en 1999 [45] no estuvo presente en la corriente sanguínea en cantidades medibles. Curiosamente, el CYP2C19 es la principal enzima para la hidroxilación C8 de WFN ($K_m = 0.3$ mM) [56] en comparación con 1A2 y 1A1 con valores de K_m más bajos (1,4 mM y 1,2 mM, respectivamente) [57]. Hasta hace poco, no se ha detectado ningún metabolito adicional para el metabolismo de la fase I de la PPC [45, 33, 53, 16].

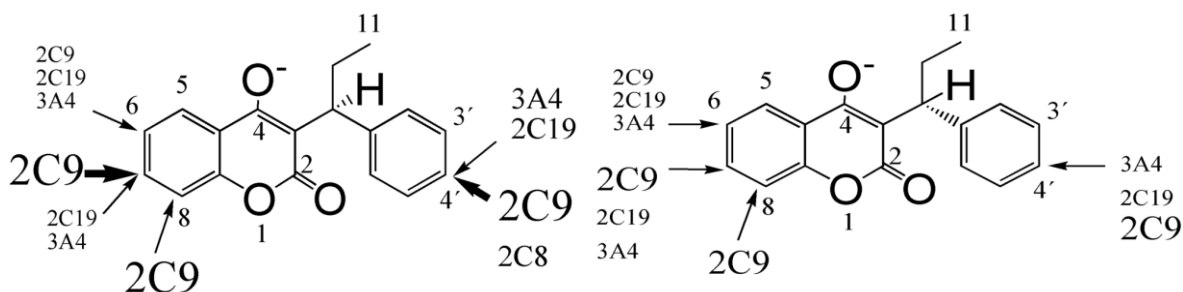


Figura PPC. Localización (flechas) de los sitios de metabolismo conocidos experimentalmente (monohidroxilación) en cada enantiómero de PPC (S-Izquierda; R-Derecha). Las etiquetas de flecha indican la enzima metabolizadora del citocromo P450, las flechas gruesas simbolizan tasas más altas [16, 33, 45]. El predictor ADMET de la caja de herramientas de farmacocinética evaluó los siguientes sitios de hidroxilación: PPC: 6, 7, 8 y 4' por CYP2C9; 6, 7, 9 y 4' por CYP3A4. La posición 9 también se predijo, en contraste con la literatura existente

1.3 RELACIÓN ESTRUCTURAL DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS CYP2C9 Y CYP3A4.

Después de muchos años de estudios experimentales, las funciones dependientes de la estructura de las actividades del CYP2C9 se resumieron en un trabajos fundamentales [25, 58, 59]. Los hallazgos anteriores sobre el reconocimiento de sustratos por el CYP2C9 todavía se mantienen a la vista de la comprensión de hoy. Quedó claro que una combinación de características intramoleculares aniónicas e hidrófobas forjaba las preferencias de la enzima y las especificidades del sustrato en las enzimas que metabolizan a PPC [21, 60].

Los estudios de mutagénesis sitio-dirigidos identificaron aminoácidos relevantes para la unión y se examinaron más estructuras cristalinas para inferir reglas generales [61, 62]. Recientemente, en 2013, los estudios de QSAR reflejaron que "CYP2C9 mostró la selectividad hacia compuestos ligeramente ácidos, gran masa molecular, gran área de superficie polar y mayor número de átomos aceptores de enlaces de hidrógeno" (citado de [63]). Recientemente, se revisaron y enumeraron más de 40 métodos o herramientas computacionales que tienen un dominio de aplicabilidad para el campo bioquímico del metabolismo del CYP [64]. Los aminoácidos diferenciales de las secuencias de CYP se identificaron mediante estudios de Alineación de Secuencias Múltiples (MSA) (Figura MSA) y superposiciones de estructuras. Se comparan los resultados con las descripciones de la literatura para complejos de enzimas y sustratos [16, 25].



Figura MSA. Recuperada de [25]. La secuencia de CYP2C9 está alineada con los otros segmentos de los CYP que son responsables del metabolismo de la PPC. Las secuencias se muestran en minúsculas de una letra. Las letras mayúsculas simbolizan los aminoácidos en el sitio catalítico. Las letras mayúsculas subrayadas representan los aminoácidos que interactúan con el PPC en el sitio catalítico. Los aminoácidos de color azul forman parte de una hélice α , los de color verde forman parte de las hojas β y los que no están resaltados son giros, vueltas o mangos. La quinta línea de cada bloque muestra la estructura secundaria particular de los CYP [43]. La línea inferior a la línea secundaria muestra algunas secuencias no conservadas con prolinas que son residuos clave para explicar las diferencias estructurales y metabólicas de los cuatro CYP en este estudio.

Importante para la regioselectividad es N297, cuya función se aclaró para la oxidación de la cumarina en el sitio abiertamente hidrófobo del CYP2A6 humano (código PDB: 1Z10 [65]). Además, los complejos de flurbiprofeno y otros ligandos (códigos PDB: 1R90 [24], 1Z10 [65], 1Z11 [65]) o una proteína de conejo (CYP2B4) en complejo con S-clopidrogel (código PDB: 3ME6 [66]) también fueron estudiados. La posición de unión del anillo de clorofenilo y la orientación del clopidrogel se inspeccionaron para comparar las posiciones de inicio para las simulaciones de hidroxilación del anillo de fenilo [67, 16].

En los estudios de alineación de secuencias múltiples (MSA), los aminoácidos interactivos (diferenciales) en el sitio catalítico están marcados en letras mayúsculas (**Figura MSA**). Las enzimas CYP2C9 y CYP3A4 difieren en las cadenas laterales responsables de la unión del ligando. En particular, S365, L366, P367, H368 están reduciendo el volumen del sitio catalítico en $4 \times 15 \text{ \AA}^3$ a través de rotaciones del esqueleto hacia el grupo Fe-hemo. Además, la rotación de la cadena principal junto con los cambios de residuos en P211, I213, Q214, V215 y P220 reducen el espacio formando un colgajo en la región del núcleo del sitio catalítico. Finalmente, F100, P101, L102 causan un cambio de cadena principal y cambios espaciales similares. Aparentemente, los residuos de prolina no se conservan a través de los miembros de la superfamilia de las isozimas y, por lo tanto, dan cuenta de las torceduras de la columna vertebral individual [16].

También se estudiaron los complejos cristalográficos relacionados con CYP3A4 (**Tabla CYP3A4**). CYP3A4 Hidroxila WFN en C10 [46]. La misma posición en PPC se estudió para evaluar su posible hidroxilación por CYP2C9. Mientras que WFN debe acoplarse al CYP3A4 en una postura que permita la hidroxilación de C10, el CYP2C9 no debería. La superposición de ambas enzimas P450 reveló cómo las cadenas laterales diferenciales favorecen o desfavorecen la hidroxilación C10 en WFN pero no de PPC [46].

Tabla CYP3A4. Listado de las estructuras cristalinas estudiadas del CYP3A4 para inspección de estructura y relación con regioselectividades [68].

Código PDB	Título PDB	Código del ligando	Nombre del ligando	Año	Resolución	Referencia
1W0E	Crystal structure of human cytochrome P450 3A4		(apo form)	2004	2.8	[69]
1W0F	Crystal structure of human cytochrome P450 3A4	STR	progesterone	2004	2.65	[69]
1W0G	Crystal structure of human cytochrome P450 3A4	MYT	metyrapone	2004	2.73	[69]
1TQN	Crystal Structure of Human Microsomal P450 3A4		(apo form)	2004	2.05	[70]
2J0D	Crystal structure of human P450 3A4 in complex with erythromycin	ERY	erythromycin A	2006	2.75	[71]

2V0M	Crystal structure of human P450 3A4 in complex with ketoconazole	KLN	ketoconazole	2006	2.8	[71]
3NXU	Crystal structure of human cytochrome P4503A4 bound to an inhibitor ritonavir	RIT	ritonavir	2010	2	[36]
3UA1	Crystal structure of the cytochrome P4503A4-bromoergocryptine complex	O8Y	bromoergocryptine	2012	2.15	[72]
3TJS	Crystal Structure of the complex between human cytochrome P450 3A4 and desthiazolymethyloxycarbonyl ritonavir	DOR	desthiazolymethyloxycarbonyl ritonavir	2012	2.25	[73]
4I3Q	Crystal structure of human CYP3A4 coordinated to a water molecule		(apo form)	2013	2.6	[73]
4I4G	Crystal structure of CYP3A4 ligated to oxazole-substituted desoxyritonavir	Z8Z	oxazole-substituted desoxyritonavir	2013	2.72	[73]
4I4H	Crystal structure of CYP3A4 ligated to pyridine-substituted desoxyritonavir	Z9Z	pyridine-substituted desoxyritonavir	2013	2.9	[73]
4K9T	Complex of CYP3A4 with a desoxyritonavir analog	1RD	desoxyritonavir analog	2013	2.5	[74]
4K9U	Complex of human CYP3A4 with a desoxyritonavir analog	5AW	desoxyritonavir analog	2013	2.85	[74]
4K9V	Complex of CYP3A4 with a desoxyritonavir analog	6AW	desoxyritonavir analog	2013	2.6	[74]
4K9W	Complex of human CYP3A4 with a desoxyritonavir analog	7AW	desoxyritonavir analog	2013	2.4	[74]
4K9X	Complex of human CYP3A4 with a desoxyritonavir analog	8AW	desoxyritonavir analog	2013	2.76	[74]
4NY4	Structure-based ligand design to overcome CYP inhibition in drug discovery projects	2QH	(8R)-3,3-difluoro-8-[4-fluoro-3-(pyridin-3-yl)phenyl]-8-(4-methoxy-3-methylphenyl)-2,3,4,8-tetrahydroimidazo[1,5-a]pyrimidin-6-amine	2014	2.95 Å	[75]
4WN1	Crystal structure of PDE10A in complex with 1-methyl-	3SJ	1-methyl-5-(1-methyl-3-{4-	2015	3.13 Å	[76]

	5-(1-methyl-3-{{4-(quinolin-2-yl)phenoxy)methyl}-1H-pyrazol-4-yl}pyridin-2(1H)-one		(quinolin-2-yl)phenoxy]methyl}-1H-pyrazol-4-yl}pyridin-2(1H)-one			
4WQ6	The crystal structure of human Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) in complex with N-(4-{{(S)-[1-(2-methylpropyl)piperidin-4-yl]sulfinyl}benzyl)furo[2,3-c]pyridine-2-carboxamide inhibitor (compound 21)	3TQ	N-(4-{{(S)-[1-(2-methylpropyl)piperidin-4-yl]sulfinyl}benzyl)furo[2,3-c]pyridine-2-carboxamide	2015	1.72 Å	[77]
5A1P	Crystal structure of cytochrome P450 3A4 bound to progesterone and citrate	STR	progesterone	2015	2.5 Å	[78]
5A1R	Crystal structure of cytochrome P450 3A4 bound to progesterone	STR	progesterone	2015	2.45 Å	[78]

Las alineaciones de la estructura ayudaron a observar las flexibilidades conformacionales necesarias para el reconocimiento molecular entre sustratos y proteínas de acuerdo con el principio establecido con respecto a las "selecciones conformacionales" [79]. La comparación de las secuencias de CYP2C9 con CYP3A4 y la visualización de sus modelos 3D revelaron su similitud de secuencia bastante baja, lo que resulta sorprendente, ya que reconocen sustratos similares e hidroxilan a PPC en prácticamente los mismos SoMs [33, 25]. En contraste con la similitud mucho mayor de sus secuencias primarias, CYP2C9 y CYP2C8 no comparten los mismos sustratos [33]. Un caso similar al de CYP2C9 y CYP3A4 lo encontramos en la alta regioselectividad de la hidroxilación aromática por CYP2C9 y CYP2C5; ambos actúan con una alta regioselectividad de la hidroxilación aromática del mismo producto para-hidroxidiclorofenilo [50].

Para la regioselectividad, encontramos que la fuerza motriz principal es una cuestión de "espacio" para acomodar el ligando cerca del sitio hemo; el efecto estérico. A continuación, se encuentran las características químicas en el sitio activo; por ejemplo, algunos CYPs prefieren sustratos cargados sobre otros sustratos no polares gracias a los grupos de cadena de tipo iónico (Arg250 y Arg241 de CYP3A4 o CYP2C8, respectivamente; Phe113 de CYP3A4, Glu241 de Cyp2C19, Lys241 de CYP2C9) [25]. Ciertos residuos son equivalentes en la secuencia de la cadena principal pero son químicamente diferentes, mientras que otros son equivalentes en función (cationes, aniones, parejas de enlaces de hidrógeno) pero no en la secuencia de aminoácidos de la cadena principal. Solo cuando se comparan aminoácidos

cuyas cadenas laterales coinciden en la posición espacial (es decir, ocupan el mismo lugar) se podrían correlacionar en una relación estructura-función.

La evidencia sugiere que con más espacio para colocarse en una geometría de hidroxilación adecuada aumentan las posibilidades de hidroxilación de un SoM. Esto fue evidenciado por un mayor número (agrupación) de posturas ligadas energéticas y geométricamente favorables durante el acoplamiento y una mayor frecuencia en trabajos de dinámica molecular [49, 25]. Los hallazgos teóricos sobre los SoM preferidos se confirmaron mediante datos numéricos sobre los patrones de hidroxilación de experimentos de cinética de enzimas. Por lo tanto, los valores calculados y de laboratorio coinciden en las preferencias de SoM (regioselectividad) de la enzima CYP2C9 que tiene la tasa más alta de metabolismo de PPC.

No debe pasarse por alto la influencia del sustrato con un doble impacto: (1) geométricamente, un tamaño más pequeño de los sustratos los hace susceptibles de a tener más SoMs; y (2) la afinidad química que exista entre el sustrato regiones claves de interacción CYP-sustrato, como lo son la hélice-G, asa B-C y el sitio activo. Un ejemplo de esto se observa en la preferencia de CYP2C9 sobre PPC. La ausencia de un grupo cetona o nitro, visto en WFN o acenocumarol, no solo permite un mayor acceso al sitio hemo de todos los CYP, sino que también influye en la reactividad a través de los efectos electrónicos [25].

Se encuentra evidencia de por qué la evolución biológica puede producir una gran cantidad de mutaciones en la familia de CYP que permite el reconocimiento de muchos sustratos endógenos no relacionados estructuralmente o incluso de xenobióticos por una misma isoforma de CYP, mientras que de formas opuesta, algunas enzimas (como en nuestro caso CYP2C9 y CYP3A4) comparten el mismo sustrato o incluso el mismo patrón de hidroxilación (aquí para PPC). Durante la evolución, el sitio catalítico de los CYP conserva esencialmente las mismas propiedades químicas, independientemente de las geometrías, pero se conservan las condiciones electrónicas para el proceso de oxidación de varios pasos. Como ejemplo, el átomo proximal que entra en contacto con el catión de hierro del grupo hemo es el átomo de azufre terminal de la cadena lateral de cisteína que es característico de toda la familia CYP (EC 1.14.13.48). El otro indicador del esfuerzo evolutivo es la treonina (Thr301) ubicada en la hélice α I. Thr301 forma un enlace de hidrógeno a través del metabolito hidroxilado. Constituye un residuo único ya que está altamente conservado, lo que no es el caso para todos los otros aminoácidos en el sitio activo. Las enzimas de la familia del citocromo P450 tienen el mismo ciclo catalítico para la hidroxilación de hidrocarburos [80].

El uso de los campos de fuerza de la mecánica molecular para los estudios de SFR es suficiente para explicar los datos de cinética enzimática de los cuatro CYP en PPC. En el caso de las soluciones de acoplamiento molecular de 2'-OH-PPC, reflejan que son necesarias más conformaciones de las enzimas. Lo que indica un ajuste inducido, ya que se necesitaban otras conformaciones de proteínas distintas de las cristalinas [55, 16].

3.1.1 Asa B-C: su papel en la actividad de los CYPs

El asa B-C es parte de la entrada al sitio catalítico y juega un papel fundamental en el reconocimiento de moléculas de sustrato (ver Figuras 1 y 2 en [21] y **Figura StrCYP**). La composición de esta asa en un número considerable de CYP se ha caracterizado en trabajos anteriores, revelando que los aminoácidos hidrófobos son los que tienen mayor incidencia [21]. En el caso de los CYP que metabolizan PPC y otros anticoagulantes cumarínicos, la presencia de aminoácidos ionizados y polares disminuye en los residuos alifáticos y fenilalanina. Los resultados de la composición porcentual de los tipos de aminoácidos en esta asa se muestran en la Tabla 4 de [25]. Aquí se puede observar el patrón de afinidad que estas enzimas tienen sobre el tipo de sustrato que metabolizan con mayor eficiencia. El PPC es un sustrato hidrófobo y al mismo tiempo iónico. Por lo tanto, se espera que las enzimas que metabolizan mejor este sustrato presenten buenas características en el asa BC. Las enzimas CYP con un porcentaje elevado por encima del 70% de aminoácidos alifáticos o fenilalanina son CYP2C9, CYP3A4 y CYP2D6.

Se encontraron enzimas con un porcentaje de hasta 15% o más para residuos iónicos: CYP2C9, CYP3A4, CYP2C8 y CYP2C19 [25]. De las enzimas que metabolizan los anticoagulantes orales, CYP2C9 y CYP3A4 comparten ambas composiciones porcentuales de estos tipos de aminoácidos. Estas dos enzimas presentan un mejor rendimiento en el metabolismo de PPC. Nuestros modelos explican en detalle a escala atomista las diferencias entre las estructuras y las actividades catalíticas para CYP2C9 y CYP2C8, todo lo cual se relaciona con solo el 50% de los residuos alifáticos y una proporción bastante alta de aminoácidos polares en el asa BC.

No solo la química del sitio activo ejerce las preferencias y rendimientos que los CYPs tienen sobre su sustrato. La composición de aminoácidos que el asa B-C tiene en un CYP, juega un papel muy importante en el reconocimiento y afinidad que estas enzimas tienen sobre el sustrato. Si se desea conocer o predecir las preferencias que un citocromo P450 tiene sobre un posible sustrato, es importante evaluar la química de esta región. Factores de cinética enzimática como K_m y V_{max} están determinados también por la facilidad en que el sustrato ingresa al sitio catalítico de una enzima. El asa B-C nos revela parte de las preferencias que los CYPs tienen sobre sus respectivos sustratos. Por tal motivo no se puede perder de vista

la importancia que esta región tiene sobre la primera fase de metabolización de los de los fármacos [81].

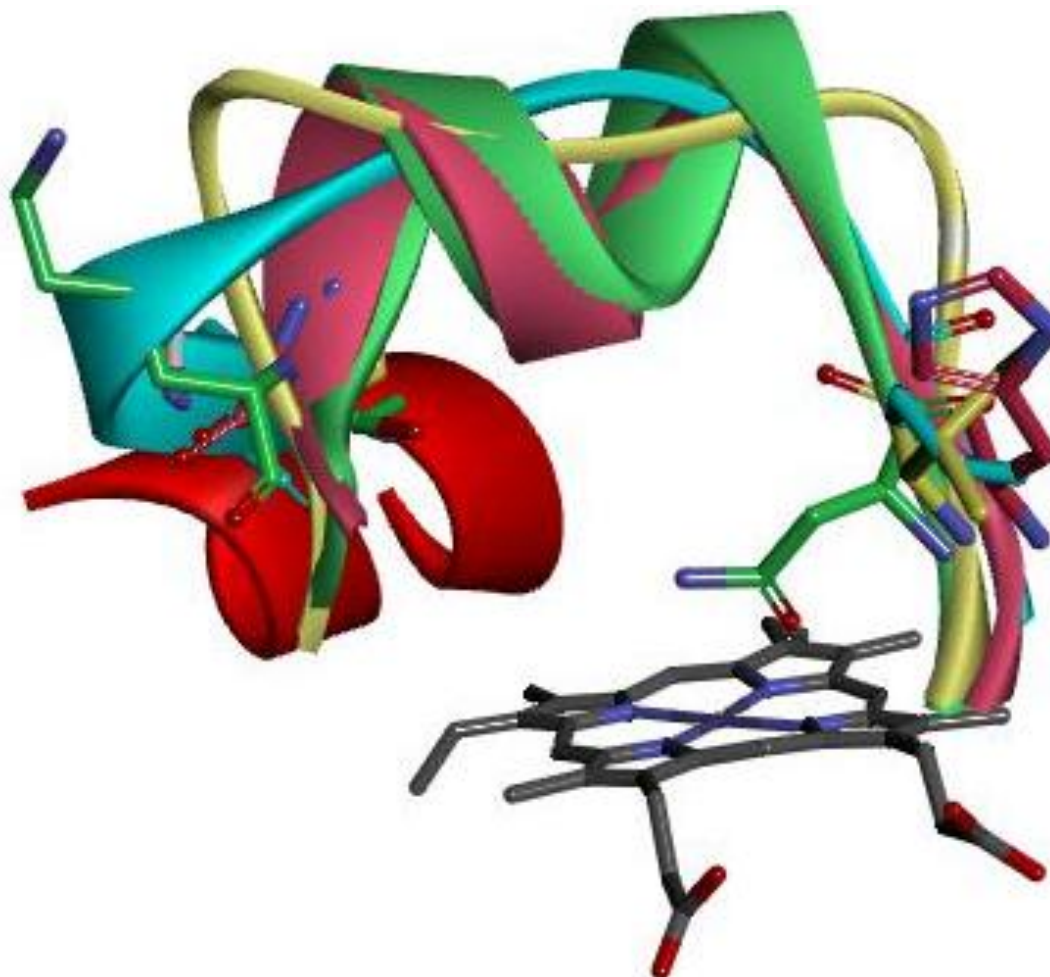


Figura B-C. Superposición de la región correspondiente al sitio de entrada denominada asa B-C en los CYPs con actividad metabólica sobre PPC 3A4 (azul), 2C9 (amarillo), 2C8 (rosa) y 2C19 (verde) [33]. Se muestra además aminoácidos pertenecientes a esta región que participan en el reconocimiento del sustrato. Se usa como referencia la hélice I en rojo al fondo y el grupo hemo común en los cuatro CYPs presentados.

1.4 EFECTO DEL AJUSTE INDUCIDO EN MODELOS *IN-SILICO*

El ajuste inducido refleja los cambios en la geometría molecular en la unión del ligando. Dichos cambios conformacionales pueden considerarse como un mecanismo de selección eficiente denominado "**selección conformacional**" [79, 82]. Como prueba de concepto, lo siguiente relacionado con el CYP2B4 también debería ser válido en el caso del CYP2C9 y, por lo tanto, se cita aquí literalmente:

"El sitio activo del CYP2B4 puede acomodar ligandos pequeños moviendo solo un pequeño número de cadenas laterales, lo que sugiere que la reorientación del ligando es favorecida energéticamente sobre los cambios conformacionales de proteínas para la unión de estas moléculas de tamaño similar. El ajuste tanto de la conformación de la proteína como de la orientación del ligando en el sitio activo le da a CYP2B4 la flexibilidad para unirse a la gama más amplia de moléculas, al tiempo que también es energéticamente favorable " [66].

En cálculos *in-silico*, para reflejar tales flexibilidades de proteínas, cuatro enfoques han sido ampliamente aceptados: el **acoplamiento molecular suave** (*soft-docking*) es reducir deliberadamente las fuerzas de repulsión, gestionar (de unas pocas) rotaciones de cadenas laterales en la **bibliotecas de rotámeros**, utilizar varias estructuras con **diferentes conformaciones de la misma proteína** o enzimas relacionadas [83] y una combinación cálculos de **dinámica molecular** (MD) y el uso posterior de acoplamiento en un marco de la simulación de MD con una conformación favorable [84, 85, 86]. Sin embargo, estas técnicas no garantizan el éxito ni la simulación y modelado correctos. En algunos casos, no hay un cristal de la estructura de la proteína necesaria para lograr un modelado correcto y la biblioteca de rotámeros no es suficiente para modelar el trabajo experimental. En muchas ocasiones MD es la opción más viable para simular el efecto del ajuste inducido. Los trabajos cristalográficos no siempre proporcionan una evidencia clara del cambio en las cadenas principales o laterales dependiendo del tamaño del sustrato que tiene un CYP en su cavidad; ya sea debido a la resolución insuficiente del cristal, que se basa en un modelo cristalográfico anterior (uso de moldes en cristales) o la pérdida de información en su estructura (brechas cristalográficas).

Para encontrar ejemplos de escenarios de ajuste inducido, se reunieron estructuras cristalinas de proteínas CYP con residuos que interactúan con el ligando. Sin embargo, ha sido posible obtener estudios cristalográficos donde se pueden observar diferencias geométricas de modelos de CYP en complejos y sin sustrato [87, 72, 71, 88, 88, 89]. Se encontraron, además, complejos de cristales de CYP3A4 con ligandos relacionados estructuralmente con WFN y PPC en términos de volumen molecular global, forma y anillos aromáticos (**Tabla CYP3A4**). Además, se recolectaron pares de estructuras cristalinas de complejos de CYP con (proteína con ligando; CYP+L) y sin (proteína sin ligando; CYP-L) unión a ligandos para observar los fenómenos de ajuste inducidos tras la unión del ligando al sitio activo (**Tabla CYP3A4**). Sin embargo, no existen muchas estructuras en la base de datos adecuadas a pesar de la gran cantidad de complejos CYP conocidos. Uno de estos pares (CYP 3A4 con ritonavir, códigos PDB: 1TQN [70], 3NXU [36]) dio una clara evidencia de ajuste inducido. Después de superponer la forma ligada sobre la forma apo, el ligando se superpuso claramente con las cadenas laterales de la forma apo.

Se han encontrado muchos informes sobre conformaciones de proteínas flexibles tras la unión del ligando (ajuste inducido), pero muy pocos artículos contenían evidencias estructurales. El ajuste inducido se hizo visible en la supercolocación de geometrías de cristales ligados y no ligados de la misma enzima CYP.

1.5 MODELOS COMPUTACIONALES EN LA ACTIVIDAD DE ENIMAS CYP

Una dificultad importante para la determinación de los metabolitos de los medicamentos es el tiempo y los costos. En este sentido, los esfuerzos para predecirlos computacionalmente se han convertido en una herramienta complementaria [90, 91, 92]. Los estudios de actividades enzimáticas para diferentes xenobióticos son susceptibles a los enfoques *In-silico* [93, 94, 8, 95, 96, 97, 98, 91, 92, 6]. Con la llegada de las estructuras cristalinas, el modelado molecular se ha aplicado en el campo de las enzimas del citocromo P450. En 1987, Poulos publicó la estructura cristalina de un citocromo P450 microbiano. Se co-cristalizó con alcanfor como un sustrato atacado por una especie de oxígeno unido a hemo para la oxidación [99]. El alcanfor aclaraba la forma en que incluso un enlace hidrógeno-carbono en una cadena de alquilo podría ser atacado por una especie de oxígeno coordinado con hemo [99, 4]. La liberación adicional de estructuras de cristales microbianos abrió el camino hacia una comprensión más profunda de los aspectos mecanicistas entre el hierro hemo, el oxígeno reactivo y el sustrato (códigos PDB: 1NOO [100], 4C9N [101]).

Unos años después del trabajo seminal de Poulos en 1987, un primer modelo computacional se ocupó del reconocimiento del sustrato CYP2C9. El modelo estableció una visión general de las características y geometrías de unión: (1) Un sustrato preferentemente aniónico (2) que se encuentra a una distancia de aproximadamente 0,4 nm de (3) un sitio de unión catiónico postulado. El tercer punto de referencia constituye el sitio de hidroxilación que forma (4) un ángulo casi ortogonal con los sitios aniónicos y catiónicos. (5) Se encontró que la distancia entre los sitios aniónicos y de hidroxilación oscila entre 0,7 y 1,0 nm [102].

Hasta la fecha, existen pocas publicaciones que pueden relacionarse con métodos *in-silico* de modelado de las rutas metabólicas del CYP2C9. La visión mecanística de la oxidación del CYP2C9 para diclofenaco, ibuprofeno y warfarina se obtuvo mediante una combinación de muestreo conformacional por dinámica molecular y QM basado en DFT y QM / MM modelado (campo de fuerza CHARMM) [103]. Modelar la potencial regioselectividad mediada por los CYPs para biotransformaciones oxidativas es una tarea compleja, ya que pertenecen a un grupo de proteínas con flexibilidades estructurales y funcionales [104]. Pueden adoptar diferentes conformaciones de la cadena principal y de las cadenas laterales cuando se unen a diferentes ligandos; fenómeno conocido como ajuste inducido por sustratos, hormonas o cofactores [50, 105, 49, 106, 107, 27].

En cálculos de acoplamiento molecular, el estándar de oro de hoy para evaluar (pruebas de evaluación comparativa) la predicción de regioespecificidad, el resultado debe encontrar los sitios de metabolismo (SoM) observados experimentalmente en las estructuras de ligandos entre el primer o el segundo grupo de intervalos de solución (agrupaciones calificadas) [6, 108]. El acoplamiento molecular es una técnica computacional de gran utilidad prospectiva y retrospectiva (analítica) para describir la unión entre un ligando y su proteína receptora objetivo. Cada posición de ligando se evalúa mediante una puntuación para reflejar su afinidad de unión [109]. Sin embargo, no es sencillo utilizar ninguna herramienta de acoplamiento convencional para calcular la unión del fenprocumón (PPC) al grupo hemo en el sitio catalítico que forma una coordinación monodentada entre el centro metálico y el sustrato intermedio durante la etapa de biotransformación oxidativa en células de hígado [6]. Algunas limitaciones publicadas de los enfoques computacionales establecidos "*resaltan las dificultades potenciales en la creación de modelos de predicción de metabolitos de aplicación general*" [6]. En un trabajo seminal, Kirchmair y sus colegas escribieron una sinopsis en el campo de las predicciones de actividad de CYP, los principios implícitos, las herramientas computacionales de los mismos y sus limitaciones [64]. En 2017, una revisión complementaria se centró en las herramientas QSAR para predecir las interacciones del ligando CYP [110].

Casi todas las drogas están unidas de manera no covalente a sus receptores. Pero en casos raros se forma un enlace covalente reversible o irreversible entre ellos (por ejemplo, inhibidores como el carbapeneme de la penicilinas o el paratión de la colinesterasa). Por lo tanto, se han desarrollado nuevas técnicas de acoplamiento para el acoplamiento covalente (por ejemplo, Covdock, Covglide). En el trabajo seminal de Kirchmair y colaboradores, se revisó el software que puede predecir las actividades de CYP [64]. Además, el concepto más general de ligando-receptor de acoplamiento ya se ha aplicado al campo particular del sustrato-metabolismo de la enzima CYP (**Tabla Trabajos Docking**). Por lo tanto, los programas más utilizados incluyen Autodock 4, AutodockVina, GOLD y FlexX [111, 112, 113, 114].

Tabla Trabajos Docking. Estudios con diferentes estrategias para el estudio del ajuste inducido por mecánica molecular

Año	Descripción y palabras clave	Referencia
2006	Superar la rigidez del receptor de su cadena principal mediante la evaluación de su flexibilidad estructural durante los estudios de dinámica molecular (MD) con agua explícita. Pero la MD con simulación solvente explícita tiene dos fallas principales: (i) los recursos computacionales limitados y (ii) la adición de errores de cálculo aún más pequeños (simplificaciones excesivas por campos de fuerza, parámetros y	[115]

	efectos electrónicos y entrópicos) en artefactos de modelo relevantes durante grandes períodos de tiempo de simulaciones durante decenas de nanosegundos.	
2007	La combinación de softdocking de conjuntos de estructuras proteicas y MD crea un nuevo enfoque llamado Fleksy.	[83]
2007	Para evitar la falta de flexibilidad conformacional durante el acoplamiento de cuerpos rígidos, se puede aplicar el llamado enfoque de acoplamiento suave. Reduce el impacto del término de repulsión en las ecuaciones del campo de fuerza entre el ligando y el sitio de unión.	[83]
2008	La aplicación de los enfoques de acoplamiento molecular basados en la red se revisó en un trabajo seminal.	[116]
2009	Definición de unos pocos aminoácidos relevantes para la unión en el sitio de unión para simular cambios conformacionales de sus cadenas laterales. Por ejemplo Autodock 4.2.	[111]
2010	Uso de Energía de Interacción Lineal (Linear Intereaction Energie, LIE) con el Campo de Fuerza Molecular de Merck y detección virtual basada en ligando para la identificación de ligandos CYP1A2 por su estructura	[117]
2011	La propuesta de un método <i>in-silico</i> que predice los SoMs como "metabolóforos".	[6]
2013	El acoplamiento con GOLD se utilizó para describir el impacto de los inhibidores de CYP1 en la regioselectividad para las reacciones de hidroxilación.	[118]
2015	El acoplamiento de la red mediante el software Glide se combinó con técnicas 3D QSAR para dilucidar la actividad de inhibición del CYP2C19 de ciertos alcaloides.	[119]
2015	Un caso especial es la simulación de ligandos unidos covalentemente para formar complejos receptores.	[120]
2017	Uso de muchas estructuras cristalinas diferentes de la misma proteína (entradas de PDB relacionadas) para el acoplamiento para describir la flexibilidad de la proteína. Esto se conoce como acoplamiento por múltiples estructuras de receptores, es decir, se utiliza un conjunto de receptores como objetivo para reflejar la flexibilidad de la proteína, ej. Glide el acoplamiento del conjunto.	[110]

Durante décadas, las herramientas de acoplamiento se han centrado en las interacciones no covalentes, pero no podemos descuidar el papel fundamental del hemo en el sitio activo. Entre la enzima y su sustrato existen contribuciones potenciales de energía, no solo de la interacción no covalente, sino también de una coordinación compleja. Mientras que los primeros son componentes integrados de conjuntos de parametrización de algoritmos de acoplamiento molecular convencional, los últimos son características no estándar [121, 122]. Por tal motivo, la coordinación a un ciclo catalítico de varios pasos es un esfuerzo no

trivial. De esta manera, se debe saber qué etapa de catálisis es susceptible a un formalismo de mecánica molecular (algoritmos de acoplamiento molecular), y si las herramientas de acoplamiento molecular estándar abarcan los tipos de átomos adecuados de la configuración de la catálisis (intermedios, estados de transición) y, por lo tanto, ser aplicables al complejo sustrato-enzima. Otro desafío no menos preocupante es enfrentar el famoso mecanismo de ajuste inducido, ya que los medios de acoplamiento estándar acoplan un ligando flexible a un receptor rígido.

Los estudios *ab-initio* juegan un papel importante en las aplicaciones de los cálculos de química cuántica para sistemas moleculares. Por ejemplo, el cálculo de las cargas de Mulliken define la carga en los átomos; lo cual afecta a propiedades como la estructura electrónica, la polarizabilidad molecular y el momento dipolar, entre otros. Las distribuciones de carga en las moléculas formadoras de átomos que sugieren la formación de pares aceptores o donantes que implican las transferencias de carga; como ocurre en la actividad de enzimas CYPs. Además, el análisis de carga atómica se puede usar para describir la electronegatividad y también es útil para los procesos de transferencia de carga en reacciones químicas [55].

Los enfoques con la dinámica molecular han logrado simular algunos patrones de hidroxilación, modos de unión enzima-sustrato de CYPs específicos, observar zonas de flexibilidad en la estructura de estas proteínas y cambios en las propiedades termodinámicas en la función del sustrato [104, 105, 49, 27, 83, 84, 85, 123, 106, 64] [124, 125]. No obstante, estos informes no intentan medir el efecto de las posiciones iniciales de los átomos en el cristal en el modelo de ajuste inducido por MD. Y con frecuencia, las posiciones atómicas iniciales de la proteína no se tienen en cuenta para simular por MD y podemos usar indistintamente cualquier modelo de proteína sin conocer el efecto real del archivo de entrada.

Se ha demostrado que los estudios de MD simulan la flexibilidad estructural de los CYP y las características que los mantienen estables. Skopalik en 2008 [106] comparó los patrones de flexibilidad de CYP3A4, CYP2C9 y CYP2A6, y logró identificar las estructuras maleables comunes en dichos CYPs, entre los que se encuentran los bucles cercanos al sitio activo (loop FG en CYP3A4 y loop BC in CYP2C9). A su vez, Chang en 2000 [126] encontró que los puentes de sal, las interacciones alifáticas y aromáticas entre las estructuras secundarias de los CYP mantienen las conformaciones iniciales.

Seifert en 2009 [105] simuló los patrones de hidroxilación del CYP2C9 en warfarina. Sin embargo, no contemplaron el efecto de las mutaciones en el modelo cristalográfico, que se sabe que en los CYP las mutaciones del sitio activo alteran la estructura tridimensional de estas proteínas [67, 127] y, por lo tanto, las interacciones de la enzima con su sustrato en el

sitio activo. Seifert atribuyó que los patrones de hidroxilación vienen dados por los cambios conformacionales de la enzima en el sitio activo.

Por otra parte, Lampe en 2010 [128] estudió las conformaciones estructurales alcanzadas de CYP119 con y sin sustrato mediante técnicas de MD. Las conclusiones de este trabajo sugieren que la formación del complejo enzima-sustrato puede deberse principalmente a los cambios conformacionales naturales de la enzima que son independientes de su interacción con el sustrato.

En términos más generales, la literatura revisada sobre regioselectividades y ajuste inducido refleja la dificultad de informar sobre los cambios evolutivos de la naturaleza: el entorno variable, los hábitats variables y la ingesta de alimentos han favorecido los cambios de secuencia en partes no funcionales sobre partes funcionales (es decir, vestíbulos de entrada y sitios de oxidación). Algunas mutaciones han modificado la topología de la cavidad, y con ella, los requisitos estéricos para que los xenobióticos sean reconocidos como sustratos para la oxidación y la posterior eliminación hidrófila (urinaria). Con la necesidad de adaptar o mejorar el rango de actividad de las especies vivas (para vertebrados), sus hábitats han sido cambiados. En contraste, el sitio catalítico y, con ello, el trabajo de tierra electrónico del proceso de oxigenación de varios pasos se ha mantenido básicamente igual (aminoácidos conservados) [94]. Aquí fue posible visualizar los resultados publicados mediante la aplicación de modelos moleculares. Sin embargo, en un futuro próximo, las publicaciones con nuevos datos pueden presentar su papel preselectivo en las células vivas, además de los factores de flexibilidad molecular, la forma y las dependencias de tamaño que modelamos aquí. Los factores limitantes también se cumplieron y se referían a la necesidad de datos de entrada dedicados (más estructuras cristalinas CYP2C9). Precisamente, para evaluar las contribuciones al reconocimiento del sustrato mediante mecanismos de ajuste inducido, solo se ha informado poca información.

Hasta la fecha no se han publicado estudios que permita conocer el efecto que tienen las posiciones iniciales de los átomos en el modelo de ajuste inducido por MD en estas enzimas. Para poder simular de manera precisa y confiable la actividad que las enzimas CYP450 tienen en su sustrato, es esencial conocer el efecto causado por el ajuste inducido en las estructuras de proteínas de los trabajos cristalográficos. Sobre la base de lo que se conoce hasta la fecha y no haber sido documentado explícitamente en la literatura, surge la necesidad de estudiar y evaluar sistemáticamente el efecto que las posiciones iniciales de los átomos en los modelos computacionales de MD tienen en el ajuste inducido; y, en consecuencia, el efecto que tiene sobre la actividad de las enzimas de la superfamilia de CYPs.

Para este fin, combinamos la mecánica molecular (acoplamiento de ligandos al receptor), la mecánica cuántica (cálculos de estado de transición *ab-initio* del complejo de coordinación) para generar modelos moleculares adecuados de los sitios de metabolismo (SoM) tras la unión de PPC al sitio activo de CYP2C9 y dinámica molecular (cálculos de cambios de posición en función del tiempo debió a interacciones atómicas basada en mecánica molecular y leyes de Newton) para evaluar el efecto del ajuste inducido en la actividad de los CYPs; este último, como principal objetivo de esta tesis. El modelo presentado en este estudio es capaz de simular el efecto que la membrana provoca sobre la estructura de CYP2C9. Además se evaluó la relevancia de la membrana en la estructura y actividad de CYP2C9, comparando las características estructurales que la membrana induce sobre la proteína para que pueda llevar a cabo su actividad. Finalmente se evaluaron los cambios conformacionales sufridos por los sitios teóricos de entrada al sustrato en diversos modelos para permitir el ingreso del sustrato.

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS

Existiendo al menos cuatro acercamientos a la resolución de la problemática del ajuste inducido en métodos *in-silico* el modelado de la actividad catalítica de las enzimas CYP es posible el estudio de su actividad. Sin embargo, debido a la poca documentación cuantitativa y a que estos acercamientos no garantizan el éxito; es preciso realizar un estudio adicional al efecto que causa el ajuste inducido en los modelos computacionales de esta familia de enzimas.

Es elemental conocer el efecto que causa el ajuste inducido en estructuras proteicas de trabajos cristalográficos para poder simular de manera precisa y confiable la actividad que las enzimas CYP450 tienen sobre su sustrato. De esta forma, se pueden obtener resultados aún más confiables de la actividad catalítica de estas enzimas que son cruciales para el entendimiento toxicológico de cualquier fármaco.

Los cálculos por dinámica molecular permiten evaluar el cambio conformacional en cadenas laterales y principal en el sitio activo en función del tiempo y de energías de interacción de las proteínas CYP con respecto a su sustrato en archivos de trabajos cristalográficos (de la base de datos PDB <https://www.rcsb.org/>, [129]). De esta forma se pueden obtener conformaciones probables de actividad y así el cálculo de interacción proteína sustrato se vuelve más preciso.

Se cuenta a disposición con suficiente poder de procesamiento computacional en el Laboratorio Nacional de Supercómputo de la BUAP, al cual se tiene acceso, y con licencias necesarias de software para la evaluación del ajuste inducido en enzimas CYPs.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Medir cuantitativa y cualitativamente el efecto del sustrato (y membrana) en el ajuste inducido en enzimas citocromo P450 por técnicas de dinámica molecular.

2.1.1 Objetivos particulares

- Medir el efecto del ajuste inducido en enzimas citocromo P450 por técnicas de acoplamiento molecular (docking) y dinámica molecular en CYP2C9 y CYP3A4.
- Simular los patrones de hidroxilación de CYP2C9 y CYP3A4 sobre fenprocumón.
- Evaluar la capacidad de simular el ajuste inducido en proteínas de las herramientas computacionales por dinámica molecular.
- Comparar las estructuras de los cálculos de dinámica molecular CYP2C9 en su forma sin unión a ligando (CYP-L) y su forma con unión a ligando (CYP+L).
- Comparar la geometría y movimiento de la estructura de CYP2C9 en su forma sin unión a ligando (CYP-L) y su forma con unión a ligando (CYP+L) en la misma línea del tiempo de un cálculo de dinámica molecular.
- Medir las diferencias de la estructura tridimensional de CYP2C9 en función de la presencia y ausencia de membrana en el modelo molecular.
- Medir cambios conformacionales los cuales permiten que el sustrato entre a la cavidad de CYP2C9.
- Evaluar si NAMD es capaz de simular valores de cinética enzimática calculados experimentalmente con una sola enzima.
- Medir la energía de interacción del sustrato y la enzima en diversas posiciones de la enzima y al momento de ingreso al sitio activo.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL (HARDWARE)

Los cálculos de dinámica molecular fueron realizados gracias al Laboratorio Nacional de Supercómputo de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Su gran poder de procesamiento es gracias a la coordinación de al menos 64 núcleos de procesamiento central y memoria gráficas. El tiempo utilizado en cálculo es reducido significativamente

comparado con una computadora personal. Los sistemas modelados se hicieron en una PC con procesador Intel® Core™ i3-4130 de 4 núcleos de 3.40 GHz, memoria de 16GB con partición para dos sistemas operativos; Windows 7 y Ubuntu 12.

3.2 MATERIAL (SOFTWARE)

El software usado en esta tesis será descrito en breve a continuación, mientras que los métodos se describirán una sección más adelante. En este punto se debe hacer notar que los programas usados en estas tesis cubren necesidades diferentes y no contemplan los mismos algoritmos de cálculos de energía de interacciones atómicas ni campos de fuerza; por tanto, no es posible comparar resultados de energía de interacción obtenidos con distintos programas.

3.2.1 Swiss-Pdb Viewer (SPDBV)

Swiss-PdbViewer es programa de descarga gratuita de www.expasy.org/ [130]. Proporciona una interfaz gráfica para la visualización de varios tipos de archivos al mismo tiempo en forma tridimensional. En este trabajo las herramientas “*Building Tools*” fueron de gran ayuda en la modelación de los sistemas iniciales. *Mutate* permite realizar mutaciones de aminoácidos. *Build loop* y *Scan loop Database* usados de forma conjunta permiten reparar asas tridimensionales no resueltas por la cristalización; dados dos aminoácidos como puntos de anclaje, se construirán varias asas de *novo*, y luego podrá elegir la más probable gracias a un score basado en librerías y cálculo de energía mínima. Dados los dos aminoácidos como puntos de anclaje, se escanea una base de datos de estructuras para encontrar fragmentos compatibles. Las asas coincidentes se presentan para una selección adicional. Por último para refinar la estructura recién modelada, SPDBV permite realizar la minimización de energía se realiza con la implementación parcial del campo de fuerza GROMOS96 [131]. En esta implementación, todos los cálculos se realizan en vacío, sin campo de reacción.

3.2.2 VEGA ZZ

VEGA ZZ es una suite de modelado molecular completa que incluye herramientas de visualización, edición y cálculo para trabajos de investigación. Este software es gratuito para usos académicos sin fines de lucro descargable desde www.ddl.unimi.it/vegazz/. Fue utilizado para crear y refinar las estructuras de los sustratos a estudiar para el acoplamiento molecular automatizado. En él se calcularon las cargas parciales atómicas de los ligandos. Además, este programa cuenta con herramientas que permiten modelar α hélices a partir de su secuencia primaria. [132].

3.2.3 Discovery Studio 4.0 Client

Accelrys Discovery Studio® software ofrece capacidades integrales de modelado y simulación molecular para la investigación en estudios computacionales. Su gran maniobrabilidad y buenos gráficos de visualización permitieron llevar a cabo el ajuste inducido manual y algunas imágenes en esta tesis. Descargable desde <http://accelrys.com/products/discovery-studio/visualization-download.php> [133].

3.2.3 UCSF Chimera

UCSF Chimera es un programa con una gran variedad de herramientas que permite la visualización interactiva y análisis de estructuras moleculares. Puede descargarse de forma gratuita para uso académico. Para esta tesis fue de gran utilidad al momento de modelar la alfa hélice transmembranal para el sistema anclado a membrana. Puede ser descargado desde <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/> [134]

3.2.4 AutoDock Tools

Autodock tools, o ADT, es la interfaz gráfica de usuario gratuita para AutoDock desarrollada por el mismo laboratorio que creo AutoDock. Se puede utilizar para configurar, ejecutar y analizar acoplamiento de AutoDock y los cálculos de superficie molecular del sitio activo de los mapas de afinidad AutoGrid. Fue utilizado para preparar a la proteína, así como la parametrización del ligando para su cálculo con AutoDock. Descargable desde <http://autodock.scripps.edu/resources/adt> [111].

3.2.5 Autodock 4.2

AutoDock 4.2 (AD4) es un programa que calcula el acoplamiento molecular automatizado con un algoritmo de búsqueda especializada. Este programa calcula la energía de interacción proteína ligando con métodos de mecánica molecular utilizando el campo de fuerza AutoDock Force Field (ADFF) que contempla energías de interacción de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones electroestáticas, desolvatación y entropía torsional del ligando. Cada término que contempla su campo de fuerza tiene valor específico calculado mediante una función de puntuación basado en un modelo de regresión lineal lo que permite el cálculo directo de la energía libre (ΔG). El análisis de regresión lineal usado por AD4 fue validado de forma cruzada con varios complejos de proteínas con ligandos y confirmó que el error estándar es de alrededor de 2.5 kcal/mol. Los resultados puede agruparlos de acuerdo la diferencia de posición de sus átomos y según su mínimo energético de interacción proteína ligando. Está diseñado para predecir cómo

pequeñas moléculas, tales como sustratos o candidatos a fármacos, se unen a la estructura 3D de una proteína. La paquetería de AutoDock 4.2 incluye al programa AutoGrid.

Descargable desde <http://autodock.scripps.edu/downloads/autodock-registration/autodock-4-2-download-page/> [111, 122].

3.2.6 BioX 4.6

Biox es un programa de modelado molecular general capaz de diseñar moléculas, asignar cargas parciales y refinar estructuras con el campo de fuerza Yeti. En esta tesis se utilizó para asignar las cargas parciales de los ligandos resultantes del acoplamiento automatizado e inspeccionar las estructuras para los refinamientos con el programa Yeti. Descargable desde <http://www.biograf.ch/index.php?id=software> [135].

3.2.7 Yeti 8.3

Yeti es un programa de refinamiento de mínimos energéticos que emplea a YetiFF. YetiFF es una extensión de AMBERFF que contemplan funciones metálicas y esta parametrizado para los metales Zn (II), Co (II), Cu (II), Ca (II), Mg (II), Ni (II), Fe (II) y Fe (III) permitiendo la simulación de sus coordinaciones metálicas (tetraédrica, cuadrada-plana, cuadrada piramidal, trigonal bipiramidal y octaédrica), así como su simetría, la transferencia de carga dinámica de metal-ligando, su direccionalidad, preferencias de ligando, entre otras. Además de las energías de enlace, ángulo, diédricos, electroestáticas, van der Waals y puentes de hidrógeno contemplados en el campo de fuerza AMBER; las contribuciones del campo de fuerza Yeti permiten medir la energía aportada por el hierro del grupo hemo de los CYPs al complejo formado por la enzima y su ligando. YetiFF incluye dos términos principales, uno que describe el comportamiento radial de las interacciones metal-ligando, el otro analiza la primera esfera de ligando en el metal. Yeti es capaz de simular y calcular las interacciones de distintas metalo-proteínas con sus ligandos y tiene la opción de hacer el refinamiento mediante la opción induce fit.

Descargable desde <http://www.biograf.ch/index.php?id=software> [136, 121].

3.2.8 Sybyl FlexX

FlexX desarrollado por Sybyl es un método de acoplamiento flexible que usa el campo de fuerza Tripos [137] para colocar los ligandos en el sitio activo. Es útil para un ligando de relativo poco volumen y una proteína con estructura tridimensional conocida. FlexX4 es capaz de predecir con precisión la geometría del complejo proteína-ligando de forma automatizada y modificar la estructura del ligando y rotámeros de los aminoácidos de la proteína [114].

3.2.9 NAMD

NAMD es un programa de libre acceso y descarga para realizar cálculos de dinámica molecular el cual está instalado en el LNS de la BUAP. Se destaca por su eficiencia en paralelizar cálculos y se usa a menudo para simular grandes sistemas (millones de átomos). Utiliza el campo de fuerza CHARMM [138]. En esta tesis se utilizó para realizar todos los cálculos de dinámica molecular. Aunque NAMD mide los cambios de posiciones de átomos con respecto al tiempo, es indispensable calcular energías de interacciones atómicas para conocer la fuerza y por tanto velocidad y dirección de los átomos en cálculos de DM. El campo de fuerza CHARMM contempla términos para medir la energía de enlace, ángulo, diédricos, electroestáticas, van der Waals y el termino Urey-Bradley. Este último término modela la resonancia armónico en la distancia entre los átomos enlazados por enlace covalente 1 y 3 de algunos componentes; por ejemplo, en moléculas alifáticas. Este término resultó ser importante para las deformaciones en el plano, así como para separar los modos de estiramiento de enlace simétrico y asimétrico.

Es descargable desde:

<https://www.ks.uiuc.edu/Development/Download/download.cgi?PackageName=NAMD>

3.2.10 VMD

Es un programa de visualización y análisis de sistemas moleculares de gran cantidad de átomos. Fue utilizado para hacer la mayor parte del análisis de dinámica molecular, las imágenes de superposición de estructuras y el cálculo de los datos para las gráficas de RMSD, RMSF y distancias entre átomos [139].

3.2.11 Gaussian

Es un programa utilizado para realizar cálculos *ab-initio* de mecánica cuántica. También está instalado en el LNS de la BUAP. El programa resuelve la ecuación de Schrödinger molecular basándose en la teoría de orbitales moleculares dadas las posiciones de los núcleos y el número de electrones para proporcionar información útil como densidades de electrones, energías y otras propiedades del sistema. Este tipo de cálculos no requiere parámetros puntuales de cargas parciales o tipos de átomos para el cálculo de energías de interacción; a diferencia de los programas basados en campos de fuerza. En esta tesis se utilizó para realizar todos los cálculos de mecánica cuántica [140].

3.3 MÉTODOS

Teniendo en cuenta la dificultad de simular el efecto que el ajuste inducido tiene sobre las enzimas hepáticas CYP450 y su actividad metabólica. Se utilizó una combinación de técnicas de MM, DM y QM para evaluar los cambios conformacionales en la estructura proteica de estas enzimas. Las técnicas basadas en MM y DM necesitan estar correctamente parametrizadas para su funcionamiento adecuado. Estas técnicas se basan en funciones de energía con distintos términos; lo que hace que los resultados del cálculo de energías de interacción realizados con campos de fuerza distintos sean difíciles de comparar. Cada átomo que será sometido a un cálculo con estas técnicas requiere los parámetros correctos como cargas (absolutas en caso de iones o parciales en caso de moléculas polares) o radio atómico entre otras. Mediante el uso de estos métodos se evaluó cómo las posiciones iniciales de los átomos de las estructuras cristalinas afectan los cálculos de esta técnica. Las energías de afinidad de los complejos enzima sustrato se evaluaron mediante simulaciones de acoplamiento molecular entre CYP2C9 y PPC (Sybyl FlexX, Autodock 4 y Yeti 8) [114, 136, 111]. Este proceso se compromete con el sexto enlace de coordinación del hierro del grupo hemo, cuyas transferencias de electrones no se pueden calcular de forma precisa utilizando ningún mecanismo molecular (algoritmos de acoplamiento molecular). Por lo tanto, se trató por separado mediante un enfoque *ab-initio* mediante el paquete de software Gaussian [111, 140, 137]. El efecto del cambio estructural en la proteína debido a las interacciones intermoleculares se calculó por métodos de dinámica molecular. Se utilizaron técnicas de dinámica molecular para calcular los cambios estructurales que la membrana y el sustrato PPC provocan sobre CYP2C9. Para ello el análisis de los resultados fueron analizados cuidadosamente con herramientas existentes y comparadas con resultados experimentales observados y calculados con otros trabajos.

3.3.1 Selección de estructuras cristalográficas

Después de una extensa revisión bibliográfica de las estructuras cristalinas (**Tabla CYP3A4**) de los CYP humanos presentes en la base de datos de proteínas (PDB) [68], se decidió utilizar dos estructuras de **CYP3A4** con y sin sustrato en su cavidad, **1TQN** y **3NXU** respectivamente [87, 72]. El trabajo cristalográfico con el código PDB 1TQN presenta una cadena única de CYP3A4, sin mutaciones, sin sustrato en su sitio activo y solo la resolución no estructural de cuatro aminoácidos en un bucle que no pertenece al sitio activo (lazo G'-I, K282, E283, T284 y E285); a su vez, 3NXU presenta un homodímero, sin mutaciones, con el antiviral ritonavir (RIT) como sustrato y aminoácidos no resueltos en posiciones similares a las de 1TQN. Cabe señalar que el cristal con el código 1TQN tiene el bucle F-G movido hacia el interior de la cavidad; mientras que 3NXU muestra el mismo bucle F-G y las cadenas laterales de los aminoácidos de dicho bucle reubicados de tal manera que ritonavir puede acoplarse a su sitio activo. Para este estudio, seleccionamos solo la cadena A en 3NXU; Para que los resultados sean comparables.

Las razones para elegir estas dos estructuras para este estudio fueron que 1) son trabajos cristalográficos de diferentes grupos de investigadores, 2) tienen una resolución similar de alta calidad, 3) 3NXU utiliza el reemplazo molecular como un método para determinar su estructura y tomaron 1TQN como modelo, 4) no presentan estructuras faltantes en su sitio activo y se observa un claro desplazamiento de sus cadenas principal y lateral entre ellas.

A continuación se describe la creación de las posiciones iniciales de los átomos de los sistemas moleculares a evaluar la actividad de **CYP2C9** con dinámica molecular. Se utilizó como modelo proteico las posiciones iniciales del cristal **1R9O**. El cristal 1R9O presenta a la enzima CYP2C9 en estado monomérico acoplada a su sustrato flurbiprofeno en geometría de hidroxilación; es decir, la enzima presenta una conformación activa. Los sustratos flurbiprofeno y glicerol fueron eliminados del cristal. No presenta mutaciones que modifiquen su estructura secundaria o terciaria. Presenta un gap cristalográfico en el asa F-G en una zona no próxima del sitio activo entre los aminoácidos I213-P221. La estructura no resulta en el cristal fue modelada como un asa con la herramienta “Build Loop” del programa SPDBV; la cual es capaz de generar asas *de-novo* teniendo dos aminoácidos como ancla (fijos) a través de librerías de asas y usando GROMOS forcé field para optimizar la geometría del asa recién creada.

3.3.2 Parametrización de ligandos

La parametrización de ligandos para el acoplamiento molecular fue realizada en varios pasos. La geometría tridimensional fue obtenida de los cristales en donde fueron resueltas por rayos $-X$ con sus proteínas; excepto para PPC. La geometría de PPC fue generada a partir de la estructura de SWF en el cristal de [141]. Los enantiómeros de PPC se generaron con el programa Vega ZZ. Para los cálculos con Yeti FF se requirió el cálculo de cargas por Gasteiger y el campo de fuerza AMBER con el programa BioX [142, 135, 143].

Ritonavir y Fenprocumón fueron parametrizados usando las herramientas de VMD *Molefacture* [139]. Se tomó como marco de referencia la herramienta en línea PRODRG [144] para elegir los tipos de átomos. A partir de eso se utilizaron las librerías de VMD para elegir los parámetros de enlaces covalentes de entre los átomos de los ligandos. La asignación de cargas fue realizada con el cálculo de cargas Gasteiger [142] con el programa Vega ZZ. El archivo de parámetros para los ligandos fue generado de forma manual con los datos obtenidos de los cálculos de dichos programas.

3.3.3 Acoplamiento molecular y refinamiento de complejos

Las estructuras de cristal se descargaron de PDB, su superposición se realizó bajo Swiss PDB Viewer y el acoplamiento manual se realizó bajo VEGA ZZ [68, 130, 132]. El acoplamiento

automático se realizó mediante FlexX (Sybyl X) y Autodock 4 (herramientas MGL) [111, 112, 114, 145]. Las posturas finales se trataron con Yeti 8 y Biograf R [146, 121]. Se debe señalar que la decisión de refinar los mínimos locales de las geometrías finales radica en la implementación de los parámetros específicos de Yeti para los grupos de hierro y hemo (sección de suplementos). Precisamente, constituye una extensión del campo de fuerza AMBER [136]. Las estructuras cristalinas relacionadas de los complejos de enzimas ligando-CYP (ligando cumarina con código PDB: 1Z10 y flurbiprofeno con código PDB: 1R90) se inspeccionaron y se evaluó el acoplamiento posterior del ligando extraído para validar el acoplamiento molecular ciego de PPC en CYP2A6 humano o CYP2C9 [65, 24].

Se utilizó un flujo de trabajo de nueve pasos para combinar poses acopladas manualmente como posiciones de inicio para acoplamiento automático por Autodock y refinamiento de poses finales por Yeti 8 [111, 121]. Este esquema de trabajo ya se había utilizado anteriormente en el laboratorio. Además, se presenta un estudio teórico del mecanismo de reacción entre el grupo hemo y el anillo aromático, utilizando el método DFT-B3LYP. Se propone un modelo del mecanismo general para esta reacción en fase gaseosa usando métodos *ab-initio* posteriormente al acoplamiento molecular para tener mayor precisión en el cálculo de energía de reacción.

3.3.4 Parametrización de dinámica molecular

La evaluación del ajuste inducido por dinámica molecular se llevó a cabo sobre los sistemas descritos en la **Tabla sistemas**. Las simulaciones de DM se realizaron en una caja de agua cúbica con el modelo de agua TIP3P (1 nm) y se aplicaron las condiciones de los límites periódicos en todas las direcciones. Los parámetros para el grupo Fe del grupo hemo se establecieron para mantener un oxígeno como ligando distal a 2,5 nm [24, 147, 99], manteniendo una carga neutra entre Fe y oxígeno, +2 y -2 respectivamente. Los átomos del grupo hemo junto con el oxígeno como ligando distal se fijaron en sus posiciones originales para ser utilizados como una referencia posicional durante la dinámica. Hubo 100000 pasos de minimización de energía de las coordenadas atómicas. Para equilibrar cada sistema, la temperatura se incrementó de 0 K a 310 K gradualmente durante 0.25 ns. Los sistemas balanceados se sometieron a 60 ns de producción de dinámica molecular con un paso de tiempo de 2 fs a temperatura y presión constante, 1 atm y 310 K. Se usó el software NAMD con el campo de fuerza CHARMM27 para llevar a cabo las corridas MD y el equilibrio descrito arriba [148].

Para el caso del sistema con membrana fue solvatado en una caja cubica de agua con el modelo de agua TIP3P (1nm) y las condiciones de frontera periódica fueron aplicadas en todas direcciones. Los parámetros del grupo hemo fueron los estándar del CHARMM force field con un ligera modificación para mantener a un oxígeno como ligando distal a 2.5 nm,

manteniendo una carga neutra entre el Fe y el oxígeno, +2 y -2 respectivamente. Se realizaron 100000 pasos de minimización energética de las coordenadas atómicas. Los sistemas sin membrana fueron equilibrados aumentando la temperatura de 0 K a 310 K gradualmente durante 0.25 ns. Los sistemas equilibrados fueron sometidos a 100 ns de producción de dinámica molecular con un paso de tiempo de 2 fs a presión y temperatura constante, 1 atm y 310 K. Se usó el programa NAMD para llevar a cabo las corridas de DM y el equilibramiento previo [28]. El equilibramiento de sistemas con membrana varía de los que no la poseen. Al sistema que contiene membrana se aplicó un equilibramiento según el protocolo de [149].

3.3.5 Sistemas de CYP3A4 para evaluación del ajuste inducido

A continuación, se describe la creación de las posiciones iniciales de los átomos de los cuatro sistemas. Se abrevia + RIT para denominar la presencia de ritonavir en el sitio activo, independientemente de si se observó mediante rayos X o modelado. Se abrevia -L en caso de que las enzimas no tengan sustrato, para distinguir formalmente la ausencia.

Dos geometrías de inicio se determinaron experimentalmente y se tomaron como modelos de entrada sin cambios: (i) la cadena A del 3NXU ligado [3NXU RIT] y (ii) el 1TQN sin sustrato [1TQN-L]. En contraste, se generaron dos geometrías de inicio más para complementar el estudio de manera sistemática: (iii) el ligando ritonavir del cristal con código PDB 3NXU se agregó a la estructura cristalina de 1TQN no ligada [1TQN+RIT] y (iv) el ligando ritonavir se retiró a la estructura cristalina del complejo ligado 3NXU [3NXU-L] (**Tabla Sistemas**).

Tabla Sistemas: Modelos moleculares tridimensionales creados para estudiar los cambios conformacionales (ajuste inducido) de la enzima CYP3A4.

	Complejo enzima-sustrato	Enzima sin sustrato
Sistemas observados (rayos X)	Código PDB: 3NXU, receptor ligando, el ligando es ritonavir: (i) 3NXU+RIT	Código PDB: 1TQN, receptor sin ligando: (ii) 1TQN-L
Sistemas Modelados	(iii) 1TQN+RIT	(iv) 3NXU-L

El Sistema (iii) 1TQN + RIT se modeló a partir de la superposición (alineación tridimensional) de las estructuras de proteínas de los cristales 1TQN (sin sustrato) y 3NXU (con RIT en su sitio activo). Una vez superpuestas las estructuras, solo se eliminó la proteína 3NXU dejando el sustrato RIT en la cavidad 1TQN.

3.3.6 Generación de sistemas de CYP2C9 y CYP3A4 para evaluación de la actividad sobre fenprocumón

Las posiciones atómicas de la proteína del cristal 1R9O fueron utilizadas para generar cuatro sistemas a evaluar por DM. Se abrevia +PPC para denominar la presencia de fenprocumón en el sitio activo. Se abrevia -L en caso que las enzimas no presenten sustrato, para distinguir formalmente su ausencia. Modelo “**CYP2C9-L**”: únicamente presenta a la proteína CYP2C9 del cristal 1R9O con el asa modelada con “*Build Loop*”. Modelo “**CYP2C9+PPC**”: Fenprocumón fue acoplado (PPC) a la proteína CYP2C9 del cristal 1R9O siguiendo la metodología de [55]. Debe destacarse que los dos sistemas anteriores no presentaban membrana. El objetivo de estos dos sistemas es medir los cambios estructurales que sufre la enzima CYP2C9 provocados por el acoplamiento del sustrato en la cavidad; y no el provocado por la membrana, de esta manera pueden ser usados a manera de control.

La abreviatura +Mem y -Mem representa la presencia y ausencia de membrana en el modelo simulado, respectivamente. Los sistemas “**CYP2C9-Mem**” y “**CYP2C9+Mem**” fueron modelados a partir del modelo “**CYP2C9-L**”. A ambos modelos se les agregaron once moléculas de PPC fuera de la cavidad de forma aleatoria a una distancia no mayor a 10 Å de la proteína. Los dos sistemas presentaron las mismas coordenadas iniciales de sus átomos. Para que la proteína pudiera estar anclada a la membrana fue necesario modelar el asa de anclaje con la herramienta “*Build Structure*” del programa Chimera y modelado según el modelo de [22, 134]. El modelo de la membrana fue generado con la herramienta “*Membrane Builder*” del programa VMD y anclando la proteína a la membrana [22].

Adicionalmente a los sistemas de CYP2C9 con PPC, se generó el sistema **CYP3A4+PPC**. El objetivo de este sistema es tener un control de los datos de la frecuencia que un SoM de PPC se coloca en geometría de hidroxilación. Se pretende simular los patrones de hidroxilación medidos experimentalmente de CYP3A4 sobre PPC [33]. La estructura proteica fue tomada del cristal de CYP3A4 sin sustrato en el sitio activo (código PDB: 1TQN) [87]. Bajo el supuesto que la estructura del sitio activo de los CYPs es modificada por la presencia de su sustrato; era necesario utilizar una estructura proteica acoplada a un sustrato con dimensiones similares a las de PPC, al no encontrar un cristal de CYP3A4 con un sustrato ideal se optó por utilizar la estructura de CYP3A4 sin sustrato. Los sustratos co-cristalizados con CYP3A4 eran demasiado grandes, y sería difícil un modelo aproximado de CYP3A4+PPC.

3.3.7 Descriptores y quimiometría para la evaluación de ajuste inducido.

Las simulaciones de MD estudiaron si las geometrías de los complejos ligados o no ligados cambian durante el tiempo de simulación. Si el modelo conserva o cambia su estructura

general se puede medir como RMSD comparando las geometrías de los cristales con las geometrías de ejecución para los complejos ligandos y no ligados. El RMSD se define como

$$2 \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{atoms}} \delta_i^2}{N_{atoms}}}$$

, donde δ_i es la distancia entre el átomo i y el átomo de referencia. El RMSD también puede medir el movimiento cuando se compara cada átomo de cada tiempo de trama de una estructura en una simulación de MD con las posiciones promedio de los átomos de sí misma; un mayor valor calculado de RMSD significa que la estructura se mueve más, la estructura de la proteína tiene más diferencias geométricas entre los marcos de tiempo [150]. Usando las herramientas computacionales existentes, es posible medir descriptores del sitio activo que nos permiten correlacionar el efecto del ajuste inducido con su actividad biológica. El software VMD se utilizó para calcular estas mediciones entre los sistemas [139].

3.3.8 Análisis de resultados de ajuste inducido.

Una vez que las simulaciones se realizaron mediante dinámica molecular, se esperaba que los sistemas moleculares en complejos (i) y (iii) (complejo enzima-sustrato) tuvieran mayores similitudes estructurales con la estructura de cristal de PDB 3NXU; es decir, RMSD inferior cuando se usa como referencia el cristal original de CYP3A4 con ritonavir en su sitio activo. A su vez, también se esperaba que ambos modelos tuvieran menos movimiento en sus cadenas laterales (menor RMSD en comparación con ellos mismos). Los sistemas moleculares sin sustrato tendrían que tener mayores similitudes estructurales con la estructura cristalina PDB 1TQN; un RMSD inferior cuando se usa como modelo de referencia para el cristal original de CYP3A4 sin sustrato en su sitio activo. Además, los sistemas (ii) y (iv) deberían tener una mayor movilidad en sus cadenas laterales (mayor RMSD cuando están en contra de ellos mismos). Las interpretaciones de estos resultados se muestran en la **Tabla interpretación**.

Tabla interpretación. Las cuatro simulaciones de MD y su resultado esperado en términos de geometrías finales. Las posiciones iniciales están relacionadas con la **Tabla Sistemas**. Comparación de las estructuras de proteínas de los cuatro sistemas después de la ejecución de MD con las estructuras de proteínas originales de los cristales informados en PDB 1TQN y 3NXU

Tipo de modelo 3D	Geometría inicial (Sistema)	Geometría similar con el PDB	Interpretación
Enzima-sustrato	(iii) 1TQN+RIT	3NXU	Ajuste inducido
Enzima-sustrato	(iii) 1TQN+RIT	1TQN	Sin ajuste inducido
Enzima-sustrato	(i) 3NXU+RIT	1TQN	Sin ajuste inducido
Enzima-sustrato	(i) 3NXU+RIT	3NXU	Ajuste inducido

Enzima sin sustrato	(iv) 3NXU-L	1TQN	Ajuste inducido
Enzima sin sustrato	(iv) 3NXU-L	3NXU	Sin ajuste inducido
Enzima sin sustrato	(ii) 1TQN-L	3NXU	Sin ajuste inducido
Enzima sin sustrato	(ii) 1TQN-L	1TQN	Ajuste inducido

Este análisis no refleja qué sistemas moleculares tienen mayor similitud en el movimiento de los átomos de proteína. Por esta razón, decidimos comparar el RMSD entre cada uno de los cuatro sistemas moleculares. Para poder verificar y medir el ajuste inducido, los sistemas moleculares con ritonavir y sin ritonavir deben presentar mayores similitudes entre sí.

La metodología de este estudio permite evaluar y calcular el efecto que el sustrato tiene sobre la flexibilidad estructural del CYP3A4. Además, permite evaluar el efecto de las posiciones iniciales de los átomos de cristal en este tipo de trabajos computacionales (MD) de una manera objetiva y sistemática; así como, para probar el efecto de los cambios conformacionales y el ajuste inducido en la actividad de estas enzimas.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Trabajos anteriores con datos experimentales de análisis de espectrometría de masas acoplada a cristal líquido mostraron metabolitos de fenprocumón nunca antes reportados para CYP2C9 [53]. Hasta antes del presente trabajo, había sido imposible el modelamiento correcto del acoplamiento de PPC en CYP2C9 que produjera el metabolito 2'-OH-PPC.

Sobre la base de lo que se conoce hasta la fecha y no haber sido documentado explícitamente en la literatura, surge la necesidad de estudiar y evaluar sistemáticamente el efecto que las posiciones iniciales de los átomos en los modelos computacionales de MD tienen en el ajuste inducido; y, en consecuencia, el efecto que tiene sobre la actividad de las enzimas de la superfamilia de CYPs.

La siguiente parte del estudio muestra los resultados de nuevos cálculos de acoplamiento molecular, refinamiento ab-initio y cálculos de dinámica molecular que permitieron el estudio y modelado de 2'-OH-PPC. Además se muestra la evaluación sistemática del efecto de ajuste inducido en sistemas CYP por dinámica molecular.

4.1 MODELADO DE SITIOS DE METABOLISMO DE FENPROCUMÓN

Se abordó la problemática de los SoMs reportados para PPC mediante la combinación de varias técnicas *in-silico*. Acoplamiento molecular basado en MM y refinamiento de los

complejos por QM. DM para buscar nuevas conformaciones proteicas no reportadas en cristales.

4.1.1 Acoplamiento molecular y refinamiento de complejos

Antes del acoplamiento, se requería la identificación de geometrías adecuadas que fueran susceptibles de formalismos de mecánica molecular dictados por enlaces predefinidos y tipos de átomos, sus geometrías, fuerzas y cargas sin movimientos de electrones sino electrostáticos. Este prerrequisito propuesto podría no haberse cumplido siempre en la literatura (**Tabla Trabajos Docking**). Muchos autores ni siquiera mencionan si el resto de oxígeno reactivo estaba presente o no, por no mencionar su unión al hierro o al sustrato. En el presente caso de metabolismo de la monoxigenasa, la geometría tetraédrica del sustrato intermedio en el sitio de (mono) oxigenación se generó mediante un estado híbrido sp^3 para reflejar el estado activado del alifático (10-OH-PPC) o aromático (6-OH-PPC, 7-OH-PPC, 2'-OH-PPC y 4'-OH-PPC) bajo ataque catalítico por un resto de oxígeno y un catión de hierro-monoxígeno del radical IV.

Para analizar las tendencias electrónicas y geométricas utilizadas como geometrías de inicio (input de acoplamiento molecular, input docking) de los ligandos para los estudios de acoplamiento molecular, se estudió la mecánica de reacción mediante un enfoque de la mecánica cuántica. Las estructuras de los reactivos, estados de transición y productos fueron optimizados. Para este fin, solo se utilizaron partes funcionales de las entidades moleculares más grandes, de modo que los fragmentos eran susceptibles de tratamientos "*ab-initio*". Para realizar los cálculos se utilizó un funcional híbrido-GGA, llamado B3LYP. Las funciones híbridas combinan energías de intercambio calculadas en un enfoque exacto (similar a Hartree-Fock) con las obtenidas a partir de métodos DFT para mejorar el desempeño de la tarea. Se han realizado varios análisis sobre la evaluación del rendimiento de B3LYP para interacciones en biomoléculas y agrupaciones que confirman la precisión de este método [151, 152, 153].

La optimización para el presente estudio mecánico cuántico se realizó al nivel B3LYP utilizando el conjunto de bases 6-31G aplicado a los átomos de C, H, O y N [154]. Se usó un potencial de núcleo efectivo relativista (ECP) en el átomo de Fe para reemplazar los electrones del núcleo interno, manteniendo los electrones del núcleo externo. Además, los cálculos de frecuencia armónica y las energías vibratorias de punto cero (ZPE) se calcularon en 298.15 K sin considerar ningún factor de escala utilizando el mismo nivel de teoría [155]. Las energías libres (G) de los reactivos, intermedios, estados de transición y productos se obtuvieron mediante la ecuación $G=E_{total}+ZPE-TS$, donde E_{total} es la energía total de la especie, T es la temperatura en Kelvin y S es la entropía. Todos los cálculos se realizaron

utilizando el programa Gaussian09 [140]. Las estructuras de geometrías optimizadas se visualizaron utilizando la aplicación gráfica GaussView 5.0.8 [156].

La estructura y la energía electrónica del sistema hierro-porfirina (FeP) se calcularon en fase gaseosa. Se evaluaron las geometrías optimizadas para tres estados de oxidación (Fe II, Fe III y Fe IV) y diferentes multiplicidades de hierro (**Tabla Eabinitio**). De acuerdo con los resultados obtenidos, la especie más estable corresponde a $^3\text{Fe II}$. La siguiente tendencia en energías relativas, en kcal mol⁻¹, se observa desde esta estructura: $^1\text{Fe II} < ^5\text{Fe II} < ^4\text{Fe III} < ^2\text{Fe III} < ^6\text{Fe III} < ^5\text{Fe IV} < ^1\text{Fe IV} < ^3\text{Fe IV}$. Se encuentra un valor de 12 kcal mol⁻¹ entre la especie más estable y $^1\text{Fe II}$, mientras que para $^3\text{Fe IV}$ la energía relativa es de 737.75 kcal mol⁻¹. Los resultados de las densidades de carga de Mulliken también se calcularon utilizando el método B3LYP.

Tabla Eabinitio. Energías relativas con respecto al estado fundamental (E relativa) en kcal/mol parámetros geométricos optimizados (Fe-N_p) en Å y Mulliken cargas atómicas de los átomos de Fe y N_p correspondientes al estado de espín más bajo de Fe (II) P, Fe (III) P y Fe (IV) P a nivel B3LYP/6-31G más el conjunto de bases Land2DZ se usaron para el átomo de Fe (solo 10 electrones internos centrales se describieron con el pseudopotencial Land2DZ)

		Fe(II)P	
		Triplete	Singlet
Energía relativa		0.00	12.88
Distancia Fe-N_p (Å)		2.01	1.99
Fe(II)		0.738	0.737
N_p		-0.655	-0.621
		Fe(III)P	
		Cuartete	Doblete
Energía relativa		321.46	326.63
Distancia Fe-N_p (Å)		1.98	1.97
Fe(III)		1.028	1.026
N_p		-0.703	-0.706
		Fe(IV)P	
		Quintete	Singlet
Energía relativa		721.87	737.29
Distancia Fe-N_p (Å)		1.96	1.99
Fe(IV)		1.065	0.857
N_p		-0.696	-0.615

Se encontró una interesante correlación entre la carga y el enlace interatómico del hierro y los nitrógenos de los anillos de la porfirina (Fe-N_p). Cuando existe una carga mayor en el sistema, se obtiene un enlace interatómico decreciente Fe-N_p. Las cargas atómicas de Mulliken muestran en todos los casos que el átomo de hierro tiene una carga positiva, mientras que la carga en el átomo de nitrógeno es negativa. Estos resultados demuestran que cuando el átomo de hierro cambia de Fe II a Fe IV (carga principal en el sistema), la carga es mayor en el átomo de hierro. Entonces, el átomo de nitrógeno tiene un valor de carga negativa máxima cercana a -0.710 en el estado quintuplet de FeIIIP. La carga positiva

máxima se obtiene para el Fe en el estado quintuplete de Fe(IV)P, cuya distancia Fe-Np corresponde al pequeño valor encontrado, que muestra la relación carga-distancia para los diferentes sistemas estudiados en este trabajo. Los resultados teóricos obtenidos aquí concuerdan con los resultados experimentales de estado sólido y los cálculos teóricos previos obtenidos por el nivel de teoría BLYP/DPN [156, 157].

Con respecto al mecanismo de reacción, los perfiles de superficie de energía potencial (Potential Energy Surface, PES) evaluaron las geometrías de los mínimos de energía, intermedios y de estado de transición. Se encontraron tres estados de transición principales (TS-3, TS-7a y TS-7b) para la segunda etapa del mecanismo de hidroxilación (**Figura estados**). En esa etapa, el resto de benceno comenzó su aproximación y el complejo de hierro formó un intermedio (**Figura Geometria**). El estado de transición llamado TS-3 mostró una energía libre de activación de $-157.7042 \text{ kcal mol}^{-1}$ que se encuentra bastante por encima del valor del intermedio MS-5. Luego se formó el complejo hierro-porfirina-O-fenilo (MS-6) con una energía libre de $-157.7080 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Figuras **estados** y **Figura Grafica ab-initio**). En esta etapa, alrededor de $-0.0038 \text{ kcal mol}^{-1}$ se administraron en la formación del complejo, todo lo cual reflejó la factibilidad de formar este complejo como un intermedio (**Figura Geometria**). Antes de nuestro trabajo, se habían observado experimentalmente dos formas de producir el compuesto final (**Figura Geometria**) [18]. Ambos fueron susceptibles de modelar la simulación durante el tercer paso: la migración del átomo de Deuterio (átomo D que reemplaza al átomo H para observar el cambio de NIH) entre dos átomos de carbono en ambos casos permite las formaciones complejas MS-7a así como MS-7b. La migración se produce a través de la formación TS-7b, con una energía libre de activación de $-157.6596 \text{ kcal mol}^{-1}$ a expensas de $-0.0484 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Una vez que se ha logrado la migración, el producto alcohólico final se puede obtener del TS-7a, con una energía libre de activación de $-0.019 \text{ kcal mol}^{-1}$, lo que se encuentra bastante por debajo del nivel de energía del TS-7b con un consumo de energía de $-0.0299 \text{ kcal mol}^{-1}$. Para este último paso de la formación del producto, se calculó un intermedio plausible mecánicamente (MS-7a) y se evaluó su energía de formación por debajo del intermedio (MS-5): $-157.7206 \text{ kcal mol}^{-1}$, que refleja la liberación de energía de $0.0887 \text{ kcal mol}^{-1}$. Todos los valores de las energías libres de formación y activación se calcularon y compararon en relación con el estado fundamental (**Tabla Eabinitio**). Las geometrías respectivas se tienen en cuenta para formular las geometrías discretas (**Figura Geometria**). La **Figura Geometria** muestra las estructuras mínimas y de estado de transición. Se encontraron tres estados de transición principales (TS-3, TS-7a y TS-7b) en el segundo paso del mecanismo. En este paso, el proceso biomolecular comienza con el enfoque de la molécula de benceno y el complejo FePO, formando el intermedio (MS-5). El estado de transición TS-3 (**Figura Grafica ab-initio**) mostró una energía libre de activación de -

157.7042 kcal · mol⁻¹, mientras que el complejo hierro-porfirina-O-fenilo (MS-6 en la **Figura Grafica ab-initio**) se modeló para evaluar la energía libre de 157 kcal.mol⁻¹. La formación del complejo MS-7b se obtiene a partir del estado de transición TS-7b, con una energía libre de activación de -157.6596 kcal.mol⁻¹. Por otro lado, la formación de alcohol puede obtenerse a partir del TS-7a, con una energía libre de activación de -0.019 kcal · mol⁻¹ por debajo de TS-7b (**Figura estados**). En este último proceso, se calcula un posible intermedio (MS-7a), con una energía de formación de -157.7206 kcal mol⁻¹. Los valores de las energías libres de formación y activación se muestran en la **Tabla Termoabinito**. Las geometrías respectivas se representan en (**Figura Geometria y Figura Grafica ab-initio**). Las geometrías discretas se muestran en la **Figura Geometria**.

Tabla Termoabinito. Propiedades termodinámicas (ΔG y ΔG^\ddagger) en kcal/mol y frecuencias imaginarias (ν) en cm^{-1} de las estructuras en la trayectoria de reacción calculadas a 298.15 K

Estructuras	ΔG	ΔG^\ddagger	ν
MS-5	-157.7336		
TS-3		-157.7042	337.15 i
MS-6	-157.7080		
TS-7b		-157.6596	2097.50 i
TS-7a		-157.6781	211.94 i
MS-7a	-157.7206		
MS-7b	-157.7483		

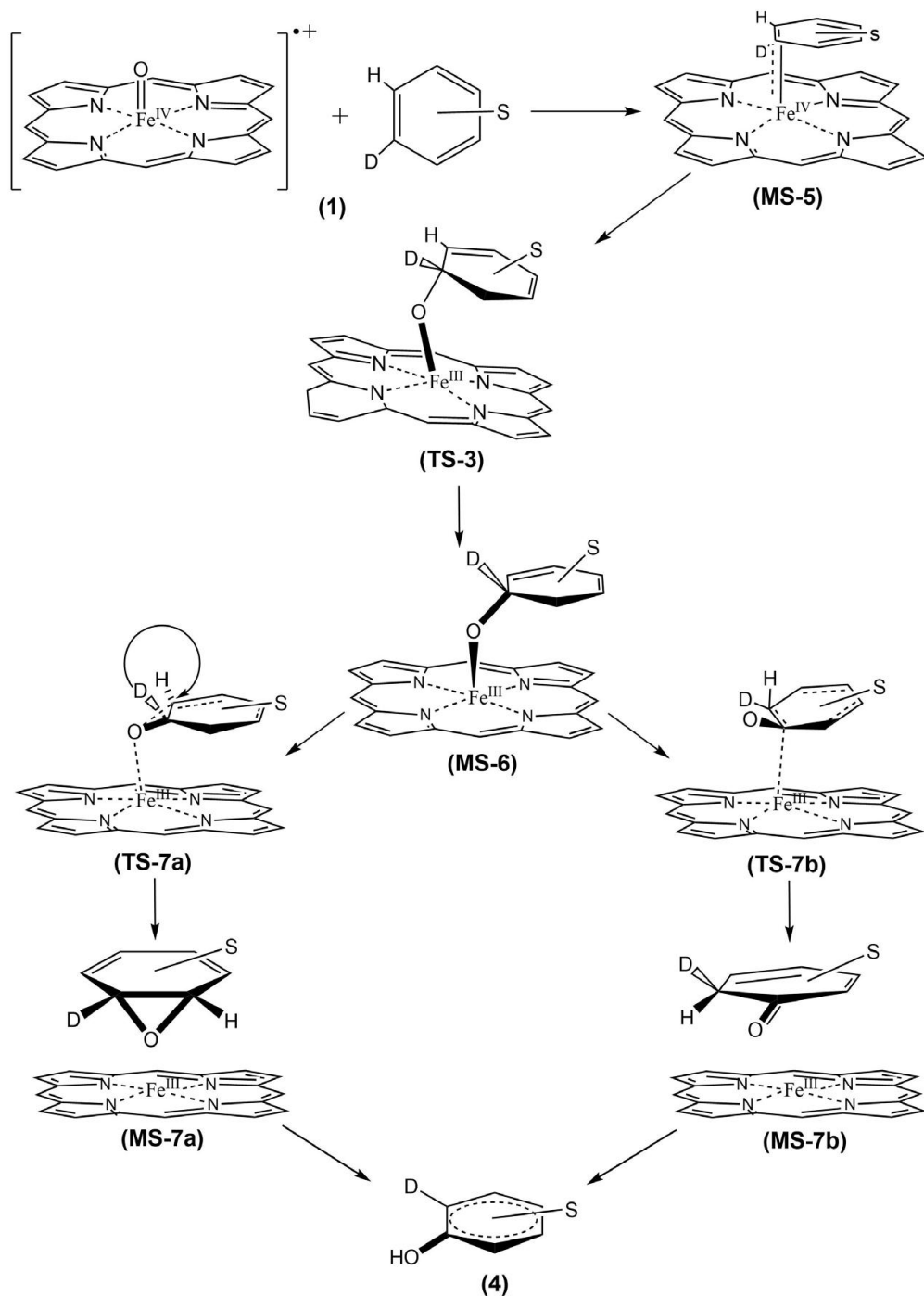
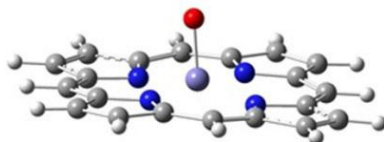
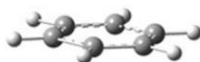
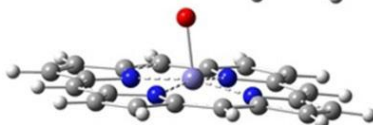


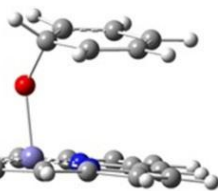
Figura estados. El sustrato (S) con su anillo aromático se acerca al sitio catalítico con el grupo hemo para formar un estado de transición tetraédrico (2). Se forma un complejo de coordinación ternario y abarca el hemo hierro IV y el resto de oxígeno activado que a su vez está unido a un átomo de carbono híbrido sp^3 (TS-3). Son posibles dos vías de reacción (TS-7a y TS-7b) el metabolito hidroxilado [18]. El mecanismo se conoce como "cambio de NIH", es decir, un átomo de hidrógeno se reemplaza por deuterio (D) para reflejar el cambio de átomo. Las poses ligadas acopladas adoptaron una geometría híbrida sp^3 del átomo de carbono atacado para simular el estado de transición de reacción en el producto (4)



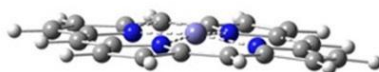
MS-5



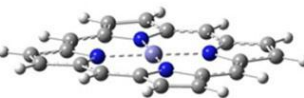
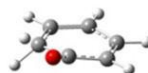
TS-3



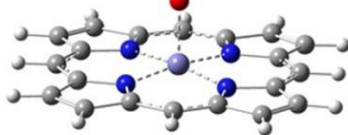
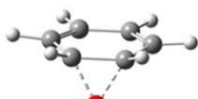
MS-6



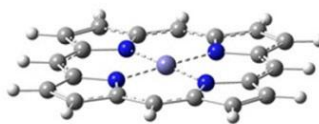
TS-7a



TS-7b



MS-7a



MS-7b

Figura Geometria. Perfil de superficie de energía potencial para la reacción. Las estructuras de mínimos y estados de transición se indican de acuerdo con la **Figura Grafica ab-initio**

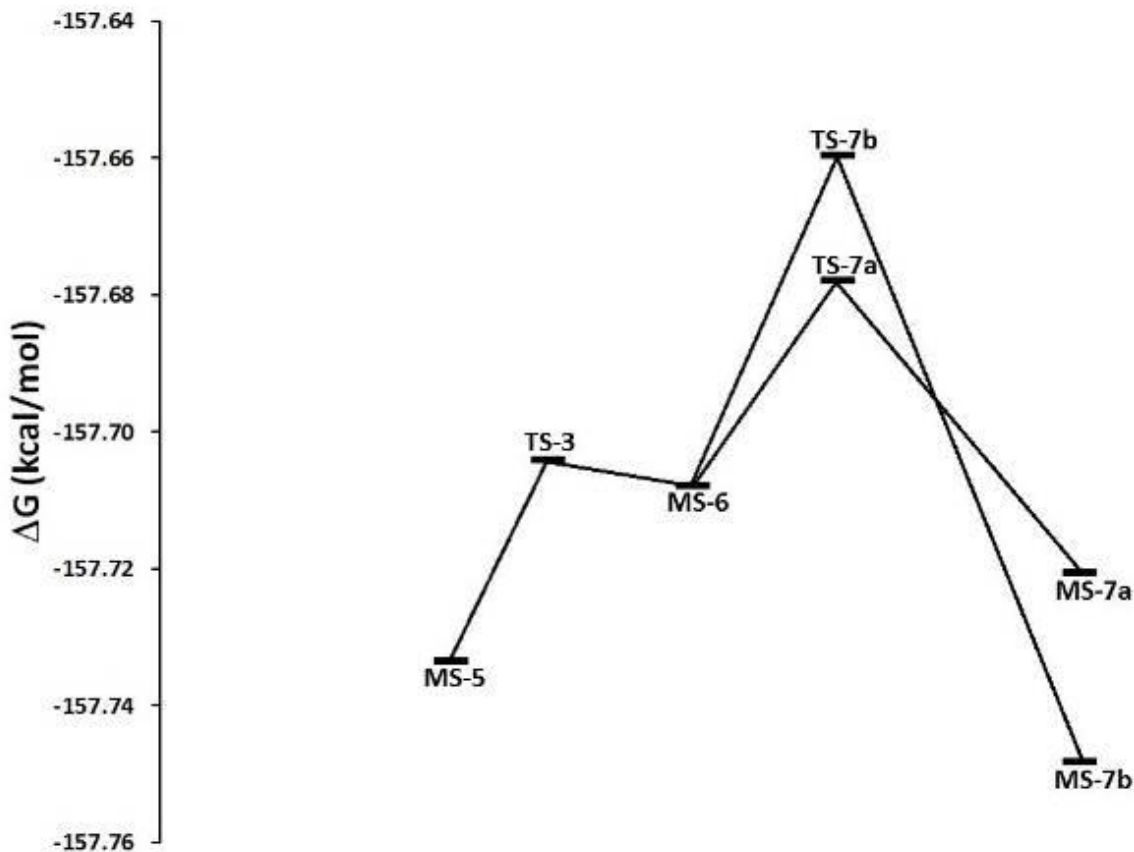


Figura Grafica ab-initio. Mínimo (MS-n) y estructuras de estado de transición (TS-n) ubicadas en la superficie potencial para la reacción catalítica **Figura Geometria**

A partir de la estructura (MS-5), se propone la formación de un estado de transición tetraédrica (TS-3) para obtener el intermediario (MS-6). Este intermediario tiene la estructura similar a un complejo catiónico radical ternario formado por un átomo de carbono central con hibridación sp^3 temporal: un tipo de oxígeno reactivo y el catión del hierro como catalizador con carga +III (FeIII) en el lado del grupo hemo. El segundo paso de la reacción es la posible formación de dos especies (MS-7a y MS-7b): una corresponde a la formación de un grupo epóxido y otra de un grupo ceto, ambas de sus respectivas estructuras de un estado de transición (TS-7a y TS-7b, respectivamente). Estas últimas especies están completamente dominadas por la influencia electrónica para estabilizar los intermediarios correspondientes (MS-7a y MS-7b). Finalmente, en el caso de que el alcohol solo esté involucrado como producto final (4), un átomo de hidrógeno fue reemplazado por deuterio (D) para analizar el mecanismo conocido como "*NIH-shift*"; cuyo producto final es de interés en este estudio para la simulación de acoplamiento molecular [18].

Independientemente de las sutiles diferencias cuánticas entre ambas geometrías de reacción, el complejo tenario tetraédrico anteriormente mencionado constituye el punto de partida en común para ambos. Por lo tanto, esa configuración se elige como un punto final estático del acoplamiento molecular y como un estado de transición (TS) predefinido para los cálculos *ab-initio*.

Se realizó el estudio *ab-initio* para generar posibles estados de transición mediante mecánica cuántica. Si bien, no se encuentra dentro del alcance de este estudio evaluar la literatura existente sobre el acoplamiento de enzimas con un grupo hemo, este estudio explora las cuatro opciones para formular las geometrías de inicio de acoplamiento para reflejar el ciclo catalítico tanto en mecánica molecular, nivel que define tipos de átomos adecuados, como en el nivel de la mecánica cuántica (**Figura opciones**).

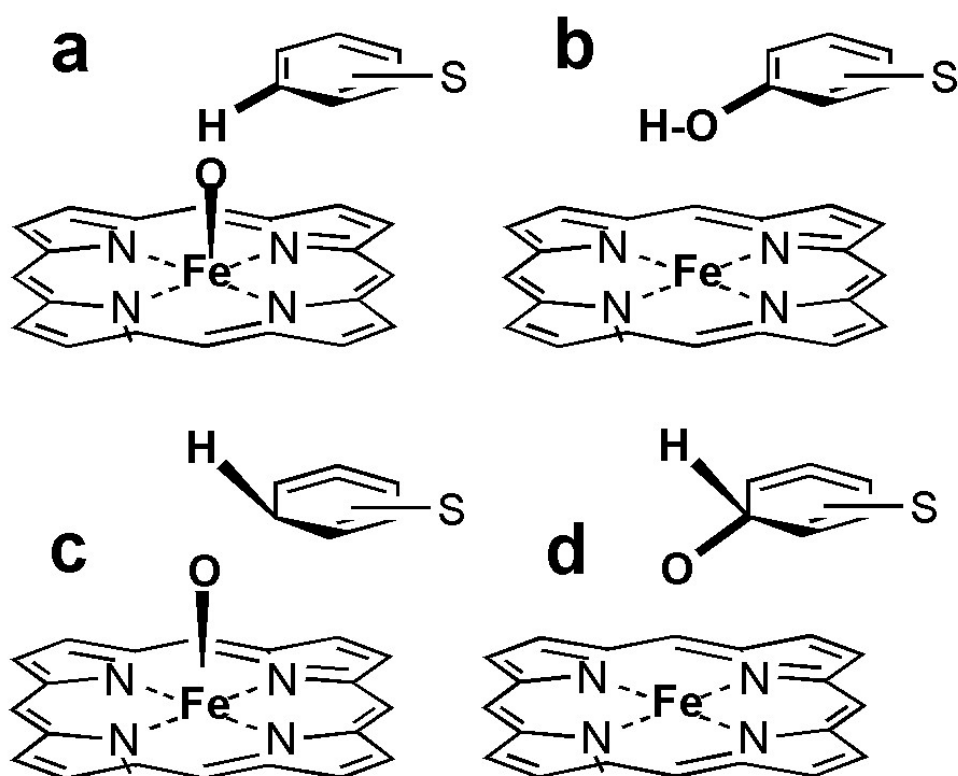


Figura opciones: las cuatro opciones (a-d) de posibles geometrías moleculares y los tipos de átomos necesarios para formular la entrada para el acoplamiento molecular. Mientras que las opciones a y b tienen un anillo aromático intacto con hibridación sp^2 y tipos de enlace aromático, las opciones c y d operan en un átomo de carbono con hibridación sp^3 en la geometría del enlace tetraédrico. La opción d evita la necesidad de reemplazar una coordinación (indefinida) con un enlace covalente (parametrizado) y resultados superiores comprobados durante el acoplamiento.

Los parámetros estructurales calculados de los complejos se presentan en la **Tabla Geometriasabinitio**. El promedio de los enlaces interatómicos Fe-N_p en los complejos es de 2.01 Å, mientras que la distancia interatómica Fe-O para los dos complejos TS-7b y MS-7b es 4.18 y 3.54 Å, respectivamente. Se observó un cambio importante en la distancia Fe-O en la formación de acetona con respecto a la formación de alcohol. Este hallazgo calculado refleja la probabilidad/viabilidad de la formación del complejo en relación con el grupo ceto durante la reacción. Estas geometrías ab initio están en línea con las geometrías de campo de fuerza preseleccionadas con tipos de átomos incorporados (**Figura Opciones**).

Tabla Geometriasabinitio. *Parámetros geométricos seleccionados de los estados mínimos y de transición optimizados con B3LYP / 6-31G más el LanLDZ (longitudes de enlace en Å y ángulos en grados)*

Estructuras	Fe-N _p	Fe-O	∠N _p FeO
TS-3	2.03	1.92	105.0
MS-6	2.01	1.77	103.6
TS-7a	2.02	1.97	87.7
TS-7b	2.00	4.18	97.8
MS-7a	2.01	2.03	88.8
MS-7b	2.01	3.54	74.5

Se realizaron los cálculos de acoplamiento molecular con las cuatro opciones de las geometrías de inicio. Las soluciones de acoplamiento molecular mejor clasificadas se extrajeron de los grupos de 2.5 Å RMSD para el refinamiento de la energía de interacción. Los complejos acoplados se refinaron bajo el campo de fuerza Yeti; el cual es una extensión AMBER e incluye parámetros para ion Fe III y hemo [121]. De este modo, todas las posturas finales obtuvieron una configuración octaédrica natural y se clasificaron en Yeti 8 [121, 102]. Posteriormente, se realizó la inspección y evaluación de las posturas finales. Las soluciones de acoplamiento molecular aceptadas se compararon con las geometrías de unión observadas en las estructuras cristalinas del complejo CYP P450 del alcanfor hidroxilado [99, 147]. La estructura de rayos X de CYP2A6 con cumarina co-cristalizada se usó como otra plantilla 3D; ya que esta revela las geometrías entre el sustrato y el sistema hemo-oxígeno (códigos PDB: 1Z10, 2CPP y 3CPP) [99, 147, 65]. Se midieron las geometrías de coordinación: distancias de átomos de Fe-O-C, ángulo de Fe-O-C y ángulos diédricos entre el grupo hemo y los ligandos acoplados [101].

El patrón de hidroxilación de los metabolitos principales [53, 45, 33] se reprodujo con éxito, excepto para el C2' por impedimento estérico. Esta es una sugerencia para cambiar las cadenas laterales o la cadena principal (ajuste inducido) que no se pueden manejar adecuadamente mediante procedimientos rígidos de acoplamiento de proteínas (**Tabla DockE**) [53]. Como fuente de los choques estéricos, identificamos Val113, Leu365 y Thr301 en CYP2C9 (código PDB: 1R9O, resolución 2 Å, valor de R 0.2) [24]. Para evitar malos sustratos: contactos de enzimas (choques) se seleccionaron nuevas conformaciones para

sus cadenas laterales de una biblioteca de rotámeros para permitir la hidroxilación en C2' [130, 158]. Dado que no se ha dilucidado ninguna estructura cristalina de CYP2C9-PPC, simulamos el ajuste inducido faltante por los cambios del rotámero (Val113, Leu365 y Thr301). De esta manera, la hidroxilación de PPC en C2' fue exitosa. La comprensión de los requisitos estéricos como las fuerzas motrices esenciales para la formación del complejo CYP-sustrato se mejoró.

Tabla DockE: Listado de soluciones de acoplamiento en el sitio catalítico. La primera columna se refiere a las cuatro opciones (a d) de posibles geometrías moleculares (**Figura opciones**). Se accedió al sitio de hidroxilación a través del octavador de oxígeno-hierro (III) -heme-Cys435. "No" implica los cambios espaciales necesarios que reflejan el ajuste inducido, por ejemplo, las rotaciones de la cadena lateral en Val113, Leu365 y Thr301 hicieron que la posición 2' fuera accesible a la hidroxilación [158].

PPC2'	Total E [Kcal/mol]	Electrostática [Kcal/mol]	VdW [Kcal/mol]	Puentes H [Kcal/mol]	Metal [Kcal/mol]	Total E menos Metal [Kcal/mol]
a	-9	-1	-8	-0.1	0	-9
c	-9.5	-1.5	-8	-0.1	0	-9.5
d	-20	-0.01	-7	0	-13	-7
b	-19	-4	-1	-0.1	-13	-6
PPC4'						
a	-7	0.2	-7	0	0	-7
c	-7	-0.1	-7	0	0	-7
d	-30	-7	-6	0	-16	-14
b	-29	-8	-6	-0.3	-15	-14
PPC6						
a	-3	1	-3	-0.002	0	-3
c	-3	-0.1	-3	-0.002	0	-3
d	-24	-5	-4	-0.004	-16	-8
b	-41	-18	-6	-2	-27	-14
PPC7						
a	-0.7	1	-1	-0.003	0	-0.7
c	-7	-0.002	-7	-0.001	0	-7
d	-37	-10	-2	0	-26	-11
b	-34	-14	6	-0.01	-26	-8
FLP						
a	-31	-18	-9	-5	0	-31
c	-31	-18	-9	-5	0	-31
d	-48	-25	-7	-3	-14	-34
b	-41	-24	-3	-2	-12	-29

La evidencia espectroscópica de masas proporciona una fuerte indicación de que el anillo fenilo de PPC está hidroxilado en la posición 2' [53]. Sin embargo, no existe ningún complejo cristalino de CYP2C9 con PPC. Por tal motivo, se utilizó a la WFN estructuralmente relacionada con PPC y co-cristalizada con un tipo mutante CYP2C9 (código PDB: 1OG5) [141, 69]. Se procedió a estudiar también a WFN en el sitio activo de CYP2C9. Con el sitio catalítico cerca de las cadenas laterales mutadas, el impedimento estérico causó el desplazamiento del sustrato más lejos del grupo hemo. Finalmente, las poses refinadas de Yeti se

encontraron plausibles en comparación con los complejos de cristales relacionados [24, 99, 147, 69, 141, 61, 62, 58]. En el caso de 2'-OH-PPC, encontramos sugerencias de ajuste inducido que reflejan conformaciones distintas a las estructuras de cristal disponibles. Posteriormente, se compararon los datos cromatográficos observados con las afinidades calculadas para la correlación entre la cantidad (AUC) y las energías potenciales de las poses acopladas (**Tabla DockE**) (Figura 2 en [53]).

Las posturas del acoplamiento molecular finales mostraron una orientación de ligando similar a la estructura cristalina del flurbiprofeno con una semejanza significativa con las características estructurales del PPC (flurbiprofeno, código PDB: 1R9O) [53, 54, 24]. Después de comparar sus estructuras, realizamos el acoplamiento molecular automatizado para evaluar qué paso del ciclo catalítico es adecuado como la postura final (paso final del acoplamiento), y cómo trabajar esta interacción enzima-sustrato en el formalismo de la mecánica molecular para Autodock 4 y Yeti 8. Dado que no se ha dilucidado ninguna estructura cristalina de PPC-CYP2C9, simulamos el ajuste inducido faltante por los cambios del rotámero los aminoácidos Val113, Leu365 y Thr301. De esta manera, la hidroxilación de PPC en C2' fue exitosa. Este hallazgo extiende el patrón conocido de metabolismo que resumimos en el capítulo de introducción.

El enfoque de la mecánica molecular con tipos de átomos predefinidos y configuraciones electrónicas, así como la mecánica cuántica con descripciones electrónicas elaboradas y flexibles, reflejó los datos experimentales sobre las selectividades de sustrato o región de miembros seleccionados de la familia CYP. Sin embargo, como una suposición hecha en silencio, se ha asumido que el vestíbulo externo de las proteínas CYP con la superficie cercana de las membranas del retículo endoplasmático también puede contribuir a la regioselectividad. Otra limitación se encontró en el complejo cristalino de warfarina-CYP2C9 en el que el ligando no estaba directamente unido al sitio catalítico, sino que estaba desplazado. La enzima no muestra el tipo salvaje sino un tipo de mutación. Por lo tanto, el desplazamiento del ligando se puede atribuir a esos aminoácidos mutados y la posición del ligando se calificó como un artefacto [141].

4.2 SIMULACIÓN DE AJUSTE INDUCIDO PARA EL CITOCROMO P450 3A4 BASADO EN OBSERVACIONES EXPERIMENTALES.

El RMSD entre el par de estructuras cristalinas iniciales (códigos PDB 1TQN y 3NXU) se midió como el paso inicial. El posible efecto del ajuste inducido entre ambas estructuras cristalográficas de la enzima CYP3A4 podría usarse como control. La **Tabla RMSDControl** muestra los resultados del cálculo entre estas estructuras proteicas en dos regiones diferentes de la proteína; una región contempla toda la proteína y la otra solo al asa F-G,

que es una parte fundamental del sitio activo de la enzima CYP3A4. El cálculo de RMSD se realizó para los átomos pertenecientes a la cadena principal. Para este estudio, la región del sitio activo se definió del aminoácido H54 al F60, de la S100 al E122, del T207 a la P218, de I238 a E244, de V296 a S311 y de la F367 a la R375.

Tabla RMSDControl. El valor computado de la distancia cuadrada media de la raíz (RMSD, en Å) entre las estructuras cristalinas originales de PDB 1TQN [87] y 3NXU [72] que comparan la proteína completa y solo la región correspondiente al sitio activo. El cálculo de ambas regiones tuvo en cuenta los átomos correspondientes a la cadena principal y más tarde a los átomos que no eran hidrógenos.

Región comparada	Valor RMSD (Å)
Proteína completa	1.6
Sitio activo	3.8

La **Tabla RMSDControl** muestra cómo los valores de RMSD entre los modelos 1TQN y 3NXU son mayores en la región del sitio activo; lo que significa que aunque son la misma enzima, y que 3NXU se basa en 1TQN, las principales diferencias estructurales se encuentran en la región con interacción directa con el sustrato (RIT).

La dinámica de los cuatro sistemas de la **Tabla Sistemas** se comparó con las dos estructuras cristalinas iniciales utilizando el RMSD (**Tabla SisvsPDB**). Como se explicó en la metodología, se esperaba que los sistemas moleculares sin sustrato tuvieran una RMSD más baja en comparación con el cristal 1TQN de PDB (cristal sin ligando) y que los sistemas con el sustrato tuvieran mayores similitudes geométricas con el cristal con cristal de PDB 3NXU (cristal con un ligando).

Tabla SisvsPDB. Valor calculado de la RMSD (en Å) de las estructuras cristalinas originales de PDB 1TQN [87] y 3NXU [72] comparando la proteína completa y solo la región correspondiente al sitio activo con los sistemas modelados para este estudio (1TQN-L, 1TQN+RIT, 3NXU-L, 3NXU+RIT y 1TQN+PPC). El cálculo de ambas regiones tuvo en cuenta los átomos correspondientes a la cadena principal.

Región comparada:	Proteína completa		Sitio activo	
	1TQN	3NXU	1TQN	3NXU
Cristal PDB de referencia:				
RMSD de sistema (iii) 1TQN+RIT:	1.5	2.1	1.5	3.8
RMSD de sistema (ii)1TQN-L(org):	2.2	2.8	3.9	5.1
RMSD de sistema (i)3NXU+RIT(org):	2.2	1.2	4.0	1.1
RMSD de sistema (iv)3NXU-L:	2.2	1.7	3.8	2.4

Como se puede apreciar en la **Tabla SisvsPDB** no se observan los resultados esperados; sin embargo, se puede ver que los valores más bajos los obtienen los sistemas con el sustrato RIT en su cavidad cuando se comparan con los modelos de PDB a partir de los cuales se generaron. Es decir, los sistemas con el sustrato en su sitio activo son estructuralmente más similares a los modelos de PDB originales. Estos resultados sugieren que el CYP3A4 es

menos flexible cuando tiene un sustrato en su cavidad. Existe evidencia de que los CYPs son termodinámicamente más estables cuando se encuentran en su forma en complejo [31, 32]; y mientras el sustrato es más grande la interacción con la enzima puede ser mayor gracias a que la energía que lidera la interacción de CYPs con sus sustratos es la energía de van der Waals [55]. Las fuerzas intermoleculares existentes ($-19.96 \text{ kcal.mol}^{-1}$), calculadas mediante el cálculo de Energía de Punto Único con YetiFF en las posiciones de los átomos originales del cristal con código PDB 3NXU [146, 55, 25] entre la enzima y su sustrato pueden causar restricciones en el movimiento de este tipo de enzimas (**Figura RIT+3A4**). Esto explicaría por qué los sistemas moleculares con RIT tienen un rango de movimiento más bajo, lo que hace que su parecido estructural sea mayor con el cristal a partir del cual se generó.

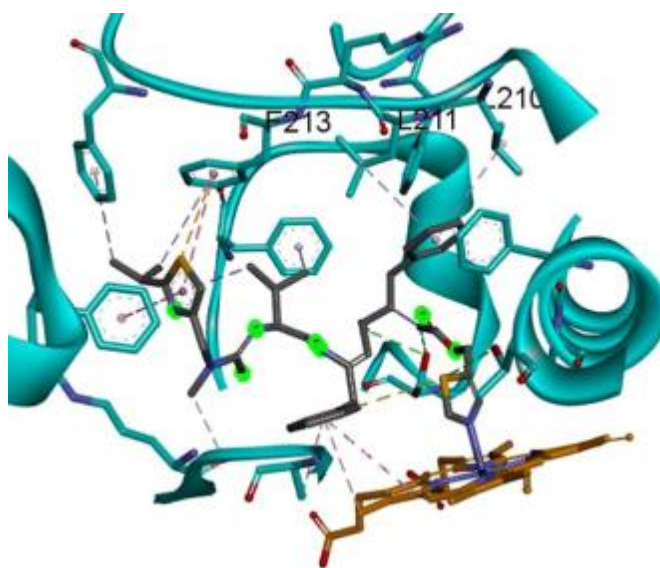


Figura RIT+3A4. Interacciones intermoleculares entre el sustrato de ritonavir y la enzima CYP3A4 en el cristal PDB 3NXU. Las interacciones intermoleculares (líneas punteadas) podrían ser la razón por la que los sistemas con el sustrato en el sitio activo tienen menos diferencias geométricas con los cristales originales de PDB 1TQN y 3NXU

Para comprobar la hipótesis de que las proteínas de los sistemas con RIT tienen menor intervalo de movimiento se midió el RMSD de los cuatro sistemas con referencia de la posición promedio de sus propios átomos a lo largo de toda la DM. El RMSD también se puede usar para medir el movimiento de una estructura de proteína si se usa como se describe detalladamente en la metodología. Esta medición sirve para medir el efecto que tiene el sustrato RIT en el sitio activo de la enzima CYP3A4. En la **Figura Supermov** y la **Tabla Mov** se puede ver cómo los sistemas con RIT tienen un valor calculado más bajo de RMSD en esta región. Como se mencionó anteriormente, una RMSD más baja refleja menos

movilidad; por lo tanto, al ser los sistemas con RIT son los que muestran menos RMSD, independientemente del cristal con el que se modelaron. Por lo tanto, podemos inferir que la presencia de RIT tiene un efecto sobre el movimiento del sitio activo de CYP3A4. Las diferencias en los valores RMSD de los sistemas con el sustrato y sin sustrato son significativas. Sin embargo, esto no muestra que ritonavir y los sistemas libres de ritonavir compartan la misma geometría en el sitio activo.

Tabla Mov. Valor calculado de RMSD (en Å) de los sistemas modelados para este estudio (1TQN-L, 1TQN + RIT, 3NXU-L y 3NXU + RIT) comparando el movimiento promedio que se calculó por DM de la región correspondiente al sitio activo contra cada una de las posiciones en esta región durante toda la simulación. Las columnas SD, min y max muestran los valores de la desviación estándar, el mínimo y el máximo de RMSD que se obtuvo durante la dinámica.

	RMSD (Å) (movimiento)	DS	Min (Å)	Max (Å)
1TQN+RIT	1.2	0.36	0.32	3.59
1TQN-L(org)	2.0	0.66	0.36	5.07
3NXU+RIT(org)	1.2	0.38	0.20	2.74
3NXU-L	2.2	0.84	0.29	5.35

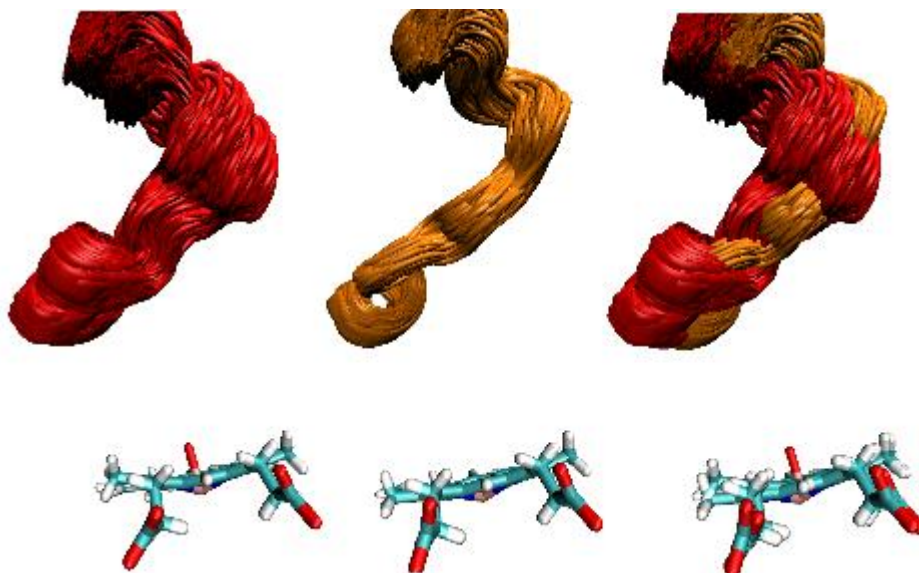


Figura Supermov. Superposición de conformaciones en todo el MD que tenía el asa F-G en el sitio activo de los sistemas 3NXU-L (izquierda), 3NXU + RIT (centro) y la superposición de ambos sistemas (derecha). Se ve claramente cómo 3NXU + RIT (centro) tuvo un rango de movimiento mucho más pequeño que 3NXU-L (izquierda) durante la dinámica.

La **Figura Supermov** muestra la superposición del asa F-G de 3NXU-L (rojo) y 3NXU + RIT (naranja) a lo largo de toda la dinámica. En él, podemos ver cómo 3NXU + RIT tiene un rango de posiciones de movimiento más pequeño que 3NXU-L. Esto puede deberse al hecho de

que las interacciones intermoleculares de CYP3A4 con RIT, además del espacio ocupado por RIT, impiden que el asa F-G de 3NXU-L ocupe las posiciones geométricas que ocupan el asa F-G de 3NXU+RIT. Por sí mismo, el impedimento estérico de RIT en la cavidad del CYP3A4 evita que el asa F-G ocupe posiciones cercanas al grupo hemo.

La **Tabla Mov** muestra que los sistemas con RIT tienen una dinámica similar, debido a que dichos sistemas son menos flexibles en su cadena principal. Mientras que aquellos sin RIT tienen una gran flexibilidad. Sin embargo, esto no refleja qué sistemas tienen mayores similitudes geométricas. Para saber qué sistemas tienen una geometría más similar independientemente de su dinámica, las diferencias dinámicas y geométricas de los cuatro sistemas moleculares se calcularon comparando los cuatro sistemas entre sí. El RMSD de dos sistemas (System1 y System2, respectivamente) se calculó tomando como referencia las posiciones promedio de los átomos considerando ambos sistemas; el movimiento del mismo átomo homólogo de los dos sistemas. El RMSD calculado de System1 con respecto a las posiciones promedio de ambos sistemas se llama A_1 , y el RMSD calculado de System2 con respecto a las posiciones promedio de ambos sistemas se llama A_2 .

Este tipo de cálculo es posible gracias al hecho de que todos los sistemas comparados tienen el mismo número de átomos en sus proteínas; por lo tanto, cuanto más alta sea la A en un sistema, mayores serán las diferencias dinámicas y estructurales que tendrá con respecto al promedio atómico de ambos sistemas. La ecuación $(A_1 - M_1) + (A_2 - M_2)$, donde M es el RMSD que expresa el movimiento de un sistema (**Tabla Mov**), permite calcular las similitudes estructurales entre dos sistemas de MD independientemente del propio movimiento de la estructura enzimática (**Figura Formula**). De esta manera, es posible expresar cuán similares son dos estructuras en una ejecución de MD. Cuanto mayor sea el valor, menos similitudes estructurales tendrá en una dinámica; cuanto menor sea este valor, habrá más conformaciones similares alcanzadas en una ejecución de MD.

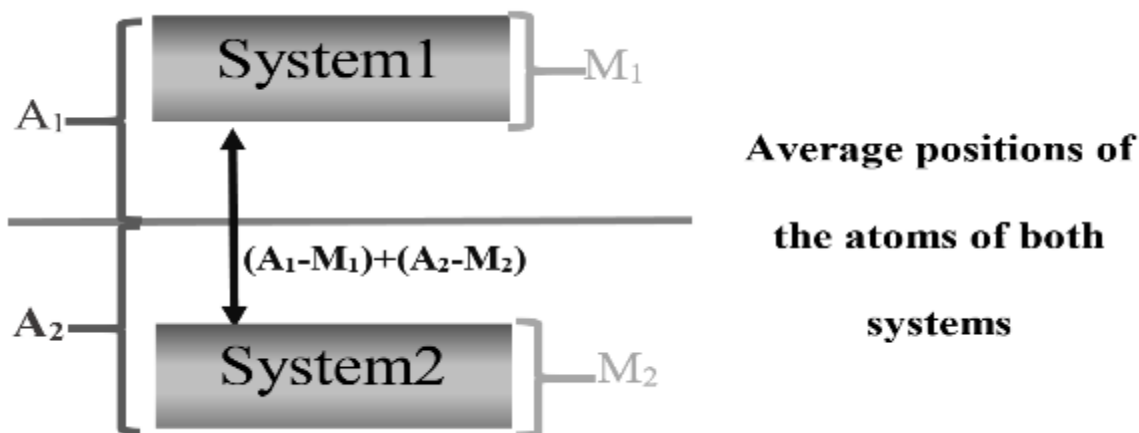


Figura Formula. Representación esquemática de la fórmula $(A_1-M_1)+(A_2-M_2)$. M es el RMSD que expresa el movimiento de un sistema (**Tabla Mov**). A es el RMSD de un sistema cuando se compara con las posiciones promedio de los átomos de ambos sistemas. Cuanto mayor sea el valor de este cálculo, más diferencias estructurales tendrán dos sistemas en una ejecución de MD.

Los resultados del RMSD calculados se muestran en la **Tabla Formula**. Un RMSD más alto en las columnas 5 y 6 expresa cuál de los dos sistemas se movió más que el otro; lo que significa que si ambos sistemas se movieron de manera similar, tendrán un valor RMSD similar. Para este cálculo, solo se tomaron los átomos que pertenecen al sitio activo y la cadena principal. Si se calcula la diferencia entre A_1 y A_2 (**Figura Formula**), se puede ver que los sistemas con menos diferencias dinámicas son los pares 1TQN+RIT y 3NXU+RIT, y 1TQN-L y 3NXU-L; es decir, aquellos que se comparan cuando ambos presentan RIT y cuando ambos no tienen un sustrato en su cavidad. Sin embargo, las posiciones iniciales de los átomos en una ejecución de MD están estrechamente relacionadas con el movimiento que seguirá una estructura de proteína; como lo muestran los valores en la columna 7 de la **Tabla Formula**. Los sistemas generados a partir del mismo modelo cristalográfico son los que tienen las mayores similitudes estructurales en una corrida de MD independientemente del propio movimiento de la estructura enzimática. Esto sugiere que se debe prestar especial atención a las posiciones iniciales de los átomos de una proteína al hacer este tipo de trabajo.

Tabla Formula. Diferencias estructurales y dinámicas en los sistemas modelados para este estudio (1TQN-L, 1TQN+RIT, 3NXU-L y 3NXU+RIT) medidos como RMSD (en Å). La comparación entre los cuatro sistemas se realiza entre ellos teniendo en cuenta las seis combinaciones posibles de la **Tabla interpretación**. M_1 y M_2 son los valores de RMSD para el movimiento calculado de los sistemas 1 y 2, respectivamente, en la **Tabla Mov**. A_1 y A_2 representan el RMSD de Sistemas 1 y 2 respectivamente, teniendo como referencia las posiciones promedio de los átomos de ambos sistemas. $(M_1-A_1)+(M_2-A_2)$ mide las diferencias entre los sistemas 1 y 2

System1	System2	M_1	M_2	A_1	A_2	$(A_1-M_1)+(A_2-M_2)$
---------	---------	-------	-------	-------	-------	-----------------------

3NXU-L	3NXU+RIT	2.2	1.2	1.5	1.2	-0.6
1TQN-L	1TQN+RIT	2.0	1.2	1.7	1.5	0.0
1TQN+RIT	3NXU-L	1.2	2.2	1.8	2.0	0.4
1TQN-L	3NXU-L	2.0	2.2	2.5	2.5	0.8
1TQN+RIT	3NXU+RIT	1.2	1.2	2.0	2.0	1.6
1TQN-L	3NXU+RIT	2.0	1.2	2.7	2.6	2.2

La **Figura Cuadrangular** muestra una serie de imágenes que ilustran la dinámica y la estructura de las comparaciones de este estudio. Muestra la superposición de estructuras que el asa F-G ocupó a lo largo de toda la dinámica. Se puede observar que los sistemas superpuestos sin ritonavir (a la izquierda de la **Figura Cuadrangular**) ocupan regiones geométricas similares; mientras que los sistemas con ritonavir tienen un rango de movimiento más pequeño en esta región y ocupan diferentes posiciones (centro de la **Figura Cuadrangular**). Las diferencias estructurales que se pueden ver en la **Figura Cuadrangular** al comparar los sistemas pueden deberse a las condiciones propias del cristal a partir del cual se crearon los sistemas. El asa F-G del sistema 3NXU+RIT (en naranja) tiene una disposición espacial de tal manera que los átomos de su cadena principal se acomodan de manera que RIT se acopla a la cavidad; mientras que 1TQN+RIT, cuando se creó a partir de un cristal que no tenía tal sustrato, organizó el asa F-G de una manera diferente y tuvo interacciones energéticamente favorables, estas posiciones ya no variaron lo suficiente para parecerse a su homólogo 3NXU+RIT; es decir, el cambio conformacional en el sistema 1TQN+RIT probablemente no tuvo lugar a lo largo de la dinámica porque las interacciones intermoleculares favorables RIT-CYP3A4 no permitieron un nuevo cambio conformacional.

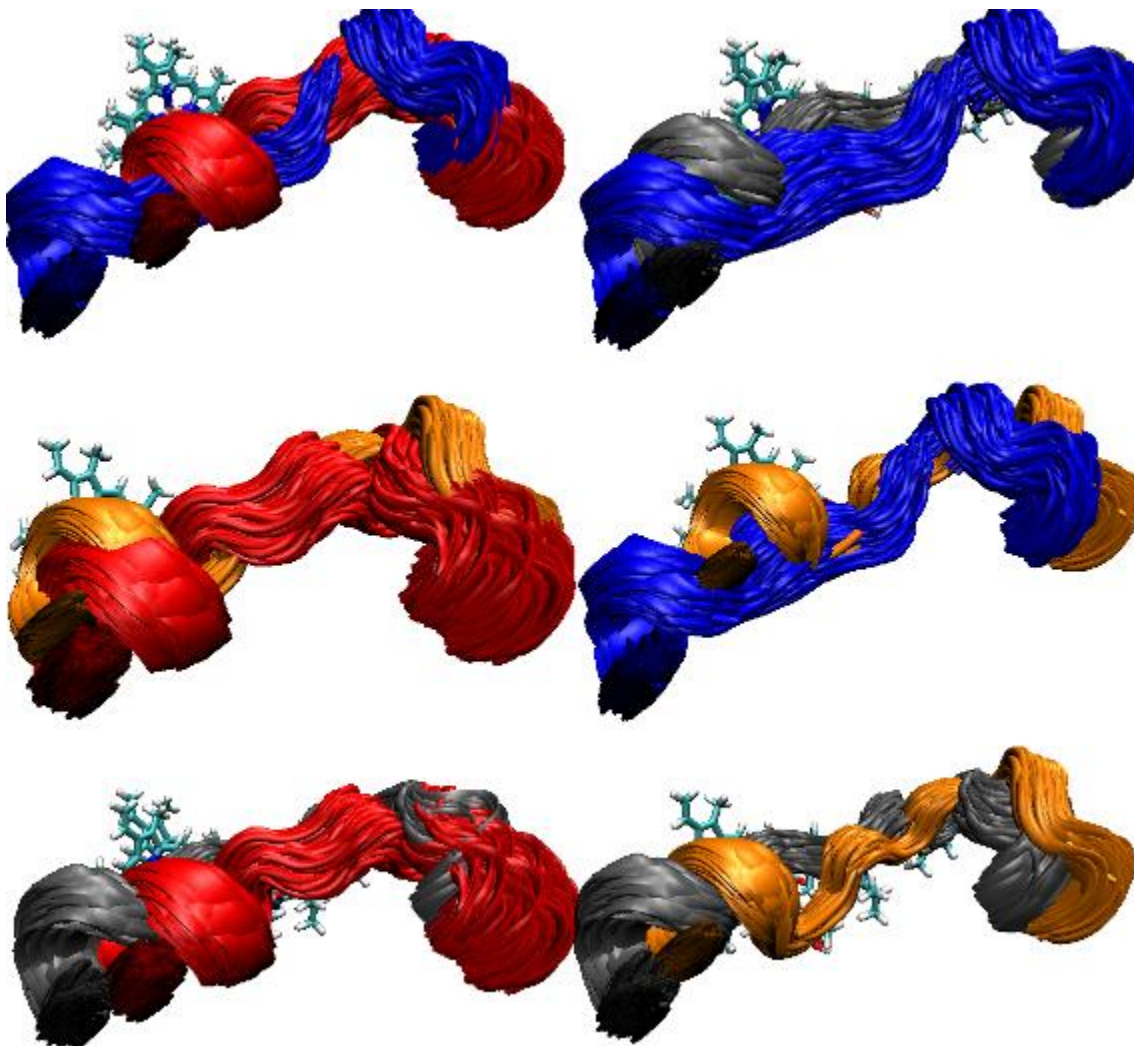


Figura Cuadrangular. Superposición de las conformaciones obtenidas del asa F-G en los cuatro sistemas. Refleja el movimiento total de esta asa en el sitio activo. A la izquierda, los sistemas 3NXU-L (rojo) se superponen con 3NXU + RIT (naranja). En el centro izquierdo, 1TQN-L (azul) superpuesto con 1TQN + RIT (negro). A la izquierda, 1TQN + RIT (negro) superpuesto con sistemas 3NXU-L (rojo). A la derecha, los sistemas 3NXU-L (rojo) superpuestos con 1TQN-L (azul). Hacia la derecha, 1TQN + RIT (negro) superpuesto con 3NXU + RIT (naranja) y hacia la derecha, 1TQN-L (azul) superpuesto con 3NXU + RIT (naranja).

Cuando los sistemas 3NXU-L y 3NXU+RIT están superpuestos (a la derecha de la **Figura Supermov** y centro izquierda de la **Figura Cuadrangular**), se pueden ver claramente las varias coincidencias espaciales ocupadas por los átomos de ambos sistemas en el sitio activo durante toda la dinámica. Aun así, en la **Figura graphsup** se puede apreciar que el asa F-G de 3NXU+RIT (**Figura graphsup**, naranja) se coloca cerca del grupo hemo y RIT, mientras que el asa F-G del sistema 3NXU-L (**Figura graphsup**, rojo) es ubicado muy por encima del asa F-G de 3NXU+RIT, lo que nos permite inferir que es una conformación energéticamente

más favorable para dicha asa y que el CYP3A4 es capaz de metabolizar sustratos con un volumen mayor que el RIT.

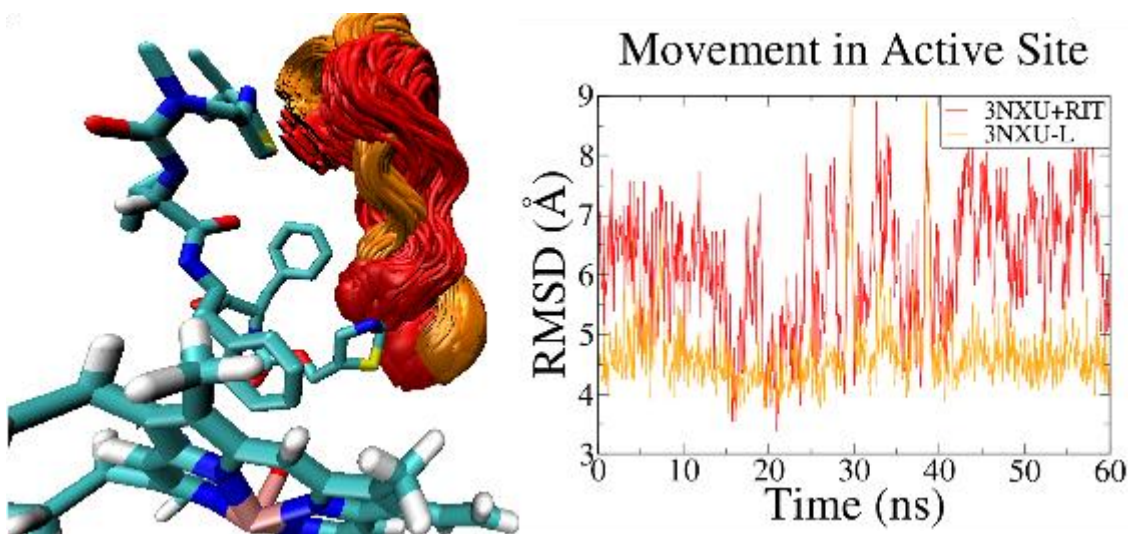


Figura graphsup. Superposición de conformaciones (izquierda) en todo el MD que tenía el asa F-G en el sitio activo de los sistemas 3NXU-L (rojo) y 3NXU+RIT (naranja). Se ve claramente cómo 3NXU+RIT (naranja) está más cerca del hemo y RIT durante la dinámica. Gráfico de la distancia (derecha) entre ritonavir y el asa F-G a lo largo de la dinámica molecular. Dado que el sistema 3NXU-L no tiene sustrato; las coordenadas del átomo RIT más cercano a la proteína en el cristal 3NXU se usaron como referencia. La distancia mínima entre las coordenadas de referencia y la proteína en ambos sistemas (3NXU-L y 3NXU+RIT) se calculó durante los 60 ns de DM

Los resultados muestran que las diferencias dinámicas más pequeñas, los sistemas cinéticamente más parecidos, se dan entre aquellos que comparten presencia o ausencia de sustrato. Esto demuestra que el sustrato tiene un efecto sobre los cambios geométricos de la enzima y que pueden ser observables y medibles en los estudios de dinámica molecular. Sin embargo, las coordenadas iniciales de los átomos influyen en los resultados de los estudios de dinámica molecular; por lo tanto, se debe prestar especial atención a las estructuras iniciales que se utilizarán, estas deben ser lo más precisas posible a lo que se desea simular. Aun así, el principal responsable del movimiento de un CYP en el sitio activo en esta prueba fue el sustrato; lo cual, generó interacciones intermoleculares con la enzima y restringió el movimiento en esta región.

Estos resultados pueden sugerir que en cuanto a las preferencias de regioselectividad de un CYP sobre su sustrato pueden estar más relacionadas con la forma en que el sustrato entra en la cavidad, ya que una vez que se forma el complejo sustrato-enzima, se vuelve más estable; lo que hace que los cambios posicionales del sustrato sean poco probables dentro de la cavidad, contrario a lo reportado en [49]. Se debe prestar especial atención al modelo de proteína cristalográfica que se utilizará al ejecutar estudios de MD.

Las condiciones termodinámicas en el momento de cristalizar una proteína son diferentes de las fisiológicas; lo que puede provocar cambios en la geometría tridimensional de los CYPs. Esto explicaría la estructura tridimensional que CYP3A4 adquirió en el cristal con el código 1TQN en el momento de su cristalización. Ninguno de los dos sistemas sin sustrato (1TQN-L y 3NXU-L) tenía una disposición espacial del asa F-G similar al cristal 1TQN, que originalmente no tenía sustrato. Los estudios de dinámica molecular simulan condiciones termodinámicas similares a los sistemas biológicos, por lo que la posición del asa F-G del CYP3A4 del sistema 1TQN-L se alejó del grupo hemo, haciendo más volumen en la cavidad y obteniendo mayores similitudes geométricas con la estructura del CYP3A4 del sistema 3NXU-L.

La presencia de RIT en el sitio activo de CYP3A4 hace que la enzima tenga menos movimiento, lo que se ve reflejado en un RMSD menor en comparación con su movimiento promedio total. Las interacciones intermoleculares del sustrato con la enzima restringen el movimiento de la enzima en su sitio activo y hacen que el complejo enzima-sustrato sea menos flexible pero más estable. Cuando la enzima no está en complejo con su sustrato, puede adquirir una gran cantidad de posiciones geométricas en su sitio activo, lo que explica por qué estas enzimas son capaces de metabolizar una gran cantidad de sustratos con diferentes tamaños.

Estos resultados concuerdan con la Figura 1-a de [123]. En este estudio, se aplicaron técnicas de MD para analizar los canales que se forman en CYP3A4 para la entrada de moléculas en su sitio activo. Se utilizaron dos estructuras cristalinas de CYP3A4, una sin sustrato en el sitio activo (ID PDB: 1TQN) y la otra con ketoconazol en su cavidad (ID PDB: 2V0M) [71, 87]. Cuando se mide la RMSD de los átomos C- α de las proteínas de ambas estructuras con respecto a la estructura inicial en función del tiempo (5 ns), la enzima sin sustrato (1TQN) observa un mayor desplazamiento; concluyendo así que el complejo CYP3A4-ketoconazol es más estable. Del mismo modo, los resultados de Karthikeyan (2017) [159] dicen: "*se infiere que la unión de ambos ligandos con la proteína CYP1A1 influye en la estabilidad de la estructura de la proteína*". Ambos resultados son consistentes con los resultados de este estudio; sin embargo, no pudieron atribuirse a las interacciones intermoleculares enzima-sustrato ni a las posiciones iniciales de los modelos de proteína utilizados.

El complejo enzima-sustrato es cinéticamente más estable, lo que causaría que el modo de unión o la forma en que el sustrato entre en el sitio activo de estas enzimas sea determinante en su regio-selectividad. Por esta razón, cuando el movimiento del complejo enzima-sustrato está restringido, es necesario saber cómo el sustrato ingresa a los CYP para conocer los patrones de metabolización en diferentes sustratos. Al comparar las

trayectorias de los sistemas que comparten RIT y aquellos que no lo hacen, podemos observar que no hay una superposición clara de los átomos de la cadena principal. Las condiciones de las estructuras iniciales influyen en los resultados de MD. Lo que también se puede ver en la Figura 2 de [160] y en la Figura 2 de [124]. En [160] realizan MD en dos estructuras de conejo CYP2B4, un estado abierto (ID PDB: 1PO5) [88] y otro en estado cerrado (ID PDB: 3MVR) [89]. Este es un estudio de MD similar en el que comparan la dinámica de un par de conformaciones diferentes de la misma enzima CYP2B6. Ellos, como nosotros, encontraron que la estructura abierta en 1PO5 es menos estable en "condiciones ambientales", pero informan que la estructura dinámica de la proteína cambia sin poder simular la geometría de 3MVR. Este resultado apoya la afirmación de que las posiciones iniciales en un trabajo de MD sobre enzimas CYP450 son importantes, y que la elección de un modelo de proteína no es un tema trivial.

4.3 SIMULACIÓN DEL METABOLISMO DE FENPROCUMÓN POR ENZIMAS CYPs

Se logró calcular los cambios estructurales que debe sufrir CYP2C9 para lograr el metabolismo de PPC. Se calculó la frecuencia con la que los distintos SoMs de PPC se colocan en geometría de hidroxilación en CYP2C9 y Cyp3A4.

4.3.1 Diferencias dinámicas y estructurales de CYP2C9 con y sin PPC en el sitio activo

El gráfico RMSD (izquierda **Figura RMSF**) global de los sistemas **CYP2C9-L** y **CYP2C9+PPC** no muestran grandes diferencias y no permite interpretar si el sustrato PPC modifica la estructura de la proteína. Sin embargo, las fluctuaciones de los aminoácidos en los dos sistemas son diferentes; permitiéndonos identificar las regiones de la proteína con mayores diferencias dinámicas. Como se mencionó anteriormente, el sitio activo de CYP2C9 está compuesta mayormente por α -hélices (hélices I, F y G), lo que supone menor flexibilidad estructural; no obstante, el sustrato PPC modifica regiones de la proteína no necesariamente del sitio activo. Asas cercanas al sitio activo son las encargadas de cambiar su dinámica para modificar la geometría de la cavidad, sin la necesidad de hacer grandes cambios en las principales regiones del sitio activo, lo que supone menor variabilidad en su estructura.

La **Figura RMSFCYP2C9** permite apreciar diferencias dinámicas en regiones cercanas al sitio activo; antes del α -hélice F (residuos 190 a 200) y después del α -hélice G (residuos 250 a 260). En el sistema **CYP2C9-L** estas regiones muestran ser más flexibles que las del sistema **CYP2C9+PPC**. Este hecho permite interpretar que el ajuste inducido de la enzima CYP2C9, y de otras enzimas CYPs cuyo sitio activo esté formado principalmente por α -hélices, ocurre

en las asas (ej. asas E-F y G-H) cercanas a las α -hélices que forman el sitio activo (hélices I, F y G). Antes del ingreso del sustrato a la cavidad de la enzima, la flexibilidad de estas regiones podrían facilitar los cambios estructurales que permitan la formación de canales para el ingreso del sustrato. Una vez formado el complejo enzima sustrato, estas regiones se estabilizan. Fuera de estas diferencias, el resto de regiones parecen ser también muy similares en su flexibilidad.

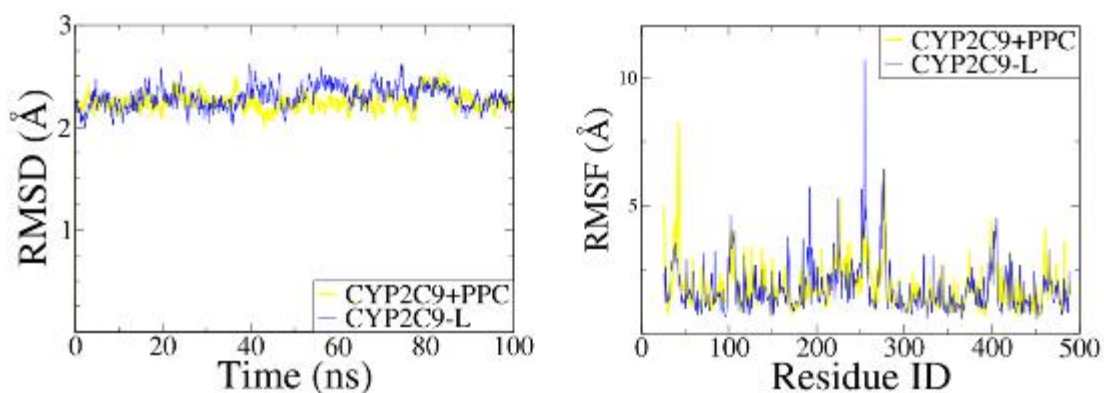


Figura RMSFCYP2C9. Perfil de RMSD y RMSF de la cadena principal de la proteína CYP2C9 en su forma en complejo y sin complejo. No se logran apreciar diferencias estructurales demasiado grandes en el gráfico de RMSD; sin embargo, cuando se analiza el RMSF se logra apreciar aminoácidos con diferentes dinámicas en presencia del sustrato PPC. El sistema **CYP2C9+PPC** tiene picos menos altos que **CYP2C9-L** en regiones cercanas en al sitio activo

A pesar de que no se encontraron grandes diferencias dinámicas, se encontraron otras regiones que sí mostraron cambios estructurales. Probablemente estas diferencias no se ven reflejados en los valores de RMSD debido a que se mueven en la misma magnitud pero en posiciones espaciales diferentes. El asa B-C, asa F-G, asa G-H y giro β 1-1 1-2 son las regiones con grandes diferencias conformacionales y no tanto en su flexibilidad. Estas diferencias estructurales son consecuencia de la interacción con el sustrato PPC en la cavidad, permitiendo que el sustrato tenga mayor interacción con la proteína en las regiones de la α -hélice F. En la **Figura regiones+ppc** también podemos apreciar como el extremo carboxilo del α -hélice G no solo presenta diferencias dinámicas, si no también estructurales provocadas por la presencia de PPC en su sitio activo.

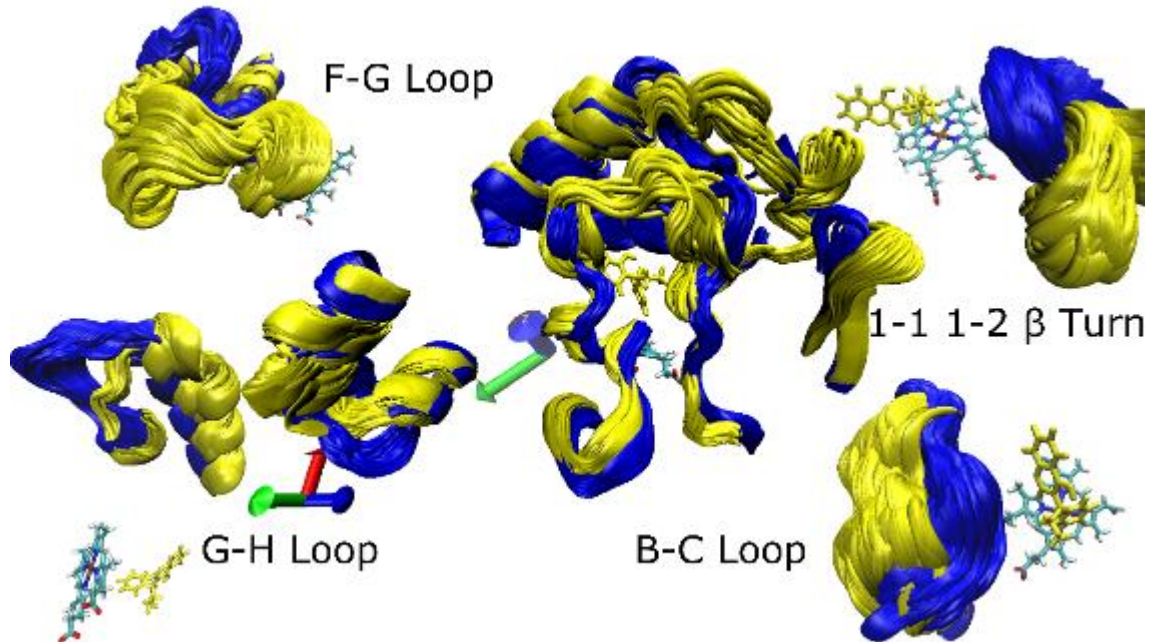


Figura regiones+ppc. Superposición de conformaciones en todo el MD que tenía el asa F-G (arriba Izq.), el asa G-H (abajo Izq.), el asa B-C (abajo Der.), giro β 1-1 1-2 (arriba Der.) y superposición de las cuatro zonas antes mencionadas de CYP2C9 en presencia y ausencia de PPC (CYP2C9+PPC y CYP2C9-L). Se aprecia cómo estos dos sistemas tienen diferentes intervalos de movimiento.

A pesar de que en la gráfica de RMSD de la **Figura RMSFCYP2C9** no se logran apreciar diferencias estructurales, la **Figura regiones+ppc** muestra una serie de regiones de la enzima CYP2C9 donde pueden apreciarse diferencias dinámicas provocadas por la presencia de PPC en la cavidad del sitio activo. Las regiones mostradas en la imagen son parte del sitio de entrada hipotético para PPC; con excepción del asa G-H. El asa F-G en el sistema **CYP2C9+PPC** desplaza al giro β 1-1 1-2 y al asa B-C hacia la parte más externa de la proteína, mientras que en el sistema **CYP2C9-L** ambas regiones se encuentran más cerca del sitio activo. Este cambio puede ser ocasionado a la interacción directa de la α -hélice F con PPC en la cavidad. Las fuerzas intermoleculares entre PPC y dicha hélice acercan a esta región de la proteína al sitio activo. Estas modificaciones estructurales podrían impedir que otro sustrato ingrese a la cavidad de CYP2C9. Se ha observado que complejos de CYP con su sustrato son termodinámicamente más estables [32].

El extremo carboxilo de la hélice G también sufre modificaciones estructurales. El asa G-H puede ser la responsable de una ligera pero significativa movilidad del sitio activo de CYP2C9. A diferencia de CYP3A4, donde el asa F-G forma parte del sitio activo y está en interacción directa con los sustratos de esta enzima, los cambios estructurales de CYP2C9 en su cavidad deben ser provocados por las asas cercanas al sitio activo. La hélice F de CYP2C9, que forma parte directa del sitio activo, no es una estructura tan flexible como lo

podiera ser un asa, y por tanto, las modificaciones estructurales que permiten el acoplamiento del sustrato a CYP2C9 deben estar dados por regiones que no son parte del sitio activo.

4.3.2 Efecto de la membrana en la estructura y dinámica de CYP2C9

La estructura general de CYP2C9 y las regiones que interactúan directamente con la membrana pueden apreciarse en las **Figuras Pa) y Pb)**. Se comparó el movimiento de CYP2C9 en presencia (**CYP2C9+Mem**) y ausencia (**CYP2C9-Mem**) de membrana (**Figura Pc y Pd)**. En ambos modelos las enzimas muestran magnitudes de movimientos similares (gráficos de RMSD similares) y no se pueden apreciar diferencias dinámicas provocadas por la membrana. Cuando se calcula el RMSD de toda la proteína en los modelos con y sin membrana, se observa la disminución de los valores de RMSD aproximadamente hasta los 20ns; y a partir de ese momento se estabilizan los valores aproximadamente en 1Å (los promedios finales de toda la dinámica son de 1.13 y 1.2 para la proteína con membrana y sin membrana respectivamente). Debe mencionarse que los sistemas ya habían alcanzado el equilibrio energético antes de comenzar los cálculos de dinámica molecular. No obstante, a pesar de las similitudes globales de ambos modelos, el cálculo del RMSF permitió observar 3 regiones donde hubo cambios conformacionales en la estructura tridimensional de CYP2C9 a consecuencia de la interacción con la bicapa modelada de fosfolípidos (**Figuras Pd), e), f) y g)**).

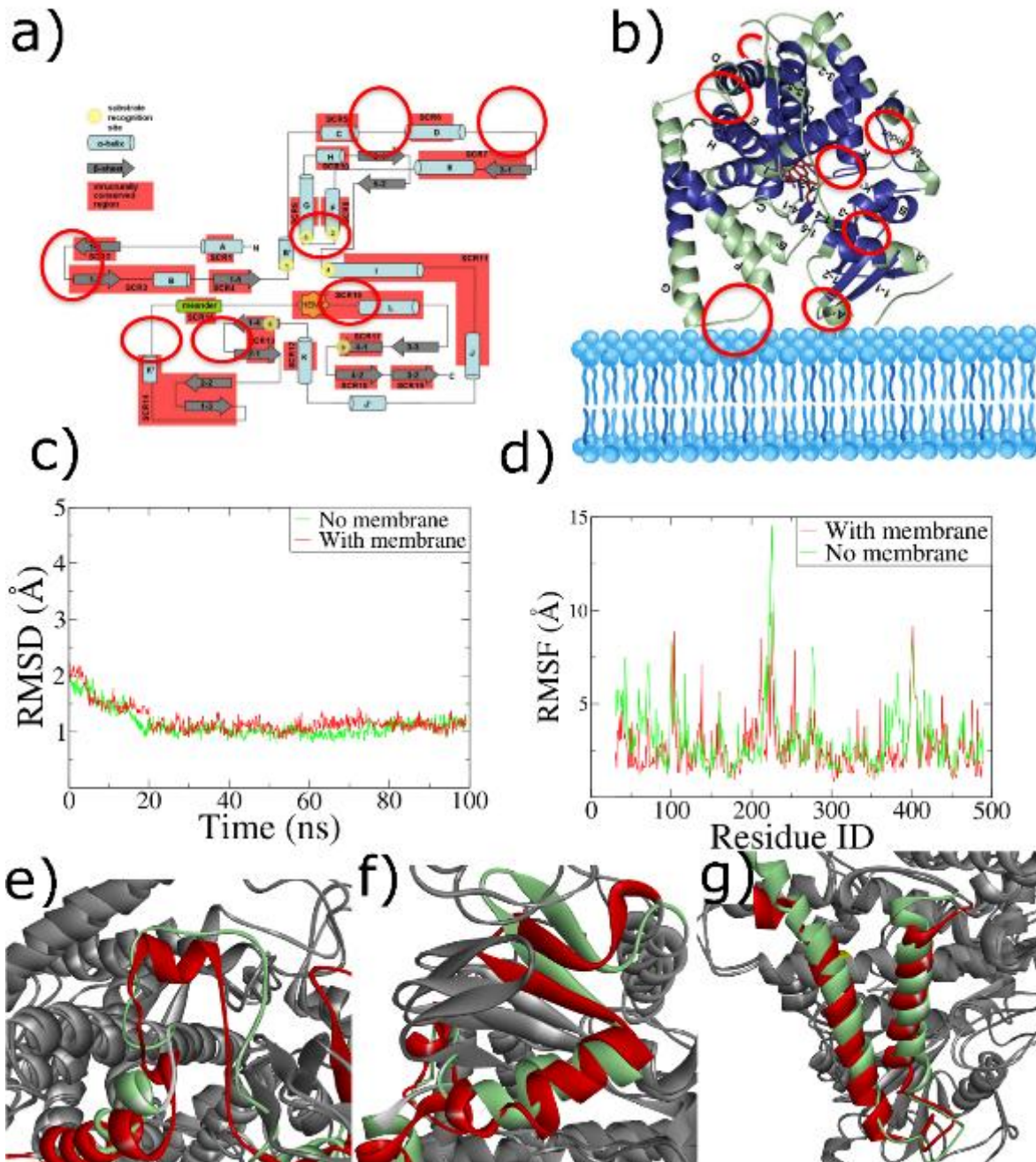
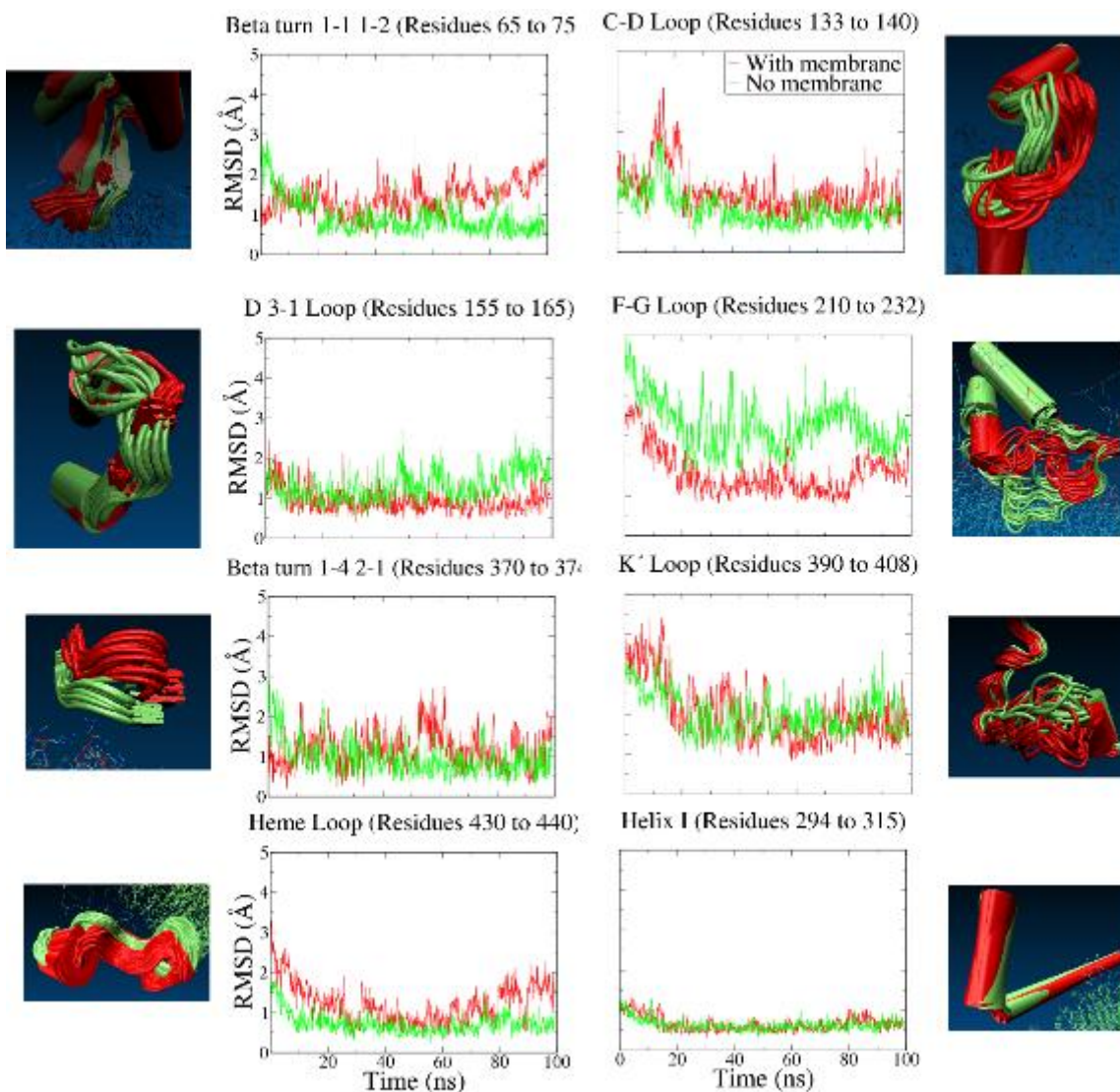


Figura P. a) Figura reportada en [21], esquema bidimensional de la estructura general de las CYP450. Se han encerrado los sitios de CYP2C9 que presentan diferencias estructurales y dinámicas. b) Figura reportada en [21], esquema tridimensional con una membrana de la estructura general de las CYP450. Se han encerrado los sitios de CYP2C9 que presentan diferencias estructurales y dinámicas entre ambos. c) Gráfica de la magnitud de **movimiento** medido en RMSD de los modelos **con membrana (CYP2C9+Mem)** y **sin membrana (CYP2C9-Mem)**. d), e) y f) Estructura tridimensional de las regiones F-G, B-C y hélice B respectivamente de CYP2C9 superponiendo los modelos **con membrana** y **sin membrana**

El modelo sin membrana presenta el asa B-C completamente bien definida, mientras que el modelo con membrana presenta un α -hélice en esta región; una estructura más compacta y rígida que un asa. Esta diferencia estructural ha sido reportada en varios trabajos cristalográficos de la enzima CYP2C9 en PDB. La estructura tridimensional del cristal 1R9O [24] presenta una conformación similar al modelo sin membrana (**Figura Pe**, asa verde); mientras que la estructura del modelo con membrana se asemeja más a la estructura de cristales reportados en PDB como 1OG5 [141]. Dichos cristales muestra un α -hélice en dicha región; y esa parte de la proteína está en interacción directa con la membrana (**Figura Pe**, asa rojo). Así mismo, en la hélice-B (**Figura Pf**) se observa un cambio estructural con la presencia de un giro cerca de su extremo carboxilo en el modelo con membrana. El cambio más destacado ocurre en la hélice-G. El modelo con membrana forma una extensión de la hélice-G en su parte amina, el cual representa un sitio de interacción directa con la membrana; mientras en la parte carboxilo se observa un giro similar al ocurrido con la hélice-B, generando un asa G-H mucho más abierta que la del modelo sin membrana (**Figura Pd**). Además de estas tres regiones con cambio conformacional, se lograron observar 7 sitios con diferencias dinámicas: giro β 1-1 1-2, asa C-D, asa D-3-1, asa F-G, giro β 1-4 2-1, asa K' y el asa cerca de la parte amina de la hélice L a la cual llamaremos asa hemo (**Figura RMSDseg**).



RMSDseg. Gráfico de movimiento y superposición de conformaciones calculadas por los modelos *con membrana* y *sin membrana*. Giro β 1-1 1-2, asa C-D, asa D-3-1, asa F-G, giro β 1-4 2-1, asa K' y el asa hemo. Hélice I (derecha inferior) se muestra como control.

Si se observan las gráficas de RMSD que describen el movimiento de la cadena principal de estas regiones, no se logra apreciar ningún patrón acerca de cuál de los dos modelos, con membrana o sin membrana, tiene mayor movilidad. En cuatro de las siete regiones (giro β 1-1 1-2, asa C-D, giro β 1-4 2-1 y asa hemo) la proteína modelada con membrana (*CYP2C9+Mem*) tiene mayor movilidad (**Figura RMSDseg**). Sin embargo, en los dos sitios donde la movilidad de la proteína (*CYP2C9-Mem*) sin membrana era mayor, la diferencia es demasiada alta (**Figura RMSDseg**); provocando que la medición de la movilidad global de ambas proteínas sea muy similar (**Figura Pc**). La gran magnitud de movimiento del asa K' es

similar en ambos modelos, la diferencia dinámica radica en las posiciones donde ocurren estos movimientos (**Figura RMSDseg**). Además, se muestra la hélice-I como una estructura control en la medición de las diferencias dinámicas de ambos modelos. Esta estructura es sumamente estable y ampliamente conservada en las enzimas CYPs, un valor elevado de RMSD en esta área o una no superposición de ambos modelos nos habrían indicado que el análisis fue incorrecto.

Otro hecho destacable del análisis de las mayores diferencias estructurales la presenta el asa F-G. El asa F-G del modelo sin membrana presenta mayores intervalos de movimiento comparado con el asa F-G del modelo con membrana. Algo que resulta evidente en esta región, es que al interactuar directamente con la membrana su movilidad se ve disminuida; incluso, si se hace una inspección más profunda de este modelo, se puede apreciar que el patrón de movilidad que describe el asa en este modelo, empieza a asemejar a una α -hélice. Lo que da evidencia de la importancia de la membrana en la estructura tridimensional de CYP2C9. En este punto se debe recordar que el cristal a partir del cual se generó el modelo de la proteína no contaba con esta región, y que tuvo que ser modelada por métodos computacionales descritos en la sección de métodos. La no resolución de esta zona en el cristal 1R9O podría hacernos inferir que es una región sumamente dinámica y difícil de cristalizar. Sin embargo, en otros modelos cristalográficos de esta misma enzima, esta región fue resuelta como una α -hélice.

4.3.3 Comparación de la estructura enzimática antes y después del ingreso del sustrato al sitio activo

Tras 100ns de dinámica molecular no se logró observar el ingreso de ningún sustrato al sitio activo de la enzima en el modelo con membrana. Las moléculas de PPC con posiciones iniciales en interacción directa con agua adquirieron posiciones cada vez menos móviles y estables. Esto permite interpretar que estas zonas son sitios de alta afinidad energética y que sería complicado que estas moléculas cambiaran de posición una vez colocadas en esos sitios. Seis de las moléculas de PPC que empezaron la dinámica en posiciones donde interactuaban con el solvente polar fueron encontrando sitios de interacción con la bicapa fosfolipídica; hecho que sugiere una correcta parametrización de PPC y de la bicapa para este modelo. Las cinco moléculas restantes de PPC encontraron sitios de interacción con la enzima fuera del sitio activo (**Figura PPCs**).

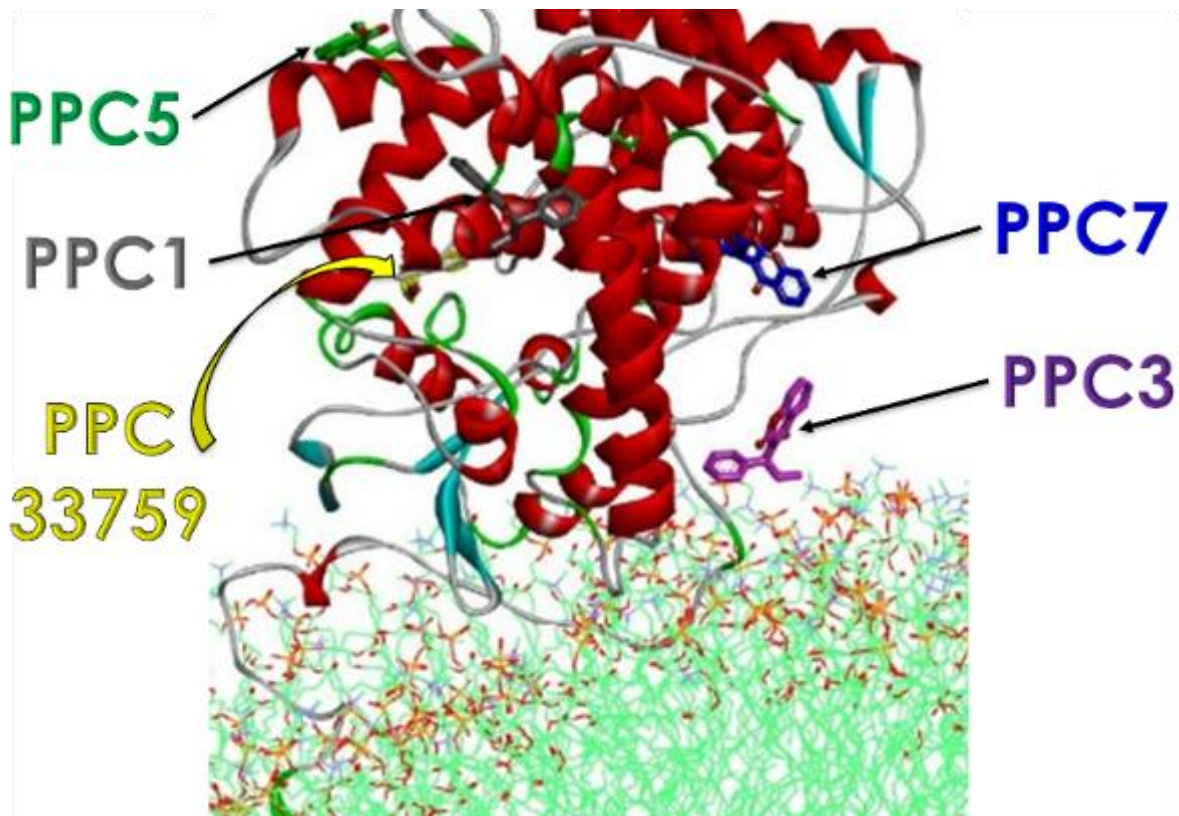


Figura PPCs. CYP2C9 en membrana y con interacción con 5 moléculas de PPC. Se teoriza que las moléculas marcadas como PPC5 y PPC33759 están en interacción con regiones de CYP2C9 que podrían interactuar con CYPOR. PPC1 es la molécula que estuvo muy cerca de interactuar con el asa B-C después de 100ns de DM. PPC7 interactuó por aproximadamente 20 ns con el sitio hipotético de salida de PPC hidroxilado.

Se calculó la energía de interacción (kcal/mol) de estas moléculas con la proteína para tener los parámetros energéticos necesarios para que PPC ingrese al sitio catalítico. La **Figura GrafEn** muestra las energías de interacción promedio a lo largo de toda la dinámica de los cinco PPC con la enzima. Se muestra además el promedio de la energía de interacción de dos moléculas de PPC con la membrana y del sustrato en el sitio activo interactuando con la enzima en el modelo **CYP2C9+PPC**. Debo destacar que el valor de la energía de interacción solo es una medida de comparación energética únicamente para este modelo en particular de dinámica molecular y que no serán los mismos valores que se podrían obtener mediante técnicas computacionales especializadas como acoplamiento molecular.

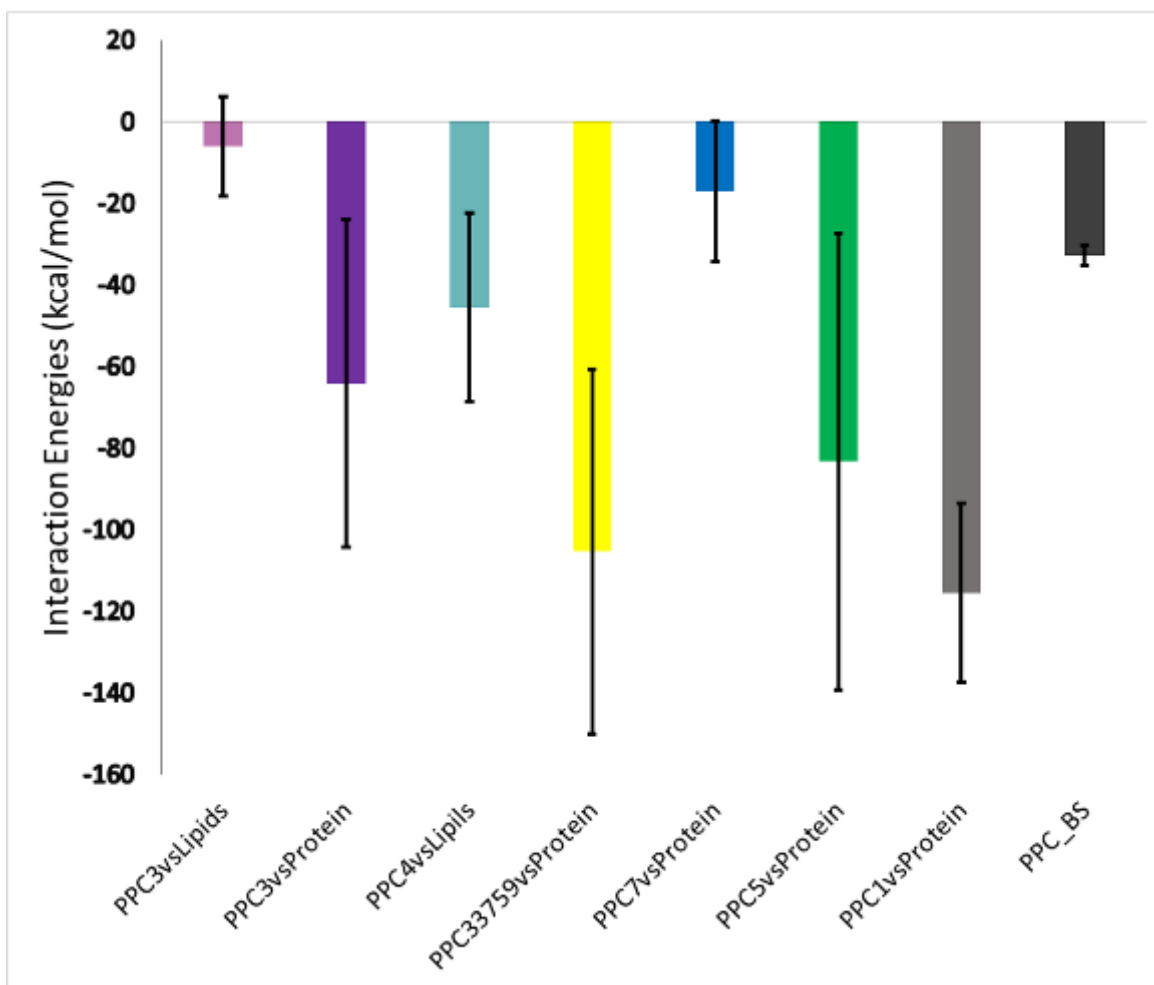


Figura GrafEn. Gráfico de los promedio de energía de interacción durante 100ns de DM con ligandos de referencia. Las barras marcan la desviación estándar. La interacción con PPC_BS corresponde a la interacción enzima sustrato en el modelo **CYP2C9+PPC**.

Como se aprecia en la **Figura GrafEn** la desviación estándar de las energías de interacción de las moléculas de PPC fuera de la enzima son muy amplias. Esto es resulta obvio si se piensa que el movimiento de estas moléculas no está restringido a una parte específica del sistema y que tiene más sitios probables de interacción con la enzima siendo algunos más favorables que otros. La energía de interacción de PPC en el sitio activo resulta ser relativamente constante a lo largo de toda la dinámica; no obstante, la afinidad energética de PPC con la enzima en este sitio resulta ser menor que otros sitios de interacción en la parte externa de la proteína. Este hecho hace preguntarnos acerca de que fenómeno permitiría que PPC pasara de sitios más afines energéticamente fuera de la proteína a uno menos afín como lo es el sitio activo.

El promedio de la energía de interacción de PPC7 (azul) es el único menor al de PPC en el sitio activo. Curiosamente, esta molécula está situada en el sitio donde se teoriza es la salida

del sitio activo. Esto hace sentido si se piensa que la enzima debe expulsar el producto para permitir el ingreso de un nuevo sustrato y continuar el ciclo catalítico. Energías de interacción mayores o cercanas a 0 kcal/mol, es decir energías de repulsión, en esta zona permite que el producto sea liberado.

En este estudio se propusieron tres posibles causas por las que ninguna de las moléculas de PPC haya entrado al sitio activo de la enzima en el modelo con membrana:

- El modelo de mi bicapa de NAMD no es una membrana “tan fluida” como lo propone el modelo de membrana de Singer y Nicolson.
- Los sitios de interacción que se observaron en este modelo no son accesibles para el sustrato en condiciones *in-vivo*. Para el funcionamiento de las enzimas CYP450 es necesario la formación de un complejo con proteínas NADPH transferasas.P450. Los sitios donde en esta simulación interactuaron algunas moléculas de PPC pueden estar siendo ocupadas por interacciones hidrofóbicas con las proteínas transferasas, haciendo imposible que el sustrato se quede “atrapado” en estos sitios.
- NAMD no permite suficiente flexibilidad a proteína. Los algoritmos dinámicos de nuestra herramienta computacional no permite cambios drásticos en las posiciones de los átomos de una proteína impidiendo que se formen canales suficientemente amplios que permitan el ingreso del sustrato al sitio activo.

Este último punto se descartó revisar los resultados del modelo sin membrana. Después de 20ns de dinámica molecular se observó como una molécula ingresaba al vestíbulo del sitio activo de la enzima haciendo posible comparar cambios estructurales de la enzima en la misma línea de tiempo respecto al sustrato (**Figura AD**). El proceso de entrada del sustrato a la proteína duró aproximadamente otros 20ns; así para el 40ns el sustrato PPC ya había entrado al sitio activo de CYP2C9.

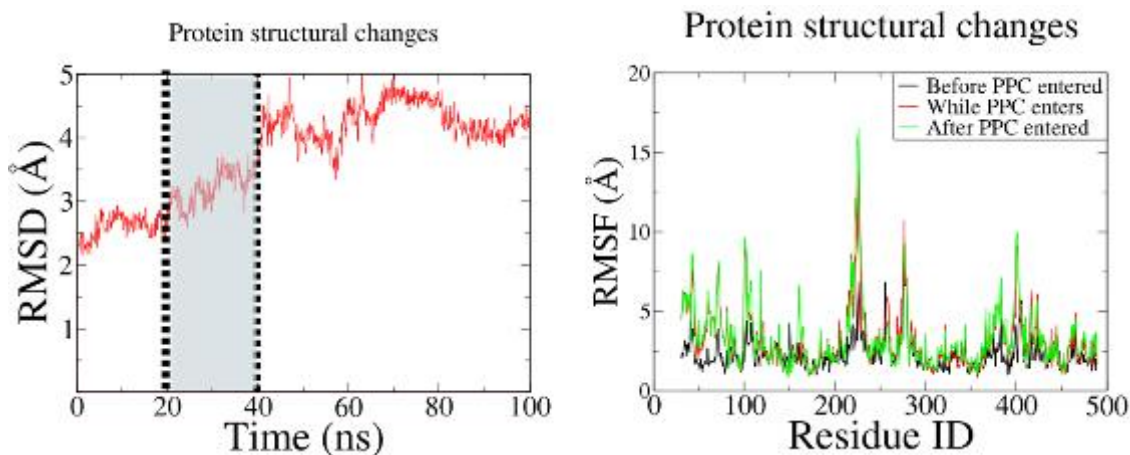


Figura AD. Cálculo de los cambios de movimiento de CYP2C9 cuando PPC entra al vestíbulo del sitio activo. a) cambio de posición respecto al tiempo del modelo sin membrana en referencia a su posición inicial. b) magnitud de movimiento de CYP2C9. *072_CYP2C9-mem*

La **Figura AD** (izquierda) muestra los cambios geométricos de la proteína (RMSD) respecto a la posición inicial de la enzima; es decir, el modelo del cristal con código PDB 1R9O. En ella se aprecia como en el intervalo de tiempo posterior al ingreso del sustrato al sitio activo, el RMSD se estabiliza en valores más altos que los calculados antes de su entrada. Así mismo, la **Figura AD b)** (derecha) muestra los cambios estructurales en distintas regiones de la enzima antes, durante y después PPC ingresa al sitio catalítico. Este modelo tiene un intervalo de movimiento mayor en regiones cercanas al sitio de entrada: asa B-C, asa F-G y el giro- β 1-1 1-2 (alrededor del residuo 70) (**Figura AD**). La región del giro- β 1-1 1-2 mostró diferencias entre los modelos *CYP2C9+PPC* y *CYP2C9-L*, y al encontrar diferencias dinámicas en el ingreso del sustrato a la cavidad resulta ser una región clave en el ingreso del sustrato para esta enzima. Este modelo permite observar diferencias dinámicas y estructurales de la enzima que antes y después de que PPC ingrese a la cavidad; realizando cambios en la estructura de la proteína que permitan el ingreso del sustrato al sitio activo.

Además, se comparó la estructura de la proteína del sistema *CYP2C9-Mem* y el de las enzimas en su forma en complejo y sin complejo (*CYP2C9+PPC* y *CYP2C9-L*). La **Figura RMSDad** muestra el cálculo del RMSD tomando como referencia el promedio de las posiciones de los sistemas *CYP2C9-Mem* y *CYP2C9+PPC* en amarillo y el promedio de las posiciones de los sistemas *CYP2C9-Mem* y *CYP2C9-L* en azul. La grafica muestra que las proteínas de los tres modelos son similares hasta después del nanosegundo 40; es decir, antes del ingreso de PPC al vestíbulo de la enzima. Una vez en el vestíbulo de CYP2C9, las diferencias estructurales de *CYP2C9-Mem* con el sistema *CYP2C9-L* fueron más evidentes. Este resultado evidencia el rearrreglo de las cadenas principales y laterales de CYP2C9 para permitir el ingreso de PPC al sitio catalítico y así llevar a cabo su actividad.

Dynamic differences of CYP2C9-mem

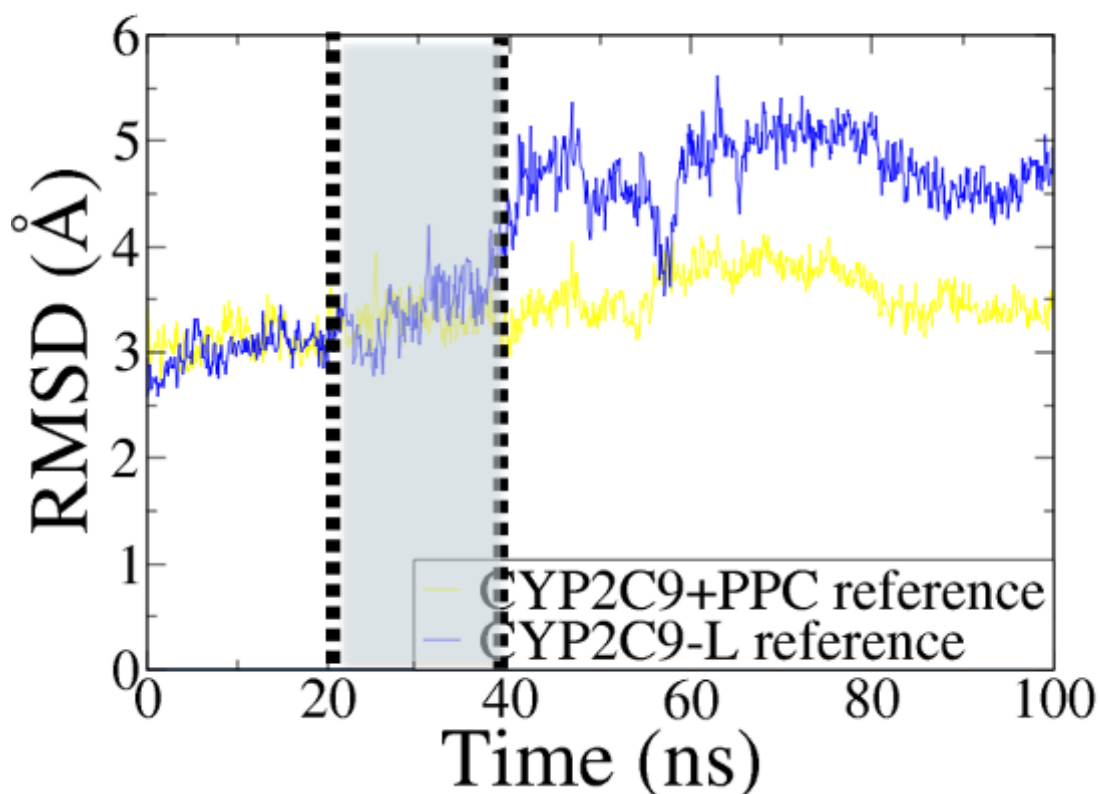


Figura RMSDad. Cálculo de los cambios de diferencias dinámicas de CYP2C9-M respecto **CYP2C9+PPC** en amarillo y **CYP2C9-L** en azul cuando PPC entra al vestíbulo del sitio activo respecto a modelos calculados anteriormente en esta tesis (respecto **CYP2C9-L** en azul y respecto **CYP2C9+PPC** en amarillo)

Este resultado nos permite interpretar que PPC modifica la estructura de CYP2C9, y que debe existir este reajuste de los átomos de la proteína para que el sustrato PPC pueda ingresar a la cavidad de la enzima. El modelo de ajuste inducido ha resultado controversial de medir. Sin embargo, este estudio ofrece evidencias de la actividad de las enzimas CYPs, no solo de lo que ocurre una vez el sustrato está en la cavidad de CYP2C9, si no también, los cambios conformacionales que la enzima debe sufrir para que el sustrato pueda acomodarse en la cavidad.

Debe mencionarse que la molécula de PPC que logró ingresar al sitio catalítico no logró colocarse en geometría de hidroxilación; en una posición similar a la del modelo **CYP2C9+PPC**. Se midió la energía de interacción de esta molécula y la proteína durante toda la DM (**Figura Eentra**). Se descubrió que en ningún momento la molécula de PPC logra tener energías de interacción similares a las que la molécula de PPC tiene con la proteína del modelo **CYP2C9+PPC**. En la región donde quedó atrapado PPC tiene una afinidad mayor a la que podría tener en su cavidad. Se midió un punto cercano al nanosegundo 76 en el que

PPC alcanzó energías de interacción cercanas al modelo **CYP2C9+PPC**. La estructura de la proteína en el nanosegundo 76 se muestra con un rojo claro (o rosa) a la derecha de la **Figura Eentra**. Mientras que la estructura roja saturada muestra la conformación de la proteína en mayor afinidad por PPC. Los aminoácidos señalados en la **Figura Eentra** parecen ser claves en el acomodo del sustrato en la geometría de hidroxilación.

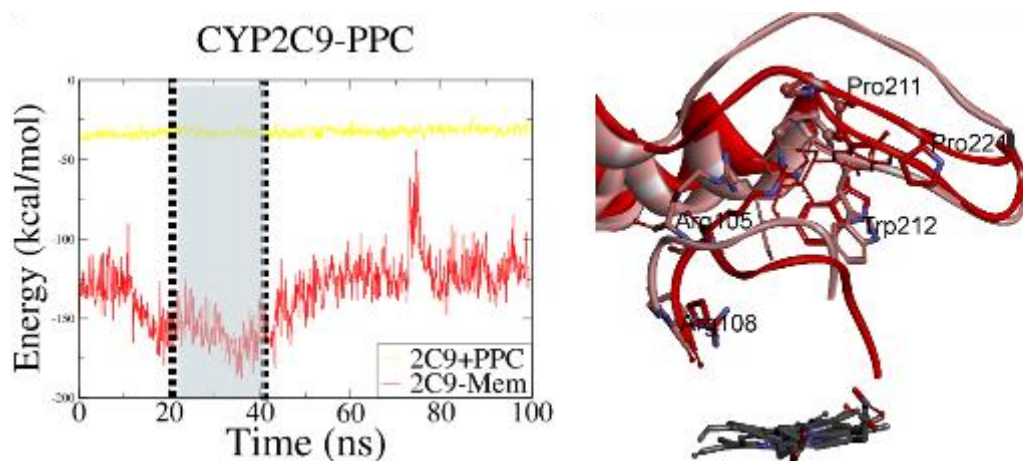


Figura Eentra. Gráfico de la energía de interacción de la molécula de PPC que entró a la cavidad con la enzima CYP2C9 y los cambios conformacionales de la entrada de CYP2C9. En rojo claro la conformación de la proteína con la energía de interacción más baja después de que ingresó PPC y en rojo fuerte la conformación con la energía de interacción más alta.

En la conformación menos afín (76ns) la prolina 221 ya no interactúa con PPC, sugiriendo que permite que el sustrato entre a la cavidad pero que no participa en su acomodo en el sitio activo. El triptófano es un aminoácido poco frecuente en la estructura primaria de las proteínas y frecuentemente encontrado en el sitio activo de muchas enzimas gracias a sus propiedades químicas. La presencia de triptófano en el vestíbulo de las enzimas de la familia CYP2C sugiere que está relacionado de alguna manera con la actividad de estas enzimas. Por último, se encontró que la arginina 105 está interactuando con el sustrato en esta región. Se sabe por modelos cristalográficos de PDB [24] que la arginina 108 interactúa directamente con el sustrato en geometría de hidroxilación en esta enzima. Que estas dos Arg estén tan cercanas una de la otra podría hacernos pensar que realizan una función de reacomodo del sustrato en la cavidad; acercado o acomodando el sustrato a la geometría de hidroxilación.

El modelo presentado fue capaz de evidenciar los cambios estructurales que CYP2C9 debe sufrir para permitir el ingreso de PPC al sitio activo. Sin estos cambios estructurales el ingreso de una molécula del volumen de PPC tiene impedimentos estéricos para posicionarse en el sitio activo. Estas barreras estéricas son superadas gracias a la flexibilidad que estas proteínas poseen.

La **Figura Eentra** muestra el gráfico de la energía de interacción de la molécula de PPC que entró a la cavidad con la enzima CYP2C9 y los cambios conformacionales de la entrada de CYP2C9. En rojo claro la conformación de la proteína con la energía de interacción más baja después de que ingresó PPC y en rojo fuerte la conformación con la energía de interacción más alta. Estos resultados sugieren que existen sitios de interacción de CYP2C9 con PPC energéticamente más afines que el sitio activo. Uno de estos sitios se encuentra justo después de la entrada a la enzima y antes del sitio activo. Un hecho que no debe pasarse por alto es que en presencia de PPC la actividad de CYP2C9 sobre warfarina disminuye; por lo que se ha sugerido que, PPC además de sustrato también puede ser un inhibidor competitivo de esta enzima [161].

Los aminoácidos Trp212, Pro211, Pro221, Arg105 y Arg108 parecen ser fundamentales en el ingreso de PPC al sitio activo de CYP2C9. Estos aminoácidos se encuentran en interacción con PPC en el vestíbulo del sitio activo y cada uno puede cumplir una función específica. Trp es un aminoácido no muy frecuente en la estructura de las proteínas pero está muy relacionado con la actividad de algunas enzimas.

La membrana modifica la estructura de CYP2C9 y por consiguiente también su actividad. Existen regiones de esta enzima que deben tener una forma específica para que puedan llevar a cabo su función. Los trabajos cristalográficos de CYP2C9 presentan inconsistencias entre ellos y esto puede deberse a las técnicas de cristalización y al sustrato que emplean y no hay manera de saber si la estructura resuelta por rayos-x de este citocromo es realmente la forma activa para dicho sustrato.

4.4 PATRONES DE HIDROXILACIÓN DE CYP3A4 Y CYP2C9 SOBRE FENPROCUMÓN

Bajo la hipótesis de que la regio-selectividad del metabolismo por parte de las enzimas CYP están guiadas por la frecuencia en la que un SoM se coloca en geometría de hidroxilación, se midió la distancia entre los carbonos 6, 7 y 8 de PPC y el oxígeno coordinado con el hierro del grupo hemo de CYP3A4 a lo largo de toda la dinámica. Para CYP2C9 también se midió la distancia del oxígeno coordinado con el hierro del grupo hemo y los carbonos 2', 3' y 4'. Como ya se ha mencionado en la parte de metodología, las coordenadas de ambos sistemas fueron calculadas a partir de un docking ciego debido a que no existen estructuras cristalográficas de PPC con ningún CYP. La energía de interacción entre PPC y ambos CYPs es similar (-9.3 Kcal/mol con CYP3A4 y -9.5 Kcal/mol con **CYP2C9+PPC**). También se debe recordar que uno de los objetivos de esta tesis es modelar la geometría que CYP2C9 debe obtener para lograr la producción de 2'-OH-PPC; por tal motivo, se escogió esa conformación inicial. La **Figura 3A42C9+PPC** muestra las coordenadas iniciales de los sistemas

CYP3A4+PPC y **CYP2C9+PPC** y las interacciones no covalentes enzima-sustrato entre PPC y su respectiva enzima.

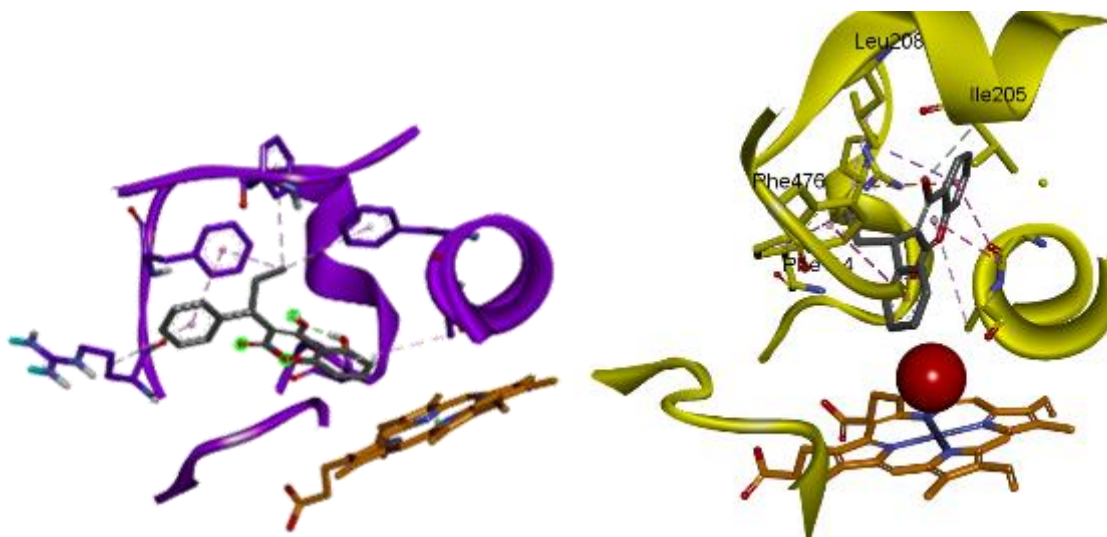


Figura 3A42C9+PPC. Coordenadas iniciales de los sistemas **CYP3A4+PPC** (-9.3 Kcal/mol) y **CYP2C9+PPC** (-9.5 Kcal/mol). En morado la estructura proteica, en gris PPC, las líneas punteadas representan interacciones intermoleculares, en naranja el grupo Hemo y la esfera roja oxígeno.

Se logró medir la distancia entre los SoMs de PPC y el oxígeno coordinado con el grupo hemo. A diferencia de los cálculos reportados en [49], en este estudio no se observaron cambios drásticos de posición del sustrato dentro de la cavidad de ninguno de los dos sistemas CYPs. En el sistema **CYP3A4+PPC** (**Figura 3A42C9+PPC**) se colocó inicialmente el estructura cumarínica de PPC en geometría de hidroxilación, y a lo largo de 100 ns de DM, el grupo fenil de PPC jamás alcanzó una geometría correcta de hidroxilación. Lo mismo ocurrió en el sistema **CYP2C9+PPC** (**Figura 3A42C9+PPC**), donde en las coordenadas iniciales el grupo fenil estaba orientado para su hidroxilación; el estructura cumarínica de PPC no logró una correcta geometría de hidroxilación para este sistema. En el caso del sistema **CYP3A4+PPC**, la frecuencia con la que un SoM se coloca a distancia de hidroxilación se relaciona con los valores experimentales de actividad observados por parte de CYP3A4 [33]. Los carbonos 7 y 6 son preferidos sobre el carbono 8 para su hidroxilación por parte de CYP3A4. En la **Figura Dist3A4** se aprecia como los C6 y C7 de PPC se colocan con más frecuencia que el C8 en un radio (3.5 Å) para su hidroxilación. Se han reportado metabolitos 8-OH-PPC producido por CYP2C9 de forma experimental. En el sistema **CYP3A4+PPC**, el C8 permanece la mayor parte de la simulación alejado del oxígeno coordinado al hemo; sin embargo, si se lograron observar periodos de tiempo en el que este carbono se coloca a distancia de hidroxilación.

Distancia C-O CYP3A4

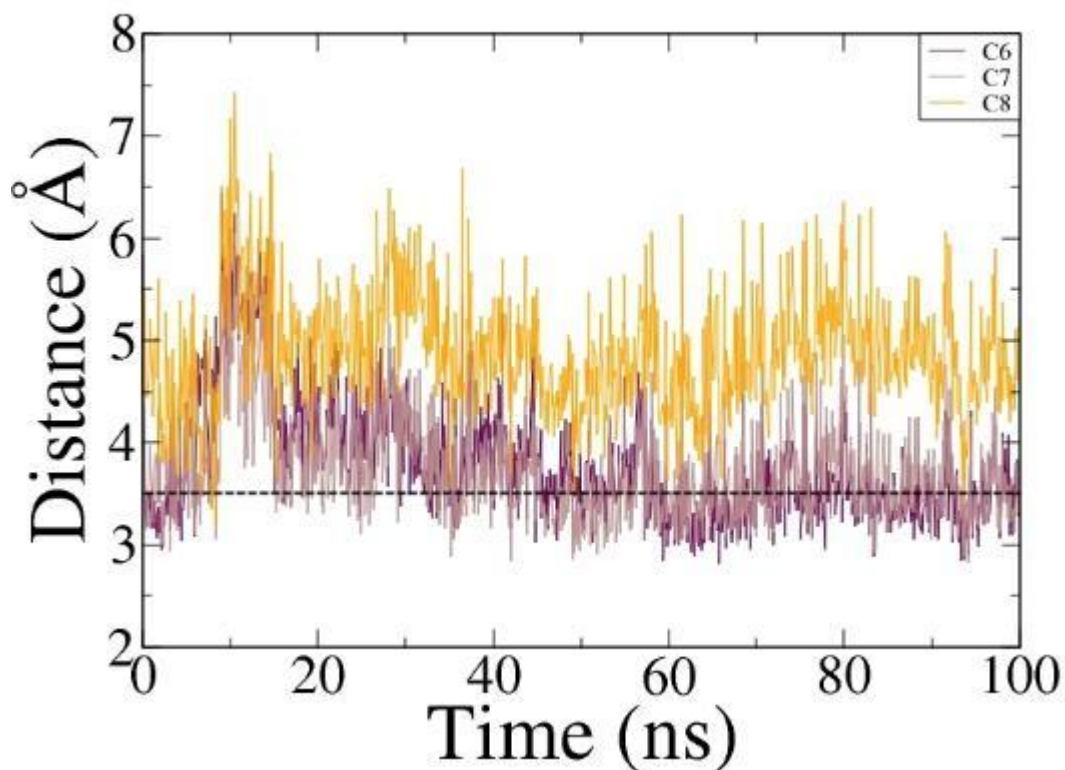


Figura Dist3A4. Cálculo de la distancia entre los carbonos de PPC y el oxígeno coordinado del grupo Hemo. Carbono 6 (C6) en morado, Carbono 7 (C7) en gris y carbono 8 (C8) en amarillo, la línea punteada indica la distancia de 3.5 Å a la cual se lleva a cabo la hidroxilación. Se aprecia que el C6 y C7 son los que frecuentemente rebasan la marca de 3.5 Å.

En el caso del sistema **CYP2C9+PPC** el carbono 4' fue el carbono más próximo al oxígeno del grupo hemo la mayor parte del tiempo de cálculo. De forma similar al C8 del sistema **CYP3A4+PPC**, el C2' tuvo cortos periodos de tiempo en los que estuvo a un correcto radio de hidroxilación (**Figura Dist2C9**). Debe destacarse que hasta la fecha no se ha reportado la producción de 3'-OH-PPC por parte de ningún CYP, y si la de 2'-OH-PPC. Los cálculos de este experimento muestran que el C3' tiene más probabilidades de colocarse a un radio correcto de hidroxilación que el C2'.

Distancia C-O CYP2C9

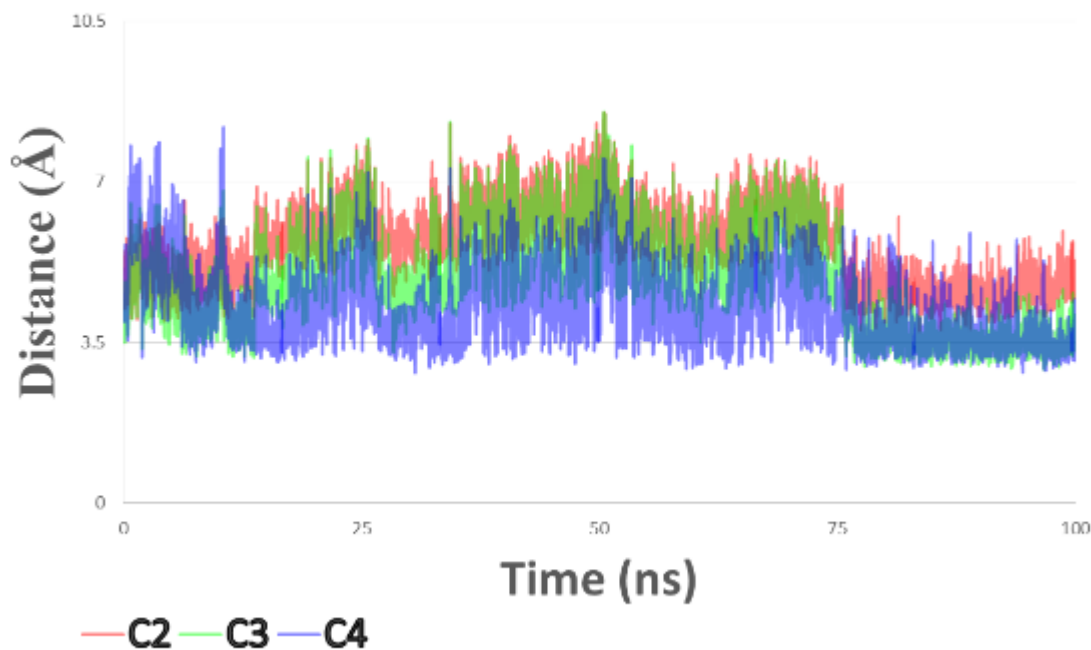


Figura Dist2C9. Cálculo de la distancia entre los carbonos de PPC y el oxígeno coordinado del grupo Hemo. Carbono 2 (C2) en rojo, Carbono 3 (C3) en verde y carbono 4 (C4) en azul. Sólo en pocos marcos se coloca el C2 en posición de hidroxilación

En los sistemas estudiados por DM que presentaban un sustrato en el sitio activo se observó que el sustrato mantenía la interacción con los mismos aminoácidos del sitio activo y por consiguiente no hubo cambios conformacionales drásticos. Estos resultados sugieren que la regio-selectividad también está guiada por la frecuencia o probabilidad de que un SoM pueda colocarse en una correcta posición para su hidroxilación (preferencias de C-7 sobre C-6 en PPC). Además, cambios y rotaciones del sustrato dentro de la cavidad de un CYP son poco probables. Si bien existe el suficiente espacio para que pudieran darse cambios de posición del sustrato en la cavidad de los CYPs, las interacciones intermoleculares entre la enzima y su sustrato estabilizan energéticamente el complejo CYP-sustrato impidiendo dichos movimientos. Por lo tanto, la forma en la que ingresa PPC a la cavidad de los CYPs es determinante para su regio-selectividad. Si el cuerpo cumarínico ingresa primero a la cavidad los carbonos 7 y 6 son los carbonos que serán hidroxilados en lugar del carbono 4'. En cambio, si se trata de que es el grupo fenil de PPC el que ingresa primero, la hidroxilación en los carbonos 7, 6 u 8 es muy improbable; convirtiendo a los carbono 4', 2' o incluso 10 a los SoMs con mayores probabilidades de su hidroxilación. Un hecho que no debe

menospreciarse es que el C3' de PPC está más cerca del oxígeno del hemo que el C2'. Lo que sugeriría que el C3' tendría que ser hidroxilado antes que el C2'; este hecho no ha sido observado de forma experimental.

Cabe esperar que en los sistemas CYP-sustrato con energías de interacción más afines o similares a CYP2C9-PPC y CYP3A4-RIT se observasen interacciones y movimientos en el complejo similares. La **Tabla CYPsL** muestra la energía de interacción entre CYPs y ligandos reportados en la base de datos PDB [129]. Los cálculos de esta tabla fueron realizados con el programa Yeti sobre el modelo original reportado en PDB con excepción de los tres primeros cálculos que fueron realizados sobre nuestros propios modelos al inicio de la DM (posiciones iniciales).

Tabla CYPsL. Energías de interacción de modelos CYPs reportados en PDB con los ligandos con los que fueron cristalizados.

Código PDB	CYP	Mutaciones en el cristal	Código del ligando	Peso molecular del ligando (g/mol)	Energía de interacción (Kcal/mol)
Modelo	2C9	I490V	PPC	280.32	-9.5
Modelo	3A4		PPC	280.32	-9.3
Modelo	3A4		RIT	720.94	-19.96
3V8D	7A1	T104L	OGV	400.64	12.18
3SN5	7A1	T104L	K2B	384.64	7.64
3E4E	2E1!		4PZ	82.1	5.95
3E6I	2E1!		LZ1	118.14	5.33
4GL7	19A1		OXJ	366.49	4.49
3MDM	46A1		FJZ	292.44	4.02
3SWZ	17A1		TOK	388.55	3.08
4K9U	3A4		5AW	552.75	2.59
3JUS	51A1		ECL	381.68	1.48
4I4H	3A4		Z9Z	698.92	0.94
4J14	46A1		X2N	700.78	0.19
2Q9F	46A1		C3S	466.72	0.00
3MDR	46A1		GJZ	133.19	-0.82
3QOA	2B6	Y226H, K262R	3QO	169.22	-1.06
3B6H	8A1		MXD	209.25	-1.86
3UA5	2B6	Y226H/K262R	06X	408.88	-2.07
3B6H	8A1		MXD	209.25	-3.46
4EJH	2A13		0QA	207.23	-3.86
3IBD	2B6	Y226H, K262R	CPZ	178.62	-5.13
4EJJ	2A6		NCT	162.23	-5.56

3MDV	46A1		CL6	344.84	-5.56
3LC4	2E1!		LC4	266.38	-5.63
2FDU	2A6		D1G	202.25	-6.01
1Z11	2A6		8MO	216.19	-6.33
3C6G	2R1		VD3	384.64	-6.35
4KQ8	19A1		ASD	286.41	-6.83
2NNJ	2C8		"225	384.25	-6.86
4J14	46A1		X2N	700.78	-7.03
3S7S	19A1		EXM	296.4	-7.42
3TJS	3A4		DOR	579.8	-7.51
2FDY	2A6		D4G	220.31	-7.53
4EJG	2A13		NCT	162.23	-7.74
2FDW	2A6		D3G	174.2	-7.86
4ENH	46A1		FVX	318.34	-7.86
4K9X	3A4		8AW	493.66	-7.98
3T3R	2A6	Y392F	9PL	208.26	-8.16
4FDH	11B2		OT3	223.27	-8.49
2P85	2A13	V23M/W24A/R25K/Q26K/R27T/K28S/R30K	IND	117.15	-8.84
4GL5	19A1		G29	352.47	-8.98
4EJI	2A6		OQA	207.23	-9.00
3T3Z	2E1!		9PL	208.26	-9.08
3MDT	46A1		VOR	349.31	-9.44
3V8D	7A1	T104L	OGV	400.64	-9.49
3EBS	2A6	I208S/I300F/G301A/S369G	N4E	179.22	-9.51
2FDV	2A6		D2G	188.23	-9.97
3RUK	17A1		AER	349.51	-9.99
1Z10	2A6		COU	146.14	-10.68
4GQS	2C19		OXV	280.32	-11.21
4I91	2B6	Y226H, K262R	TMH	136.23	-11.40
3PM0	1B1	A119S	BHF	272.30	-11.61
3QM4	2D6		PN0	423.51	-11.81
3T3S	2A13		9PL	208.26	-12.18
3TDA	2D6		PN0	423.51	-12.28
2HI4	1A2		BHF	272.30	-12.32
4I8V	1A1		BHF	272.30	-12.61
3N9Y	11A1		CLR	386.65	-13.19
2J0D	3A4		ERY	733.93	-13.47
3LD6	51A1		KKK	531.43	-13.51
3KOH	2E1!		OIO	210.27	-14.25
2NNH	2C8		REA	300.44	-14.28
3NA0	11A1		2DC	418.65	-14.42
4FIA	46A1		OU9	430.37	-14.61

4DVQ	11B2		1CA	330.46	-14.72
3TBG	2D6		RTZ	370.58	-15.59
4K9T	3A4		1RD	524.7	-16.38
3S79	19A1		ASD	286.41	-17.46
3GPH	2E1!		OID	238.33	-18.25
4K9V	3A4		6AW	568.75	-18.38
1OG5	2C9	K206E/I216V/C217Y/S220P/P221A/I222L/I223L/	SWF	308.33	-18.59
2V0M	3A4		KLN	531.43	-18.98
2NNI	2C8		MKT	586.18	-19.07
4K9W	3A4		7AW	656.9	-19.08
3CZH	2R1		D2V	396.65	-19.17
3NXU	3A4		RIT	720.94	-19.50
3UA1	3A4		08Y	654.59	-20.05
3SN5	7A1	T104L	K2B	384.64	-20.12
3N9Z	11A1		HC9	402.65	-20.12
3NA1	11A1		HCD	402.65	-22.03
2Q9F	46A1		C3S	466.72	-22.11
2VN0	2C8		TDZ	441.54	-22.53
4I4G	3A4		Z8Z	688.88	-23.10
3DL9	2R1		V2H	412.65	-23.39
1R9O	2C9	I490V	FLP	244.26	-30.44

5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La serie de cálculos efectuados en este trabajo comprobó y reafirmó los aspectos más relevantes en la actividad de los citocromos P450. El efecto que otras moléculas tienen sobre la estructura y actividad de CYP2C9 y CYP3A4 fue comprobada. La interacción con distintos sustratos provocan cambios estructurales diferentes en los CYPs; lo que pone de manifiesto el efecto del ajuste inducido en su actividad. La enzima CYP3A4 mostró diferencias estructurales en presencia de RIT, PPC o en su forma si sustrato. Aun que CYP2C9 tiene características estructurales más rígidas que CYP3A4, también presentó diferencias estructurales en presencia y ausencia de PPC. El efecto de la membrana sobre la estructura y actividad de CYP2C9 también quedó de manifiesto por los cálculos de dinámica molecular.

En el presente estudio de acoplamiento, las posturas de Autodock fueron refinadas por Yeti y ambas fueron validadas mediante auto-acoplamiento hasta ahora conocidos complejos de cristales ligados de enzimas. PPC y WFN como ligandos se acoplaron con éxito en CYP2C9 y CYP3A4. El acoplamiento proporciona información sobre la naturaleza estérica de las fuerzas impulsoras para el reconocimiento del sustrato. Las poses acopladas simularon un complejo de coordinación ternario (hierro (IV) - oxígeno activado - átomo de carbono híbrido sp³). Los resultados de acoplamiento podrían reproducir los metabolitos de

hidroxilación de PPC determinados experimentalmente. Las estructuras de cuatro metabolitos ya habían sido identificadas por picos en espectrometría de masas (6-OH-PPC, 7-OH-PPC, 2'-OH-PPC y 4'-OH-PPC). Los choques estéricos de uno de los cinco metabolitos (2'-OH-PPC) reflejaron el ajuste inducido que se simuló utilizando una biblioteca empírica de rotámeros para encontrar conformaciones de cadena lateral observadas para Val113, Leu365 y Thr301. Además, la mecánica cuántica calculó movimientos geométricos y electrónicos sutiles para describir la coordenada de reacción con la geometría del estado de transición del complejo ligando-hemo. Nuestros resultados están en línea con las regioselectividades reportadas. A pesar de que sería imposible generalizar sobre el tema, el logro técnico para el campo del modelado molecular del metabolismo del sustrato enzimático se vuelve obvio: los algoritmos de acoplamiento de ligandos y receptores (cálculos avanzados del campo de fuerza) pueden reproducir la unión del sustrato a la enzima objetivo a pesar del catalizador de múltiples etapas ciclo.

De forma cuantitativa se midió el efecto de las posiciones atómicas iniciales en los trabajos de MD. Lo que remarca la especial atención al similar la actividad de las enzimas CYPs. Esto fue posible gracias al desarrollo de una fórmula que ayuda a diferencias entre diferencias estructurales y dinámicas en estructuras proteicas sometidas a cálculos de DM. Al comparar las trayectorias de los sistemas que comparten RIT y aquellos que no lo hacen, podemos observar que no hay una superposición clara de los átomos de la cadena principal. Las condiciones de las estructuras iniciales influyen en los resultados de MD. Las condiciones térmicas y barométricas en el momento de cristalizar una proteína son diferentes de las fisiológicas. Esto puede provocar cambios en la geometría tridimensional de los CYP. Esto explicaría la estructura tridimensional que CYP3A4 adquirió en el cristal con el código 1TQN en el momento de su cristalización. Los resultados fomentan la conciencia de ajuste inducido, ya que se encontró que se ha citado con frecuencia en el cuerpo de la literatura existente, pero se describe pobremente en una escala atómica.

El ajuste inducido entre el fármaco y las enzimas del citocromo P450 (CYP) que conduce a reordenamientos espaciales en los sitios del ligando y el receptor se estudió mediante simulaciones por computadora y los resultados se compararon con la evidencia publicada. Se reunieron estructuras cristalinas de pares de complejos ligandos/no ligados conocidos y simulaciones de MD. MD proporcionó una visión detallada del modelo de los cambios geométricos para las proteínas CYP3A4 ligadas y no ligadas. No parece exagerado suponer que los cambios conformacionales por MD imitan las interacciones moleculares inducidas que ocurren naturalmente, que a su vez se han documentado solo en casos raros por pares de estructuras cristalinas ligadas/no ligadas. En todos los demás casos, al menos en términos teóricos, el acoplamiento y MD estiman los cambios necesarios para el reconocimiento del sustrato y las regioselectividades. Los resultados fomentan el

conocimiento del ajuste inducido, ya que se encontró que se ha citado con frecuencia en el cuerpo de la literatura existente pero está mal descrito a escala atómica.

Los patrones de hidroxilación de las enzimas CYP3A4 y CYP2C9 sobre PPC fueron simulados parcialmente. Al dividir a PPC en dos partes, la parte del cuerpo cumarínico y el extremo del grupo fenil, se logró correlacionar y explicar las preferencias de la producción de los distintos metabolitos de PPC en estas dos partes de PPC; siendo el C4' el SoM preferido del grupo fenil y los C7 y 6 del estructura cumarínica de PPC. Este estudio también explica la importancia de las partes en contacto con el solvente de estas enzimas hepáticas. La interacción entre el sustrato y la enzima guía el ingreso del sustrato a la cavidad de los CYPs; y dependiendo de la orientación del sustrato al momento de ingresar algunos SoMs serán hidroxilados. Una vez formado el complejo CYP-sustrato, este ya no sufrirá mayores cambios estructurales debido a las interacciones intermoleculares entre el CYP y su sustrato. El ingreso de ritonavir al sitio activo de CYP3A4 provoca que CYP3A4 tenga menor movimiento. Lo mismo ocurrió con los modelos de CYP3A4 y CYP2C9 con PPC. Las interacciones inter moleculares entre PPC y sus enzimas explicarían por qué el complejo enzima-sustrato se mueve menos que la enzima sin sustrato. Al verse restringido el movimiento del complejo enzima-sustrato, es necesario conocer como ingresa el sustrato a la los CYPs para saber los patrones de hidroxilación. El sustrato ritonavir si tiene efecto sobre la dinámica de los modelos 1TQN y 3NXU haciendo que los átomos de las proteínas del sitio activo se muevan menos.

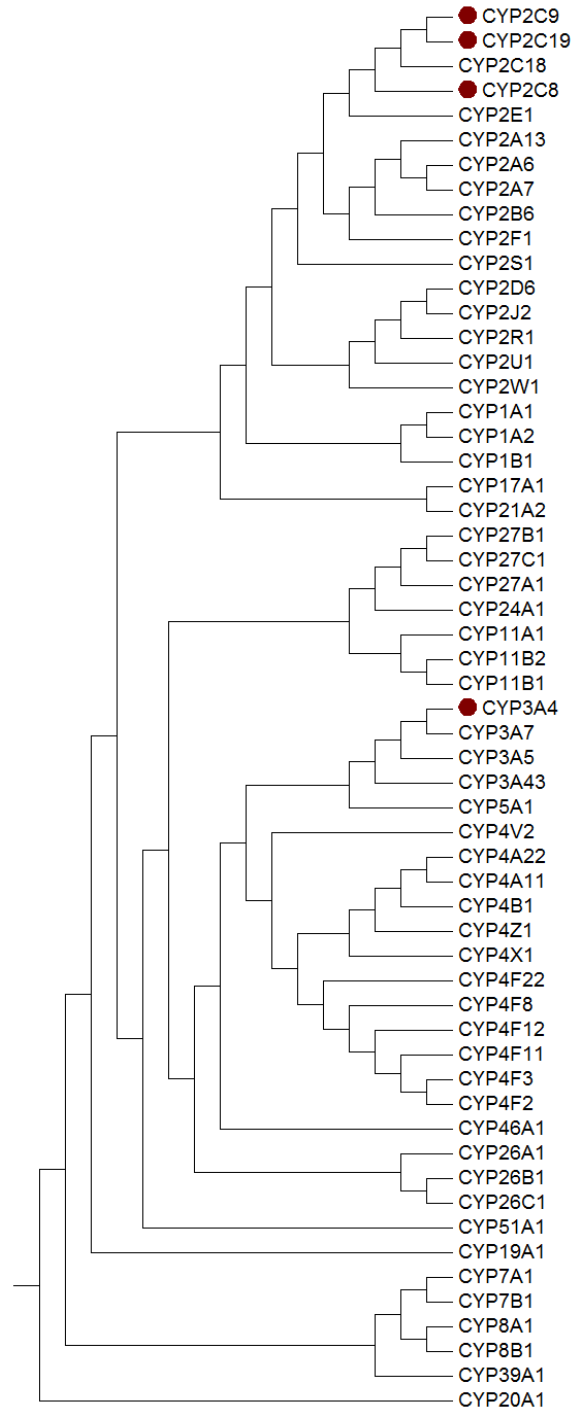
CYP2C9 no es tan flexible como CYP3A4 (con y sin sustrato se mueve en la misma proporción); sin embargo, también hay diferencias geométricas entre la forma en complejo y sin sustrato. El asa en el sitio activo de CYP3A4 probablemente es la causa por la cual es capaz de metabolizar una mayor cantidad de sustratos que otros CYPs (**Figura Supermov**). Se puede hablar de ajuste inducido por parte de CYP3A4; sin embargo, en CYP2C9 las mayores diferencias geométricas entre las formas con y sin sustrato no se encuentran en su sitio activo. La estructura y dinámica de CYP2C9 es modificada por la membrana y por tanto también su actividad en este modelo. Se identificaron las regiones que sufren cambios estructurales en CYP2C9 en presencia de la membrana. Las regiones cercanas al sitio de entrada del sustrato son las regiones principales en sufrir dichos cambios. El asa B-C y asa F-G son las estructuras que sufren los cambios más drásticos, guiando así el ajuste inducido de las enzimas hepáticas (**Figura AD**). El giro beta 1-1 1-2 es otra región que guía el ajuste inducido. Se observó los grandes cambios estructurales que CYP2C9 debe sufrir para que PPC ingrese al sitio activo. Además, se identificaron los aminoácidos que pueden participar el movimiento del sustrato desde el vestíbulo del sitio activo hasta el sitio activo. Los aminoácidos Trp212, Pro211, Pro221, Arg105 y Arg108 parecen ser fundamentales en el ingreso de PPC al sitio activo de CYP2C9. La región del 227 es por donde entra; por eso en

sistema donde entro (*CYP2C9-Mem*) es el que más RMSF tiene. Los sistemas donde no entró tiene un RMSF similar (**Figura P y Figura RMSD2C9** *CYP2C9-L* y *CYP2C9+Mem*). Pero en el sistema que ya tenía a su PPC en el BS el RMSF de esa zona es el más bajo. Una vez se forma el complejo E-S la enzima se estabiliza en esa región deja de ser flexible impidiendo que ingrese otro sustrato. En el cristal 1R9O se observan dos ligandos en el BS (glicerol y FLP) sin embargo GOL no es lo suficientemente grande para estabilizar a la enzima y si entró antes que FLP (lo cual tiene sentido ya que se observa más alejado del sitio de entrada) pudo haber dejado la oportunidad de que entrara otro ligando.

Se encontró que la energía de interacción de PPC y CYP2C9 energéticamente más favorable no se encuentra en el sitio activo; y que de hecho, zonas fuera de la proteína y el vestíbulo de la proteína son energéticamente más favorables para el acoplamiento del sustrato PPC en CYP2C9. PPC debe vencer o evitar barreras energéticas generadas por la estructura de CYP2C9 para llegar al sitio activo. El modelo presentado todavía no es capaz de simular la cinética enzimática reportada de forma experimental.

6 SUPLEMENTOS

6.1 Árbol filogenético de los CYPs humanos



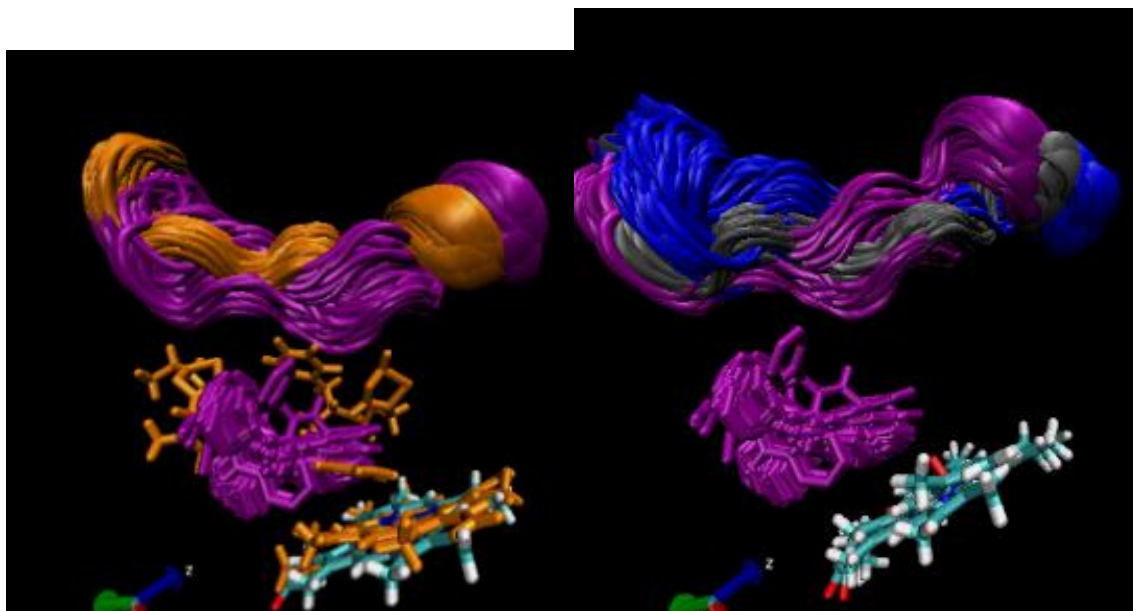
Árbol filogenético resultante del alineamiento múltiple de secuencias de los CYPs humanos. Las enzimas capaces de metabolizar a PPC están marcadas con un círculo rojo. Las familias están correctamente agrupadas en clados.

6.2 Redimiendo de producción de metabolitos de WFN y PPC

El redimiendo de producción se tomó como la división de V_{max} ($\mu\text{mol/nmolcyp450}\cdot\text{min}$) sobre KM (μM) los datos experimentales se extrajeron de [46] y [33]. La X marca que existe metabolismo en cantidades muy bajas

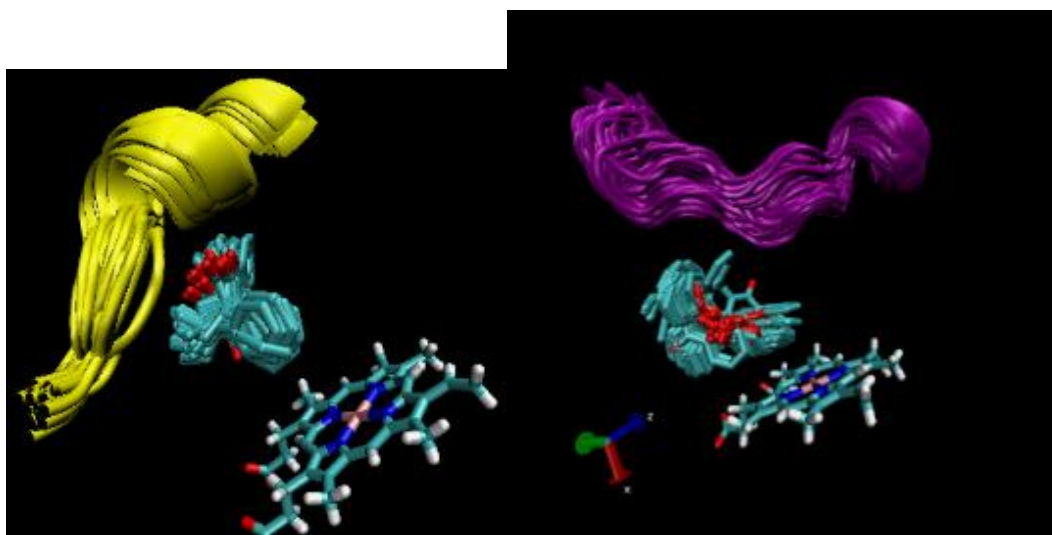
S-PPC	2C8	2C9	2C19	3A4	2C8	2C9	2C19	3A4
4'-OH	7.14	8.09	0.12	2.18	58.05%	66%	1%	18%
6-OH	0	3.25	0.31	0.65	0.00%	26%	3%	5%
7-OH	0	12.3	4.78	3.82	0.00%	100%	39%	31%
R-PPC	2C8	2C9	2C19	3A4	2C8	2C9	2C19	3A4
4'-OH	0	2.61	0.11	1.27	0.00%	21%	1%	10%
6-OH	0	2.05	0.96	0.22	0.00%	17%	8%	2%
7-OH	0	1.22	3.3	0.71	0.00%	10%	27%	6%
S-WFN	2C8	2C9	2C19	3A4	2C8	2C9	2C19	3A4
4'-OH	X	0	X	0	1%	0%	1%	0%
6-OH	0	30.5	0	0	0%	29%	0%	0%
7-OH	0	105.25	0	0	0%	100%	0%	0%
8-OH	0	0	0	0	0%	0%	0%	0%
R-WFN	2C8	2C9	2C19	3A4	2C8	2C9	2C19	3A4
4'-OH	0	0.010534 65	0	0	0%	1%	0%	0%
6-OH	0	0	0	0	0%	0%	0%	0%
7-OH	X	0	0	0	1%	0%	0%	0%
8-OH	0	0	45.75	87.5	0%	0%	43%	83%

6.3 Comparación intervalos de movimiento CYP3A4 en modelos de estudio



1TQN+RIT
1TQN-L(org)
1TQN+PPC

3NXU+RIT(org)
(0.6)
1TQN+PPC
(1.370)



6.4 Campos de fuerza utilizados

AutoDock Force Field

$$= W_{\text{vdw}}(\text{vdW}) + W_{\text{hb}}(\text{Hbond}) + W_{\text{elec}}(\text{elec}) \\ + W_{\text{sol}}(\text{desolv}) + W_{\text{tor}}(\text{torsDoF})$$

Yeti Force Field

Directional force field – software Quasar, Raptor, Yeti, Bio, PrGen

$$E_{\text{total}} = \sum_{\text{bonds}} K_r (r - r_{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_{\text{eq}})^2 + \\ \sum_{\text{dihedrals}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{\text{nb pairs}} \frac{q_i \cdot q_j}{4\pi\epsilon_0 D(r) r_{ij}} + \sum_{\text{nb pairs}} \frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{B}{r_{ij}^6} \\ + \sum_{\text{H-bonds}} \left(\frac{C}{r_{\text{H-Acc}}^{12}} - \frac{D}{r_{\text{H-Acc}}^{10}} \right) \cdot \cos^2(\theta_{\text{Don-H-Acc}}) \cdot \cos^n(\omega_{\text{H-Lig-LP}}) \\ + \sum_{\text{metal-ligand pairs}} \frac{q_i^{\text{CT}} \cdot q_j^{\text{CT}}}{4\pi\epsilon_0 D(r) r_{ij}} + \sum_{\text{metal-ligand pairs}} \left(\frac{E}{r_{\text{M-Lig}}^{12}} - \frac{F}{r_{\text{M-Lig}}^{10}} \right) \\ + (E_{\text{MC}} + E_{\text{LFS}}) \cdot \prod_{\text{indep. angles}} \cos^2(\psi_{\text{Lig-M-Lig}} - \psi_{\text{eq}}) \cdot \frac{1}{n} \sum_{\text{1st shell ligands}} \cos^n(\omega_{\text{M-Lig-LP}})$$

Biographics Laboratory 3R

CHARMM Force Field

$$U(R) = \sum_{\text{bonds}} k_r (r - r_{\text{eq}})^2 \quad \text{bond} \quad \text{---}$$

$$+ \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_{\text{eq}})^2 \quad \text{angle} \quad \text{---}$$

$$+ \sum_{\text{dihedrals}} k_\phi (1 + \cos[n\phi - \gamma]) \quad \text{dihedral} \quad \text{---}$$

$$+ \sum_{\text{impropers}} k_\omega (\omega - \omega_{\text{eq}})^2 \quad \text{improper} \quad \text{---}$$

$$+ \sum_{i < j}^{\text{atoms}} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad \text{van der Waals} \quad \text{---}$$

$$+ \sum_{i < j}^{\text{atoms}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad \text{electrostatic} \quad \text{---}$$

7 REFERENCIAS

- [1] F. J. Gonzalez and R. H. Tukey, "Drug metabolism," in *Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11 ed., New York, McGraw-Hill, 2006, pp. 71-91.
- [2] P. Danielson, "The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug," *Current Drug Metabolism*, vol. 3, no. 6, pp. 561-597, 2002.
- [3] D. R. Nelson, "The cytochrome p450 homepage," *Human genomics*, vol. 4, no. 1, pp. 59-65, 2009.
- [4] P. R. Ortiz de Montellano, "Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes," *Chemical reviews*, vol. 110, no. 2, pp. 932-948, 2010.
- [5] D. Korolev, K. V. Balakin, Y. Nikolsky, E. Kirillov, Y. A. Ivanenkov, N. P. Savchuk and T. Nikolskaya, "Modeling of human cytochrome P450-mediated drug metabolism using unsupervised machine learning approach," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 46, no. 17, pp. 3631-3643, 2003.
- [6] J. Zaretski, C. Bergeron, P. Rydberg, T. W. Huang, K. P. Bennett and C. M. Breneman, "RS-Predictor: A new tool for predicting sites of cytochrome P450-mediated metabolism applied to CYP 3A4," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 51, no. 7, pp. 1667-1689, 2011.
- [7] L. Gan, L. L. von Moltke, L. A. Trepanier, J. S. Harmatz and D. J. Greenblatt, "Role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome-b5/NADH-b5 reductase in variability of CYP3A activity in human liver microsomes," *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 37, no. 1, pp. 90-96, 2009.
- [8] C. Handschin and U. A. Meyer, "Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors," *Pharmacological reviews*, vol. 55, no. 4, pp. 649-673, 2003.
- [9] A. M. McDonnell and C. H. Dang, "Basic review of the cytochrome p450 system," *Journal of the advanced practitioner in oncology*, vol. 4, no. 4, p. 263, 2013.
- [10] Ł. Gricman, C. Vogel and J. Pleiss, "Conservation analysis of class-specific positions in cytochrome P450 monooxygenases: Functional and structural relevance," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 82, no. 3, pp. 491-504, 2014.

- [11] X. He and P. R. Ortiz de Montellano, "Radical rebound mechanism in cytochrome P-450-catalyzed hydroxylation of the multifaceted radical clocks α - and β -thujone," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 38, pp. 39479-39484, 2004.
- [12] A. E. Shilov and G. B. Shul'pin, "Activation of CH bonds by metal complexes," *Chemical Reviews*, vol. 97, no. 8, pp. 2879-2932, 1997.
- [13] F. P. Guengerich, "Cytochrome p450 and chemical toxicology," *Chemical research in toxicology*, vol. 21, no. 1, pp. 70-83, 2007.
- [14] J. W. Daly, D. M. Jerina and B. Witkop, "Arene oxides and the NIH shift: the metabolism, toxicity and carcinogenicity of aromatic compounds," *Experientia*, vol. 28, no. 10, pp. 1129-1149, 1972.
- [15] H. Becker, *Organikum: organisch-chemisches Grundpraktikum*, Berlin: Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1967.
- [16] T. Scior, I. Quiroga and B. Kammerer, "Inquiry of literature evidence for induced fit and regioselectivity of cytochrome P450 enzyme CYP2C9: a critical review.," *SCIOL Biotechnology*, vol. 1, pp. 30-48, 2018.
- [17] K. R. Korzekwa, D. C. Swinney and W. F. Trager, "Isotopically labeled chlorobenzenes as probes for the mechanism of cytochrome P-450 catalyzed aromatic hydroxylation," *Biochemistry*, vol. 28, no. 23, pp. 9019-9027, 1989.
- [18] G. Guroff, J. Daly, D. Jerina, J. Renson, B. Witkop and S. Udenfriend, "Hydroxylation-induced migration: the NIH shift. Recent experiments reveal an unexpected and general result of enzymatic hydroxylation of aromatic compounds.," *Science*, vol. 157, no. 3796, pp. 1524-1530, 1967.
- [19] H. G. Enoch and P. Strittmatter, "Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 254, no. 18, pp. 8976-8981, 1979.
- [20] B. A. Schacter, E. B. Nelson, H. S. Marver and B. S. S. Masters, "Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport systems," *Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system*, vol. 247, no. 11, pp. 3601-3607, 1972.
- [21] D. Sirim, M. Widmann, F. Wagner and J. Pleiss, "Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases," *BMC structural biology*, vol. 10, no. 1, pp. 34-46, 2010.

- [22] V. Cojocaru, K. Balali-Mood, M. S. Sansom and R. C. Wade, "Structure and dynamics of the membrane-bound cytochrome P450 2C9.," *PLoS computational biology*, vol. 7, no. 8, p. e1002152., 2011.
- [23] G. A. Schoch, J. K. Yano, M. R. Wester, K. J. Griffin, C. D. Stout and E. F. Johnson, "Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8 Evidence for a peripheral fatty acid binding site," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 10, pp. 9497-9503, 2004.
- [24] M. R. Wester, J. K. Yano, G. A. Schoch, C. Yang, K. J. Griffin, C. D. Stout and E. F. Johnson, "The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-Å resolution," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 34, pp. 35630-35637, 2004.
- [25] I. Quiroga and T. Scior, "Structure-Function Analysis of the Cytochromes P450, Responsible for Phenprocoumon Metabolism," *Journal of the Mexican Chemical Society*, vol. 61, no. 4, pp. 349-360, 2017.
- [26] I. Denisov, A. Shih and S. Sligar, "Structural differences between soluble and membrane bound cytochrome P450s," *Journal of inorganic biochemistry*, vol. 108, pp. 150-158, 2012.
- [27] X. Yu, V. Cojocaru and R. C. Wade, "Conformational diversity and ligand tunnels of mammalian cytochrome P450s," *Biotechnology and applied biochemistry*, vol. 60, no. 1, pp. 134-145, 2013.
- [28] X. Yu, V. Cojocaru, G. Mustafa, O. Salo-Ahen, G. Lepesheva and W. RC, "Dynamics of CYP51: implications for function and inhibitor design," *Journal Molecular Recognition*, vol. 28, no. 2, pp. 59-73, 2015.
- [29] V. Navrátilová, M. Paloncýová, M. Kajšová, K. Berka and M. Otyepka, "Effect of cholesterol on the structure of membrane-attached cytochrome P450 3A4," *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 55, no. 3, pp. 628-635, 2015.
- [30] J. Hackett, "Membrane-embedded substrate recognition by cytochrome P450 3A4," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 293, no. 11, pp. 4037-4046, 2018.
- [31] W. McClary, J. Sumida, M. Scian, L. Paço and W. Atkins, "Membrane Fluidity Modulates Thermal Stability and Ligand Binding of Cytochrome P4503A4 in Lipid Nanodiscs," *Biochemistry*, vol. 55, no. 45, pp. 6258-6268, 2016.
- [32] N. Treuheit, M. Redhair, H. Kwon, W. McClary, M. Guttman, J. Sumida and W. Atkins, "Membrane Interactions, Ligand-Dependent Dynamics, and Stability

of Cytochrome P4503A4 in Lipid Nanodiscs," *Biochemistry*, vol. 55, no. 7, pp. 1058-1069, 2016.

- [33] M. Ufer, J. O. Svensson, K. W. Krausz, H. V. Gelboin, A. Rane and G. Tybring, " Identification of cytochromes P 450 2C9 and 3A4 as the major catalysts of phenprocoumon hydroxylation in vitro," *European journal of clinical pharmacology*, vol. 60, no. 3, pp. 173-182, 2004.
- [34] F. P. Guengerich, "Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity," *The AAPS journal*, vol. 8, no. 1, pp. E101-E111, 2006.
- [35] M. Ufer, "Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists," *Clinical pharmacokinetics*, vol. 44, no. 12, pp. 1227-1246, 2005.
- [36] I. F. Sevrioukova and T. L. Poulos, "Structure and mechanism of the complex between cytochrome P4503A4 and ritonavir," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 43, pp. 18422-18427, 2010.
- [37] Y. van Leeuwen, *Towards Improvement*, Primera ed., Enschede: Gildeprint, 2009.
- [38] M. Zareh, A. Davis and S. Henderson, "Reversal of warfarin-induced hemorrhage in the emergency department," *West J Emerg Med*, vol. 12, no. 4, p. 386–392, 2011.
- [39] H. Auterhoff, J. Knabe and H. D. Höltje, *Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie*, 12 ed., Stuttgart: Wissenschaftliche verlagsgesellschaft, 1991.
- [40] I. Sugiura, B. Furie, C. T. Walsh and B. C. Furie, "Propeptide and glutamate-containing substrates bound to the vitamin K-dependent carboxylase convert its vitamin K epoxidase function from an inactive to an active state," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 17, pp. 9069-9074, 1997.
- [41] J. K. Tie, D. Y. Jin, D. L. Straight and D. W. Stafford, "Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells," *Blood*, vol. 117, no. 10, pp. 2967-2974, 2011.
- [42] J. Oldenburg, M. Marinova, C. Müller-Reible and M. Watzka, "The vitamin K cycle," *Vitamins & Hormones*, vol. 78, pp. 35-62, 2008.
- [43] E. A. Loeliger, C. A. van Dijk-Wierda, A. M. H. P. van den Besselaar, A. W. Broekmans and J. Roos, "Anticoagulant control and the risk of bleeding," *Anticoagulants and myocardial infarction: a reappraisal*, pp. 135-177, 1984.
- [44] A. P. Gadisseur, F. J. van der Meer, H. J. Adriaansen, S. D. Fihn and F. R. Rosendaal, "herapeutic quality control of oral anticoagulant therapy comparing the short-acting

acenocoumarol and the long-acting phenprocoumon," *British journal of haematology*, vol. 117, no. 4, pp. 940-946, 2002.

- [45] M. He, K. R. Korzekwa, J. P. Jones, A. E. Rettie and W. F. Trager, "Structural forms of phenprocoumon and warfarin that are metabolized at the active site of CYP2C9," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 372, no. 1, pp. 16-28, 1999.
- [46] L. S. Kaminsky and Z. Y. Zhang, " Human P450 metabolism of warfarin," *Pharmacology & therapeutics*, vol. 73, no. 1, pp. 67-74, 1997.
- [47] M. Remko, R. Broer and A. Remková, "A comparative study of the molecular structure, lipophilicity, solubility, acidity, absorption and polar surface area of coumarinic anticoagulants and direct thrombin inhibitors," *RSC Advances*, vol. 4, no. 16, pp. 8072-8084, 2014.
- [48] D. Cairns, *Essentials of pharmaceutical chemistry*, Cuarta ed., Padstow: Pharmaceutical Press, 2012.
- [49] A. Seifert, S. Tatzel, R. D. Schmid and J. Pleiss, "Multiple molecular dynamics simulations of human p450 monooxygenase CYP2C9: the molecular basis of substrate binding and regioselectivity toward warfarin," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 64, no. 1, pp. 147-155, 2006.
- [50] M. R. Wester, E. F. Johnson, C. Marques-Soares, S. Dijols, P. M. Dansette, D. Mansuy and C. D. Stout, " Structure of mammalian cytochrome P450 2C5 complexed with diclofenac at 2.1 Å resolution: evidence for an induced fit model of substrate binding," *Biochemistry*, vol. 42, no. 31, pp. 9335-9345, 2003.
- [51] P. A. Williams, J. Cosme, V. Sridhar, E. F. Johnson and D. E. McRee, "Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity," *Molecular cell*, vol. 5, no. 1, pp. 121-131, 2000.
- [52] J. Kirchheiner, M. Ufer, E. C. Walter, B. Kammerer, R. Kahlich, C. Meisel, M. Schwab, C. H. Gleiter, A. Rane, I. Roots and J. Brockmöller, " Effects of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics of R- and S-phenprocoumon in healthy volunteers," *Pharmacogenetics and Genomics*, vol. 14, no. 1, pp. 19-26, 2004.
- [53] B. Kammerer, R. Kahlich, M. Ufer, A. Schenkel, S. Laufer and C. H. Gleiter, "Stereospecific pharmacokinetic characterisation of phenprocoumon metabolites, and mass-spectrometric identification of two novel metabolites in human plasma and liver microsomes," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 383, no. 6, pp. 909-917, 2005.

- [54] M. Ufer, B. Kammerer, R. Kahlich, J. Kirchheiner, Ü. Yasar, J. Brockmöller and A. Rane, "Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2C9 causing reduced phenprocoumon (S)-7-hydroxylation in vitro and in vivo," *Xenobiotica*, vol. 34, no. 9, pp. 847-859, 2004.
- [55] I. Quiroga, F. Meléndez, K. Atonal-Salvador and B. Kammerer, "Identification a New Site of Metabolism for Phenprocoumon by Modeling it's CYP2C9 Hydroxylation Pattern," *SAJ Pharmacy and Pharmacology*, vol. 5, pp. 1-12, 2018.
- [56] B. Plietker, *Iron catalysis in organic chemistry: reactions and applications*, Primera ed., Stuttgart: John Wiley & Sons, 2008.
- [57] Z. Y. Zhang, M. J. Fasco, L. Huang, F. P. Guengerich and L. S. Kaminsky, "Characterization of purified human recombinant cytochrome P4501A1-Ile462 and-Val462: assessment of a role for the rare allele in carcinogenesis," *Cancer research*, vol. 56, no. 17, pp. 3926-3933, 1996.
- [58] S. F. Zhou, Z. W. Zhou, L. P. Yang and J. P. Cai, "Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development," *Current medicinal chemistry*, vol. 16, no. 27, pp. 3480-3675, 2009.
- [59] D. Van Booven, S. Marsh, H. McLeod, M. W. Carrillo, K. Sangkuhl, T. E. Klein and R. B. Altman, "Cytochrome P450 2C9-CYP2C9," *Pharmacogenetics and genomics*, vol. 20, no. 4, p. 277, 2010.
- [60] R. L. Reynald, S. Sansen, C. D. Stout and E. F. Johnson, "Structural Characterization of Human Cytochrome P450 2C19 active site differences between P450s 2C8, 2C9, AND 2C19," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 53, pp. 44581-44591, 2012.
- [61] S. L. Mo, Z. W. Zhou, L. P. Yang, M. Q. Wei and S. F. Zhou, " New insights into the structural features and functional relevance of human cytochrome P450 2C9," *Current drug metabolism*, vol. 10, no. 10, pp. 1075-1126, 2009.
- [62] S. L. Mo, Z. W. Zhou, L. P. Yang, M. Q. Wei and S. F. Zhou, "New insights into the structural features and functional relevance of human cytochrome P450 2C9. Part II," *Current drug metabolism*, vol. 10, no. 10, pp. 1127-1150, 2009.
- [63] J. Sridhar, J. Liu, M. Foroozesh and C. L. K. Stevens, "Insights on cytochrome p450 enzymes and inhibitors obtained through QSAR studies," *Molecules*, vol. 17, no. 8, pp. 9283-9305, 2012.
- [64] J. Kirchmair, M. J. Williamson, J. D. Tyzack, L. Tan, P. J. Bond, A. Bender and R. C. Glen, " Computational prediction of metabolism: sites, products, SAR, P450 enzyme dynamics, and

mechanisms," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 52, no. 3, pp. 617-648, 2012.

- [65] J. K. Yano, M. H. Hsu, K. J. Griffin, C. D. Stout and E. F. Johnson, "Structures of human microsomal cytochrome P450 2A6 complexed with coumarin and methoxsalen," *Nature structural & molecular biology*, vol. 12, no. 9, pp. 822-823, 2005.
- [66] S. C. Gay, A. G. Roberts, K. Maekawa, J. C. Talakad, W. X. Hong, Q. Zhang, C. D. Stout and J. R. Halpert, "Structures of cytochrome P450 2B4 complexed with the antiplatelet drugs ticlopidine and clopidogrel," *Biochemistry*, vol. 49, no. 40, pp. 8709-8720, 2010.
- [67] K. H. Tiong, N. A. M. Yunus, B. C. Yiap, E. L. Tan, R. Ismail and C. E. Ong, "Inhibitory Potency of 8-Methoxypsoralen on Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) Allelic Variants CYP2A6* 15, CYP2A6* 16, CYP2A6* 21 and CYP2A6* 22: Differential Susceptibility Due to Different Sequence Locations of the Mutations," *PLoS one*, vol. 9, no. 1, p. e86230, 2014.
- [68] F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. Williams, E. F. Meyer, M. D. Brice, J. R. Rodgers and M. Tasumi, "The protein data bank," *European Journal of Biochemistry*, vol. 80, no. 2, pp. 319-324, 1977.
- [69] P. A. Williams, J. Cosme, D. M. Vinković, A. Ward, H. C. Angove, P. J. Day, C. Vonrhein, I. J. Tickle and H. Jhoti, "Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone," *Science*, vol. 305, no. 5684, pp. 683-686, 2004.
- [70] J. K. Yano, M. R. Wester, G. A. Schoch, K. J. Griffin, C. D. Stout and E. F. Johnson, "The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 37, pp. 38091-38094, 2004.
- [71] M. Ekroos and T. Sjögren, "Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 37, pp. 13682-13687, 2006.
- [72] I. F. Sevrioukova and T. L. Poulos, "Interaction of human cytochrome P4503A4 with ritonavir analogs," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 520, no. 2, pp. 108-116, 2012.
- [73] I. F. Sevrioukova and T. L. Poulos, "Pyridine-substituted desoxyritonavir is a more potent inhibitor of cytochrome P450 3A4 than ritonavir," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 56, no. 9, pp. 3733-3741, 2013.
- [74] I. F. Sevrioukova and T. L. Poulos, "Dissecting cytochrome P450 3A4–ligand interactions using ritonavir analogues," *Biochemistry*, vol. 52, no. 26, pp. 4474-4481, 2013.

- [75] G. Brändén, T. Sjögren, V. Schnecke and Y. Xue, "Structure-based ligand design to overcome CYP inhibition in drug discovery projects," *Drug discovery today*, vol. 19, no. 7, pp. 905-911, 2014.
- [76] W. Hamaguchi, N. Masuda, S. Miyamoto, Y. Shiina, S. Kikuchi, T. Mihara, H. Moriguchi, H. Fushiki, Y. Murakami, Y. Amano, K. Honbou and K. Hattori, "Hamaguchi, W., Masuda, N., Miyamoto, S., Shiina, Y., Kikuchi, S., Mihara, T., ... & Honbou, K. (2015). Synthesis, SAR study, and biological evaluation of novel quinoline derivatives as phosphodiesterase 10A inhibitors with reduced CYP3A4 inhibition," *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 23, no. 2, pp. 297-313, 2015.
- [77] M. Zak, B. Liederer, D. Sampath, P. Yuen, K. Bair, T. Baumeister, A. Buckmelter, K. Clodfelter, E. Cheng, L. Crocker, B. Fu, B. Han, G. Li, Y. Ho, J. Lin, X. Liu, J. Ly, T. O'Brien, D. Reynolds, N. Skelton and C. Smith, "Identification of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors with no evidence of CYP3A4 time-dependent inhibition and improved aqueous solubility," *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, vol. 3, no. 529-541, p. 25, 2015.
- [78] I. Sevrioukova and T. Poulos, "Anion-Dependent Stimulation of Cyp3A4 Monooxygenase," *Biochemistry*, vol. 54, no. 26, pp. 4083-4096, 2015.
- [79] P. Chakraborty and E. Di Cera, "Induced fit is a special case of conformational selection," *Biochemistry*, vol. 56, no. 22, p. 2853-2859, 2017.
- [80] P. R. Ortiz de Montellano, "Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes," *Chemical reviews*, vol. 110, no. 2, pp. 932-948, 2009.
- [81] R. Jäger, "Quantification and localization of molecular hydrophobicity," Technischen Universität Darmstadt, Darmstadt, 2000.
- [82] H. N. Motlagh, J. O. Wrabl, J. Li and V. J. Hilser, "The ensemble nature of allostery," *Nature*, vol. 7496, no. 508, pp. 331-339., 2014.
- [83] S. B. Nabuurs, M. Wagener and J. De Vlieg, "A flexible approach to induced fit docking," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 50, no. 26, pp. 6507-6518, 2007.
- [84] Y. Sheng, Y. Chen, L. Wang, G. Liu, W. Li and Y. Tang, "Effects of protein flexibility on the site of metabolism prediction for CYP2A6 substrates," *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 54, pp. 90-99, 2014.
- [85] E. Sano, W. Li, H. Yuki, X. Liu, T. Furihata, K. Kobayashi, K. Chiba, S. Neya and T. Hoshino, "Mechanism of the decrease in catalytic activity of human cytochrome P450 2C9

polymorphic variants investigated by computational analysis.," *Journal of computational chemistry*, vol. 15, no. 31, pp. 2746-2758, 2010.

- [86] K. Kobayashi, O. Takahashi, M. Hiratsuka, N. Yamaotsu, S. Hirono, Y. Watanabe and A. Oda, "Evaluation of influence of single nucleotide polymorphisms in cytochrome P450 2B6 on substrate recognition using computational docking and molecular dynamics simulation," *PloS one*, vol. 9, no. 5, p. e96789, 2014.
- [87] J. K. Yano, M. R. Wester, G. A. Schoch, K. J. Griffin, C. D. Stout and E. F. Johnson, "The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 37, pp. 38091-38094, 2004.
- [88] E. Scott, Y. He, M. Wester, M. White, C. Chin, J. Halpert, E. Johnson and C. Stout, "An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6 Å resolution," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 23, no. 100, pp. 13196-13201, 2003.
- [89] P. Wilderman, M. Shah, T. Liu, S. Li, S. Hsu, A. Roberts, D. Goodlett, Q. Zhang, V. Woods, C. Stout and J. Halpert, "Plasticity of cytochrome P450 2B4 as investigated by hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry and X-ray crystallography," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 49, no. 285, pp. 38602-38611, 2010.
- [90] J. Hodgson, *ADMET-turning chemicals into drugs*, 1 ed., New York: Nature biotechnology, 2001.
- [91] A. Vedani and M. Smiesko, "In silico toxicology in drug discovery-concepts based on three-dimensional models," *Alternatives to laboratory animals: ATLA*, vol. 37, no. 5, pp. 477-496, 2009.
- [92] A. Vedani, M. Dobler and M. Smieško, "VirtualToxLab—A platform for estimating the toxic potential of drugs, chemicals and natural products," *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 261, no. 2, pp. 142-153, 2012.
- [93] S. Wöll, S. H. Kim, H. J. Greten and T. Efferth, "Animal plant warfare and secondary metabolite evolution," *Natural products and bioprospecting*, vol. 3, no. 1, pp. 1-7, 2013.
- [94] J. Brodie, B. Ridenhour and I. E. Brodie, "The evolutionary response of predators to dangerous prey: hotspots and coldspots in the geographic mosaic of coevolution between garter snakes and newts," *Evolution*, vol. 56, no. 10, pp. 2067-2082, 2002.

- [95] M. Bello, J. E. Mendieta-Wejebe and J. Correa-Basurto, "Structural and energetic analysis to provide insight residues of CYP2C9, 2C11 and 2E1 involved in valproic acid dehydrogenation selectivity," *Biochemical pharmacology*, vol. 90, no. 2, pp. 145-158, 2014.
- [96] E. J. Mendieta-Wejebe, J. Correa-Basurto, E. M Garcia-Segovia, G. Ceballos-Cancino and M. C. Rosales-Hernandez, "Molecular modeling used to evaluate CYP2C9-dependent metabolism: homology modeling, molecular dynamics and docking simulations," *Current drug metabolism*, vol. 12, no. 6, pp. 533-548, 2011.
- [97] J. E. Mendieta-Wejebe, M. C. Rosales-Hernández, H. Rios, J. Trujillo-Ferrara, G. López-Pérez, F. Tamay-Cach, R. Ramos-Morales and J. Correa-Basurto, "Comparing the electronic properties and docking calculations of heme derivatives on CYP2B4," *Journal of molecular modeling*, vol. 14, no. 6, pp. 537-545, 2008.
- [98] M. C. Rosales-Hernández, J. E. Mendieta-Wejebe, J. G. Trujillo-Ferrara and J. Correa-Basurto, "Homology modeling and molecular dynamics of CYP1A1 and CYP2B1 to explore the metabolism of aryl derivatives by docking and experimental assays," *European journal of medicinal chemistry*, vol. 45, no. 11, pp. 4845-4855, 2010.
- [99] T. L. Poulos, B. C. Finzel and A. J. Howard, "High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam," *Journal of molecular biology*, vol. 195, no. 3, pp. 87-700, 1987.
- [100] H. Li, S. Narasimhulu, L. M. Havran, J. D. Winkler and T. L. Poulos, "Crystal structure of cytochrome P450cam complexed with its catalytic product, 5-exo-hydroxycamphor," *ournal of the American Chemical Society*, vol. 117, no. 23, pp. 6297-6299, 1995.
- [101] D. Batabyal and T. L. Poulos, "Crystal structures and functional characterization of wild-type CYP101D1 and its active site mutants," *Biochemistry*, vol. 52, no. 49, pp. 8898-8906, 2013.
- [102] A. Mancy, P. Broto, S. Dijols, P. M. Dansette and D. Mansuy, "The substrate binding site of human liver cytochrome P450 2C9: an approach using designed tienilic acid derivatives and molecular modeling," *Biochemistry*, vol. 34, no. 33, pp. 10365-10375, 1995.
- [103] R. Lonsdale, K. Houghton, J. Żurek, C. M. Bathelt, N. Foloppe, d. G. M.J., J. Harvey and A. Mulholland, "Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Modeling of Regioselectivity of Drug Metabolism in Cytochrome P450 2C9," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 21, p. 8001–8015, 2013.
- [104] L. Perić-Hassler, E. Stjernschantz, C. Oostenbrink and D. P. Geerke, "CYP 2D6 binding affinity predictions using multiple ligand and protein conformations," *International journal of molecular sciences*, vol. 14, no. 12, pp. 24514-24530, 2013.

- [105] A. Seifert and J. Pleiss, " Identification of selectivity-determining residues in cytochrome P450 monooxygenases: A systematic analysis of the substrate recognition site 5," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 74, no. 4, pp. 1028-1035, 2009.
- [106] J. Skopalík, P. Anzenbacher and M. Otyepka, "Flexibility of human cytochromes P450: molecular dynamics reveals differences between CYPs 3A4, 2C9, and 2A6, which correlate with their substrate preferences," *The journal of physical chemistry B*, vol. 112, no. 27, pp. 8165-8173, 2008.
- [107] C. Sotriffer, "Accounting for induced-fit effects in docking: what is possible and what is not?," *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 11, no. 2, pp. 179-191, 2011.
- [108] J. D. Tyzack, H. Y. Mussa, M. J. Williamson, J. Kirchmair and R. C. Glen, "Cytochrome P450 site of metabolism prediction from 2D topological fingerprints using GPU accelerated probabilistic classifiers," *Journal of cheminformatics*, vol. 6, no. 1, p. 29, 2014.
- [109] S. F. Sousa, A. J. M. Ribeiro, J. T. S. Coimbra, R. P. P. Neves, S. A. Martins, N. S. H. N. Moorthy, P. A. Fernandes and M. J. Ramos, "Protein-ligand docking in the new millennium— a retrospective of 10 years in the field," *Current medicinal chemistry*, vol. 20, no. 18, pp. 2296-2314, 2013.
- [110] H. Kato, N. Yamaotsu, N. Iwazaki, S. Okamura, T. Kume and S. Hirono, "Precise prediction of activators for the human constitutive androstane receptor using structure-based three-dimensional quantitative structure–activity relationship methods," *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2017.
- [111] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell and A. J. Olson, "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility," *Journal of computational chemistry*, vol. 30, no. 16, pp. 2785-2791, 2009.
- [112] O. Trott and A. Olson, "AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading," *J Comput Chem*, vol. 31, p. 455–461, 2010.
- [113] G. Jones, P. Willett, R. Glen, A. Leach and R. Taylor, "Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking," *J Mol Biol*, vol. 267, p. 727–748, 1997.
- [114] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer and G. Klebe, " A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm," *Journal of molecular biology*, vol. 261, no. 3, pp. 470-489, 1996.

- [115] H. Alonso, A. A. Bliznyuk and J. E. Gready, "Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design," *Med Res Rev*, vol. 26, pp. 531-568, 2006.
- [116] A.-A. Tantar, S. Conilleau, B. Parent, N. Melab, L. Brillet, S. Roy, E.-G. Talbi and D. Horvath, "Docking and biomolecular simulations on computer grids: Status and trends," *Curr Comput Aided Drug Des*, vol. 4, p. 235-249, 2008.
- [117] P. Vasanthanathan, J. Lastdrager, C. Oostenbrink, J. N. Commandeur, N. P. Vermeulen, F. S. Jørgensen and L. Olsen, "Identification of CYP1A2 ligands by structure-based and ligand-based virtual screening," *MedChemComm*, vol. 2, no. 9, pp. 853-859, 2011.
- [118] S. N. Lo, Y. P. Chang, K. C. Tsai, C. Y. Chang, T. S. Wu and Y. F. Ueng, "Inhibition of CYP1 by berberine, palmatine, and jatrorrhizine: selectivity, kinetic characterization, and molecular modeling," *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 272, no. 3, pp. 671-680, 2013.
- [119] K. Salminen, M. Rahnasto-Rilla, R. Väänänen, P. Imming, A. Meyer, A. Horling, A. Poso, T. Laitinen, H. Raunio and M. Lahtela-Kakkonen, "Time-Dependent Inhibition of CYP2C19 by Isoquinoline Alkaloids: In Vitro and In Silico Analysis," *Drug Metab Dispos*, vol. 43, no. 12, pp. 1891-1904, 2015.
- [120] H. M. Kumalo, S. Bhakat and M. E. Soliman, "Theory and applications of covalent docking in drug discovery: merits and pitfalls," *Molecules*, vol. 20, no. 2, pp. 1984-2000, 2015.
- [121] A. Vedani and D. W. Huhta, "Algorithm for the systematic solvation of proteins based on the directionality of hydrogen bonds," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 113, no. 15, pp. 5860-5862, 1991.
- [122] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew and A. J. Olson, "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function," *Journal of computational chemistry*, vol. 19, no. 14, pp. 1639-1662, 1998.
- [123] N. Krishnamoorthy, P. Gajendrarao, S. Thangapandian, Y. Lee and K. W. Lee, "Probing possible egress channels for multiple ligands in human CYP3A4: a molecular modeling study," *Journal of molecular modeling*, vol. 4, no. 16, pp. 607-614, 2010.
- [124] E. Ascitutto, M. Dang, S. Pochapsky, J. Madura and T. Pochapsky, "Experimentally restrained molecular dynamics simulations for characterizing the open states of cytochrome P450cam," *Biochemistry*, vol. 10, no. 50, pp. 1664-1671, 2011.
- [125] A. Roberts, M. Cheesman, A. Primak, M. Bowman, W. Atkins and A. Rettie, "Intramolecular Heme Ligation of the Cytochrome P450 2C9 R108H Mutant Demonstrates Pronounced

Conformational Flexibility of the B– C Loop Region: Implication for Substrate Binding," *Biochemistry*, vol. 40, no. 49, pp. 8700-8708, 2010.

- [126] Y. Chang and G. Loew, "Homology modeling, molecular dynamics simulations, and analysis of CYP119, a P450 enzyme from extreme acidothermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*," *Biochemistry*, vol. 10, no. 39, pp. 2484-2498, 2000.
- [127] C. R. Lee, J. A. Goldstein and J. A. Pieper, "Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data," *Pharmacogenetics and Genomics*, vol. 12, no. 3, pp. 251-263, 2002.
- [128] J. Lampe, R. Brandman, S. Sivaramakrishnan and P. O. de Montellano, "Two-dimensional NMR and all-atom molecular dynamics of cytochrome P450 CYP119 reveal hidden conformational substates," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 13, no. 285, pp. 9594-9603, 2010.
- [129] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. Shindyalov and P. E. Bourne, "The protein data bank," *Nucleic acids research*, vol. 28, no. 1, pp. 235-242, 2000.
- [130] N. Guex and M. C. Peitsch, "SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling," *Electrophoresis*, vol. 18, no. 15, pp. 2714-2723, 1997.
- [131] W. F. van Gunsteren, S. R. Billeter, A. A. Eising, P. H. Hünenberger, P. Krüger, A. E. Mark, W. R. P. Scott and I. G. Tironi, in *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*, Groningen, vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich and BIOMOS b.v, 1996.
- [132] A. Pedretti, L. Villa and G. Vistoli, "VEGA: a versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs," *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 21, no. 1, pp. 47-49, 2002.
- [133] Studio, D. , *version 4.0*, San Diego: Accelrys. Inc, 2009.
- [134] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng and T. E. Ferrin, "UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis," *Journal of computational chemistry*, vol. 25, no. 13, pp. 1605-1612, 2004.
- [135] A. Vedani, "Biograf3R," [Online]. Available: <http://www.biograf.ch/>.
- [136] A. Vedani and D. W. Huhta, " A new force field for modeling metalloproteins," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 112, no. 12, pp. 4759-4767, 1990.
- [137] Tripos, *Sybyl X*, St Louis MO 63144-2319USA: Tripos Inc, 2010.

- [138] B. Brooks, R. Bruccoleri, B. Olafson, D. States, S. Swaminathan and M. Karplus, "CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 4, no. 2, p. 187–217, 1983.
- [139] W. Humphrey, A. Dalke and K. Schulten, "VMD: visual molecular dynamics," *Journal of molecular graphics*, vol. 14, no. 1, pp. 33-38, 1996.
- [140] I. Gaussian, "Gaussian 9 Revision A 01," Wallingford CT, 2009.
- [141] P. A. Williams, J. Cosme, A. Ward, H. C. Angove, D. M. Vinković and H. Jhoti, " Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin," *Nature*, vol. 424, no. 6947, pp. 464-468, 2003.
- [142] J. Gasteiger and M. Marsili, " Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges," *Tetrahedron*, vol. 36, no. 22, pp. 3219-3228, 1980.
- [143] W. L. Jorgensen and J. Tirado-Rives, "The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 110, no. 6, pp. 1657-1666, 1988.
- [144] A. W. Schüttelkopfa and D. M. F. van Aaltena, "PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein–ligand complexes," *Acta Crystallographica*, vol. D60, pp. 1355-1363, 2004.
- [145] M. Clark, R. D. Cramer III and N. Van Opdenbosch, "Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 10, no. 8, pp. 982-1012, 1989.
- [146] A. Vedani, D. W. Huhta and S. P. Jacober, "Metal-coordination, hydrogen-bond network formation, and protein-solvent interactions in native and complexed human carbonic anhydrase I: a molecular mechanics study," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 111, no. 11, pp. 4075-4081, 1989.
- [147] R. Raag and T. L. Poulos, "Crystal structure of the carbon monoxide-substrate-cytochrome P-450CAM ternary complex," *Biochemistry*, vol. 28, no. 19, pp. 7586-7592, 1989.
- [148] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, E. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa and K. Schulten, "Scalable molecular dynamics with NAMD," *Journal of computational chemistry*, vol. 26, no. 16, pp. 1781-1802, 2005.
- [149] A. Aksimentiev, M. Sotomayor and D. Wells, "Membrane Proteins Tutorial," Computational Biophysics Workshop, 2016.

- [150] V. N. Maiorov and G. M. Crippen, "Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins," *Journal of molecular biology*, vol. 2, no. 235, pp. 625-634, 1994.
- [151] A. Becke, "Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange.," *J. Chem. Phys.*, no. 98, pp. 5648-5652, 1993.
- [152] Y. Zhao and D. Truhlar, "Density Functionals with Broad Applicability in Chemistry.," *Acc. Chem. Res.*, no. 41, p. 157–167, 2008.
- [153] M. Walker, A. Harvey, A. Sen and C. Dessent, "Performance of M06, M06-2X, and M06-HF Density Functionals for Conformationally Flexible Anionic Clusters: M06 Functionals Perform Better than B3LYP for a Model System with Dispersion and Ionic Hydrogen-Bonding Interactions," *J. Phys. Chem. A Mol. Spectrosc. Kinet. Environ. Gen. Theory.*, no. 117, p. 12590–12600, 2013.
- [154] P. Hariharan and J. Pople, "The effect of d-functions on molecular orbital energies for hydrocarbons.," *Chem. Phys. Lett.*, no. 16, pp. 217-219, 1972.
- [155] P. Hay and W. Wadt, "Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals.," *J. Chem. Phys.*, no. 82, pp. 299-310, 1985.
- [156] R. Dennington, T. Keith, M. Millam, S. Inc and K. Shawnee Mission, "GaussView, Version 5.0.8," 2016..
- [157] J. P. Collman, J. U. Hoard, N. Kim, G. Lang and C. A. Reed, "Synthesis, stereochemistry, and structure-related properties of alpha, beta, gamma, delta-tetraphenylporphin-atoiron(II)," *J. Am. Chem. Soc.*, no. 97, pp. 2676-2681, 1975.
- [158] M. Shapovalov and R. Dunbrack, "A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions," *Structure*, vol. 19, pp. 844-858, 2011.
- [159] B. Karthikeyan, S. Suvaithenamudhan, M. Akbarsha and S. Parthasarathy, "Analysis of Species-Selectivity of Human, Mouse and Rat Cytochrome P450 1A and 2B Subfamily Enzymes using Molecular Modeling, Docking and Dynamics Simulations," *Cell Biochemistry and Biophysics*, pp. 1-20, 2017.
- [160] T. Hendrychova, K. Berka, V. Navratilova, P. Anzenbacher and M. Otyepka, "Dynamics and hydration of the active sites of mammalian cytochromes P450 probed by molecular dynamics simulations," *Current drug metabolism*, vol. 2, no. 13, pp. 177-189, 2012.

- [161] M. He, K. R. Korzekwa, J. P. Jones, A. E. Rettie and W. F. Trager, "Structural forms of phenprocoumon and warfarin that are metabolized at the active site of CYP2C9," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 372, no. 1, pp. 16-28, 1999.
- [162] S. Yamano, J. Tatsuno and F. J. Gonzalez, "The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes," *Biochemistry*, vol. 29, no. 5, pp. 1322-1329, 1990.
- [163] T. L. Poulos and E. F. Johnson, "Structures of Cytochrome P450 Enzymes," in *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*, P. R. O. De Montellano, Ed., New York, Springer Science & Business Media, 2005, pp. 87-114.
- [164] C. Bathelt, R. D. Schmid and J. Pleiss, "Regioselectivity of CYP2B6: homology modeling, molecular dynamics simulation, docking," *Molecular modeling annual*, vol. 8, no. 11, pp. 327-335, 2002.
- [165] A. M. Azevedo, V. C. Martins, D. M. Prazeres, V. Vojinović, J. M. Cabral and L. P. Fonseca, "Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology," *Biotechnology annual review*, vol. 9, pp. 199-247, 2003.
- [166] M. Fischer, M. Knoll, D. Sirim, F. Wagner, S. Funke and J. Pleiss, "The Cytochrome P450 Engineering Database: a navigation and prediction tool for the cytochrome P450 protein family," *Bioinformatics*, vol. 23, no. 15, pp. 2015-2017, 2007.
- [167] J. A. Pavon, MECHANISM OF OXYGEN ACTIVATION AND HYDROXYLATION BY THE AROMATIC AMINO ACID HYDROXYLASES, Doctoral dissertation ed., Texas A&M University, 2009.
- [168] L. Zhang, Heme Biology: The Secret Life of Heme in Regulating Diverse Biological Processes, 1 ed., Singapore: World Scientific, 2011.
- [169] A. Cecil, C. Rikanovic, K. Ohlsen, C. Liang, J. Bernhardt, T. Oelschlaeger, T. Gulder, G. Bringmann, U. Holzgrabe, M. Unger and T. Dandekar, "Modeling antibiotic and cytotoxic effects of the dimeric isoquinoline IQ-143 on metabolism and its regulation in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and human cells," *Genome Biol*, vol. 12, no. 3, pp. R24-R42, 2011.
- [170] E. Meléndez, "Metallocenes as target specific drugs for cancer treatment," *Inorganica chimica acta*, vol. 393, pp. 36-52, 2012.
- [171] K. M. Kadish, K. M. Smith and R. Guilard, The porphyrin handbook, Singapore: World Scientific, 2012.

- [172] V. B. Urlacher and M. Girhard, "Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application," *Trends in biotechnology*, vol. 30, no. 1, pp. 26-36, 2010.
- [173] A. Seifert and J. Pleiss, " Identification of selectivity determinants in CYP monooxygenases by modelling and systematic analysis of sequence and structure," *Current drug metabolism*, vol. 13, no. 2, pp. 197-202, 2012.
- [174] T. Scior, M. Verhoff, I. Gutierrez-Aztatzi, H. P. Ammon, S. Laufer and O. Werz, "Interference of Boswellic Acids with the Ligand Binding Domain of the Glucocorticoid Receptor," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 54, no. 3, pp. 978-986, 2014.
- [175] E. Fischer, "Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme," *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, vol. 27, no. 3, pp. 2985-2993, 1894.
- [176] D. E. Koshland Jr, "Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 44, no. 2, p. 98, 1958.
- [177] P. H. Hünenberger, M. A. E. and W. F. Van Gunsteren, "Fluctuation and cross-correlation analysis of protein motions observed in nanosecond molecular dynamics simulations," *Journal of molecular biology*, vol. 252, no. 4, pp. 492-503, 1995.
- [178] I. C. Gray, C. Nobile, R. Muresu, S. Ford and N. K. Spurr, " A 2.4-megabase physical map spanning the CYP2C gene cluster on chromosome 10q24," *Genomics*, vol. 28, no. 2, pp. 328-332, 1995.
- [179] A. E. Rettie and J. P. Jones, "Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, vol. 45, pp. 477-494, 2005.
- [180] M. Pirmohamed and B. K. Park, "Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions," *Toxicology*, vol. 192, no. 1, pp. 23-32, 2003.
- [181] G. Brändén, T. Sjögren, V. Schnecke and Y. Xue, "Structure-based ligand design to overcome CYP inhibition in drug discovery projects," *Drug discovery today*, vol. 19, no. 7, pp. 905-911, 2014.
- [182] R. Wallin, S. M. Hutson, D. Cain, A. Sweatt and D. C. Sane, "A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat," *The FASEB Journal*, vol. 15, no. 13, pp. 2542-2544, 2001.

- [183] W. Li, S. Schulman, R. J. Dutton, D. Boyd, J. Beckwith and T. A. Rapoport, "Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase," *Nature*, vol. 463, no. 7280, pp. 507-512, 2010.
- [184] T. H. Sullivan-Klose, B. I. Ghanayem, D. A. Bell, Z. Y. Zhang, L. S. Kaminsky, G. M. Shenfield, J. O. Miners, D. J. Birkett and J. A. Goldstein, "The role of the CYP2C9-Leu 359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism," *Pharmacogenetics and Genomics*, vol. 6, no. 4, pp. 341-349, 1996.
- [185] L. C. Wienkers, C. J. Wurden, E. Storch, K. L. Kunze, A. E. Rettie and W. F. Trager, "Formation of (R)-8-hydroxywarfarin in human liver microsomes. A new metabolic marker for the (S)-mephenytoin hydroxylase, P4502C19," *Drug metabolism and disposition*, vol. 24, no. 5, pp. 610-614, 1996.
- [186] A. E. Rettie, K. R. Korzekwa, K. L. Kunze, R. F. Lawrence, A. C. Eddy, T. Aoyama, G. H. V., F. J. Gonzalez and W. F. Trager, "Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-4502C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions," *Chemical research in toxicology*, vol. 5, no. 1, pp. 54-59, 1992.
- [187] M. Spreafico, Mixed-model QSAR at the glucocorticoid and liver X receptors, Basel: University of Basel, 2009.
- [188] A. R. Leach, B. K. Shoichet and C. E. Peishoff, "Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 49, no. 20, pp. 5851-5855, 2006.
- [189] V. A. Payne, Y. T. Chang and G. H. Loew, "Homology modeling and substrate binding study of human CYP2C9 enzyme," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 37, no. 2, pp. 176-190, 1999.
- [190] D. F. Lewis, M. Dickins, B. G. Lake and P. S. Goldfarb, "Investigation of enzyme selectivity in the human CYP2C subfamily: homology modelling of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 from the CYP2C5 crystallographic template," *Drug metabolism and drug interactions*, vol. 19, no. 4, pp. 257-286, 2003.
- [191] L. Afzelius, Computational Modelling of Structures and Ligands of CYP2C9, Uppsala: Computational Modelling of Structures and Ligands of CYP2C9, 2004.
- [192] R. R. Ayscue, Computer Modeling of Dapsone-mediated Heteroactivation of Flurbiprofen Metabolism by CYP2C9, Primera ed., Morgantown: ProQuest, 2008.
- [193] A. Belic, M. Temesvari, K. Kohalmy, R. Vrzal, Z. Dvorak, D. Rozman and K. Monostory, "Investigation of the CYP2C9 induction profile in human hepatocytes by combining

experimental and modelling approaches," *Current drug metabolism*, vol. 10, no. 10, pp. 1066-1074, 2009.

- [194] M. W. Linder, M. B. Homme, K. K. Reynolds, B. F. Gage, C. Eby, N. Silvestrov and R. Valdes, "Interactive modeling for ongoing utility of pharmacogenetic diagnostic testing: application for warfarin therapy," *Clinical chemistry*, vol. 55, no. 10, pp. 1861-1868, 2009.
- [195] G. Rossato, B. Ernst, M. Smiesko, M. Spreafico and A. Vedani, "robing Small-Molecule Binding to Cytochrome P450 2D6 and 2C9: An In Silico Protocol for Generating Toxicity Alerts," *ChemMedChem*, vol. 5, no. 12, pp. 2088-2101, 2010.
- [196] R. C. Braga, V. M. Alves, C. A. Fraga, E. J. Barreiro, V. de Oliveira and C. H. Andrade, "Combination of docking, molecular dynamics and quantum mechanical calculations for metabolism prediction of 3, 4-methylenedioxybenzoyl-2-thienylhydrazone," *Journal of molecular modeling*, vol. 18, no. 5, pp. 2065-2078, 2012.
- [197] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman and D. A. Case, "Development and testing of a general amber force field," *Journal of computational chemistry*, vol. 25, no. 9, pp. 1157-1174, 2004.
- [198] A. K. Rappé, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard Iii and W. M. Skiff, "UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 114, no. 25, pp. 10024-10035, 1992.
- [199] V. Poltev, "Molecular Mechanics: Method and Applications," in *In Handbook of Computational Chemistry*, J. Leszczynski, Ed., Dordrecht, Springer , 2012, pp. 259-291.
- [200] A. R. Leach, *Molecular modelling: principles and applications*, Segunda ed., Essex: Pearson Education, 2001.
- [201] E. C. Meng, B. K. Shoichet and I. D. Kuntz, "Automated docking with grid-based energy evaluation," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 13, no. 4, pp. 505-524, 1992.
- [202] A. D. van Dijk, R. Boelens and A. M. Bonvin, "Data-driven docking for the study of biomolecular complexes," *Febs Journal*, vol. 272, no. 2, pp. 293-312, 2005.
- [203] K. L. Haas and K. J. Franz, "Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology," *Chemical reviews*, vol. 109, no. 10, pp. 4921-4960, 2009.
- [204] J. Hénin, J. Gumbart and C. Chipot, "In silico alchemy: A tutorial for alchemical free-energy perturbation calculations with NAMD," 2014.

- [205] C. D. Christ, A. E. Mark and W. F. Van Gunsteren, "Basic ingredients of free energy calculations: a review," *Journal of computational chemistry*, vol. 31, no. 8, pp. 1569-1582, 2010.
- [206] A. Pohorille, C. Jarzynski and C. Chipot, " Good practices in free-energy calculations," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 114, no. 32, pp. 10235-10253, 2010.
- [207] M. Eisenstein and E. Katchalski-Katzir, "On proteins, grids, correlations, and docking," *Comptes rendus biologiques*, vol. 327, no. 5, pp. 409-420, 2004.
- [208] T. R. M. Lengauer, "Computational methods for biomolecular docking," *Current opinion in structural biology*, vol. 6, no. 3, pp. 402-406, 1996.
- [209] S. Y. Yang, "Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances," *Drug discovery today*, vol. 15, no. 11, pp. 444-450, 2010.
- [210] K. Czarnecki, S. Nimri, Z. Gross, L. M. Proniewicz and J. R. Kincaid, "Direct Resonance Raman Evidence for a Trans Influence on the Ferryl Fragment in Models of Compound I Intermediates of Heme Enzymes," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 118, no. 12, pp. 2929-2935, 1996.
- [211] C. Crocoll, *Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme*, Jena: der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität , 2011.
- [212] G. A. Schoch, J. K. Yano, S. Sansen, P. M. Dansette, C. D. Stout and E. F. Johnson, " Determinants of cytochrome P450 2C8 substrate binding structures of complexes with montelukast, troglitazone, felodipine, and 9-cis-retinoic acid," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 25, pp. 17227-17237, 2008.
- [213] D. W. Cameron, M. Heath-Chiozzi, S. Danner, C. Cohen, S. Kravcik, C. Maurath, E. Sun, R. Henry, R. Rode, A. Potthoff, J. Leonard and A. H. D. R. S. Group, "Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease," *The Lancet*, vol. 351, no. 9102, pp. 543-549, 1998.
- [214] S. Preissner, K. Kroll, M. Dunkel, C. Senger, G. Goldsobel, D. Kuzman and R. Preissner, "SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions," *Nucleic acids research*, vol. 38, no. 1, pp. D237-D243, 2010.

- [215] G. N. Kumar, A. D. Rodrigues, A. M. Buko and J. F. Denissen, "Cytochrome P450-mediated metabolism of the HIV-1 protease inhibitor ritonavir (ABT-538) in human liver microsomes," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 277, no. 1, pp. 423-431, 1996.
- [216] K. Schwetlick, *Organikum*, Berlin: V. E. B. Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1977.
- [217] F. P. Guengerich, "Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 409, no. 1, pp. 59-71, 2003.
- [218] I. F. Sevrioukova and T. L. Poulos, "Structural and mechanistic insights into the interaction of cytochrome P4503A4 with bromoergocryptine, a type I ligand," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 5, pp. 3510-3517, 2012.