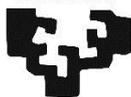


eman ta zabal zazu



Universidad Euskal Herriko
del País Vasco Unibertsitatea

**ESTUDIOS COMPUTACIONALES SOBRE LA
REACTIVIDAD DE DESMETILASAS DE
HISTONAS QUE CONTIENEN DOMINIOS Jmj-C Y
CITOCROMOS**

Nerea Alberro Osa

Donostia

2018

ESKERRAK

Iritsi da azkenik hainbatetan imajinatu dudan unea, nire Doktoretza Tesi honen azken orria idaztekoa..... Bizitzako ziklo honi amaiera emateko unea.

Lehen eskerra zuretzat da Ana, Tesi honen zati handi bat ere zurea baita. Zuk eman zenidan aukera klaseak nituela jakinda ere Doktoretza Tesia egiteko. Eskerrak eman behar dizkizut bihotzez beti ulertu duzulako nire aparteko egoera, eta beti nigan sinetsi duzulako.

Miquel, llegaste a Donosti en el mejor de los momentos para mí. Si por ti no hubiera sido no sé en qué hubiera derivado esta Tesis. Comenzaste como colaborador ayudando con los MECPs y has acabado merecidamente siendo director de mi tesis, MOLTES GRÀCIES.

Fernando, mila mila esker zure ikerketa taldean hartzeagatik, zure jakituria nirekin partekatzeagatik. Goraipatzekoa da zeinen erraz azaltzen dituzun hain konplexuak diren gauzak. Urte hauetan inoiz pentsatu ez nukeen munduan murgildu naiz. Ikasi dudan guztia benetako zientzia egiten den ikerketa talde baten parte naizelako izan da, eta zu zara talde honen burua. Eta nola ez, eskerrak ere zure ordezkoa izateagatik, urte hauetan ere asko gozatu dut irakasten, mila esker.

Como no podía ser de otra forma, quiero agradecer a mis compañeros, tanto actuales como pasados, las vivencias y momentos vividos con vosotr@s , me han hecho crecer como persona, Eskerrik asko!

Aizpea, eskerrak eman behar dizkizut hain bihotz zabala izateagatik, desagertzeaz dagoen espezie bat zara, ez aldatu. Beti egon zara nire

aldamenean laguntzeko prest, plazer handia izan da zurekin lan egitea, lankide bikaina izan zara. Hemendik gutxira zure plaza eta nire tesia ospatuko ditugu!

Losune, por tener siempre los oídos dispuestos a escucharme, aconsejarme y apoyarme, Mila esker!

Antonia, por hacer que el compaginar la docencia y la investigación fuera lo más llevadero posible. ¡Y por otras tantas cosas más!

A tod@s los que me han aguantado en este periodo (habéis sido tant@s que no os puedo nombrar a tod@s)... Siempre con ánimos no permitiendo que tirara la toalla, Gracias.

Aita eta Ama, naizen pertsona zuei zor dizuet. Zuek erakutsi didazuei bizitzan aurrera egiten, tinko eusten eta esfortzurik gabeko saririk ez dagoela ederki azaldu didazue. Eta nola ez, nire familia osoari. Maite Zaituztet.

Azkenik, nire etxeko gizonei eman behar dizkiet eskerrak. Iñakiri lehengo, mundo honetan gehien maite dudana pertsona emateagatik, gure ttikia. Sinesgaitza bada ere, azken urteetako ekaitz guztiak baretzera doaz. Dantzan egiteko gai izan gara orainarte, jarraitu dezagun urte askotan dantzan olatu zipriztin artean!

Eta zuri Igor, etxera iristean bapatean laneko kontu guztiak alde batera uzten laguntzeagatik, eta hain zoriontsu egiteagatik. Benetako maitasuna zer den erakusteagatik, eta gure etxeko zurrumbiloa izateagatik. Hemendik aurrera amatxok lan gutxiago egingo du, zuk eskatzen didazun bezala. Maite zaituztet.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Å	Ångström
α-HOTMX	α-hidroxitamoxifeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ADP	Adenosin difosfato
Ala	Alanina
ARN	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosin trifosfato
Coa	Coenzima A
Cpd I	Compuesto I
CYP450	Citocromo P450
Cys	Cisteína
DACS	Deacetilcefalosporin C sintasa
DAOCS	Deacetoxicefalosporin C sintasa
DFT	Teoría de la Densidad Funcional (<i>Density Functional Theory</i>)
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina (<i>flavin adenine dinucleotide</i>)
FMO	Flavinmonooxigenasa
Glu	Ácido glutámico
H	Histona
HAT	Acetiltransferasas de histonas (<i>Histone acetyltransferase</i>)
HAT	Transferencia átomo hidrógeno (<i>Hydrogen Atom Transfer</i>)
HD	Desmetilasas de histonas (<i>Histone demethylase</i>)
HDAC	Desacetilasas de histonas (<i>Histone deacetylase</i>)
HF	Hartree-Fock
His	Histidina

HMT	Metiltransferasas de histonas (<i>Histone methyltransferase</i>)
IDO	Indoleamin 2,3-dioxigenasa
Ile	Isoleucina
Jmj	Jumonji
K	Lisina
KDM	Desmetilasas de lisina (<i>Lysine demethylase</i>)
LANL	Laboratorio Nacional Los Alamos (<i>Los Alamos National Laboratory</i>)
Leu	Leucina
LSD	Desmetilasas de histona específicas de lisina (<i>Lysine-specific histone demethylase</i>)
Lys	Lisina
MAO	Monoaminoxidasa
MM	Mecánica molecular
Me	Metilo
MECP	Punto de cruce de mínima energía (<i>Minimum energy crossing point</i>)
NADP(H)	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAT	N-acetiltransferasa
N-Me1TMX	N-desmetiltamoxifeno
PCM	Modelo del continuo polarizable (<i>polarizable continuum model</i>)
PDB	Banco de datos de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PES	Superficie de energía potencial (<i>potential energy surface</i>)
PHD	Prolil hidroxilasa
Phe	Fenilalanina
QM	Mecánica cuántica (<i>Quantum mechanics</i>)
R	Sustituyentes
Ser	Serina

SET	Transferencia de un electron (<i>Single Electron Transfer</i>)
SUMO	Pequeña modificadora ubiquitina (<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>)
SyrB	Siringomicin biosíntesis
TauD	Taurina dioxigenasa
TDO	Triptófano 2,3-dioxigenasa
TMX	Tamoxifeno
Thr	Treonina
TS	Estado de transición (<i>transition state</i>)
Tyr	Tirosina
UGT	UDT-glucoronosiltransferasa
Val	Valina
ZPVE	Energía del punto cero vibracional (<i>zero point vibrational energy</i>)

Estudios Computacionales sobre la Reactividad de Desmetilasas de Histonas que contienen Dominios Jmj-C y Citocromos

CAPÍTULO 1. Introducción general

1.1 El papel biológico del oxígeno molecular	1
1.2 Oxigenasas no-hemo	7
1.2.1 Enzimas dependientes de α -cetoglutarato	11
1.3 Enzimas con grupo hemo	13

CAPÍTULO 2. Objetivos

2.1 Objetivos	19
---------------	----

CAPÍTULO 3. Métodos Computacionales

3.1 Introducción	21
3.2 Elección de la estructura inicial	23
3.3 Métodos Computacionales	24
3.3.1 Métodos de Mecánica Molecular	24
3.3.2 Métodos Mecanocuánticos	26
3.3.3 Métodos de mecánica cuántica y mecánica molecular (QM/MM)	28
3.3.4 Métodos de dinámica molecular	28
3.4 Cálculo de propiedades moleculares mediante métodos mecanocuánticos	29
3.4.1 Métodos <i>Ab initio</i>	29
3.4.1.1 Aproximación de Hartree-Fock	29
3.4.1.2 Bases atómicas	31
3.4.1.3 Métodos Post Hartree-Fock y Multiconfiguracionales	35
3.4.2 Métodos semiempíricos	37
3.4.3 Teoría de la Densidad Funcional	38
3.4.1.1 Funcional B3LYP	40
3.5 Tratamiento de la energía de dispersión	41
3.6 Tratamiento del disolvente	43
3.7 Caracterización de puntos estacionarios y puntos de cruce de mínima energía entre estados de espín	44
3.7.1 Superficies de energía potencial	44

3.7.2	Reactividad en dos estados	47
-------	----------------------------	----

CAPÍTULO 4. Reacción de desmetilación de residuos de lisina catalizada por desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C

4.1	Epigenética	50
4.2	Desmetilasas de histonas	56
4.2.1	Desmetilasas específicas de lisina	58
4.2.2	Desmetilasas que contienen el dominio Jmj-C	60
4.2.3	Ciclo catalítico	66
4.3	Resultados computacionales y discusión	72
4.3.1	Sustratos trimetilados	72
4.3.2	Sustratos dimetilados	79
4.3.2.1	Sustratos dimetilados con orientación <i>out</i>	81
4.3.2.2	Sustratos dimetilados con orientación <i>in</i>	83
4.3.3	Sustratos monometilados	90
4.4	Conclusiones	102

CAPÍTULO 5. Reacción de desmetilación de aminas catalizada por el citocromo P450

5.1	La familia de los Citocromos P450	106
5.2	Reacciones de oxidación catalizadas por los Citocromos P450	110
5.3	Metabolismo de fármacos	114
5.4	Resultados computacionales y discusión	120
5.4.1	Desmetilación de la trimetilamina	121
5.4.2	Desmetilación de la dimetilamina	124
5.4.3	Desmetilación de la metilamina	130
5.4.4	Metabolismo de fármacos: el tamoxifeno como caso de estudio	134
5.5	Conclusiones	144

CAPÍTULO 6. Conclusiones Generales

6.1	Conclusiones	146
-----	--------------	-----

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

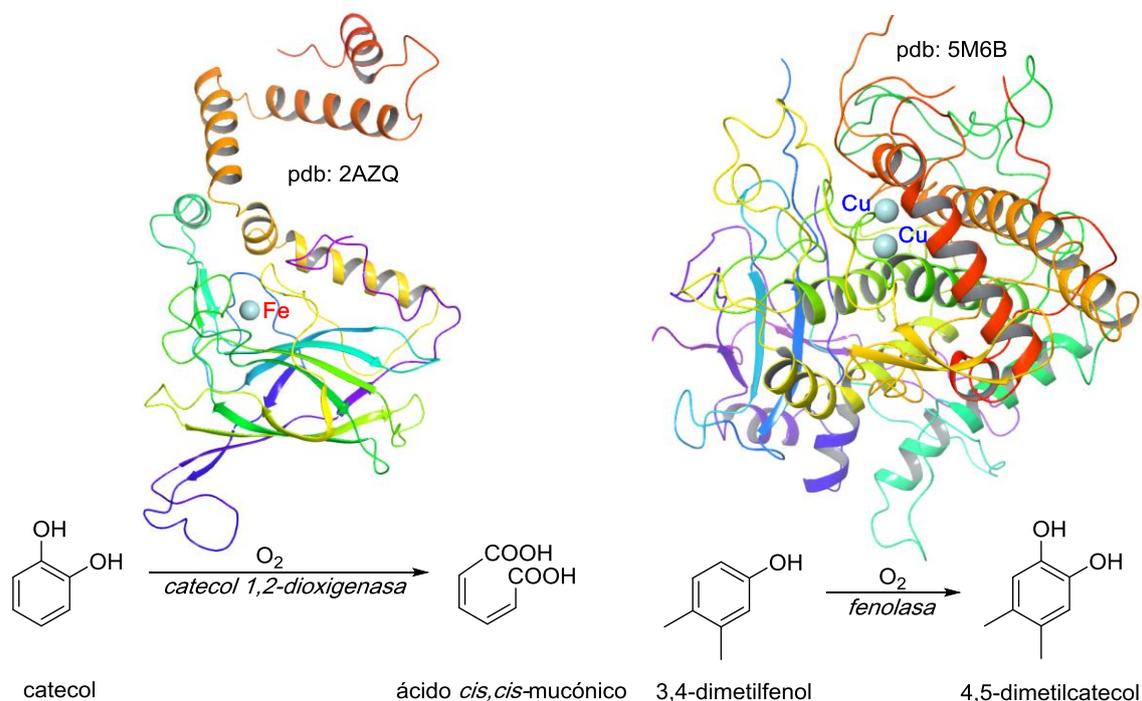
1.1 El papel biológico del oxígeno molecular

El oxígeno molecular es un elemento esencial para la vida aeróbica. Además de aportar una gran cantidad de energía, este compuesto se caracteriza por poseer un elevado potencial oxidante cuyo producto de reducción es exclusivamente el agua. Asimismo, aporta oxígeno a moléculas esenciales en los sistemas biológicos.

El papel que desempeña el oxígeno en la naturaleza sólo ha sido conocido en detalle desde fechas recientes. Hasta los años 50 se pensaba que el oxígeno era demasiado estable como para reaccionar y adicionarse a los sustratos orgánicos. Así, se consideraba que el oxígeno incorporado a sistemas biológicos provenía del agua. Fue en el año 1955 cuando diversos autores¹ demostraron mediante el empleo de $^{18}\text{O}_2$ y H_2^{18}O en las reacciones que se muestran en el Esquema 1.1 que esa idea no era correcta. En efecto, Mason y colaboradores^{1a} observaron que el oxígeno que se incorporaba en la síntesis del 4,5-dimetilcatecol (2-hidroxi-4,5-dimetilfenol) desde el 3,4-dimetilfenol con el uso de la fenolasa (también conocida como tirosinasa), provenía del oxígeno molecular y no del agua. Al mismo tiempo, Hayaishi y colaboradores^{1b} demostraron que los dos átomos de oxígeno necesarios para generar el ácido cis,cis-mucónico (ácido (2Z, 4Z)-hexadiendioico) desde el catecol (o-hidroxifenol) catalizado con la catecol 1,2-dioxigenasa los aportaba el oxígeno y no el agua. Por consiguiente, gracias a estos descubrimientos se estableció el oxígeno molecular como fuente

¹ a) H. S. Mason, W. L. Fowlks, E. Peterson, *J. Amer. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2914-2915; b) O. Hayaishi, M. Katagiri, S. Rothberg, *J. Amer. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 5450-5451.

de oxígeno de sustratos orgánicos, empleando enzimas como catalizadores. Ello permitió definir a las oxigenasas como una nueva familia de enzimas.



Esquema 1.1. Dos transformaciones metabólicas en las que se demostró que los procesos de oxidación estaban mediados por oxígeno molecular y no por agua. Las estructuras y códigos Protein Data Bank (pdb) de las metaloenzimas asociadas con estos procesos están también incluidas.

El oxígeno molecular se encuentra en estado triplete, ya que posee dos electrones desapareados en orbitales moleculares degenerados (Figura 1.1). En cambio, los compuestos orgánicos al tener todos los electrones apareados se encuentran en estado singlete. Esta desigualdad evita la combustión espontánea del material orgánico en dióxido de carbono y agua,² e impide que se dé la oxidación de forma natural. Por tanto, los seres vivos han creado procesos que permiten hacer uso del oxígeno a temperaturas fisiológicas. Generalmente,

² M. Y. M. Pau, J. D. Lipscomb, E. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 18355-18362.

dichos procesos utilizan enzimas que incorporan metales de transición en su centro activo.

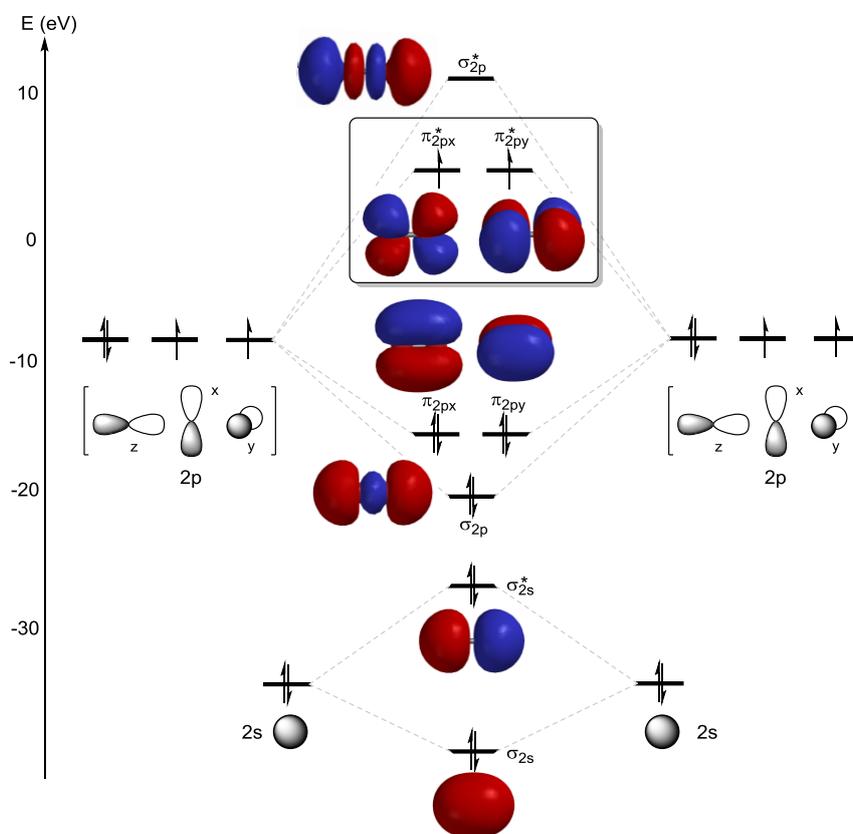


Figura 1.1. Orbitales moleculares canónicos del oxígeno molecular en su estado fundamental ($S=1$). Se han resaltado los orbitales moleculares responsables del estado triplete.

Los metales de transición posibilitan la existencia de compuestos con capacidad de adoptar tanto diferentes estados de oxidación como de espín, y son capaces de activar el oxígeno al aportar electrones para reducirlo. Así, los metales más frecuentes presentes en diversas familias de metaloenzimas son hierro, cobre y, en menor medida, manganeso.³ Además, los organismos aerobios también disponen de cofactores como la flavina o la pteridina que pueden desarrollar la misma función que los metales. En otros casos, se requiere

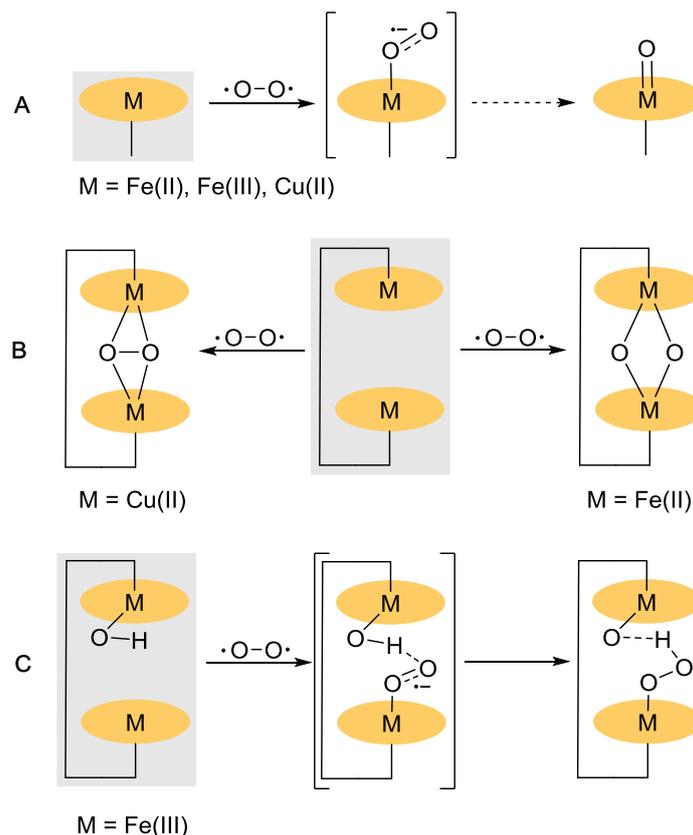
³ R. H. Holm, P. Kennepohl, E. I. Solomon, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2239-2314.

la presencia tanto del metal de transición como del cofactor para llevar a cabo esta función.

Los mecanismos a través de los cuales es llevada la activación del oxígeno son muy diversos, pero en todos ellos se produce la reducción del O₂ y la ruptura del enlace O-O durante la reacción.⁴ Esta ruptura puede ocurrir de forma homolítica o heterolítica. Así, en el primer caso se requiere un único electrón para la formación del intermedio radicalario y este proceso se produce mediante una reacción por etapas. Por el contrario, en la ruptura heterolítica los dos electrones necesarios para reducir el oxígeno los aporta el metal M(n) que se oxida a M(n+2)=O. Como consecuencia de la activación, los intermedios metal-oxígeno generados son muy reactivos, tales como metal-superoxo, (hidro)peroxo, o especies oxo vía transferencia de electrón y protón (Esquema 1.2).⁵

⁴ E. G. Kovaleva, J. D. Lipscomb, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 186-193.

⁵ M. Lundberg, P. E. M. Siegbahn, K. Morokuma, *Biochemistry* **2008**, *47*, 1031-1042.



Esquema 1.2. Modos de activación del O₂ en oxidasas y oxigenasas con un centro metálico (A) y con dos (B y C).

Dos son las familias de enzimas que emplean oxígeno para llevar a cabo sus funciones en la naturaleza, denominadas oxidasas y oxigenasas. Las oxidasas catalizan la transferencia de electrones desde su sustrato al oxígeno, reduciendo este último a peróxido, superóxido o agua, pero sin incorporar ningún átomo de oxígeno al sustrato. Por el contrario, las oxigenasas son las encargadas de transferir el oxígeno a los sustratos, y se clasifican en dos subfamilias, las monoxigenasas y las dioxigenasas.⁶ Estas enzimas se diferencian en el número de átomos de oxígeno que emplean. Así, las primeras

⁶ a) M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, J. H. Dawson, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841-2887; b) E. I. Solomon, T. C. Brunold, M. I. Davis, J. N. Kemsley, S. K. Lee, N. Lehnert, F. Neese, A. J. Skulan, Y. S. Yang, J. Zhou, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 235-349; c) F. P. Guengerich, *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 611-650; d) J. T. Groves, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3569-3574; e) M. Costas, M. P. Mehn, M. P. Jensen, L. Que Jr., *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 939-986; f) B. Meunier, S. P. de Visser, S. Shaik, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947-3980.

transfieren únicamente un átomo de oxígeno al sustrato, reduciendo el otro a agua. En cambio, las dioxigenasas utilizan los dos átomos de oxígeno que añaden a uno o dos sustratos. Además, las oxigenasas dependientes de hierro pueden presentar la porfirina en su estructura, denominadas enzimas hemo (*vide infra*), o carecer de ella, en tal caso se denominan no-hemo.

Las dioxigenasas no-hemo son muy versátiles y se emplean tanto para transportar el oxígeno, como para catalizar reacciones tanto de síntesis como de degradación de compuestos. Además, son altamente eficaces y muestran una elevada selectividad con los sustratos. Asimismo, debido a la importancia que tienen en los diferentes organismos en los que están presentes, una alteración en su desarrollo provocará efectos negativos en los mismos. En este sentido, se sabe que en los humanos una alteración en la homeostasis del oxígeno conlleva un cambio en el correcto funcionamiento de las dioxigenasas. Esta disfunción está directamente relacionada con enfermedades como la anemia, el cáncer, enfermedades cardiovasculares,⁷ o las enfermedades relacionadas con el colágeno, como la osteoporosis⁸ entre otras. En los últimos años han cobrado especial importancia las AlkB⁹ y Jmj-C.¹⁰ Estas enzimas catalizan las reacciones de desmetilación del ADN/ARN y de las lisinas presentes en histonas respectivamente, lo que está relacionado directamente con alteraciones en la transcripción. Por todo ello, el estudio tanto estructural como mecanístico de

⁷ a) G. L. Semenza, *Gen. Dev.* **2000**, *14*, 1983-1991; b) T. Jokilehto, P. M. Jaakkola, *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 758-770; c) R. Anindya, *DNA Repair* **2017**, *49*, 21-25.

⁸ J. Myllyharju, K. I. Kivirikko, *Ann. Med.* **2001**, *33*, 7-21.

⁹ G. Q. Zheng, Y. Fu, C. He, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4602-4620.

¹⁰ J. W. Hojfeldt, K. Agger, K. Helin, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 917-930.

estas metaloenzimas muestra gran interés, tanto en la industria farmacéutica¹¹ como en la química, particularmente en el diseño de compuestos biomiméticos.¹²

Debido a la abundancia en la naturaleza y a la trascendencia de las reacciones catalizadas por las metaloenzimas que contienen hierro, este trabajo se centrará fundamentalmente en oxigenasas que contienen este metal. Así, en los puntos posteriores de este capítulo se citarán y explicarán las principales características de oxigenasas de tipo no-hemo, donde se hará especial hincapié en las enzimas dependientes del α -cetoglutarato, y en las oxigenasas de tipo hemo, con los citocromos P450 (CYP450) como principales representantes.

1.2 Oxigenasas no-hemo

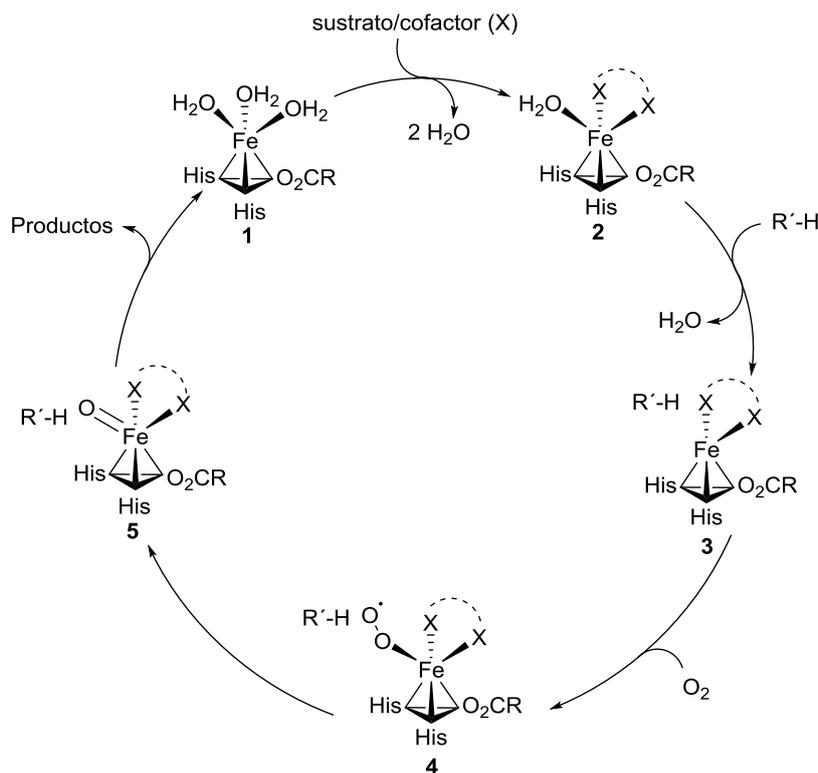
Las oxigenasas no-hemo están presentes en todos los organismos vivos, donde catalizan reacciones muy diferentes. No obstante, es característico que la mayoría presenten una unidad estructural común denominada tríada facial, que está compuesta por dos histidinas y un carboxilato (*2-His-1-carboxylate facial triad*) (ver Esquema 1.3).¹³ Esta unidad estructural está formada por un centro metálico de Fe al que se unen 3 ligandos endógenos, 2 residuos de histidina y un grupo carboxilato, que es aportado bien por un glutamato, o bien por un aspartato. Esta tríada ocupa una cara del octaedro, dejando disponibles otras tres vacantes coordinativas, que suelen ser ocupadas por ligandos fácilmente desplazables, tales como el agua, el oxígeno y los cofactores. Esta flexibilidad

¹¹ R. Rose, M. A. McDonough, O. N. F. King, A. Kawamura, C. J. Schofield, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4364-4397.

¹² B. Meunier, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1411-1456.

¹³ a) E. L. Hegg, L. Que Jr., *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 625-629; b) L. Que Jr., *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 182-184.

en la coordinación con el metal permite que este tipo de enzimas catalicen reacciones de oxidación muy diversas. Así, estas enzimas llevan a cabo reacciones de hidroxilación, tanto de compuestos alifáticos como aromáticos, y desmetilan tanto residuos de lisinas presentes en histonas, como el ADN o el ARN. Además, son capaces de catalizar reacciones de expansión de anillo, desaturaciones, ciclaciones o halogenaciones.¹⁴ Cabe destacar que, independientemente del tipo de reacción de oxidación catalizada, estas metaloenzimas que presentan la tríada facial activan el oxígeno molecular a través de un mecanismo similar (Esquema 1.3).



Esquema 1.3. Ciclo catalítico general de las enzimas no-hemo que presentan la tríada facial 2-His-1-carboxilato.

¹⁴ T. Borowski, P. E. M. Siegbahn, in Density Functional Theory Studies on Non-heme Iron Enzymes. In Iron-Containing Enzymes-Versatile Catalysts of Hydroxylation Reactions in Nature, (Eds.: S. P. de Visser, D. Kumar), RSC Publishing, Cambridge, **2011**, pp. 88-118.

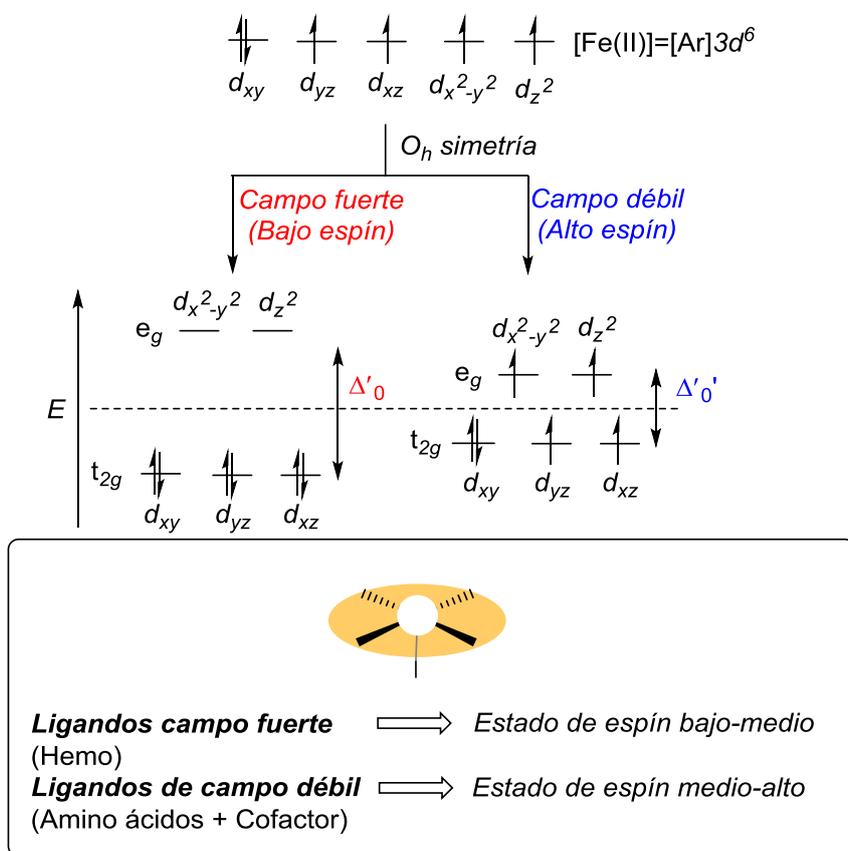
El ciclo catalítico general para la formación del intermedio que lleva a cabo la oxidación se muestra en el Esquema 1.3. Este ciclo comienza con la unión del sustrato o el cofactor que, al desplazar dos moléculas de agua, se le une de forma bidentada al complejo **1**, generando el complejo **2**. La entrada de un segundo sustrato al centro activo desplaza otra molécula de agua y se forma el intermedio **3**. El sustrato no se une directamente al metal, pero sí se sitúa lo suficientemente cerca como para que posteriormente sea oxidado. Una vez formado el compuesto pentacoordinado, queda disponible una vacante coordinativa y el metal puede activar el oxígeno dando lugar el intermedio **4**. Posteriormente, se produce la reducción del oxígeno y la ruptura del enlace O-O presente en el complejo **4**, para generar la especie oxidante Fe(IV)=O o Fe(V)=O **5**.¹⁵ Tal y como se ha mencionado anteriormente, este último paso puede llevarse a cabo mediante ruptura homolítica o heterolítica. Este mecanismo general está basado en el mecanismo propuesto en los años ochenta por Hanauske-Abel y Günzler para la prolil-4-hidroxilasa.¹⁶

En las dioxigenasas no-hemo, los ligandos que se unen al Fe(II) o Fe(III) en la primera esfera de coordinación son del tipo histidina, glutamato, tirosina o aspartato. Estos ligandos son de campo débil, es decir, producen Δ_o pequeño. Tal y como está representado en el Esquema 1.4, en un complejo octaédrico los orbitales d se desdoblán en dos grupos de simetría t_{2g} y e_g , por este orden de energía. La diferencia de energía entre los orbitales t_{2g} y e_g se llama energía del desdoblamiento del campo de los ligandos, Δ_o . Por ello, se espera que las reacciones catalizadas por este tipo de enzimas lo hagan en estados de alto

¹⁵ a) K. D. Koehntop, J. P. Emerson, L. Que Jr., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 87-93; b) P. C. A. Bruijnincx, G. van Koten, R. Gebbink, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2716-2744.

¹⁶ H. M. Hanauske-Abel, V. Günzler, *J. Theor. Biol.* **1982**, *94*, 421-455.

espín. En cambio, las enzimas hemo poseen una mayor diferencia entre los orbitales t_{2g} y e_g , con lo que catalizarán las reacciones en estado de bajo espín.



Esquema 1.4. Representación esquemática del desdoblamiento de los orbitales d de un complejo octaédrico en presencia de ligandos de campo fuerte y débil.

Las enzimas que contienen la triada facial 2-His-1-carboxilato se dividen en cinco grupos en función de la estructura o la reactividad que presentan: las enzimas dependientes de α -cetoglutarato, las extradiol dioxigenasas, las Rieske oxigenasas y las hidroxilasas dependientes de pterina. Por último, el resto de enzimas que no entran en los grupos anteriores se agrupan en un grupo final, como es el caso de la isopenicilin N-sintasa.^{15b} Debido a que las enzimas dependientes de α -cetoglutarato presentan la subfamilia más amplia, en el punto siguiente de este capítulo se analizará esta familia de enzimas.

1.2.1. Enzimas dependientes de α -cetoglutarato

Las enzimas dependientes de α -cetoglutarato abarcan una gran familia y están presentes en animales, plantas, bacterias e incluso en virus. Debido a que poseen la capacidad de activar el oxígeno molecular, llevan a cabo oxidaciones de vital importancia en los organismos en los que se encuentran. Así, participan en la biosíntesis de productos naturales, como el colágeno¹⁷ o lípidos,¹⁸ regulan la respuesta ante situaciones de hipoxia,¹⁹ participan en modificaciones postranscripcionales, como la desmetilación de histonas,²⁰ y reparan tanto el ADN como el ARN.²¹ Además, se encargan de la degradación de compuestos, tanto endógenos, en el caso de los ácidos grasos, como exógenos, en el caso de los fármacos, y son capaces de catalizar la síntesis de antibióticos.²² Para llevar a cabo estas funciones, estas enzimas catalizan un amplio abanico de oxidaciones. En el Esquema 1.5 se muestra un pequeño resumen de las reacciones más características catalizadas por esta familia de enzimas.²³

¹⁷ K. L. Gorres, R. T. Raines, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *45*, 106-124.

¹⁸ C. Loenarz, C. J. Schofield, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 152-156.

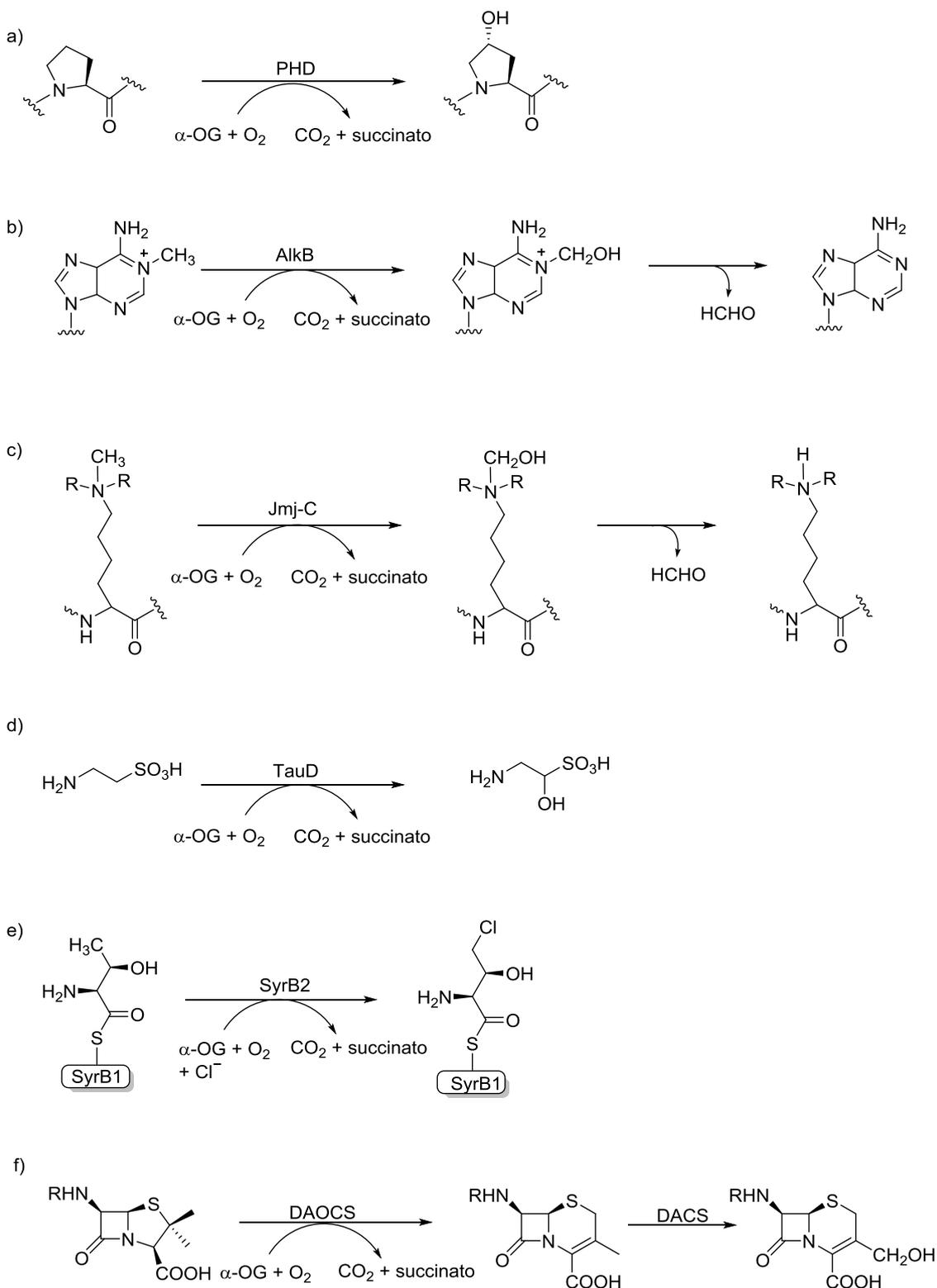
¹⁹ A. Ozer, R. K. Bruick, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 144-153.

²⁰ C. Johansson, A. Tumber, K. Che, P. Cain, R. Nowak, C. Gileadi, U. Oppermann, *Epigenomics* **2014**, *6*, 89-120.

²¹ a) S. C. Trewick, T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, B. Sedgwick, *Nature* **2002**, *419*, 174-178; b) G. Q. Zheng, Y. Fu, C. He, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4602-4620.

²² R. B. Hamed, J. R. Gomez-Castellanos, L. Henry, C. Ducho, M. A. McDonough, C. J. Schofield, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 21-107.

²³ a) J. J. Hutton, A. Kaplan, S. Udenfriend, *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, *121*, 384-391; b) P. O. Falnes, R. F. Johansen, E. Seeberg, *Nature* **2002**, *419*, 178-182; c) S. C. Trewick, T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, B. Sedgwick, *Nature* **2002**, *419*, 174-178; d) Y. Tsukada, J. Fang, H. Erdjument-Bromage, M. E. Warren, C. H. Borchers, P. Tempst, Y. Zhang, *Nature* **2006**, *439*, 811-816; e) J. C. Price, E. W. Barr, B. Tirupati, J. M. Bollinger, C. Krebs, *Biochemistry* **2003**, *42*, 7497-7508; f) L. C. Blasiak, F. H. Vaillancourt, C. T. Walsh, C. L. Drennan, *Nature* **2006**, *440*, 368-371; g) K. Valegard, A. C. T. van Scheltinga, A. Dubus, G. Ranghino, L. M. Oster, J. Hajdu, I. Andersson, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 95-101.



Esquema 1.5. Representación de reacciones químicas más características catalizadas por enzimas no-hemo dependientes de hierro, a) prolil hidroxilasa (PHD), b) enzimas reparadoras AlkB (AlkB), c) desmetilasas de lisina con dominio Jmj-C, d) taurina dioxigenasa (TauD), e) SyrB2 halogenasa, f) deacetoxicefalosporin C sintasa (DAOCS), deacetilcefalosporin C sintasa, (DACs).

Diferentes aminoácidos como la prolina (Esquema 1.5a) y la lisina (Esquema 1.5c), los ácidos nucleicos (Esquema 1.5b), así como la taurina (Esquema 1.5d) son sustratos que sufren reacciones de hidroxilación en contacto con estas metaloenzimas. La capacidad de activar los enlaces C-H se ve también reflejada en reacciones de halogenación (Esquema 1.5e). Asimismo, destaca la reacción de expansión que producen en la síntesis de antibióticos β -lactámicos las dioxigenasas presentes en los microorganismos de la especie *Streptomyces*, entre otros (Esquema 1.5f).

A día de hoy, la reacción más común de las oxigenasas dependientes de α -cetoglutarato y Fe(II) es la hidroxilación de sustratos, además de ser la única que se produce en animales.²⁴

1.3 Enzimas con grupo Hemo

La familia de enzimas conocida como hemo se caracteriza por presentar en su estructura el complejo del mismo nombre. Este tipo de enzimas está ampliamente distribuido en la naturaleza, tanto en células procariontas como eucariotas.²⁵

Tal y como se observa en la Figura 1.2, el grupo hemo está formado por la unión de un centro metálico de hierro a la protoporfirina. Esta unión se produce mediante los átomos de nitrógeno presentes en cada uno de los cuatro anillos de pirrol a los que se une. Concretamente, se trata de dos grupos imino (=N-) y

²⁴ M. A. McDonough, C. Loenarz, R. Chowdhury, I. J. Clifton, C. J. Schofield, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 659-672.

²⁵ D. R. Nelson, T. Kamataki, D. J. Waxman, F. P. Guengerich, R. W. Estabrook, R. Feyereisen, F. J. Gonzalez, M. J. Coon, I. C. Gunsalus, O. Gotoh, K. Okuda, D. W. Nebert, *DNA Cell Biol.* **1993**, *12*, 1-51.

dos nitrógenos pirrólicos (-NH-). A su vez, estos anillos se unen entre sí mediante grupos metilideno (-CH=) indicados como α , β , γ y δ en la Figura 1.2. A su vez, cada anillo de pirrol está sustituido, y cada protoporfirina posee dos cadenas laterales de ácido propanoico. El quinto ligando suele variar en función del tipo de proteína, siendo siempre un aminoácido que satura valencia, como la cisteína, o meramente coordinante, como la histidina. Por tanto, la diferencia entre los diferentes grupos hemo radica en los sustituyentes presentes en los anillos de tetrapirrol (ver Figura 1.2). Por ejemplo, los grupos hemo más abundantes en la naturaleza, los grupos Hemo B y C, difieren en los sustituyentes de las posiciones 3 y 8, ya que poseen 2 grupos vinílicos y dos grupos sulfuro, respectivamente. Debido a la presencia de enlaces conjugados, las porfirinas presentan características peculiares, tales como el color, la fluorescencia y la planaridad.

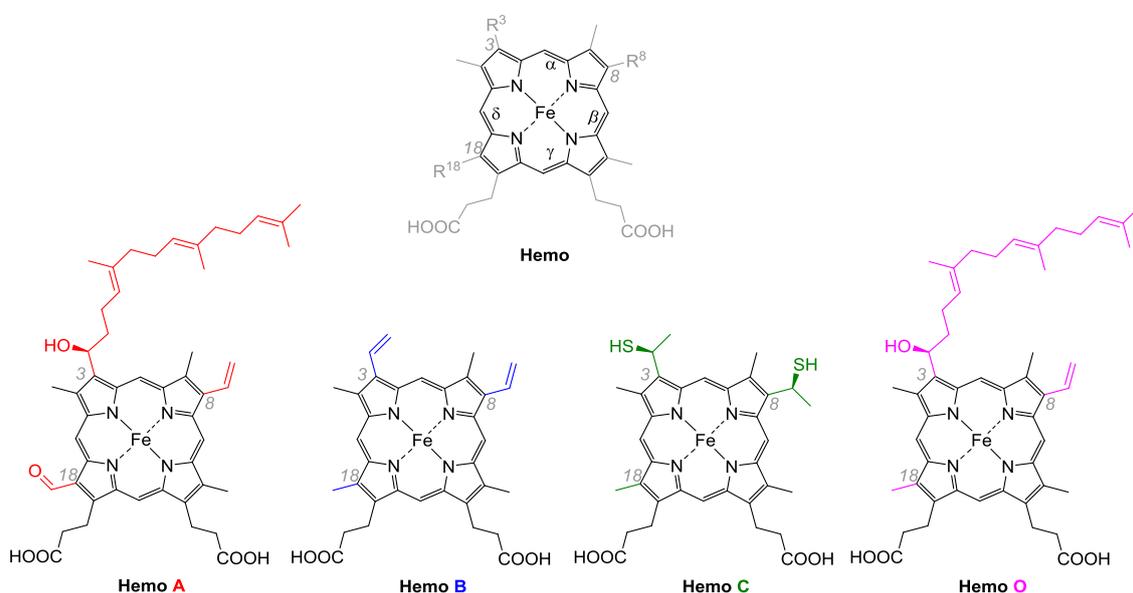


Figura 1.2. Representación de la estructura del grupo hemo, así como una representación de los principales tipos de grupos hemo.

En los mamíferos, el grupo presente en las hemo proteínas corresponde al Hemo B, también conocida como la protoporfirina IX. La hemoglobina, la mioglobina o los citocromos son algunas de las proteínas en las que este grupo hemo está presente.

El descubrimiento de esta proteína se remonta al año 1958, cuando Klingenberg²⁶ y Garfinkel²⁷ hallaron la existencia de un pigmento presente en las células hepáticas que al reducirse en presencia de monóxido de carbono producía un pico de absorción inusual de la banda Soret a 450nm (en lugar de 420nm). Unos años más tarde, Omura y Sato lo denominaron P450²⁸ y demostraron que el pigmento en cuestión era en realidad una proteína. Posteriormente, Estabrook y colaboradores²⁹ comprobaron que esta proteína participaba en la hidroxilación de los esteroides.

Con el paso de los años, las funciones atribuidas al grupo hemo y a las metaloenzimas en las que está presente se han ampliado considerablemente. No obstante, estas funciones se pueden agrupar en tres: transporte de oxígeno, procesos redox y transporte de electrones. Además, una función dada suele relacionarse con el aminoácido presente en la posición axial. Así, la histidina está presente en las proteínas que se encargan de transportar el oxígeno, como la hemoglobina. Por el contrario, las enzimas que catalizan reacciones redox, como la familia de los CYP450, poseen residuos de histidina, tirosina, metionina o cisteína. Por último, las proteínas cuya función corresponde al transporte de electrones ocupan la quinta y sexta vacante coordinativa mediante aminoácidos,

²⁶ M. Klingenberg, *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, 75, 376-386.

²⁷ D. Garfinkel, *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, 77, 493-509.

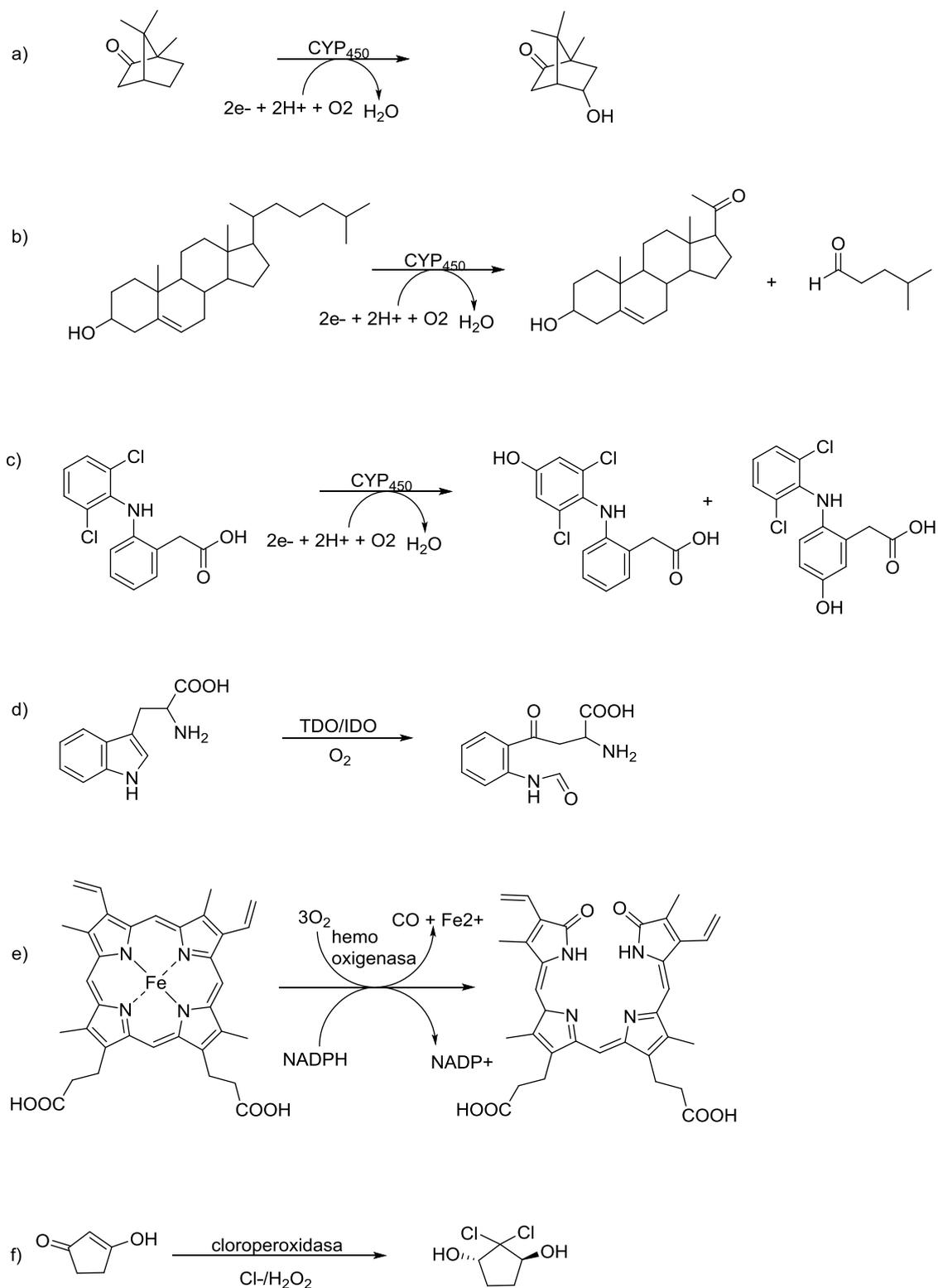
²⁸ a) T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 1375-1376; b) T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 2370-2378.

²⁹ R. W. Estabrook, O. Rosenthal, D. Y. Cooper, *Biochem. Z.* **1963**, 338, 741-755.

por lo que no se unen al oxígeno. Todas estas funciones las realizan gracias a que la porfirina se quelata con un metal de transición, siendo éste el encargado de unirse al oxígeno o de transferir los electrones. Como se ha mencionado, en los mamíferos el metal presente en estas enzimas es el hierro.

Las enzimas con presencia del grupo hemo y dependientes de hierro con más importancia biológica corresponde a la gran familia de los citocromos. Estas enzimas son capaces de activar el oxígeno molecular e incorporarlo a los sustratos orgánicos. Además, pueden llevar a cabo multitud de reacciones de oxidación. Así, de un modo similar a las enzimas no-hemo, éstas son capaces de hidroxilar compuestos alifáticos y aromáticos, producen la desmetilación de compuestos N-alquilados, la halogenación de enlaces C-H y la O-desmetilación de diversos sustratos, como la epoxidación entre otros. De la multitud de reacciones que son capaces de catalizar, destaca la oxidación de enlaces C-H inactivados, dando lugar a intermedios que incorporan grupos hidroxilo C-OH. A modo de ejemplo se muestran en el Esquema 1.6 algunas reacciones catalizadas por estas enzimas, junto con una pequeña representación de reacciones catalizadas por otras enzimas de tipo hemo.^{6a,30}

³⁰ a) J. Hedegaard, I. C. Gunsalus, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 4038-4043; b) T. Leemann, C. Transon, P. Dayer, *Life Sci.* **1993**, *52*, 29-34; c) S. Sen, S. K. Manna, S. Mazumdar in *Density Functional Theory Studies on Non-heme Iron Enzymes. In Iron –Containing Enzymes-Versatile Catalysts of Hydroxylation Reactions in Nature*, (Eds.: S. P. de Visser, D. Kumar), RSC Publishing, Cambridge, **2011**, pp. 330-365.



Esquema 1.6. Representación de reacciones químicas más características catalizadas por enzimas hemo dependientes de hierro, a), b) y c) citocromo P450, d) triptófano 2,3-dioxigenasa, (TDO) e Indoleamin 2,3-dioxigenasa (IDO) e) hemo oxigenasa, f) cloroperoxidasa.

Es especialmente reseñable el papel de la familia de los CYP450 en el metabolismo de compuestos exógenos, como los fármacos.³¹ Se encargan de la metabolización de todos aquellos fármacos que sufren metabolismo de primer paso, lo que influye directamente en su biodisponibilidad. El poder predecir los metabolitos que se forman, así como conocer la predisposición de cada individuo a generarlos es vital para poder ajustar correctamente la dosis de principio activo, disminuyendo así los efectos secundarios. Además, estas enzimas participan también en la biosíntesis de compuestos como las hormonas esteroideas o los ácidos grasos.^{6c} Por la transcendencia en las funciones que realizan la familia de los citocromos, fue la enzima de tipo hemo seleccionada para estudiar en más detalle en esta Tesis Doctoral.

³¹ U. M. Zanger, M. Schwab, *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138*, 103-141.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos

Hasta la fecha se conoce que la única reacción catalizada por las oxigenasas no-hemo dependientes de α -cetoglutarato en humanos corresponde a la hidroxilación de enlaces C-H y la N-desmetilación de (poli)metilaminios mediante la C-hidroxilación de grupos N-metilo. Esta reacción catalizada por AlkB y por las desmetilasas de lisina con dominio Jmj-C es la responsable de controlar el nivel de metilación del ADN, así como el de las proteínas asociadas, respectivamente. Una alteración de dicho mecanismo conlleva un cambio en el patrón de transcripción de las proteínas, lo que se relaciona con enfermedades neurodegenerativas y con diversos tipos de cáncer. Además, esta reacción de N-desmetilación despierta gran interés, ya que las aminas metiladas están presentes en un gran número de principios activos, y la reacción de N-desmetilación forma parte del metabolismo de los mismos. La familia de los citocromos P450 es la responsable de catalizar las reacciones de fase I del metabolismo de fármacos con el fin de facilitar la eliminación de los mismos del organismo.

En vista de que en los humanos existen dos familias de enzimas que catalizan la misma reacción de N-desmetilación, decidimos seleccionar una subfamilia de cada una de ellas con el fin de estudiar en más profundidad esta reacción. Por todo ello, los objetivos de la presente Tesis Doctoral se pueden resumir como sigue:

1. Estudio mediante métodos de mecánica cuántica de la reacción de N-desmetilación de lisinas con diferentes grados de metilación catalizada por las desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C.

2. Analizar si existe relación entre la reacción de la N-desmetilación con la selectividad mostrada por las desmetilasas de histona con dominio Jmj-C sobre los substratos de lisina con diferentes grados de metilación.

3. Estudio mediante métodos mecanocuánticos de la reacción de N-desmetilación de aminas con diferentes grados de metilación catalizada por la familia de citocromos P450.

4. Estudiar computacionalmente mediante diferentes métodos si el modelo propuesto para las reacciones catalizadas por la familia de CYP450 es adecuado para determinar *in silico* los metabolitos primarios de fármacos. Como fármaco modelo de estudio hemos seleccionado el Tamoxifeno.

3. MÉTODOS COMPUTACIONALES

3.1 Introducción

Las enzimas son catalizadores naturales presentes en los organismos vivos que se encargan de favorecer multitud de reacciones químicas mediante la disminución de la energía de activación de los mismos (ver Figura 3.1). Este aumento de la velocidad de reacción se logra mediante el descenso de la energía del estado de transición (TS), en reacciones asociadas a la preorganización del sustrato y/o al aumento de energía del complejo reactivo.

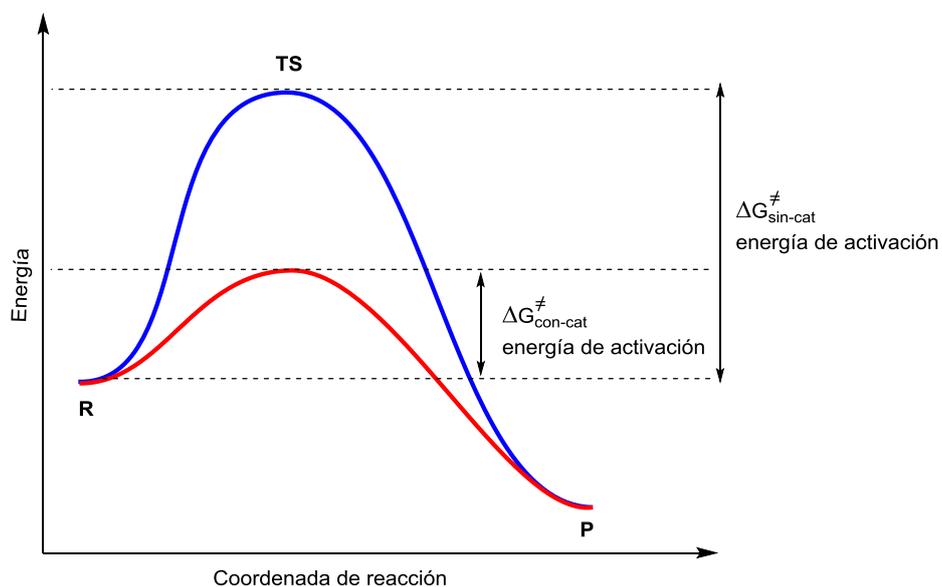


Figura 3.1. Coordenada de reacción correspondiente a una reacción sin catalizar (en azul) y catalizada (en rojo).

Desde un punto de vista experimental, la determinación del mecanismo mediante el cual las enzimas catalizan una reacción se ve nuevamente dificultada por la gran complejidad estructural y funcional de estas proteínas. Es en este punto donde resultan provechosas las simulaciones y modelizaciones moleculares, ya que complementan la información obtenida mediante las técnicas experimentales, facilitando la comprensión de dichos procesos. Así, la química computacional va más allá, proporcionando información acerca de las

reacciones químicas y de las estructuras geométricas y electrónicas de los estados de transición y de los intermedios de reacción.¹ Las estructuras de los estados de transición no se pueden determinar experimentalmente, y los intermedios de reacción no siempre se pueden obtener de esta forma. Además, es posible realizar también estudios computacionales *a priori*, sin que existan datos experimentales.

Por tanto, se puede concluir que las técnicas computacionales ayudan a entender qué ocurre en los procesos bioquímicos desde un punto de vista estructural y electrónico. A su vez, y teniendo en cuenta que una alteración de estos procesos bioquímicos puede estar relacionada con patologías, dichas herramientas pueden ser útiles en el diseño de nuevos fármacos. Un ejemplo de ello lo constituye la familia de los citocromos P450. Como se ha comentado en la introducción, estas enzimas se encargan de metabolizar numerosos fármacos. El poder predecir computacionalmente qué estructuras tendrán los metabolitos puede facilitar el diseño de principios activos más eficientes y menos tóxicos. Además, estas herramientas ayudan a entender y conocer los detalles de cómo realizan las enzimas su labor catalítica. Este es el caso de la Jmj-C o de la AlkB, ambas oxigenasas vinculadas con la epigenética, y por tanto, con modificaciones postranscripcionales relacionadas con enfermedades como el cáncer, el Alzheimer o el Parkinson. Además, debido a la elevada selectividad que presentan los sistemas enzimáticos, un mayor conocimiento de la estructura del sitio activo puede permitir diseñar nuevos catalizadores más eficientes.

¹ C. J. Cramer, in *Essentials of Computational Chemistry: Theory and Models*, 2nd ed.; Wiley Chichester, **2010**.

A continuación, se procederá a resaltar los puntos más importantes que se deben tener en cuenta a la hora de hacer cálculos computacionales con enzimas.

3.2 Elección de la estructura inicial

La modelización de reacciones químicas catalizadas por enzimas requiere partir de estructuras que se asemejen en la mayor medida posible a las reales. Así, es habitual coger como punto de partida datos de las estructuras de cristales de Rayos X. Dichas estructuras cristalinas deben representar con la mayor precisión posible el complejo enzima-sustrato que se desea estudiar. Para ello la mejor opción consiste en partir de estructuras cristalinas de complejos enzima-inhibidor. En ellas se puede observar cuál es el sitio activo de la enzima, y cómo se une al inhibidor, dando una idea de cuáles son los residuos más importantes a la hora de estudiar estos sistemas. Además, el complejo enzima-inhibidor muestra el modo de unión entre ambas estructuras que, en general, es parecido a la unión entre la enzima y el sustrato, tanto en el estado de transición como en el intermedio de reacción. Desafortunadamente, no siempre es posible aislar estos complejos, ya que a veces son demasiado reactivos.

Una vez seleccionada la estructura de Rayos X, ésta tiene que ser procesada, ya que no se dispone de las posiciones de los protones, que deben ser añadidos. Además, se deben colocar la enzima y el sustrato en un medio acuoso, bien incorporando explícitamente las moléculas de agua que no estén en la estructura, bien embebiendo la estructura en un medio dieléctrico que reproduzca las propiedades de un disolvente continuo.

Una vez que se dispone de la estructura inicial, el siguiente paso consiste en discernir el centro activo de la enzima, que puede estar formado por parte de la proteína unida, o no, a determinados cofactores.

Finalmente, el siguiente paso consiste en la elección del método computacional a seguir para optimizar las estructuras. Como se ha comentado, el estudio de estos sistemas biológicos está condicionado por el tamaño. Así, la elección del método se basa en elegir un modelo adecuado que aporte un buen equilibrio entre precisión y viabilidad en términos de tiempo de cálculo.

3.3 Métodos computacionales

A continuación, se procederá a resumir los métodos computacionales más empleados en la modelización molecular de enzimas para el estudio de mecanismos de reacción. Además, se detallarán los métodos escogidos en los estudios de la N-desmetilación por las desmetilasas de histona con dominio Jmj-C y de la N-desmetilación catalizada por la familia de los citocromos P450.

3.3.1 Métodos de Mecánica Molecular

La mecánica molecular (MM) se basa en las interacciones presentes entre los diferentes átomos, sin tratar explícitamente los electrones de una molécula. Básicamente, y de forma muy simplificada, este método describe los átomos como esferas de un radio determinado, que se unen entre sí mediante enlaces que se tratan como si fueran muelles que obedecen las leyes de osciladores armónicos clásicos. Estos métodos obtienen la energía total del sistema a partir de la ecuación siguiente:

$$E = \Sigma E_r + \Sigma E_\theta + \Sigma E_\omega + \Sigma E_{coul} + \Sigma E_{vdw} \quad (3.1)$$

Donde E es la energía total del sistema, E_r es la energía de tensión, E_θ es la energía de flexión, E_ω es la energía de torsión, E_{coul} es la energía correspondiente a las interacciones electrostáticas y E_{vdw} es la energía de van der Waals.

Estos métodos son útiles para analizar de forma rápida sistemas muy grandes. No obstante, su uso está limitado a las moléculas para las cuales el campo de fuerza está parametrizado. Además, no sirve para detallar ni el mecanismo de reacción, ni la reorganización electrónica involucrada en las reacciones químicas. Algunos de los métodos de MM más utilizados en el estudio de biomoléculas son: CHARMM,² AMBER,³ GROMOS⁴ y MMFF.⁵

Una aplicación que hace uso de esta metodología es el *docking*. El *docking* es el procedimiento empleado para predecir los posibles modos de unión y la interacción entre un compuesto y una macromolécula biológica, es decir, se analizan complejos de tipo ligando-receptor. Por ello, es una técnica muy

² a) B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, J. Comput. Chem. 1983, 4, 187-217; b) B. R. Brooks, C. L. Brooks, A. D. Mackerell, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caffisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, H. L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D. M. York, M. Karplus, J. Comput. Chem. 2009, 30, 1545-1614; c) K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, A. D. MacKerell, J. Comput. Chem. 2010, 31, 671-690.

³ a) J. M. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, J. Comput. Chem. 2004, 25, 1157-1174; b) D. A. Case, T. E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R. J. Woods, J. Comput. Chem. 2005, 26, 1668-1688.

⁴ a) W. R. P. Scott, P. H. Hunenberger, I. G. Tironi, A. E. Mark, S. R. Billeter, J. Fennen, A. E. Torda, T. Huber, P. Kruger, W. F. van Gunsteren, J. Phys. Chem. A 1999, 103, 3596-3607; b) C. Oostenbrink, A. Villa, A. E. Mark, W. F. Van Gunsteren, J. Comput. Chem. 2004, 25, 1656-1676.

⁵ T. A. Halgren, J. Comput. Chem. 1996, 17, 490-519.

utilizada en el diseño y descubrimiento de nuevos fármacos.⁶

El estudio completo requiere del análisis de todos los modos de unión entre el ligando y el receptor, cuantificados energéticamente. Con el fin de simplificar los cálculos, una primera aproximación consiste en considerar el sistema a analizar de forma rígida, fijando los grados internos de libertad excepto tres traslaciones y tres rotaciones. Se colocan las moléculas para que interactúen entre sí, y se analiza la energía correspondiente a dicha interacción. Por tanto, únicamente se evalúan las interacciones no enlazantes. Otra aproximación utilizada consiste en el uso de celdas tridimensionales mediante las que se acota el espacio alrededor del centro activo del receptor.

En este trabajo se han realizado unas pruebas de docking empleando el programa Glide,⁷ que hace uso del campo de fuerza MMFF.⁸

3.3.2 Métodos Mecanocuánticos

La modelización de reacciones químicas requiere de un método de computación capaz de describir la ruptura y la formación de los enlaces químicos. La mecánica cuántica (QM) describe explícitamente la distribución electrónica de una molécula para distintas configuraciones de núcleos, lo que hace que esté ampliamente extendida para el estudio de reacciones químicas.

⁶ a) T. Lazaridis, *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 1319-1332; b) B. K. Shoichet, S. L. McGovern, B. Q. Wei, J. J. John, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 439-446.

⁷ a) Glide, version 6.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015; b) R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, D. E. Shaw, M. Shelley, J. K. Perry, P. Francis, P. S. Shenkin, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739-1749; c) T. A. Halgren, R. B. Murphy, R. A. Friesner, H. S. Beard, L. L. Frye, W. T. Pollard, J. L. Banks, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750-1759.

⁸ a) T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 720-729; b) T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 730-748.

Existen diferentes métodos de QM, todos ellos basados en la ecuación de Schrödinger⁹ independiente del tiempo:

$$\hat{H}\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = E \Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \quad (3.2)$$

Donde \hat{H} es el hamiltoniano, $\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R})$ es la función de onda para todos los núcleos y electrones, y E es la energía asociada a esa función de onda. Esta expresión engloba la energía cinética y potencial de la molécula mediante el hamiltoniano, y depende de las posiciones nucleares \mathbf{R} y de las posiciones electrónicas \mathbf{r} . Esta ecuación no es posible resolverla exactamente para sistemas que contengan más de un electrón, siendo necesario hacer uso de aproximaciones para estos casos.

La aproximación de Born-Oppenheimer¹⁰ se basa en considerar de forma independiente los movimientos de los núcleos y de los electrones, dada la diferencia de velocidad entre éstos, más ligeros, y aquellos. Con esta aproximación no se incluye en la parte electrónica la energía cinética correspondiente al núcleo y se considera que la interacción Coulombica núcleo-núcleo es constante para una geometría molecular concreta. Esta constante debe ser añadida a la energía electrónica E_e . Así, se resuelve la ecuación de Schrödinger sólo con la parte electrónica, y dicha ecuación pasa a tener la expresión que se muestra en la Ec. 2.3, también conocida como ecuación electrónica de Schrödinger.

$$\hat{H}_e \Psi_e(\mathbf{r}; \mathbf{R}) = E_e(\mathbf{R}) \Psi_e(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \quad (3.3)$$

⁹ E. Schrödinger, *Phys. Rev.* **1926**, 28, 1049-1070.

¹⁰ M. Born, J. R. Oppenheimer, *Ann. Physik.* **1927**, 389, 457-484.

3.3.3 Métodos de mecánica cuántica y mecánica molecular (QM/MM)

Estos métodos combinan las ventajas de la precisión de los métodos QM con la rapidez de los métodos de MM descritos previamente. Tratan los átomos que participan directamente en la reacción mediante QM y el resto los tratan con MM. La parte cuántica suele ser relativamente pequeña comparando con la región de MM. Estos métodos fueron introducidos, entre otros, por Warshel y Levitt en los años 70.¹¹

Un método híbrido QM/MM obtiene la energía de las moléculas mediante la combinación de tres tipos de interacciones. Por un lado, recoge la interacción de los átomos situados en la región QM, por otro lado, agrupa las interacciones de los átomos de la región de MM, y por último se describe la interacción de los átomos de ambas regiones entre sí.

La ventaja fundamental de estos métodos consiste en que son válidos para analizar sistemas muy grandes de manera eficaz. La principal dificultad de aplicar esta metodología mixta consiste en establecer los límites entre ambas regiones (QM y MM) dentro del sistema.

3.3.4 Métodos de dinámica molecular

Las simulaciones clásicas de dinámica molecular¹² emplean ecuaciones de Newton para describir el movimiento de los átomos. Así, estos métodos obtienen la posición de los átomos mediante el cálculo de la aceleración y la velocidad. A diferencia de los métodos tratados hasta ahora, que eran independientes del tiempo, estos métodos no lo son. Así, estas simulaciones consisten en fijar un

¹¹ A. Warshel, M. Levitt, *J. Mol. Biol.* **1976**, 103, 227-249.

¹² J. A. McCammon, B. R. Gelin, M. Karplus, *Nature* **1977**, 267, 585-590.

periodo de tiempo determinado en el que se les permite a los átomos moverse e interactuar entre sí. De este modo se obtiene la evolución dinámica de los sistemas tratados. Estos métodos ofrecen información acerca de los cambios conformacionales que sufren las moléculas.

3.4 Cálculo de propiedades moleculares mediante métodos mecanocuánticos

Dependiendo de qué tipo de aproximación se realice para resolver la ecuación de Schrödinger, se pueden clasificar los métodos QM en métodos *ab initio*, métodos basados en la teoría de la densidad funcional (DFT) y métodos semiempíricos.

3.4.1 Métodos *Ab initio*

Estos métodos resuelven la ecuación de Schrödinger sin introducir parámetros obtenidos de datos experimentales. Las ecuaciones correspondientes incluyen constantes elementales como la masa del electrón o la constante de Planck. Con el fin de que las ecuaciones sean tratables en tiempos de cálculo razonables, se introducen las aproximaciones que se describen en los apartados siguientes.

3.4.1.1 Aproximación de Hartree-Fock

En la teoría de Hartree-Fock (HF),¹³ se considera que la distribución espacial de cada electrón no depende del movimiento de los demás electrones.

¹³ a) D. R. Hartree, *Proc. Camb. Philos. Soc.* **1928**, 24, 89-110; b) V. Fock, *Ann. Physik* **1930**, 61, 126-148.

En este método la función de onda total se obtiene mediante un determinante llamado de Slater¹⁴ que se muestra en la Ec. 3.4.

$$\Psi(1,2, \dots, n) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \phi_1(1) & \phi_2(2) & \dots & \phi_n(1) \\ \phi_1(1) & \phi_2(2) & \dots & \phi_n(1) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \phi_1(N) & \phi_2(N) & \dots & \phi_n(N) \end{vmatrix} \quad (3.4)$$

Donde N es el número total de electrones y ϕ es el orbital de espín, es decir, el producto del orbital espacial y la función propia del espín del electrón. El determinante de Slater asegura la antisimetría de la función de onda electrónica Ψ_e y satisface el Principio de Exclusión de Pauli. Es decir, dos electrones no pueden ser representados mediante el mismo conjunto de números cuánticos, y por tanto, Ψ_e debe cambiar el signo cuando hay intercambio en las coordenadas de dos electrones.

$$\Psi_e(1,2, \dots, i, \dots, k, n) = -\Psi_e(2,1, \dots, i, \dots, k, n) \quad (3.5)$$

Además, utilizando la aproximación de la combinación lineal de los orbitales atómicos, cada orbital molecular se expresa mediante la combinación lineal de orbitales atómicos:

$$\phi_i = \sum_r C_{ri} \chi_r \quad (3.6)$$

El orbital molecular, ϕ_i es representado como la suma de r orbitales atómicos χ_r , cada uno multiplicado por el coeficiente de expansión, C_r , de cada orbital atómico. Los orbitales moleculares se optimizan iterativamente sobre el

¹⁴ J. C. Slater, *Phys. Rev.* **1930**, 35, 210-211.

conjunto de coeficientes de expansión que permite obtener un mínimo energético. Este método se conoce como el Campo Auto Consistente.

En el método HF, la interacción electrón-electrón es aproximada como la interacción de un electrón con el resto de electrones considerados en conjunto. Esta aproximación es la principal limitación de la teoría HF. Este hecho hace que puedan producirse errores considerables en el cálculo de la energía total de las reacciones químicas. Los cálculos realizados con este método escalan computacionalmente a M^4 (donde M es el número de funciones de base, *vide infra*).

3.4.1.2 Bases atómicas

Como se ha visto en la Ec. 3.6, los orbitales moleculares ϕ_i son descritos mediante la combinación lineal de orbitales atómicos χ_r . A su vez, estos orbitales atómicos son descritos mediante la combinación lineal de funciones de base. La elección de las funciones de base es clave para poder obtener resultados precisos al realizar estudios teóricos. Dicha elección está condicionada por conseguir un buen equilibrio entre precisión y tiempo de cálculo ya que, a mayor tamaño de función de base se incrementa el tiempo de cálculo.

Existen diferentes tipos de funciones de base, pero nos centraremos únicamente en las funciones Gaussianas propuestas por Boys¹⁵ en 1950.

$$G_A(r) = \left(\frac{2\alpha}{\pi}\right)^{3/4} e^{-\zeta(r-R_A)^2} \quad (3.7)$$

¹⁵ S. F. Boys, *Proc. R. Soc. Lond.* **1950**, 200, 542-554.

Mediante las diferentes funciones de base se pretende obtener una función de onda que represente la mayor parte del espacio donde es posible hallar electrones. Por tanto, las funciones de base deben tener la suficiente flexibilidad como para permitir a los electrones moverse en regiones de alta y de baja densidad electrónica. Con este fin se desarrolló la aproximación de *split-valence basis set*, basada en aumentar el tamaño de la base creando orbitales similares, pero con distribución espacial diferente. Así, 6-31G es una de las bases más empleadas, donde los electrones internos (*core electrons*) se representan con seis gaussianas, y los electrones de valencia se dividen en tres gaussianas para la región interna y una gaussiana para la externa (ver Figura 3.2).

Frecuentemente, para la correcta descripción de sistemas con densidad electrónica significativa lejos de los núcleos, como en el caso de sistemas excitados o el caso de aniones, es necesario añadir funciones difusas. Las funciones difusas son versiones más extendidas que las funciones de tipo “s” y “p” usuales, que permiten que los orbitales ocupen una región más amplia del espacio. El uso de este tipo de funciones se indica con el símbolo + al lado de la función de base (ver Figura 3.2).

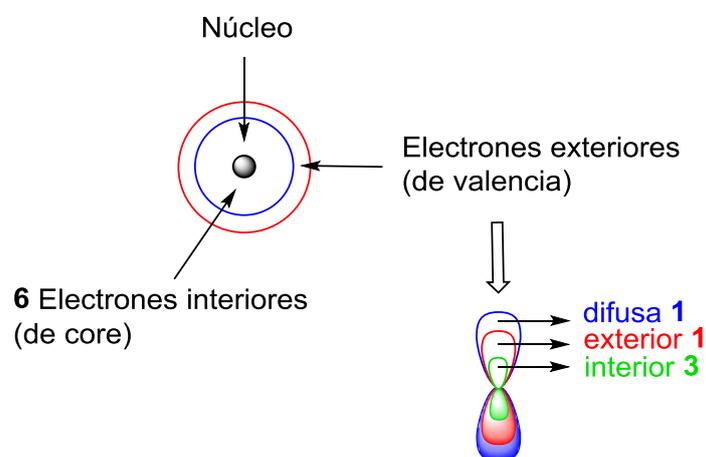


Figura 3.2. Descripción del Split-valence de las funciones de base 6-31+G.

Asimismo, la descripción de algunos enlaces o casos donde existen diferencias en la polarización, como ocurre en los puentes de hidrógeno, requiere el empleo de funciones polarizadas para describirlos adecuadamente. Estas funciones permiten sumar gaussianas con momento angular más amplio que el requerido por el estado fundamental para describir cada átomo. De este modo, tal y como se muestra en la Figura 3.3, la función 6-31G(d) indica que se han añadido funciones “d” para polarizar las funciones “p” en los átomos diferentes al hidrógeno. El caso del 6-31G(d,p) indica que adicionalmente se ha añadido polarización “p” a los orbitales “s” de los átomos de hidrógeno. Finalmente, cabe señalar que, con el fin de aumentar la precisión en la descripción de los electrones, se pueden proseguir el esquema de valencia dividida (*split valence*) pasando de doble z a triple z. Por ejemplo, un esquema 6-311G divide la región de valencia en tres dominios: uno interno (descrito mediante tres gaussianas), otro interno y otro externo (descrito cada uno de ellos mediante una gaussiana).

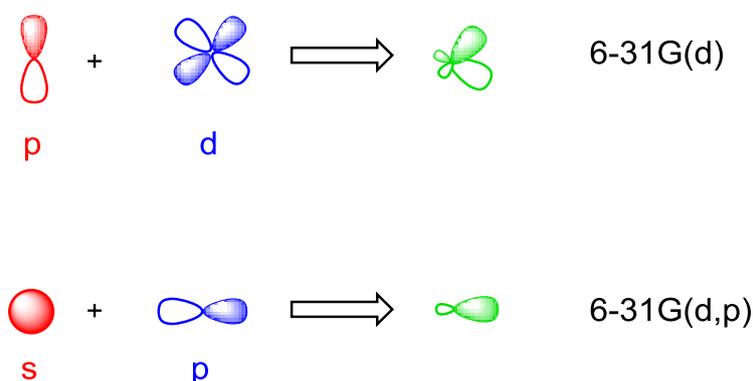


Figura 3.3. Representación esquemática de la inclusión de la función de polarización en la función de base 6-31G.

Los sistemas que engloban elementos pesados que poseen un elevado número de electrones son computacionalmente caros, ya que requieren de multitud de funciones de base para describirlos correctamente.

En este sentido, Hellman¹⁶ propuso describir los electrones internos empleando funciones analíticas. Este tipo de función se denomina potencial efectivo de core o pseudopotencial. A día de hoy, uno de los pseudopotenciales más habituales es el desarrollado por Hay y Wadt,¹⁷ conocido como Los Alamos National Laboratory o LANL.

A modo de ejemplo se muestra en la Figura 3.4 la configuración electrónica del hierro. El pseudopotencial LANL2DZ describe los 18 electrones internos con funciones analíticas y trata los electrones de valencia con la función de base doble zeta.

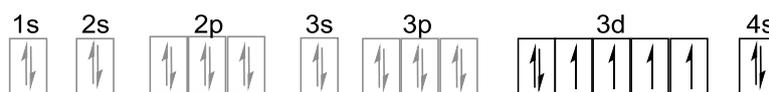


Figura 3.4. Configuración electrónica del hierro (Fe^0). Los electrones de valencia corresponden a los orbitales atómicos 3d y 4s.

La optimización y el cálculo de frecuencias de las geometrías¹⁸ de este trabajo se han realizado empleando la base *split-valence* 6-31G(d,p) para C, H, N y O, y con LanL2DZ para el hierro. Además, se han realizado cálculos de energía de todos los puntos estacionarios para una mejor descripción de la superficie de energía potencial empleando la base 6-311+G(2d,2p) y LanL2DZ para el hierro.

¹⁶ H. Hellmann, *J. Chem. Phys.* **1935**, 3, 61-61.

¹⁷ P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 299-310.

¹⁸ Jr. J. W. Mclver, A. Komornicki, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 2625-2633.

3.4.1.3 Métodos Post Hartree-Fock y Multiconfiguracionales

Los métodos HF sobreestiman la repulsión electrón-electrón y la energía total. Por ello, se debe calcular la energía de correlación, E_{corr} , que se define como la diferencia entre la energía exacta (experimental), E , y la energía Hartree-Fock, E_{HF} , obtenida mediante el mejor conjunto de funciones disponible (*vide infra*).

$$E_{corr} = E - E_{HF} \quad (2.8)$$

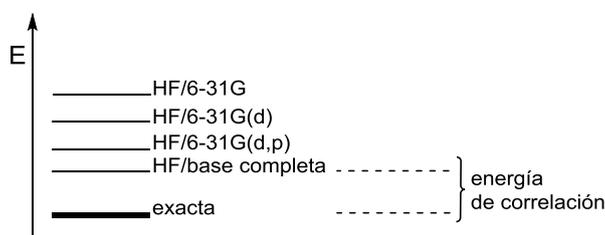


Figura 3.5. Representación esquemática de la diferencia entre la energía exacta y la energía obtenida con diferentes niveles de teoría.

Muchos de los métodos *ab initio* parten de la energía HF y después la modifican con el fin de incluir la energía de correlación. Estos métodos son los denominados métodos post-Hartree-Fock. Así, la teoría de perturbación de Møller-Plesset,¹⁹ parte del hamiltoniano monoeléctrico al que añaden la correlación electrónica como una perturbación de tipo Royleigh-Schrödinger. Normalmente estas perturbaciones se calculan hasta el 2º orden (MP2). En ocasiones y para sistemas pequeños dichas perturbaciones se extienden hasta los órdenes tercero y cuarto (MP3 y MP4, respectivamente). Otra teoría se basa

¹⁹ C. Moller, M. S. Plesset, *Phys. Rev.* **1934**, 46, 618-622.

en la interacción de configuraciones, CI,²⁰ que desarrolla la función de onda como una combinación lineal con coeficientes variables de un gran número de determinantes de Slater. Dentro de este método el más exacto corresponde al *full CI*, donde se expresa la función de onda como la combinación lineal de todas las configuraciones electrónicas posibles del sistema. Otro grupo de metodologías post-Hartree-Fock a destacar es la de los métodos *coupled cluster*,²¹ especialmente CCSD(T). Este método es considerado de referencia para cálculos teóricos, aunque su elevado coste computacional hace que sólo sea factible para sistemas pequeños. Además, es posible combinar varios métodos entre sí, lo que se conoce como métodos compuestos, como por ejemplo el método G2.²²

La energía electrónica de un sistema definido por varias configuraciones electrónicas nunca puede ser descrita correctamente mediante un determinante simple. El método HF tiene un carácter monodeterminantal y, por tanto, resulta inadecuado para describir situaciones en las que hay varias configuraciones electrónicas que están degeneradas o que tienen energías muy próximas entre sí. Es decir, no tienen en cuenta la *correlación no-dinámica*. Para ello se debe recurrir, por ejemplo, a los métodos multiconfiguracionales, que definen la función de onda como una combinación lineal de determinantes de Slater. Entre ellos, el CASSCF es el método donde se incluyen todas las combinaciones de

²⁰ a) J. B. Foresman, M. Head-Gordon, J. A. Pople, M. J. Frish, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 135-149; b) M. Head-Gordon, R. J. Rico, M. Oumi, T. J. Lee, *Chem Phys. Lett.* **1994**, *219*, 21-29; c) M. Head-Gordon, D. Maurice, M. Oumi, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *246*, 114-121.

²¹a) R. J. Bartlett, G. D. Purvis, *Int. J. Quantum Chem.* **1978**, *14*, 561-581; b) J. A. Pople, R. Krishnan, H. B. Schlegel, J. S. Binkley, *Int. J. Quantum Chem.* **1978**, *14*, 545-560; c) G. E. Scuseria, C. L. Janssen, H. F. Schaefer, *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 7382-7387; d) G. E. Scuseria, H. F. Schaefer, *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 3700-3703.

²² L. A. Curtiss, K. Raghavachari, G. W. Trucks, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1991**, *94*, 7221-7230.

los orbitales espaciales activos, es decir, se consideran todas las excitaciones posibles dentro de un subespacio del número total de orbitales.

Estas variaciones para incluir la *correlación dinámica* y la *correlación no dinámica* mejoran considerablemente los cálculos obteniendo valores de energía más precisos, a costa de un mayor coste computacional, ya que el escalado de estos métodos oscila entre el M^5 del MP2 hasta el M^7 del *coupled cluster*. Por tanto, estos métodos son sólo factibles en sistemas de pocos átomos y electrones.

Finalmente, se debe citar el método de pares naturales de orbitales de dominio local, DLPNO-CCSD(T) con excitaciones dobles y estimación de las triples.²³ Dicho método combina la aproximación de los pares naturales de orbitales²⁴ con el *coupled cluster* con excitaciones dobles y estimación de las triples. Con ello se obtienen valores que recogen una gran parte de la energía de correlación. Además, es válido para analizar sistemas compuestos con centenares de átomos y con bases atómicas aceptables, por lo que se está convirtiendo en uno de los métodos actuales de referencia.

3.4.2 Métodos semiempíricos

El nombre de estos métodos tiene su origen en la combinación de los métodos HF con datos experimentales para resolver la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo. Es decir, evalúan la ecuación de HF, pero algunos de sus términos más costosos computacionalmente son parametrizados a partir de

²³ a) C. Riplinger, F. Neese, *J. Chem. Phys.* **2013**, *138*, 034106; b) C. Riplinger, B. Sandhoefer, A. Hansen, F. Neese, *J. Chem. Phys.* **2013**, *139*, 134101.

²⁴ a) F. Neese, A. Hansen, D. G. Liakos, *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 064103; b) F. Neese, F. Wennmohs, A. Hansen, *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 114108.

datos experimentales. De este modo, la energía de correlación se incluye implícitamente mediante la parametrización. Los métodos semi-empíricos más conocidos son AM1²⁵ y la serie PM3-6²⁶. Son métodos mucho menos costosos computacionalmente y su precisión y fiabilidad depende de que el sistema estudiado esté incluido en el espacio de parametrización.

3.4.3 Teoría de la Densidad Funcional

A diferencia de los métodos descritos, la teoría de la densidad funcional,²⁷ DFT, emplea otro tipo de aproximación para obtener la energía y la geometría de las moléculas. Los métodos citados hasta ahora se basan en la función de onda que depende de las coordenadas x , y , z y espín de cada electrón. Sin embargo, existe una forma más simple de obtener esta función de onda que consiste en emplear la densidad electrónica total, $\rho(\mathbf{r})$. Este término depende de sus tres variables espaciales y es un parámetro físico observable. Todo ello conlleva que el escalado de esta metodología es de M^3 . Por tanto, en principio los cálculos DFT son más rápidos que los métodos descritos previamente.

En 1964, Hohenberg y Kohn²⁸ plantearon un teorema donde argumentaron que la energía y las propiedades de las moléculas en el estado fundamental están determinadas únicamente por la $\rho(\mathbf{r})$ del estado fundamental.

$$E = E[\rho(\mathbf{r})] \quad (3.9)$$

²⁵ M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902-3909.

²⁶ J. J. P. Stewart, *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 209-220.

²⁷ J. P. Foster, F. Weinhold, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7211-7218.

²⁸ P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev. B* **1964**, *136*, B864.

De esta forma, la densidad electrónica depende del número total de electrones, N , presente en una molécula.

$$\int \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = N \quad (3.10)$$

Aunque la teoría es en principio exacta, su implementación computacional requiere del uso de aproximaciones. Así, en lugar de emplear el determinante de Slater para obtener la función de onda, la densidad electrónica viene dada por los orbitales Kohn-Sham.²⁹

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^N |\phi_i(\mathbf{r})|^2 \quad (3.11)$$

Las metodologías DFT obtienen la energía de las moléculas mediante la siguiente ecuación:

$$E[\rho(\mathbf{r})] = T_{ni}[\rho(\mathbf{r})] + V_{ne}[\rho(\mathbf{r})] + V_{ee}[\rho(\mathbf{r})] + \Delta T[\rho(\mathbf{r})] + \Delta V_{ee}[\rho(\mathbf{r})] \quad (3.12)$$

Donde T_{ni} corresponde a la energía cinética electrónica, V_{ne} es la energía potencial de atracción núcleo-electrón, V_{ee} hace referencia a la repulsión electrón-electrón, y los últimos términos corresponden a la energía de intercambio-correlación. Así, ΔT hace referencia a la corrección de la energía cinética derivada de la interacción de electrones, y ΔV_{ee} recoge las interacciones no clásicas de la repulsión electrón-electrón.

Debido a la dificultad de calcular la función de intercambio-correlación, se han efectuado gran cantidad de aproximaciones, siendo las más tradicionales la aproximación de densidad local y la aproximación del gradiente generalizado. Además, existen los funcionales híbridos, que combinan los funcionales de

²⁹ W. Kohn, L. J. Sham, *Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133.

intercambio puros de DFT con el término de intercambio de HF. A continuación, se explica brevemente el funcional B3LYP, que es uno de los métodos DFT más utilizados y la metodología empleada en esta Tesis Doctoral.

3.4.3.1 Funcional B3LYP

Este funcional híbrido corresponde a la combinación del funcional analítico de intercambio propuesto por Becke,³⁰ con el funcional de correlación de Lee, Yang y Parr.³¹ De acuerdo a este método, la energía de intercambio-correlación se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$E_{xc}^{B3LYP} = (1 - a)E_x^{LSDA} + aE_x^{HF} + b\Delta E_x^B + (1 - c)E_c^{LSDA} + cE_c^{LYP} \quad (3.13)$$

Donde los valores de los parámetros a , b y c son 0.20, 0.72 y 0.81, respectivamente. E_x^{LSDA} es el funcional de intercambio, que depende de la densidad de espín, E_x^{HF} es el funcional de intercambio exacto de HF, E_x^B es el funcional de intercambio de Becke, E_c^{LSDA} es el funcional de correlación y E_c^{LYP} es el funcional de correlación definido por Lee, Yang y Parr.

Los resultados obtenidos utilizando el funcional B3LYP son bastante precisos y con un coste de computación aceptable. Además, este funcional posee una amplia trayectoria como método en el estudio de reacciones catalizadas con hierro, tanto en sistemas del tipo hemo, como en sistemas no-

³⁰ a) A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098-3100; b) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652; c) W. Kohn, A. D. Becke, R. G. Parr, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 12974-12980.

³¹ C. T. Lee, W. T. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.

hemo.³² Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Chen y colaboradores³³ en el estudio de la abstracción del hidrógeno del metano con diferentes modelos no-hemo con Fe(IV)=O en el centro catalítico empleando el método CCSD(T) y doce métodos DFT. Estos autores concluyeron que el funcional híbrido B3LYP es el más adecuado para el análisis de sistemas donde la reactividad varía entre estados de espín. Por tanto, los estudios computacionales descritos en este trabajo han sido realizados mediante el funcional B3LYP implementado en el paquete de programas de Gaussian 09.³⁴

3.5 Tratamiento de la energía de dispersión

Las fuerzas de dispersión se dan entre átomos y moléculas no unidos entre sí mediante enlaces químicos. Estas fuerzas surgen como consecuencia de interacciones instantáneas dipolo-dipolo inducido o dipolo inducido-dipolo inducido y son atractivos a larga distancia y repulsivos a distancias más cortas que la suma de los valores de van der Waals. Puesto que el DFT es una teoría completa, en principio las interacciones de London-van der Waals deberían ser descritas por los funcionales correspondientes. Sin embargo, por cuestiones que

³² a) E. I. Solomon, A. Decker, N. Lehnert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3589-3594; b) T. Borowski, P. E. M. Siegbahn, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12941-12953; c) M. -S. Liao, M. -J. Huang, J. D. Watts, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 9554-9569; d) S. Ye, F. Neese, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 1228-1233; e) A. S. Faponle, M. G. Quesne, C. V. Sastri, F. Banse, S. P. de Visser, *Chem. -Eur. J.* **2015**, *21*, 1221-1236; f) V. Postils, A. Company, M. Solà, M. Costas, J. M. Luis, *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 8223-8236; g) D. Sahoo, M. G. Quesne, S. P. de Visser, S. P. Rath, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 4796-4800; h) B. Wang, Z. Cao, D. A. Sharon, S. Shaik, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 7077-7090.; i) S. F. Ye, J. C. Price, E. W. Barr, M. T. Green, J. M. Bollinger, C. Krebs, F. Neese, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4739-4751; j) A. Altun, J. Breidung, F. Neese, W. Thiel, *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10*, 3807-3820; k) W. A. Cortopassi, R. Simion, C. E. Honsby, T. C. C. Franca, R. S. Paton, *Chem. -Eur. J.* **2015**, *21*, 18983-18992; l) B. K. Mai, Y. Kim, *Angew., Chem. Int. Ed.* **2015**, *45*, 3946-3951; m) K. D. Dubey, B. Wang, S. Haik, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 837-845; n) Y. Sun, H. Tang, K. Chen, L. Hu, J. Yao, S. Shaik, H. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3715-3730; ñ) R. Ramanan, K. D. Dubey, B. Wang, D. Mandal, S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 6786-6797.

³³ H. Chen, W. Lai, S. Shaik, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 1533-1540.

³⁴ Gaussian 09, Revision E01, M. J. Frisch et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.

no cabe discutir aquí, no suele ser el caso. En particular, el funcional B3LYP no describe adecuadamente la energía de dispersión. Para ello se han desarrollado diferentes aproximaciones en DFT. El funcional no localizado de DFT-D es una de las aproximaciones existentes.³⁵

La energía total del sistema es la suma de la energía Kohn-Sham y la energía de dispersión. Este último término se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$E_{disp}^{DFT-D} = - \sum_{AB} \sum_{n=6,8,10} S_n \frac{C_n^{AB}}{R_{AB}^n} f_{damp}(R_{AB}) \quad (2.14)$$

Donde se considera la suma de la contribución atractiva de todos los pares de átomos del sistema (AB), que dependen del coeficiente de dispersión C_n^{AB} a orden n, (n=6,8,10...), y R_{AB} es la distancia comprendida entre dos núcleos de los átomos AB. El factor de escalado S_n se emplea para ajustar la corrección del comportamiento repulsivo del funcional de la densidad.

El término de expansión de la ecuación con el valor de n=6 (D3) asegura el correcto comportamiento asintótico del potencial. Esta aproximación es fácil de programar y es rápida, por lo que no supone prácticamente tiempo de cálculo adicional. En los cálculos realizados en la presente Tesis Doctoral se les ha añadido el efecto de la dispersión D3 de Grimme³⁶ con el factor de amortiguación de Becke-Johnson.³⁷

³⁵ S. Grimme, A. Hansen, J. G. Brandenburg, C. Bannwarth, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 5105-5154.

³⁶ S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg, *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104-154119.

³⁷ a) E. R. Johnson, A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 174104; b) S. Grimme, S. Ehrlich, L. Goerigk, *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 1456-65.

3.6 Tratamiento del disolvente

La inmensa mayoría de las reacciones químicas ocurren en disolución, por lo que a la hora de realizar los cálculos deben considerarse los efectos del disolvente para poder realizar una coordenada de reacción correcta. Para ello existen dos métodos computacionales diferentes, donde se incluyen las moléculas de disolvente, bien explícitamente, o bien implícitamente. Asimismo, es posible combinar ambos métodos.³⁸

La primera aproximación considera explícitamente moléculas de disolvente alrededor de los reactivos. El número de moléculas que se pueden añadir es grande, pero es un número finito. Además, mediante este método se pueden tratar mecanocuánticamente las moléculas de solvente que están coordinadas con el centro activo, y que pueden estar involucradas en la ruptura y formación de enlaces. El resto de las moléculas de disolvente se tratan con métodos de mecánica molecular. La principal ventaja de esta aproximación es que se consideran las interacciones existentes entre soluto y disolvente de manera explícita, obteniendo así un resultado más cercano a la realidad. Esta metodología tiene el inconveniente de que se incrementa el tiempo de cálculo con el mínimo de moléculas de disolvente considerados.

La segunda aproximación considera las interacciones entre el soluto y el disolvente simplificando este último como un dieléctrico continuo de extensión infinita. Dicha descripción se caracteriza por su constante dieléctrica, también conocida por permitividad relativa, ϵ . Este valor corresponde a la constante dieléctrica experimental del disolvente a la temperatura y presión de la

³⁸ J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999-3094.

disolución. En esta metodología se coloca el soluto dentro de una cavidad en el seno del dieléctrico. La principal ventaja de esta aproximación radica en que no tiene un sobrecoste elevado en tiempo de cálculo.

Existen diferentes aproximaciones para calcular el efecto del disolvente implícitamente. Estas difieren en el tamaño y la forma de la cavidad donde se coloca el soluto, además de en la forma de calcular la interacción entre el soluto y el solvente. En el presente trabajo, el efecto del solvente ha sido incluido en todos los cálculos (optimización, análisis vibracional, coordenada de reacción intrínseca) con el Modelo del continuo polarizable (Polarizable Continuum Model, PCM).³⁹ En este modelo cada núcleo atómico de la molécula de soluto está rodeado por una esfera de radio 1.2 veces el radio de van der Waals. Teniendo en cuenta que los modelos estudiados representan los centros activos de diferentes enzimas con un entorno diferente, y por tanto, con un entorno dieléctrico diferente, se ha utilizado el valor estándar de solvatación de agua como referencia ($\epsilon=78.39$). Las energías relativas en solución han sido calculadas para el estado estándar 1M.⁴⁰

3.7 Caracterización puntos estacionarios y puntos de cruce de mínima energía entre estados de espín

3.7.1 Superficies de energía potencial

Mediante los diferentes métodos descritos previamente se obtienen valores de energía para un conjunto de átomos o moléculas. Éstas pueden estar

³⁹ M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, V. Barone, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 669-681.

⁴⁰ a) C. P. Kelly, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16066-16081; b) C. P. Kelly, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 1408-1415.

descritas, bien por coordenadas cartesianas, o bien por distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros. Se consigue, dentro de la aproximación de Born-Oppenheimer, la superficie (o hipersuperficie) de energía potencial (PES), al representar la energía total con respecto a diferentes disposiciones nucleares (ver Figura 3.6).⁴¹

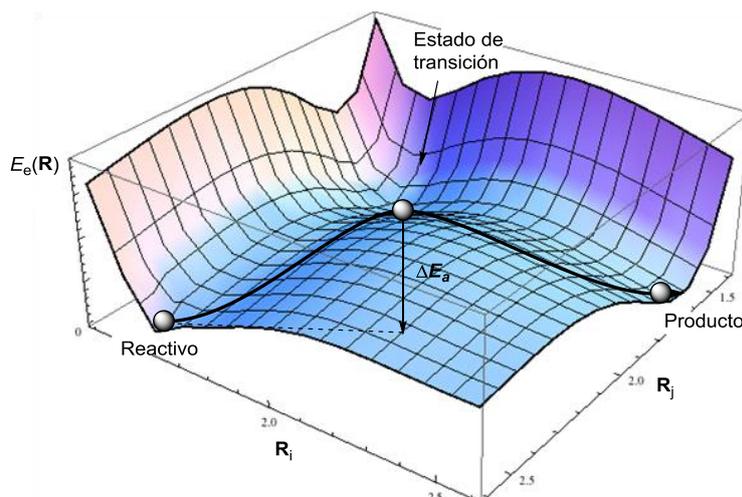


Figura 3.6. Representación de la superficie de la energía electrónica $E_e(\mathbf{R})$ proyectado en las coordenadas nucleares R_i y R_j . Se indican también el reactivo, el estado de transición, el intermedio y el producto de la reacción.

De todos los posibles puntos de la PES, los puntos que resultan más interesantes desde un punto de vista químico son los puntos estacionarios. Se denominan puntos estacionarios a los puntos en los que el gradiente de la energía con respecto a las coordenadas es cero. Desde el punto de vista químico, los puntos estacionarios corresponden a los mínimos locales, es decir, a los reactivos, intermedios de reacción y productos, así como a los estados de transición.

⁴¹ F.P Cossío, in Calculation of Kinetic data Using Computational Methods. in Rate Constant Calculation for Thermal Reactions, (Eds.: H. DaCosta, M. Fan), Willey, Hoboken, NJ, 2012, pp. 33-65.

En los mínimos locales, la segunda derivada de la energía electrónica respecto a las coordenadas nucleares es positiva. Los estados de transición, por el contrario, son los puntos de máxima energía a lo largo de la coordenada de reacción. Por lo tanto, la segunda derivada de la energía electrónica respecto a las coordenadas siempre es positiva o igual a cero, a excepción de la coordenada asociada a la reacción química que se considera, ($E = \frac{1}{2}kx^2$) donde es negativa.

Dentro de la aproximación de un oscilador armónico simple de masa reducida $\mu = m_1m_2/m_1 + m_2$, la energía potencial es descrita mediante una parábola de forma $V = \left(\frac{1}{2}\right)kx^2$. La constante de enlace asociada a la reacción química considerada está relacionada con la energía potencial según la ecuación siguiente:

$$k = \frac{d^2V(x)}{dx^2} \quad (3.15)$$

Así, la frecuencia correspondiente a esta vibración se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3.16)$$

Por tanto, la segunda derivada de los puntos estacionarios respecto a las coordenadas nucleares aporta la constante de fuerza y la frecuencia correspondiente al modo de vibración normal. La matriz que se forma de esta segunda derivada respecto a las coordenadas nucleares se denomina matriz de

la constante de fuerza o Hesiano. La diagonalización del Hesiano incluye la información de las constantes de fuerza y de las frecuencias correspondientes a los modos de vibración normales. Como se ha indicado, en los mínimos locales la segunda derivada de la energía es positiva, y se dice que el Hessiano es positivo. Por el contrario, en los estados de transición, dado que la segunda derivada respecto de la coordenada de reacción es negativa, la frecuencia asociada tomará un valor imaginario, según la Ec. 3.16.

3.7.2 Reactividad en dos estados

En general, las reacciones químicas ocurren en una sola PES con el mismo estado de espín. Esto implica que tanto los intermedios de reacción, como los estados de transición poseen el mismo estado de espín que los reactivos y los productos (ver Figura 3.7a). En estos casos, la velocidad de reacción dependerá de la energía de activación.

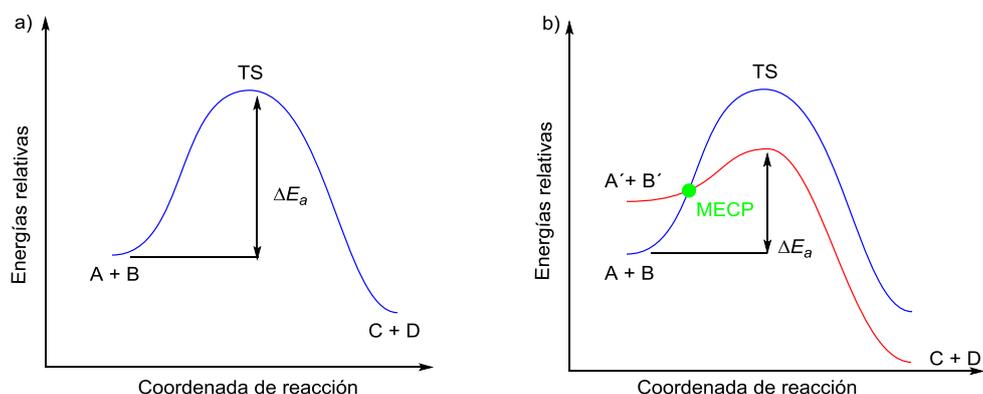


Figura 3.7. Perfiles energéticos de a) reacción con reactividad en un estado de espín y b) reacción con reactividad en dos estados de espín.

No obstante, en los casos en los que existan orbitales formalmente ocupados y vacíos próximos en energía, como en sistemas con compuestos que contengan metales de transición de la primera fila (Fe, Co, Ni), es muy común

que la reacción transcurra en diferentes estados de espín. En este tipo de reacciones (ver Figura 3.7b) el paso de los reactivos a los productos no ocurre necesariamente en el mismo estado de espín, ya que si se produce el cambio de espín puede disminuir la energía de activación y, por tanto, la reacción puede transcurrir por esa vía. Los puntos de cruce donde se solapan las PES de sistemas con diferentes espines se denominan puntos de cruce de mínima energía (MECP).

Debido a que tanto las desmetilasas de histona con dominio Jmj-C como la familia de los Citocromos P450 poseen un átomo de hierro en el centro activo, cabe esperar que las reacciones en las que participan se produzcan en diferentes estados de espín.

Los MECPS entre dos hipersuperficies de energía potencial asociados a los diferentes estados de espín han sido caracterizados y localizados mediante el programa desarrollado por Harvey y colaboradores.⁴² Para que la transición entre dos superficies adiabáticas de diferente espín electrónico sea efectiva es necesario que tenga una probabilidad de cambio de espín suficientemente elevada. Para calcular esta probabilidad de transición en la geometría del MECPS se ha utilizado el modelo de Landau-Zener.⁴³

$$p(i) = 1 - \exp \left[-\frac{2\pi H(i)_{SOC}^2}{\hbar v(i) \Delta F(i)} \right] \quad (3.17)$$

⁴² J. N. Harvey, M. Aschi, H. Schwarz, W. Koch, *Theor. Chem. Acc.* **1998**, 99, 95-99.

⁴³ a) A. I. Chichinin, *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 6018-6018; b) C. Wittig, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 8428-8430; c) J. S. Hess, D. J. Doren, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 8206-8210; d) M. R. Manaa, D. R. Yarkony, *J. Chem. Phys.* **1991**, 95, 1808-1816.

Los términos expresados en la ec. (3.17) son los siguientes: $H(i)_{SOC}$ es el acoplamiento espín-orbita obtenido de los elementos no diagonales de la matriz Hamiltoniana entre los correspondientes estados de espín correspondientes al MECP. Este término ha sido calculado con el programa MolSOC⁴⁴ sobre la geometría del MECP previamente optimizada a nivel UB3LYP/6-31G(d,p). Los elementos de la matriz del acoplamiento espín-orbita se han determinado mediante el operador de Breit-Pauli.⁴⁵ Por otro lado, $\Delta F(i)$ es la diferencia entre las pendientes de las curvas energía/coordenada de reacción de los diferentes estados de espín cuyo punto de cruce es el MECP que conecta los reactivos con los respectivos estados de transición. Finalmente, $v(i)$ es la velocidad de paso por el MECP, que se puede aproximar a la velocidad promedio en una distribución de Maxwell-Boltzmann:

$$v(i) = \sqrt{\frac{k_B T}{2\pi\mu(i)}} \quad (3.18)$$

donde $\mu(i)$ es la masa reducida de los sistemas que interaccionan a lo largo de la coordenada de reacción, es decir, el centro activo de la enzima y el sustrato correspondiente.

⁴⁴ a) S. G. Chiodo, *MolSOC*, version 0.1, **2012**; b) S. G. Chiodo, M. Leopoldini, *Comp. Phys. Commun.* **2014**, *185*, 676-683; c) A. D. Quartarolo, S. G. Chiodo, N. Russo, *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 3176-3189; d) A. D. Quartarolo, S. G. Chiodo, N. Russo, *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 1091-1100.

⁴⁵ G. Breit, *Phys. Rev.* **1932**, *39*, 616-624.

4. REACCIÓN DE DESMETILACIÓN DE RESIDUOS DE LISINA CATALIZADA POR DESMETILASAS DE HISTONAS CON DOMINIO Jmj-C

The N-demethylation reactions of N,N,N-trimethylpropan-1-ammonium and N,N-dimethyl- and N-methylpropan-1-aminium cations in the presence of [(AcO)₂(imidazole)₂(H₂O)Fe=O] complex have been studied by density functional theory. These transformations are suitable models for the N-demethylation of tri-, di-, and monomethylated lysine residues of histones in the presence of Jumonji-C containing histone demethylases. It has been found that the N-demethylation reaction is stepwise and occurs on triplet and quintet potential energy hypersurfaces. Both spin states are nearly degenerated and the quantum jump from one state to another has a transition probability close to one. The preferred intrinsic mechanism depends upon the methylation degree. For trimethylated residues the mechanism consists of a proton abstraction from a methyl group followed by a formation of a hydroxymethylaminium intermediate.

This mechanism also occurs when dimethylated residues are able to orientate one methyl group towards the Fe=O group of the catalytic site. In contrast, when a N-H group of the substrate is close enough to the Fe=O group, the intrinsically preferred N-demethylation reaction leads to the formation of an iminium intermediate that can be hydrolyzed to form the corresponding N-demethylated product.

4.1 Epigenética

La epigenética hace referencia a los cambios reversibles de enlaces covalentes que se producen en el ácido desoxirribonucleico (ADN) o en sus proteínas asociadas. Este concepto comenzó a considerarse en 1975, cuando diversos autores postularon que el patrón de metilación del ADN podía ser el responsable del mantenimiento de la expresión de los genes durante la división celular.¹ Estas modificaciones son heredables tanto por mitosis como por meiosis y no afectan a la secuencia de nucleótidos del ADN. Dicho de otro modo, el término epigenética hace referencia a la información transportada por el genoma que no está codificada por la secuencia de bases del ADN. Por tanto, se ve alterado el fenotipo, que incluye las propiedades observables de un organismo, sin que se altere el genotipo, que hace referencia al contenido genético del mismo.

El resultado de estos cambios conlleva la activación o la represión de la transcripción, es decir, se modifica la expresión de genes. En este sentido, se conoce que la regulación del grado de metilación de histonas juega un papel importante en multitud de procesos biológicos, tales como la regulación del ciclo celular, la formación de heterocromatina, la inactivación del cromosoma X y en la regulación de la transcripción.² Por ello, cualquier cambio que afecte al grado de metilación, como al resto de posibles alteraciones de las histonas, contribuye al desarrollo de diversas patologías como el cáncer, o a diversas enfermedades

¹a) R. Holliday, J. E. Pugh, *Science* **1975**, *187*, 226-232; b) A. D. Riggs, *Cytogenet. Cell. Genet.* **1975**, *14*, 9-25.

² C. Martin, Y. Zhang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 838-849.

del sistema nervioso central.³ Como consecuencia de ello, en los últimos años se viene produciendo un gran interés por el estudio de los mecanismos epigenéticos, donde las herramientas computacionales son muy valiosas, así como en el diseño de nuevos fármacos vinculados al tratamiento de procesos oncológicos y neurodegenerativos.⁴

El ADN es un polímero de desoxinucleótidos unidos por enlaces 3'-5' fosfodiéster. En dicho polímero las dos hebras de ADN antiparalelas se entrelazan mediante la interacción por enlaces de hidrógeno entre bases nitrogenadas, constituyendo así la doble hélice de ADN. Las células eucariotas han desarrollado un sistema de empaquetamiento para poder albergar el material genético en el núcleo. Así, para llevar a cabo esta función la evolución ha seleccionado unas proteínas de carácter básico denominadas histonas.⁵ Dichas proteínas contienen un pequeño dominio globular y una hebra rica en grupos amino terminales que están cargados positivamente, lo que permite que mediante interacciones electroestáticas, el ADN se enrolle alrededor de las histonas minimizando así la repulsión entre grupos fosfato.

Tal y como se puede observar en la Figura 4.1, las histonas se organizan en octámeros formados por dos unidades de histonas H2A, dos unidades de histonas H2B, dos unidades de histonas H3 y otras dos unidades de H4. El conjunto formado por el bucle de ADN, que contiene 146 pares de bases

³a) G. Egger, G. N. Liang, A. Aparicio, P. A. Jones, *Nature* **2004**, *429*, 457-463; b) J. W. Hojfeldt, K. Agger, K. Helin, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 917-930; c) T. Abel, R. S. Zukin, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, *8*, 57-64.

⁴ a) B. C. Smith, J. M. Denu, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1789*, 45-57; b) N. A. Vellore, R. Baron, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 484-494; c) W. A. Cortopassi, K. Kumar, F. Duarte, A. S. Pimentel, R. S. Paton, *J. Mol. Graph. Model.* **2016**, *67*, 69-84.

⁵ M. M. Müller, T. W. Muir, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2296-2349.

enrollados en torno a este octámero, se denomina nucleosoma.⁶ La unión de los diferentes nucleosomas se realiza mediante el ADN espaciador y las histonas H1. A su vez, estos nucleosomas se disponen en una estructura compacta llamada cromatina, que se ancla a proteínas de la lámina nuclear, permitiendo así el empaquetamiento del ADN en un espacio reducido.

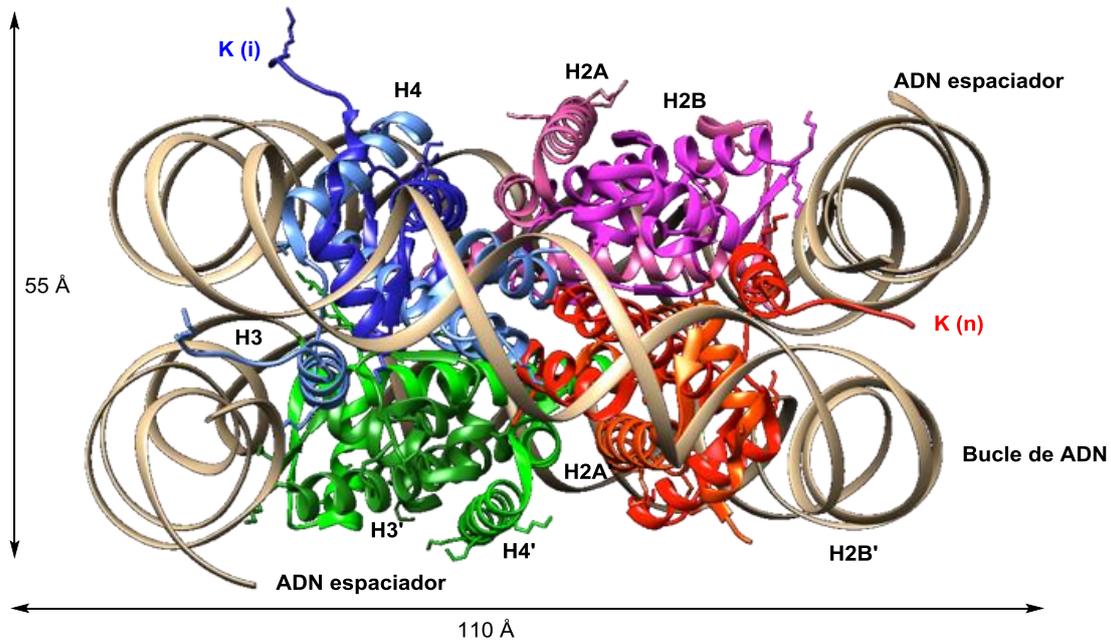


Figura 4.1. Visión lateral de la estructura de un nucleosoma. Figura construida a partir de las coordenadas publicadas en el fichero pdb 1AOI.

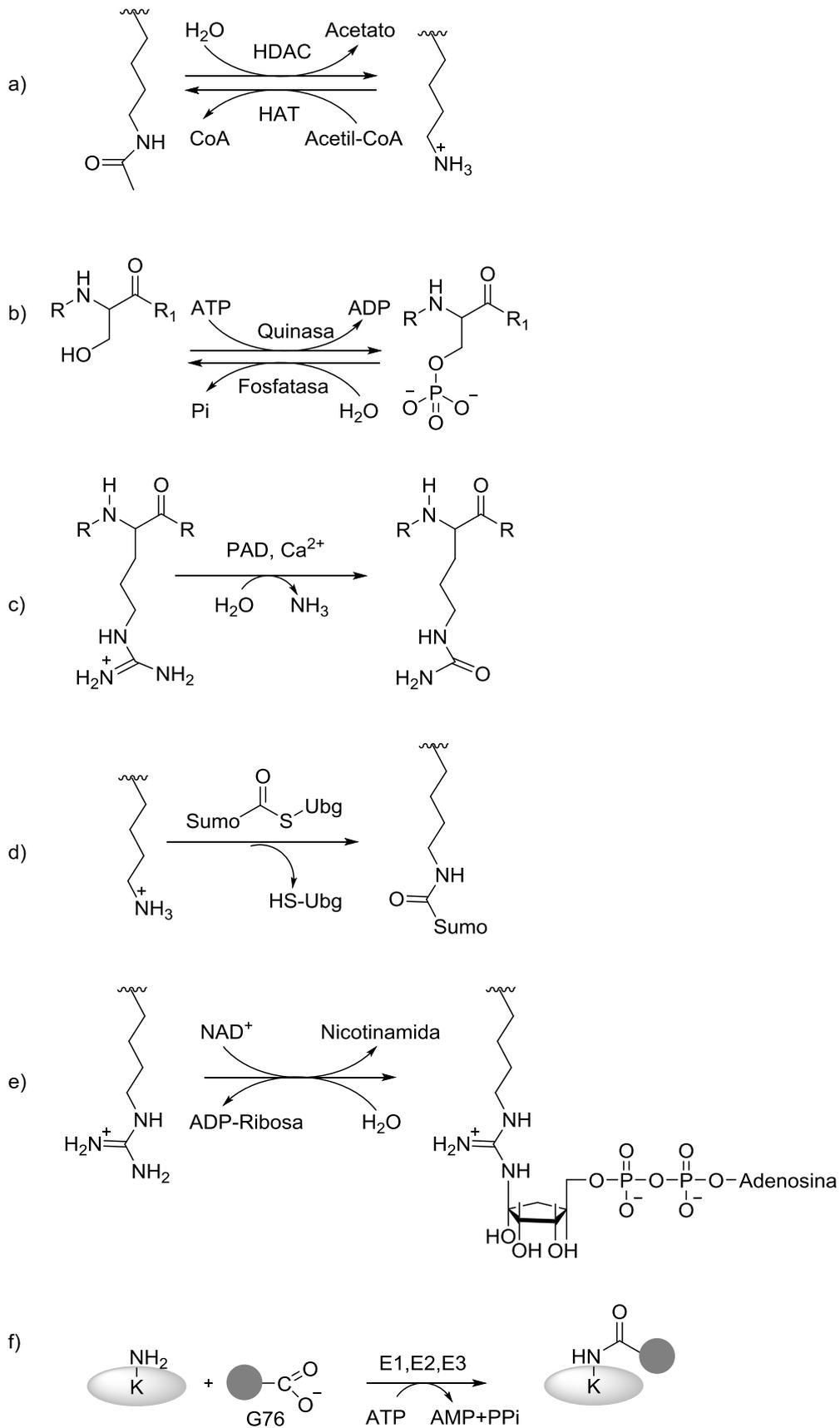
Este empaquetamiento, no obstante, debe permitir el flujo de la información genética, es decir, el paso del ADN a ARN, y de éste a proteínas. Para ello deben desempaquetarse en primer lugar los nucleosomas, para que después se suelte el ADN de las histonas y se formen las proteínas a través de la traducción. De este modo, las histonas juegan un papel que va más allá de la simple función

⁶ a) K. Luger, A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond, *Nature* **1997**, 389, 251-260; b) R. D. Kornberg, Y. L. Lorch, *Cell* **1999**, 98, 285-294.

estructural. En realidad, se convierten en agentes reguladores de la transcripción.

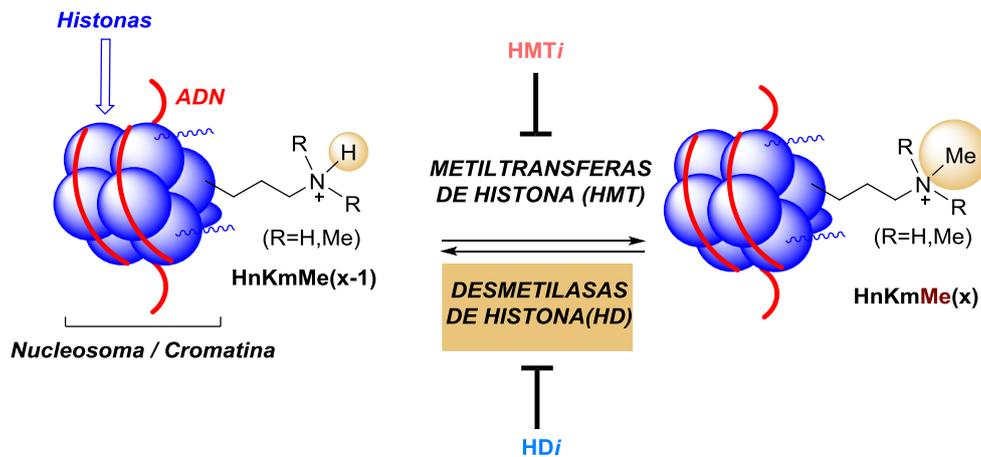
La cromatina puede adoptar dos formas diferentes denominadas eucromatina y heterocromatina. En la primera, el material genético está menos compactado, lo que permite el acceso de la maquinaria de transcripción y, por tanto, se produce la expresión génica. En la heterocromatina, sin embargo, el material genético está condensado, no se da la transcripción y, por tanto, los genes están inactivos. Estos estados son controlados mediante las modificaciones reversibles del ADN y/o por las modificaciones de las histonas.⁷ Las modificaciones más comunes de estas proteínas son las siguientes: la metilación, tanto de residuos de lisina como de arginina; la acetilación y ubiquitinación de residuos de lisina; la fosforilación de residuos de serina y treonina; la SUMOilación de lisinas; la deiminación de argininas y la ADP-ribosilación (ver Esquema 4.1). La acetilación y la desacetilación de los residuos de lisina de las histonas están reguladas por dos familias de enzimas llamadas acetiltransferasas de histonas (HAT) y desacetilasas de histonas (HDAC) (Esquema 4.1a) y la fosforilación de los residuos de serina por las quinasas de histonas.

⁷ T. Kouzarides, *Cell* **2007**, 128, 693-705.



Esquema 4.1. Representación de las modificaciones de las colas de las histonas: a) acetilación, b) fosforilación, c) deiminación, d) SUMOilación (SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier), e) ADP-ribosilación, f) ubiquitinación.

Las reacciones de metilación de los residuos de lisina y arginina de las histonas están reguladas por dos familias de enzimas: las metiltransferasas de histonas (HMT)⁸ y las desmetilasas de histonas (HD). El primer grupo de enzimas es el encargado de realizar la metilación en dichos residuos (HnKmMeX → HnKmMe(X+1)), mientras que las segundas llevan a cabo el proceso inverso, la desmetilación (HnKmMeX → HnKmMe(X-1)).



Esquema 4.2. Metilación y desmetilación catalítica de residuos de lisina (Km) presentes en histonas (Hn).

El conjunto de modificaciones que sufren los residuos amino terminales de las histonas y las posibles combinaciones de las mismas, se conoce como “el código de las histonas”.⁹ El hecho de que estos procesos sean dinámicos y que, además los cambios se produzcan rápidamente, amplía considerablemente el potencial del código genético, ya que, tal y como se ha mencionado anteriormente, modifican la estructura de la cromatina y, por tanto, modifican el patrón de transcripción del ADN.

⁸ S. Rea, F. Eisenhaber, N. O'Carroll, B. D. Strahl, Z. W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C. P. Ponting, C. D. Allis, T. Jenuwein, *Nature* **2000**, *406*, 593-599.

⁹ a) T. Jenuwein, C. D. Allis, *Science* **2001**, *293*, 1074-1080; b) B. D. Strahl, C. D. Allis, *Nature* **2000**, *403*, 41-45.

4.2 Desmetilasas de histona

Debido a la estabilidad del enlace N-CH₃, la metilación de residuos de lisina y arginina presentes en histonas ha sido considerada irreversible hasta hace pocas décadas.¹⁰ Los primeros indicios que demostraron la posibilidad de que esta modificación se podía revertir se remontan a 1964, cuando Kim y colaboradores descubrieron la existencia de una enzima capaz de desmetilar lisinas con diferente grado de metilación, a la que nombraron ϵ -alkylisinas.¹¹ Unos años más tarde, en 1973, estos mismos autores nuevamente observaron experimentalmente la desmetilación de histonas, pero no fueron capaces de aislar la enzima correspondiente.¹² Finalmente en el año 2004, Shi y colaboradores consiguieron aislar y caracterizar la primera desmetilasa de histona, la desmetilasa específica de lisina, LSD1.¹³

Las desmetilasas de histonas que se conocen a día de hoy se dividen en dos grupos; la familia de las desmetilasas específicas de lisina, LSD, que agrupa las enzimas nombradas como LSD1 y LSD2, y las desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C.^{7,13,14} Las primeras son dependientes del dinucleótido de flavina y adenina, FAD, mientras que las segundas se agrupan dentro de las familias de enzimas no-hemo dependientes de hierro y que emplean el α -cetoglutarato como cofactor. Así, los residuos de lisina que son capaces de desmetilar ambas

¹⁰ A. J. Bannister, R. Schneider, T. Kouzarides, *Cell* **2002**, 109, 801-806.

¹¹ S. Kim, L. Benoiton, W. K. Paik, *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 3790-3796.

¹² W. K. Paik, S. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, 51, 781-788.

¹³ Y. J. Shi, F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstone, P. A. Cole, R. A. Casero, Y. Shi, *Cell* **2004**, 119, 941-953.

¹⁴ a) B. D. Strahl, C. D. Allis, *Nature* **2000**, 403, 41-45; b) Y. Tsukada, J. Fang, H. Erdjument-Bromage, M. E. Warren, C. H. Borchers, P. Tempst, Y. Zhang, *Nature* **2006**, 439, 811-816; c) R. J. Klose, E. M. Kallin, Y. Zhang, *Nat. Rev. Genet.* **2006**, 7, 715-727; d) R. J. Klose, K. Yamane, Y. Bae, D. Zhang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. Wong, Y. Zhang, *Nature* **2006**, 442, 312-316; e) A. Karytinis, F. Forneris, A. Profumo, G. Ciossani, E. Battaglioli, C. Binda, A. Mattevi, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 17775-17782.

desempaquetamiento de la cromatina y se activa la transcripción.¹⁶ El efecto de la metilación y desmetilación de las lisinas, sin embargo, es más complejo, ya que, a similares grados de metilación (todos ellos con carga =+1), pueden tanto activar como inhibir la transcripción, siendo necesario especificar el grado de metilación de un residuo de lisina concreto, junto con el resto de posibles modificaciones que pueden sufrir las histonas. Así, y como se recoge en la Figura 4.1, se conoce que los residuos H3K4 y H3K36 trimetilados están asociados con la activación de la transcripción, mientras que estos mismos residuos con grados de metilación inferiores se relacionan con la represión de la transcripción. A su vez, los residuos trimetilados en las posiciones H4K20, H3K9 y H3K27 se considera que poseen un efecto represor sobre la transcripción.^{2,17}

A continuación, se procederá a explicar brevemente las características principales de las desmetilasas de histonas, las LSD en primer lugar, para continuar con las desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C.

4.2.1 Desmetilasas específicas de lisina

Tal y como se ha mencionado anteriormente, las LSD se clasifican dentro de la familia de las monoaminoxidasas y emplean el FAD como cofactor. Esta familia de desmetilasas de histonas se divide en dos. Inicialmente se descubrió la LSD1 (también conocida como KDM1A o AOF2) como la primera desmetilasa de histona¹³ y, unos años más tarde, Karytinos y colaboradores descubrieron la existencia de la LSD2 (nombrada también como KDM1B o AOF1).^{14e} Ambas

¹⁶ S. Y. Roth, J. M. Denu, C. D. Allis, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 81-120.

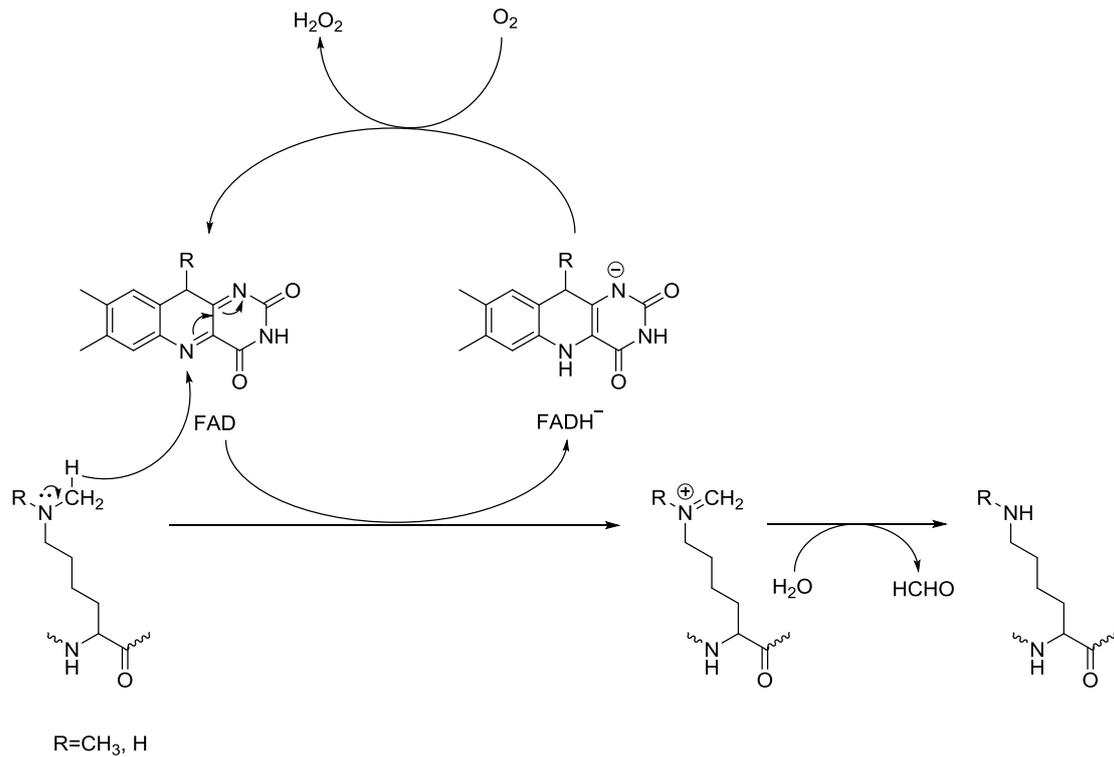
^{17a)} A. Barski, S. Cuddapah, K. R. Cui, T. Y. Roh, D. E. Schones, Z. B. Wang, G. Wei, I. Chepelev, K. J. Zhao, *Cell* **2007**, *129*, 823-837.

familias comparten el dominio amino oxidasa C-terminal y el dominio SWIRM.¹⁸ Estas enzimas son capaces de llevar a cabo la desmetilación de residuos H3K4 tanto monometiladas como dimetiladas.¹³ Posteriormente se vio que al asociarse la LSD1 al receptor androgénico también mostraba actividad sobre los residuos H3K9 con el mismo grado de metilación.¹⁹ El mecanismo de desmetilación de esta familia LSD ha sido controvertido, ya que la formación de la imina intermedia puede darse tanto mediante la transferencia del hidruro como a través de un mecanismo de tipo radicalario. Finalmente, tal como se muestra en Esquema 4.3, diversos autores han propuesto que la desmetilación de histonas catalizada por las LSD se lleva a cabo mediante la transferencia del hidruro.²⁰ Así, la reacción comienza con la ruptura del enlace C-H en α de la lisina metilada, con la posterior transferencia del hidruro al cofactor, FAD, generando FADH \cdot . Posteriormente se regenera el FAD ante la presencia de O $_2$, que actúa como aceptor de electrones, dando lugar a H $_2$ O $_2$. Finalmente, y tras la hidrólisis de la imina formada, se generan la correspondiente lisina desmetilada y formaldehído (ver Esquema 4.3). Por tanto, es posible concluir que las LSD son incapaces de desmetilar las lisinas trimetiladas, ya que es necesaria la presencia del par de electrones no enlazantes del nitrógeno para que catalicen la reacción.

¹⁸ Y. C. Zheng, J. L. Ma, Z. R. Wang, J. F. Li, B. L. Jiang, W. J. Zhou, X. J. Shi, X. X. Wang, W. Zhao, H. M. Liu, *Med. Res. Rev.* **2015**, *35*, 1032-1071.

¹⁹ E. Metzger, M. Wissmann, N. Yin, J. M. Muller, R. Schneider, A. Peters, T. Gunther, R. Buettner, R. Schule, *Nature* **2005**, *437*, 436-439.

²⁰ a) E. C. Ralph, M. A. Anderson, W. W. Cleland, P. F. Fitzpatrick, *Biochemistry* **2006**, *45*, 15844-15852; b) X. Kong, S. Ouyang, Z. Liang, J. Lu, L. Chen, B. Shen, D. Li, M. Zheng, K. K. Li, C. Luo, H. Jiang, *Plos One* **2011**, *6*, e25444; c) B. Karasulu, M. Patil, W. Thiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13400-13413.



Esquema 4.3. Reacción de desmetilación de lisina catalizada por LSD.

4.2.2 Desmetilasas que contienen el dominio Jmj-C

Las oxigenasas con dominio Jmj-C pertenecen al grupo de oxigenasas dependientes de α -cetoglutarato y emplean Fe(II) como cofactor. Esta familia de enzimas está compuesta por las desmetilasas de histonas, que llevan a cabo la desmetilación de residuos de lisina, y las hidroxilasas.

El origen del nombre del dominio Jmj-C radica en la primera proteína en la que se identificó este dominio, a la que denominaron “Jumonji”, que en japonés significa cruciforme, debido a la forma que presentaban las ranuras neurales de los ratones knockout.²¹

²¹ T. Takeuchi, *Genes Dev.* **1995**, 9, 1211-1222.

A día de hoy han sido identificadas más de 30 desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C. Tal y como se ha mencionado anteriormente, este dominio incluye un centro metálico de Fe (II), coordinado octaédricamente, y un cofactor, el α -cetoglutarato (ver Figura 4.2). El dominio está compuesto por ocho laminas β , tres aminoácidos unidos al hierro, His188, His276 y Glu190 (que a veces es sustituido por Asp) y por otros dos aminoácidos que se le unen al α -cetoglutarato, Thr185/Phe185 (a veces reemplazado por Ser/Ala/Lys, y Lys206).^{14b, 22} Se observa que los cambios presentes en este dominio hacen referencia a aminoácidos con características químicas similares. Un ejemplo de ello lo presentan Glu y Asp, o Thr y Ser. Por tanto, se considera que este dominio está muy conservado en la escala filogenética.²³

²² a) F. Lan, A.C. Nottke, Y. Shi, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20*, 316-325; b) F. Lu, G. Li, X. Cui, X. J. Wang, X. Cao, *J. Intergr. Plant. Biol.* **2008**, *50*, 886-896; c) Z. Z. Chen, J. Y. Zang, J. Whetstine, X. Hong, F. Davrazou, T. G. Kutateladze, M. Simpson, Q. L. Mao, C. H. Pan, S. D. Dai, J. Hagman, K. Hansen, Y. Shi, G. Y. Zhang, *Cell* **2006**, *125*, 691-702

²³ Y. Huang, D. Chen, C. Liu, W. Shen, Y. Ruan, *Mol. Genet. Genomics* **2016**, *291*, 33-49.

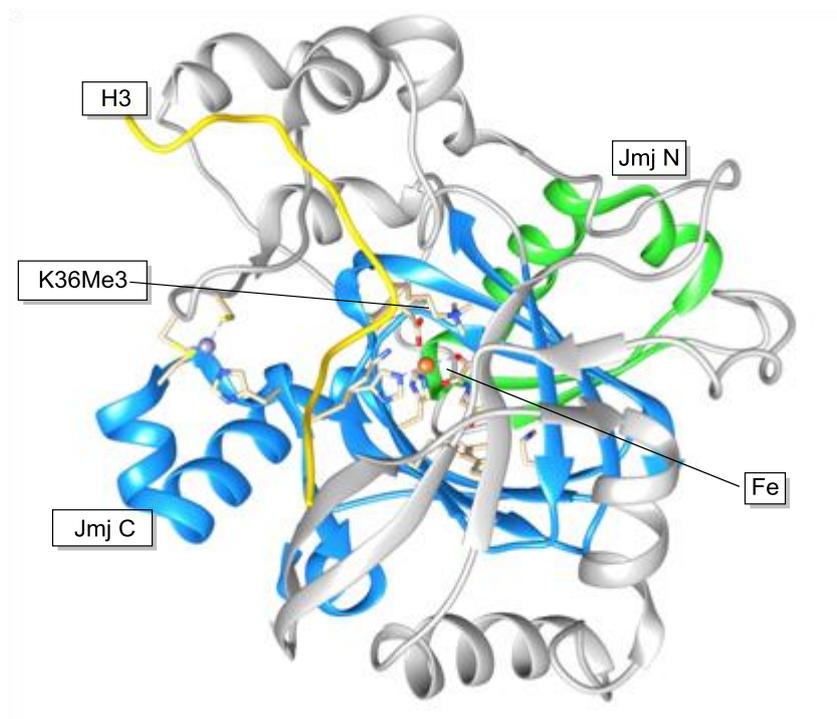


Figura 4.2. Imagen de la estructura cristalizada del PDB ID: 2P5B, correspondiente a la JMJD2A junto con el residuo H3K36, donde se resaltan el dominio Jmj C en azul, el dominio Jmj N en verde, el Fe en naranja, y por último el residuo H3 en amarillo.

La actividad catalítica de estas enzimas reside en el dominio Jmj-C, aunque diversos autores^{14,24} postulan que el dominio Jmj-N también forma parte del centro activo de la enzima. Por otro lado, los dominios restantes son los responsables de la selectividad que las diferentes enzimas muestran por las lisinas con diferente grado de metilación. En este sentido, se observa más variabilidad en los aminoácidos presentes alrededor del canal que conecta el centro activo de las enzimas con el exterior que en las inmediaciones de los cofactores. Como consecuencia, los sustratos adoptan diferentes conformaciones y, por tanto, se modifica también el modo de unión de los mismos con los centros activos.²⁴ Esto propicia la gran variabilidad mostrada por estas metaloenzimas en cuanto a la selectividad con los diferentes sustratos. Un

²⁴ E. S. Pilka, T. James, J. H. Lisztwan, *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 743-749.

ejemplo de ello lo presenta la KDM7B (también conocida como PHF8), donde la interacción catión π -hidrofóbica entre el dominio PHD de la enzima y la H3K4Me3 favorece la desmetilación de la H3K9Me2/1 y no de otro residuo.²⁵

La actividad catalítica de las desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C (KDM)^{14b,26} recae sobre las lisinas tri-, di- y monometiladas. Como se puede observar en la Tabla 4.1, esta familia de enzimas se puede clasificar en diferentes subfamilias, KDMn, donde n=2-8. Además, cada familia desmetila lisinas con diferente grado de metilación y posición concreta de forma selectiva. Así, las KDM3 pueden actuar sobre H3K9Me1 y H3K9Me2, mientras que las enzimas que pertenecen a la subfamilia KDM4 muestran preferencia sobre los sustratos tri- y dimetilados frente a los monometilados. Así, KDM4A, KDM4B y KDM4C desmetilan H3K9MeX, H3K36MeX y H1.4K26MeX, donde X=2,3. Por el contrario, KDM4D y KDM4E no son capaces de desmetilar el residuo H3K36Me2/3 y únicamente desmetilan H3K9Me3. En este sentido, las KDM6 desmetilan solo H3K27MeX, donde X=2,3.^{3b} Por tanto, tal y como se puede observar en la Tabla 4.1, la variabilidad en cuanto a la actividad catalítica de estas enzimas es muy grande, ya que no siguen un patrón de desmetilación concreto. Esto da lugar a que cada enzima muestre afinidad sobre un residuo en concreto con un grado de metilación determinado. Asimismo, también se ha observado actividad catalítica de algunas desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C sobre residuos de arginina metilados,²⁷ aunque este proceso no está tan

²⁵ J. R. Horton, A. K. Upadhyay, H. H. Qi, X. Zhang, Y. Shi, X. Cheng, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 38-43.

²⁶ S. C. Trewick, P. J. McLaughlin, R. C. Allshire, *Embo Rep.* **2005**, *6*, 315-320.

²⁷ a) B. S. Chang, Y. Chen, Y. M. Zhao, R. K. Bruick, *Science* **2007**, *318*, 444-447; b) L. J. Walport, R. J. Hopkinson, R. Chowdhury, R. Schiller, W. Ge, A. Kawamura, C. J. Schofield, *Nat. Commun.* **2016**, *7*:11974.

estudiado y requerirá de más estudios para determinar el mecanismo de acción, así como su relevancia biológica.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la variabilidad en la expresión de las desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C ha sido relacionada con el cáncer. No obstante, se desconoce cuál es la relación directa de las enzimas con la enfermedad, ya que, dependiendo del tipo de cáncer, la expresión de estas enzimas pueden estar tanto aumentadas como disminuidas, y los genes pueden estar tanto mutados como borrados o translocados. A modo de resumen, en la Tabla 4.1 se recogen las familias de desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C conocidas hasta la fecha, con los sustratos de histonas que se sabe que interaccionan y los casos en que se conoce su relación con determinados tipos de cáncer.²⁸

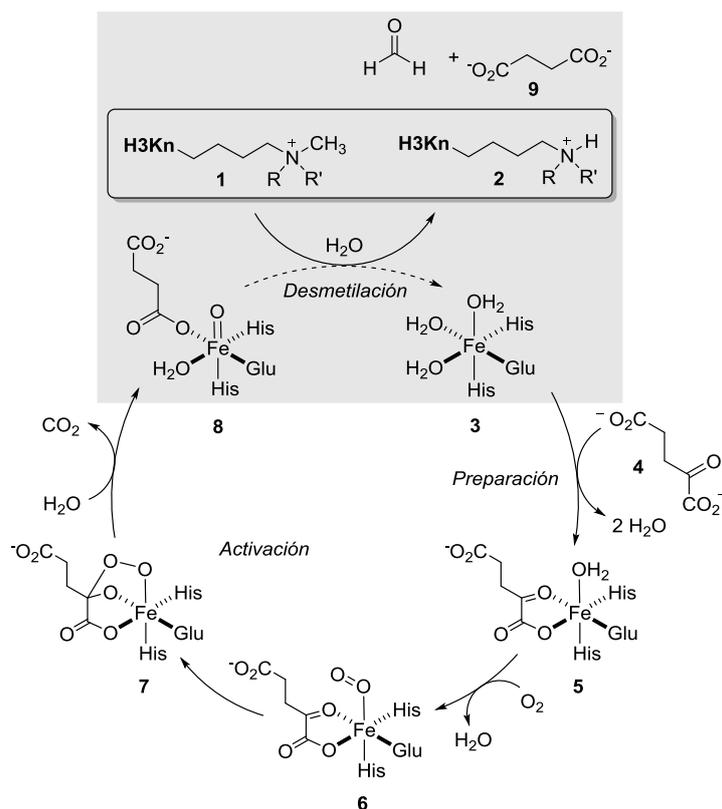
²⁸ a) S. Lim, E. Metzger, R. Schuele, J. Kirfel, R. Buettner, *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 1991-1998; b) K. Liu, Y. L. Liu, J. L. Lau, J. R. Min, *Pharmacol. Therapeut.* **2015**, *151*, 121-140; c) S. Y. Park, J. W. Park, Y. S. Chun, *Pharmacol. Res.* **2016**, *105*, 146-151.

Subfamilia	Nombres alternativos	Sustrato	Tipo de cáncer	
KDM2	2A	JHDM1A,FBXL11	H3K36Me2/1	pulmón, pecho, gástrico, próstata, glioblastoma
	2B	JHDM1B, FBXL10	H3K36Me2/1, H3K4Me3	leucemia, vejiga, páncreas, próstata, glioblastoma
KDM3	3A	JHDM2A, JMJD1A, TSGA	H3K9Me2/1	pecho, prostata, colorectal, renal, hepatocelular
	3B	JHDM2B, JMJD1B,5qNCA		frecuentemente suprimido en el cáncer
		JHDM2C, JMJD1C, TRIP8		no registrado
KDM4	4A	JHDM3A, JMJD2A	H3K9Me3/2/1 H3K36Me3/2/1 H1.4K26Me3/2	pecho, vejiga
	4B	JHDM3B, JMJD2B		tumor vaina del nervio periférico
	4C	JHDM3C, JMJD2C, GASC1		pecho, próstata, células escamosas, linfoma, células B
	4D	JHDM3D, JMJD2D	H3K9Me3/2/1 H1.4K26Me3/2	no descrito
	4E	JMJD2E	H3K9Me3/2/1 H1.4K26Me3/2	no descrito
	4F	JMJD2F	No registrado	no descrito
KDM5	5A	JARID1A, RBP2	H3K4Me3/2/1	pulmón, hematopoyético, melanoma, gástrico
	5B	JARID1B, PLU1		pecho, próstata, vejiga, cervical, testicular
	5C	JARID1C, SMCX		próstata
	5D	JARID1D, SMCY		próstata
KDM6	6A	UTX, MGC141941	H3K27Me3/Me2	pecho, pulmón, hígado, mieloma múltiple
	6B	JMJD3, KIAA0346		leucemia, pulmón, hígado, próstata
	6C	UTY		no descrito
KDM7	7A	JHDM1D, KIAA1718	H3K9Me2/Me1 H3K27Me2/1 H4K20Me1	no descrito
	7B	PHF8, JHDM1F, KIAA1111, ZNF422	H3K9Me2/Me1 H4K20Me1	células escamosas, próstata, pulmón
	7C	PHF2, KIAA0662, JHDM1E,CENP35, GRC5	H3K9Me2/Me1 H4K20Me3 H3K27me2/1	pecho, colorectal, estómago, cabeza, células escamosas
KDM8		JMJD5	H3K36me2	No descrito

Tabla 4.1. Familia de las desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C junto con los sustratos que modifican su relación con el cáncer.

4.2.3 Ciclo catalítico

De acuerdo a lo acordado para las enzimas no-hemo que emplean hierro como cofactor,²⁹ el mecanismo comúnmente aceptado para la desmetilación de residuos de lisina llevado a cabo por las desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C se representa en el Esquema 4.4.³⁰



Esquema 4.4. Ciclo catalítico general de las desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C. La etapa correspondiente a la desmetilación se representa sombreada en gris.

Así, tal y como se ha mencionado anteriormente, el centro activo del enzima en estado latente está compuesto por el centro metálico Fe(II) **3** coordinado en este caso a un Glu y a dos residuos de His. Tras la unión del α-cetoglutarato **4**

²⁹ *Iron-Containing Enzymes Versatile Catalysis of Hydroxylation Reactions In Nature*, (Eds.: S. P. de Visser, D. Kumar), RSC Publishing, Cambridge, **2011**.

³⁰ S. S. Ng, K. L. Kavanagh, M. A. McDonough, D. Butler, E. S. Pilka, B. M. R. Lienard, J. E. Bray, P. Savitsky, O. Gileadi, F. von Delft, N. R. Rose, J. Offer, J. C. Scheinost, T. Borowski, M. Sundstrom, C. J. Schofield, U. Oppermann, *Nature* **2007**, *448*, 87-91.

se genera el intermedio **5**. Posteriormente, se activa el centro metálico mediante la reacción con oxígeno para generar el aducto **6**, el superóxido de hierro, donde solamente una molécula de oxígeno se une al centro metálico. Tras descomponer la energía de interacción, Paton y colaboradores³¹ cuantificaron que la mitad de la energía de interacción total correspondía a la unión O₂-Fe en el estado quintuplete. La energía restante comporta las demás interacciones con el resto de residuos y la lisina *N*-metilada. Así, y de acuerdo a los resultados obtenidos, estos autores señalaron que la lisina metilada, la His182, la Asp187 y la Lys200 ejercen un efecto positivo en la interacción con el oxígeno molecular al aportar valores negativos a la energía electrostática, aumentando así la afinidad por el O₂. Por tanto, el hecho de modificar dichos residuos disminuiría considerablemente la afinidad por el mismo.

Continuando con la descripción del ciclo catalítico, la transformación del compuesto **6** en el intermedio ferrilo **8** ha sido estudiada para otras enzimas dependientes de α -cetoglutarato.³² Así, es sabido que el proceso comienza con la adición de un átomo de oxígeno a la cetona generando el biciclo [2.1.1] **7**. Este paso limita la velocidad de reacción para la transformación del compuesto **5** en el compuesto **8**.³³ Posteriormente, mediante la descarboxilación del intermedio **7**, se genera el complejo **8**. Este último se encuentra en estado quintuplete y es más estable que todos los anteriores. Este último paso tiene asociado una elevada energía de activación, por lo que se ha considerado que el compuesto

³¹ W. A. Cortopassi, R. Simion, C. E. Honsby, T. C. C. Franca, R. S. Paton, *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 18983-18992.

³² a) T. Borowski, A. Bassan, P. E. M. Siegbahn, *Chem. - Eur. J.* **2004**, *10*, 1031-1041; b) I. A. Topol, A. V. Nemukhin, K. Salnikow, R. E. Cachau, Y. G. Abashkin, K. S. Kasprzak, S. K. Burt, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 4223-4228.

³³ L. M. Mirica, K. P. McCusker, J. W. Munos, H.-W. Liu, J. P. Klinman, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8122-8123.

bicíclico **7** tiene una vida media limitada, siendo el proceso de descarboxilación irreversible.³⁴ Por otro lado, cálculos DFT sugieren que el peroxosuccinato derivado de **7** no puede ser la especie oxidante en el proceso de desmetilación debido a que las rutas ensayadas computacionalmente presentan elevadas energías de activación.³⁵ Asimismo, Visser y colaboradores demostraron, mediante cálculos QM/MM, que la transformación de **5** en **8** también se da en otras enzimas dependientes de α -cetoglutarato y comprobaron que este proceso no varía significativamente con el entorno del centro catalítico.³⁶

Como se observa en el Esquema 4.5, una vez formado el intermedio **8** se produce la desmetilación del residuo de lisina. De acuerdo con el mecanismo aceptado, el complejo Fe(IV)=O **8** reacciona con el grupo metilo del sustrato **1** para generar el intermedio hidroxilado **10** y el catión radical **11**. Posteriormente, y tras la combinación de estos dos compuestos, se da lugar al intermedio **12**, que a continuación conduce a la liberación del catión hidroximetilado **13** y del succinato **9** del centro metálico. El ciclo catalítico continúa con la hidrólisis del compuesto **13** generando formaldehído y el derivado desmetilado **2**.³⁷ Finalmente, el complejo **3** es capaz de reiniciar un nuevo ciclo catalítico tras la incorporación del oxígeno molecular y el α -cetoglutarato (ver Esquema 4.4). El mecanismo de reacción $\mathbf{8} + \mathbf{1} \rightarrow \mathbf{10} + \mathbf{11} \rightarrow \mathbf{12}$ descrito es similar al estudiado por Shaik y colaboradores³⁸ para enzimas hemo, siendo el citocromo P450 la

³⁴ S. P. de Visser, in *Experimental and Computational Studies on the Catalytic Mechanism of Non-Heme Iron Dioxygenases*. In *Iron-Containing Enzymes-Versatile Catalysts of Hydroxylation Reactions in Nature*, (Eds.: S. P. de Visser, D. Kumar), RSC Publishing, Cambridge, **2011**, pp. 1-41.

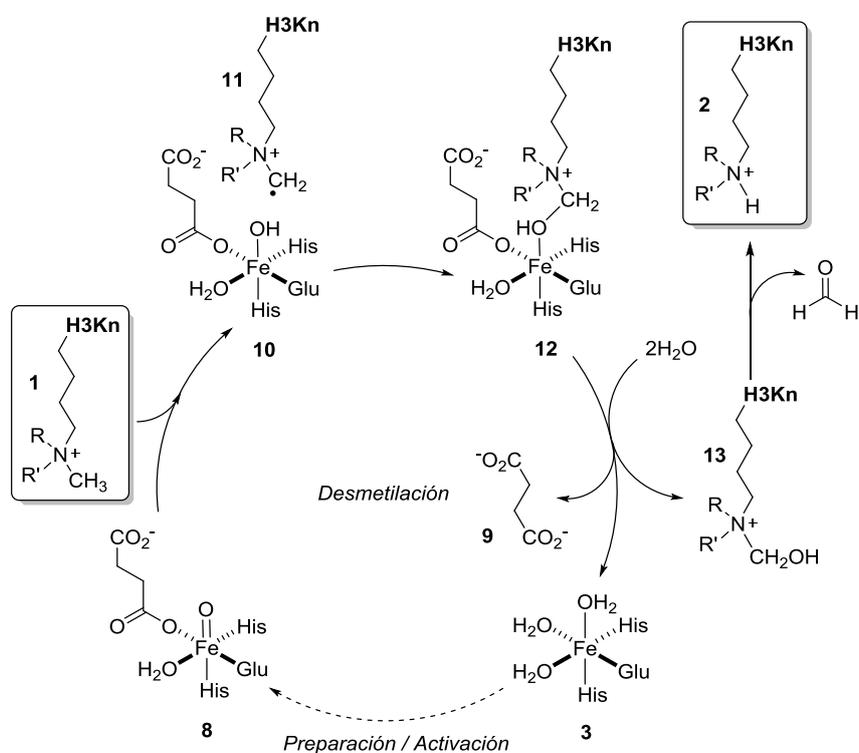
³⁵ a) S. P. de Visser, *Chem. Commun.* **2007**, 171-173; b) R. M. Cicchillo, H. Zhang, J. A. Blodgett, J. T. Witteck, G. Li, S. K. Nair, W. A. Van der Donk, W. W. Metcalf, *Nature* **2009**, *459*, 871-875.

³⁶ E. Godfrey, C. S. Porro, S. P. de Visser, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 2464-2468.

³⁷ R. G. Kallen, W. P. Jencks, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 5864-5878.

³⁸ a) B. Meunier, S. P. de Visser, S. Shaik, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947-3980; b) K.-B. Cho, H. Hirao, S. Shaik, W. Nam, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1197-1210.

enzima de este tipo más estudiada. Así, para la desmetilación de aminas terciarias neutras por este grupo de enzimas se han estudiado dos mecanismos diferentes: la desmetilación y la formación de N-óxidos.³⁹ Para las aminas di- y monometiladas la formación de N-hidroxiaminas también ha sido contemplada.⁴⁰ Además del citocromo P450, otras enzimas no-hemo como la AlkB son compatibles con el ciclo catalítico mencionado.⁴¹ No obstante, los detalles de la desmetilación catalizada por enzimas no-hemo no son bien conocidas, y para el caso de las Jmj-C no había sido estudiado hasta el inicio de nuestro trabajo.



Esquema 4.5. Reacción de desmetilación asociado al mecanismo de las desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C.

³⁹ a) Y. Wang, D. Kumar, C. Yang, K. Han, S. Shaik, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7700-7710; b) P. Rydberg, U. Ryde, L. Olsen, *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 1369-1377; c) C. Li, W. Wu, K. -B. Cho, S. Shaik, *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 8492-8503.

⁴⁰ a) P. Rydberg, L. Olsen, *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 3399-3404; b) L. Ji, G. Schueuermann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 744-748; c) S. T. Seger, P. Rydberg, L. Olsen, *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28*, 597-603.

⁴¹ a) S. C. Trewick, T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, B. Sedgwick, *Nature* **2002**, *419*, 174-178; b) P. O. Falnes, R. F. Johansen, E. Seeberg, *Nature* **2002**, *419*, 178-182; c) C. Yi, C. - G. Yang, C. He, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 519-529.

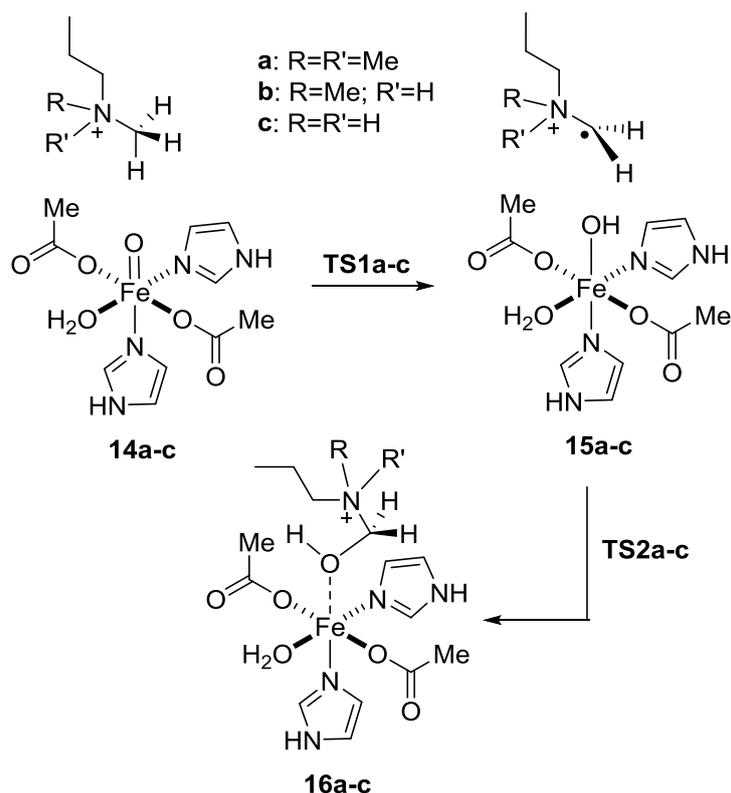
Como se ha comentado en capítulos anteriores, la reacción de desmetilación catalizada por enzimas hemo se lleva a cabo en estado de bajo espín, es decir, con un bajo número de electrones desapareados. Este hecho es totalmente compatible con el carácter de ligando de campo fuerte del grupo hemo. Por el contrario, debido a la presencia de ligandos de campo débil en las enzimas con dominio Jmj-C, se presupone que esta misma reacción sea llevada en estados de espín medios o altos, es decir, triplete o quintuplete, tal y como ocurre en las fases de preparación y activación del ciclo catalítico. Asimismo, es esperable que la desmetilación sea un proceso que ocurra con una reactividad en dos estados.⁴² Por tanto, debido a este tipo de reactividad, es posible que ocurran cruces de espín a lo largo de la coordenada de reacción, y para ello es necesario que la probabilidad de cruce de espín sea suficiente para que dé lugar al cambio entre estos dos estados de espín diferentes.⁴³

Con el objetivo de estudiar el mecanismo asociado a la etapa de desmetilación catalizada por el intermedio Fe(IV)=O **8**, se procedió a seleccionar un modelo computacional apropiado para analizar dicha reacción. Este sistema está representado en el Esquema 4.6. El criterio empleado para la elaboración del modelo computacional se basó en incluir el máximo número de átomos para estudiar la reacción de una forma viable a nivel UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ con $\epsilon=78.39$. Por tanto, se escogieron únicamente los residuos comunes presentes en el centro activo de las desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C. Además, los residuos de His y Glu de los complejos reactivos

⁴² a) D. Schröder, S. Shaik, H. Schwarz, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 139-145; b) *Spin States in Biochemistry and Inorganic Chemistry-Influence on Structure and Reactivity*, (Eds.: M. Swart, M. Costas), Wiley, Chichester, **2016**.

⁴³ P. L. Holland, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1696-1702.

14a-c, fueron representados por grupos 1H-imidazol y acetato, respectivamente. No obstante, y a pesar de que trabajos previos³⁰ sugieren que el equivalente de CO₂ generado en la descarboxilación del α -cetoglutarato se mantiene en la proximidad del centro activo, en este modelo no se consideró, dado que no estaba claro en qué etapa del ciclo catalítico se eliminaría el CO₂ del mismo. Por tanto, en nuestro modelo se saturó la esfera de coordinación del hierro con una molécula de agua, ya que abundan en las inmediaciones del centro activo. El residuo de succinato se modelizó con otro acetato, y por último, el residuo de lisina (poli)metilado fue representado por el catión (poli)metil n-propilamonio. El modelo así constituido alberga las características esenciales tanto estructurales como electrónicas presentes en la reacción de desmetilación objeto de estudio. De acuerdo al mecanismo aceptado, tal y como se puede observar en el Esquema 4.6, la reacción comienza con la transferencia de un átomo de hidrógeno del sustrato ϵ -N-metilado al grupo ferrilo (Fe(IV)=O) para generar los intermedios **15a-c**. Estos compuestos son transformados en una segunda etapa en los correspondientes aminocarbinos coordinados al Fe **16a-c**. Esta es la última etapa estudiada en este trabajo. No obstante, el ciclo catalítico se completa mediante la hidrólisis del catión N-(hidroximetil)propan-1-aminio para generar formaldehído y el correspondiente residuo de amina desmetilado (Esquema 4.5 y 4.6).



Esquema 4.6. Modelo computacional propuesto para el estudio de la reacción de desmetilación de sustratos de amonio tri-, di- y monometilados.

4.3 Resultados computacionales y discusión

A continuación se muestran los resultados y las coordenadas de reacción analizadas para los diferentes grados de metilación estudiados. Expondremos el análisis del mecanismo de desmetilación de los residuos de lisina tri-, di- y monometilados catalizados por las desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C por separado. En todos los casos se ha estudiado la reacción de desmetilación en estados de espín bajo (singlete, $S=0$), medio (tripleto, $S=1$) y alto (quintuplete, $S=2$).

4.3.1 Sustratos trimetilados

La coordenada de reacción de desmetilación de los sustratos de lisina trimetilados se representa en la Figura 4.3. En dicho perfil se observa la

transformación del reactivo **14a** en el producto desmetilado **16a**. Tal y como se puede observar en el perfil expuesto, el mecanismo de reacción varía en función del estado de espín, siendo concertado para el estado de bajo espín. Por el contrario, para los estados triplete y quintuplete la desmetilación se produce por etapas. Este último proceso concuerda con el mecanismo propuesto para este tipo de enzimas (Esquema 4.5 y 4.6).

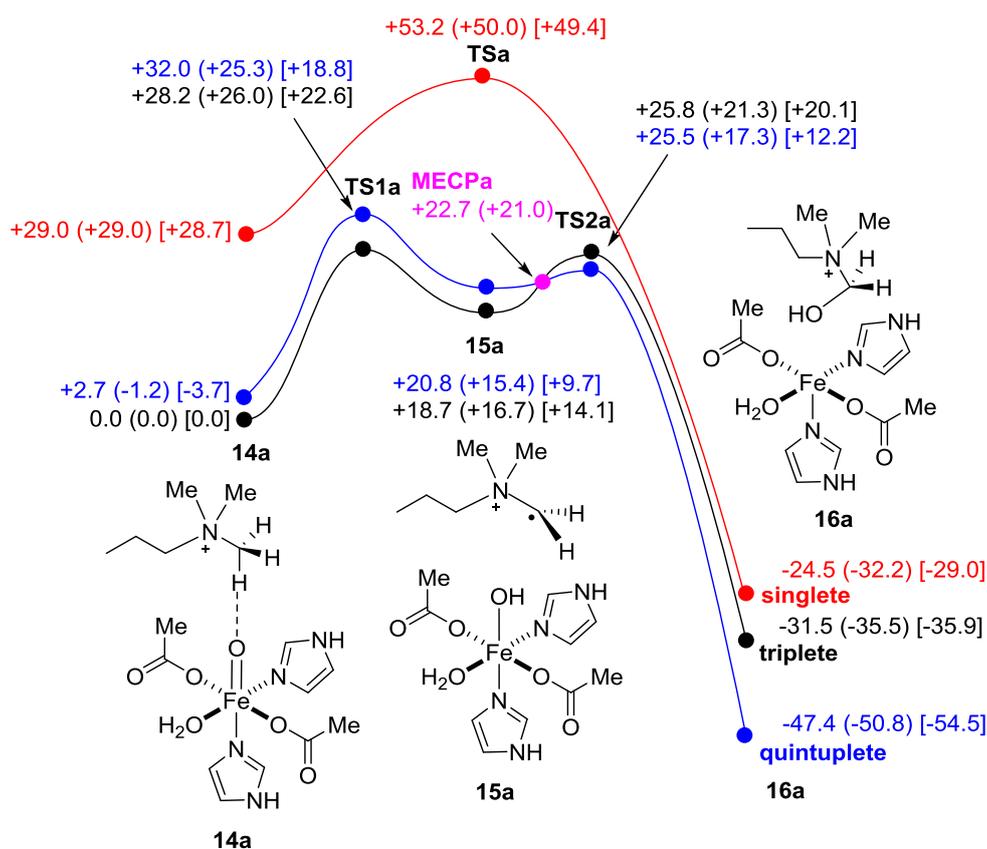


Figura 4.3. Coordenada de reacción correspondiente a la transformación de **14a** en **16a** calculado a nivel de teoría UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ con $\epsilon=78.39$. Las energías, en kcal/mol, son relativas respecto a **14a** en estado de espín triplete. Asimismo, se indica el punto de cruce de mínima energía **MECPa**. Las energías mostradas entre paréntesis y entre corchetes corresponden a las energías relativas y a las energías de Gibbs (298 K) respectivamente, calculadas en el nivel de teoría UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ.

Según nuestros resultados, se observa que el estado de bajo espín es significativamente más energético a lo largo de toda la coordenada de reacción. Así, las diferencias de energía entre los estados triplete y quintuplete con el singlete oscilan, aproximadamente, entre 20 y 30 kcal/mol. Esta tendencia

energética resulta favorable para el estado de alto espín, según la secuencia quintuplete < triplete < singlete. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la JMJD2A por Paton y colaboradores,³¹ así como en otras enzimas no-hemo, como la Alkb.⁴⁴ En este sentido, el complejo reactivo **14a** es prácticamente isoenergético para estados triplete y quintuplete, mientras que para el singlete es 29 kcal/mol más energético. No obstante, no se han observado diferencias significativas para las geometrías optimizadas de los complejos **14a** para los estados de espín analizados, siendo todas ellas estructuras casi idénticas (ver Figura 4.4). En este sentido es importante señalar que en las tres estructuras la orientación de los metilos concuerda con la presentada en la estructura cristalizada de la JMJD2A con K9H3Me3 antes de reaccionar con el oxígeno (código pdb: 2q8c, ver Figura 4.4).⁴⁵

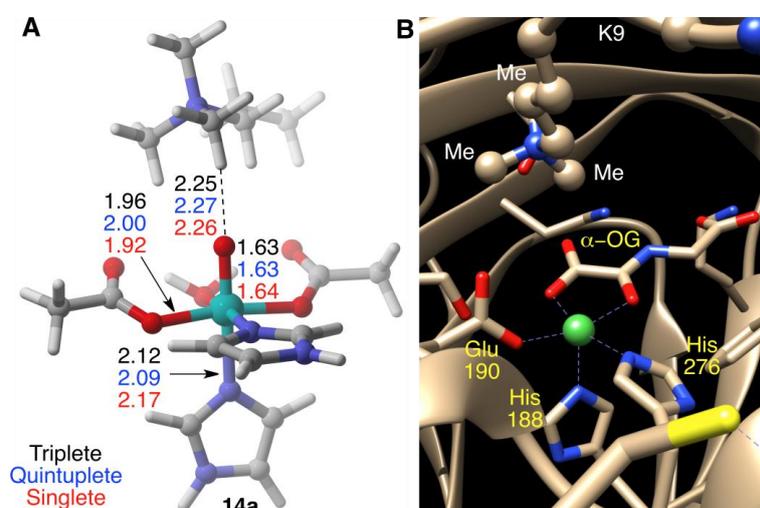


Figura 4.4. (A) Geometría optimizada del complejo **14a** en estado triplete a nivel UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe). Las distancias de enlace (en Å) se muestran también para los estados triplete (en negro), quintuplete (en azul), y singlete (en rojo). (B) Análisis de difracción de rayos X del centro activo de la desmetilasa de histona JMJD2A (código pdb 2q8c) con la lisina K9 trimetilada de la histona H3, junto con la α -oxalil glicina (en lugar del α -oxoglutarato), denominado como α -OG.

⁴⁴ M. G. Quesne, R. Latifi, L. E. Gonzalez-Ovalle, D. Kumar, S. P. de Visser, *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 435-446.

⁴⁵ J. -F. Couture, E. Collazo, P. Ortiz-Tello, J. S. Brunzelle, R. C. Trievel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 689-695.

Tal y como se recoge en la Figura 4.4, en el complejo **14a** se observa una única interacción de un metilo con la fracción Fe=O, lo que da lugar a productos diferentes en función del estado de espín. Así, para S=0 dicha interacción genera directamente, y mediante un mecanismo concertado, el producto **16a**, el complejo hidroximetilamonio, tras superar una energía de activación de 21 kcal/mol aproximadamente. En cambio, para los estados de espín triplete y quintuplete, esa misma interacción da lugar al intermedio **15a** con una barrera aproximada de unos 22.5 kcal/mol para ambos estados electrónicos (ver Figura 4.3). Por otro lado, tal y como se observa en la Figura 4.5, a pesar de las diferencias de ambas transformaciones, las características de las geometrías optimizadas del **TSa** y del **TS1a** son muy similares. Dichos estados de transición corresponden a estados de transición tardíos, lo que indica que están más próximos a la formación del enlace O-H que a la ruptura homolítica del enlace C-H del metilo. Por el contrario, sí se han encontrado diferencias de unos 0.4 Å en la segunda etapa de la formación del carbinol (**TS2a**) en la distancia C-O para los estados triplete y quintuplete. No obstante, esto no ha influido en la barrera de activación de ambos estados de espín.

Continuando con el análisis de la coordenada de reacción que se muestra en la Figura 4.3, se observa que, a diferencia de los complejos **14a** y **TS1a**, **TS2a** y **16a** están favorecidos para S=2, con diferencias de unas 8 kcal/mol y 20 kcal/mol, respectivamente, frente a S=1. Por tanto, se observa un punto de cruce a lo largo de la coordenada. Este tipo de reactividad, donde el centro catalítico cambia de espín a lo largo de la coordenada de reacción y, por tanto, muestra una reactividad entre dos estados de espín, es característico de compuestos no-

hemo con complejos Fe=O.⁴⁶ Por tanto, tal y como se ha planteado anteriormente, se confirma que la desmetilación de residuos de lisina trimetilados por desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C se produce con una reactividad en dos estados.

A continuación, se procedió a calcular dicho punto de cruce de mínima energía MECP a nivel UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ (Fe). Como se puede ver en la Figura 4.5, las características principales de la estructura optimizada del MECP no difieren sustancialmente de las encontradas para **15a**.

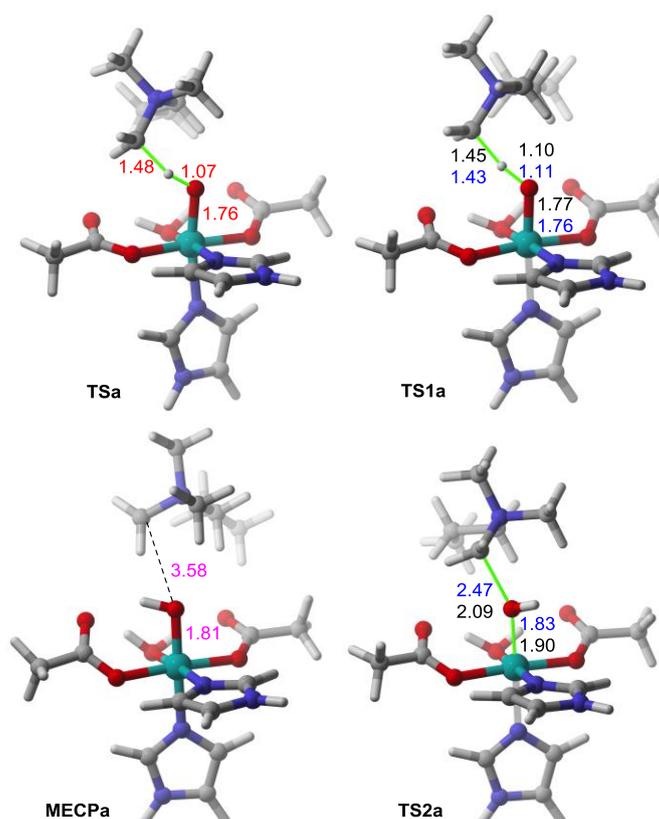


Figura 4.5. Geometrías optimizadas de los estados de transición **TSa**, **TS1a** y **TS2a** a nivel UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe), así como el punto de cruce de mínima energía **MECPa**. Las geometrías corresponden a los estados triplete, quintuplete y singlete en negro, azul y rojo, respectivamente. Las distancias de los enlaces están representadas en Å. En los **TS1a** y **TS2a**, las geometrías representadas corresponden a los estados de espín triplete y quintuplete, respectivamente.

⁴⁶ H. Hirao, D. Kumar, L. Que, S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8590-8606.

Posteriormente, se procedió a calcular el efecto del intercambio de espín en la constante de velocidad de la reacción.

La barrera adiabática triplete-quintuplete ΔG_{TQ}^a está relacionada con la constante cinética observable k_{obs} por medio de la siguiente ecuación.⁴⁷

$$k_{obs} = P_{TQ} \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G_{TQ}^a}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G_{eff}^a}{RT}\right) \quad (4.1)$$

Donde P_{TQ} es la probabilidad de paso entre el triplete y quintuplete en el **MECPa** conforme a la Ec. 3.1. Si se define la energía de activación efectiva ΔG_{eff}^a dentro del marco de la ecuación de Eyring, y sin tener en cuenta el cruce de estados de espín, se obtiene la siguiente relación:

$$\Delta G_{eff}^a = \Delta G_{TQ}^a - RT \ln P_{TQ} \quad (4.2)$$

Por lo tanto, y de acuerdo a lo establecido por Harvey⁴⁷, P_{TQ} se puede representar como un término adicional a la entropía de activación:

$$\Delta G_{eff}^a = \Delta H_{TQ}^a - T(\Delta S_{TQ}^a + R \ln P_{TQ}) \quad (4.3)$$

⁴⁷ J. N. Harvey, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9, 331-343.

Se calcularon los términos necesarios para estimar P_{TQ} de acuerdo a las ecuaciones (3.17) y (3.18) y se obtuvieron los siguientes valores para **MECPa**: $H_{SOC}^2 = 163.4 \text{ cm}^{-1}$, $\Delta F = 0.0425 \text{ hartree/bohr}$, y $\mu = 78.2 \text{ a.m.u.}$ Con estos valores se calculó un valor de probabilidad de cruce de $P_{TQ} = 0.92$, bastante próximo a 1. En consecuencia, se obtuvo un valor de energía de activación efectiva de $DG_{eff}^a = 2.52$ casi idéntico al ΔG_{TQ}^a calculado a nivel UB3LYP(PCM)/6-31(d,p) & LanL2DZ (Fe).

Continuando con el análisis de la coordenada de reacción, se observó que las energías libres de los complejos **15a** y **TS2a** siguen el siguiente orden: $G(\text{quintuplete}) < G(\text{triplete})$ (ver Figura 4.3). En este sentido, el cruce de espín resulta innecesario si se añaden a las energías respectivas totales la energía de vibración del punto cero, la energía de dispersión, térmica y la corrección entrópica. Como consecuencia, la segunda etapa de formación del carbinol **16a** conlleva una barrera aproximada de 2.5 kcal/mol, siendo la etapa de abstracción de hidrógeno del **TS1a** la etapa limitante de la reacción.

En base a estos resultados, es posible concluir que la reacción de desmetilación de la fracción del trimetilamonio del **14a** tiene lugar en el estado de hipersuperficie de energía quintuplete mediante una reacción por etapas que conlleva la formación del intermedio radical catiónico **15a**. La formación de este complejo limita la velocidad de la reacción, con una energía de activación aproximada de 22.5 kcal/mol. Los estados triplete y quintuplete transcurren muy próximos en energía a lo largo de toda la coordenada de reacción, siendo este último ligeramente menos energético. Además, se ha visto que el intercambio de espín triplete-quintuplete transcurre con una probabilidad cercana a 1.

4.3.2 Sustratos dimetilados

De acuerdo con la posición de los metilos y el protón de las lisinas ϵ -N-Dimetiladas de histonas en el centro catalítico, en principio se pueden considerar dos posibles conformaciones con respecto a al centro activo (ver Figura 4.6). Así, la primera conformación hace referencia a los casos en los que la unidad Me_2NH de la lisina interacciona con el átomo de oxígeno mediante un puente de hidrógeno. Esta estructura se ha indicado como ***in-14b*** en la Figura 4.6A. Por otro lado, también es posible considerar una segunda conformación, la estructura ***out-14b*** (Figura 4.6B), en la que el enlace N-H adopta una disposición antiperiplanar con respecto al grupo $\text{Fe}=\text{O}$. Sin embargo, esta última conformación parece que no está presente en las estructuras cristalizadas, ya que al observar el análisis de difracción de rayos X de la JMJD2A coordinada con la histona H3 dimetilada en las lisinas K36⁴⁵ y K9³⁰ se comprueba que únicamente la conformación H-*in* es la que está presente en dichos sustratos (Figura 4.6C y 4.7D). No obstante, a la hora de realizar el estudio computacional se consideraron ambas conformaciones, y, por tanto, su estudio se realizó analizando las dos reacciones por separado. A continuación se procederá a explicar el perfil energético de ambas desmetilaciones.

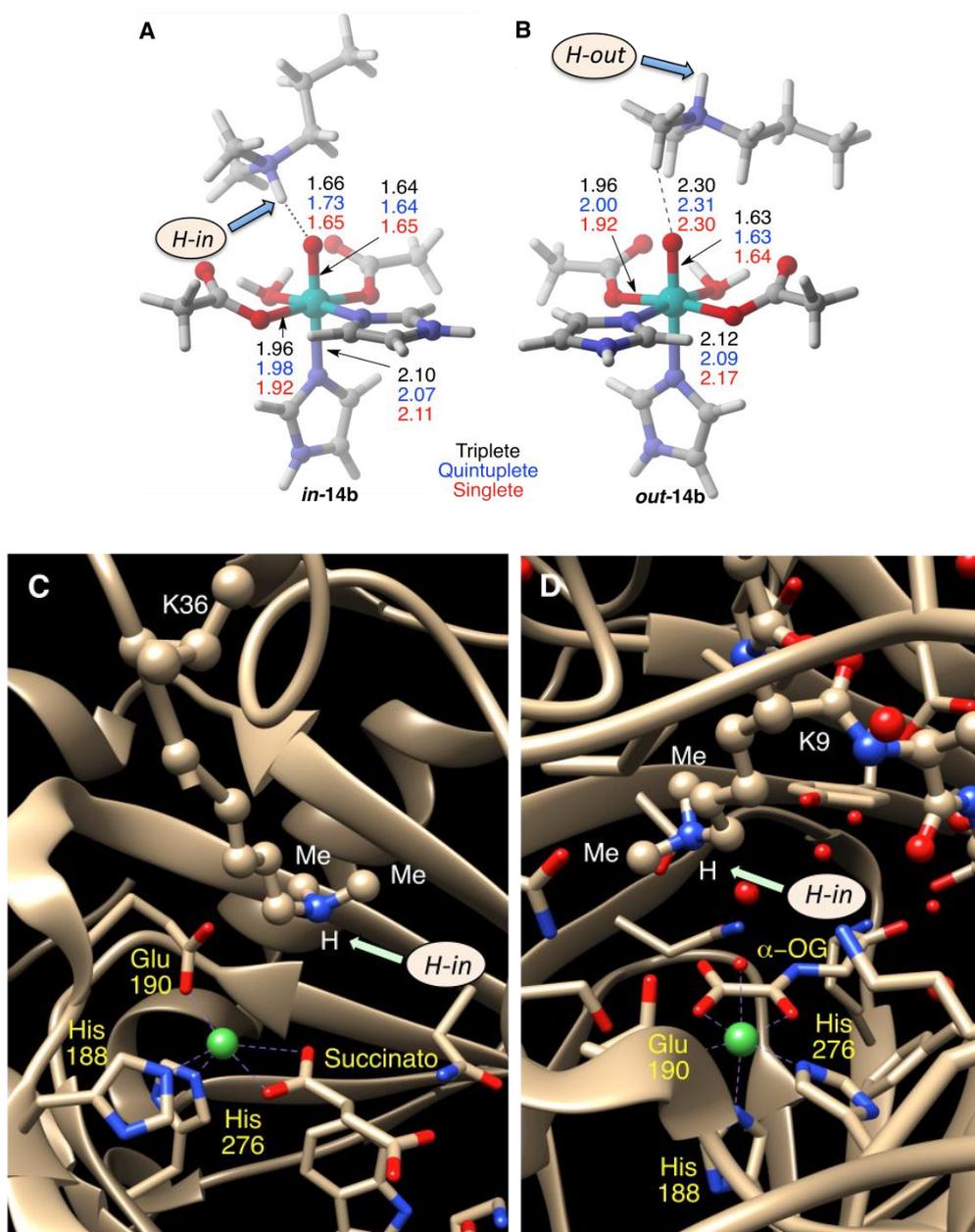


Figura 4.6. Geometrías optimizadas a nivel UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) de los complejos *in-14b* (A) y *out-14b* (B) en estado triplete. Las distancias de enlace (en Å) se muestran también para los estados triplete (en negro), quintuplete (en azul) y singlete (en rojo). (C) Análisis de difracción de rayos X del centro activo de la desmetilasa de histona JMJD2A (código pdb 2q8d) con la lisina K36 dimetilada de la histona H3, junto con la α -oxalil glicina (en lugar del α -oxoglutarato, denominado como α -OG). (D) Análisis de difracción de rayos X del centro activo de la desmetilasa de histona JMJD2A (código pdb 2ox0) con la lisina K9 dimetilada de la histona H3, junto con la α -oxalil glicina (en lugar del α -oxoglutarato, indicada como α -OG)

4.3.2.1 Sustratos dimetilados con orientación out

La coordenada de reacción obtenida para la transformación del complejo **out-14b** en **out-16b** es muy similar a la descrita anteriormente para el caso de la lisina trimetilada. Tal y como se observa en la Figura 4.7, el complejo reactivo **out-14b** es isoenergético para los estados de espín medio ($S=1$) y alto ($S=2$), mientras que, una vez más, el estado singlete es unas 29 kcal/mol más inestable energéticamente. En este estado de espín la reacción es concertada, a diferencia del triplete y quintuplete donde la reacción transcurre por etapas. Para los estados de espín medio y alto la transferencia del átomo de hidrógeno del metilo da lugar al intermedio hidroxilado **out-15b**, tras superar una energía de activación de aproximadamente 20 kcal/mol. Este compuesto es transformado en el producto hidroxilado **out-16b** mediante un mecanismo radicalario, a través del estado de transición **out-TS2b**, y tras superar una barrera energética de aproximadamente 3 kcal/mol. Asimismo, se debe mencionar que en este punto se da un punto de cruce **out-MECPb**, muy próximo al intermedio de reacción **out-15b**. Según estos resultados es posible concluir que en este caso también la transferencia del protón constituye la etapa limitante de la reacción. Finalmente, se observa que la reacción nuevamente es muy exotérmica y transcurre mediante una reactividad en dos estados, entre los estados de espín triplete y quintuplete.

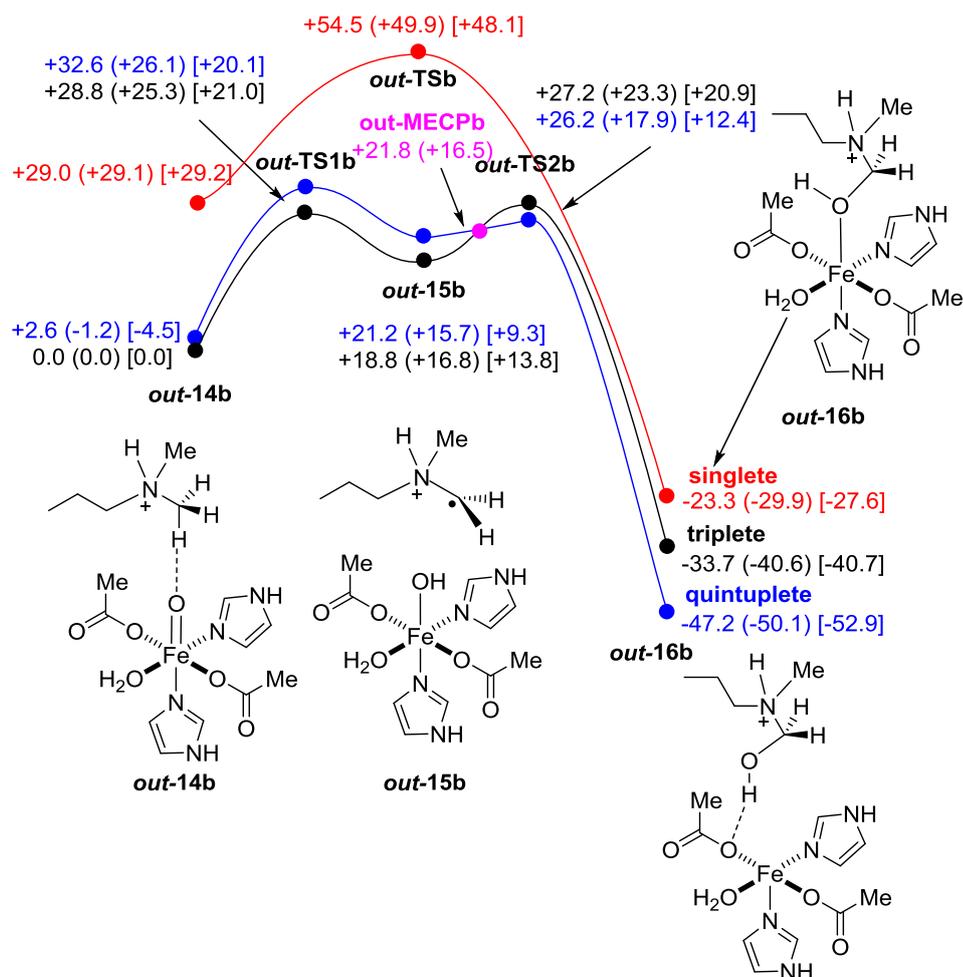


Figura 4.7. Coordenada de reacción correspondiente a la transformación de **out-14b** en **out-16b** calculado a nivel de teoría UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ con $\epsilon=78.39$. Las energías, en kcal/mol, son relativas respecto a **out-14b** en estado de espín triplete. Asimismo, se indica el punto de cruce de mínima energía **out-MECPb**. Las energías mostradas entre paréntesis y entre corchetes corresponden a las energías relativas y a las energías de Gibbs (298 K) respectivamente, calculadas en el nivel de teoría UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ.

A partir de los resultados obtenidos cabe concluir que las estructuras optimizadas siguen el mismo patrón que el de las lisinas trimetiladas (ver Figura 4.5), y no se observaron diferencias significativas en función del estado de espín. Así, y como se recoge en la Figura 4.8, las geometrías de los **out-TSb** y **out-TS1b** resultaron ser prácticamente iguales para los tres estados de espín analizados, siendo la estructura del **out-MECPb** muy similar a la estructura del intermedio **out-15b**. Por el contrario, nuevamente se observó que la distancia C-

O es aproximadamente 0.4 Å más corta para la estructura de transición **out-TS2b** en estado triplete.

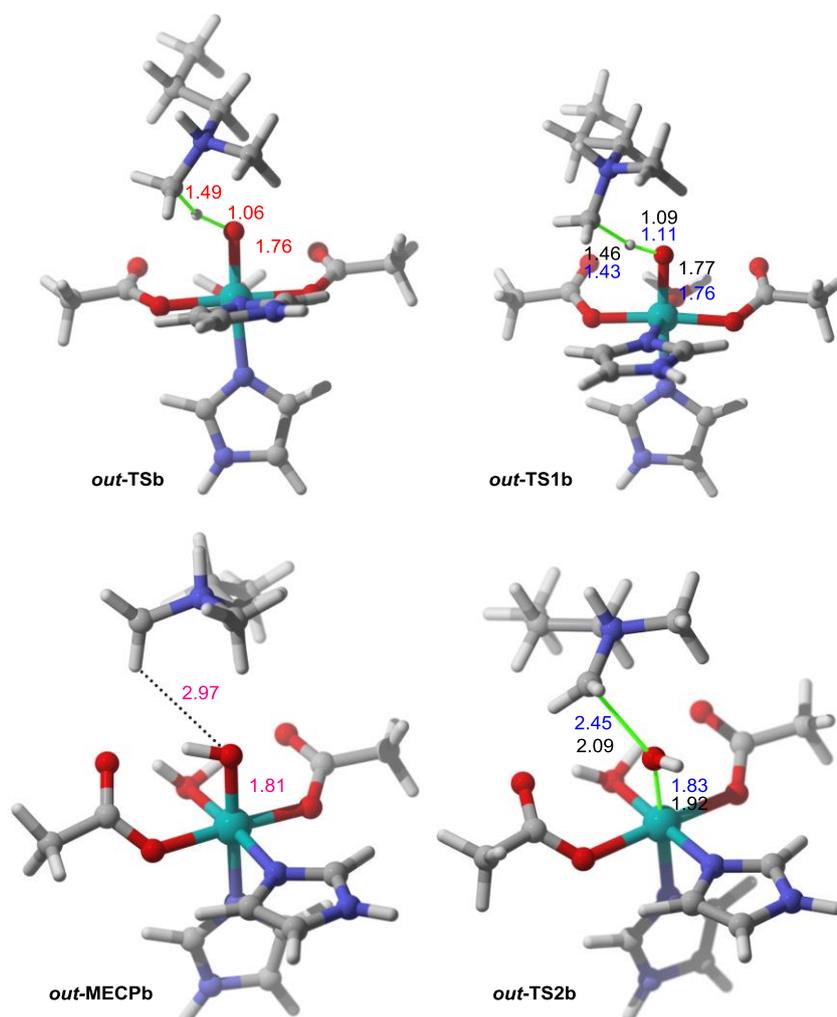


Figura 4.8. Geometrías optimizadas de los estados de transición **out-TSb**, **out-TS1b** y **out-TS2b** a nivel UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe), así como el punto de cruce de mínima energía **out-MECPb**. Las geometrías corresponden a los estados triplete, quintuplete y singlete en negro, azul y rojo, respectivamente. Las distancias de los enlaces están representadas en Å. En los **out-TS1b** y **out-TS2b**, las geometrías representadas corresponden a los estados de espín triplete y quintuplete, respectivamente.

4.3.2.1 Sustratos dimetilados con orientación *in*

Según nuestros resultados, las energías relativas del complejo reactivo **in-14b** siguen el orden quintuplete ~ triplete << singlete. Una vez más, las superficies de energía potencial para los estados de espín triplete y quintuplete resultaron estar muy cercanas entre sí, siendo la energía libre de Gibbs

ligeramente menor para el estado quintuplete. La abstracción del protón del metilo da lugar al intermedio *in-15b*, con una energía de activación de aproximadamente 25 kcal/mol para los estados triplete y quintuplete (Figura 4.9). Asimismo, y como ya observamos en las reacciones analizadas anteriormente, las características estructurales de los estados de transición de todos los estados de espín de los complejos *in-TS1b* e *in-TSb* resultaron ser muy similares. Además, no se observaron diferencias significativas con respecto al estado de transición *TS1a* (Figura 4.10, 4.9 y 4.6).

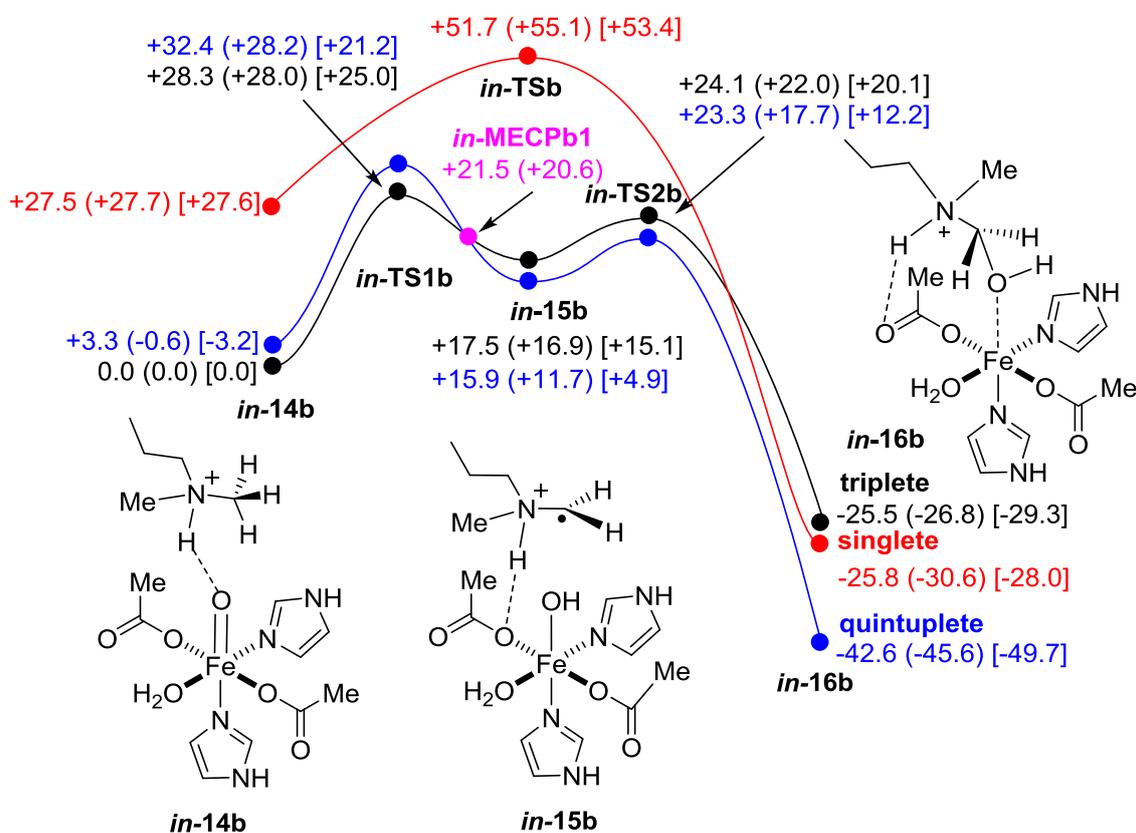


Figura 4.9. Coordenada de reacción correspondiente a la transformación de *in-14b* en *in-16b* calculado a nivel de teoría UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ con $\epsilon=78.39$. Las energías, en kcal/mol, son relativas respecto a *in-14b* en estado de espín triplete. Asimismo, se indica el punto de cruce de mínima energía *in-MECPb1*. Las energías mostradas entre paréntesis y entre corchetes corresponden a las energías relativas y a las energías de Gibbs (298 K) respectivamente, calculadas en el nivel de teoría UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ.

El intermedio de reacción ***in-15b*** da lugar al derivado hidroxilado ***in-16b*** a través del ***in-TS2b*** tras superar una energía de activación de Gibbs de sólo 7.3 kcal/mol para el quintuplete. Por lo tanto, la etapa limitante de la reacción corresponde a la abstracción del átomo de hidrógeno del sustrato dimetilado ***in-14b***. Además, se calculó el punto de cruce ***in-MECPb1*** que en este caso resultó estar próximo al intermedio ***in-15b***. Cabe mencionar también que este último cálculo no era necesario si se tiene en cuenta la energía de Gibbs, ya que el quintuplete es menos energético a lo largo de toda la coordenada de reacción. Finalmente, y como se recoge en la Figura 4.9, la reacción de desmetilación es altamente exergónica, ya que posee una energía libre de reacción de -50 kcal/mol aproximadamente. Así, y en base a los resultados obtenidos, concluimos que el mecanismo de la desmetilación de lisinas dimetiladas con la orientación *in* es muy similar al de los sustratos trimetilados y dimetilados con la orientación *out*, si se considera la formación de carbinoles de tipo ***in-16b***. Sin embargo, cabía considerar otros mecanismos alternativos, que se comentan con más detalle a continuación.

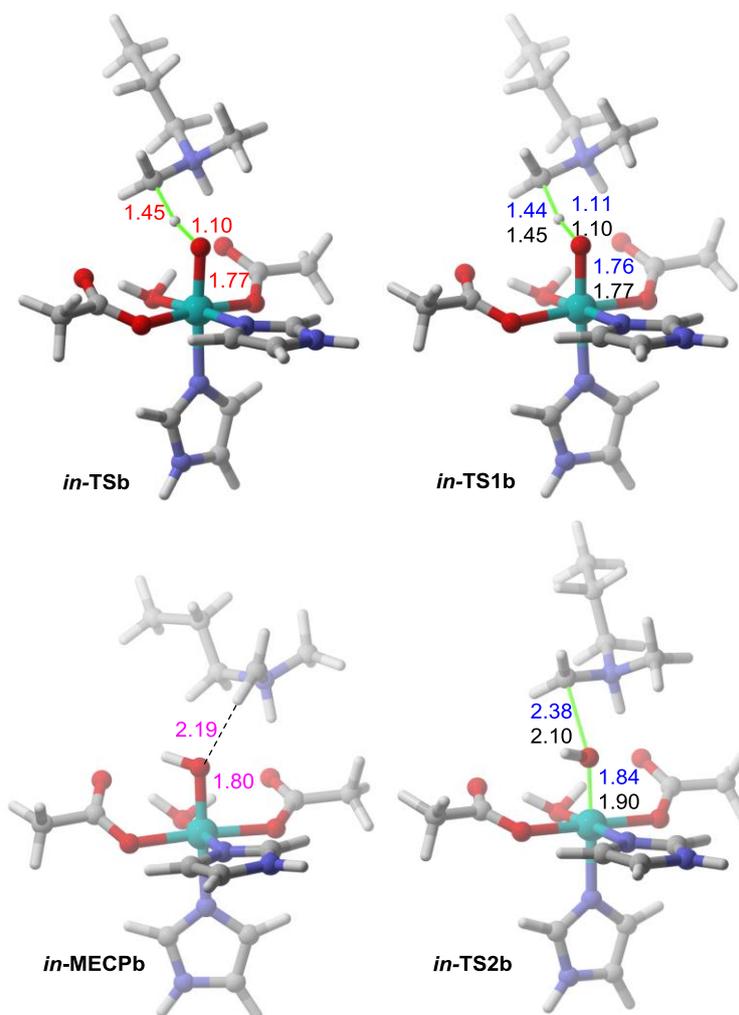
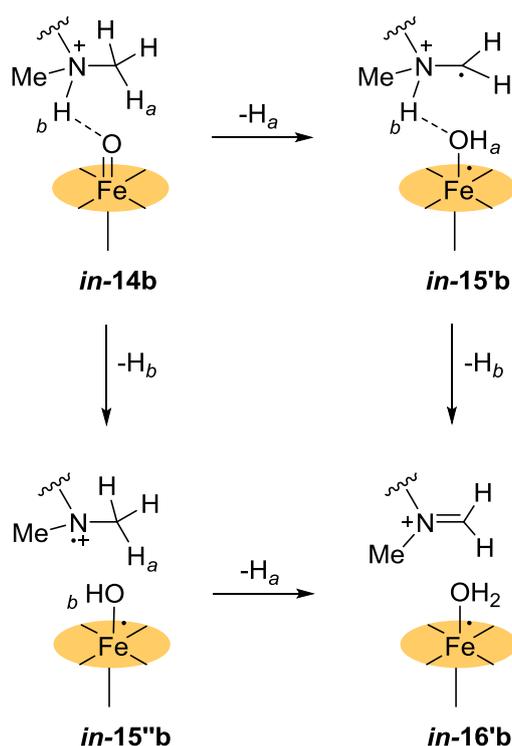


Figura 4.10. Geometrías optimizadas de los estados de transición *in-TSb*, *in-TS1b* e *in-TS2b* a nivel UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe), así como el punto de cruce de mínima energía *in-MECPb*. Las geometrías corresponden a los estados triplete, quintuplete y singlete en negro, azul y rojo, respectivamente. Las distancias de los enlaces están representadas en Å. En los puntos estacionarios *in-TS1b* e *in-TS2b*, las geometrías representadas corresponden a los estados de espín triplete y quintuplete, respectivamente.

En efecto, debido a la proximidad del enlace N-H con el grupo Fe(IV)=O, consideramos la posibilidad de la abstracción de este protón por el átomo de oxígeno como una vía alternativa para la reacción de desmetilación. Así, esta transferencia de hidrógeno es posible llevarla a cabo mediante dos procesos diferentes tal y como se representa en el Esquema 4.7. En primer lugar, cabe la posibilidad de que el reactivo *in-14b* abstraiga el hidrógeno correspondiente al metilo, H_a, y forme el compuesto *in-15'b*, para que en una segunda etapa

abstraiga el protón del nitrógeno, el H_b . Este proceso comparte la primera etapa limitante de la reacción con la reacción anteriormente expuesta correspondiente a la vía del hidroximetilamonio. Por el contrario, si se abstrae primeramente el protón del nitrógeno, H_b , se genera el intermedio ***in-15''b***, que tras la transferencia del H_a da el producto ***in-16'b***. Como se observa en el Esquema 4.7, ambos procesos convergen en el producto ***in-16'b***, donde tras abandonar el centro activo de la enzima, y tras la hidrólisis del catión iminio, se formarán los productos resultantes de la reacción de desmetilación, es decir, un equivalente de formaldehído y el residuo de lisina monometilado. En definitiva, el estudio de estos procesos requiere el análisis de dos nuevas coordenadas de reacción.



Esquema 4.7. Posibles mecanismos de desprotonación del sustrato ***in-14b*** para dar el correspondiente catión iminio ***in-16'b***.

En la Figura 4.11 se puede apreciar que, una vez formado el intermedio ***in-15b***, puede generarse su isómero ***in-15'b***, y se observa que ambos

compuestos son isoenergéticos. En el intermedio *in-15'b* existe un puente de hidrógeno débil entre el N-H y el grupo Fe-OH, que tras la transferencia del protón del catión aminio de *in-15'b* da lugar al correspondiente catión iminio *in-16'b*. Este proceso es altamente exotérmico y no ha sido posible obtener el estado de transición (Figura 4.11) correspondiente. Por tanto, este proceso se ve favorecido con respecto a la formación del producto hidroximetilado *in-16b* expuesto anteriormente (ver Figura 4.9).

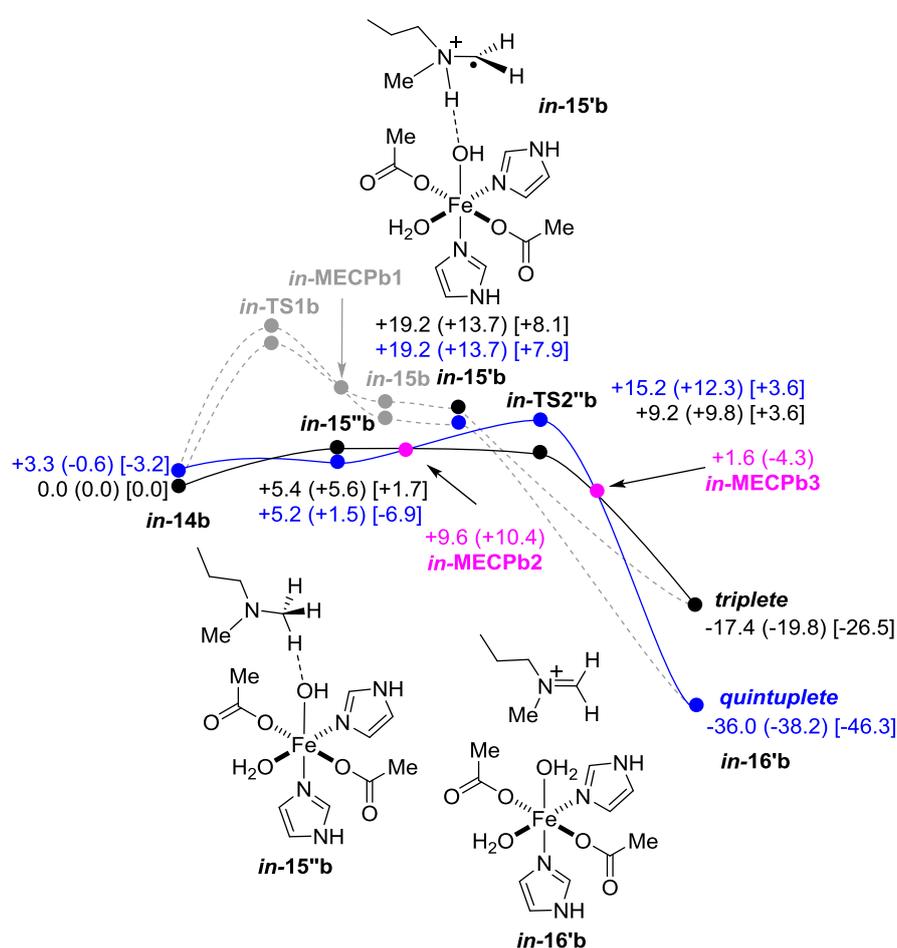


Figura 4.11. Coordenada de reacción correspondiente a la transformación de *in-14b* en *in-16'b* calculado a nivel de teoría UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ con $\epsilon=78.39$. Las energías, en kcal/mol, son relativas respecto a *in-14b* en estado de espín triplete. Asimismo, se indican los puntos de cruce de mínima energía *in-MECPb2* e *in-MECPb3*. Las energías mostradas entre paréntesis y entre corchetes corresponden a las energías relativas y a las energías de Gibbs (298 K), respectivamente, calculadas en el nivel de teoría UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ.

En lo que concierne al proceso alternativo representado en el Esquema 4.7, $in-14b \rightarrow in-15''b \rightarrow in-16'b$, ha resultado ser más rápido aún, ya que la desprotonación del reactivo $in-14b$ para dar el intermedio $in-15''b$ se produce sin barrera de activación. Esta última estructura es, en términos de energía libre y para el estado quintuplete, aproximadamente 7 kcal/mol más estable que el reactivo $in-14b$. La abstracción del hidrógeno H_a (Esquema 4.7), tiene lugar vía $in-TS2''b$, donde el estado triplete es 2.5 kcal/mol más estable que el quintuplete en términos de energía relativa. Por tanto, para que se dé la ruptura del enlace C- H_a es necesario que se dé un punto de cruce denotado como $in-MECPb2$ en la Figura 4.11. Este punto de cruce es aproximadamente 10 kcal/mol menos estable que el intermedio $in-14b$ y estructuralmente es muy similar $in-15''b$ con una ligera interacción $H_a \cdots O$ (Figura 4.12). El estado de transición $in-TS2''b$ calculado es bastante sincrónico y está asociado con una energía libre de activación de sólo 11 kcal/mol aproximadamente. Este proceso lleva asociada una probabilidad de cambio de espín cercana a 1. Dicho estado de transición da lugar al producto final $in-16'b$ que está favorecido para el estado de espín quintuplete, siendo necesario que se dé el punto de cruce $in-MECPb3$. Tal y como se puede observar en las Figura 4.11 y 4.13, la geometría del punto de cruce es muy similar a la correspondiente al producto de la reacción $in-16'b$, con el catión iminio formado y una molécula de agua unida al centro metálico.

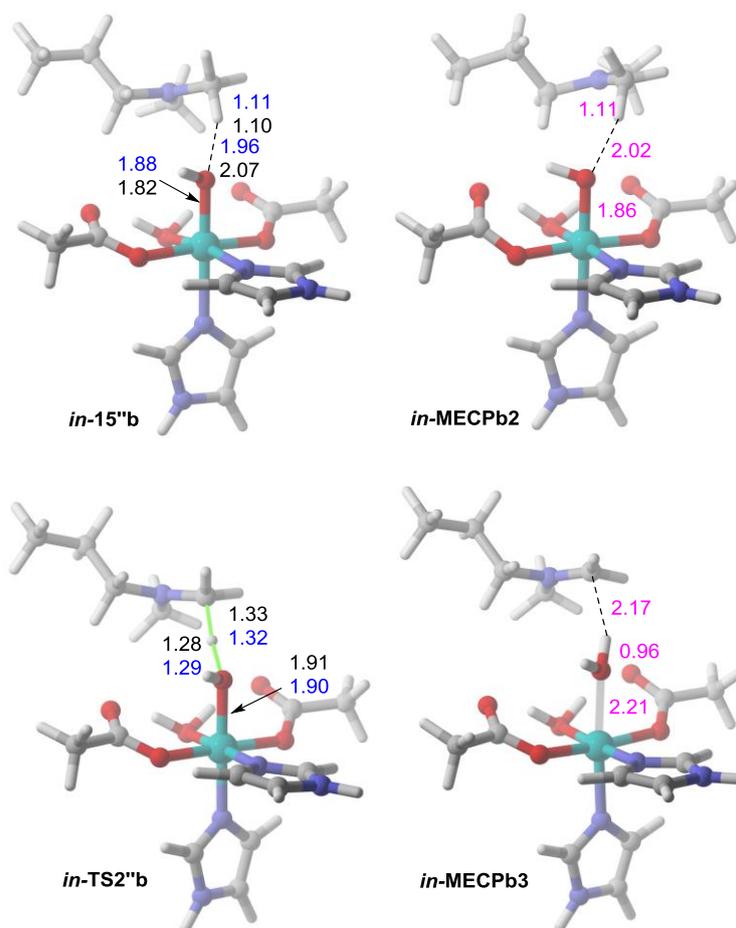


Figura 4.12. Geometrías optimizadas del intermedio *in-15''b*, de los puntos de cruce de mínima energía *in-MECPb2* e *in-MECPb3*, y del estado de transición *in-TS2''b*. Las geometrías corresponden a los estados triplete y quintuplete, en negro y azul, respectivamente. Las distancias de los enlaces están representadas en Å. Las geometrías de *in-15''b* e *in-TS2''b* corresponden a los estados de espín triplete y quintuplete, respectivamente.

4.3.3 Sustratos monometilados

En el caso de los residuos de lisina ϵ -*N*-monometilados, los dos enlaces N-H del fragmento de la amina pueden formar puentes de hidrógeno con los grupos Fe=O y carboxilato. Como consecuencia de esta interacción se genera una estructura conformacionalmente restringida, donde al menos un hidrógeno del grupo N-H está orientado al interior del grupo Fe(IV)=O (Figura 4.13A). Esta misma disposición es la que se observa en la Figura 4.13B, donde se muestra el análisis de la difracción de rayos X del complejo formado por la JMJD2A y el

residuo de lisina monometilado Lys 36 con la histona 3 (H3K36Me1).⁴⁸ Por tanto, es posible concluir que, al igual que ocurre en el caso de los residuos de lisina dimetilados, la reacción de desmetilación de residuos de lisina monometilados podrá realizarse mediante dos mecanismos diferentes. A continuación, se procederá a explicar los detalles de las mismas: la ruta del carbinol en primer lugar, y, seguidamente, la ruta del catión iminio.

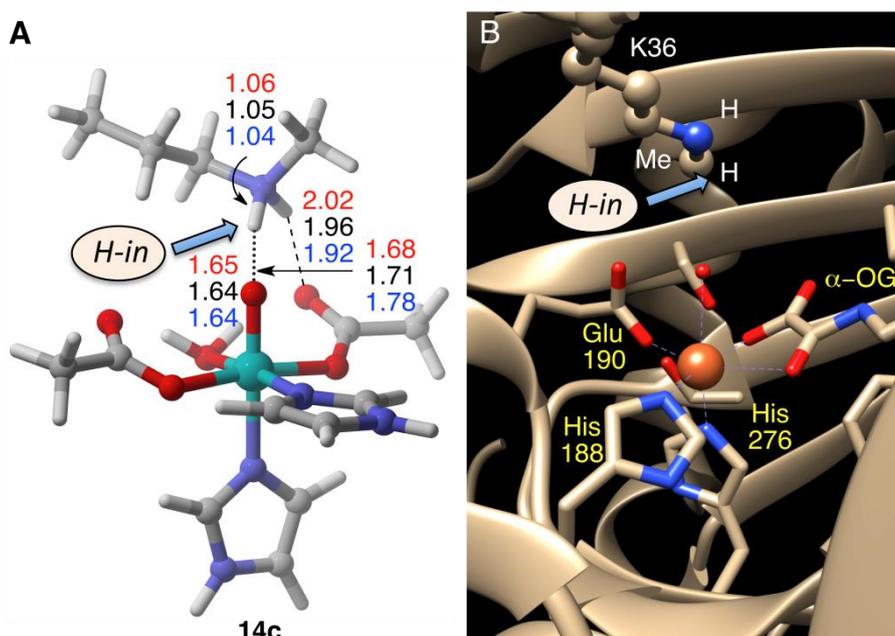


Figura 4.13. (A) Geometría optimizada del complejo **14c** en estado triplete a nivel UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe). Las distancias de enlace (en Å) se muestran también para los estados triplete (en negro), quintuplete (en azul) y singlete (en rojo). (B) Análisis de difracción de rayos X del centro activo de la desmetilasa de histona JMJD2A (código pdb 2pxj) con la lisina K36 monometilada de la histona H3, cristalizado junto con la α -oxalil glicina (en lugar del α -oxoglutarato), denominada como α -OG.

El mecanismo de desmetilación a través de la ruta del carbinol sigue el mismo patrón que los anteriormente mencionados de las lisinas tri- y dimetiladas. Tal y como se recoge en el diagrama de la reacción que se muestra en la Figura 4.14, las superficies de energía potencial para los casos de S=1 y S=2 son muy cercanas, y, una vez más, el estado singlete resultó ser considerablemente más

⁴⁸ Z. Chen, J. Zang, J. Kappler, X. Hong, F. Crawford, Q. Wang, F. Lan, C. Jiang, J. Whetstone, S. Dai, K. Hansen, Y. Shi, G. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10818-10823.

energético. En este caso también la transferencia del protón para formar el intermedio **15c** lleva consigo una barrera de activación de aproximadamente 26 kcal/mol. Esta etapa limita la velocidad de la reacción ya que nuevamente resultó ser una barrera mucho más alta que la necesaria para generar el estado de transición **TS2c**, donde únicamente son necesarias unas 2.8 kcal/mol para generar el correspondiente grupo hidroximetilamonio **16c** (Figura 4.14 y 4.17). Asimismo, se observó que las geometrías optimizadas tanto de los intermedios como de los estados de transición eran similares a las halladas para la reacción de desmetilación de las lisinas tri-, y dimetiladas, tanto para la orientación *in*, como para la orientación *out*.

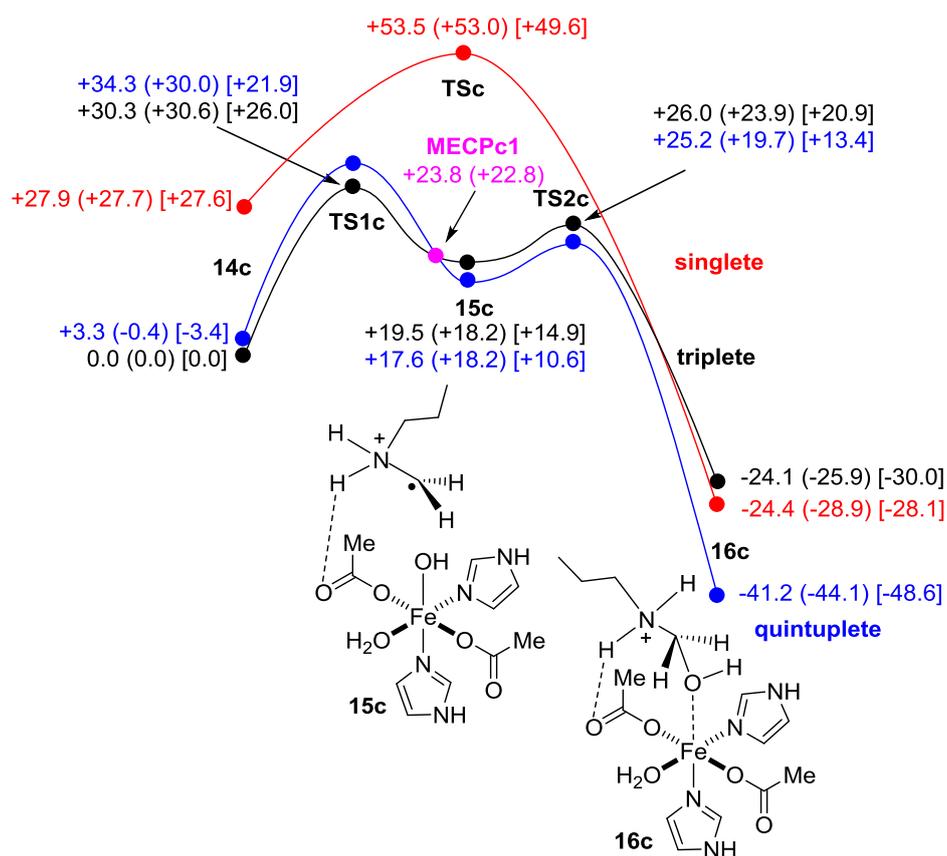


Figura 4.14. Coordenada de reacción correspondiente a la transformación del complejo monometilado **14c** en **16c** calculado a nivel de teoría UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ con $\epsilon=78.39$. Las energías, en kcal/mol, son relativas respecto a **14c** en estado de espín triplete. Asimismo, se indica el punto de cruce de mínima energía **MECPc1**. Las energías mostradas entre paréntesis y entre corchetes corresponden a las energías relativas y a las energías de Gibbs (298 K) respectivamente, calculadas en el nivel de teoría UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ.

En lo que respecta a la vía del catión iminio, los resultados obtenidos se recogen en la Figura 4.16. Como se puede observar en este diagrama, el producto **16'c** puede generarse a través de diferentes vías. Así, si primeramente se realiza la transferencia del protón del enlace C-H se genera el intermedio **15c**, que a su vez puede derivar en su conformero **15'c**, donde se produce la transferencia del protón del grupo N-H en una etapa que transcurre sin barrera de activación para generar el producto **16'c**. Esta primera etapa de transferencia del protón del grupo de C-H es común a la analizada anteriormente (ver Figura 4.14), pero en vista de que ambos intermedios, **15c** y **15'c**, son isoenergéticos, esta segunda vía de formación de catión iminio estará favorecida respecto a la vía de formación del producto hidroximetilado, ya que esta etapa se produce sin barrera. Este proceso es similar al caso de los residuos de lisina dimetilados con la orientación “*in*”. Por el contrario, si primeramente se produce la transferencia de protón del enlace N-H, se genera el intermedio **15''c** en una etapa que transcurre sin energía de activación. Posteriormente, según nuestros cálculos, dicho intermedio se transforma en el producto **16'c** pasando por el estado de transición **TS2''c** tras vencer una barrera de tan solo 2 kcal/mol aproximadamente en términos de energía libre. Las características geométricas de este estado de transición son similares a las encontradas para el *in*-**TS2''b**, salvo el enlace de hidrógeno entre el N-H y el residuo carboxilado. Nuestros estudios mostraron que la coordenada de reacción transcurre en un estado degenerado entre los estados de espín triplete y quintuplete. Asimismo, se localizó el punto de cruce de mínima energía **MECPc2** entre el **TS2''c**, que es 0.9 kcal/mol más estable en triplete, y el **16'c**, que está favorecido en estado quintuplete.

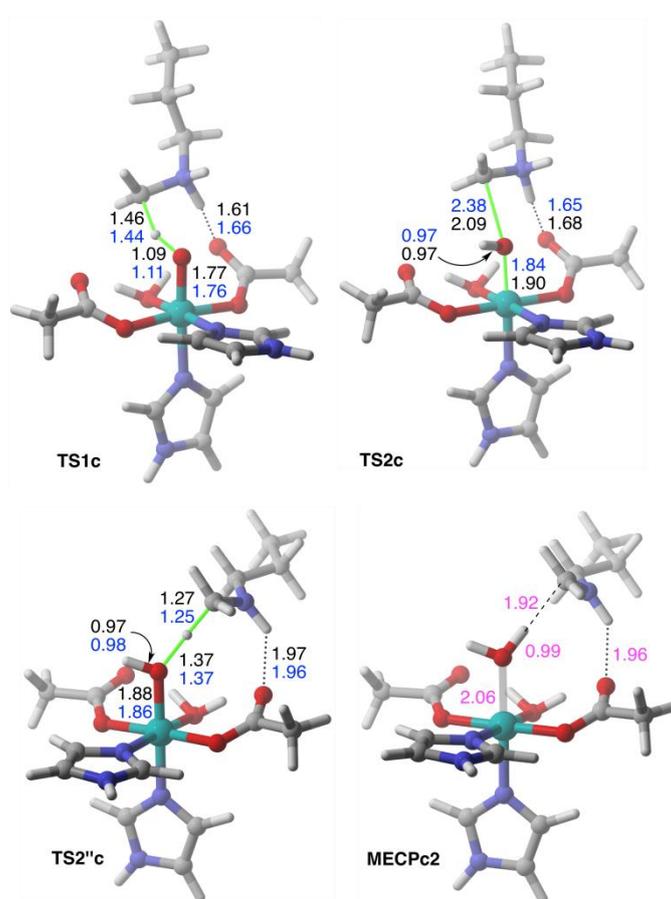


Figura 4.15. Geometrías optimizadas de los estados de transición **TS1c**, **TS2c** y **TS2''c** a nivel UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe), así como el punto de cruce de mínima energía **MECPc2**. Las geometrías corresponden a los estados triplete y quintuplete en negro y azul, respectivamente. Las distancias de los enlaces están representadas en Å. Los estados de transición representados corresponden al estado triplete, con la excepción del **TS2c** que corresponde al estado de espín quintuplete.

En vista de los resultados obtenidos es posible concluir que intrínsecamente la primera etapa de la reacción de desmetilación de los residuos de lisina monometilados corresponde a la desprotonación del enlace N-H, que se produce sin barrera de activación. Por tanto, la ruta del catión iminio está favorecida respecto a la formación del complejo hidroximetilado. El intermedio formado se hidroliza fuera del centro activo de la enzima para dar formaldehído y el residuo de lisina monometilado. Según estos resultados, la selectividad de enzimas como la JMJD2A frente a sustratos trimetilados tiene que ser debida a

factores entrópicos de los tres grupos metilos y/o a enlaces de hidrógeno.⁴⁹ A continuación se tratará de resumir las posibles causas de por qué estas enzimas son capaces de discernir entre diferentes lisinas, así como el grado de metilación.

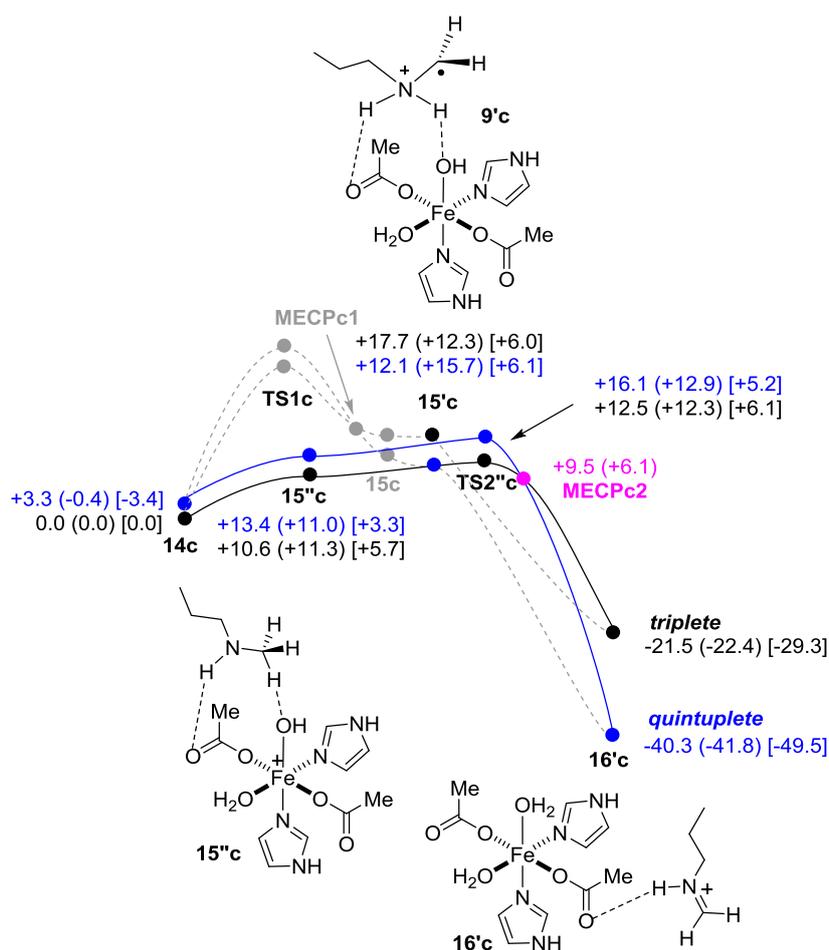


Figura 4.16. Coordenada de reacción correspondiente a la transformación de **14c** en **16'c** calculada a nivel de teoría UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ con $\epsilon=78.39$. Las energías, en kcal/mol, son relativas respecto a **14c** en estado de espín triplete. Asimismo, se indica el punto de cruce de mínima energía **MECPc2**. Las energías mostradas entre paréntesis y entre corchetes corresponden a las energías relativas y a las energías de Gibbs (298 K), respectivamente, calculadas en el nivel de teoría UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ.

Con intención de racionalizar los resultados obtenidos se realizó el análisis de los orbitales moleculares que se muestra en la Figura 4.17. Así, se analizaron las interacciones de los orbitales moleculares del grupo Fe=O con los enlaces

⁴⁹ O. Ulucan, O. Keskin, B. Erman, A. Gursoy, *PLoS One* **2011**, *6*, e24664.

localizados C-H y N-H. En dicho análisis se comprobó que el átomo de oxígeno unido al hierro es capaz de interactuar con un electrón del enlace X-H, (donde X=C, N), a través de los orbitales moleculares parcialmente ocupados π_{xz}^*/π_{yz}^* . Esta interacción es posible tanto para el estado triplete, S=1, como para el quintuplete, S=2. En el análisis se observó que, a diferencia del estado triplete, cuando S=2 el orbital molecular δ_{xy} está parcialmente ocupado, lo que conlleva que el orbital $s_{x^2-y^2}^*$, que está fuertemente estabilizado respecto al triplete, también esté parcialmente lleno. No obstante, las energías de los orbitales moleculares p_{xz}^*/p_{yz}^* y s_{zz}^* correspondientes al grupo Fe=O son muy similares energéticamente para ambos estados electrónicos. Este dato se corresponde con la similitud hallada en las geometrías optimizadas tanto de los estados de transición como de los intermedios asociados al enlace O-H para ambos estados de espín. Asimismo, al analizar los orbitales s_{zz}^* de ambos estados electrónicos se observó que son muy energéticos y, por tanto, no pueden interactuar con los enlaces C-H y N-H, lo que permite excluir la vía $\sigma \rightarrow \sigma^*$ en favor de la interacción $s \rightarrow p^*$. Por tanto, la geometría angular aislada para el enlace H-O-Fe, tanto de los estados de transición como de los intermedios de reacción aislados, concuerda con esta interacción $s \rightarrow p^*$. Por último, se observó que el enlace N-H era termodinámicamente más estable y cinéticamente más reactivo que el enlace C-H, tal y como se demuestra con la energía de activación asociada a la ruptura de los enlaces N-H de los reactivos **in-14b** y **14c**.

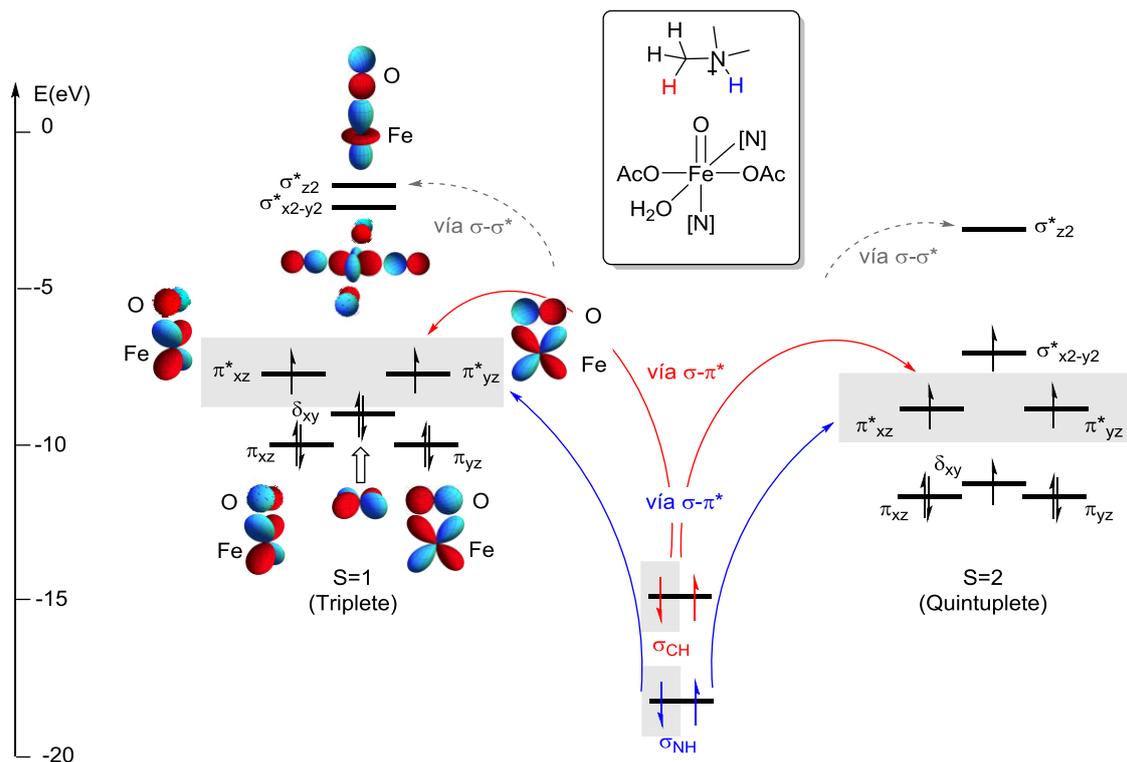


Figura 4.17. Interacciones de los orbitales entre los enlaces localizados C-H y N-H y la unidad Fe(IV)=O de las enzimas JMJD en estado de espín triplete y quintuplete.

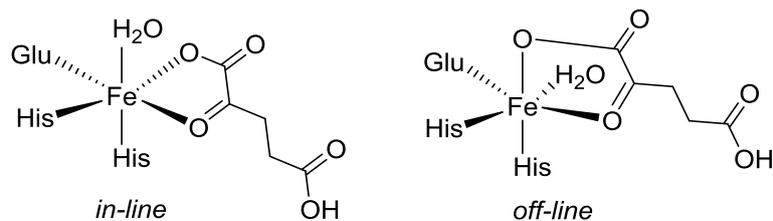
El siguiente paso consistió en comprender la selectividad que muestran las enzimas del tipo JMJD2A en la desmetilación de los residuos de lisina con diferente grado de metilación. Como se ha comentado anteriormente, el estudio del mecanismo de acción de las enzimas con dominio Jmj-C se ve dificultado por la variabilidad que presentan. En este aspecto, a pesar de poseer todas ellas el mismo centro catalítico, muestran selectividades diferentes sobre diferentes sustratos.

En esta línea, Hausinger⁵⁰ introdujo los conceptos *off-line* e *in-line* para nombrar los diferentes modos de quelación del centro metálico con el α -acetoglutarato para enzimas dependientes de este cofactor y del centro metálico. La diferencia de estas dos conformaciones radica en la posición del ligando

⁵⁰ R. P. Hausinger, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, 39, 21-68.

aquo. Así, como se muestra en el Esquema 4.8, en la disposición *in-line* el oxígeno molecular es capaz de desplazar al agua, que está en la posición axial, para formar el grupo ferrilo. Esto da lugar al inicio del ciclo catalítico y proporciona la disposición óptima para la entrada del sustrato. Por el contrario, en la conformación *off-line* el ligando aquo se sitúa en la posición ecuatorial mientras que un oxígeno del carboxilato del α -cetoglutarato ocupa la posición axial, lo que imposibilita la entrada del oxígeno y por tanto el comienzo del ciclo catalítico (ver Esquema 4.8). En esta línea, años más tarde, Cheng y colaboradores⁵¹ analizaron la selectividad de KDM2A. Esta enzima, también conocida como JHDM1A, es capaz de desmetilar los residuos H3K36Me_{2/1}, mientras que no muestra actividad para el mismo residuo trimetilado. En este trabajo cristalizaron dicha enzima con los tres sustratos diferentes y no observaron diferencias significativas en el modo de interacción de los mismos con el centro activo. Por tanto se descartó el impedimento estérico como la razón de la selectividad, ya que el centro catalítico posee suficiente espacio para albergar la lisina con mayor grado de metilación. Estos autores postularon que el origen de la selectividad de KDM2A podía ser debido a que la lisina trimetilada tiene impedido el cambio conformacional necesario para el inicio del ciclo catalítico y, por ello, el α -cetoglutarato quelata el Fe únicamente en la conformación *off-line*. En cambio, las lisinas con menor grado de metilación posibilitan la entrada del oxígeno molecular al cambiar de la conformación *off-line* a la *in-line*.

⁵¹ Z. J. Cheng, P. Cheung, A. J. Kuo, E. T. Yukl, C. M. Wilmot, O. Gozani, D. J. Patel, *Gene. Dev.* **2014**, *28*, 1758-1771.



Esquema 4.8. Representación esquemática de las diferentes formas de coordinación del α -cetoglutarato con el Fe en las dioxigenasas dependientes de ambos cofactores, denominadas conformaciones *in-line* y *off-line*.

Aparte de estas consideraciones, analizamos el potencial electrostático de diferentes enzimas con dominio Jmj-C para ver si la polaridad del canal de las enzimas influía en la selectividad de las mismas. Así, como modelo de enzima con preferencia por $KMe_3 > KMe_2 >> KMe_1$ se analizó la estructura de rayos X de la JMJD2A con el residuo H3K36Me2 (ver Figura 4.18A). Tal y como se muestra en dicha figura, el análisis del potencial electrostático realizado reveló la existencia de una amplia cavidad con un entorno muy polar. Por tanto, el grupo N-H presente en los residuos de lisina di- y monometilados puede interactuar con múltiples grupos con carga parcial negativa presentes en la misma. Así, el análisis realizado señala como residuos con potencial para interactuar con las lisinas cargadas positivamente la Ser-288 y la Tyr-177 principalmente. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Couture y colaboradores⁴⁵ y Chen y colaboradores,⁴⁸ donde entre otros aminoácidos también resaltaron estos residuos como posibles responsables de la selectividad de esta enzima. Así, los átomos de oxígeno de estos residuos pueden formar puentes de hidrógeno con el grupo N-H de la lisina, dificultando el acceso del sustrato al grupo Fe=O del centro activo de la enzima (Figura 4.19B). Si se considera que intrínsecamente el mecanismo de desmetilación para los residuos di- y monometilados se da mediante la ruta del catión iminio con la transferencia del N-H en primer lugar,

es posible concluir que dicho mecanismo estaría dificultado para el primer caso e impedido para el segundo. Además, y si se planteara la ruta del hidroximetilamonio como alternativa para la desmetilación, tal y como se recoge en diferentes trabajos, la probabilidad de encontrar un metilo cercano al ferrilo decrece considerablemente al disminuir el grado de metilación.³⁰ Así, Ulucan y colaboradores⁴⁹ calcularon mediante dinámica molecular la probabilidad de hallar un metilo a menos de 4.7Å del hierro, que resultó ser del 86% para las lisinas trimetiladas, mientras que para las di- y monometiladas decaía a valores de 4.5% y 1.5%, respectivamente. Además, estos autores sugieren que los espacios vacíos de los metilos ausentes en los sustratos di- y monometilados podían ser ocupados por moléculas de agua presentes en el medio, alejando así el sustrato del centro catalítico.

Por el contrario, estos resultados obtenidos para la JMJD2A no se hallaron en el análisis de la enzima PHF8 junto con el residuo H3K9Me2. Esta enzima, también conocida como KDM7B o JHDM1F, fue la escogida en este trabajo como modelo de desmetilasa de histona que no muestra actividad sobre los residuos trimetilados (ver Figura 4.18B). En este caso, se observó que la cavidad del centro activo de la enzima es más pequeña. Este dato concuerda con el calculado por Yu y colaboradores, donde estimaron el volumen correspondiente de ambas enzimas, 169 Å³ para PHF8, mientras que para JMJD2A era de 722 Å³.⁵² Por lo tanto, el acceso de los residuos trimetilados estaría excluido debido a la estrechez del canal de PHF8 (Figura 4.19A). Asimismo, tal y como se recoge en la Figura 4.18B, nuestro análisis del potencial electrostático mostró que la

⁵² L. Yu, Y. Wang, S. Huang, J. Wang, Z. Deng, Q. Zhang, W. Wu, X. Zhang, Z. Liu, W. Gong, Z. Chen *Cell, Res.* **2010**, *20*, 166-173.

cavidad del centro activo se encuentra rodeada de residuos hidrofóbicos. Por consiguiente, el grupo N-H de los residuos de las lisinas di- y monometiladas no será atrapado por átomos aceptores de hidrógeno. Así, los sustratos pueden acceder con total libertad al centro activo de la enzima y llevar a cabo la desmetilación mediante el mecanismo anteriormente propuesto. Todas estas consideraciones se recogen de forma gráfica en la Figura 4.19.

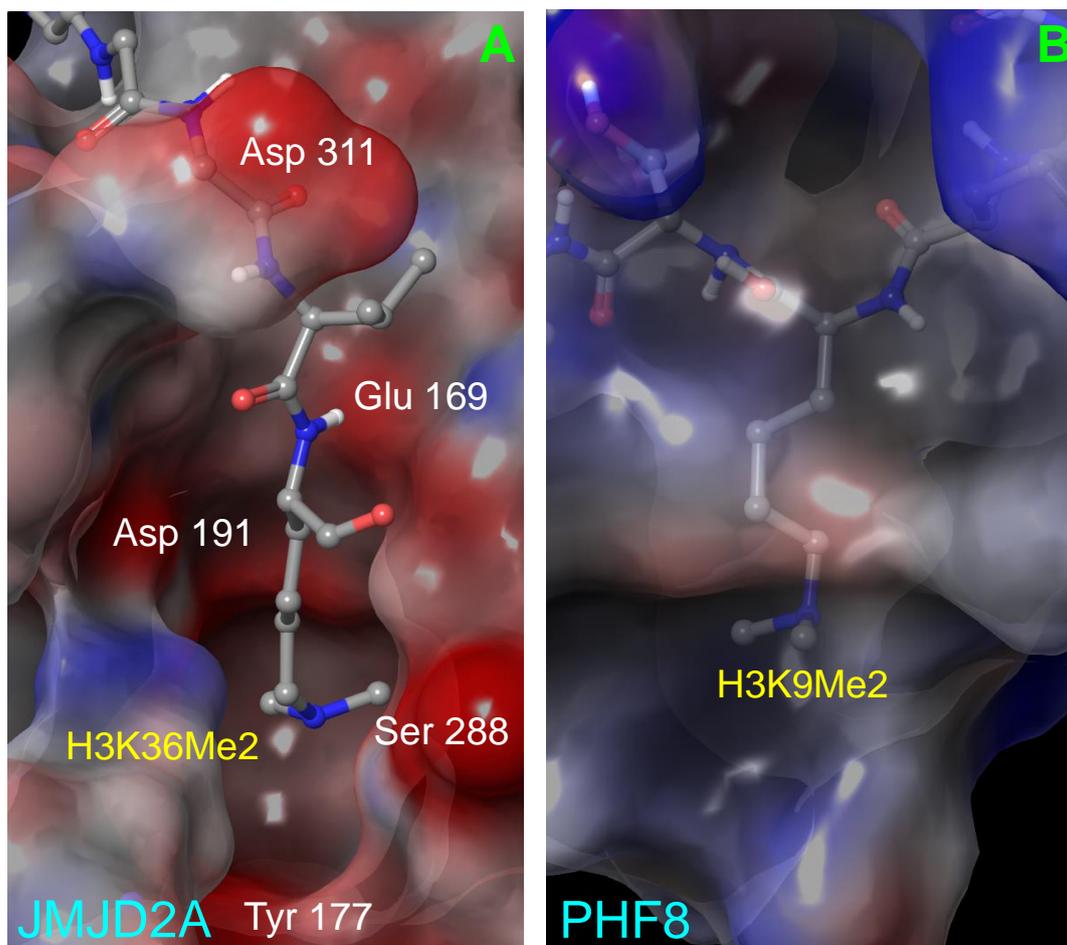


Figura 4.18. Superficies de potencial electrostático de las cavidades asociadas a la interacción de H3K36Me2 con JMJD2A (A, código pdb 2q8d) y H3K9Me2 con PHF8 con H3K9Me2 (B, código pdb 3k3n). Las cargas negativas y positivas se representan en rojo y azul, respectivamente.

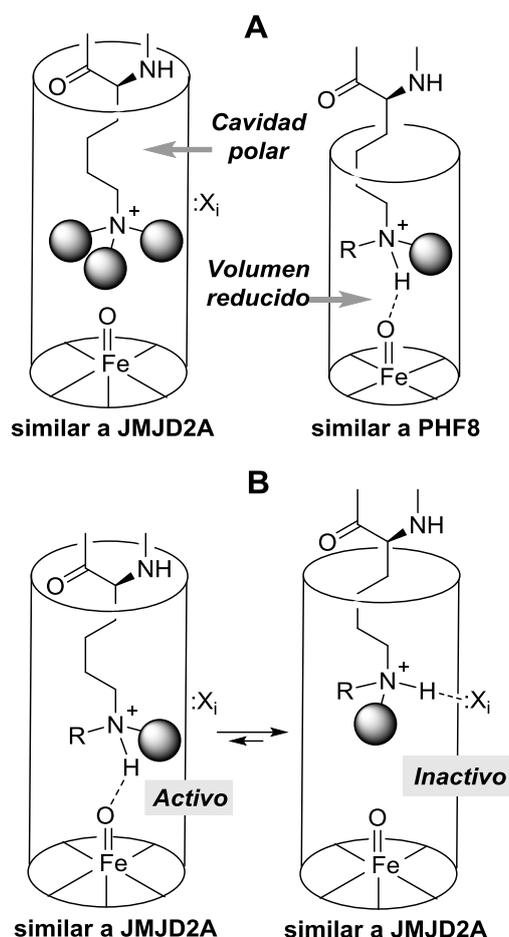


Figura 4.19. (A) Representación esquemática de la selectividad frente al tamaño y la polaridad de los grupos trimetilo (izquierda) y di- y monometilo de la desmetilasa de histonas (derecha). (B) Representación esquemática de los complejos activos e inactivos de los sustratos dimetilados ($R=Me$) y monometilados ($R=H$) en una cavidad polar similar a la que está presente en las desmetilasas de histonas que son selectivas con los residuos trimetilados.

4.4 Conclusiones

En este capítulo se recoge una búsqueda sistemática de los mecanismos de desmetilación de residuos de lisina catalizada por desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C. Así, una vez que se forma el grupo $Fe(IV)=O$, el centro activo puede fluctuar entre los estados de espín triplete y quintuplete, de modo que el cruce de espín tiene asociada una probabilidad cercana a 1.

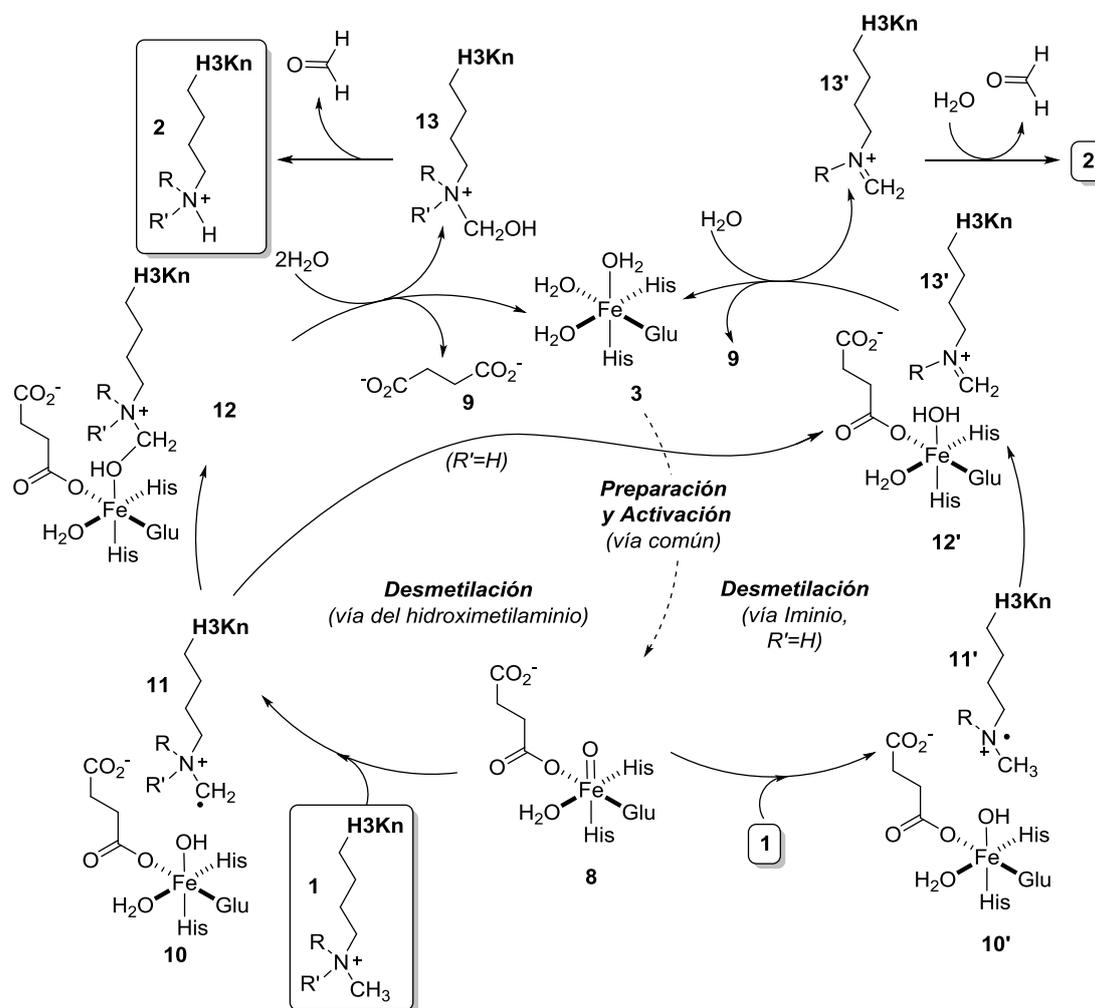
Los resultados obtenidos indican que tras la preparación y activación del ciclo catalítico (transformación **3** \rightarrow **8**, ver Esquema 4.5), existen dos vías

alternativas para llevar a cabo la desmetilación: la vía del hidroximetilamonio y la vía del iminio (Esquema 4.9).

La vía del hidroximetilamonio comienza con la ruptura homolítica del enlace C-H de uno de los metilos presentes en el sustrato **1** tras la interacción con el fragmento Fe(IV)=O presente en el intermedio activado **8**. En el caso de los residuos trimetilados, tras esta primera etapa de transferencia del hidrógeno del enlace C-H, se generan el intermedio **10** y el catión radicalario **11**, para dar el compuesto coordinado **12** mediante un ataque radicalario. Finalmente, se libera el intermedio hidroximetilamonio **13** que es hidrolizado rápidamente dando lugar a formaldehído y el producto desmetilado **2**. Para este tipo de sustratos la vía del hidroximetilamonio es la única que da lugar a la desmetilación.

En el caso de los residuos de lisina dimetilados y monometilados, es posible llevar a cabo la reacción anteriormente expuesta o desmetilar mediante la vía del iminio. Para desmetilar mediante este último mecanismo, una vez generados los intermedios **10** y **11**, se puede producir la transferencia del protón del grupo N-H al grupo Fe-OH generando el complejo **12'** y el intermedio iminio **13'**, que nuevamente tras liberarse del centro activo, se hidroliza y genera los productos de la reacción de desmetilación, el formaldehído y el sustrato desmetilado. Asimismo, es posible obtener el mismo producto **13'** invirtiendo el orden de las etapas, es decir, se puede producir primeramente la transferencia del protón del grupo N-H generando los intermedios **10' + 11'** que, tras la ruptura homolítica del enlace C-H, generan nuevamente el catión iminio **13'**. Según nuestros resultados, los sustratos di- y monometilados son desmetilados mediante este último mecanismo, ya que la ruptura del enlace C-H inicial lleva asociada una energía de activación de 22 kcal/mol aproximadamente, muy superior a la ruptura

inicial del enlace N-H. Por lo tanto, la reacción de desmetilación del ciclo catalítico del Esquema 4.5 debe ampliarse con estas dos vías alternativas expuestas en el Esquema 4.9.



Esquema 4.9. Posible mecanismo de desmetilación asociado a desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C.

Finalmente, y de acuerdo con los resultados experimentales,^{45,48,52} nuestro trabajo señala que el origen de la selectividad, además de tener en cuenta los residuos presentes en el centro activo, debe considerar también la polaridad del canal, la posibilidad de rotación del α -cetoglutarato de la conformación *off-line* a la *in-line*, así como el volumen de la cavidad de las enzimas, ya que todo ello juega un papel determinante en la selectividad. Así, las enzimas selectivas de

residuos di- y monometilados presentan un canal mucho más estrecho y apolar, lo que impide el acceso de los residuos trimetilados a ellos. No obstante, en los casos en los que exista suficiente espacio para albergar los sustratos trimetilados, cabe la posibilidad de que el ciclo catalítico pueda estar bloqueado por impedimento en la rotación del cofactor debido al volumen del sustrato. Por el contrario, la cavidad del centro activo de las enzimas selectivas de los sustratos trimetilados es más amplia y presenta aminoácidos polares en el canal de la enzima, lo que impide o dificulta el acceso de los grupos N-H al grupo Fe=O del centro activo. Esto hace que la desmetilación de sustratos di- y monometilados esté ralentizada o impedida para este tipo de enzimas. Con todo ello, se concluye que el entorno del ciclo catalítico modula la actividad de las enzimas y que los aminoácidos cercanos al centro catalítico parecen ser los responsables de discernir entre los diferentes sustratos, según su grado de metilación.

5. REACCIÓN DE DESMETILACIÓN DE AMINAS CATALIZADA POR EL CITOCROMO P450

In this work, we studied computationally the N-demethylation reaction of methylamine, dimethylamine, and trimethylamine as archetypal examples of primary, secondary, and tertiary amines catalyzed by high-field low-spin Fe-containing enzymes such as cytochromes P450. Using DFT calculations, we found that the expected C–H hydroxylation process was achieved for trimethylamine. When dimethylamine and methylamine were studied, two different reaction mechanisms (C–H hydroxylation and a double hydrogen atom transfer) were computed to be energetically accessible and both are equally preferred. Both processes led to the formation of formaldehyde and the N-demethylated substrate. Finally, as an illustrative example, the relative contribution of the three primary oxidation routes of tamoxifen was rationalized through energetic barriers obtained from density functional calculations and docking experiments involving CYP3A4 and CYP2D6 isoforms. We found that the N-demethylation process was the intrinsically favored one, whereas other oxidation reactions required most likely preorganization imposed by the residues close to the active sites.

J. Phys. Chem. A **2018**, 122, 1658–1671

5.1 La familia de los Citocromos P450

Los citocromos P450¹ constituyen una gran familia de enzimas que están presentes en todas las formas de vida (plantas, bacterias, mamíferos).² Estas enzimas promueven la oxidación de compuestos tanto endógenos como exógenos. Se ha cuantificado en aproximadamente 20000 el número de genes que codifican estas oxigenasas entre todas las especies en las que están presentes.³ A pesar de esta gran diversidad, todos ellos presentan un grupo hemo, con la protoporfirina IX, unido a una cisteína mediante el enlace del Fe(III) al S-H del grupo prostético.

En la introducción de esta Tesis Doctoral se ha indicado que estas enzimas se agrupan dentro de las oxidoreductasas, más concretamente en las monooxigenasas. Para poder realizar reacciones de oxidación estas metaloenzimas requieren de un agente oxidante. Esta función la realiza bien el oxígeno molecular o el H₂O₂. Los ciclos catalíticos de las monooxigenasas presentan ciertas similitudes, por lo que se muestran conjuntamente los ciclos catalíticos de las peroxidasas,⁴ de las catalasas⁵ y del citocromo P450^{2,6} en el Esquema 5.1.

¹ a) D. R. Nelson; T. Kamataki; D. J. Waxman; F. P. Guengerich; R. W. Estabrook; R. Feyereisen; F. J. Gonzalez; M. J. Coon, I. C. Gunsalu. O. Gotoh, *DNA Cell Biol.*, 1993, 12, 1-51; b) M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, J. H. Dawson, *Chem. Rev.*, 1996, 96, 2841-2888; c) *Cytochrome P450: Structure Mechanism and Biochemistry*, P. R. Ortiz de Montellano, (Eds.: P. R. Ortiz de Montellano), University of California, San Francisco, 2011; d) *Iron-Containing Enzymes Versatile Catalysis of Hydroxylation Reactions In Nature*, (Eds.: S. P. de Visser, D. Kumar), RSC Publishing, Cambridge, 2011.

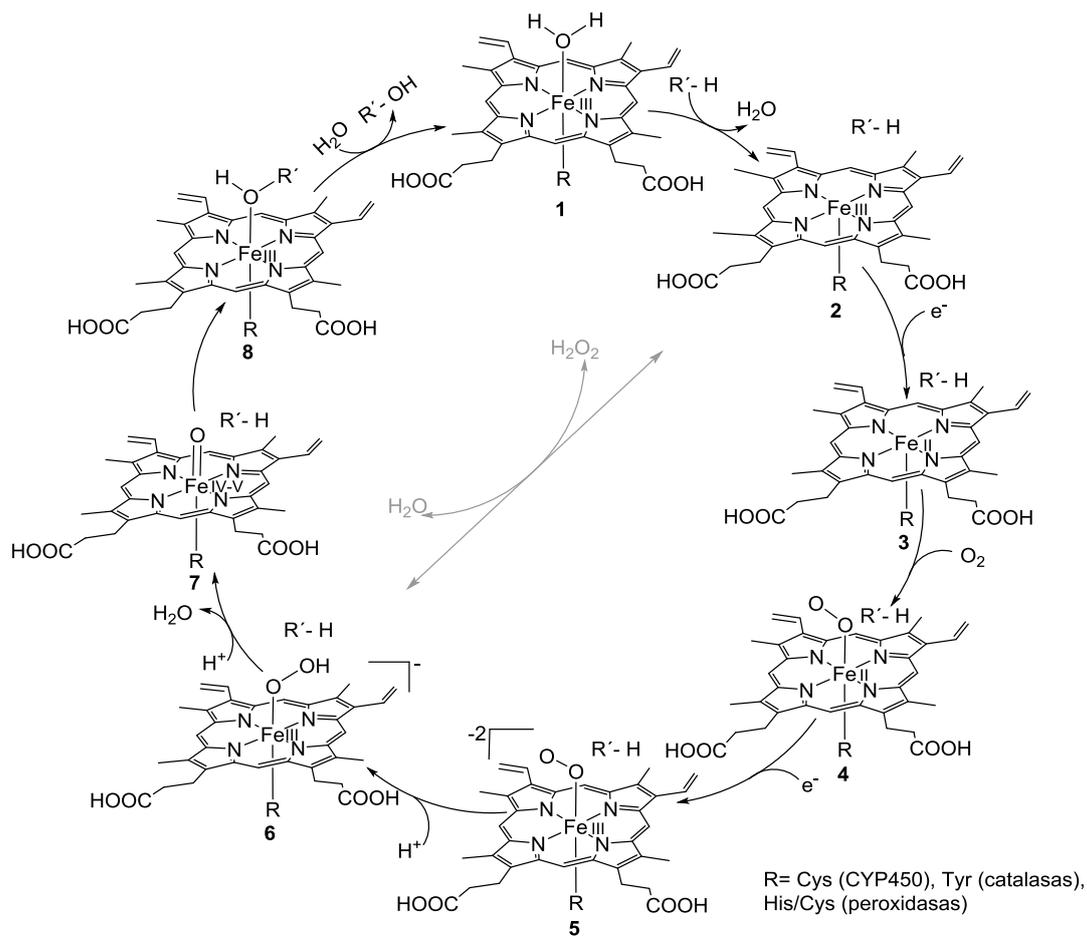
² B. Meunier, S. P. de Visser, S. Shaik, *Chem. Rev.* 2004, 104, 3947-3980.

³ D. R. Nelson, *Biochim. Biophys. Acta* 2011, 1814, 14-18.

⁴ H. B. Dunford, J. S. Stillman, *Coord. Chem. Rev.* 1976, 19, 187-251.

⁵ a) D. Keilin, E. F. Hartree, *Proc. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.* 1938, 124, 397-405; b) A. Deisseroth, A. L. Dounce, *Physiol. Rev.* 1970, 50, 319-75.

⁶ a) S. Shaik, S. P de Visser, in *Cytochrome P450 Structure, Mechanism and Biochemistry* (Eds.: P. R. Ortiz de Montellano, 3rd Ed.), Plenum Publishers, New York, 2004, pp. 45-80.



Esquema 5.1. Ciclo catalítico de las peroxidasas, de las catalasas, y del citocromo P450.

Todos los ciclos catalíticos parten del compuesto **1**, correspondiente al grupo hemo hexacoordinado con una molécula de agua que se encuentra en estado de bajo espín. Al igual que ocurre con las enzimas no-hemo dependientes de α -cetoglutarato, la entrada del sustrato en la proximidad del centro activo desplaza un ligando aquo, lo que da lugar al compuesto **2** de alto espín que posee libre una vacante coordinativa. Además, en el caso del citocromo P450, el cambio de bajo a alto espín provoca por lo general un aumento del potencial redox del grupo hemo, lo que facilita la transferencia de electrones a dicho grupo. Así, se produce la reducción del centro activo, lo que genera el compuesto ferroso **3**, al que posteriormente se le une el oxígeno y produce el intermedio oxiferroso **4**. A continuación, tras la transferencia de un segundo electrón desde

la pareja redox correspondiente, se genera el intermedio peroxo **5**. Le sigue la protonación del mismo, lo que da lugar al compuesto hidropoxo **6**, conocido como Compuesto cero. La segunda protonación sobre el mismo oxígeno distal provoca la ruptura heterolítica del enlace O-O, lo que libera agua y genera el intermedio oxo-ferrilo **7**, que es altamente reactivo y se conoce como Compuesto I, Cpd I.⁷ Se sabe que dicho compuesto es el responsable de la oxidación de los sustratos. Posteriormente, se produce la transferencia del protón desde el sustrato, lo que genera el intermedio Fe-OHR' **8** que, tras la entrada de una molécula de agua, produce nuevamente el compuesto **1**, completando así el ciclo catalítico.

En resumen, el ciclo catalítico de la familia de los citocromos P450 requiere la reducción del grupo hemo mediante la transferencia sucesiva de dos electrones y dos protones para generar el Cpd I, según la siguiente ecuación:



La procedencia de estos electrones proviene del NAD(P)H, que ejerce de agente reductor. La transferencia de dichos electrones desde el cofactor NAD(P)H a la protoporfirina IX es realizada por las proteínas transportadoras de electrones. Estas proteínas emplean como grupos prostéticos flavoproteínas y

⁷ a) J. Rittle, M. T. Green, *Science* 2010, 330, 933-937; b) T. H. Yosca, J. Rittle, C. M. Krest, E. L. Onderko, A. Silakov, J. C. Calixto, R. K. Behan, M. T. Green, *Science*, **2013**, 342, 825-829; c) C. M. Krest, A. Silakov, J. Rittle, T. H. Yosca, E. L. Onderko, J. C. Calixto, M. T. Green, *Nature Chem.*, **2015**, 7, 696-702.

proteínas de hierro unido a azufre, o sólo flavoproteínas para realizar esta función.⁸

Por otro lado, las peroxidasas emplean H_2O_2 como fuente de átomos de oxígeno y completan el ciclo catalítico directamente desde el intermedio **2** al **6**. Una vez formado el Cpd I, son capaces de oxidar compuestos electro dadores, completando así su ciclo catalítico.⁹

Finalmente, y para completar el ciclo catalítico de las monooxigenasas indicadas en el Esquema 5.1, se presenta el ciclo de las catalasas. Estas enzimas al igual que las peroxidasas, unen el H_2O_2 al compuesto **2**, generando el compuesto **7** tras la protonación del intermedio **6**. Al igual que las peroxidasas oxidan compuestos, las catalasas son las responsables de oxidar una nueva molécula de H_2O_2 , reduciendo nuevamente el Cpd I al compuesto **2** y generando H_2O y O_2 .⁹ Así, las catalasas son las encargadas de descomponer el H_2O_2 en agua y O_2 sin generar radicales libres. Por tanto, es posible concluir que tanto las peroxidasas como las catalasas se encargan de proteger y prevenir a las células de los efectos negativos del peróxido de hidrógeno. Mientras que las primeras emplean el H_2O_2 para oxidar compuestos, las segundas se encargan de catalizar la dismutación del mismo.

Se conoce que el Cpd I presenta estados electrónicos próximos en energía, lo que facilita que pueda existir en varios estados de espín, más concretamente en estados doblete y cuadruplete. Este punto es relevante, ya que la reactividad del Cpd I puede ser diferente en función del estado electrónico en el que se

⁸ F. Hannemann, A. Bichet, K. M. Ewen, R. Bernhardt, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1770, 330-344.

⁹ a) P. Vidossich, M. Alfonso-Prieto, C. Rovira, *J. Inorg. Biochem.* **2012**, 117, 292-297; b) P. Campomanes, U. Rothlisberger, M. Alfonso-Prieto, C. Rovira, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 11170-11178.

encuentre o incluso puede variar de estado a lo largo de una misma reacción. Tal y como ya se ha comentado, estas enzimas pueden presentar reactividad en los dos estados, lo que añade complejidad al estudio de sus reacciones.

Además, el Cpd I es una especie muy reactiva lo que dificulta el análisis experimental de su reactividad. En este punto, la química computacional resulta ser una herramienta muy útil, ya que permite conocer y estudiar en detalle su estructura y su reactividad.¹⁰

5.2 Reacciones de oxidación catalizadas por los Citocromos P450

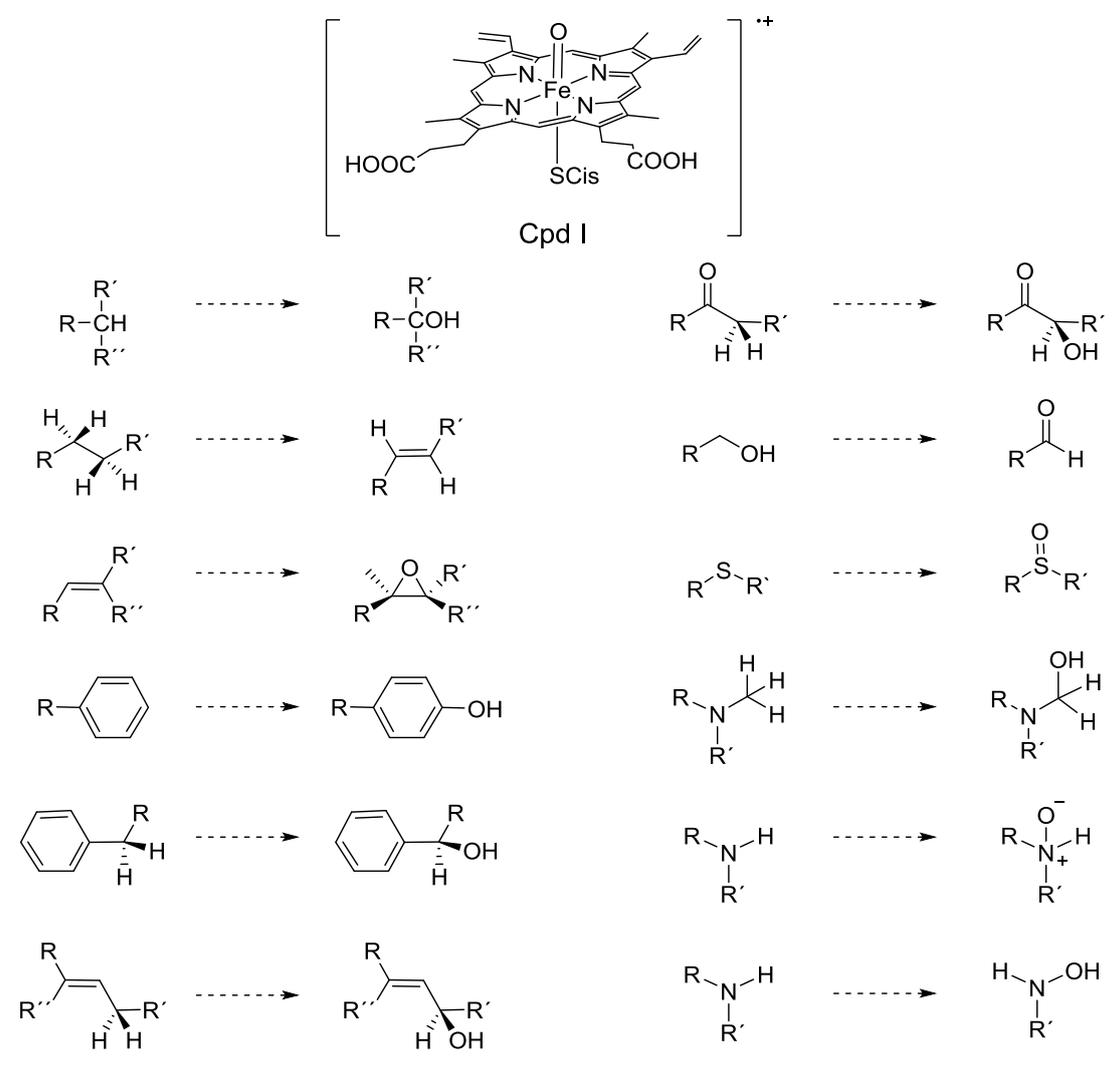
Tal y como se puede observar en el Esquema 5.2, el abanico de reacciones catalizadas por estas enzimas es muy amplio. Así, realizan la epoxidación de dobles enlaces, oxidan compuestos aromáticos, alcoholes, aldehídos y heteroátomos. No obstante, estas enzimas destacan sobre todo por la capacidad de hidroxilar enlaces C-H inactivados y por realizar las N-, O- y S-dealquilaciones.^{2,10b}

El estudio de estas reacciones presenta gran interés debido a que generan intermedios de reacción inusuales y poseen un elevado potencial sintético.¹¹ Por

¹⁰ a) S. Shaik, D. Kumar, S. P. de Visser, A. Altun, W. Thiel, *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 2279-2328; b) S. Shaik, S. Cohen, Y. Wang, H. Chen, D. Kumar, W. Thiel, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 949-1017; c) K. B. Cho, H. Hirao, S. Shaik, W. Nam, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *45*, 1197-1210; d) B. Krámos, J. Oláh, *Struct. Chem.*, **2015**, *26*, 279-300; e) A. Tomberg, J. Pottel, Z. Liu, P. Labute, N. Moitessier, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2015**, *54*, 13743-13747; f) L. Ji, A. S. Faponle, M. G. Quesne, M. A. Sainna, J. Zhang, A. Franke, D. Kumar, R. van Eldik, W. P. Liu, S. P. de Visser, *Chem. - Eur. J.*, **2015**, *21*, 9083-9092; g) M. A. Sainna, S. Kumar, D. Kumar, S. Fornarini, M. E. Crestoni, S. P. de Visser, *Chem. Sci.*, **2015**, *6*, 1516-1529; h) B. Wang, K. D. Dubey, S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 7379-7390; i) I. Viciano, R. Castillo, S. Martí, *J. Comput. Chem.*, **2015**, *36*, 1736-1747; j) K. D. Dubey, B. Wang, S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*, 837-845; k) X. X. Li, V. Postils, W. Sun, A. S. Faponle, M. Solà, Y. Wang, W. Nam, S. P. de Visser, *Chem. - Eur. J.*, **2017**, *23*, 6406-6418.

¹¹ V. B. Urlacher, M. Girhard, *Trends Biotechnol.*, **2012**, *30*, 26-36.

ello, en los últimos años se han publicado multitud de trabajos tanto teóricos como experimentales sobre la reactividad de estos compuestos.^{2,9b}



Esquema 5.2. Representación esquemática de las principales reacciones químicas producidas por el Cpd I de los citocromos CYP450.

En el ciclo catalítico (Esquema 5.1) existen diferentes especies reactivas, entre las que destaca el Cpd I como el intermedio clave en la mayoría de oxidaciones producidas por estas enzimas.^{2,12}

Los sustratos que contienen heteroátomos pueden sufrir diferentes mecanismos de oxidación. Así, tal y como se recogen en el Esquema 5.3, las

¹² P. R. Ortiz de Montellano, J. J. De Voss, *Nat. Prod. Rep.*, **2002**, 19, 477-493.

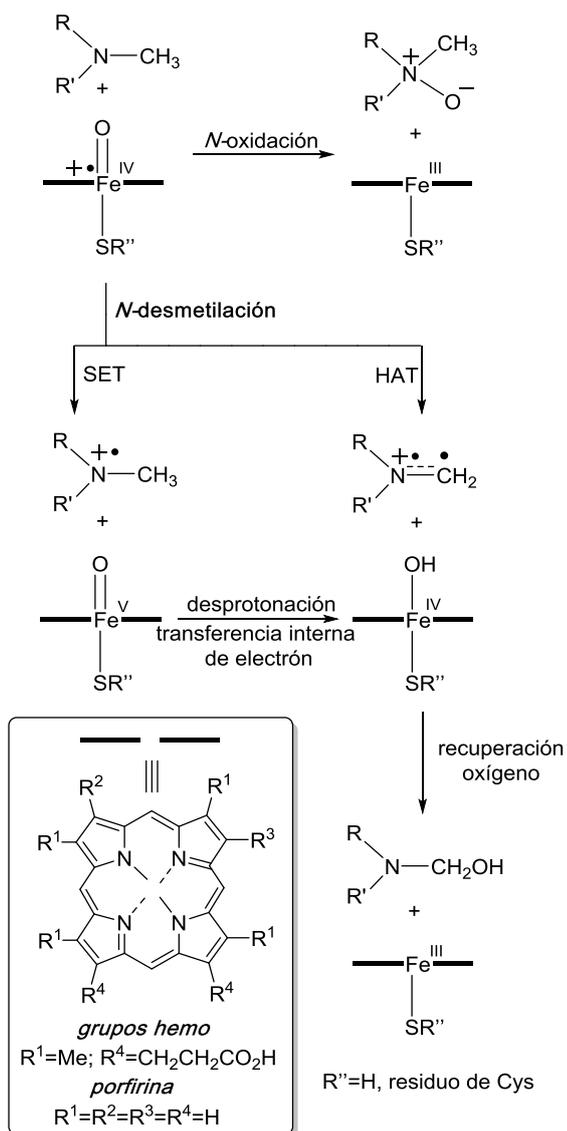
aminas pueden ser oxidadas mediante la N-oxidación y/o a través de la N-dealquilación, para la que se han propuesto varios mecanismos.^{10b,12,13}

La N-dealquilación puede tener lugar mediante dos mecanismos que difieren entre sí en la primera etapa. El primer mecanismo comienza con la transferencia de un protón del carbono en α al grupo ferrilo Fe(IV)=O (Hydrogen Atom Transfer o HAT) seguido de la recombinación con el grupo Fe(IV)-OH, lo que da lugar a la formación de la carbinolamina (Esquema 5.3).

El segundo mecanismo empieza con la transferencia de un electrón (Single Electron Transfer o SET) del nitrógeno de la amina al Fe(IV)=O para dar el correspondiente catión radical aminio que, tras la desprotonación, genera la carbinolamina (Esquema 5.3). Posteriormente, esta especie se descompone mediante hidrólisis fuera del centro activo, sin la participación del grupo hemo, generando formaldehído y la correspondiente amina N-desmetilada.¹⁴ Ambas propuestas han sido ampliamente analizadas, tanto desde un punto de vista teórico como experimental.^{10b} No obstante, el primer mecanismo correspondiente al HAT es el más aceptado en la N-dealquilación de aminas.

¹³ a) C. L. Shaffer, M. D. Morton, R. P. Hanzlik, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 8502-8508; b) C. L. Shaffer, S. Harriman, Y. M. Koen, R. P. Hanzlik, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 8268-8274; c) K. B. Cho, Y. Moreau, D. Kumar, D. A. Rock, J. P. Jones, S. Shaik, *Chem. -Eur. J.*, **2007**, *13*, 4103-4115; d) S. Shaik, S.; D. Kumar, S. P. de Visser, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 10128-10140; e) P. Rydberg, U. Ryde, L. Olsen, *J. Chem. Theory Comput.*, **2008**, *4*, 1369-1377; f) C. S. Li, W. Wu, K. B. Cho, S. Shaik, *Chem. -Eur. J.*, **2009**, *15*, 8492-8503; g) K. M. Roberts, J. P. Jones, *Chem. -Eur. J.*, **2010**, *16*, 8096-8107; h) P. Rydberg, L. Olsen, *J. Chem. Theory Comput.*, **2011**, *7*, 3399-3404; i) N. Taxak, P. V. Desai, B. Patel, M. Mohutsky, V. J. Klimkowski, V. Gombar, P. V. Bharatam, *J. Comput. Chem.*, **2012**, *33*, 1740-1747; j) L. Ji, G. Schuurmann, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2013**, *52*, 744-748; k) H. Hirao, P. Chuanprasit, Y. Y. Cheong, X. Q. Wang, *Chem. -Eur. J.*, **2013**, *19*, 7361-7369; l) P. Rydberg, M. S. Jorgensen, T. A. Jacobsen, A. M. Jacobsen, K. G. Madsen, L. Olsen, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2013**, *52*, 993-997; m) S. T. Seger, P. Rydberg, L. Olsen, *Chem. Res. Toxicol.*, **2015**, *28*, 597-603.

¹⁴ a) Y. Wang, D. Kumar, C. Yang, K. Han, S. Shaik, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7700-7710; b) C. Li, W. Wu, K.-B. Cho, S. Shaik, *Chem. -Eur. J.* **2009**, *15*, 8492-8503.



Esquema 5.3. Mecanismo de oxidación propuestos para la N-oxidación y la N-dealquilación de aminas, catalizada por la protoporfirina, y el análogo computacional de la cisteína. *SET*: Single electron transfer; *HAT*: hydrogen atom transfer.

La tercera reacción de oxidación de aminas corresponde a la N-oxigenación mostrada en el Esquema 5.3. Ésta se produce al adicionar directamente un átomo de oxígeno del CYP450 al nitrógeno de la amina.¹⁵ Sin embargo, diversos

¹⁵ a) Y. Seto, F. P. Guengerich, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 9986–9997; b) K. Linnet, O. V. Olesen, *Drug Metab. Dispos.* **1997**, *25*, 1379–1382; c) T. J. Volz, D. A. Rock, J. P. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9724–9725; d) T. S. Dowers, D. A. Rock, D. A. Rock, J. P. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8868–8869; e) T. S. Dowers, D. A. Rock, D. A. Rock, B. N. S. Perkins, J. P. Jones, *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 328–332; f) T. S. Dowers, J. P. Jones, *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 1288–1290.

trabajos tanto teóricos como experimentales reflejan la preferencia por la N-dealquilación frente a la N-oxidación en los compuestos que contienen aminas.^{13e,13f,15}

5.3 Metabolismo de fármacos

Los fármacos ingeridos así como las sustancias xenobióticas, deben ser eliminadas del organismo, ya que su acumulación es potencialmente tóxica. No obstante, las características físico-químicas que facilitan la absorción de los fármacos para que sean absorbidos correctamente impiden o dificultan su eliminación. Por tanto, estos compuestos deben ser transformados químicamente en el organismo para poder ser eliminados, y esta función es llevada a cabo mediante enzimas.

El objetivo principal de la metabolización de los fármacos consiste en aumentar su polaridad, lo que facilita su excreción al hacerlos más solubles en agua. Para ello, se producen una serie de transformaciones que se dividen en dos fases: el metabolismo de primer grado, o fase I, y el metabolismo de fase II.¹⁶ No obstante, no todos los fármacos sufren estas transformaciones, ya que algunos, como el Valsartan, se eliminan inalterados. Además, los compuestos que poseen grupos funcionales fácilmente conjugables pueden ser metabolizados directamente mediante la fase II sin necesidad de sufrir metabolización de primer paso.

Como ya se ha comentado, diversas enzimas que se distribuyen ampliamente en el organismo son las responsables de producir estos cambios.

¹⁶ Medicinal Chemistry Principles and Practice, (Ed.: F.D. King), Cambridge, **2008**.

Fundamentalmente se deben considerar las enzimas presentes en el intestino y en el hígado, lugar donde se produce principalmente la metabolización de los fármacos administrados por vía oral.

El hígado es el órgano principal donde transcurre la metabolización de compuestos exógenos, ya que en él están presentes diversas enzimas, entre ellas mayoritariamente las enzimas del grupo CYP450. Este órgano, además, recibe abundante flujo sanguíneo proveniente del tracto gastrointestinal. Por todo ello, el hígado es el principal responsable del aclaramiento o eliminación de fármacos y compuestos exógenos.

Como se ha mencionado anteriormente, la metabolización se divide en dos procesos. Así, la fase I consiste en la introducción o producción de grupos funcionales que faciliten las reacciones posteriores de la fase II. Los grupos funcionales introducidos suelen ser del tipo $-OH$, $-SH$, $-NH_2$ y $-COOH$. En esta fase I se produce la oxidación de los compuestos, bien mediante la hidroxilación, tanto aromática como alifática, bien a través de la N-/O-dealquilación de los mismos.¹⁷ Reacciones típicas de esta fase son también la hidrólisis de ésteres y de amidas para producir ácidos carboxílicos, alcoholes o aminas, así como la reducción de grupos nitro o éteres para generar aminas y alcoholes, respectivamente. En la fase II se producen reacciones de conjugación con ácido glucurónico, sulfato, glutamato o con aminoácidos. Todas estas reacciones aumentan la solubilidad en agua de los compuestos, facilitando su eliminación mediante la orina o la bilis.

¹⁷ L. Olsen, C. Oostenbrink, F. S. Jorgensen, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *86*, 61-71.

En la Figura 5.1A se muestra una representación esquemática de la distribución de enzimas responsables del metabolismo de fármacos. Estas enzimas, entre ellas la familia de los CYP450, la UDT-glucuronosiltransferasa (UGT), las estearasas, la flavinmonooxigenasa (FMO), la N-acetiltransferasa (NAT) o la monoaminoxidasa (MAO), son las encargadas de realizar el metabolismo de compuestos exógenos. De entre todas ellas destaca la familia del CYP450. Tal y como se ha comentado en la Figura 5.1A, las 57 isoformas del CYP450 presentes en el cuerpo humano¹⁸ son las responsables del metabolismo del 75% de los fármacos que se ingieren. No obstante, únicamente 5 isoformas, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 y 3A4¹⁹ se encargan de realizar el 95% de las reacciones de metabolización de los fármacos (Figura 5.1B).

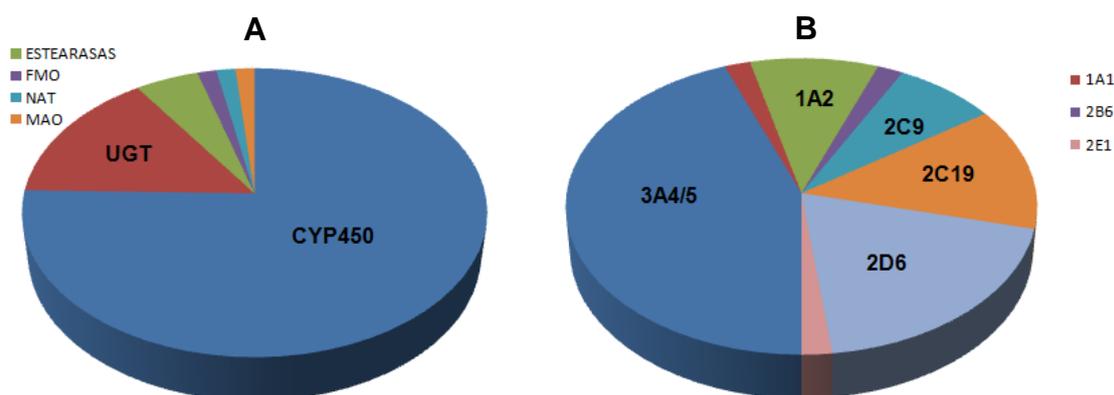


Figura 5.1. Representación esquemática de las principales enzimas encargadas de la metabolización de fármacos. A) estimación de la contribución de las enzimas en la metabolización de fármacos por el CYP450, la UDT-glucuronosiltransferasa, UGT, las estearasas, la flavinmonooxigenasa, FMO, la N-acetiltransferasa, NAT, monoaminoxidasa, MAO; B) estimación de la contribución de las isoformas del CYP450 encargadas de la metabolización de fármacos.

La selectividad mostrada por cada isoforma en cuanto a su preferencia por ciertos sustratos viene determinada por la naturaleza de su centro activo.¹⁷ Así, se conoce que la CYP1A2 posee un centro activo pequeño, hidrofóbico y plano,

¹⁸ D. R. Nelson, *Human Genomics*, **2009**, 4, 59-65.

¹⁹ F. P. Guengerich, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, 21, 70-83.

lo que propicia la metabolización de compuestos de geometría molecular esencialmente planar. El CYP2C9, por el contrario, muestra preferencia por compuestos pequeños y de naturaleza aniónica, mientras que el CYP2D6 la tiene por los compuestos que poseen átomos de nitrógeno protonados.²⁰

De todas las isoformas destaca la CYP3A4, que presenta un carácter más promiscuo que el resto, con cierta preferencia por los compuestos más lipófilos. Esta enzima es la responsable de la metabolización del 30-40% de los fármacos.¹⁹ Fundamentalmente, se encarga de realizar reacciones de hidroxilación de enlaces C-H inactivados y N-dealquilaciones.

Se conoce que los sustratos pueden presentar diversas orientaciones en el centro activo de esta isoforma. Además, la gran amplitud del centro activo del CYP3A4 permite albergar a más de un sustrato al mismo tiempo. Todo ello dificulta la comprensión del metabolismo de los compuestos exógenos catalizados por esta isoforma.

Se debe mencionar que las funciones biológicas del CYP450 no se limitan únicamente a la metabolización de los fármacos, sino que se extienden también a la eliminación de compuestos xenobióticos. Asimismo, la biosíntesis de algunos compuestos endógenos, tales como las hormonas esteroideas o los ácidos grasos, también entran dentro de las funciones de estas metaloenzimas.^{20b}

Los metabolitos formados durante la metabolización poseen su propia toxicidad y actividad farmacológica, que no tienen por qué ser similares a las de

²⁰ a) O. Pelkonen, M. Turpeinen, J. Hakkola, P. Honkakoski, J. Hukkanen, H. Raunio, *Arch. Toxicol.* **2008**, *82*, 667-715; b) D. Dong, B. J. Wu, D. Chow and M. Hu, *Drug Metab. Rev.* **2012**, *44*, 192-208.

los compuestos de partida. Por ello, es interesante poder predecir qué metabolitos son los que se van a formar durante la metabolización, evitando así posibles efectos adversos y problemas relacionados con la biodisponibilidad de los mismos.

Para aumentar la eficacia en la búsqueda de nuevos fármacos es importante poder predecir el metabolismo de los compuestos *in silico*. Dado que la mayoría de los fármacos poseen diversos puntos susceptibles de sufrir oxidación por parte del CYP450, los cálculos QM son útiles para entender y predecir la reactividad del CYP450 en la metabolización de compuestos xenobióticos. Tal y como se ha visto en capítulos anteriores, los métodos DFT permiten cuantificar las regiones más reactivas de las moléculas.^{2,10,21}

En el capítulo anterior se observó que en la reacción de desmetilación de residuos de lisina catalizada por desmetilasas de histona con dominio Jmj-C, el mecanismo de desmetilación varía en función del grado de metilación.²² Sobre estos resultados, se planteó que la N-dealquilación catalizada por la familia del CYP450 podía también presentar esta doble reactividad, no estudiada hasta la fecha para estas enzimas.

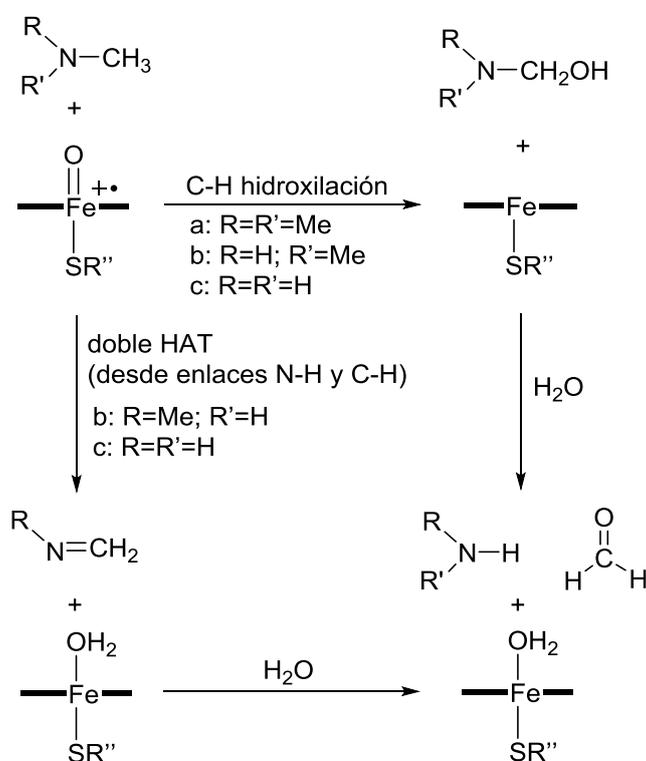
Para este estudio se modeló el centro catalítico del CYP450 con el grupo Fe(IV)=O unido al anillo de porfirina, donde se abreviaron las cadenas laterales con hidrógenos, y el residuo de cisteína axial con el anión bisulfuro. En trabajos previos se comprobó que este modelo simulaba de manera eficiente a modelos

²¹ P. Rydberg, F. S. Jorgensen, L. Olsen, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2014**, *10*, 215-227.

²² N. Alberro, M. Torrent-Sucarrat, I. Arrastia, A. Arrieta, F. P. Cossío, F. P., *Chem. -Eur. J.*, **2017**, *23*, 137-148.

más complejos, donde se tienen en cuenta los residuos adyacentes al centro activo.^{10a-c}

Los sustratos elegidos para analizar la reacción de N-dealquilación fueron la trimetilamina, dimetilamina y monometilamina neutras. Las reacciones globales se recogen en el Esquema 5.4, en el que se plantea un esquema similar al empleado en el estudio de la N-desmetilación de residuos de lisina catalizada por desmetilasas de histona con dominio Jmj-C.



Esquema 5.4. Mecanismos de N-dealquilación propuestos en función del grado de metilación de aminas.

En el Esquema 5.4 se observa que la N-dealquilación puede producirse mediante dos mecanismos diferentes. El primero de ellos hace referencia a la C-H hidroxilación, que ocurre cuando un metilo se orienta al grupo Fe(IV)=O, lo que da lugar a la correspondiente carbinolamina. Posteriormente, ésta se descompone en formaldehído y la amina N-desmetilada.

En cambio, en las aminas secundarias y primarias se puede orientar al menos un grupo N-H hacia el grupo Fe(IV)=O. Esto permite que pueda realizarse una doble transferencia de hidrógeno (doble HAT, Esquema 5.4), primero del grupo N-H y después desde el enlace C-H, generando así la correspondiente imina. Nuevamente, este compuesto puede hidrolizarse para dar formaldehído y la amina N-desmetilada.

Además, y teniendo en cuenta la implicación de esta familia de enzimas en el metabolismo de fármacos, se estudió si esta doble reactividad podía afectar a la oxidación de fármacos que contienen aminas. Para ello, se eligió el tamoxifeno como modelo de fármaco metabolizado por la familia del CYP450.

Los detalles de la metodología computacional empleada en este estudio se recogen en el capítulo 2 de esta Tesis Doctoral.

5.4 Resultados computacionales y discusión

En los sucesivos puntos de este apartado se expondrán los resultados y las coordenadas de reacción analizadas para las reacciones de desmetilación de la trimetilamina, dimetilamina y monometilamina neutras catalizadas por el CYP450.

Para que se produzcan la N-oxidación y la N-dealquilación producida por transferencia de electrones (SET), se requiere de aminas neutras, con un par de electrones del nitrógeno libres. Por ello, estudios previos, tanto experimentales^{13a,13b,13g} como teóricos,^{13c-m,23} han considerado los sustratos con las aminas en su forma neutra. Además, este estado concuerda con el grado de

²³ D. Li, W. Wu, D. Kumar, S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 394-395.

piramidalización mostrado por diversas aminas terciarias en diferentes estructuras de Rayos X. Ejemplos de ello son el cristal del CYP3A4 unido a la bromoergocriptina²⁴ (pdb 3UA1), y los de CYP2D6 unidos a la tioridazina (pdb 4WNW) o a ajmalicina²⁵ (pdb 4WNT), que son compatibles con la presencia de aminas terciarias neutras.

En todos los casos se ha estudiado la reacción de desmetilación en estados de espín bajo (doblete, $S=1/2$), medio (cuadruplete, $S=3/2$) y alto (sextuplete, $S=5/2$).

5.4.1 Desmetilación de la trimetilamina

La coordenada de reacción correspondiente a la reacción de desmetilación de la trimetilamina catalizada por el Cpd I se representa en la Figura 5.2. Nuestros resultados indicaron que la hidroxilación de la trimetilamina se lleva a cabo a través de un mecanismo concertado. Además, se observa que las superficies de energía potencial para los estados doblete y cuadruplete son prácticamente isoenergéticas. En cambio, el estado sextuplete es aproximadamente 10 kcal/mol más energético en el caso del reactivo y del estado de transición. En los estados de bajo y medio espín, la energía de activación necesaria para llevar a cabo la reacción es menor a 5 kcal/mol. Así, el **R_Me3** es transformado en el dimetilaminometanol a través de la abstracción del átomo de hidrógeno del metilo por el ferrilo del grupo hemo, generando así el producto **Pa_Me3**. Posteriormente, este producto es hidrolizado para formar formaldehído, dimetilamina y agua.

²⁴ I. F. Sevrioukova, T. L. Poulos, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 3510-3517.

²⁵ A. Wang, C. D. Stout, Q. Zhang, E. F. Johnson, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 5092-5104.

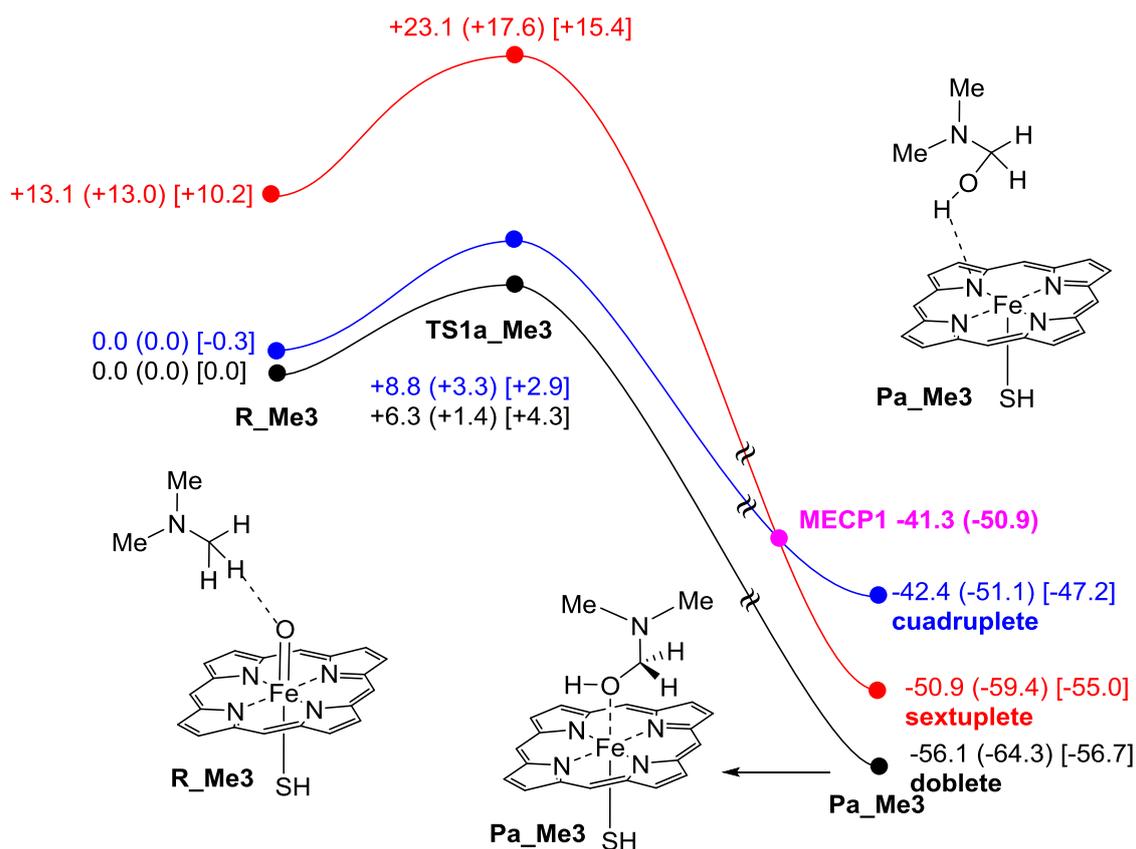


Figura 5.2. Coordenada de reacción correspondiente a la hidroxilación de la trimetilamina **R_Me3** por el Cpd I para dar lugar a **Pa_Me3** calculado a nivel de teoría UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ con $\epsilon=78.39$ en doblete, cuadruplete y sextuplete. Las energías, en kcal/mol, son relativas respecto a **R_Me3** en estado doblete. Asimismo, se indica el punto de cruce de mínima energía **MECP1**. Las energías mostradas entre paréntesis y entre corchetes corresponden a las energías relativas y a las energías de Gibbs (298 K) respectivamente, calculadas al nivel de teoría UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ.

Al analizar los compuestos optimizados se observó que el **R_Me3** forma un puente de hidrógeno con el oxígeno del ferrilo presente en el grupo hemo a una distancia de 2.9 Å aproximadamente. Como se ha mencionado anteriormente, este compuesto es isoenergético para los estados de espín bajo y medio. El **TS1a_Me3** es ligeramente más estable en estado doblete, alrededor de unas 1.9 kcal/mol. No obstante, si se consideran las correcciones de térmicas y entrópicas respecto a la energía total se invierte la estabilidad de los estados de espín a favor del cuadruplete, siendo éste 1.4 kcal/mol más estable que el doblete. Como se puede observar en la Figura 5.3, las geometrías optimizadas para este estado

de transición presentan diferencias significativas en función del estado de espín. Así, las distancias de enlace asociadas a la transferencia del hidrógeno al grupo Fe=O muestran diferencias superiores a 0.4 Å. Por último, el complejo **Pa_Me3** formado es más estable en $S=1/2$ (doblete). A excepción de lo que ocurre a lo largo de toda la coordenada de reacción, el estado sextuplete en este caso es más estable que el cuadruplete.

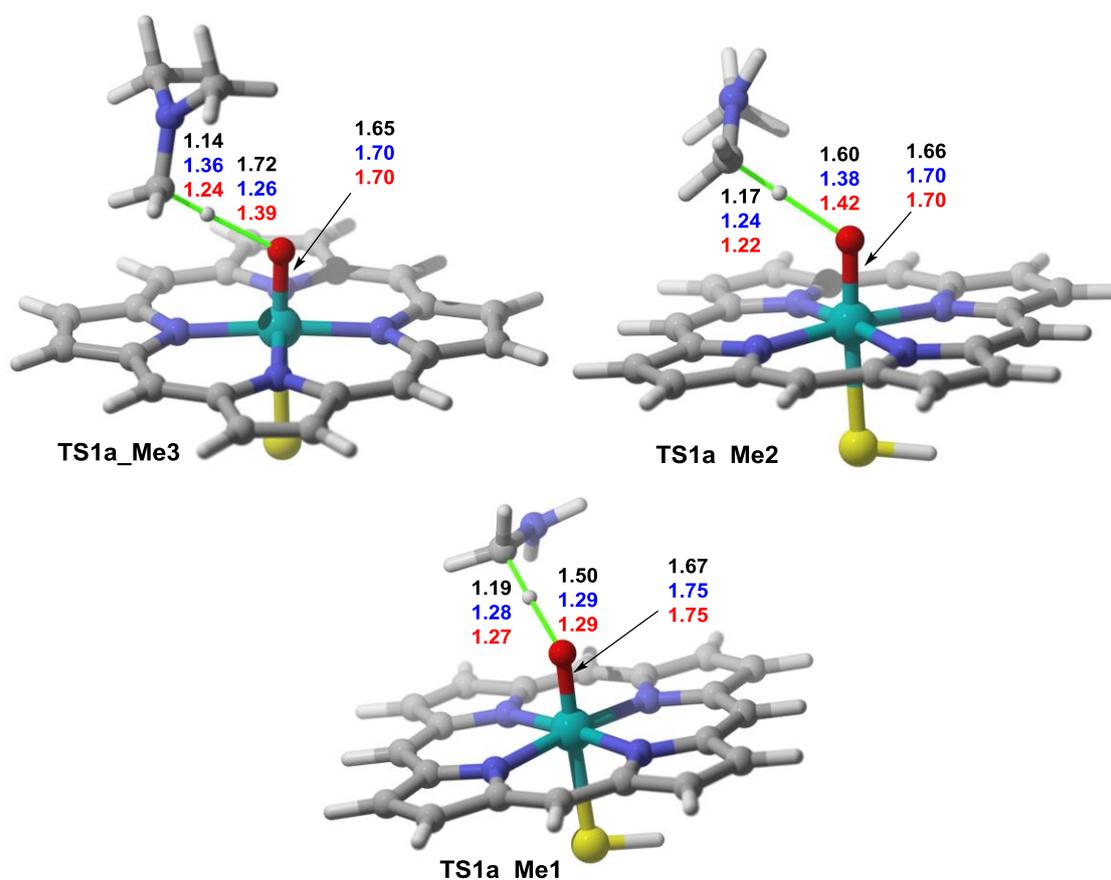


Figura 5.3. Geometrías de los estados de transición **TS1a_Me3**, **TS1a_Me2** y **TS1a_Me1** optimizadas a nivel UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ. Las geometrías corresponden a los estados doblete, cuadruplete y sextuplete en negro, azul y rojo, respectivamente. Las geometrías representadas corresponden al estado doblete. Las distancias de los enlaces están representadas en Å.

Por tanto, nuestros cálculos indican que a lo largo de la coordenada de reacción, es necesario que se produzca un punto de cruce de mínima energía, **MECP1**, entre las superficies de energía potencial cuadruplete y sextuplete del

TS1a_Me3 al **Pa_Me3**. Cabe destacar que el **MECP1** presenta características geométricas similares a las de **Pa_Me3**.

A diferencia de los estados de alto y medio espín, el producto formado por el complejo Fe(III)-porfirina y $\text{Me}_2\text{NCH}_2\text{OH}$ en estado doblete presenta una interacción débil $\text{HO}\cdots\text{Fe}$ entre el oxígeno del grupo alcohol y el centro metálico. Por el contrario, cuando $S=3/2$ y $S=5/2$ se produce un puente de hidrógeno entre un átomo de nitrógeno de la porfirina con el grupo hidroxilo. Como se puede comprobar en la Figura 5.2, la reacción de desmetilación es altamente exergónica e irreversible.

Por todo lo anteriormente expuesto, concluimos que la reacción de desmetilación de la trimetilamina catalizada por el CYP450 es concertada y se produce principalmente a través de los estados doblete y cuadruplete.

5.4.2. Desmetilación de la dimetilamina

Al igual que ocurre en la reacción de la desmetilación de las lisinas di- y monometiladas catalizadas por las desmetilasas de histona con dominio Jmj-C, la reacción de desmetilación de la N,N-dimetilamina puede darse a través de dos mecanismos diferentes. Para ello, el enlace N-H debe situarse en las inmediaciones del grupo $\text{Fe}=\text{O}$, para que, tras dos sucesivas abstracciones de hidrógeno, tenga lugar la desmetilación mencionada (ver Esquema 5.4).

La coordenada de reacción correspondiente a la transformación del complejo **R_Me2** en **Pa_Me2** se representa en la Figura 5.4 y es muy similar a la descrita anteriormente para la trimetilamina.

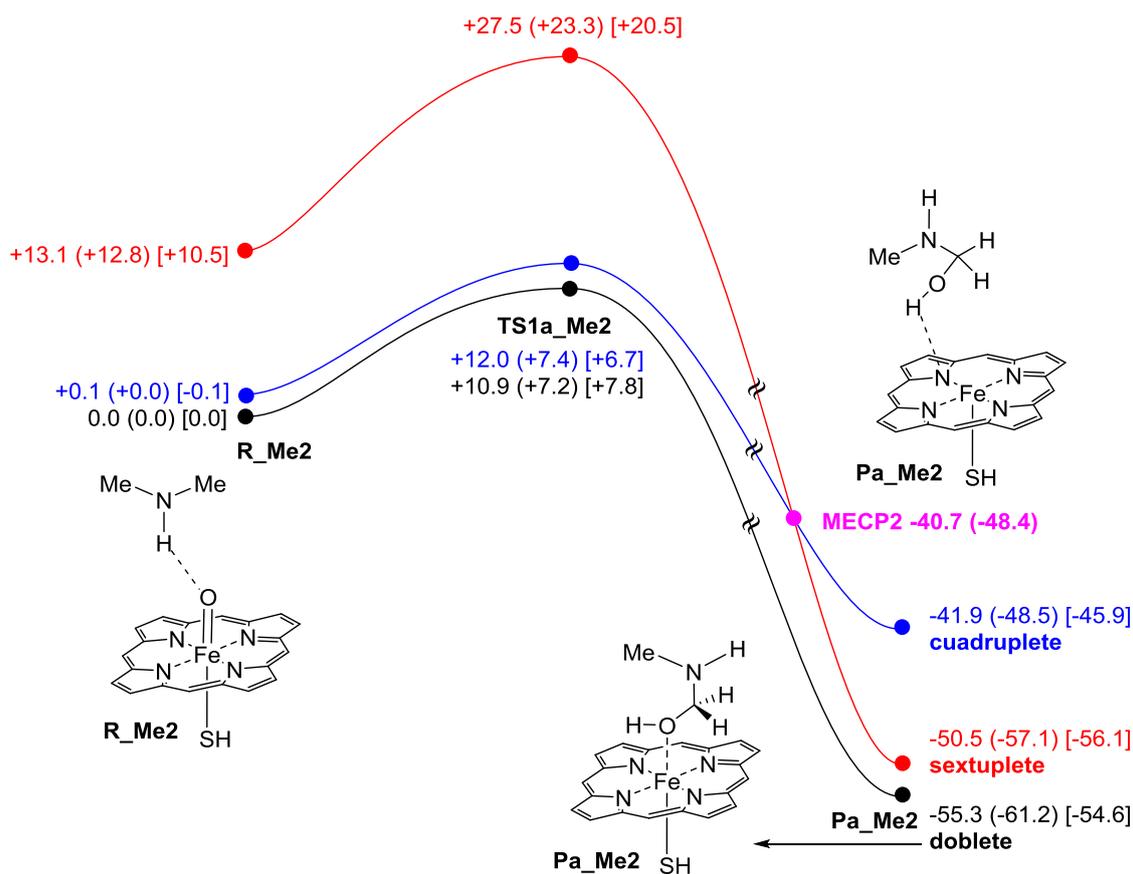


Figura 5.4. Coordenada de reacción correspondiente a la hidroxilación del reactivo **R_Me2** por el Cpd I para dar lugar a **Pa_Me2** calculado a nivel de teoría UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ con $\epsilon=78.39$ en doblete, cuadruplete y sextuplete. Las energías, en kcal/mol, son relativas respecto a **R_Me2** en estado doblete. Asimismo, se indica el punto de cruce de mínima energía **MECP2**. Las energías mostradas entre paréntesis y entre corchetes corresponden a las energías relativas y a las energías de Gibbs (298 K) respectivamente, calculadas al nivel de teoría UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ.

Como se muestra en la Figura 5.4, se comprobó que la reacción de hidroxilación del enlace C-H se produce nuevamente a través de un mecanismo concertado entre las superficies de energía potencial doblete y cuadruplete. Así, el reactivo es transformado en el producto **Pa_Me2** a través del estado de transición **TS1a_Me2** tras la abstracción del átomo de hidrógeno del enlace C-H por parte del grupo Fe=O. Esta etapa lleva asociada una energía de activación de ca. 7 kcal/mol, ligeramente superior a la desmetilación de la trimetilamina.

Esta diferencia puede ser debida principalmente a dos factores. En primer lugar, el enlace de hidrógeno formado en el complejo **R_Me2** es más corto y, por tanto, más fuerte que el observado para **R_Me3**, mostrando distancias aproximadas de 2.1 y 2.9 Å, respectivamente. Además, el estado de transición de la reacción de hidroxilación del enlace C-H presenta la configuración electrónica de un radical. Estas especies se estabilizan con el grado de sustitución y por tanto, una alquil amina radicalaria terciaria es más estable que una secundaria y ésta, a su vez, más estable que una primaria. Por consiguiente, cabe esperar que la energía de activación de la hidroxilación seguirá el siguiente orden: $\text{Me}_3 < \text{Me}_2 < \text{Me}_1$.

Nuevamente, el complejo **Pa_Me2** formado presenta una interacción entre el Fe y el átomo de oxígeno del carbinol cuando se encuentra en estado de bajo espín. Esta interacción no se observa en estados cuadruplete y sextuplete, donde sí existe un enlace de hidrógeno OH...N-Fe (ver Figura 5.4). En esta reacción también se determinó un punto de cruce de mínima energía, **MECP2**, entre los estados cuadruplete y sextuplete, siendo su geometría muy similar a la optimizada para **Pa_Me2**.

La segunda vía para llevar a cabo la reacción de desmetilación de la dimetilamina se muestra en la Figura 5.5. Esta reacción comienza con la abstracción del protón del enlace N-H por parte del grupo Fe(IV)=O a través de la estructura de transición **TS1b_Me2**, lo que genera el intermedio **INT1_ME2**. Esta etapa puede considerarse que carece de barrera de activación, ya que únicamente es de 0.2 kcal/mol.

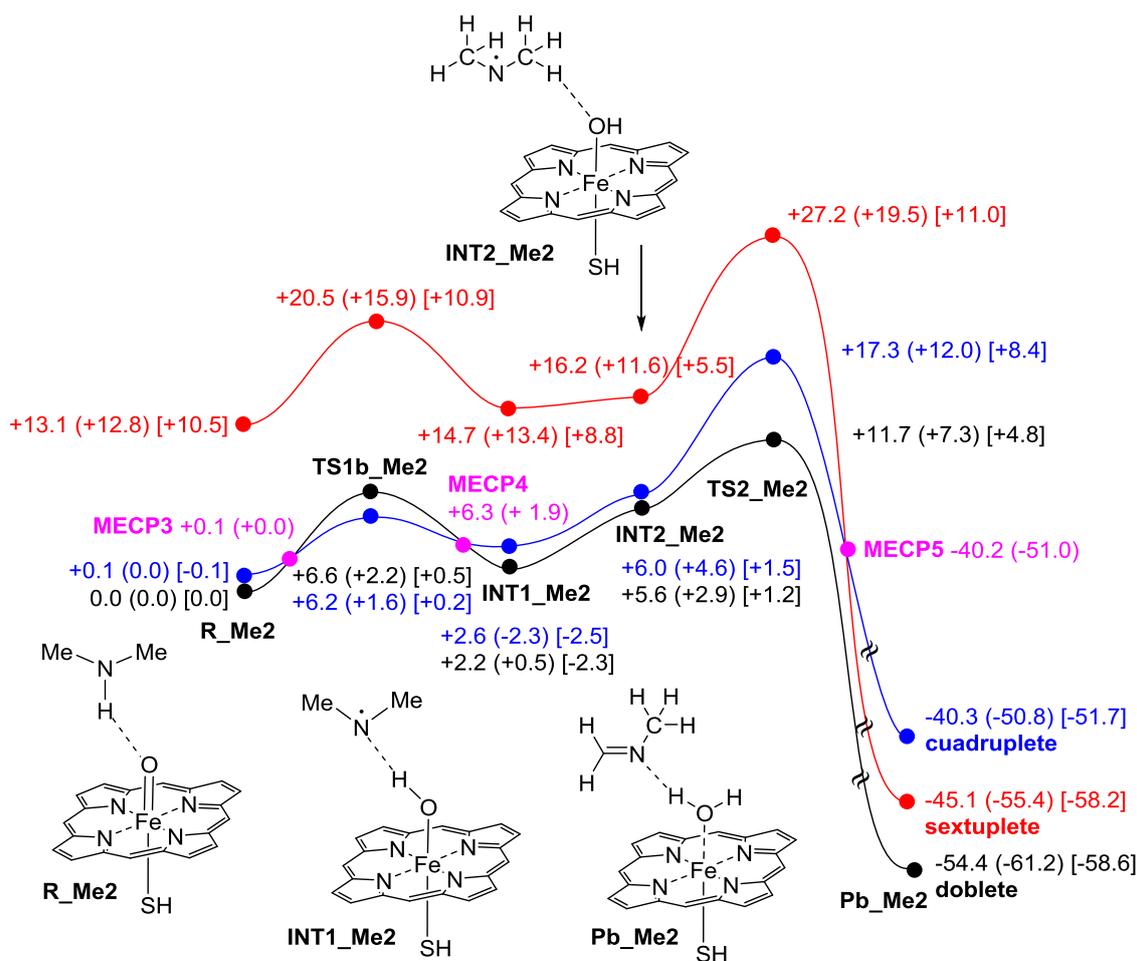


Figura 5.5. Coordenada de reacción correspondiente a la doble transferencia de hidrógeno del reactivo **R_Me2** por el Cpd I para formar **Pb_Me2** calculado a nivel de teoría UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ con $\epsilon=78.39$ en doblete, cuadruplete y sextuplete. Las energías, en kcal/mol, son relativas respecto a **R_Me2** en estado de espín doblete. Asimismo, se indican los puntos de cruce de mínima energía **MECP3**, **MECP4** y **MECP5**. Las energías mostradas entre paréntesis y entre corchetes corresponden a las energías relativas y a las energías de Gibbs (298 K) respectivamente, calculadas al nivel de teoría UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ.

Esta primera transferencia de protón se produce entre las superficies de energía potencial doblete y cuadruplete, que al estar muy próximas en energía da lugar a que se generen dos puntos de cruce de mínima energía, **MECP3** y **MECP4**, antes y después de **TS1b_Me2**, respectivamente. Las geometrías de estos compuestos son muy semejantes a los del complejo reactivo **R_Me2** y a la del complejo intermedio **INT1_Me2**, respectivamente (ver Figura 5.6). Este intermedio presenta un enlace de hidrógeno formado entre el grupo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OH}$ y el

nitrógeno del radical de la dimetilamina. Posteriormente, el **INT1_Me2** puede dar lugar al **INT2_Me2**, que es alrededor de 3.5 kcal/mol más inestable. Posiblemente esta diferencia puede ser debida a que el **INT1_Me2** presenta una interacción N...HO 0.4 Å más corta que la interacción C-H...OH presente en el **INT2_Me2**. En este compuesto se observa que el enlace C-H se orienta hacia el grupo Fe^{III}-OH, lo que favorece la ruptura del enlace C-H y, tras superar una barrera de 7 kcal/mol aproximadamente respecto al **INT1_Me2**, da lugar al complejo **Pb_Me2** a través de la estructura de transición **TS2_Me2**. Dicho complejo está formado por la imina H₂C=N-Me y el grupo hemo, que contiene una molécula de agua unida al hierro. Esta segunda etapa, con una energía de activación relativamente baja, es la etapa limitante asociada a la coordenada de reacción. Además, en este último paso se produce un nuevo cruce entre los estados de espín cuadruplete y sextuplete, el **MECP5**.

Con todo lo anteriormente expuesto concluimos que la desmetilación de aminas secundarias catalizada por CYP450 se puede producir indistintamente tanto por la vía de la hidroxilación del enlace C-H, como por la doble transferencia de hidrógeno.

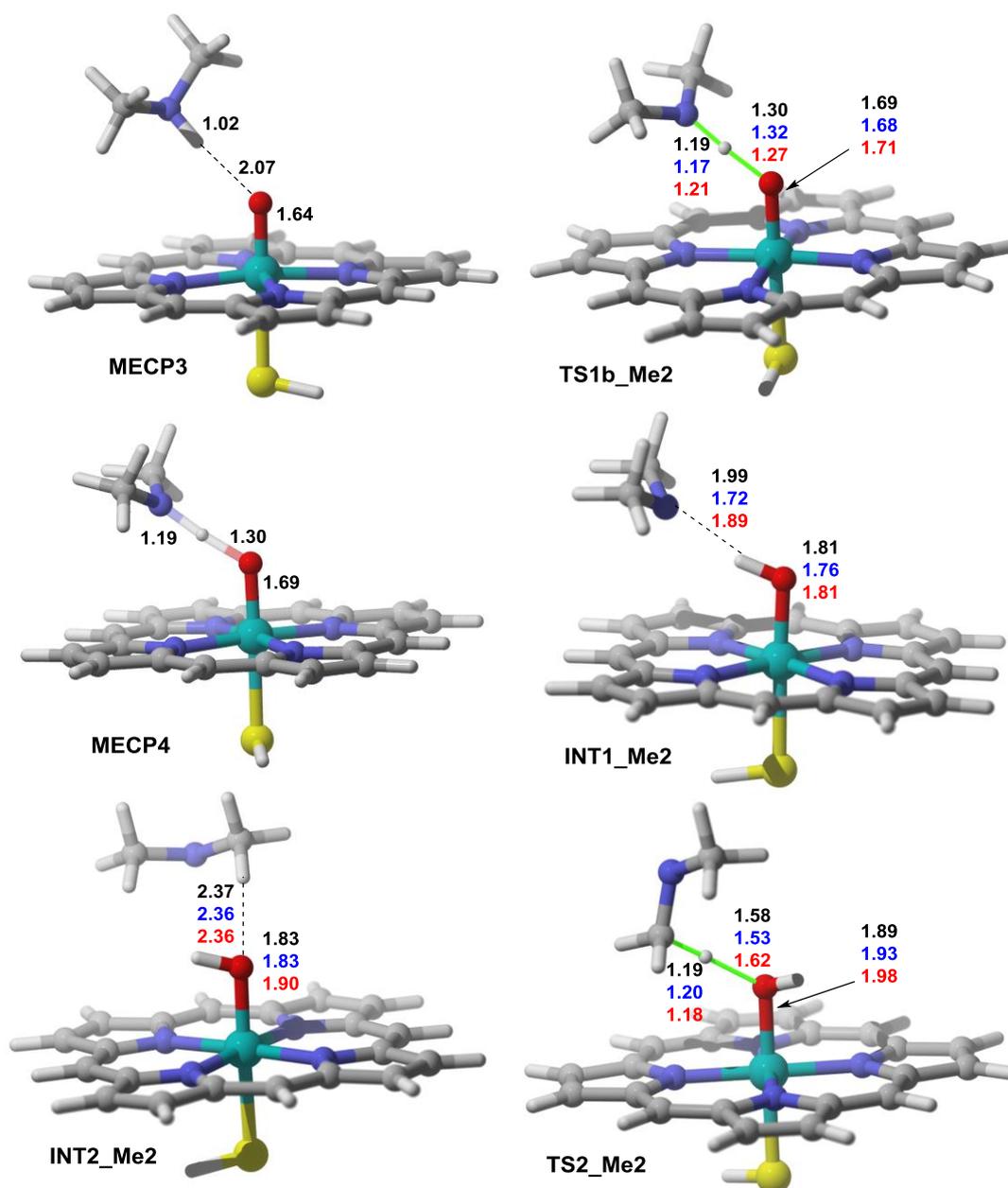


Figura 5.6. Geometrías de los puntos estacionarios **TS1b_Me2**, **INT1_Me2**, **INT2_Me2** y **TS2_Me2**, y de los puntos de cruce **MECP3** y **MECP4** optimizadas a nivel UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ. Las geometrías corresponden a los estados doblete, cuadruplete y sextuplete en negro, azul y rojo, respectivamente. Las geometrías representadas corresponden al estado doblete a excepción del **TS1b_Me2**, que corresponde al estado cuadruplete. Las distancias de los enlaces están representadas en Å.

5.4.3. Desmetilación de la metilamina

La reacción de desmetilación de la metilamina catalizada por CYP450 sigue un patrón similar al expuesto anteriormente para la dimetilamina. Así, esta reacción puede llevarse a cabo mediante la hidroxilación del enlace C-H (ver Figura 5.7) y también a través de la doble transferencia de hidrógeno (ver Figura 5.8).

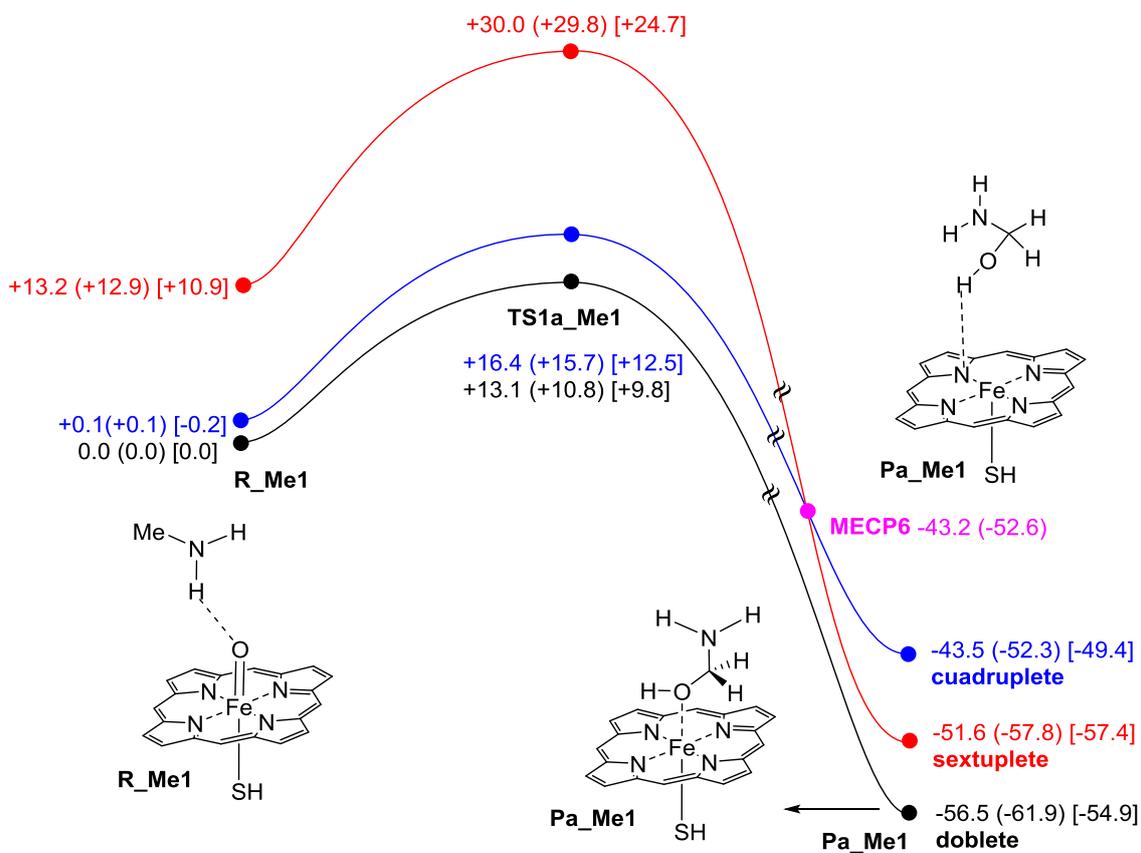


Figura 5.7. Coordenada de reacción correspondiente a la hidroxilación de la metilamina **R_Me1** por el Cpd I para dar lugar a **Pa_Me1** calculado a nivel de teoría UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ con $\epsilon=78.39$ en doblete, cuadruplete y sextuplete. Las energías, en kcal/mol, son relativas respecto a **R_Me1** en estado doblete. Asimismo, se indica el punto de cruce de mínima energía **MECP6**. Las energías mostradas entre paréntesis y entre corchetes corresponden a las energías relativas y a las energías de Gibbs (298 K) respectivamente, calculadas al nivel de teoría UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p) & LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p) & LanL2DZ.

En ambos casos, la energía de activación necesaria para llevar a cabo la reacción es de unas 10 kcal/mol. Por tanto, y como se ha comentado

anteriormente, la desmetilación de aminas primarias tiene una barrera superior a la asociada a la desmetilación de aminas secundarias y a las terciarias. Además, al igual que ocurría en la desmetilación de la dimetilamina, la hidroxilación del C-H ocurre a través de un mecanismo concertado principalmente en estados de bajo y medio espín (ver Figura 5.7). Nuevamente, en esta reacción se produce un punto de cruce **MECP6** entre las superficies de energía potencial $S=3/2$ y $S=5/2$. Dicho punto conecta el estado de transición **TS1a_Me1** con el complejo **Pa_Me1**. Este último producto presenta una interacción entre el Fe y el oxígeno del carbinol en los estados doblete y cuadruplete, mientras que en el estado sextuplete se observa la existencia de un puente de hidrógeno OH...N-Fe (ver Figura 5.7).

La reacción correspondiente a la doble transferencia de hidrógeno entre la metilamina y el CYP450 se muestra en la Figura 5.8. Al igual que ocurría en la N,N-dimetilamina, la reacción comienza con la transferencia (HAT) del átomo de H del grupo N-H al ferrilo del grupo hemo. Este paso lleva asociado una barrera de activación de unas 10 kcal/mol aproximadamente, lo que da lugar a la formación del complejo **INT1_Me1**. Este intermedio presenta también un puente de hidrógeno entre el grupo Fe^{III} -OH y el nitrógeno de la monometilamina. A continuación, y tras sufrir un cruce de espín entre los estados bajo y medio, se llega al **INT2_Me1** que se encuentra en estado cuadruplete. Este intermedio favorece la segunda transferencia de hidrógeno del enlace C-H tras superar una barrera de activación 6.5 kcal/mol de energía aproximadamente. En este paso se produce nuevamente un punto de cruce **MECP8** entre los estados doblete y cuadruplete. Finalmente, se genera el complejo **Pb_Me1** compuesto por la imina y el grupo hemo hidratado. A diferencia de lo que ocurría en la N,N-dimetilamina,

en esta reacción es la primera transferencia del protón del enlace N-H la etapa limitante de la formación de la H₂C=NH.

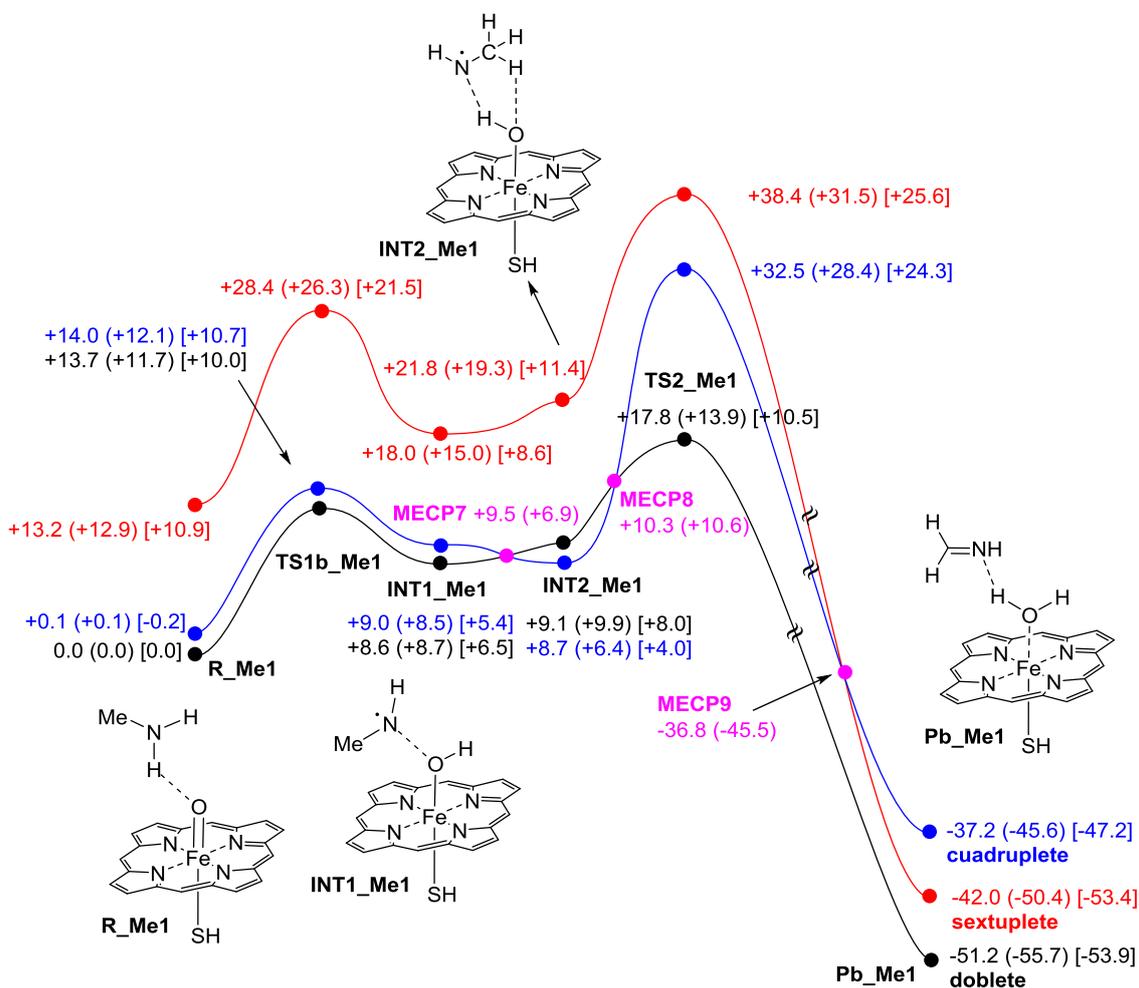


Figura 5.8. Coordenada de reacción correspondiente a la doble transferencia de hidrógeno del reactivo R_Me1 para formar Pb_Me1 calculado a nivel de teoría UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ con $\epsilon=78.39$ en doblete, cuadruplete y sextuplete. Las energías, en kcal/mol, son relativas respecto a R_Me1 en estado doblete. Asimismo, se indican los puntos de cruce de mínima energía **MECP7**, **MECP8** y **MECP9**. Las energías mostradas entre paréntesis y entre corchetes corresponden a las energías relativas y a las energías de Gibbs (298 K) respectivamente, calculadas al nivel de teoría UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ.

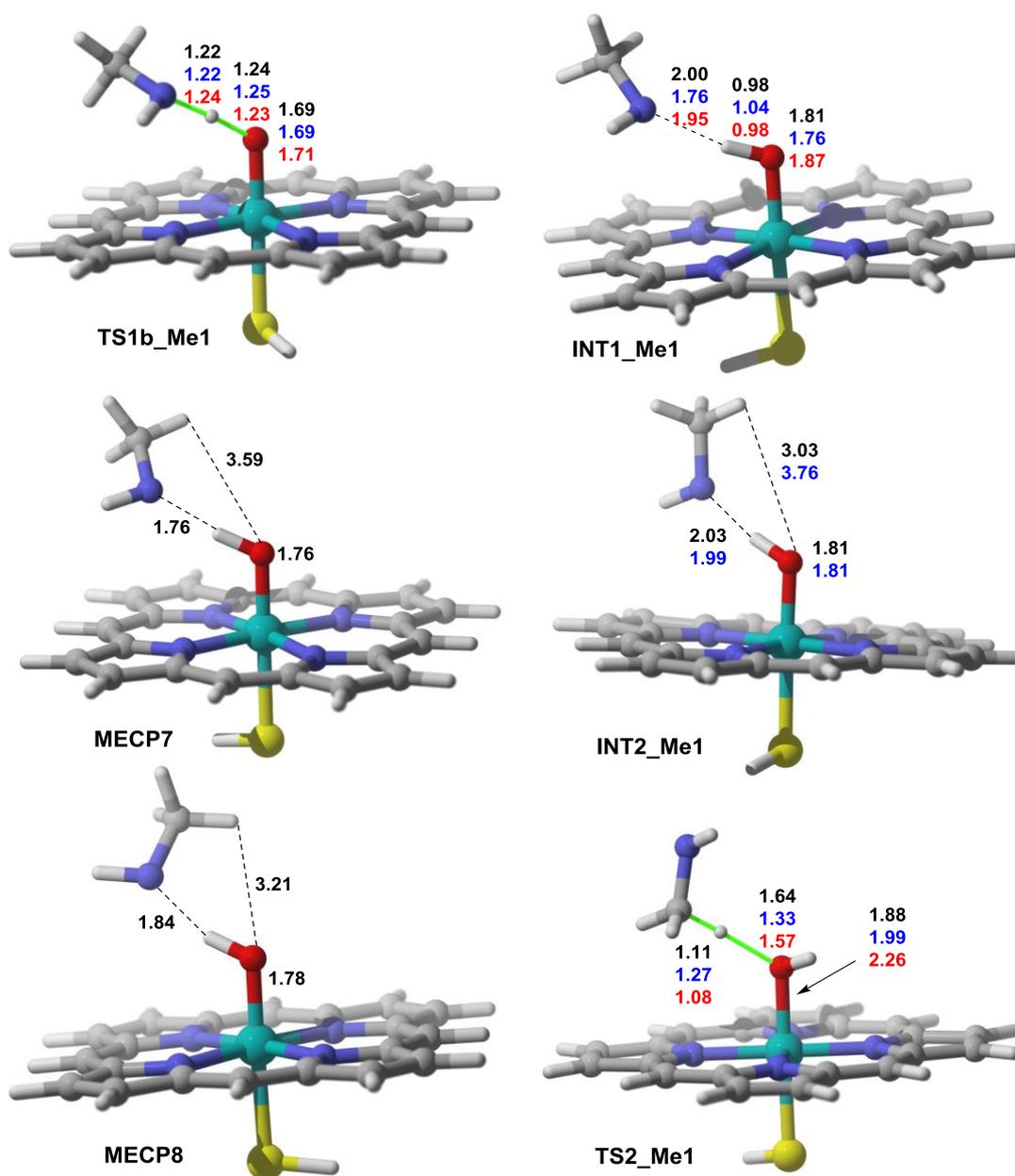


Figura 5.9. Geometrías de los puntos estacionarios **TS1b_Me1**, **INT1_Me1**, **INT2_Me1**, y **TS2_Me1**, y de los puntos de cruce **MECP7** y **MECP8** optimizadas a nivel UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ. Las geometrías corresponden a los estados doblete, cuadruplete y sextuplete en negro, azul y rojo, respectivamente. En el estado de espín sextuplete, el **INT2_Me1** dio lugar a otro conformero por lo que no se ha representado. Las geometrías expuestas corresponden al estado doblete a excepción del **INT2_Me1**, que corresponde al estado cuadruplete. Las distancias de los enlaces están representadas en Å.

Según los resultados obtenidos, la velocidad relativa de la energía de desmetilación de aminas catalizada por CYP450 sigue el orden $\text{Me}_3 > \text{Me}_2 > \text{Me}_1$. Además, las aminas terciarias únicamente muestran una ruta para llevar a cabo dicha reacción. Por el contrario, las aminas con menor grado de sustitución

pueden realizarlo indistintamente tanto mediante la C-H hidroxilación como por la doble transferencia de hidrógeno.

5.4.4. Metabolismo de fármacos: el tamoxifeno como caso de estudio

Como se ha mencionado en la introducción de este capítulo, la familia de los CYP450 juega un papel esencial en el metabolismo de fármacos. De acuerdo a los resultados de la reacción de N-desmetilación previamente expuestos, cabe esperar que los principios activos que contengan grupos amino sufran esta reacción durante la fase I de su metabolismo.

En el Esquema 5.5 se recoge una pequeña muestra de principios activos que contienen grupos amino mono y dimetilados en su estructura. Así, se propone que los principios activos terciarios y N,N-dimetilados tales como la Amitriptilina,²⁶ la Imipramina,²⁷ el Citalopram,²⁸ la N,N-dimetilamfetamina²⁹ y el Tamoxifeno (TMX),³⁰ son metabolizados por el CYP450 para generar los correspondientes metabolitos N-desmetilados mediante la hidroxilación del enlace C-H. Posteriormente, estos metabolitos al igual que los principios activos

²⁶a) A. H. Beckett, S. Alsarraj, *J. Pharm. Pharmacol.* **1973**, *25*, 335-336; b) J. Y. Lee, S. Y. Lee, K. Lee, S. J. Oh, S. K. Kim, *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *229*, 109-118; c) X. Zhou, C. Chen, F. R. Zhang, Y. Zhang, Y. L. Feng, H. Ouyang, Y. Xu, H. L. Jiang, *Bioanalysis* **2016**, *8*, 1365-1381.

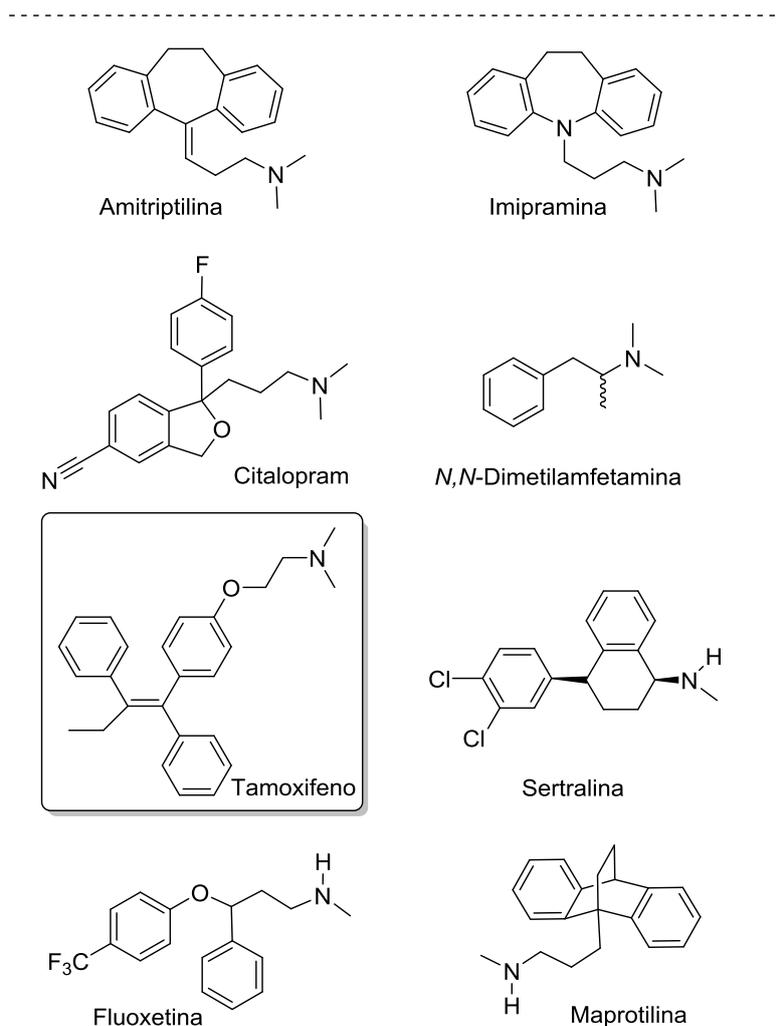
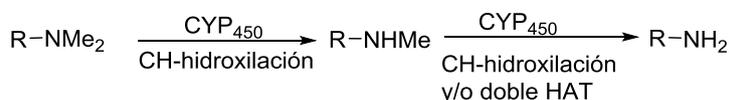
²⁷ A. Lemoine, J. C. Gautier, D. Azoulay, L. Kiffel, C. Belloc, F. P. Guengerich, P. Maurel, P. Beaune, J. P. Leroux, *Mol. Pharmacol.* **1993**, *43*, 827-832.

²⁸ a) O. V. Olesen, K. Linnet, *Pharmacology* **1999**, *59*, 298-309; b) X. X. Hu, L. J. Yuan, P. Fang, Y. H. Mao, Y. Y. Zhan, X. Y. Li, D. P. Dai, J. P. Cai, G. X. Hu, *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2016**, *31*, 133-138.

²⁹ T. Inoue, S. Suzuki, *Xenobiotica* **1987**, *17*, 965-971.

³⁰a) H. K. Crewe, L. M. Notley, R. M. Wunsch, M. S. Lennard, E. M. J. Gillam, *Drug Metab. Dispos.*, **2002**, *30*, 869-874; b) Z. Desta, B. A. Ward, N. V. Soukhova, D. A. Flockhart, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, *310*, 1062-1075.

N-monometilados como la Sertralina,³¹ la Fluoxetina³² o la Maprotilina³³ generarán el producto desmetilado bien mediante la C-H hidroxilación, bien mediante la doble transferencia de hidrógeno (ver Esquema 5.5).



Esquema 5.5. Ruta de biodesmetilación de diversas aminas *N,N*-dimetiladas y *N*-metiladas catalizadas por el CYP450.

³¹ R. S. Obach, L. M. Cox, L. M. Tremaine, *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 262-270.

³² a) L. L. von Moltke, D. J. Greenblatt, S. X. Duan, J. Schmider, C. E. Wright, J. S. Harmatz, R. I. Shader, *Psychopharmacology* **1997**, *132*, 402-407; b) J. M. Margolis, J. P. O'Donnell, D. C. Mankowski, S. Ekins, R. S. Obach, *Drug Metab. Dispos.* **2000**, *28*, 1187-1191.

³³ L. Brachtendorf, A. Jetter, K. T. Beckurts, A. H. Holscher, U. Fuhr, *Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *90*, 144-149.

Por tanto, y teniendo en cuenta los resultados anteriormente expuestos, se decidió analizar mediante cálculos DFT las reacciones de oxidación que ocurren en el transcurso de la metabolización del TMX como modelo de principio activo N-metilado.

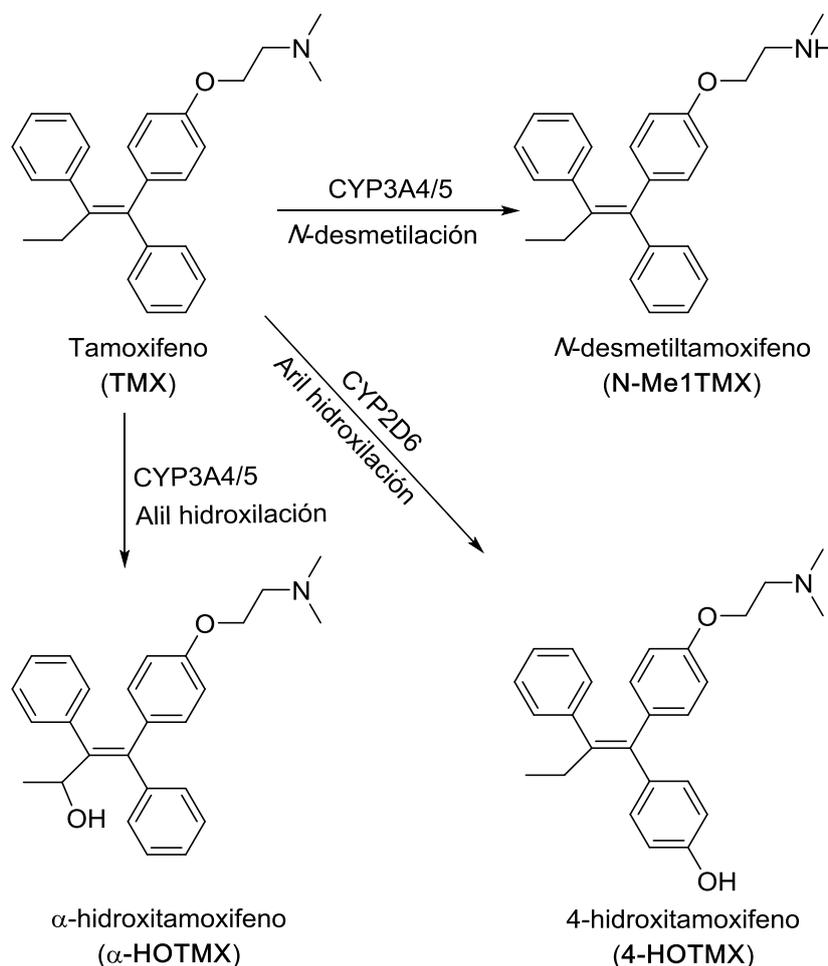
El TMX pertenece al grupo de moduladores selectivos de los receptores de estrógenos. Este compuesto bloquea dichos receptores, lo que permite, en los tumores cuyo crecimiento es estrógeno-dependiente, que se produzca la inhibición del crecimiento tumoral. Por este motivo, esta molécula se utiliza en el tratamiento y prevención del cáncer de mama.

El sistema del CYP450 se encarga de metabolizar el TMX en el hígado a través de diferentes reacciones de oxidación. Dado que el metabolismo de este fármaco se produce en varias etapas, en este estudio nos centraremos únicamente en analizar los metabolitos mayoritarios de la ruta de metabolización primaria que se muestran en el Esquema 5.6. Así, se conoce que aproximadamente el 90% del TMX es transformado en el N-desmetiltamoxifeno (**N-Me1TMX**) por el CYP3A4/5³⁴ fundamentalmente tras desmetilar la cadena aminoetoxi del TMX. En menor proporción se produce el 4-hidroxitamoxifeno (**4-HOTMX**), que se genera mediante la aril hidroxilación del TMX producida por el CYP2D6.³⁵ Este metabolito muestra una actividad farmacológica superior a la ejercida por el TMX. Por último, se ha considerado el α -hidroxitamoxifeno (**α -HOTMX**) como tercer metabolito de la ruta de metabolización primaria. Este

³⁴ C. Mani, H. V. Gelboin, S. S. Park, R. Pearce, A. Parkinson, D. Kupfer, *Drug Metab. Dispos.* **1993**, *21*, 645-656.

³⁵ a) Y. Jin, Z. Desta, V. Stearns, B. Ward, H. Ho, K. H. Lee, T. Skaar, A. M. Storniolo, L. Li, A. Araba, R. Blanchard, A. Nguyen, L. Ullmer, J. Hayden, S. Lemler, R. M. Weinsilboum, J. M. Rae, D. F. Hayes, D. A. Flockhart, *J. Natl. Cancer Inst.* **2005**, *97*, 30-39; b) R. Ferraldeschi, W. G. Newman, *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 1122-1138.

compuesto se forma en menor cantidad tras la alil hidroxilación del TMX catalizado por las isoformas CYP3A4/5 y es potencialmente más tóxico que el TMX.³⁰



Esquema 5.6. Ruta de metabolización primaria del tamoxifeno.

La selectividad que muestran las diferentes isoformas del CYP450 al catalizar las diferentes reacciones de oxidación puede ser debida a múltiples factores. En primer lugar, los residuos adyacentes al centro activo son diferentes en las isoformas, por tanto, los compuestos no muestran la misma preferencia de orientación y no se acomodan igual en el centro activo. Además, tanto el canal de entrada al centro activo como el tamaño de este último varía entre las diferentes isoformas. Por último, es posible que las diferentes reacciones de

oxidación muestren intrínsecamente diferencias significativas en las barreras de activación.

Por todo ello, en primer lugar llevamos a cabo varios experimentos de docking entre el TMX y varias isoformas de CYP450, con el fin de analizar si presentan orientaciones predeterminadas. Así, se realizaron pruebas de docking con el TMX y las isoformas CYP3A4 y CYP2D6. La primera enzima es la responsable de la N-desmetilación del TMX, lo que da lugar al **N-Me1TMX**. El CYP2D6, en cambio, se encarga de oxidar el TMX mediante la para-hidroxilación de su anillo aromático, lo que genera el **4-HOTMX** (Esquema 5.6). Las coordenadas de los citocromos CYP3A4 y CYP2D6 se obtuvieron de las estructuras de Rayos X con bromoergocriptina²⁴ (pdb 3UA1) y con (4*aR*,6*R*,8*aS*)-8*a*-(2,4-difluorofenil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-4,4*a*,5,6,8,8*a*-hexahidropirano[3,4-*d*][1,3]-tiazin-2-amina,³⁶ (pdb 4XRY), respectivamente. Los resultados de estas pruebas de docking se muestran en la Figura 5.10.

³⁶ M. A. Brodney, E. M. Beck, C. R. Butler, G. Barreiro, E. F. Johnson, D. Riddell, K. Parris, C. E. Nolan, Y. Fan, K. Atchison, C. Gonzales, A. E. Robshaw, S. D. Doran, M. W. Bundesmann, L. Buzon, J. Dutra, K. Henegar, E. LaChapelle, X. Hou, B. N. Rogers, J. Pandit, R. Lira, L. Martinez-Alsina, P. Mikochik, J. C. Murray, K. Ogilvie, L. Price, S. M. Sakya, A. Yu, Y. Zhang, B. T. O'Neill. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3223-3252.

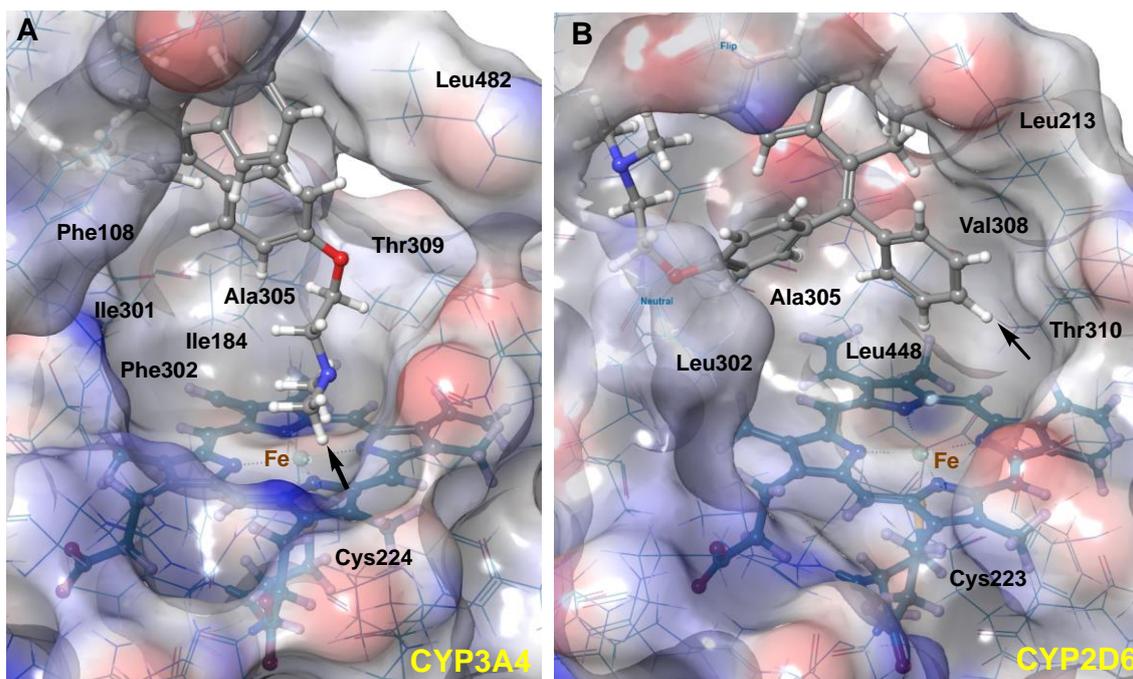


Figura 5.10. Posiciones menos energéticas tras la incorporación del tamoxifeno al CYP3A4 (A) y al CYP2D6 (B). Las flechas indican los enlaces C-H más próximos al sistema Fe-hemo. Para el CYP3A4 (A) la orientación apunta a la reacción de N-desmetilación, mientras que para el CYP2D6 muestra preferencia por la reacción de 4-hidroxilación como reacción de oxidación favorecida.

Las simulaciones realizadas con CYP3A4 y con CYP2D6 mostraron que ambas enzimas poseen un centro activo amplio que les permite albergar el TMX con más de una orientación posible. Tal y como se observa en la Figura 5.10, ambas enzimas presentan un entorno hidrofóbico alrededor del grupo hemo formado por múltiples residuos de valina, leucina, isoleucina, treonina y fenilalanina. La Figura 5.10A muestra la orientación predeterminada del TMX en el centro activo del CYP3A4. En esta imagen se puede observar que el grupo más próximo al Fe(III) del grupo hemo corresponde a la fracción N,N-dimetilamino. Este resultado es compatible con la preferencia en la reacción de N-desmetilación del TMX por esta isoforma, lo que genera el **N-Me1TMX** como principal metabolito. Otra orientación posible del TMX en este centro activo se forma al situar el grupo etilo próximo al Fe (III). Esta combinación es menos

probable pero energéticamente posible y es compatible con la formación del metabolito **α -HOTMX**.

Por el contrario, el centro activo del CYP2D6 muestra como orientación predeterminada aquella en la que se coloca el grupo fenilo del TMX próximo al Fe(III) del grupo hemo (ver Figura 5.10B). Esta orientación favorece la para-hidroxilación del benceno y genera el **4-HOTMX** como principal metabolito. Nuevamente, los resultados de estos experimentos de docking concuerdan con los resultados experimentales mostrando que las diferentes isoformas del CYP450 pueden preorganizar la orientación de los sustratos, y que cada isoenzima muestra preferencia por determinadas reacciones de oxidación.

Una vez comprobado que las diferentes isoformas del CYP450 presentan diferencias en la orientación del TMX, se evaluó la preferencia intrínseca del TMX por diferentes reacciones de oxidación. Para ello, se cuantificaron las energías de disociación de enlace de algunos enlaces C-H seleccionados del TMX. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 5.11, donde se observa que de las tres reacciones responsables del metabolismo primario del TMX, intrínsecamente es la alil α -hidroxilación (84.6 kcal/mol) la reacción favorecida. A continuación, está la disociación correspondiente a la N-desmetilación del TMX (97.0 kcal/mol) y por último se encuentra la aril 4-hidroxilación (118.7 kcal/mol). Independientemente de estos valores, la preferencia cinética por las diferentes reacciones está ligada a la relación de energías de activación. Por tanto, para completar el estudio, se analizaron las tres reacciones de metabolización anteriormente expuestas con el modelo del Cpd I empleado en el análisis de la N-desmetilación de aminas. Asimismo, y teniendo en cuenta que el CYP450 actúa en estado de espín bajo, las superficies de energía potencial de la N-

desmetilación, la 4-hidroxilación y la α -hidroxilación fueron analizadas únicamente en ese estado. Los resultados de este estudio se recogen en la Tabla 5.1.

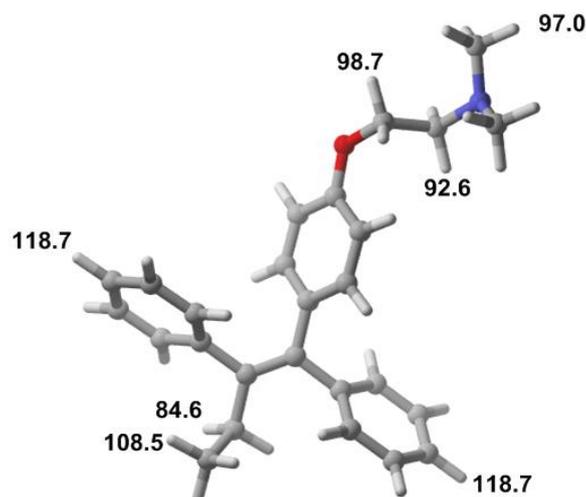


Figura 5.11. Energías de disociación de enlace de ciertos enlaces C-H del tamoxifeno analizados a UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ. Los valores de energía se muestran en kcal/mol.

Según los resultados recogidos en la Tabla 5.1, la N-desmetilación del TMX carece de barrera efectiva de activación. Además, la reacción es concertada ya que no fue posible hallar el estado de transición correspondiente a la recombinación del oxígeno. Las características geométricas del **TS1_{N-dem}** son muy similares a las obtenidas para el **TS1a_{Me3}** (ver Figura 5.12 y 5.3, respectivamente). Por otra parte, la α -hidroxilación también presenta una barrera de activación baja, de unas 7.1 kcal/mol, y la reacción ocurre nuevamente a través de un mecanismo concertado. El **TS1 _{α -hid}** (1.24 Å) presenta un estadio más avanzado que el **TS1_{N-dem}** (1.17 Å) en la transferencia del protón del enlace C-H.

La reacción de la 4-hidroxilación presenta diferencias significativas respecto a las dos oxidaciones anteriores. En primer lugar, es una reacción que

transcurre en dos etapas, y se han aislado los dos estados de transición, **TS1**_{4-hid} y **TS2**_{4-hid}. La primera etapa de reacción, que corresponde a la transferencia del protón, es la etapa limitante, ya que su energía de activación es ca.15 kcal/mol superior a la correspondiente a la segunda etapa. El estado de transición **TS1**_{4-hid} es tardío, en el que la formación del enlace O-H está más avanzado que la ruptura homolítica del enlace C-H. Por el contrario, la estructura optimizada del **TS2**_{4-hid} corresponde a un estado de transición temprano.

Tabla 5.1.: Energías relativas (ΔE), Energías relativas con contribución vibracional del punto cero ($\Delta E+ZPE$), Entalpías relativas (ΔH) y Energías relativas libres (ΔG), en kcal/mol, a 298 K, calculado para la ruta metabólica del tamoxifeno catalizada por HS-Fe(O)-porfirina como el modelo computacional del centro activo del CYP450.^a

Producto	Compuesto	ΔE	$\Delta(E+ZPE)$	ΔH	ΔG
N-Me1TMX	R _{N-dem}	0.0	0.0	0.0	0.0
	TS1 _{N-dem}	0.4	-0.7	-1.3	0.5
	P _{N-dem}	-65.3	-62.2	-63.6	-57.4
4-HOTMX	R _{4-hid}	-0.4	-0.4	-0.4	-0.6
	TS1 _{4-hid}	20.7	15.8	15.4	18.4
	INT _{4-hid}	19.4	17.5	17.8	17.8
	TS2 _{4-hid}	22.5	20.6	20.4	22.3
	P _{4-hid}	-65.3	-63.2	-63.8	-60.3
α-HOTMX	R _{α-hid}	-5.8	-5.9	-5.8	-4.9
	TS1 _{α-hid}	0.5	-1.9	-2.6	2.2
	P _{α-hid}	-68.0	-65.5	-66.2	-61.2

(a) Energías calculadas en estado de espín doblete empleando UB3LYP-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ como nivel de teoría y en solución con PCM, con $\epsilon = 78.39$. La ZPE, entalpía, y la energía libre de Gibbs se han obtenido mediante el nivel de teoría de UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ.

A partir de los resultados obtenidos, cabe concluir que la N-desmetilación del TMX es la reacción intrínsecamente preferida de metabolización, ya que es la que menor energía de activación presenta. Este dato concuerda con los resultados experimentales, según los cuales aproximadamente el 90% del TMX se transforma en **N-Me1TMX**, siendo este su principal metabolito. En este sentido, la 4-hidroxilación presenta una barrera de activación de 23 kcal/mol, lo que se traduce experimentalmente en una menor proporción del metabolito **4-**

HOTMX. La α -HOTMX se situaría entre ambos metabolitos, con una energía libre de activación de unas 7 kcal/mol.

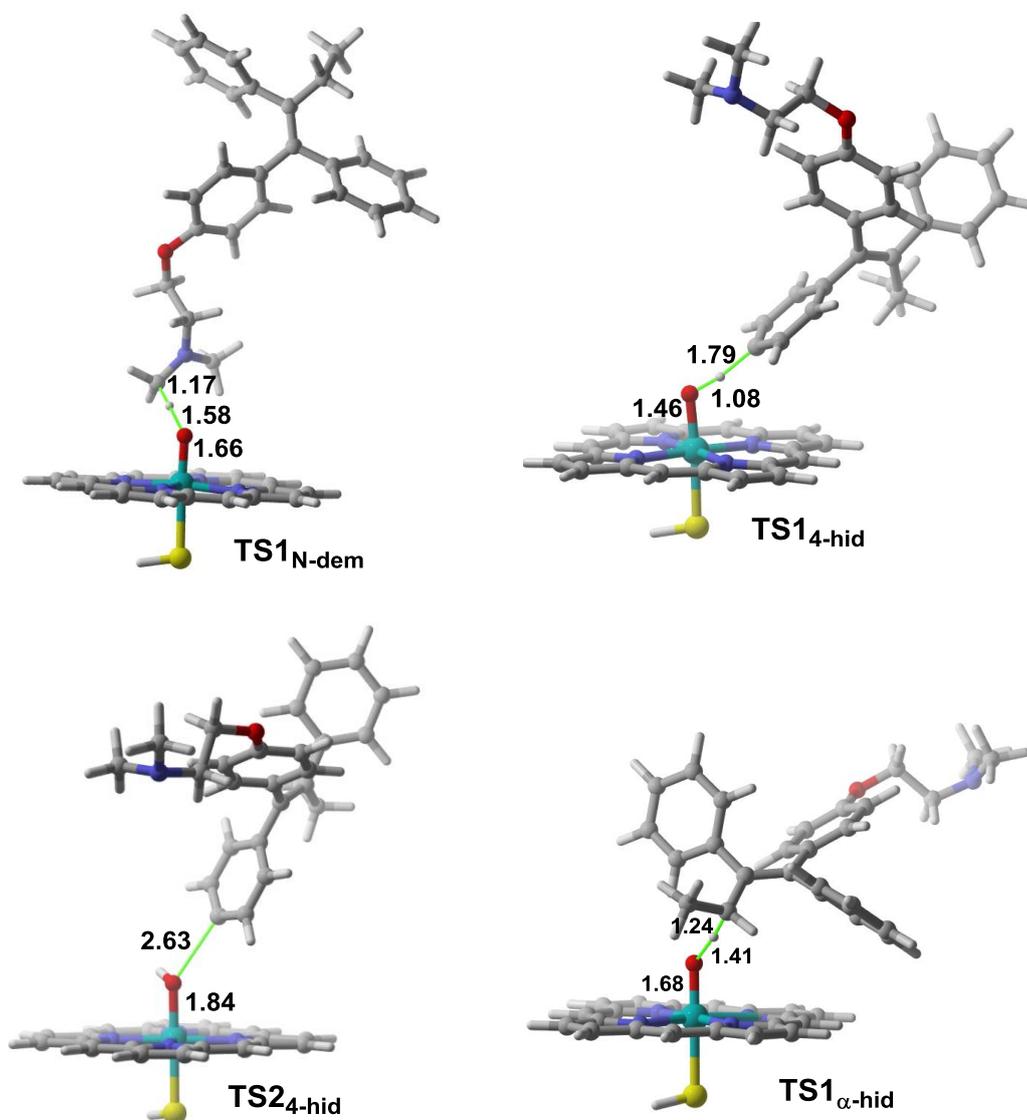


Figura 5.12. Geometrías de los estados de transición TS1_{N-dem}, TS1_{4-hid}, TS2_{4-hid} y TS1_{α-hid} en estado de espín doblete. Las distancias de los enlaces están representadas en Å.

Al considerar las pruebas de docking, de energía de disociación de enlace, así como los cálculos DFT entre el TMX y el sistema hemo, llegamos a la conclusión de que la formación del **N-Me1TMX** como principal metabolito viene determinada por la preferencia intrínseca de la reacción de N-desmetilación, a la que se añade la preferencia del centro activo del CYP450 por el grupo NMe₂. Por

ello, las isoformas como por ejemplo el CYP3A4, contienen centros activos más amplios donde no está tan restringida la orientación del sustrato. La isoforma CYP2D6, por el contrario, requiere de una mayor preorganización del sustrato para llevar a cabo la hidroxilación del anillo aromático. Su centro activo está más restringido, sorteando así la menor preferencia intrínseca del centro activo por generar el metabolito **4-HOTMX**.

5.5 Conclusiones

En este capítulo se han presentado y discutido las reacciones de N-desmetilación de la trimetilamina, dimetilamina y monometilamina catalizadas por el CYP450. Para ello se ha empleado el anillo de porfirina unido al Fe(IV)=O y al anión bisulfuro como modelo. Los sustratos trimetilados llevan a cabo la reacción mediante la hidroxilación del enlace C-H, en los que el mecanismo de recombinación propuesto por Shaik da lugar al producto N-hidroxilado mediante un mecanismo concertado. Este compuesto se descompone en formaldehído y el correspondiente producto N-desmetilado. Los sustratos dimetilados y monometilados, por el contrario, poseen un enlace N-H próximo al grupo hemo, lo que posibilita la doble transferencia por etapas de hidrógeno como mecanismo alternativo a la C-H hidroxilación. La imina formada por esta vía también es hidrolizada para generar nuevamente formaldehído y el producto N-desmetilado. Los resultados anteriormente expuestos indican que ambos mecanismos son prácticamente isoenergéticos.

Ambos tipos de reacciones se producen entre estados de espín doblete y cuadruplete, lo que implica la participación de varios puntos de cruce de mínima energía a lo largo de las coordenadas de reacciones respectivas.

Por último, se ha estudiado el metabolismo primario del TMX como modelo de fármaco N,N-dimetilado. Para ello, se han realizado pruebas tanto de docking, de energía de disociación de enlace y de cálculos DFT. Los resultados obtenidos muestran el producto N-desmetiltamoxifeno como principal metabolito, siendo el 4-hidroxitamoxifeno y el α -hidroxitamoxifeno metabolitos relativamente menos abundantes. Estos resultados están en buen acuerdo con los resultados experimentales.

6. CONCLUSIONES GENERALES

6.1 Conclusiones

En la presente Tesis Doctoral se ha estudiado la reacción de N-desmetilación de aminas catalizada por enzimas dependientes de α -cetoglutarato tales como la JMJD2A y por enzimas de tipo hemo, con el CYP450 como representante. De los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. Tanto las enzimas dependientes de α -cetoglutarato como las enzimas hemo son capaces de catalizar la N-desmetilación de aminas.

2. Se han observado diferencias respecto al mecanismo mediante el cual llevan a cabo dicha reacción dependiendo del grado de metilación:

Ambas familias de enzimas realizan la N-desmetilación de aminas trimetiladas mediante la ruta del carbinol (C-hidroxilación del grupo N-metilo). Esta reacción es concertada cuando es catalizada por el CYP450, mientras que cuando es catalizada por la JMJD2A, tiene lugar mediante un mecanismo por etapas.

Por el contrario, las aminas dimetiladas y monometiladas son desmetiladas mediante la ruta del catión iminio en el caso de la JMJD2A, mientras que los CYP450 pueden realizar la N-desmetilación de aminas di- y monometiladas, tanto por la vía del carbinol como por la vía del catión iminio. Este último mecanismo no había sido reportado hasta la fecha.

3. Las enzimas no-hemo catalizan la N-desmetilación en estado de medio y alto espín, mientras que las enzimas hemo lo hacen en estado de bajo y medio espín. Por tanto, ambas familias de enzimas deben realizar

varios puntos de cruce de mínima energía a lo largo de las respectivas coordenadas de reacción.

4. La selectividad que muestran las desmetilasas de histonas con dominio Jmj-C con respecto al grado de metilación de lisinas no tiene relación intrínseca con la N-desmetilación. Por tanto, el origen de la selectividad es consecuencia de múltiples factores tales como la polaridad del canal de entrada al centro activo y/o el tamaño del grupo (poli)metilamino, donde cobran especial importancia los residuos adyacentes al centro activo. Las enzimas selectivas que desmetilan los residuos trimetilados poseen residuos más polares en el canal, de forma que la N-desmetilación de aminas dimetiladas está dificultada, e incluso impedida, para las lisinas monometiladas, al establecerse interacciones entre los grupos NH del sustrato y los residuos polares del canal de entrada al centro activo. En el caso de las enzimas que desmetilan las lisinas di- y monometiladas, la selectividad viene determinada por el tamaño del centro activo, ya que puede no ser lo suficientemente grande como para albergar residuos de lisina trimetilados y poseer residuos apolares, lo que permite acceder al centro activo a residuos con menor grado de metilación.
5. Se ha comprobado que el modelo computacional propuesto para la familia del CYP450 sirve para poder calcular *in silico* el metabolismo primario de fármacos catalizados por estas enzimas. Nuestros resultados han permitido calcular las preferencias de formación del Tamoxifeno tal y como ocurren experimentalmente. Estos cálculos pueden ser útiles para determinar cuáles serán los metabolitos que se

formarán como consecuencia del metabolismo de otros fármacos N-metilados.

6. Finalmente, parece que la existencia en el organismo de dos familias de enzimas responsables de catalizar la misma reacción puede ser debida al grado de selectividad de desmetilación de diferentes sustratos. En este sentido, la familia de los citocromos P450 posee una cavidad más amplia con un centro activo plano, lo que hace que sea más promiscuo, permitiendo el acceso y la oxidación de diversos tipos de sustratos, entre ellos xenomoléculas. Por el contrario, la familia de las desmetilasas de lisina con dominio Jmj-C muestra una mayor selectividad a la hora de ejercer su acción, lo que parece compatible con los procesos, forzosamente más sutiles, de activación o represión de la transcripción de genes a partir de un marcador epigenético tan importante como la N-metilación/desmetilación.

ANEXOS

Chemical Biology

Two-State Reactivity of Histone Demethylases Containing Jumonji-C Active Sites: Different Mechanisms for Different Methylation Degrees

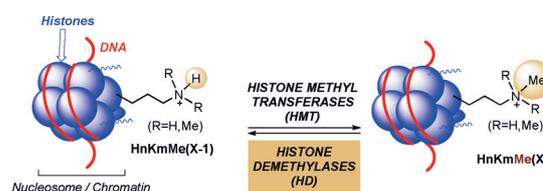
Nerea Alberro,^[a] Miquel Torrent-Sucarrat,^[a, b, c] Iosune Arrastia,^[b] Ana Arrieta,^[a] and Fernando P. Cossío*^[a, b]

Abstract: The N-demethylation reactions of *N,N,N*-trimethylpropan-1-ammonium and *N,N*-dimethyl- and *N*-methylpropan-1-ammonium cations in the presence of [(AcO)₂(imidazole)₂(H₂O)Fe=O] complex have been studied by density functional theory. These transformations are suitable models for the N-demethylation of tri-, di-, and monomethylated lysine residues of histones in the presence of Jumonji-C containing histone demethylases. It has been found that the N-demethylation reaction is stepwise and occurs on triplet and quintet potential energy hypersurfaces. Both spin states are nearly degenerated and the quantum jump from one state to another has a transition probability close to

one. The preferred intrinsic mechanism depends upon the methylation degree. For trimethylated residues the mechanism consists of a proton abstraction from a methyl group followed by a formation of a hydroxymethylaminium intermediate. This mechanism also occurs when dimethylated residues are able to orientate one methyl group towards the Fe=O group of the catalytic site. In contrast, when a N–H group of the substrate is close enough to the Fe=O group, the intrinsically preferred N-demethylation reaction leads to the formation of an iminium intermediate that can be hydrolyzed to form the corresponding N-demethylated product.

Introduction

DNA is not an isolated macromolecule inside the nucleus of eukaryotic cells. Instead, it is wrapped around ensembles of proteins named histones.^[1] Each histone octamer and the corresponding DNA segment form the nucleosome (Scheme 1).^[2] The ensemble of nucleosomes, linker DNA, and linker histones form the supramolecular complex known as chromatin.^[3] This latter complex can adopt two forms: euchromatin and heterochromatin. The former disposition is less condensed and can act as a receptor to trigger the transcription machinery. In contrast, heterochromatin is highly condensed and is not transcribed, thus silencing the genomic information contained in chromosomal DNA.^[4]



Scheme 1. Catalytic methylation and demethylation of lysine residues (Km) of histones (Hn).

Lysine substituents present in the tails of histones can suffer post-transcriptional modifications. Writer enzymes catalyze the incorporation of different substituents in the ϵ -amino of groups of lysine residues and eraser enzymes remove them.^[5] Among the possible chemical changes, ϵ -N-methylation in lysine residues play a very important role in diverse biological processes associated with health, disease, and inheritance.^[6] In particular, different ratios of methylation states in lysine residues of histones (HnKmMeX, X=0,1,2,3) can determine the transcriptional outcome of a given gene by means of recognition of the methylation degree by reader proteins.^[7] The writer proteins associated with lysine methylation (HnKmMeX \rightarrow HnKmMe(X+1)) are known as histone methyl transferases.^[8] The corresponding eraser proteins that catalyze the demethylation reaction (HnKmMeX \rightarrow HnKmMe(X-1)) are defined as histone demethylases (Scheme 1). This second group of enzymes is in turn divided into lysine-specific demethylases (LSD) and Jumonji-C (JMJC) domain-containing demethylases.^[8b,9]

[a] N. Alberro, Dr. M. Torrent-Sucarrat, Prof. Dr. A. Arrieta, Prof. Dr. F. P. Cossío
Department of Organic Chemistry I
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)
Centro de Innovación en Química Avanzada (ORFEO-CINQA)
Manuel Lardizabal Ibilbidea 3, 20018 San Sebastián/Donostia (Spain)
E-mail: fp.cossio@ehu.es
Homepage: <http://www.ehu.es/es/web/qbmm/hasiera>

[b] Dr. M. Torrent-Sucarrat, Dr. I. Arrastia, Prof. Dr. F. P. Cossío
Donostia International Physics Center (DIPC)
Manuel Lardizabal Ibilbidea 4, 20018 San Sebastián/Donostia (Spain)

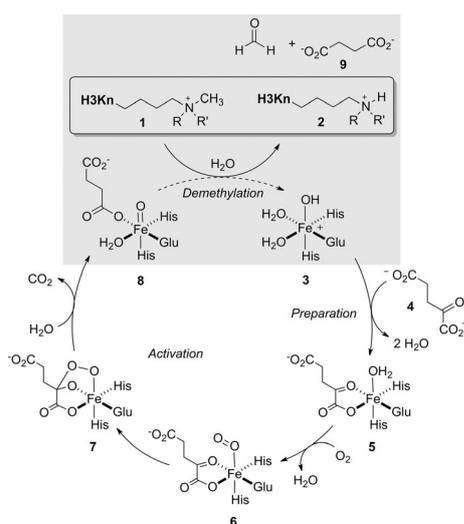
[c] Dr. M. Torrent-Sucarrat
Ikerbasque, Basque Foundation for Science
María Díaz de Haro 3, 6 floor, 48013 Bilbao (Spain)

Supporting information and ORCID(s) from the author(s) for this article are available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201604219>.

The LSD family of enzymes comprises two enzymes named LSD1 and LSD2, which contain FAD as a cofactor and only accept di- and monomethylated lysines as suitable substrates.^[10] In contrast, the JMJC domain-containing histone demethylases (JMJD)^[11] can act on tri-, di-, and monomethylated lysine residues. These enzymes can be classified in different subfamilies JMJD n , in which $n = 1-8$. The JMJD1A-C lysine demethylases act on H3K9Me1 and on H3K9Me2, whereas enzymes belonging to the JMJD2 subfamily act preferentially on tri- and dimethylated substrates. Thus, JMJD2A, JMJD2B, and JMJD2C demethylate H3K9MeX, H3K36MeX, and H1,4K26MeX, in which $X = 2,3$. In contrast, JMJD2D accepts H3K9Me3 as a sole substrate. Finally, JMJD3 demethylates H3K27MeX, in which $X = 2,3$.^[9a]

Aside from the inherent interest of JMJD n enzymes in deciphering the histone code,^[12] most of the current interest on this family of enzymes stems from the relevance of histone demethylation in cancer and other disorders. Noteworthy is that computational chemistry has become a useful tool to understand the epigenetic mechanisms and to design new drugs.^[13] Moreover, a considerable effort to develop small-molecule inhibitors of histone demethylases has been produced in the last years, although with limited success.^[8,9,14]

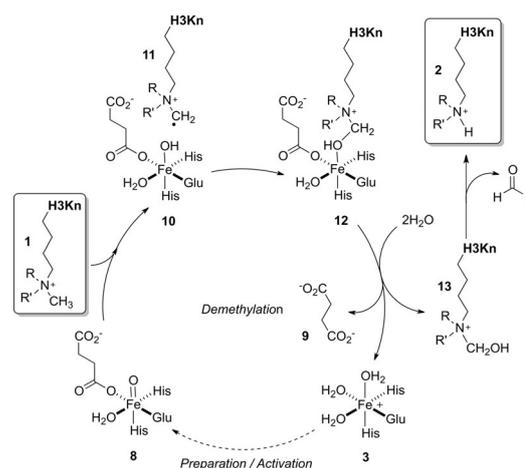
The accepted reaction mechanism for JMJC-containing histone demethylases is depicted in Scheme 2^[15] and closely resembles similar catalytic cycles proposed for other demethylation processes in non-heme iron-containing enzymes.^[16] Thus, the enzyme active site at its resting state contains a Fe^{II} center **3** coordinated to an amino acid triad of one glutamate and two histidine residues. The α -ketoglutarate cofactor **4** is incorporated to the active site to give rise to intermediate **5**. This preparation step is followed by activation of the metallic site by binding to one molecule of oxygen to yield a ferric superoxo adduct **6**, in which only one oxygen atom is bound to the metallic center. Paton et al.^[17] have shown that in JMJD2A the O₂-Fe interaction accounts for half the total interaction energy



Scheme 2. General catalytic cycle for Jumonji-C domain-containing histone demethylases. The details of the demethylation process (highlighted in grey) are gathered in Scheme 3.

at the most stable quintet state. The rest of the interaction energy stems from other residues and from the N-methylated lysine. Transformation of **6** into ferryl oxo intermediate **8** has been studied for 2-oxoglutarate-dependent enzymes.^[18] The process starts with the addition of one oxygen atom on the ketone group to yield [2.1.1.]bicyclic intermediate **7**. This step determines the rate of the **5**→**8** transformation.^[19] Peroxo intermediate **7** gives rise to iron (IV)-oxo complex **8** through concerted decarboxylation along the quintet spin state. This step has also a significant activation energy and therefore it has been suggested that bicyclic intermediate **7** could have a finite lifetime.^[20] On the other hand, DFT calculations suggest that a peroxosuccinate derivative of **7** cannot be the oxidative species in the subsequent demethylation steps.^[21] In addition, de Visser et al.^[22] also demonstrated by QM/MM studies that the **5**→**8** process takes place in other α -ketoglutarate-dependent enzymes and is not modified significantly by the environment of the catalytic site.

Once intermediate **8** has been formed, the demethylation part of the catalytic cycle can proceed. According to the accepted mechanism, the iron (IV)-oxo complex **8** reacts with the methyl moiety of **1** to form a Fe^{III}-hydroxy intermediate **10** and the radical cation **11** (Scheme 3). These two species re-



Scheme 3. Demethylation steps associated with the reaction mechanism of Jumonji-C domain-containing histone demethylases.

combine to form intermediate **12**, from which the hydroxy-methyl aminium cation **13** can leave the metallic center, with the release of succinate **9**. Aminium carbinol **13**, in turn, is hydrolyzed to yield the demethylated derivative **2** and formaldehyde. The triaquo complex **3** can initiate another catalytic cycle by consecutive incorporation of α -ketoglutarate and dioxygen (Scheme 2). The two-step mechanism involving **8** + **1**→**10** + **11**→**12** transformations is similar to the rebound mechanism extensively studied by Shaik et al.^[23] for heme (mainly cytochrome P450) and related enzymes, although the details of the demethylation reaction catalyzed by non-heme enzymes are known into a lesser extent. When N-demethylation of neutral tertiary amines is considered, two possible mechanisms have been studied for P450:^[24] demethylation and formation of *N*-

oxides. When di- and monosubstituted amines are considered, formation of *N*-hydroxamines can be also observed.^[25] Aside from cytochrome P450, other non-heme Fe-containing biocatalysts like AlkB enzymes are compatible with the rebound mechanism.^[26]

In heme-containing demethylation processes, low-spin mechanisms have been observed, a result compatible with the high-field character of the heme polydentate ligand. However, in the case of low-field ligands such as those present in JMJC domain-containing enzymes, medium or high spin states can be expected given the presence of triplet, quintet, and even septet states present in the preparation and activation stages of the catalytic cycle (vide supra). In addition, two-spin reactivity can be expected in the demethylation process.^[27] Moreover, spin crossovers can occur along the reaction coordinate, which could give rise to a spin acceleration^[28] through crossing points between two spin states, provided that the probability of jumping from one potential energy surface to another is large enough.

Within this context, the goals of the present study have been: 1) to assess the reaction mechanism for the demethylation steps gathered in Scheme 3; 2) to explore alternative mechanisms depending upon the methylation degree of the aminium substrate; and 3) to determine the preferred spin states along the reaction coordinate. Given that up to date the design of JMJC-containing histone demethylases has met with limited success, the ultimate aim of this work has been to get a detailed understanding of the reaction mechanism of this demethylation reaction that could help in the design of new generations of inhibitors.^[29]

Computational Methods

All the calculations reported in this work were carried out within the Density Functional Theory framework.^[30] Previous computational studies on Fe^{II} complexes have shown that DFT methods are accurate enough to compete with other more demanding theoretical levels^[31] such as CASPT2,^[32] CCSD(T),^[33] or MP2,^[34] both in terms of geometries and relative energies at different spin and oxidation states. In addition, different authors have shown that these systems are not very sensitive to the treatment of dispersive terms.^[35] Chen et al.^[36] studied the methane hydrogen abstraction process of several models of high-valent non-heme Fe^{IV}=O catalytic sites using the open-shell RCCSD(T) method and twelve density functional methods. The authors recommended the use of the three-parameter hybrid functional B3LYP method^[37] in theoretical studies for which comparison between quintet and triplet reactivity is required. Moreover, the B3LYP functional has been largely used in theoretical studies of non-heme and heme iron active sites.^[38] Therefore, the computational studies reported in this work were carried out at the unrestricted B3LYP level as implemented in the Gaussian 09 suite of programs.^[39]

Optimized geometries and harmonic analyses of the stationary points^[40] were obtained using the standard split-valence 6-31G(d,p) basis sets for C, H, N, and O elements, whereas the iron center was described by means of the basis set and effec-

tive core potential (ECP) developed by Hay and Wadt,^[41] activated in Gaussian 09 by the LanL2DZ keyword. All local minima exhibited positive definite Hessians (NIMAG=0). Transition structures showed one and only one negative eigenvalue in the diagonalized Hessian matrices (NIMAG=1), associated with nuclear motion along the reaction coordinate under study. The connection between local minima and transition structures was verified by forward and reverse intrinsic reaction coordinate^[42] calculations, as implemented in Gaussian 09.^[43]

Energies were refined using the LanL2DZ and 6-311+G(2d,2p) basis sets and ECP and the dispersion effects were included using the D3-Grimme's dispersion^[44] with Becke-Johnson damping.^[45] Solvent effects were included by means of the Polarization Continuum Model (PCM)^[46] with the relative permittivity ($\epsilon=78.39$) and parameters corresponding to water. Since we have studied a model active site that is present in different JMJDn enzymes with different dielectric environments, we used the standard values for free water as a reference model. Relative energies in solution were computed at the 1 M standard state.^[47]

Minimum-energy crossing points (MECPs) between two potential energy hypersurfaces associated with triplet and quintet spin states were located and characterized by means of the MECP program developed by Harvey et al.^[48] The probability of hopping from one spin state surface to another through a given MECP(*i*) was estimated by means of the Landau-Zener model:^[49]

$$p_{sh}(i) = 1 - \exp\left[-\frac{2\pi H(i)_{SOC}^2}{\hbar v(i)\Delta F(i)}\right] \quad (1)$$

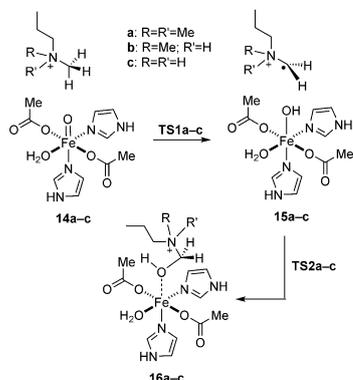
in which $H(i)_{SOC}$ is the spin-orbit coupling (SOC) derived from off-diagonal Hamiltonian matrix elements between the triplet and quintet states at the corresponding MECP. This term was calculated using the MolSOC program^[50] on previously optimized UB3LYP/6-31G(d,p) geometry of the MECP under study. SOC matrix elements were calculated using the full Breit-Pauli operator.^[51] $\Delta F(i)$ was approximated as the difference of slopes between triplet and quintet surfaces at the MECP connecting reactant(s) and TS along the respective IRCs. Finally, $v(i)$ is the effective velocity of passing through the MECP, which was approximated as the average velocity in a Maxwell-Boltzmann distribution:

$$v(i) = \sqrt{\frac{k_B T}{2\pi\mu(i)}} \quad (2)$$

in which $\mu(i)$ is the reduced mass of the interacting systems along the reaction coordinate, namely the corresponding substrate and the model active site.

Results and Discussion

In order to study the reaction mechanism associated with the demethylation step catalyzed by $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ intermediate **8** (Scheme 3), we selected the computational model system gathered in Scheme 4. In complexes **14a–c**, the histidine and



Scheme 4. Model system for the study of the demethylation step in tri-, di-, and monomethylated aminium substrates.

glutamate residues of **8** are represented by 1*H*-imidazole and acetate, respectively. Although in previous studies^[15] it has been suggested that the CO_2 equivalent generated in the decarboxylation of the α -ketoglutarate cofactor remains close to the active site, the exact step in which its departure takes place remains undetermined. To eliminate this ambiguity and since there are many water molecules close to the $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ moiety, we saturated the octahedral coordination pattern of the metallic center with a molecule of water. The succinate residue was modeled by another acetate close to the $\text{Fe}=\text{O}$ moiety. In addition, the (poly)methylated lysine residue was represented by a (poly)methylated *N*-propylaminium cation. This model system captures the structural and electronic essential features of the demethylation reaction. According to the accepted mechanism, this process involves the formation of intermediates **15a–c** (Scheme 4), in which the ϵ -*N*-methylated surrogate is transformed into a *N*-methylene radical cation by transfer of one hydrogen atom to the ferryl ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) group. These intermediates are in principle transformed into the corresponding Fe-coordinated aminium carbinols **16a–c**. From this latter intermediate, the *N*-(hydroxymethyl)propan-1-aminium cation is hydrolyzed to formaldehyde and the corresponding demethylated aminium residue (Schemes 3 and 4). As we will show in the next sections, the different methylation degrees require separate analyses of the respective reaction coordinates. Therefore, the tri-, di-, and monomethylated cases will be discussed separately.

Trimethylated substrates

The reaction profiles of transformation **14a**→**16a** at the low (singlet, $S=0$), medium (triplet, $S=1$), and high (quintet, $S=2$) spin states are gathered in Figure 1. According to our results,

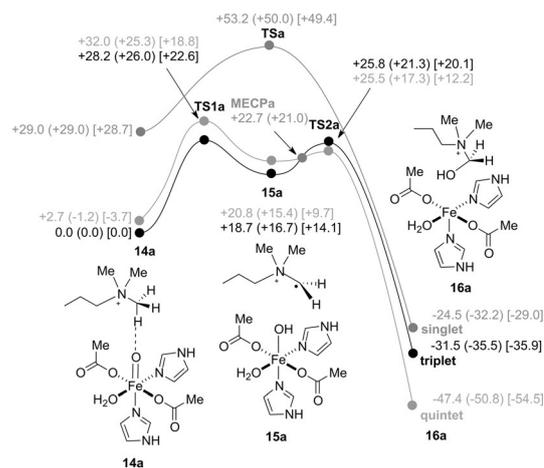


Figure 1. Reaction profiles for the transformation of **14a** into **16a** at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$. Relative energies refer to **14a** at the triplet state and are given in kcal mol⁻¹. Minimum energy crossing point MECPa is also indicated. Numbers in parentheses and brackets correspond to relative energies and Gibbs energies (298 K), respectively, computed at the UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311 + G(2d,2p)&LanL2dz//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory.

the reaction profile at the singlet state is concerted, although it is significantly more energetic than the medium and high-spin profiles calculated along the entire reaction path. In the case of the triplet and quintet states, the reaction coordinates are much closer in energy and correspond to a stepwise process in line with that indicated in Schemes 3 and 4.

Reactant structure **14a** resulted to be almost isoenergetic at the triplet ($S=1$) and quintet ($S=2$) states, whilst the low (singlet) spin state was calculated to lie approximately 29 kcal mol⁻¹ above the medium and high states (Figure 1). The three geometries were found to be almost identical (see Figure 2A). In addition, the orientation of the three methyl groups in **14a** closely resembles that found in the X-ray structure of the active site of JMJD2A before reaction with dioxygen coordinated to K9H3Me3 (pdb code: 2q8c, see Figure 2B).^[52]

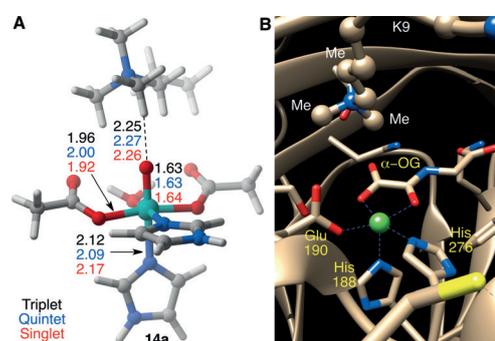


Figure 2. A) Fully optimized UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) geometry of complex **14a** at the triplet state. Bond distances (in Å) at the quintet, triplet, and singlet states are also given. B) X-ray diffraction analysis data of the active site of human histone demethylase JMJD2A (pdb code: 2q8c) with trimethylated lysine K9 of histone H3, complexed with α -oxallyl glycine (α -oxoglutarate surrogate, denoted as α -OG).

In complex **14a** the Fe=O moiety interacts with one methyl group of the substrate and yields directly the hydroxymethylammonium complex **16a** at the singlet state, with a free activation energy of approximately 21 kcal mol⁻¹ via transition structure **TSa** (Figures 1 and 3). In contrast, the same complex is transformed into intermediate **15a** at the triplet and quintet states, showing in both electronic states a free energy barrier of approximately 22.5 kcal mol⁻¹. Despite the different nature of both transformations, the geometric features of **TSa** and **TS1a** (see Figure 3) are very similar and correspond to a late transition structure in which formation of the O–H bond is more advanced than the homolytic cleavage of the C–H bond of one methyl group.

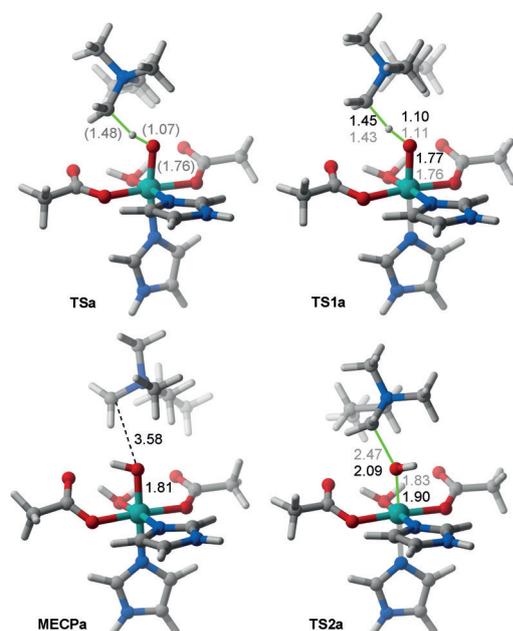


Figure 3. Fully optimized UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) geometries of transition structures **TSa**, **TS1a**, and **TS2a**, as well as minimum-energy crossing point **MECPa**. Geometric data of triplet, quintet, and singlet states are represented in black, light grey, and dark grey (in parenthesis), respectively. Bond distances are given in Å. In **TS1a** and **TS2a**, ball and stick representations correspond to the triplet and quintet spin states, respectively.

Although **15a** was calculated to be slightly more stable at the quintet state when dispersion and thermal effects were considered, complex **16a** resulted to be approximately 20 kcal mol⁻¹ more stable at the quintet state (Figure 1). In addition, transition-structure **TS2a** was also calculated to be approximately 8 kcal mol⁻¹ less energetic at *S*=2. We located a minimum-energy crossing point (**MECPa**) at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p) & LanL2DZ(Fe) level. Considering only total energies at this computational level, we concluded that an adiabatic free energy barrier of only approximately 2.5 kcal mol⁻¹ via **MECPa** should result in a facile second step, provided that the probability of hopping was large enough (Figure 1). Actually, the chief features of this crossing point were very similar to those found for **15a** (Figure 3).

The triplet–quintet adiabatic barrier ΔG_{TQ}^a is related to the observable kinetic constant k_{obs} by means of the following expression:^[53]

$$k_{\text{obs}} = P_{\text{TQ}} \frac{k_{\text{B}}T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G_{\text{TQ}}^a}{RT}\right) = \frac{k_{\text{B}}T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G_{\text{eff}}^a}{RT}\right) \quad (3)$$

in which P_{TQ} is the probability of hopping between the triplet and quintet states at **MECPa** according to Equation (1). If we define the effective activation energy ΔG_{eff}^a as that expected within the Eyring framework without spin-state crossing, we obtain the following relationship:

$$\Delta G_{\text{eff}}^a = \Delta G_{\text{TQ}}^a - RT \ln P_{\text{TQ}} \quad (4)$$

Therefore, according to Harvey,^[53] P_{TQ} represents an additional term to the activation entropy:

$$\Delta G_{\text{eff}}^a = \Delta H_{\text{TQ}}^a - T(\Delta S_{\text{TQ}}^a + R \ln P_{\text{TQ}}) \quad (5)$$

We computed the terms required to evaluate P_{TQ} according to Equations (1) and (2) and we obtained the following values for **MECPa**: $H_{\text{SOC}}^2 = 163.4$ cm⁻¹, $\Delta F = 0.0425$ hartree/bohr, and $\mu = 78.2$ a.m.u. Therefore, the surface-hopping probability was close to 1, with $P_{\text{TQ}} = 0.92$. As a consequence, we obtained $\Delta G_{\text{eff}}^a = 2.52$ kcal mol⁻¹, a value virtually identical to ΔG_{TQ}^a at the UB3LYP(PCM)/6-31(d,p) & LanL2DZ(Fe) level. Actually, the free energies of **15a** and **TS2a** follow the order $G(\text{quintet}) < G(\text{triplet})$ (Figure 1). Therefore, the spin crossing is unnecessary if the zero-point vibrational energies as well as the dispersion, thermal, and entropic corrections are added to the respective total energies. As a consequence, we assumed an activation barrier of approximately 2.5 kcal mol⁻¹ for this second step leading to the formation of carbinol **16a**, which makes the step of the hydrogen-atom transfer via **TS1a** the limiting step.

On the basis of these results, we concluded that the demethylation reaction of the trimethylammonium moiety of **14a** takes place on the quintet potential energy hypersurface by a stepwise process involving radical cationic intermediate **15a**. The triplet and quintet states are very close to each other along the entire reaction coordinate, the latter being slightly less energetic than the former. This makes spin crossing either very likely (with transition probabilities close to one) or unnecessary.

Dimethylated substrates

ϵ -N-Dimethylated lysine units of histones can adopt two main conformations with respect to the Fe=O unit of the active site (Figure 4). In one of them, the Me₂NH moiety can interact with the oxygen atom by forming a hydrogen bond. This structure is denoted as **in-14b** in Figure 4A. Alternatively, the N–H bond can adopt an antiplanar disposition with respect to the Fe=O unit, as indicated in structure **out-14b** (Figure 4B). However, the X-ray diffraction analysis of JMJD2A coordinated to

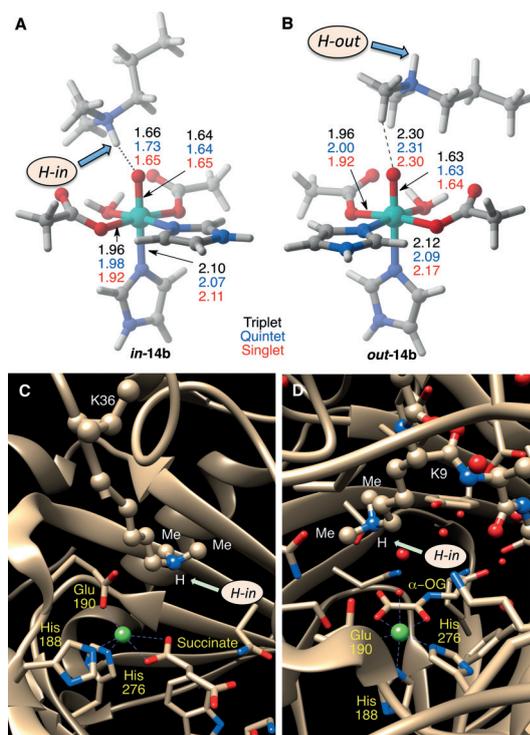


Figure 4. Fully optimized UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) geometries of complexes *in-14b* (A) and *out-14b* (B) at the triplet state. Bond distances (in Å) at the quintet, triplet, and singlet states are also given. C) X-ray diffraction analysis data of the active site of human histone demethylase JMJD2A (pdb code: 2q8d) with dimethylated lysine K36 of histone H3, complexed with succinate. D) X-ray diffraction analysis data of the active site of human histone demethylase JMJD2A (pdb code: 2ox0) with dimethylated lysine K9 of histone H3, complexed with α -oxallyl glycine (α -oxoglutarate surrogate, denoted as α -OG).

histone H3 via dimethylated lysines K36^[52] and K9^[15] reveals that only the H-*in* conformations are observed in these substrates (Figure 4C and D). Therefore, only demethylation routes via *in-14b* shall be discussed in this section. The route involving *out-14b* (very similar to that discussed in the previous section for trimethylated **14a**) can be found in the Supporting Information.

The relative energies of reactive dimethylated complex *in-14b* follow the order quintet \approx triplet \ll singlet. Once again, the triplet and quintet potential energy surfaces were calculated to be very close to each other and the Gibbs free energy of the quintet was found to be slightly lower than that found for the triplet. Abstraction of one hydrogen from the methyl group led to intermediate *in-15b* with an activation free energy of approximately 25 kcal mol⁻¹ at the quintet and triplet states (Figure 5). The structural features of saddle point *in-TS1b* were found to be similar to those found for **TS1a** (Figures 6 and 3).

Reaction intermediate *in-15b* led to the hydroxymethyl derivative *in-16b* via *in-TS2b*, with a Gibbs activation barrier of only 7.3 kcal mol⁻¹ at the quintet state. Therefore, in this route the limiting step corresponds to the abstraction of the hydrogen atom of the dimethylated substrate *in-14b*. We also located the crossing point *in-MECPb1* slightly above intermediate

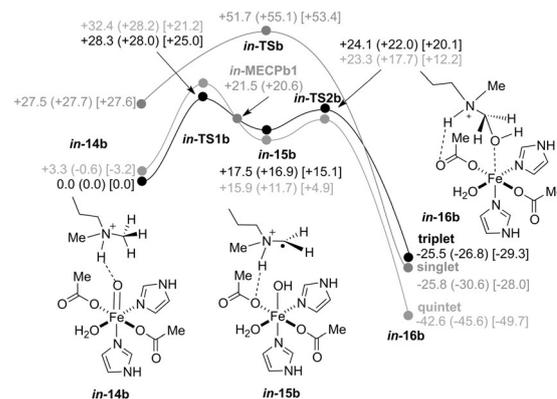


Figure 5. Reaction profiles for the transformation of *in-14b* into *in-16b* at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$. Relative energies refer to *in-14b* at the triplet state and are given in kcal mol⁻¹. Minimum energy crossing point *in-MECPb1* is also indicated. Numbers in parentheses and brackets correspond to relative energies and Gibbs energies (298 K), respectively, computed at the UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311 + G(2d,2p)&LanL2dz//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory.

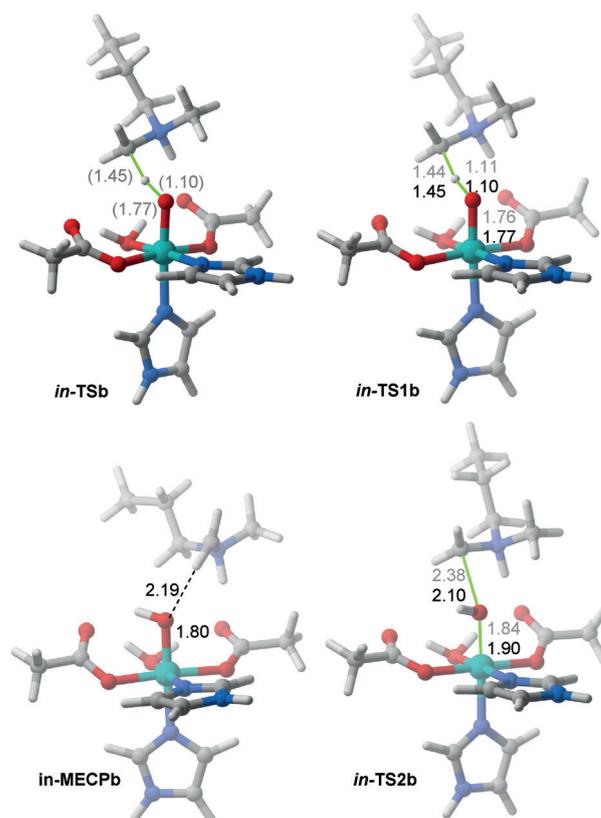
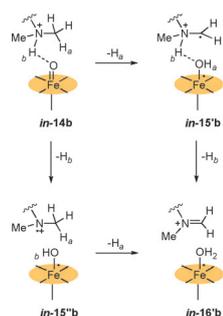


Figure 6. Fully optimized UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) geometries of transition structures *in-TSb*, *in-TS1b*, and *in-TS2b*, as well as the minimum energy crossing point *in-MECPb1*. Geometric data of triplet, quintet, and singlet states are represented in black, light grey, and dark grey (in parenthesis), respectively. Bond distances are given in Å. Ball and stick representations in saddle points *in-TS1b* and *in-TS2b* correspond to the quintet spin state.

in-15b. However, this point was not found to be relevant when Gibbs energies were considered since the quintet reaction path was the less energetic one along the complete reac-



Scheme 5. Possible hydrogen-atom transfer paths to yield iminium species *in-16'b* from dimethylated substrate *in-14b*.

As an alternative pathway, we considered that the proximity of the N–H bond to the Fe^{IV}=O group could result in the abstraction of this proton by the oxygen atom, thus resulting in the formation of a Fe^{III}–OH group and an iminium radical cation through the two alternative routes gathered in Scheme 5. The iminium derivative *in-16'b* leaves the active site and is hydrolyzed to yield the same products associated with the demethylation process, namely one equivalent of formaldehyde and the monomethylated lysine residue. This N-hydrogen atom transfer process can take place on intermediate *in-15'b* (Scheme 5) or on starting reactant *in-14b*. The former process would share the limiting first step with the previously discussed hydroxymethyl route, whereas the latter would give rise to the *in-15''b* intermediate. This second route required the re-examination of the whole reaction coordinate.

Our calculations indicated that intermediate *in-15b*, in which there is a weak hydrogen bond between the N–H and Fe–O(CO)Me group, was very close in energy to *in-15'b*. From *in-15'b*, the aminium radical cation was deprotonated without any detectable transition structure to yield the corresponding iminium cation *in-16'b* by a very exergonic process (Figure 7). Therefore, this route was found to be favored with respect to the previously discussed mechanism leading to hydroxymethyl product *in-16b* (see Figure 5).

The alternative route *in-14b*→*in-15''b*→*in-16'b* depicted in Scheme 5 resulted to be even faster since reactant *in-14b* was deprotonated without any noticeable barrier to form intermediate *in-15''b*. This latter stationary point was calculated to be approximately 7 kcal mol^{−1} (relative free energies) more stable than *in-14b* at the quintet spin state. Abstraction of hydrogen H_a (Scheme 5) took place via transition structure *in-TS2''b*, for which the triplet state was calculated to be approximately 3 kcal mol^{−1} less energetic than the quintet state. This cleavage of the C–H_a bond required a crossing point denoted as *in-MECPb2* in Figure 7. This point was located at approximately 10 kcal mol^{−1} above *in-14b* and was found to be structurally very similar to *in-15'b* with a weak C–H_a...O interaction (Figure 8). Saddle point *in-TS2''b* was calculated to be quite synchronous and was associated with a Gibbs activation energy of only approximately 11 kcal mol^{−1}, since the probability of spin crossing was estimated to be close to 1 (vide supra). From this latter saddle point, the system evolves towards the iminium product *in-16'b*, for which the most stable spin state is the quintet. This transformation was achieved by means of

tion coordinate. The demethylation process within this reaction path was strongly exergonic, with a free reaction energy of approximately −50 kcal mol^{−1} (Figure 5). On the basis of these results, we concluded that this hydroxymethyl route did not differ substantially from the similar reaction path found for the trimethylated case.

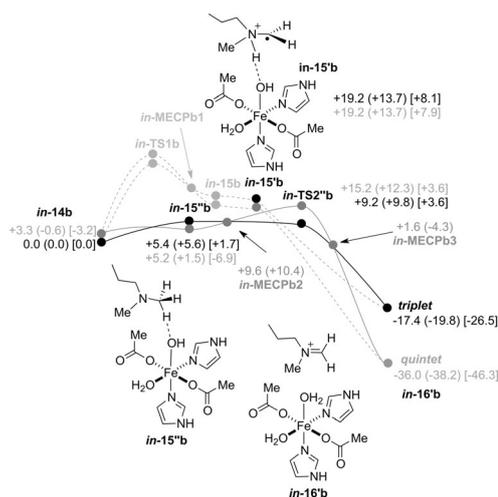


Figure 7. Reaction profiles for the transformation of *in-14b* into iminium species *in-16'b* at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$. Relative energies refer to *in-14b* at the triplet state and are given in kcal mol^{−1}. Minimum-energy crossing points *in-MECPb2* and *in-MECPb3* are also indicated. Numbers in parentheses and brackets correspond to relative energies and Gibbs energies (298 K), respectively, computed at the UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311 + G(2d,2p)&LanL2dz//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory.

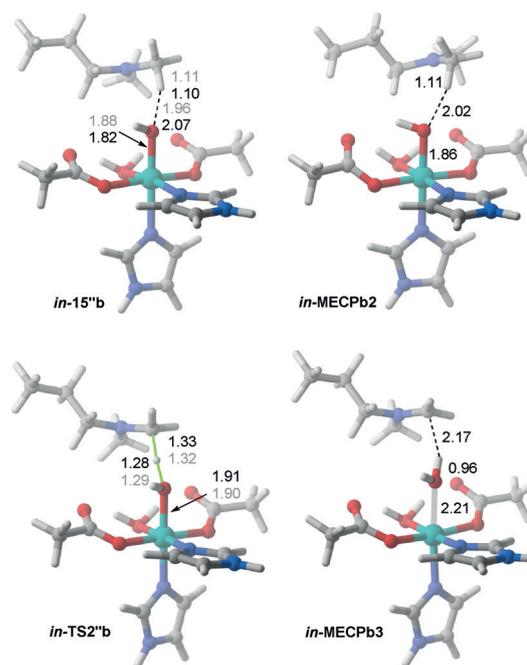


Figure 8. Fully optimized UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) geometries of intermediate *in-15'b*, minimum-energy crossing points *in-MECPb2* and *in-MECPb3*, and transition structure *in-TS2''b*. Geometric data of triplet and quintet states are represented in black and light grey, respectively. Bond distances are given in Å. Ball and stick representations of stationary points *in-15'b* and *in-TS2''b* correspond to the quintet and triplet spin states, respectively.

crossing point *in-MECPb3* (Figures 7 and 8), the chief geometric features of which were quite similar to those found for the reaction product, with a completely formed iminium cation and a water molecule loosely bound to the metallic center.

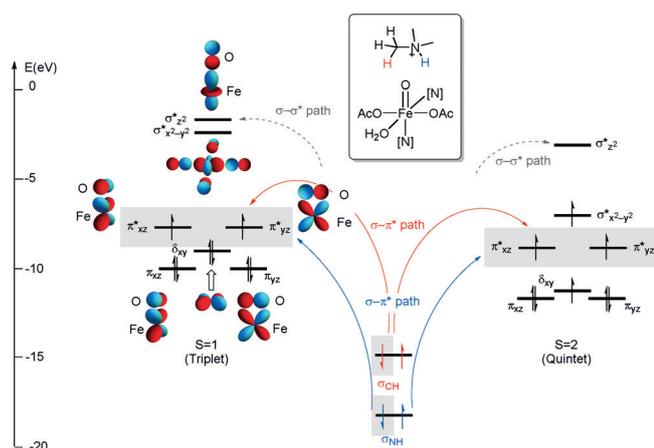


Figure 9. Orbital interactions between localized C–H and N–H bonds and the Fe^{IV}=O moiety of JMJD enzymes at triplet and quintet states.

These results can be rationalized considering the orbital interactions between the molecular orbitals associated with the Fe^{IV}=O group and the localized N–H and C–H bonds (Figure 9). At both the triplet ($S=1$) and quintet ($S=2$) electronic states, the oxygen atom bound to the metallic center can interact with one electron of the X–H bond ($X=C,N$) through the nearly degenerate singly occupied π_{xz}^*/π_{yz}^* molecular orbitals (MOs). In the quintet state, the δ_{xy} MO is singly occupied at the expenses of the $\sigma_{x^2-y^2}^*$ MO, which is strongly stabilized with respect to the triplet state. However, the energies of the MOs π_{xz}^*/π_{yz}^* and $\sigma_{z^2}^*$ comprising the Fe=O system are very similar at both spin states. This is in agreement with the similar geometries found for the transition structures and intermediates associated with the formation of the O–H bond when $S=1$ and $S=2$. In addition, the $\sigma_{z^2}^*$ MO lies at higher energy at triplet and quintet states and it cannot interact with the C–H or N–H bonds. This excludes the $\sigma^* \rightarrow \sigma^*$ reaction path and results in angular H–O–Fe geometries for the transition structures and reaction intermediates associated with the first step of the reaction through the $\sigma \rightarrow \pi^*$ path, as shown in Figure 9. It is also noteworthy that the thermodynamically more stable N–H bond is kinetically more reactive than the C–H bond, as demonstrated by the negligible activation energy associated with the cleavage of the N–H bond in reactive complex *in-14b*.

On the basis of these results, we concluded that demethylation of ϵ -N-dimethylated lysine residues is intrinsically preferred through N-hydrogen atom transfer followed by C-hydrogen atom transfer to yield the N-methyl iminium cation. This latter *in-16'b* intermediate can be readily hydrolyzed to formaldehyde and the corresponding N-monomethylated residue.

Monomethylated substrates

In ϵ -N-monomethylated lysine residues, the two N–H bonds of the aminium moiety of **14c** can generate hydrogen bonds with the Fe=O and carboxylate groups, thus yielding conformationally restricted structures, in which at least one N–H group is in an inward relationship with respect to the Fe^{IV}=O

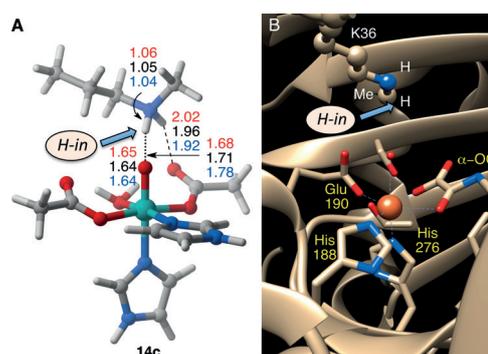


Figure 10. A) Fully optimized UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) geometry of complex **14c** at the triplet state. Bond distances (in Å) at the quintet (blue) and singlet (red) states are also given. B) X-ray diffraction analysis data of the active site of human histone demethylase JMJD2A (pdb code: 2pxj) with monomethylated lysine K36 of histone H3, complexed with α -oxallyl glycine (α -oxoglutarate surrogate, denoted as α -OG).

group (Figure 10A). This inward disposition is also appreciated in the X-ray diffraction analysis of the complex between JMJD2A and the monomethylated Lys 36 residue of histone 3 (H3K36Me1, Figure 10B).^[54]

Also in this case, **14c** was calculated to be slightly more stable at the quintet state in terms of free energy (Figure 11). From **14c**, the first transition structure **TS1c** (Figure 11) led to intermediate cation radical **15c**. The activation energy for this step was calculated to be of approximately 25 and 26 kcal mol⁻¹ at quintet and triplet states, respectively. Therefore, we concluded that, as far as this particular mechanism is concerned, this step is only slightly selective with respect to the degree of methylation of the starting lysine residue, since in the trimethylated case a Gibbs activation energy of approxi-

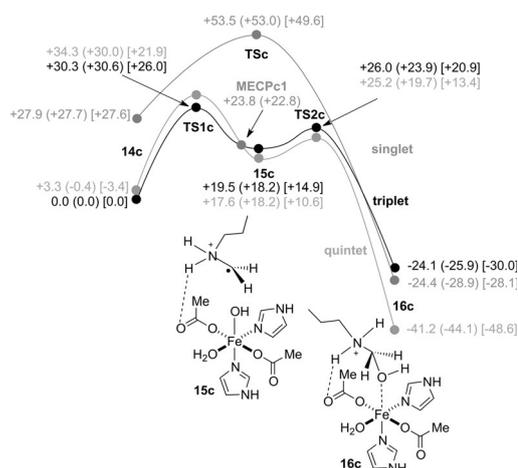


Figure 11. Reaction profiles for the transformation of monomethylated complex **14c** into **16c** at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon=78.39$. Relative energies refer to **14c** at the triplet state and are given in kcal mol⁻¹. Minimum-energy crossing point **MECPC1** is also indicated. Numbers in parentheses and brackets correspond to relative energies and Gibbs energies (298 K), respectively, computed at the UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311 + G(2d,2p)&LanL2dz/UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory.

mately 22.5 kcal mol⁻¹ was obtained, whereas for both dimethylated and monomethylated substrates, the corresponding energy barriers were calculated to be 25–26 kcal mol⁻¹.

From **15c**, formation of the corresponding hydroxymethylaminium intermediate **16c** was observed, with a very low free energy barrier of approximately 2.8 kcal mol⁻¹ at the quintet state (Figure 11). The saddle point that connects **15c** and **16c** is **TS2c** (Figure 12), the geometric features of which resulted to be quite similar to those found for **TS2a**, **out-TS2b**, and **in-TS2b**, with the exception of the hydrogen bond between one N–H group and one carboxy group coordinated to the metallic center. In summary, this particular mechanism is quite similar to the analogue routes computed for the tri- and dimethylated substrates.

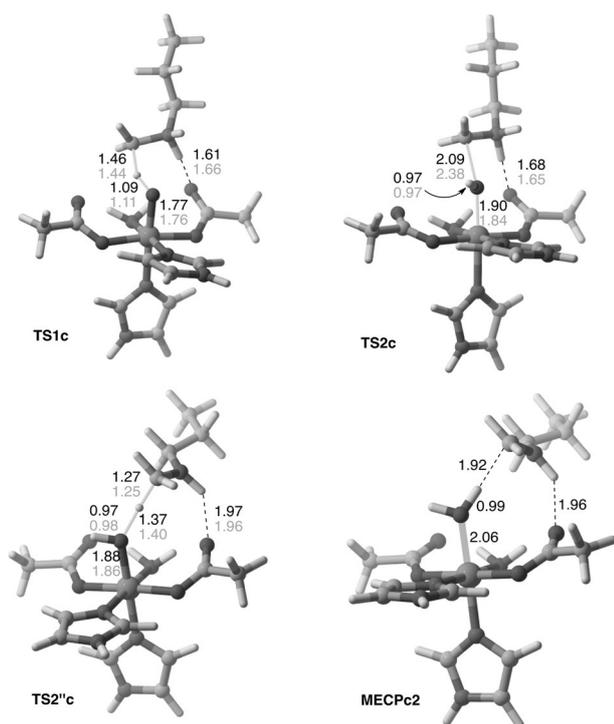


Figure 12. Fully optimized UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) geometries of transition structures **TS1c**, **TS2c**, and **TS2''c** and minimum-energy crossing point **MECPC2**. Geometric data of triplet and quintet states are represented in black and light grey, respectively. Bond distances are given in Å. Ball and stick representations of stationary points correspond to the triplet spin state, with the exception of **TS2c**, which corresponds to the quintet spin state.

We also analyzed the alternative N–H hydrogen-atom transfer reaction paths found for the dimethylated case. These reaction profiles are gathered in Figure 13. As in the previous case (see Scheme 5), the hydrogen-atom transfer route via intermediate **15c** leads to intermediate **15'c** which is almost isoenergetic with respect to **15c** (Figure 13). However, the hydrogen-atom transfer of the N–H moiety leads, without any noticeable barrier, to intermediate **15''c**, which was found to be approximately 3 kcal mol⁻¹ lower in free energy (quintet state) than intermediate **15'c**, associated with the C–H hydrogen atom transfer path. From **15''c** iminium intermediate **16'c** was

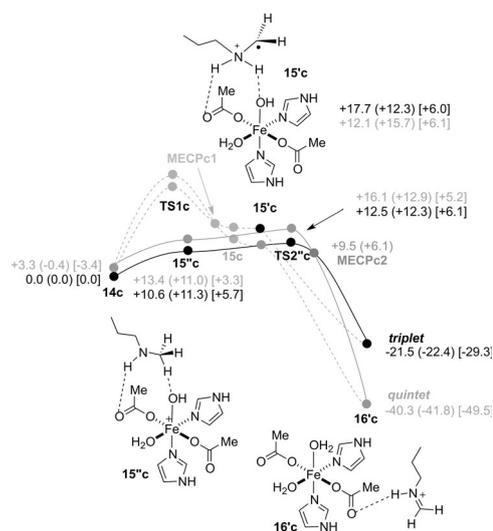


Figure 13. Reaction profiles for the transformation of **14c** into iminium species **16'c** at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$. Relative energies refer to **14c** at the triplet state and are given in kcal mol⁻¹. Minimum-energy crossing point **MECPC2** is also indicated. Numbers in parentheses and brackets correspond to relative energies and Gibbs energies (298 K), respectively, computed at the UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311 + G(2d,2p)&LanL2dz//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory.

predicted to occur via transition structure **TS2''c** (Figure 12). The chief features of this latter saddle point were found to be quite similar to those found for **in-TS2''b** (Figure 8), except the hydrogen bond between the N–H moiety and one carboxy group. The most stable spin state of **TS2''c** was the quintet although the triplet was found to be only 0.9 kcal mol⁻¹ higher in free energy, thus resulting in an almost degenerate quintet–triplet reaction path. We also located a minimum-energy crossing point **MECPC2** that led to iminium product **16'c** in its most stable quintet state (Figure 12). This latter point includes the just-formed iminium moiety and a water molecule loosely bound to the metallic center, together with the hydrogen bond between the N–H and carboxy groups.

From these results, we concluded that the N–H hydrogen-atom transfer route is the intrinsically preferred one also in the monomethylated case, since it takes place without any measurable energy barrier. Therefore, if other steric or binding factors are not considered, the intrinsically preferred demethylation mechanism is associated with the formation of an iminium intermediate that can be easily hydrolyzed inside or outside the catalytic pocket of the enzyme. As a consequence, the selectivity of enzymes like JMJD2A for the demethylation of trimethylated substrates must stem from other factors such as the entropic equivalence of the three methyl groups and hydrogen bonding.^[55]

An analysis of the electrostatic potential of JMJD2A (Figure 14) shows a highly polar environment in the cavity around the active site (Figure 15 A). In the case of the dimethylated residue shown in Figure 14, there are several residues that can interact with the N–H group of a dimethylated or monomethylated lysine residues of H3. Among these residues, Couture et al.^[52] and Chen et al.^[54] have highlighted Ser-288

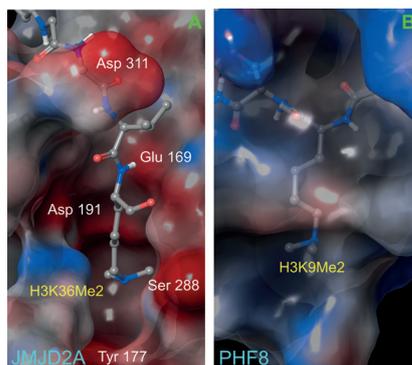


Figure 14. Electrostatic surfaces of the cavities associated with the binding of H3K36Me2 with JMJD2A (A, pdb code 2q8d) and H3K9Me2 with PHF8 (B, pdb code 3k3n). Negative and positive charges are represented in red and blue, respectively.

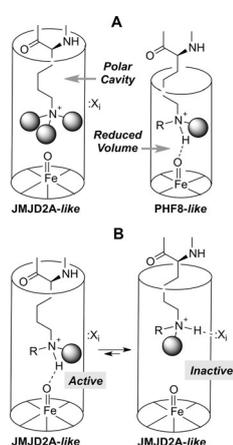


Figure 15. A) Schematic representation of the size and polarity of trimethyl selective (left) and di- and monomethyl selective histone demethylases (right). B) Schematic representation of the active and inactive complexes of dimethylated ($R=Me$) and monomethylated ($R=H$) substrates in a polar cavity similar to that found in trimethyl selective histone demethylases.

cludes the entrance of trimethylated substrates (Figure 15A). In addition, the residues that form this cavity are hydrophobic,^[56] as can be appreciated in Figure 14. Thus, the NH bonds of di- and trimethylated lysine residues are not sequestered by hydrogen-bond acceptors and can react efficiently the active site and proceed through the NH-first mechanism.

Conclusion

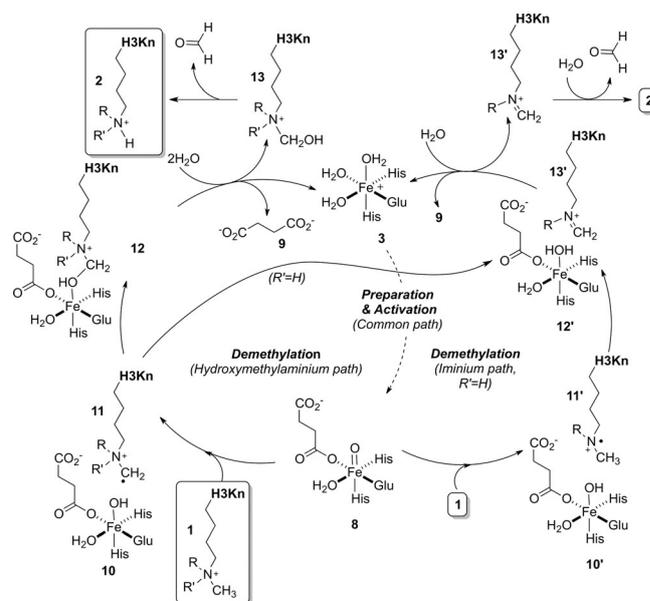
In this work we have performed a systematic search of the possible reaction mechanisms associated with the demethylation of lysine residues catalyzed by histone demethylases con-

and Tyr-177. These oxygen atoms can form hydrogen bonds with the NH group of the di- or monomethylated substrate thus promoting inactive complexes that cannot react with the $Fe=O$ group of the activated enzyme, as it is represented in Figure 15A. Therefore, our intrinsically formed NH-first model cannot proceed in the case of monomethylated lysine residues and it is hampered when dimethylated residues are present. This interpretation is compatible with the observed selectivity $Me_3 > Me_2 \gg Me$ in demethylation of histones catalyzed by enzymes such as JMJD2A.

In the case of histone demethylases such as PHF8 that are selective for dimethylated and monomethylated lysine residues, a much lower cavity volume of the active chamber is observed (169 \AA^3 for PHF8, whereas the cavity volume corresponding to JMJD2A is 722 \AA^3).^[56] Therefore, the narrower cavity around the active site pre-

cludes the entrance of trimethylated substrates (Figure 15A). In addition, the residues that form this cavity are hydrophobic,^[56] as can be appreciated in Figure 14. Thus, the NH bonds of di- and trimethylated lysine residues are not sequestered by hydrogen-bond acceptors and can react efficiently the active site and proceed through the NH-first mechanism.

Our results indicate that after completion of the preparation and activation steps of the catalytic cycle ($3 \rightarrow 8$ transformation, see Scheme 3) two alternative demethylation mechanisms can operate, as it is indicated in Scheme 6. The hydroxymethyl-



Scheme 6. Possible demethylation mechanisms associated with Jumonji-C domain-containing histone demethylases.

aminium path occurs by homolytic bond cleavage of the C–H bond of one methyl group of substrate **1** through interaction with the $Fe^{IV}=O$ moiety present in activated intermediate **8**. In the case of trimethylated substrates, radical cation **11** recombines with intermediate **10** to yield the loosely bound intermediate **12** from which the hydroxymethylaminium intermediate **13** is released. This latter intermediate can be readily hydrolyzed to yield the demethylated product **2**.

When a dimethylated substrate reacts with **8**, intermediate system **10** + **11** can suffer the abstraction of the proton bond to the nitrogen atom by the $Fe-OH$ group thus yielding iminium intermediate **13'** and aqua complex **12'**. Iminium cation **13'** is released from the catalytic site and hydrolyzed to yield the demethylated product **2**. The hydroxymethylaminium path is the only option for trimethylated substrates **1**, whereas the dimethylated lysine residues can enter the iminium path shown in Scheme 6.

This latter path can be followed by both dimethylated and monomethylated substrates and leads initially to N-deprotonated cation radical **11'**, the homolytic cleavage of which of the C–H bond gives rise to iminium cation **13'**. When possible, this latter mechanism is the intrinsically preferred one, since cleav-

age of the C–H bond to yield radical cation complex **10** + **11** has an activation energy of approximately 22 kcal mol⁻¹ larger than that associated with the same homolytic cleavage from complex **10'** + **11'**. Therefore, the demethylation part of the catalytic cycle gathered in Scheme 3 must be expanded to include the two alternative pathways illustrated in Scheme 6.

Finally, in agreement with experimental observations,^[52,54,56] our results point to an origin of the selectivity of these enzymes that involves not only the active site but also the polarity and volume of the cavity above it. Thus, monomethyl selective enzymes possess narrower and hydrophobic cavities (that can permit the entrance of dimethylated lysine residues), whereas trimethyl selective demethylases have larger cavities with many polar groups. This generates a “polar hindrance” that does not permit the access of the N–H group of di- and monomethylated substrates to the Fe=O highly reactive site. Further QM/MM studies would determine which is the operating demethylation mechanism in each JMJDn enzyme when acting on HnKmMe2 and HnKmMe1 residues.

Acknowledgements

Financial support was provided by the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) of Spain and FEDER (projects CTQ2013-45415-P and Red de Excelencia Consolider CTQ2014-51912-REDC), the UPV/EHU (UFI11/22 QOSYC), and the Basque Government (GV/EJ, grant IT-324-07). The authors thank the SGI/IZO-SGIker UPV/EHU and the DIPC for generous allocation of computational and analytical resources. We thank Prof. J.N. Harvey (Quantum and Physical Chemistry Division of the Chemistry Department, KU Leuven, Belgium) for making a copy of the MECF program available to us.

Keywords: chemical biology · computational chemistry · epigenetics · histone demethylases · spin crossover

- [1] M. M. Müller, T. W. Muir, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2296–2349.
- [2] K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond, *Nature* **1997**, *389*, 251–260.
- [3] a) J. Bednar, R. A. Horowitz, S. A. Grigoryev, L. M. Carruthers, J. C. Hansen, A. J. Koster, C. L. Woodcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 14173–14178; b) T. Schalch, S. Duda, D. F. Sargent, T. J. Richmond, *Nature* **2005**, *436*, 138–141.
- [4] a) S. I. S. Grewal, S. C. Elgin, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2002**, *12*, 178–187; b) B. V. van Steensel, *Embo J.* **2011**, *30*, 1885–1895.
- [5] L. Simó-Riudalbas, M. Esteller, *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 2716–2732.
- [6] E. L. Greer, Y. Shi, *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 343–357.
- [7] a) J. C. Rice, S. D. Briggs, B. Ueberheide, C. M. Barber, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, Y. Shinkai, C. D. Allis, *Mol. Cell* **2003**, *12*, 1591–1598; b) J. Kim, J. Daniel, A. Espejo, A. Lake, M. Krishna, L. Xia, Y. Zhang, M. T. Bedford, *Embo Rep.* **2006**, *7*, 397–403.
- [8] a) M. Jung in *Epigenetic Targets in Drug Discovery*, (Eds.: W. Sippl, M. Jung), Wiley-VCH, Weinheim, **2009**, pp. 251–268; b) A. Spannhoff, A. T. Hauser, R. Heinke, W. Sippl, M. Jung, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1568–1582.
- [9] a) J. W. Højfeldt, K. Agger, K. Helin, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2013**, *12*, 917–930; b) R. P. Clausen, M. T. Pedersen, K. Helin, in *Epigenetic Targets in Drug Discovery*, (Eds.: W. Sippl, M. Jung), Wiley-VCH, Weinheim, **2009**, pp. 269–290.
- [10] F. Forneris, C. Binda, M. A. Vanoni, A. Mattevi, E. Battaglioli, *Febs Lett.* **2005**, *579*, 2203–2207.
- [11] a) S. C. Treweek, P. J. McLaughlin, R. C. Allshire, *Embo Rep.* **2005**, *6*, 315–320; b) Y. Tsukada, J. Fang, H. Erdjument-Bromage, M. E. Warren, C. H. Borchers, P. Tempst, Y. Zhang, *Nature* **2005**, *439*, 811–816.
- [12] a) T. Jenuwein, C. D. Allis, *Science* **2001**, *293*, 1074–1080; b) B. D. Strahl, C. D. Allis, *Nature* **2000**, *403*, 41–45; c) W. Fischle, D. Schwarzer, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 689–705.
- [13] a) B. C. Smith, J. M. Denu, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2009**, *1789*, 45–57; b) N. A. Vellore, R. Baron, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 484–494; c) W. A. Cortopassi, K. Kumar, F. Duarte, A. S. Pimentel, R. S. Paton, *J. Mol. Graphics Modell.* **2016**, *67*, 69–84.
- [14] a) T. Suzuki, N. Miyata, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8236–8250; b) T. Maes, E. Carceller, J. Salas, A. Ortega, C. Buesa, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2015**, *23*, 52–60; c) C. C. Thinnis, K. S. England, A. Kawamura, R. Chowdhury, C. J. Schofield, R. J. Hopkinson, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2014**, *1839*, 1416–1432; d) T. McAllister, K. S. England, R. J. Hopkinson, P. E. Brennan, A. Kawamura, C. J. Schofield, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 1308–1329.
- [15] S. S. Ng, K. L. Kavanagh, M. A. McDonough, D. Butler, E. S. Pilka, B. M. R. Lienard, J. E. Bray, P. Savitsky, O. Gileadi, F. von Delft, N. R. Rose, J. Offer, J. C. Scheinost, T. Borowski, M. Sundstrom, C. J. Schofield, U. Oppermann, *Nature* **2007**, *448*, 87–91.
- [16] S. P. de Visser, D. Kumar, *Iron-Containing Enzymes Versatile Catalysis of Hydroxylation Reactions In Nature*, RSC Publishing, Cambridge, **2011**.
- [17] W. A. Cortopassi, R. Simion, C. E. Honsby, T. C. C. Franca, R. S. Paton, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 18983–18992.
- [18] a) T. Borowski, A. Bassan, P. E. M. Siegbahn, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1031–1041; b) I. A. Topol, A. V. Nemukhin, K. Salnikow, R. E. Cachau, Y. G. Abashkin, K. S. Kasprzak, S. K. Burt, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 4223–4228.
- [19] L. M. Mirica, K. P. McCusker, J. W. Munos, H.-W. Liu, J. P. Klinman, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8122–8123.
- [20] S. P. de Visser in *Experimental and Computational Studies on the Catalytic Mechanism of Non-Heme Iron Dioxygenases. In Iron-Containing Enzymes-Versatile Catalysts of Hydroxylation Reactions in Nature* (Eds.: S. P. de Visser, D. Kumar), RSC Publishing, Cambridge, **2011**, pp. 1–41.
- [21] a) S. P. de Visser, *Chem. Commun.* **2007**, 171–173; b) R. M. Cicchillo, H. Zhang, J. A. Blodgett, J. T. Witteck, G. Li, S. K. Nair, W. A. van der Donk, W. W. Metcalf, *Nature* **2009**, *459*, 871–875.
- [22] E. Godfrey, C. S. Porro, S. P. de Visser, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 2464–2468.
- [23] a) B. Meunier, S. P. de Visser, S. Shaik, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947–3980; b) K.-B. Cho, H. Hirao, S. Shaik, W. Nam, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1197–1210.
- [24] a) Y. Wang, D. Kumar, C. Yang, K. Han, S. Shaik, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7700–7710; b) C. Li, W. Wu, K. B. Cho, S. Shaik, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 8492–8503; c) P. Rydberg, U. Ryde, L. Olsen, *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 1369–1377.
- [25] a) L. Ji, G. Schueuermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 744–748; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 772–776; b) S. T. Seger, P. Rydberg, L. Olsen, *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28*, 597–603; c) P. Rydberg, L. Olsen, *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 3399–3404.
- [26] a) C. Yi, C. G. Yang, C. He, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 519–529; b) S. C. Treweek, T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, B. Sedgwick, *Nature* **2002**, *419*, 174–178; c) P. O. Falnes, R. F. Johansen, E. Seeberg, *Nature* **2002**, *419*, 178–182.
- [27] a) D. Schröder, S. Shaik, H. Schwarz, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 139–145; b) *Spin States in Biochemistry and Inorganic Chemistry-Influence on Structure and Reactivity*, (Eds.: M. Swart, M. Costas), Wiley, Chichester, **2016**.
- [28] P. L. Holland, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1696–1702.
- [29] For related studies carried out by our group on the design and chemical synthesis of inhibitors of cancer metastasis and epigenetic enzymes, see: a) A. Zubia, L. Mendoza, S. Vivanco, E. Aldaba, T. Carrascal, B. Lecea, A. Arrieta, T. Zimmerman, F. Vidal-Vanaclocha, F. P. Cossío, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2903–2907; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2963–2967; b) E. San Sebastián, J. M. Mercero, R. H. Stote, A. Dejaegere, F. P. Cossío, X. López, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3554–3563; c) A. Zubia, S. Roperio, D. Otaegui, E. Ballestar, M. F. Fraga, M. Boix-Chornet, M. Berdasco, A. Martínez, L. Coll-Mulet, J. Gil, F. P. Cossío, M. Esteller, *Oncogene* **2009**, *28*, 1477–1484; d) R. Zangi, A. Arrieta, F. P. Cossío, *J. Mol. Biol.* **2010**, *400*, 632–644; e) M. Aginagalde, V. Gómez-Vallejo, Y. Vara, F. P. Cossío, J. Llop, *Appl. Radiat. Isot.* **2012**, *70*, 2552–2557; f) E. San Sebastián, T. Zim-

- merman, A. Zubia, Y. Vara, E. Martin, F. Sirockin, A. Dejaegere, R. H. Stote, X. López, X. Pantoja-Uceda, M. Varcárcel, L. Mendoza, F. Vidal-Vanaclocha, F. P. Cossío, F. J. Blanco, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 735–747; g) F. P. Cossío, Y. I. Vara, C. Masdeu, M. R. Alcalá, S. Villa-fruela, D. Otaegui, E. Aldaba, E. San Sebastián, A. Zubia (Universidad del País Vasco; Quimatryx, S.L.), WO 2014/180984.
- [30] R. G. Parr, W. Yang, *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford, New York **1989**.
- [31] M.-S. Liao, J. D. Watts, M. J. Huang, *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1577–1592.
- [32] M.-S. Liao, M. J. Huang, J. D. Watts, *Mol. Phys.* **2011**, *109*, 2035–2048.
- [33] T. Wondimagnegn, A. Rauk, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 10301–10310.
- [34] T. Wondimagnegn, A. Rauk, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 569–579.
- [35] M.-S. Liao, M. J. Huang, J. D. Watts, *J. Mol. Model.* **2013**, *19*, 3307–3323.
- [36] H. Chen, W. Lai, S. Shaik, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 1533–1540.
- [37] a) A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098–3100; b) W. Kohn, A. D. Becke, R. G. Parr, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 12974–12980; c) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- [38] a) E. I. Solomon, A. Decker, N. Lehnert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3589–3594; b) T. Borowski, P. E. M. Siegbahn, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12941–12953; c) M. S. Liao, M. J. Huang, J. D. Watts, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 9554–9569; d) S. Ye, F. Neese, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 1228–1233; e) A. S. Faponle, M. G. Quesne, C. V. Sastri, F. Banse, S. P. de Visser, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 1221–1236; f) V. Postils, A. Company, M. Solà, M. Costas, J. M. Luis, *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 8223–8236; g) D. Sahoo, M. G. Quesne, S. P. de Visser, S. P. Rath, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4796–4800; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 4878–4882; h) B. Wang, Z. Cao, D. A. Sharon, S. Shaik, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 7077–7090.
- [39] Gaussian 09, Revision E.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Ciołowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
- [40] J. W. Mclver Jr., A. Komornicki, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 2625–2633.
- [41] P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 299–310.
- [42] K. Fukui, *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 363–368.
- [43] a) H. P. Hratchian, H. B. Schlegel, *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 9918–9924; b) H. P. Hratchian, H. B. J. Schlegel, *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, *1*, 61–69.
- [44] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg, *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104.
- [45] a) E. R. Johnson, A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 174104; b) S. Grimme, S. Ehrlich, L. Goerigk, *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 1456–1465.
- [46] a) M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, V. Barone, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 669–681; b) J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999–3094.
- [47] a) C. P. Kelly, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16066–16081; b) C. P. Kelly, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 408–422.
- [48] J. N. Harvey, M. Aschi, H. Schwarz, W. Koch, *Theor. Chem. Acc.* **1998**, *99*, 95–99.
- [49] a) A. I. Chichinin, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 6018–6018; b) C. Wittig, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 8428–8430; c) J. S. Hess, D. J. Doren, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 8206–8210; d) M. Riad Manaa, D. R. Yarkony, *J. Chem. Phys.* **1991**, *95*, 1808–1816.
- [50] a) S. G. Chiodo, *MolSOC*, versión 0.1, **2012**; b) S. G. Chiodo, M. Leopoldini, *Comp. Phys. Commun.* **2014**, *185*, 676–683; c) A. D. Quartarolo, S. G. Chiodo, N. Russo, *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 3176–3189; d) A. D. Quartarolo, S. G. Chiodo, N. Russo, *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 1091–1100.
- [51] G. Breit, *Phys. Rev.* **1932**, *39*, 616–624.
- [52] J.-F. Couture, E. Collazo, P. Ortiz-Tello, J. S. Brunzelle, R. C. Trievel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 689–695.
- [53] J. N. Harvey, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 331–343.
- [54] Z. Chen, J. Zang, J. Kappler, X. Hong, F. Crawford, Q. Wang, F. Lan, C. Jiang, J. Whetstone, S. Dai, K. Hansen, Y. Shi, G. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10818–10823.
- [55] O. Ulucan, O. Keskin, B. Erman, A. Gursoy, *PLoS One* **2011**, *6*, e24664.
- [56] L. Yu, Y. Wang, S. Huang, J. Wang, Z. Deng, Q. Zhang, W. Wu, X. Zhang, Z. Liu, W. Gong, Z. Chen, *Cell. Res.* **2010**, *20*, 166–173.

Manuscript received: September 6, 2016

Accepted Article published: October 11, 2016

Final Article published: November 23, 2016

Density Functional Theory Study on the Demethylation Reaction between Methylamine, Dimethylamine, Trimethylamine, and Tamoxifen Catalyzed by a Fe(IV)–Oxo Porphyrin Complex

Published as part of *The Journal of Physical Chemistry virtual special issue “Manuel Yáñez and Otilia Mó Festschrift”*.

Nerea Alberro,[†] Miquel Torrent-Sucarrat,^{*,†,‡,§} Ana Arrieta,[†] Gloria Rubiales,[†] and Fernando P. Cossío^{*,†,‡,§}

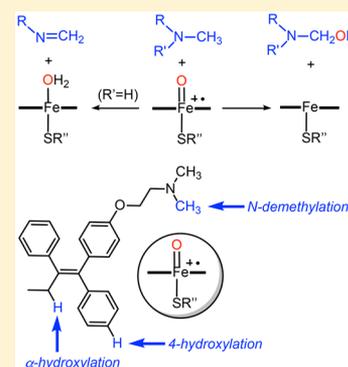
[†]Department of Organic Chemistry I, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Centro de Innovación en Química Avanzada (ORFEO-CINQA), Manuel Lardizabal Ibilbidea 3, 20018 San Sebastián/Donostia, Spain

[‡]Donostia International Physics Center (DIPC), Manuel Lardizabal Ibilbidea 4, 20018 San Sebastián/Donostia, Spain

[§]Ikerbasque, Basque Foundation for Science, María Díaz de Haro 3, 6°, 48013 Bilbao, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: In this work, we studied computationally the N-demethylation reaction of methylamine, dimethylamine, and trimethylamine as archetypal examples of primary, secondary, and tertiary amines catalyzed by high-field low-spin Fe-containing enzymes such as cytochromes P450. Using DFT calculations, we found that the expected C–H hydroxylation process was achieved for trimethylamine. When dimethylamine and methylamine were studied, two different reaction mechanisms (C–H hydroxylation and a double hydrogen atom transfer) were computed to be energetically accessible and both are equally preferred. Both processes led to the formation of formaldehyde and the N-demethylated substrate. Finally, as an illustrative example, the relative contribution of the three primary oxidation routes of tamoxifen was rationalized through energetic barriers obtained from density functional calculations and docking experiments involving CYP3A4 and CYP2D6 isoforms. We found that the N-demethylation process was the intrinsically favored one, whereas other oxidation reactions required most likely preorganization imposed by the residues close to the active sites.



1. INTRODUCTION

Cytochromes P450 (CYP450s)^{1–4} form an enzyme family of heme-containing monooxygenases, which plays a crucial role in the degradation and elimination of endogenous and exogenous substrates. For instance, in the human liver, the CYP450s catalyze the biodegradation of xenobiotic molecules by oxidizing them to more soluble and more easily excretable metabolites. The CYP450s catalyze many types of reactions, e.g., C–H hydroxylation, C=C epoxidation, desaturation, and N- and O-dealkylation.^{5–11}

All CYP450s present a heme group with a central iron atom that is connected to the protein through a cysteine thiolate axial ligand. These systems can covalently bind an oxygen molecule to the iron center and break the O–O double bond. One of the oxygen atoms is reduced to water, while the second one is used to generate an iron(IV)–oxo heme cation radical species, called compound I (Cpd I).^{12–14} It presents two close-lying electronic spin states, a doublet and a quartet, which can contribute in a different way depending on the reaction mechanism, i.e., two-state reactivity with high-spin and low-spin components. The short lifetime character of the Cpd I indicates that the determination of its reaction mechanisms and rates are difficult to obtain experimentally. Within this context, computational

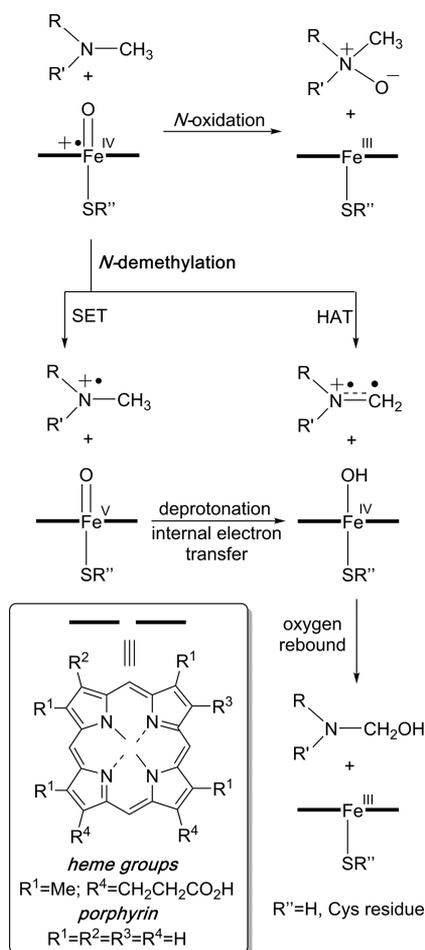
chemistry has become a powerful tool to measure and understand the Cpd I reactivity.^{8,9,15–23}

The CYP450s oxidation process of amines may proceed via N-dealkylation and/or N-oxygenation processes, for which several mechanistic hypotheses have been proposed (Scheme 1).^{5,9,24–36} For instance, the N-dealkylation process can take place via hydrogen atom transfer (HAT) followed by oxygen rebound to form the corresponding carbinolamine, which decomposes to formaldehyde and the N-dealkylated amine. Another alternative reaction consists of a single electron transfer (SET), which generates an aminium cation radical that after a deprotonation and an internal electron transfer can also lead to the formation of the carbinolamine intermediate. Both hypotheses have been analyzed by theoretical and experimental results,⁹ although the HAT mechanism is the most accepted one. Moreover, it is worth noting that the measured and computed intramolecular kinetic isotope effects (KIEs) present different values for the high-spin and low-spin processes and can be used as a probe of the reacting state of Cpd I.^{37,38}

Received: October 27, 2017

Revised: January 9, 2018

Published: January 11, 2018

Scheme 1. Proposed Reaction Pathways for N-Oxidation and N-Dealkylation (Demethylation) of Amines^a

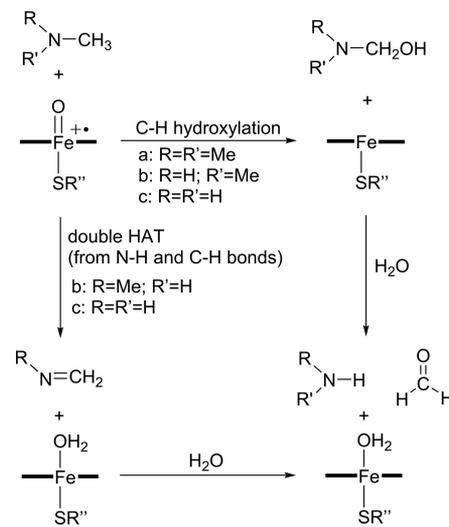
^aThe different heme groups and cysteine residues present in cytochromes, as well as the porphyrin and bisulfide computational analogs, are indicated. SET: single electron transfer. HAT: hydrogen atom transfer.

Goldberg and co-workers³⁹ reported the first direct examination of the rebound hydroxylation. They use a corrole ligand, which presents a trianionic donor set without the need for an axial donor that can stabilize the key $[\text{Fe}(\text{OH})]^{3+}$ state. Kinetic measurements provided a mechanistic assessment of the radical hydroxylation step, leading to a model for the rebound process that included both concerted and stepwise pathways.

In a recent work,⁴⁰ we performed a computational study on the demethylation of lysine residues catalyzed by histone demethylases containing Jumonji-C sites. The obtained results concluded that the intrinsically preferred mechanism is different depending upon the N-methylation degree of the lysine residue. For trimethylated residues, the expected rebound mechanism was found;¹⁵ i.e., the oxygen of the ferryl group ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) abstracts a hydrogen of the methyl group and rebounds to the carbon of the substrate. This mechanism was also observed in dimethylated residues when the methyl group is oriented toward the ferryl group of the catalytic site. In contrast, a new reaction mechanism appeared when a N-H group of the substrate is close to the $\text{Fe}=\text{O}$ group, which resulted to be the intrinsically preferred one. It consists of a N-hydrogen atom transfer followed by C-hydrogen atom transfer to yield the N-methyliminium cation, which can be hydrolyzed to form formaldehyde and the corresponding N-demethylated product. All these reaction

mechanisms occur on nearly degenerated triplet and quintet potential energy hypersurfaces (two-state reactivity) and several spin crossovers were found in both N-dimethylated and mono-methylated residues.

Within this context, the main goal of the present work is to study whether this double reactivity character depending on the methylation degree is also present in the biodegradation of amines catalyzed by CYP450s. The demethylation reaction pathways of trimethylamine, dimethylamine, and methylamine as model methylated neutral amines, Scheme 2, have been evaluated by using

Scheme 2. Proposed Reaction Pathways for N-Dealkylation Depending on the Methylation Degree of the Amine

B3LYP density functional calculations. In analogy to our previous work,⁴⁰ the methyl group oriented toward the $\text{Fe}=\text{O}$ group gives rise to the corresponding carbinolamine intermediate, which is obtained through a C-H hydroxylation process. This intermediate decomposes to formaldehyde and the N-demethylated amine. Conversely, when the N-H groups of dimethylamine and methylamine are close to the ferryl group, a double HAT process is also possible, which consists of a N-hydrogen transfer followed by a C-hydrogen transfer. This route yields the formation of the corresponding imine, which in turn can be hydrolyzed to formaldehyde and the N-demethylated product. To the best of our knowledge, the latter reaction mechanism has not been previously reported in the CYP450s literature. Additionally, the implications of these findings for the degradation processes of tamoxifen, as a prominent example of an amine containing drug, are also discussed.

2. COMPUTATIONAL METHODS

The present study models Cpd I as $\text{Fe}(\text{IV})$ -oxo porphyrin complex, in which all side chains were abbreviated to hydrogen atoms and the axial cysteine thiolate ligand to a bisulfide anion (HS^-). In previous works, this model has proved to be sufficient to mimic the environmental effects of the protein obtained from QM/MM optimized geometries.^{8,9,15}

All stationary points on the potential surface were optimized with the unrestricted three-parameter hybrid density functional UB3LYP.^{41,42} The effect of the solvent was considered through fully optimizations by using the polarization continuum model (PCM)^{43,44} and the dielectric constant of water ($\epsilon = 78.39$). The B3LYP functional has been proven a track-record in successful estimations of structures, energetic, and spectroscopic

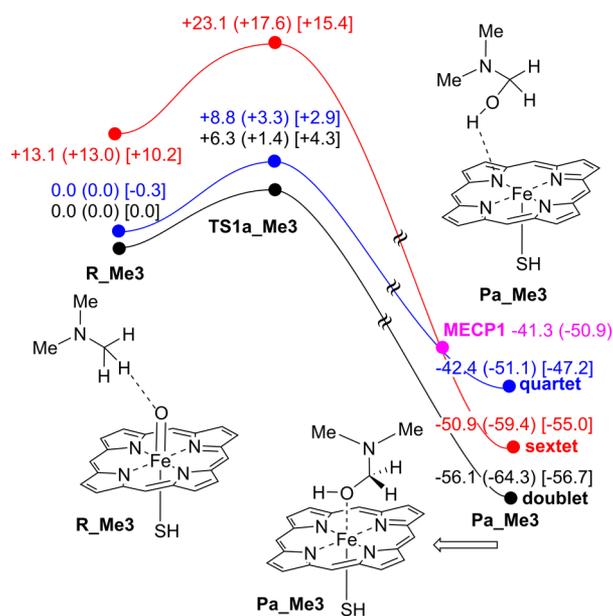


Figure 1. Potential energy landscapes of trimethylamine hydroxylation by Cpd I at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$ in doublet, quartet, and sextet states. Relative energies refer to **R_Me3** at the doublet state, and their values are given in kcal/mol. The minimum energy crossing point **MECP1** is also indicated. Numbers in parentheses and brackets correspond to relative energies and Gibbs energies (298 K), respectively, computed at the UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2dz//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory.

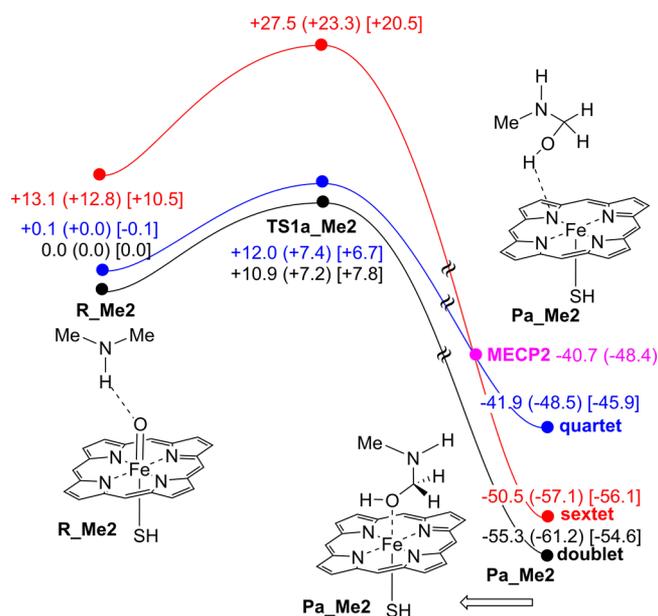


Figure 3. Potential energy landscapes of dimethylamine hydroxylation by Cpd I the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$ in doublet, quartet and sextet states. Relative energies refer to **R_Me2** at the doublet state, and their values are given in kcal/mol. Minimum energy crossing point **MECP2** is also indicated. Numbers in parentheses and brackets correspond to relative energies and Gibbs energies (298 K), respectively, computed at the UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2dz//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory.

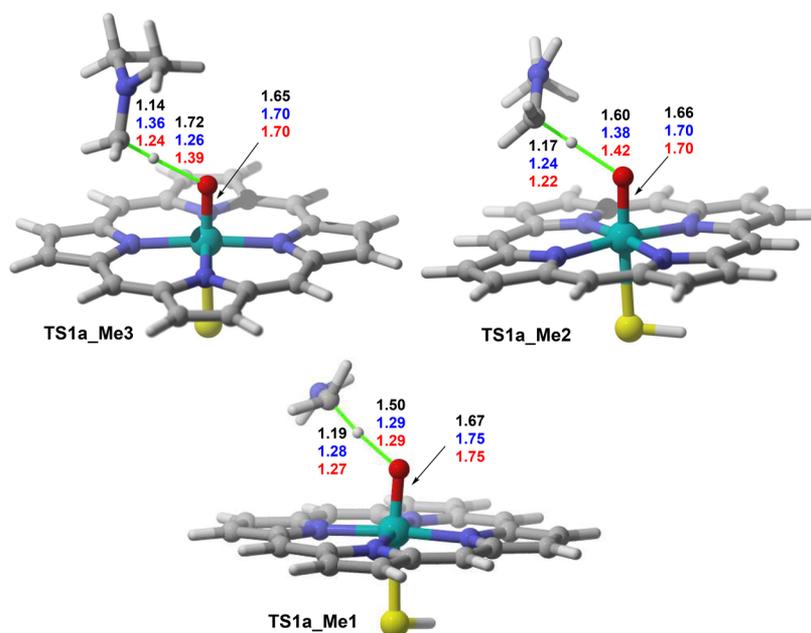


Figure 2. Fully optimized UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz geometries of transition structures **TS1a_Me3**, **TS1a_Me2**, and **TS1a_Me1**. Geometric data of doublet, quartet, and sextet spin states are represented in black, blue, and red, respectively. Ball and stick representations correspond to the doublet spin state. Bond distances are given in Å.

properties for such iron catalyzed reactions, and it has been capable of competing with other more demanding theoretical levels such as coupled cluster theory and correlated multi-reference *ab initio* methods.^{22,45–55}

All reaction pathways were studied in doublet, quartet and sextet spin states. As we will see, these spin states (mainly doublet and quartet) present very close-lying electronic states along the

potential energy landscapes, which can lead to spin crossovers. In terms of energy, the lowest point where two potential energy surfaces cross is the minimum-energy crossing point (MECP). If the MECP energy lies below (above) those of both stationary points, it can create a spin acceleration (hindrance) process.⁵⁶ The MECPs were located using the program developed by Harvey.⁵⁷ Moreover, it is necessary to consider the probability of hoping

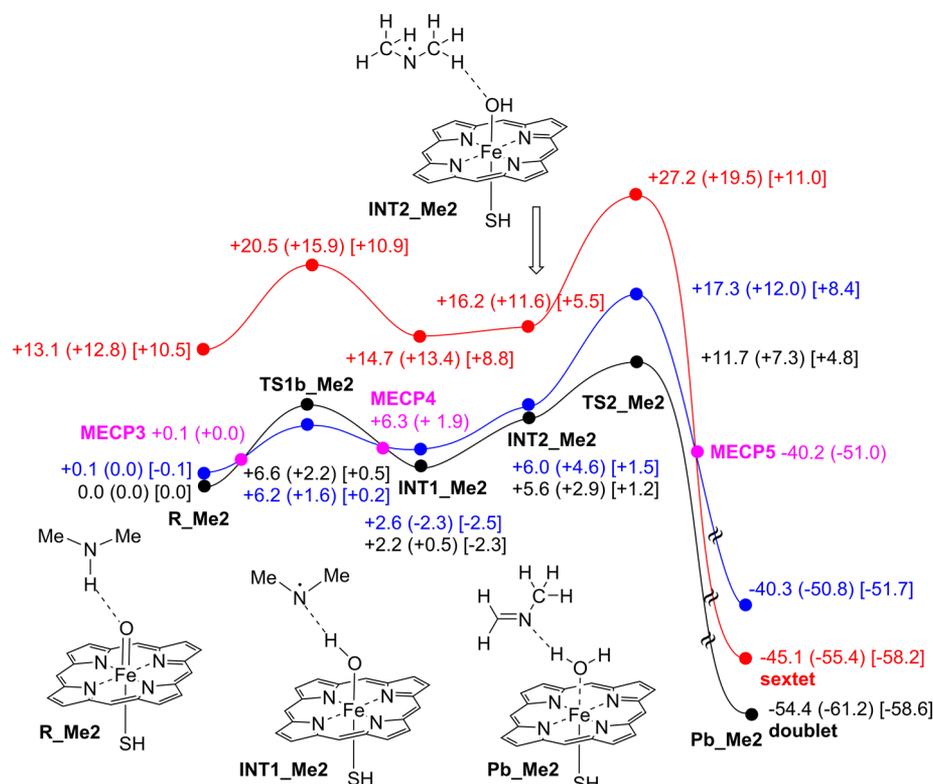


Figure 4. Potential energy landscapes of the double H-abstraction (from N–H and C–H bonds) of dimethylamine by Cpd I at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ level of theory with $\epsilon = 78.39$ in doublet, quartet, and sextet states. Relative energies refer to R_Me2 at the doublet state, and their values are given in kcal/mol. Minimum energy crossing points MECP3, MECP4, and MECP5 are also indicated. Numbers in parentheses and brackets correspond to relative energies and Gibbs energies (298 K), respectively, computed at the UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ level of theory.

from one spin state to another through a given MECP. Nevertheless, following the results of our previous work,⁴⁰ we assume that this probability of hopping is always close enough to 1.

The standard split valence 6-31G(d,p) basis set^{58,59} was employed for all atoms, except for the Fe center, for which the LanL2DZ effective core potential⁶⁰ was used. Frequency calculations were performed to characterize the stationary points (minima or transition states), as well to provide the zero-point vibrational energies and the thermodynamic contributions to the enthalpy and free energies for $T = 298$ K. Moreover, intrinsic reaction coordinate^{61,62} technique was used to verify that the transition states connect the reactants and products belonging to the reaction coordinate under study.

To obtain more reliable relative energies, single-point energies were carried at the UB3LYP(PCM)/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ level, and the dispersion effects were included using the D3-Grimme's dispersion⁶³ with Becke–Johnson damping.^{64,65} All quantum chemistry calculations in this work were carried out with the Gaussian 09 program package.⁶⁶

Docking experiments were carried out by using the Glide^{67–69} suite of programs within the Extra Precision (XP) mode.⁷⁰ The coordinates of cytochromes P450 CYP3A4 and CYP2D6 were obtained from the X-ray structures of the corresponding proteins complexed with bromoergocryptine⁷¹ (pdb code: 3UA1) and with (4aR,6R,8aS)-8a-(2,4-difluorophenyl)-6-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-4,4a,5,6,8,8a-hexahydropyrano[3,4-d][1,3]-thiazin-2-amine,⁷² (pdb code: 4XRY), respectively.

All the calculations described in this work have been performed with neutral (nonquaternized) N-methylated amines. In cytochrome-catalyzed oxidation reactions, both SET and

N-oxidation processes require a significant concentration of neutral amines. The active sites in cytochromes involve hydrophobic pockets with several acidic amino acids and carboxy groups in the periphery of the heme groups (*vide infra*), which facilitate the *in situ* formation of neutral amines before the oxidative steps. This neutral state of the amine substrates has been assumed both in experimental^{24,25,30} and in previous computational^{26–36,38} studies. In addition, the pyramidalization degree found for the tertiary amine groups in the X-ray structures of cytochromes P450 CYP3A4 bound to bromoergocryptine⁷¹ (pdb code: 3UA1) and CYP2D6 bound to thioridazine (pdb code: 4WNW) and ajmalicine⁷³ (pdb code: 4WNT) are compatible with significant concentrations of neutral tertiary amine moieties.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Trimethylamine as Substrate. The potential energy surfaces of the low- (doublet), medium- (quartet), and high-spin (sextet) states for the C–H hydroxylation of trimethylamine are gathered in Figure 1, showing a concerted rebound mechanism. Then, in only one step, the hydrogen atom of the methyl group is abstracted by the ferryl group and the oxygen of the Fe–O–H moiety rebounds to the carbon of the alkyl radical leading to the formation of dimethylaminomethanol, which in turn decomposes to formaldehyde and dimethylamine.

The reactant structure, R_Me3, forms a hydrogen-bonded complex formed between the oxygen of the ferryl group and one hydrogen of trimethylamine with a computed hydrogen-bond distance of *ca.* 2.9 Å. According to our results, the doublet and quartet potential energy surfaces were found to be almost isoenergetic and both transition structures associated with this

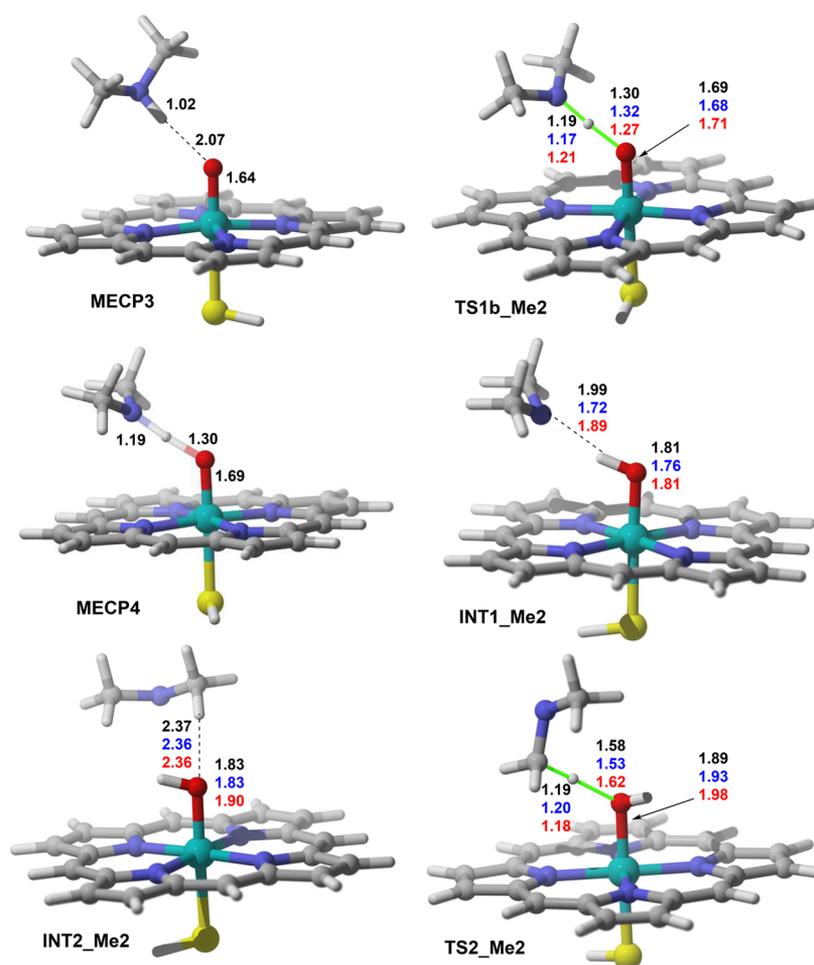


Figure 5. Fully optimized UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz geometries of transition structures **MECP3**, **TS1b_Me2**, **MECP4**, **INT1_Me2**, **INT2_Me2**, and **TS2_Me2**. Geometric data of doublet, quartet, and sextet spin states are represented in black, blue, and red, respectively. Ball and stick representations correspond to the doublet spin state, except the **TS1b_Me2** structure that corresponds to the quartet spin state. Bond distances are given in Å.

reaction show very small energetic barriers, less than 5 kcal/mol. For all reactions studied in this work, the reactant and transition state energies, **TS1a,b_MeX** ($X = 3, 2, 1$) and **TS2_MeX** ($X = 2, 1$), of the sextet spin state lie approximately 10 kcal/mol above their doublet and quartet equivalents. Only in the product structures **Pa,b_MeX** ($X = 3, 2, 1$), the high-spin state becomes more stable than the medium one. In other words, the demethylation of amines catalyzed by CYP450s is mainly a one- or two-state reactivity process (doublet and quartet spin states).

In **TS1a_Me3**, the quartet spin state lies 1.9 kcal/mol above the doublet one. However, if the dispersion, thermal, and entropic corrections are added to the respective total energies, the order of spin state stabilities switches; i.e., the Gibbs free energy of the medium spin state becomes 1.4 kcal/mol lower than the low-spin one. Moreover, **TS1a_Me3** presents important geometrical differences associated with the H-transfer from the C atom to the Fe=O moiety (larger than 0.4 Å, **Figure 2**) between spin states.

From this saddle point, the system evolves to **Pa_Me3**, a complex formed between the Fe(III)–porphyrin and $\text{Me}_2\text{NCH}_2\text{OH}$. It is worth noting that this final step is strongly exergonic and irreversible. Before the **Pa_Me3** formation, a minimum-energy crossing point, **MECP1**, between the quartet and sextet potential energy surfaces has been located after the rate-determining **TS1a_Me3** and it presents very similar geometrical features with respect to those found for **Pa_Me3**. Our results also indicate that

the geometries of these final complexes are different depending on the spin state. Thus, in the lowest energy doublet state **Pa_Me3** shows a weak $\text{HO}\cdots\text{Fe}$ interaction, whereas in the quartet and sextet states the interaction between the Fe–porphyrin and $\text{Me}_2\text{NCH}_2\text{OH}$ moieties takes place via a hydrogen bond between the hydroxyl group and one nitrogen atom of the porphyrin moiety (**Figure 1**).

Lastly, (*N,N*-dimethylamino)methanol can be hydrolyzed to formaldehyde and dimethylamine (the results of the *N*-demethylation process of the carbinolamines studied in this work can be found in the **Figure S1** and **Table S7** of the Supporting Information). Wu, Shaik, and co-workers²⁹ also studied this final hydrolysis reaction and concluded that it occurs without participation of the Fe–heme group, the hydrate of formaldehyde being the final product. Our results are in line with the profiles found by these authors.

Dimethylamine as Substrate. As we stated earlier, two reaction mechanisms (C–H hydroxylation and double HAT) are studied for the dimethylamine compound. The potential energy landscapes of the C–H hydroxylation process are displayed in **Figure 3**. The results obtained for the $\text{Me}_2\text{NH} \rightarrow \text{MeNHCH}_2\text{OH}$ transformation were found to be quite similar to those obtained for trimethylamine. The main difference is that the energetic barriers associated with dimethylamine are ca. 4 kcal/mol larger than those computed for trimethylamine, which can be

rationalized through two different factors. First, **R_Me2** presents a N–H...O hydrogen-bonded complex stronger than the CH...O intermediate found for **R_Me3**. Thus, the N–H...O and C–H...O bond distances corresponding to **R_Me2** and **R_Me3** are ca. 2.1 and 2.9 Å, respectively. Second, the transition state structure of the C–H hydroxylation reaction presents a radical electronic configuration. Because a tertiary alkylamine radical is more stable than a secondary alkylamine radical and, in turn, more stable than a primary alkylamine radical, the energetic barriers of the C–H hydroxylation process must follow the order $\text{Me}_3 < \text{Me}_2 < \text{Me}_1$.

Also in this case, the carbinol moiety in **Pa_Me2** is computed to be an O-bond in the doublet state, whereas for the quartet and sextet states the complex shows an OH...N–Fe hydrogen bond (Figure 3). In addition, a minimum-energy crossing point, **MECP2**, between the quartet and sextet potential energy surfaces has also been located after the rate-determining **TS1a_Me2** with geometrical features similar to those found for **Pa_Me2**. Also in this case, the final hydrolytic step leading to methylamine and formaldehyde was calculated as nonheme dependent process.²⁹ The profile was similar to that found for trimethylamine (Figure S2 of the Supporting Information).

As an alternative pathway, the N–H proton of dimethylamine is abstracted by the $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ moiety via transition structure **TS1b_Me2**. This mechanism consists of an essentially barrierless process with a free energy barrier of only 0.2 kcal/mol, which leads to **INT1_Me2** (Figure 4). This intermediate structure presents a hydrogen-bonded complex formed between the hydrogen of the $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OH}$ group and the nitrogen of the dimethylamine radical. The doublet and quartet potential energy surfaces are so close in energy that two minimum-energy crossing points, **MECP3**, and **MECP4** are found before and after **TS1b_Me2**, respectively. The chief geometrical features of **MECP3** and **MECP4** are quite similar to those found for **R_Me2** and **INT1_Me2**, respectively (Figure 5). The **INT1_Me2** structure can be transformed into **INT2_Me2** via an internal rotation that only changes the orientation of the dimethylamine radical with respect to the $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OH}$ moiety. **INT1_Me2** is calculated to lie 3.5 kcal/mol below **INT2_Me2** (doublet spin state). This fact parallels the computed bond lengths of both interactions; i.e., the C–H...OH distance in **INT2_Me2** is approximately 0.4 Å longer than the N...HO distance in **INT1_Me2**, as can be seen by inspection of Figure 5.

From **INT2_Me2**, the reaction proceeds through a C–H transfer from the dimethylamine radical to the $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OH}$ group via saddle point, **TS2_Me2**. This transition structure displays geometric features similar to those found for the previous HAT mechanism, and it shows a free energy barrier of ca. 7 kcal/mol with respect to **INT1_Me2**. This second HAT represents the reaction limiting step and its energy barrier value is similar to that computed for the direct C–H hydroxylation process. Finally, **TS2_Me2** yields complex **Pb_Me2**, in which a water ligand is bonded to the $\text{Fe}(\text{III})$ –porphyrin–SH moiety. The imine product $\text{H}_2\text{C}=\text{N}-\text{Me}$ is loosely bonded to the complex via a hydrogen bond between the aqua ligand and the sp^2 -hybridized atom of the imine, which in turn can be hydrolyzed to formaldehyde and monomethylamine. Before **Pb_Me2**, the **MECP5** has been located between the quartet and sextet potential energy surfaces.

To check the effect of the solvent selection in the energetic profile, single-point energies calculations with diethyl ether were performed for the demethylation reaction pathways of dimethylamine. The average difference between the relative

energies obtained from the two solvents (water, $\epsilon = 78.39$, and diethyl ether, $\epsilon = 4.24$) is 0.8 kcal/mol, which indicates that the conclusions derived from this work are independent of the solvent used in the PCM calculations (for more details see Table S2 of the Supporting Information).

On the basis of these results, we can conclude that in the experimental conditions of the enzyme catalysis the demethylation mechanism of a secondary amine catalyzed by CYP450s can proceed through both reaction mechanisms (C–H hydroxylation and double HAT), in an indiscriminate way. It is pertinent to note that the environmental effects of the protein have not been evaluated, although we anticipate that not important differences would be found and the conclusions of this work will be retained.

Methylamine as Substrate. The demethylation potential energy surfaces of methylamine catalyzed by the porphyrin– $\text{Fe}=\text{O}$ complex are gathered in Figures 6 and 7. The most

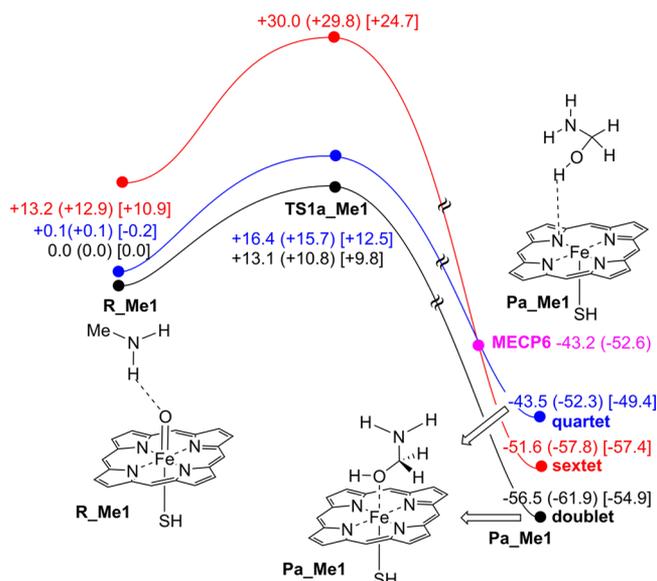


Figure 6. Potential energy landscapes of methylamine hydroxylation by Cpd I at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$ in doublet, quartet, and sextet states. Relative energies refer to **R_Me1** at the doublet state, and their values are given in kcal/mol. Minimum energy crossing point **MECP6** is also indicated. Numbers in parentheses and brackets correspond to relative energies and Gibbs energies (298 K), respectively, computed at the UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2dz//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory.

representative optimized structures associated with this reaction are shown in Figure 8. Our results indicate that the behavior of methylamine and dimethylamine as substrates are quite similar to each other, and therefore, only the main aspects will be discussed. For instance, the demethylation reaction mechanisms (C–H hydroxylation and double HAT) of methylamine show overall activation energies of about 10 kcal/mol, which represent the largest energy barriers of the present study. Moreover, it is noteworthy that two minimum-energy crossing points, **MECP7** and **MECP8**, are found before and after reaction intermediate **INT2_Me1**. It is also interesting to note that the **Pa_Me1** complex shows an O-bond structure at both the doublet and quartet states, whereas the OH...N–Fe hydrogen bond is formed only at the high-spin sextet state (Figure 6). Also in this case, the final hydrolytic step occurs without participation of the catalytic site²⁹ and with a kinetic profile similar to those

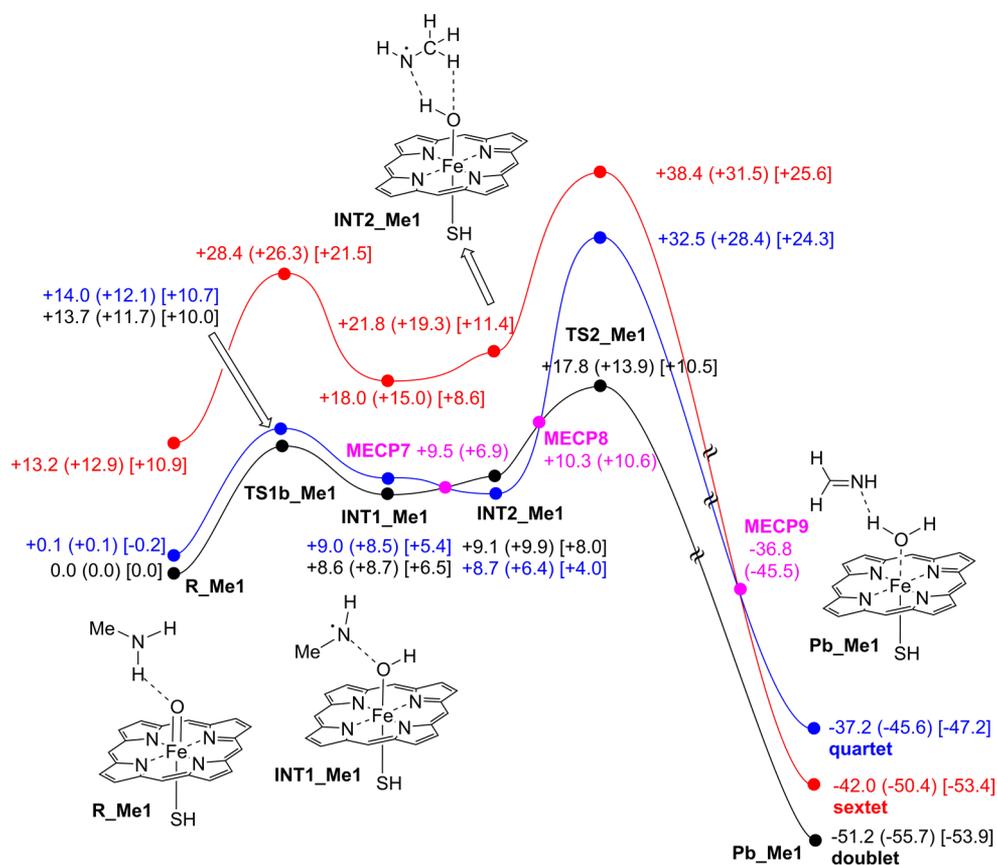


Figure 7. Potential energy landscapes of the double H-abstraction (from N–H and C–H bonds) of methylamine by Cpd I at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$ in doublet, quartet, and sextet states. Relative energies refer to **R_Me1** at the doublet state and their values are given in kcal/mol. Minimum energy crossing points **MECP7**, **MECP8**, and **MECP9** are also indicated. Numbers in parentheses and brackets correspond to relative energies and Gibbs energies (298 K), respectively, computed at the UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p) & LanL2dz//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory.

calculated for the previous substrates (Figure S3 of the Supporting Information).

On the basis of these results, we conclude that the activation energies of demethylation amines catalyzed by our model complex and CYP450s show the following trend: $\Delta G_{\text{Me1}}^{\ddagger} > \Delta G_{\text{Me2}}^{\ddagger} > \Delta G_{\text{Me3}}^{\ddagger}$. From a mechanistic point of view, the tertiary alkylamines only show a possible path, the C–H hydroxylation. Conversely, in secondary and primary alkylamines, two demethylation mechanisms are feasible (C–H hydroxylation and double HAT) and both processes are equally feasible. The implications of these findings can result very useful for rationalizing the degradation process of alkylamines catalyzed by CYP450s (*vide infra*).

As illustrative examples, the demethylation processes of several amine drugs are shown in Scheme 3. The amitriptyline, imipramine, citalopram, and *N,N*-dimethylamphetamine (sertraline, fluoxetine, and maprotiline) are tertiary (secondary) amines with two (one) methyl groups, respectively.

Tamoxifen as Substrate. From the previous results reported and discussed in this work, we propose that the metabolism of *N,N*-dimethylated drugs such as Amitriptyline^{74–76} (Elavil), Imipramine⁷⁷ (Tofranil), Citalopram^{78,79} (Celexa), *N,N*-dimethylamphetamine,⁸⁰ and Tamoxifen (TMX) (Scheme 3) are *N*-demethylated by CYP450s to yield the corresponding *N*-monomethylated intermediates via C–H hydroxylation mechanisms. These latter metabolites, as well as other *N*-monomethylated drugs such as Sertraline⁸¹ (Zoloft), Fluoxetine^{82,83} (Prozac), or Maprotiline⁸⁴ could be *N*-demethylated via additional

C–H hydroxylation processes and/or double HAT mechanisms (Scheme 3).

To explore computationally this hypothesis, as well as the competition between the *N*-demethylation pathways with other oxidation processes such as aryl or allyl hydroxylation (Scheme 4), we estimate the kinetic order of the primary metabolic routes of tamoxifen (TMX) as a model example of an *N,N*-dimethylated drug using DFT calculations. The nonsteroidal antiestrogen^{85,86} TMX (Nolvadex) is a chemotherapeutic agent to treat breast cancer. The metabolism of TMX is complex and in the human liver the oxidation process is mainly performed by the CYP450 system. Several primary and secondary routes of TMX have been identified, although in this work we will focus only on the primary routes (Scheme 4). The 90% oxidation of TMX proceeds through the demethylation of the aminoethoxy side chain to yield *N*-desmethyltamoxifen (**N-Me1TMX**, Scheme 4), mainly catalyzed by the CYP3A subfamily. As minor routes of the primary metabolites, 4-hydroxytamoxifen and α -hydroxytamoxifen (**4-HOTMX** and α -**HOTMX**, respectively, Scheme 4) have been identified. The **4-HOTMX** (α -**HOTMX**) is predominantly catalyzed by CYP2D6 (CYP3A4 and CYP3A5).

The selectivity of cytochromes toward different oxidation reactions of TMX or other substrates can stem from intrinsic activation barriers and/or from the preferential orientation of the substrate with respect to the active site of the cytochrome. To check the effect of the P450 isoform on the preferred orientation of TMX, we performed docking experiments with CYP3A4, which preferably promotes the *N*-demethylation reaction to yield

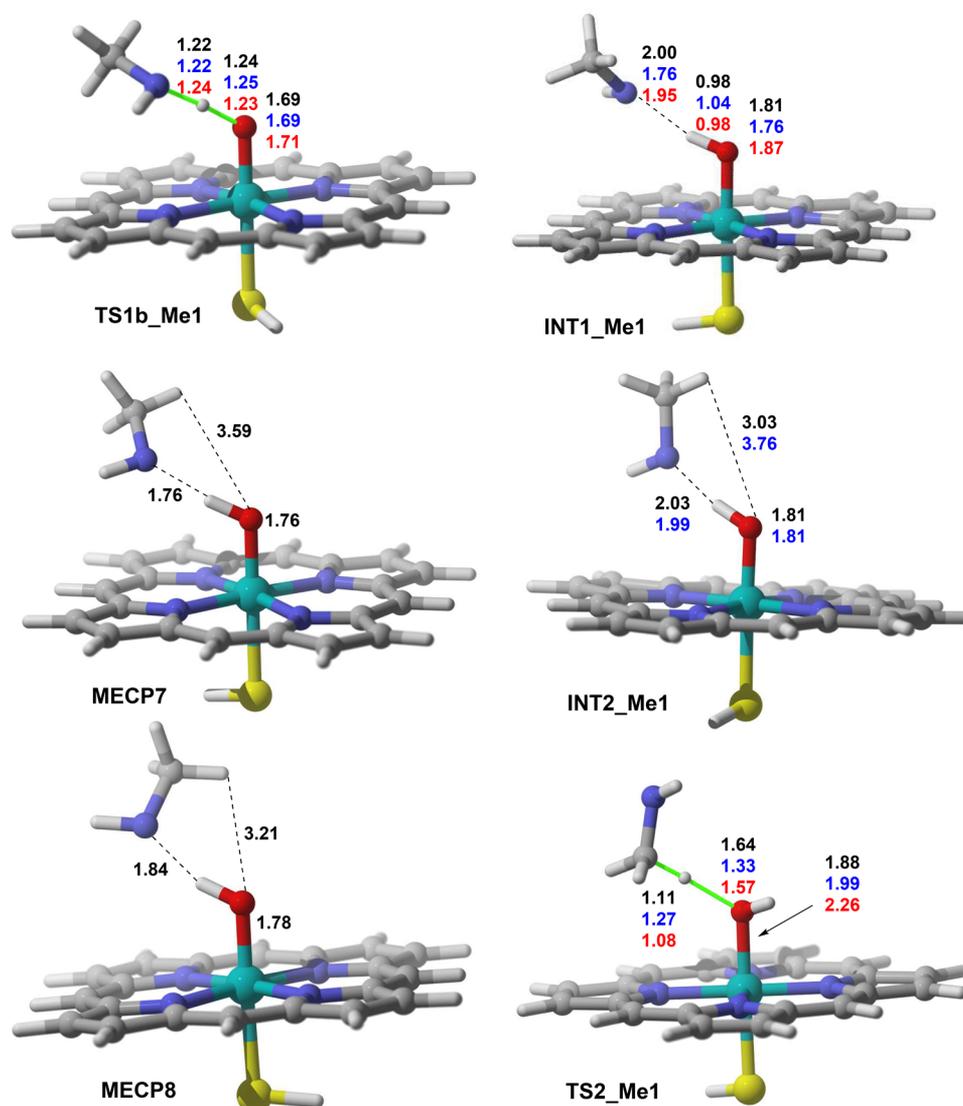


Figure 8. Fully optimized UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz geometries of transition structures **TS1b_Me1**, **INT1_Me1**, **MECP7**, **INT2_Me1**, **MECP8**, and **TS2_Me1**. Geometric data of doublet, quartet, and sextet spin states are represented in black, blue, and red, respectively. In the sextet spin state, the optimization process of **INT2_Me1** leads to another conformer and for this reason their geometric parameters are not reported. Ball and stick representations correspond to the doublet spin state, except the **INT2_Me1** structure that corresponds to the quartet spin state. Bond distances are given in Å.

N-Me1TMX (Scheme 4), and with CYP2D6, whose preferred oxidative process is the para-hydroxylation of one aromatic ring of TMX, giving rise to **4-OHTMX** (Scheme 4). The results of these docking experiments are gathered in Figure 9.

It has been reported that cytochromes P450 show quite wide binding sites close to the heme group. Indeed, these sites can accommodate even more than one drug, which can affect the ADME-Tox properties of isolated and combined drug pairs.^{87,88} Our simulations show that both CYP3A4 and CYP2D6 possess quite wide active sites that permit different orientations of TMX within a hydrophobic environment that includes many valine, leucine, isoleucine, threonine, and phenylalanine residues (Figure 9). In addition, the preferred pose for TMX in CYP3A4 consists of a geometry in which the *N,N*-dimethylamino moiety is oriented toward the Fe(III) atom (Figure 9A). This result is compatible with the preferential N-demethylation process leading to **N-Me1TMX** catalyzed by CYP3A4. Another less preferred, but energetically feasible, pose (not shown) involves a close proximity of the ethyl group of TMX to the Fe(III) atom,

which is also compatible with the formation of α -**HOTMX** catalyzed by this enzyme. However, CYP2D6 imposes more restrictions to the orientation of TMX and the preferred pose is that shows a phenyl group close to the Fe(III)-heme moiety (Figure 9B). This orientation is that it would be expected for the preferential formation of **4-OHTMX**, as it is found experimentally (*vide supra*). Therefore, these docking experiments show that, aside other considerations, different cytochrome P450 isoforms can preorganize different substrates and favor alternative hydroxylation pathways.

To assess the intrinsic (not involving the structure of the protein) selectivity of these different oxidation reactions, bond dissociation energy strengths for some selected C-H bonds of TMX have been calculated. On the basis of the results displayed in Figure 10, it is possible to conclude that the TMX N-demethylation (97.0 kcal/mol) is intrinsically a more feasible process than the TMX aryl 4-hydroxylation (118.7 kcal/mol), although less favorable than the TMX allyl α -hydroxylation (84.6 kcal/mol).

Scheme 3. Biodegradation Pathways of Several N,N-Dimethylated and N-Methylated Amine Drugs Catalyzed by CYP450s

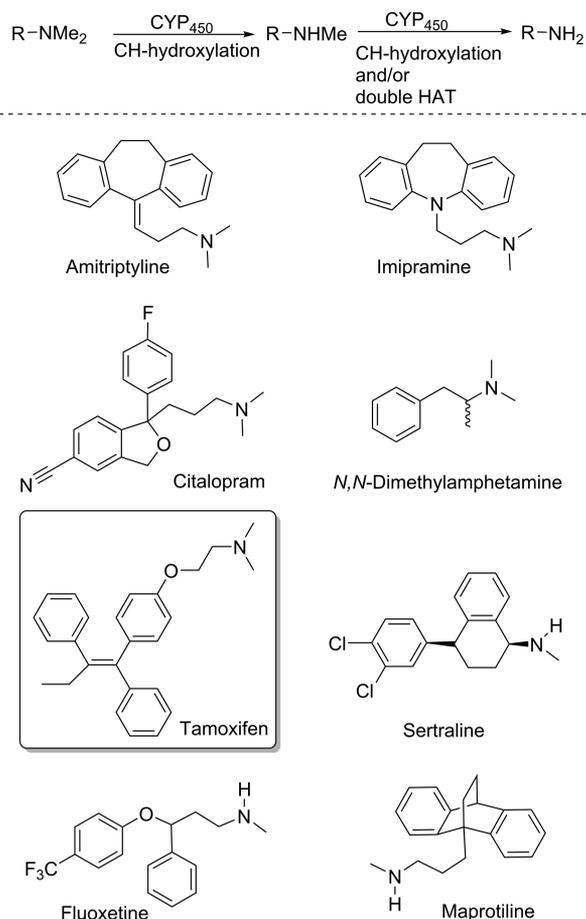


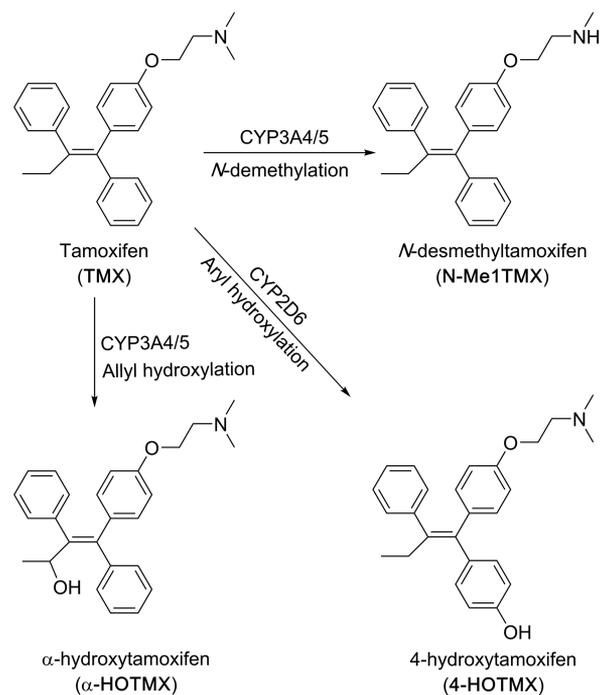
Table 1 collects the relative energy values from the reaction pathways of these three primary routes. Figure 11 displays the optimized geometries of the different transition structures with their most relevant geometrical parameters. On the basis of our previous results, the potential energy landscapes of *N*-demethylation, 4-hydroxylation, and α -hydroxylation of TMX have only been evaluated at the doublet spin state.

The amine group of TMX is a tertiary amine with two methyl groups; i.e., the demethylation mechanism must necessarily follow a C–H hydroxylation process (*vide supra*). The demethylation and α -hydroxylation processes present very small energy barriers (less than 10 kcal/mol). The oxygen rebound transition states were not located, which result in a concerted rebound mechanism for both processes with only one transition state; see $TS1_{N-dem}$ and $TS1_{\alpha-hyd}$ structures in Figure 11. The geometric features of $TS1_{N-dem}$ and its associated energy barrier are very similar to those found for $TS1a_Me3$ (*vide supra*). Moreover, it is worth noting that the cleavage of C–H bond is more advanced in $TS1_{\alpha-hyd}$ geometry (1.24 Å) than in $TS1_{N-dem}$ (1.17 Å).

In the 4-hydroxylation reaction mechanism, two transition states were found, $TS1_{4-hyd}$ and $TS2_{4-hyd}$, with free energy barriers of 19.0 and 4.5 kcal/mol, respectively. $TS1_{4-hyd}$ represents a late transition state in which formation of the O–H bond is more advanced than the homolytic cleavage of the C–H bond. Conversely, the structure of $TS2_{4-hyd}$ displays an early transition state structure and it represents the oxygen rebound process.

In summary, the obtained results estimate that the TMX *N*-demethylation leading to *N-Me1TMX* shows the smallest

Scheme 4. Primary Metabolic Pathways of Tamoxifen Studied in This Work



energy barrier (actually our calculations point to an essentially a barrierless process). This result is compatible with the *in vivo* results reported for this drug, according to which *N-Me1TMX* is the most abundant primary metabolite. The α -hydroxylation and 4-hydroxylation reaction mechanisms present overall free energy barriers of about 7 and 23 kcal/mol, respectively. Our results are also in line with the experimentally observed minor role of the 4-HOTMX item as primary metabolite. The α -allylic route leading to α -HOTMX also involves a very low Gibbs energy activation, although larger than that computed for the *N*-demethylation process.

From the combined docking experiments, dissociation energies and QM/DFT calculations on the TMX–Fe(III)–heme system we conclude that there is an intrinsic preference for the metabolic route that yields *N-Me1TMX*, followed by the formation α -HOTMX. Therefore, P450 isoforms like CYP3A4, which give rise to these two metabolites, can possess relatively wide active sites because the observed selectivity is dictated by the intrinsic preference of the Fe(III)–heme group for the NMe_2 and Et groups of TMX. In contrast, 4-hydroxylation of one phenyl group of TMX leading to 4-HOTMX is an intrinsically less favored process and the architecture of the active site must circumvent this higher kinetic barrier via a more restricted pre-organization of the substrate, as it occurs in the CYP2D6 isoform.

Additional subtle details concerning the chemo- and regioselectivity of the oxidation processes associated with drug metabolism promoted by different cytochrome P450 isoforms would require specific QM/MM calculations. However, we think that our simplified model based on isolated HS–Fe(O)–porphyrin captures the essential aspects of these oxidation processes, at least in qualitative and even semiquantitative terms.

4. CONCLUSIONS

In this work, the *N*-demethylation routes of trimethylamine, dimethylamine, and methylamine have been studied. Porphyrin bound to a Fe(IV)=O moiety and to a bisulfide anion has

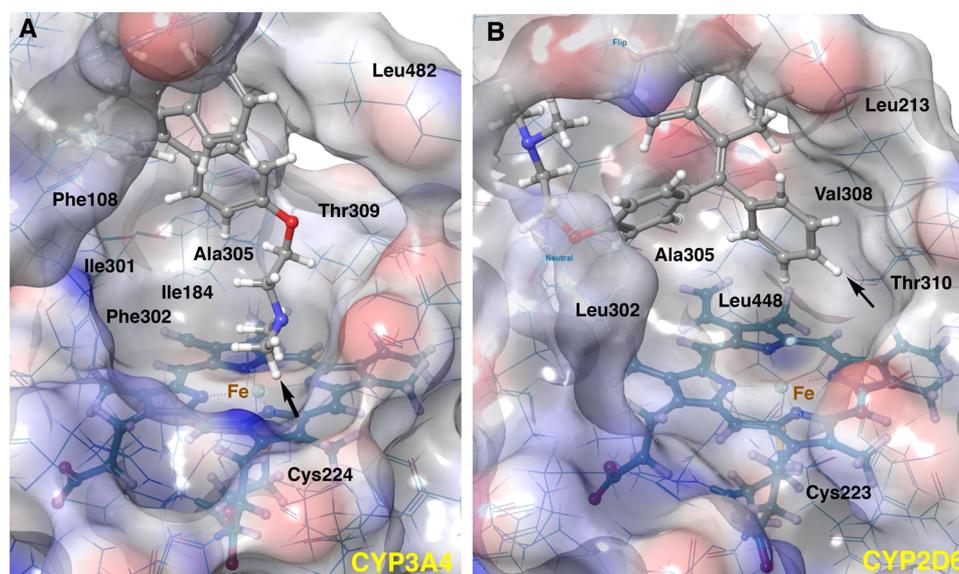


Figure 9. Less energetic poses of tamoxifen docked to CYP3A4 (A) and CYP2D6 (B). The arrows point to the C–H bonds of tamoxifen that are closer to the Fe–heme system. In the case of CYP3A4 (A) the orientation of the substrate points to a N-demethylation reaction, whereas in the case of CYP2D6 (B) the preferred orientation of tamoxifen suggests the 4-hydroxylation process as the most favored oxidation reaction.

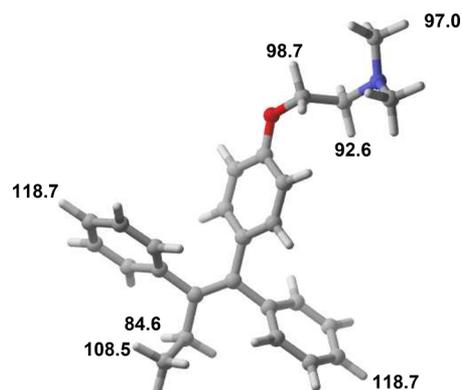


Figure 10. Bond dissociation energy strengths for some selected C–H bonds of tamoxifen evaluated at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p) level of theory. All values are given in kcal/mol.

been used as a computationally adequate model of the active site of CYP450s, in which an heme group is the essential cofactor. In the case of trisubstituted N-demethylated substrate the C–H hydroxylation mechanism has been found, in which the rebound mechanism described by Shaik results in a concerted mechanism leading to a N-hydroxymethyl product that in turns decomposes to formaldehyde and the corresponding N-demethylated product. In the case of substrates possessing a N–H bond (dimethylamine and methylamine) the C-hydroxylation mechanism competes with a double HAT mechanism that gives rise to an imine derivative. This latter product is hydrolyzed to yield the same products, namely, formaldehyde and the N-demethylated product. Our results indicate that both mechanisms are virtually isoenergetic.

In these processes, the reacting systems evolve through doublet (low spin) and quartet (medium spin) states, connected by different minimum energy crossing points. The reaction products can compete between the doublet and sextet spin states.

Finally, tamoxifen has been studied as a model N,N-dimethylated drug. Docking experiments, computational dissociation energies, and DFT/QM calculations on the tamoxifen/Fe(II)–heme system have been carried out. It has been found

Table 1. Relative Energies (ΔE), Zero-Point Vibrational Energy Corrected Energies ($\Delta E + \text{ZPE}$), Enthalpies (ΔH), and Free Energies (ΔG), in kcal/mol, at 298 K, Calculated for the Three Primary Metabolic Routes of Tamoxifen Mediated by HS–Fe(O)–Porphyrin as the Computational Model of the Cytochrome P450 Active Site^a

product	compound	ΔE	$\Delta(E + \text{ZPE})$	ΔH	ΔG
N-Me1TMX	R _{N-dem}	0.0	0.0	0.0	0.0
	TS1 _{N-dem}	0.4	−0.7	−1.3	0.5
	P _{N-dem}	−65.3	−62.2	−63.6	−57.4
4-HOTMX	R _{4-hyd}	−0.4	−0.4	−0.4	−0.6
	TS1 _{4-hyd}	20.7	15.8	15.4	18.4
	INT _{4-hyd}	19.4	17.5	17.8	17.8
	TS2 _{4-hyd}	22.5	20.6	20.4	22.3
	P _{4-hyd}	−65.3	−63.2	−63.8	−60.3
α -HOTMX	R _{α-hyd}	−5.8	−5.9	−5.8	−4.9
	TS1 _{α-hyd}	0.5	−1.9	−2.6	2.2
	P _{α-hyd}	−68.0	−65.5	−66.2	−61.2

^aEnergies computed at doublet spin state using the UB3LYP-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2dz//UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory in solution using the PCM with $\epsilon = 78.39$. The ZPE, enthalpy, and Gibbs energy corrections are obtained at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory.

that the N-desmethyltamoxifen is the preferred metabolite, follow by α -hydroxytamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. These results are in qualitative agreement with the experimental results. Although further studies including environmental effects around the active sites of CYP450s are requested, the results shown here describe the basic aspects of the possible modes of action of these enzymes.

In our previous paper⁴⁰ on N-demethylation reactions catalyzed by Jumonji-C-containing histone demethylases, we observed subtle electronic and steric effects to selectively demethylate tri-, di-, and monomethylated lysine residues, as one would expect for epigenetic enzymes. In contrast, the reactions studied in this paper show low-barrier N-demethylation processes via two almost isoenergetic mechanisms that lead to the same products after hydrolysis of the imine or aminocarbinol intermediates.

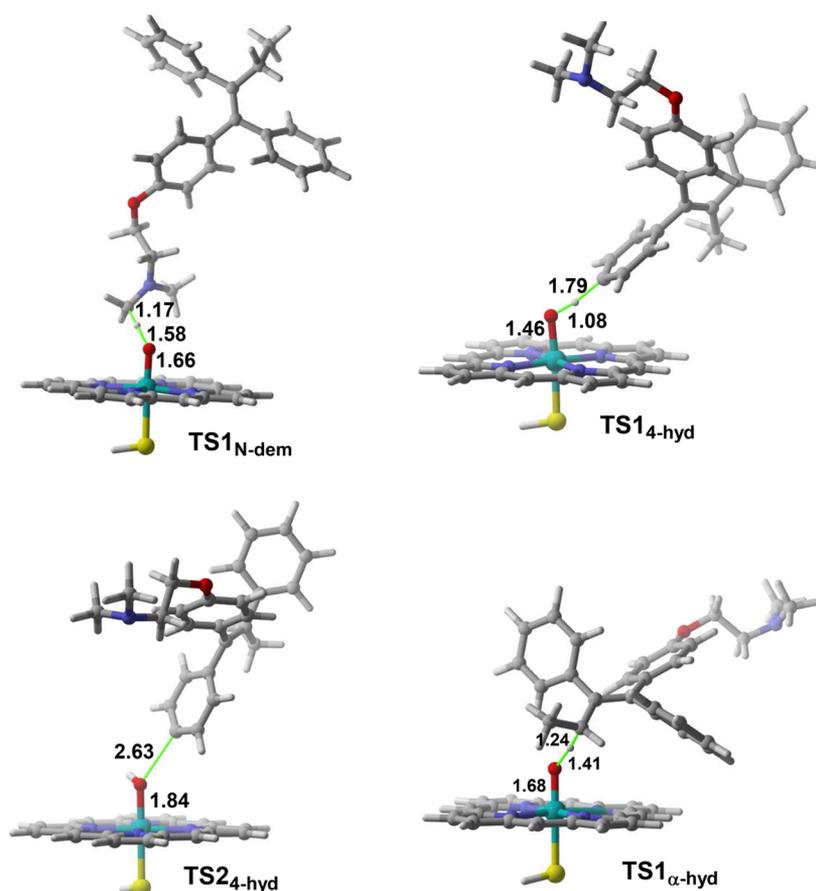


Figure 11. Fully optimized UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz geometries of transition structures TS1_{N-dem}, TS1_{4-hyd}, TS2_{4-hyd}, and TS1_{α-hyd} in doublet spin state. Bond distances are given in Å.

No special selectivity has been observed for different amines. Perhaps this is the reason why nature has selected two Fe-containing but conceptually different families of enzymes: one low-field type of histone demethylases for encoding epigenetic information associated with gene expression/repression and other high-field group of less selective enzymes that accelerate catalytic routes for secondary metabolites and drugs.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jpca.7b10654.

Tables with relative energies, energies plus zero-point energies, enthalpies, and free energies for all the reaction mechanisms studied; potential energy landscapes of the N-demethylation process of carbinolamines; Cartesian coordinates of all stationary points investigated in this work (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*M. Torrent-Sucarrat. E-mail: miqueltorrentsucarrat@gmail.com.

*F. P. Cossío. E-mail: fp.cossio@ehu.es.

ORCID

Miquel Torrent-Sucarrat: 0000-0003-2689-0278

Gloria Rubiales: 0000-0003-1379-4666

Fernando P. Cossío: 0000-0002-4526-2122

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was provided by the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) of Spain and FEDER (projects CTQ2016-80375-P and Red de Excelencia Consolidar CTQ2014-51912-REDC) and the Basque Government (GV/EJ, grant IT-324-07). The authors thank the SGI/IZO-SGIker UPV/EHU and the DIPIC for generous allocation of computational and analytical resources. We thank Prof. J. N. Harvey (Quantum and Physical Chemistry Division of the Chemistry Department, KU Leuven, Belgium) for making a copy of the MECP program available to us.

■ REFERENCES

- (1) Sono, M.; Roach, M. P.; Coulter, E. D.; Dawson, J. H. Heme-Containing Oxygenases. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841–2888.
- (2) *Cytochrome P450: Structure Mechanism and Biochemistry*; Ortiz de Montellano, P. R., Ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2004.
- (3) *Iron-Containing Enzymes: Versatile Catalysts of Hydroxylation Reactions in Nature*; DeVisser, S. P., Kumar, D., Eds.; RSC Publishing: Cambridge, UK, 2011.
- (4) Nelson, D. R.; Kamataki, T.; Waxman, D. J.; Guengerich, F. P.; Estabrook, R. W.; Feyereisen, R.; Gonzalez, F. J.; Coon, M. J.; Gunsalus, I. C.; et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* **1993**, *12*, 1–51.

- (5) Ortiz de Montellano, P. R.; De Voss, J. J. Oxidizing Species in the Mechanism of Cytochrome P450. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 477–493.
- (6) Meunier, B.; de Visser, S. P.; Shaik, S. Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947–3980.
- (7) Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2253–2277.
- (8) Shaik, S.; Kumar, D.; de Visser, S. P.; Altun, A.; Thiel, W. Theoretical Perspective on the Structure and Mechanism of Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2279–2328.
- (9) Shaik, S.; Cohen, S.; Wang, Y.; Chen, H.; Kumar, D.; Thiel, W. P450 Enzymes: Their Structure, Reactivity, and Selectivity-Modeled by QM/MM Calculations. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 949–1017.
- (10) Ortiz de Montellano, P. R. Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 932–948.
- (11) Bernhardt, R. Cytochromes P450 as Versatile Biocatalysts. *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 128–145.
- (12) Rittle, J.; Green, M. T. Cytochrome P450 Compound I: Capture, Characterization, and C-H Bond Activation Kinetics. *Science* **2010**, *330*, 933–937.
- (13) Yosca, T. H.; Rittle, J.; Krest, C. M.; Onderko, E. L.; Silakov, A.; Calixto, J. C.; Behan, R. K.; Green, M. T. Iron(IV)hydroxide pKa and the Role of Thiolate Ligation in C-H Bond Activation by Cytochrome P450. *Science* **2013**, *342*, 825–829.
- (14) Krest, C. M.; Silakov, A.; Rittle, J.; Yosca, T. H.; Onderko, E. L.; Calixto, J. C.; Green, M. T. Significantly Shorter Fe-S Bond in Cytochrome P450-I is consistent with Greater Reactivity Relative to Chloroperoxidase. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 696–702.
- (15) Cho, K. B.; Hirao, H.; Shaik, S.; Nam, W. To Rebound or Dissociate? This is the Mechanistic Question in C-H Hydroxylation by Heme and Nonheme Metal-Oxo Complexes. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1197–1210.
- (16) Krámos, B.; Oláh, J. The Mechanism of Human Aromatase (CYP 19A1) Revisited: DFT and QM/MM Calculations Support a Compound I-mediated Pathway for the Aromatization Process. *Struct. Chem.* **2015**, *26*, 279–300.
- (17) Tomberg, A.; Pottel, J.; Liu, Z.; Labute, P.; Moitessier, N. Understanding P450-mediated Bio-transformations into Epoxide and Phenolic Metabolites. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 13743–13747.
- (18) Ji, L.; Faponle, A. S.; Quesne, M. G.; Sainna, M. A.; Zhang, J.; Franke, A.; Kumar, D.; van Eldik, R.; Liu, W. P.; de Visser, S. P. Drug Metabolism by Cytochrome P450 Enzymes: What Distinguishes the Pathways Leading to Substrate Hydroxylation Over Desaturation? *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 9083–9092.
- (19) Sainna, M. A.; Kumar, S.; Kumar, D.; Fornarini, S.; Crestoni, M. E.; de Visser, S. P. A Comprehensive Test Set of Epoxidation Rate Constants for Iron(IV)-oxo Porphyrin Cation Radical Complexes. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1516–1529.
- (20) Wang, B.; Dubey, K. D.; Shaik, S. Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Calculated Reactivity Networks Reveal How Cytochrome P450cam and Its T252A Mutant Select Their Oxidation Pathways. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 7379–7390.
- (21) Viciano, I.; Castillo, R.; Martí, S. QM/MM Modeling of the Hydroxylation of the Androstenedione Substrate Catalyzed by Cytochrome P450 Aromatase (CYP19A1). *J. Comput. Chem.* **2015**, *36*, 1736–1747.
- (22) Dubey, K. D.; Wang, B.; Shaik, S. Molecular Dynamics and QM/MM Calculations Predict the Substrate-Induced Gating of Cytochrome P450 BM3 and the Regio- and Stereoselectivity of Fatty Acid Hydroxylation. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 837–845.
- (23) Li, X. X.; Postils, V.; Sun, W.; Faponle, A. S.; Sola, M.; Wang, Y.; Nam, W.; de Visser, S. P. Reactivity Patterns of (Protonated) Compound II and Compound I of Cytochrome P450: Which is the Better Oxidant? *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 6406–6418.
- (24) Shaffer, C. L.; Morton, M. D.; Hanzlik, R. P. N-Dealkylation of an N-Cyclopropylamine by Horseradish Peroxidase. Fate of the Cyclopropyl Group. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8502–8508.
- (25) Shaffer, C. L.; Harriman, S.; Koen, Y. M.; Hanzlik, R. P. Formation of Cyclopropanone during Cytochrome P450-Catalyzed N-Dealkylation of a Cyclopropylamine. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8268–8274.
- (26) Cho, K. B.; Moreau, Y.; Kumar, D.; Rock, D. A.; Jones, J. P.; Shaik, S. Formation of the Active Species of Cytochrome P450 by using Iodosylbenzene: A Case for Spin-Selective Reactivity. *Chem. - Eur. J.* **2007**, *13*, 4103–4115.
- (27) Shaik, S.; Kumar, D.; de Visser, S. P. Valence Bond Modeling of Trends in Hydrogen Abstraction Barriers and Transition States of Hydroxylation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10128–10140.
- (28) Rydberg, P.; Ryde, U.; Olsen, L. Sulfoxide, Sulfur, and Nitrogen Oxidation and Dealkylation by Cytochrome P450. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 1369–1377.
- (29) Li, C. S.; Wu, W.; Cho, K. B.; Shaik, S. Oxidation of Tertiary Amines by Cytochrome P450-Kinetic Isotope Effect as a Spin-State Reactivity Probe. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 8492–8503.
- (30) Roberts, K. M.; Jones, J. P. Anilinic N-Oxides Support Cytochrome P450-Mediated N-Dealkylation through Hydrogen-Atom Transfer. *Chem. - Eur. J.* **2010**, *16*, 8096–8107.
- (31) Rydberg, P.; Olsen, L. Do Two Different Reaction Mechanisms Contribute to the Hydroxylation of Primary Amines by Cytochrome P450? *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 3399–3404.
- (32) Taxak, N.; Desai, P. V.; Patel, B.; Mohutsky, M.; Klimkowski, V. J.; Gombar, V.; Bharatam, P. V. Metabolic-intermediate Complex Formation with Cytochrome P450: Theoretical Studies in Elucidating the Reaction Pathway for the Generation of Reactive Nitroso Intermediate. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 1740–1747.
- (33) Ji, L.; Schuurmann, G. Model and Mechanism: N-Hydroxylation of Primary Aromatic Amines by Cytochrome P450. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 744–748.
- (34) Hirao, H.; Chuanprasit, P.; Cheong, Y. Y.; Wang, X. Q. How Is a Metabolic Intermediate Formed in the Mechanism-Based Inactivation of Cytochrome P450 by Using 1,1-Dimethylhydrazine: Hydrogen Abstraction or Nitrogen Oxidation? *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 7361–7369.
- (35) Rydberg, P.; Jorgensen, M. S.; Jacobsen, T. A.; Jacobsen, A. M.; Madsen, K. G.; Olsen, L. Nitrogen Inversion Barriers Affect the N-Oxidation of Tertiary Alkylamines by Cytochromes P450. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 993–997.
- (36) Seger, S. T.; Rydberg, P.; Olsen, L. Mechanism of the N-Hydroxylation of Primary and Secondary Amines by Cytochrome P450. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28*, 597–603.
- (37) Kumar, D.; De Visser, S. P.; Sharma, P. K.; Cohen, S.; Shaik, S. Radical Clock Substrates, Their C-H Hydroxylation Mechanism by Cytochrome P450, and Other Reactivity Patterns: What Does Theory Reveal about the Clocks' Behavior? *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1907–1920.
- (38) Li, D.; Wu, W.; Kumar, D.; Shaik, S. Kinetic Isotope Effect is a Sensitive Probe of Spin State Reactivity in C-H Hydroxylation of N,N-Dimethylaniline by Cytochrome P450. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 394–395.
- (39) Zaragoza, J. P.; Yosca, T. H.; Siegler, M. A.; Moënné-Loccoz, P.; Green, M. T.; Goldberg, D. P. Direct Observation of Oxygen Rebound with an Iron-Hydroxide Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 13640–13643.
- (40) Alberro, N.; Torrent-Sucarrat, M.; Arrastia, I.; Arrieta, A.; Cossío, F. P. Two-State Reactivity of Histone Demethylases Containing Jumoni-C Active Sites: Different Mechanisms for Different Methylation Degrees. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 137–148.
- (41) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry 0.3. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- (42) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623–11627.

- (43) Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V. Energies, Structures, and Electronic Properties of Molecules in Solution with the C-PCM Solvation Model. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 669–681.
- (44) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999–3093.
- (45) Chen, H.; Lai, W. Z.; Shaik, S. Exchange-Enhanced H-Abstraction Reactivity of High-Valent Nonheme Iron(IV)-Oxo from Coupled Cluster and Density Functional Theories. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 1533–1540.
- (46) Ye, S.; Neese, F. Nonheme Oxo-Iron(IV) Intermediates form an Oxyl Radical upon Approaching the C-H Bond Activation Transition State. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 1228–1233.
- (47) Ye, S.; Price, J. C.; Barr, E. W.; Green, M. T.; Bollinger, J. M., Jr; Krest, C.; Neese, F. Cryoreduction of the NO-Adduct of Taurine: α -Ketoglutarate Dioxygenase (TauD) Yields an Elusive {FeNO}8 Species. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4739–4751.
- (48) Radon, S. Spin-State Energetics of Heme-Related Models from DFT and Coupled Cluster Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10*, 2306–2321.
- (49) Roy, S.; Kästner, J. Synergistic Substrate and Oxygen Activation in Salicylate Dioxygenase Revealed by QM/MM Simulations. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 1168–1172.
- (50) Cortopassi, W. A.; Simion, R.; Honsby, C. E.; Franca, T. C. C.; Paton, R. S. Dioxygen Binding in the Active Site of Histone Demethylase JMJD2A and the Role of the Protein Environment. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 18983–18992.
- (51) Faponle, A. S.; Quesne, M. G.; Sastri, C. V.; Banse, F.; de Visser, S. P. Differences and Comparisons of the Properties and Reactivities of Iron(III)-hydroperoxo Complexes with Saturated Coordination Sphere. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 1221–1236.
- (52) Sahoo, D.; Quesne, M. G.; de Visser, S. P.; Rath, S. P. Hydrogen-Bonding Interactions Trigger a Spin-Flip in Iron(III) Porphyrin Complexes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 4796–4800.
- (53) Faponle, A. S.; Quesne, M. G.; de Visser, S. P. Origin of the Regioselective Fatty-Acid Hydroxylation versus Decarboxylation by a Cytochrome P450 Peroxygenase: What Drives the Reaction to Biofuel Production? *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 5478–5483.
- (54) Sun, Y. H.; Tang, H.; Chen, K. J.; Hu, L. R.; Yao, J. N.; Shaik, S.; Chen, H. Two-State Reactivity in Low-Valent Iron-Mediated C-H Activation and the Implications for Other First-Row Transition Metals. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3715–3730.
- (55) Ramanan, R.; Dubey, K. D.; Wang, B. J.; Mandal, D.; Shaik, S. Emergence of Function in P450-Proteins: A Combined Quantum Mechanical/Molecular Mechanical and Molecular Dynamics Study of the Reactive Species in the H₂O₂-Dependent Cytochrome P450(SP alpha) and Its Regio- and Enantioselective Hydroxylation of Fatty Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 6786–6797.
- (56) Holland, P. L. Distinctive Reaction Pathways at Base Metals in High-Spin Organometallic Catalysts. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1696–1702.
- (57) Harvey, J. N.; Aschi, M.; Schwarz, H.; Koch, W. The Singlet and Triplet States of Phenyl Cation. A Hybrid Approach for Locating Minimum Energy Crossing Points between Non-interacting Potential Energy Surfaces. *Theor. Chem. Acc.* **1998**, *99*, 95–99.
- (58) Hehre, W. J.; Ditchfield, R.; Pople, J. A. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules (6-31G* basis set). *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 2257–2261.
- (59) Hehre, W. J.; Radom, L.; Schleyer, P. v. R.; Pople, J. A. *Ab Initio Molecular Orbital Theory*; Wiley: New York, 1986.
- (60) Hay, P. J.; Wadt, W. R. Ab Initio Effective Core Potentials for Molecular Calculations - Potentials for K to Au Including the Outermost Core Orbitals. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 299–310.
- (61) Hratchian, H. P.; Schlegel, H. B. Accurate Reaction Paths Using a Hessian Based Predictor-Corrector Integrator. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 9918–9924.
- (62) Hratchian, H. P.; Schlegel, H. B. Using Hessian Updating to Increase the Efficiency of a Hessian Based Predictor-Corrector Reaction Path Following Method. *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, *1*, 61–69.
- (63) Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H. A. Consistent and Accurate Ab Initio Parametrization of Density Functional Dispersion Correction (DFT-D) for the 94 Elements H-Pu. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104.
- (64) Johnson, E. R.; Becke, A. D. A Post-Hartree-Fock Model of Intermolecular Interactions: Inclusion of Higher-order Corrections. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 174104.
- (65) Grimme, S.; Ehrlich, S.; Goerigk, L. Effect of the Damping Function in Dispersion Corrected Density Functional Theory. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 1456–1465.
- (66) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, H. B.; Robb, M. A.; J. R. Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; et al. *Gaussian 09*, revision E.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2013.
- (67) *Glide*, version 6.9; Schrödinger, LLC: New York, NY, 2015.
- (68) Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shaw, D. E.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Francis, P.; Shenkin, P. S. *Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy.* *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739–1749.
- (69) Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. *Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening.* *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750–1759.
- (70) Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T. Extra Precision *Glide*: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177–6196.
- (71) Sevioukova, I. F.; Poulos, T. L. Structural and Mechanistic Insights into the Interaction of Cytochrome P4503A4 with Bromoergocryptine, a Type I Ligand. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 3510–3517.
- (72) Brodney, M. A.; Beck, E. M.; Butler, C. R.; Barreiro, G.; Johnson, E. F.; Riddell, D.; Parris, K.; Nolan, C. E.; Fan, Y.; Atchison, K.; et al. Utilizing Structures of CYP2D6 and BACE1 Complexes To Reduce Risk of Drug-Drug Interactions with a Novel Series of Centrally Efficacious BACE1 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3223–3252.
- (73) Wang, A.; Stout, C. D.; Zhang, Q.; Johnson, E. F. Contributions of Ionic Interactions and Protein Dynamics to Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) Substrate and Inhibitor Binding. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 5092–5104.
- (74) Beckett, A. H.; Alsarraj, S. Metabolism of Amitriptyline, Nortriptyline, Imipramine and Esipramine to Yield Hydroxylamines. *J. Pharm. Pharmacol.* **1973**, *25*, 335–336.
- (75) Lee, J. Y.; Lee, S. Y.; Lee, K.; Oh, S. J.; Kim, S. K. Determination of Species-difference in Microsomal Metabolism of Amitriptyline using a Predictive MRM-IDA-EPI Method. *Chem.-Biol. Interact.* **2015**, *229*, 109–118.
- (76) Zhou, X.; Chen, C.; Zhang, F. R.; Zhang, Y.; Feng, Y. L.; Ouyang, H.; Xu, Y.; Jiang, H. L. Metabolism and Bioactivation of the Tricyclic Antidepressant Amitriptyline in Human Liver Microsomes and Human Urine. *Bioanalysis* **2016**, *8*, 1365–1381.
- (77) Lemoine, A.; Gautier, J. C.; Azoulay, D.; Kiffel, L.; Belloc, C.; Guengerich, F. P.; Maurel, P.; Beaune, P.; Leroux, J. P. Major Pathway of Imipramine Metabolism is Catalyzed by Cytochromes P-450 1A2 and P-450 3A4 in Human Liver. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *43*, 827–832.
- (78) Olesen, O. V.; Linnet, K. Studies on the Stereoselective Metabolism of Citalopram by Human Liver Microsomes and cDNA-expressed Cytochrome P450 Enzymes. *Pharmacology* **1999**, *59*, 298–309.
- (79) Hu, X. X.; Yuan, L. J.; Fang, P.; Mao, Y. H.; Zhan, Y. Y.; Li, X. Y.; Dai, D. P.; Cai, J. P.; Hu, G. X. Effect of CYP2D6 Genetic Polymorphism on the Metabolism of Citalopram in Vitro. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2016**, *31*, 133–138.

(80) Inoue, T.; Suzuki, S. The Metabolism of Dimethylamphetamine in Rat and Man. *Xenobiotica* **1987**, *17*, 965–971.

(81) Obach, R. S.; Cox, L. M.; Tremaine, L. M. Sertraline is Metabolized by Multiple Cytochrome P450 Enzymes, Monoamine Oxidases, and Glucuronyl Transferases in Human: An in Vitro Study. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 262–270.

(82) vonMoltke, L. L.; Greenblatt, D. J.; Duan, S. X.; Schmider, J.; Wright, C. E.; Harmatz, J. S.; Shader, R. I. Human Cytochromes Mediating N-demethylation of Fluoxetine in Vitro. *Psychopharmacology* **1997**, *132*, 402–407.

(83) Margolis, J. M.; O'Donnell, J. P.; Mankowski, D. C.; Ekins, S.; Obach, R. S. (R)-, (S)-, and Racemic Fluoxetine N-demethylation by Human Cytochrome P450 Enzymes. *Drug Metab. Dispos.* **2000**, *28*, 1187–1191.

(84) Brachtendorf, L.; Jetter, A.; Beckurts, K. T.; Holscher, A. H.; Fuhr, U. Cytochrome P-450 Enzymes Contributing to Demethylation of Maprotiline in Man. *Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *90*, 144–149.

(85) Crewe, H. K.; Notley, L. M.; Wunsch, R. M.; Lennard, M. S.; Gillam, E. M. J. Metabolism of Tamoxifen by Recombinant Human Cytochrome P450 Enzymes: Formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy and N-desmethyl Metabolites and Isomerization of Trans-4-hydroxytamoxifen. *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 869–874.

(86) Desta, Z.; Ward, B. A.; Soukhova, N. V.; Flockhart, D. A. Comprehensive Evaluation of Tamoxifen Sequential Biotransformation by the Human Cytochrome P450 System in Vitro: Prominent Roles for CYP3A and CYP2D6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *310*, 1062–1075.

(87) Williams, P. A.; Cosme, J.; Ward, A.; Angove, H. C.; Vinković, D. M.; Jhoti, H. Crystal Structure of Human Cytochrome P450 2C9 with Bound Warfarin. *Nature* **2003**, *424*, 464–468.

(88) Williams, P. A.; Cosme, J.; Vinković, D. M.; Ward, A.; Angove, H. C.; Day, P. J.; Vonrhein, C.; Tickle, I. J.; Jhoti, H. Crystal Structures of Human Cytochrome P450 3A4 Bound to Metyrapone and Progesterone. *Science* **2004**, *305*, 683–686.

