

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Jmj-C DOMINIOA DUTEN HISTONEN
DESMETILASEN ETA ZITOKROMOEN
ERREAKTIBITATEARI BURUZKO AZTERKETA
KONPUTAZIONALAK**

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.

LABURDURAK ETA AKRONIMOAK

Å	Ångström
α-HOTMX	α-hidroxitamoxifenoa
ADN	Azido desoxirribonukleikoa (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ADP	Adenosin difosfatao
Ala	Alanina
ARN	Azido ribonukleikoa (<i>Ribonucleic acid</i>)
Asp	Azido aspartikoa
ATP	Adenosin trifosfatao
Coa	Koentzima A
Cpd I	I konposatua (<i>Compound I</i>)
CYP450	Zitocromo P450
Cys	Zisteina
DACS	Deazetilzefalosporin C sintasa
DAOCS	Deazetoxizefalosporin C sintasa
DFT	Dentsitate Funtzionalaren Teoria (<i>Density Functional Theory</i>)
FAD	Flabina eta adeninaren dinukleotidoa (<i>flavin adenine dinucleotide</i>)
FMO	Flavinmonooxigenasa
Glu	Azido glutamikoa
H	Histona
HAT	Histonen azetiltransferasa
HAT	Hidrogeno atomoaren transferentzia
HD	Histonen desmetilasa
HDAC	Histonen desazetilasa
HF	Hartree-Fock
His	Histidina
HMT	Histonen metiltransferasa

IDO	Indoleamin 2,3-dioxigenasa
Ile	Isoleuzina
Jmj	Jumonji
K	Lisina
KDM	Lisinen desmetilasa
LANL	Los Alamos laborategi nazionala (<i>Los Alamos National Laboratory</i>)
Leu	Leuzina
LSD	Lisinarekiko espezifikoa den histona desmetilasa (<i>Lysine-specific histone demethylase</i>)
Lys	Lisina
MAO	Monoaminoxidasa
MM	Mekanika molekularra
Me	Metiloa
MECP	Energia gutxienerako gurutzaketa puntua (<i>Minimum energy crossing point</i>)
NADP(H)	Nikotinamida adenina dinukleotido fosfatao
NAT	N-azetiltransferasa
N-Me1TMX	N-desmetiltamoxifenoa
PCM	Polarizagarri jarraieren eredua (<i>polarizable continuum model</i>)
PDB	Proteinen datuen bankua
PES	Energia potentzialaren gainazala (<i>potential energy surface</i>)
PHD	Prolil hidroxilasa
Phe	Fenilalanina
QM	Mekanika kuantikoa (<i>Quantum mechanics</i>)
R	Ordezkatzaileak
Ser	Serina
SET	Elektroi bakarreko transferentzia (<i>Single Electron Transfer</i>)

SUMO	Ubiquitina aldagarri txikia (<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>)
SyrB	Siringomicin biosintesia
TauD	Taurina dioxigenasa
TDO	Triptofano 2,3-dioxigenasa
TMX	Tamoxifenoa
Thr	Treonina
TS	Estado de transición
Tyr	Tirosina
UGT	UDT-glucuronosiltransferasa
Val	Balina
ZPVE	Zero puntu bibrazionalaren energia (<i>zero point vibrational energy</i>)

Jmj-C Dominioa duten Histonen Desmetilasen eta Zitokromoen

Erreaktibitateari buruzko Azterketa Konputazionalak

1. KAPITULUA Sarrera Orokorra	
1.1 Oxigeno molekularren funtzio biologikoa	1
1.2 Ez-hemo oxigenasak	6
1.2.1 α -zetoglutaratoarekiko menpeko diren entzimak	10
1.3 Hemo taldea duten entzimak	13
2. KAPITULUA Helburuak	
2.1 Helburuak	19
3. KAPITULUA Metodo Konputazionalak	
3.1 Sarrera	21
3.2 Hasierako egituraren aukeraketa	23
3.3 Metodo Konputazionalak	24
3.3.1 Mekanika Molekularreko Metodoak	24
3.3.2 Metodo Mekanokuantikoak	26
3.3.3 Mekanika Kuantikako eta Mekanika Molekularreko Metodoak (QM/MM)	27
3.3.4 Dinamika Molekularreko Metodoak	28
3.4 Ezaugarri molekularren kalkulua metodo mekanikokuantikoen bitartez	29
3.4.1 <i>Ab initio</i> Metodoak	29
3.4.1.1 Hartree-Fock hurbilketa	29
3.4.1.2 Base atomikoak	31
3.4.1.3 Hartree-Focken ondorengo metodoak	
eta Multikonfigurazionalak	34
3.4.2 Metodo semienpirikoak	37
3.4.3 Dentsitate Funtzionalaren Teoria	38
3.4.1.1 B3LYP Funtzionala	39
3.5 Sakabanatze energiaren tratamendua	40
3.6 Disolbatzailearen tratamendua	42
3.7 Puntu geldikorren eta espinen arteko energia gutxieneko gurutzaketa puntuaren karakterizazioa	43
3.7.1 Energia potentzialen gainazala	43

3.7.2 Bi egoeren arteko erreaktivitatea	45
---	----

4. KAPITULUA Jmj-c dominioa duten histonen desmetilasek katalizatutako lisina taldeen desmetilazio erreakzioa

4.1 Epigenetika	49
4.2 Histonen desmetilasak	55
4.2.1 Lisinen desmetilasa zehatzak	57
4.2.2 Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasak	59
4.2.3 Ziklo katalitikoak	64
4.3 Emaiza konputazionalak eta hausnarketa	70
4.3.1 Trimetilatatutako Substratoak	71
4.3.2 Dimetilatatutako Substratoak	77
4.3.2.1 <i>Out</i> orientazioa duten dimetilatatutako substratoak	78
4.3.2.2 <i>In</i> orientazioa duten dimetilatatutako Substratoak	81
4.3.3 Monometilatutako Substratoak	88
4.4 Ondorioak	100

5. KAPITULUA Zitokromo P450 familiak katalizatutako aminen desmetilazio erreakzioa

5.1 Zitokromo P450aren familia	104
5.2 Zitokromo P450ek katalizatutako oxidazio erreakzioak	108
5.3 Farmakoen metabolismoa	113
5.4 Emaiza konputazionalak eta hausnarketa	119
5.4.1 Trimetilaminaren desmetilazioa	120
5.4.2 Dimetilaminaren desmetilazioa	123
5.4.3 Metilaminaren desmetilazioa	129
5.4.4 Farmakoen metabolismoa: tamoxifenoa aztertzeko eredu moduan	133
5.5 Ondorioak	143

6. KAPITULUA Ondorio Orokorrak

6.1 Ondorioak	145
---------------	-----

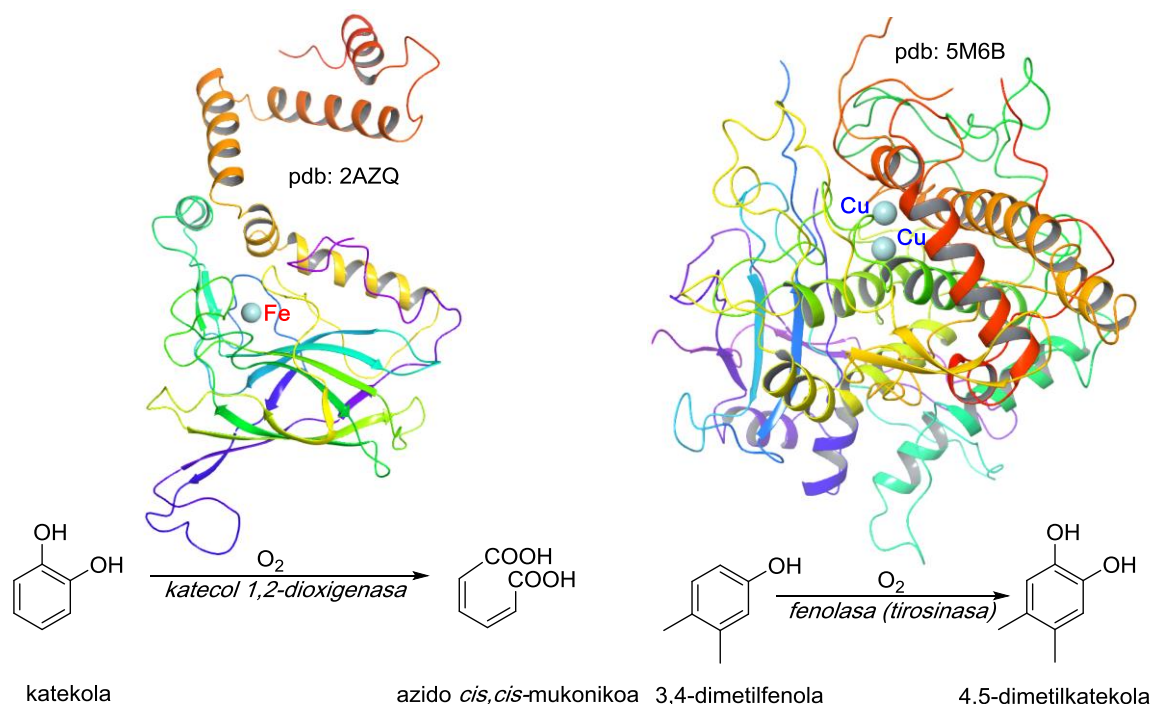
1. SARRERA OROKORRA

1.1 Oxigeno molekularren funtzio biologikoa

Oxigeno molekularra bizi aerobikorako funtsezko elementua da. Energia aunitz emateaz gain, konposatu honek oxidatzeko duen gaitasun handiagatik ere bereizgarri da. Izan ere, bera erreduzitzerako garaian sortzen den produktu bakarra ura izan ohi da. Halaber, sistema biologikoentat oinarrizko diren molekulentzat ere oxigeno iturri da.

Naturan oxigenoaren betebeharrak ez dira orain dela urte gutxi batzu arte ezagutu. XX. mende erdialderarte, oxigenoa erreakzionatzeko eta substratu organikoei adizionatzeko egonkorregia zela pentsatzen zen. Ordurarte, sistema biologikoen oxigeno iturria ura zela uste zen. 1955. urtean aldiz, zenbait ikerlarik $^{18}\text{O}_2$ eta H_2^{18}O erabiliz ideia hau okerra zela frogatu zuten. 1.1. Eskeman ageri diren bi erreakzioak aztertuz.¹ Honela, Masonek *et al.*^{1a} 3,4-dimetilfenolak fenolasarekin (tirosinasa bezala ere ezagutua), 4,5-dimetilkatekolaren (2-hidroxi-4,5-dimetilfenola) sintesian gehitzen zen oxigenoa, urarena izan beharrean, oxigeno molekularrena zela ikusi zuten. Aldi berean, Hayaishik beste ikerlari batzuekin batera,^{1b} azido cis,cis-mukonikoa (azido (2Z, 4Z)-hexadiendioikoa) katekol 1,2-dioxigenasak katalizatutako katekoletik (o-hidroxifenol) abiatutako erreakzioan behar diren oxigenozko bi atomoak, berriro ere oxigenoak ematen zituela frogatu zuten. Beraz, aurkikuntza hauei esker, oxigeno molekularra ezarri zen substratu organikoen oxigeno iturri bezala, entzimak erabiliz katalizataile moduan. Aurkikuntza hauek, oxigenasa entzimen familia berriaren sorrera ahalbideratu zuten.

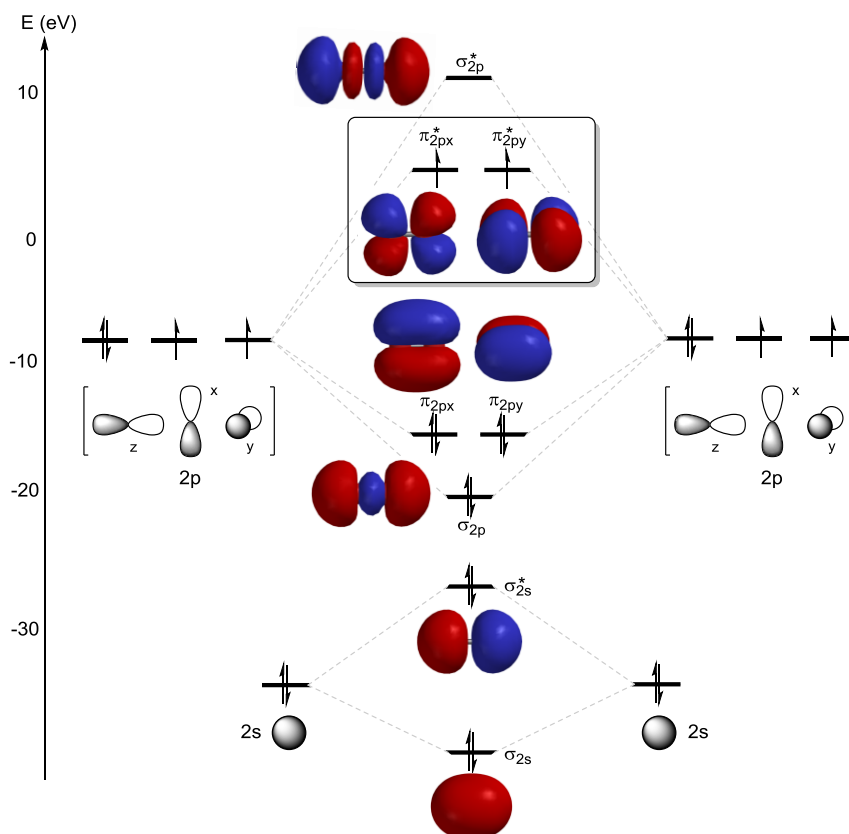
¹ a) H. S. Mason, W. L. Fowlks, E. Peterson, *J. Amer. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2914-2915; b) O. Hayaishi, M. Katagiri, S. Rothberg, *J. Amer. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 5450-5451.



1.1. Eskema. Oxidazio prozesuak oxigeno molekularren bitartez eta ez uraren bitartez gertatzen direla egiaztatzen duten bi eraldaketa metaboliko. Prozesu hauek burutzen dituzten metaloentzimen egiturak, baita Protein Data Bank kodeak ere (pdb) irudikatzen dira.

Oxigeno molekularrak bi elektroiei ez parekatuak orbital molekular endekatueta ditu, eta beraz, triplete egoeran dago (ikus 1.1. Irudia). Konposatu organikoek aldiz, elektroiei guztiak parekatuak dituztenez, singlete egoeran daude. Ezberdintasun honek material organikoaren berezko erredukzioa ekiditea ahalbidetzen du, zeinak karbono dioxido eta ura² sortzen duten, baita konposatuaren berezko oxidazioa burutzea ere. Hori dela eta, izaki bizidunek tenperatura fisiologikoetan oxigenoa erabili ahal izateko beste nolabaiteko bilakabideak sortu behar dituzte. Orokorrean, prozesu hauek burutu ahal izateko, bizidunek gune aktiboetan trantsizio metalak dituzten entzimak erabiltzen dituzte.

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



1.1. Irudia. Oinarrizko egoeran dagoen ($S=1$) oxigeno molekularren orbital molekularrak. Triplete egoerari dagozkien orbital molekularrak irudikatu dira.

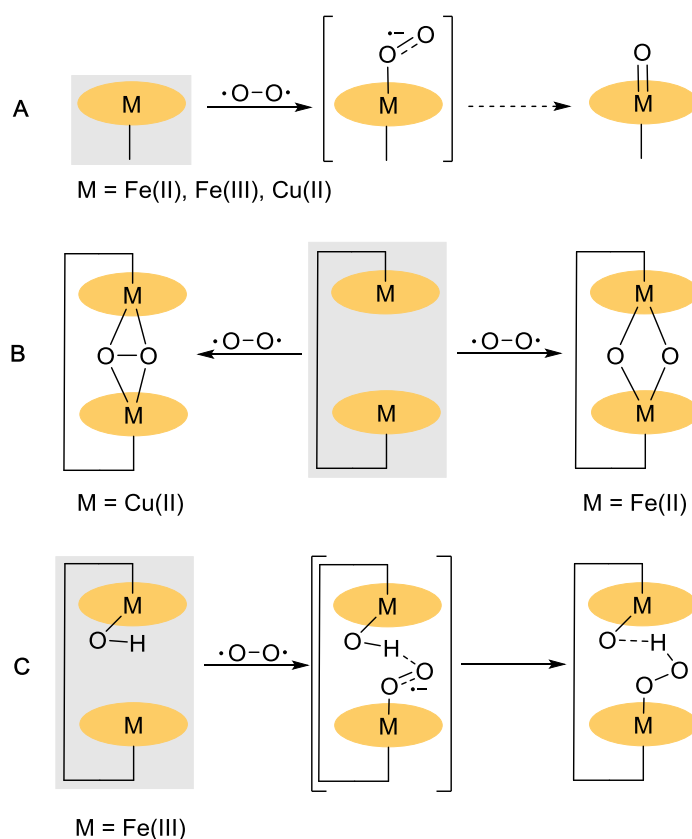
Trantsizio metalek oxidazio eta espin egoera desberdinak izan ditzaketen konposatuak izatea ahalbideratzen dute, gainera oxigenoa aktibatzen dute erreduzitzeko behar dituzten elektroiak ematen baitizkie. Honela, metaloentzima familia desberdinetan ageri diren ohiko metalak burdina eta kobrea dira, baita manganesoa ere baina proportzio txikiagoan.³ Gainera, organismo aerobioek flabina edo pteridina bezalako kofaktotereak izan ditzakete metalen funtzio bera bete ahal izateko. Zenbait kasutan ordea, funtzio hau bete ahal izateko bai metala baita kofaktorea ere behar izaten dira.

Oxigenoa mekanismo desberdinen bitartez aktibatu daiteke, baina erreakzioan zehar guztiek O_2 erreduzitu eta O-O loturaren haustura burutzen

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

1. Kapitulu

dute.⁴ Apurtze hau homolitikoki edo heterolitikoki burutu daiteke. Honela, lehen kasuan artekari erradikalariora osatzeko elektroirik bakarra behar da, eta prozesu hau urratsetan ematen da. Haustura heterolitikoan aldiz, oxigenoa erreduzitzeko behar diren bi elektroirik metalak ematen ditu $M(n)$, eta beraz bera oxidatu egiten da $M(n+2)=O$. Aktibazioaren ondorioz sortutako metal-oxigeno artekariak oso erreakzioak dira, hala nola metal-superoxo, (hidro)peroxo, edo elektroirik eta protoirik transferentzia bitarteko oxo espezieak (1.2. Eskema).⁵



1.2. Eskema. Oxidasek eta oxigenasek O_2 aktibatzen dituzten moduen irudikapena, zentru metaliko batekin (A) eta birekin (B eta C).

Naturan, bi entzima famili dira oxigenoa erabiltzen dutenak beraien funtzioak betetzeko, oxidasek eta oxigenasek hain zuzen ere. Oxidasek,

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.

elektroien transferentzia burutzen dute substratetik oxigenora, azken hau peroxido, superoxido edo ur modura erreduzitzen dutelarik substratora oxigeno atomorik gehitu gabe. Oxigenasak ordea, substratoei atomoak gehitzen dizkieten entzimak dira, zeinak bi azpifamilietan sailkatu daitezkeen, monoxigenasak eta dioxigenasak.⁶ Entzima hauek, erabiltzen dituzten oxigeno atomo kopuruaren arabera bereizten dira. Horrela, lehenak atomo bakarra gehitzen diete substratoari, beste oxigeno atomoa erreduzituz ura sortzeko. Dioxigenasek oster, oxigenoaren bi atomoak erabiltzen dituzte substrato bakarrari edo biri gehitzeko. Gainera, burdinarekiko menpeko diren dioxigenasek porfirina izan dezakete bere egituran, hemo entzimak izeneztatua (*vide infra*). Talde hau ez duten entzimek aldiz, ez-hemo deritzaie.

Hemo talderik gabeko dioxigenasak oso aldakorrak dira, euren funtzioen artean oxigenoaren garraioa, erreazioen katalisia edo konposatuen degradazioa baitaude. Gainera, oso eraginkorrak dira eta substratoekiko hautakortasun handia dute. Halaber, ageri diren organismoetan duten garrantziaren ondorioz, beren garapenean aldaketarik burutuz gero, eragin latzak izango dituzte organismo hauetan. Ildo berean jarraituz, jakina da gizakietan homeostasian gertatutako aldaketek, dioxigenasen funtzionamendu egokian eragina izango dutela. Desoreka hauek, anemia, minbizia, gaisotasun kardiobaskularrak,⁷ edota kolagenoarekin zer ikusia duten gaisotasunekin

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.

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.

1. Kapitulu

erlazionatzen dira, osteoporosiarekin esaterako.⁸ Azken urteotan, AlkB⁹ eta Jmj-C¹⁰ entzimek berebiziko garrantzia hartu dute. Metaloentzima hauek ADN/ARN eta histonetan ageri diren lisinen desmetilazio erreakzioak katalizatzen dituzte hurrenez hurren. Bi prozesu hauek transkripzioarekin erlazionatuak daude. Honenbestez, metaloentzima hauen egiturari eta mekanismoari dagokien azterketek interes handia sortu dute azken urteotan, industria farmazeutiko,¹¹ zein kimikoan,¹² konposatu biomimetikoen diseinuan.

Burdina duten metaloentzimen ugaritasun eta katalizatzen dituzten erreakzioen garrantzia ikusirik, lan honen ildo metal hau duten oxigenasak izango dira. Oinarri hau kontutan hartuz, kapitulu honen ondorengo ataletan hemo talderik gabeko entzimak azalduko dira, euren ezaugarri nagusiak azaltzearekin batera. Talde honetan berebiziko aipamena egingo zaie α -zetoglutaratoarekiko menpeko diren entzimei. Jarraian, hemo taldea duten entzimak ere adieraziko dira, zitokromo P450 entzimen familia izanik esanguratsuena.

1.2 Ez-hemo oxigenasak

Hemo talderik gabeko entzimak bizidun guztietan ageri dira, non era askotako erreakzioak katalizatzen dituzten. Katalizatzeko gaitasun desberdinak izan arren, entzima hauetan oso ohikoa da 2-His-1-karboxilato hirukote aurkegiz ezagutzen den unitate estruktural bat agertzea, amankomuna entzima familia

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.

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.

honetan (ikus 1.3. Eskema).¹³ Unitate hau burdinezko guneko metaliko batez osatzen da, non 3 ligando endogeno lotzen diren. Ligando hauek 2 histidina talde eta karboxilato bat dira, azken hau glutamato edo aspartatoek ematen dutelarik. Hirukote honek oktaedroaren aurpegi bat betetzen du, eta bete gabe gelditzen diren beste hiru koordinazio postuak erraz desplazatzen diren ligandoek betetzen dituzte, hala nola urak, oxigenoak edota kofaktoreek. Malgutasun honek, entzima hauen oxidazio erreakzioak katalizatze gaitasunean eragin zuzena du, oso desberdinak diren erreakzioak katalizatzea ahalbideratzen baitu. Hala nola, konposatu alifatiko eta aromatikoaren hidroxilazio erreakzioak, histonetan ageri diren lisinen desmetilazioa, bai ADNan edo ARNan ere burutzeko gai dira. Gainera, eraztunen handitzeak, desaturazioak, ziklazioak edo halogenazio motako erreakzioak ere katalizatzen dituzte.¹⁴ Nahiz eta katalizatutako erreakzioak oso anitzak diren, beraien egitura bi histidina eta karboxilatoz osatutako hirukotea duten metaloentzimek, mekanismo beretsu baten bitartez aktibatzen dute oxigeno molekularra.

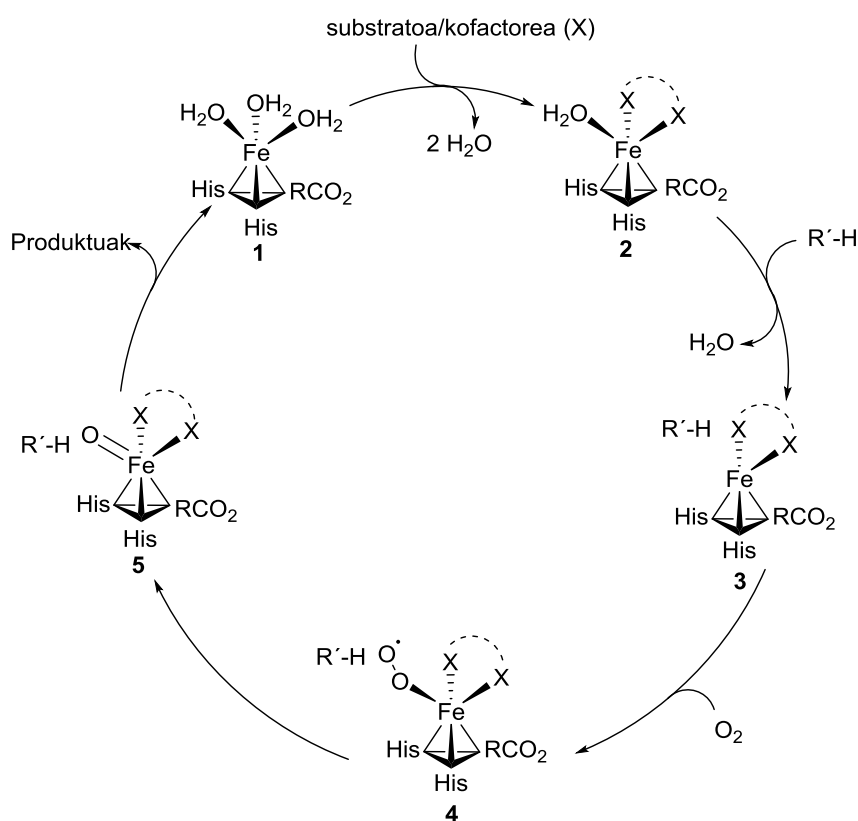
Oxidazioa burutzen duen artekaria osatzeko behar den ziklo katalitiko orokorra 1.1. Eskeman irudikatzen da. Substrato edo kofaktorearen sarrerak ziklo katalitikoaren hasiera ematen du, non bi ur molekula lerratzean bihurtz moduan batzen diren **1** konplexura, **2** konplexua sortuz. Substratoa guneko aktibora sartzeak beste ur molekula bat lerratzen du, **3** artekaria eratuz. Substratoa ez da zuzenean lotzen metalari, baina oxidazioa emateko adina gertu gelditzen da. Behin konposatu pentakoordinatua eratu denean, koordinazio postu bat libre

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.

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.

1. Kapituluua

gelditzen da, eta beraz, metalak oxigenoa aktibatu dezake **4.** artekaria eratuz. Jarraian, oxigenoaren erredukzioa gertatzen da, baita **4.** konplexuan dagoen O-O loturaren haustura ere Fe(IV)=O edo Fe(V)=O frakzio oxidatzaile **5** eratuz.¹⁵ Lehenago aipatu den moduan, haustura hau homolitikoki edo heterolitikoki burutu daiteke. Ziklo katalikoaren mekanismo orokor hau, 80. urtean proliil-4-hidroxisarentzat Hanauske-Abelek eta Günzlerek proposatutako mekanismoan oinarritzen da.¹⁶



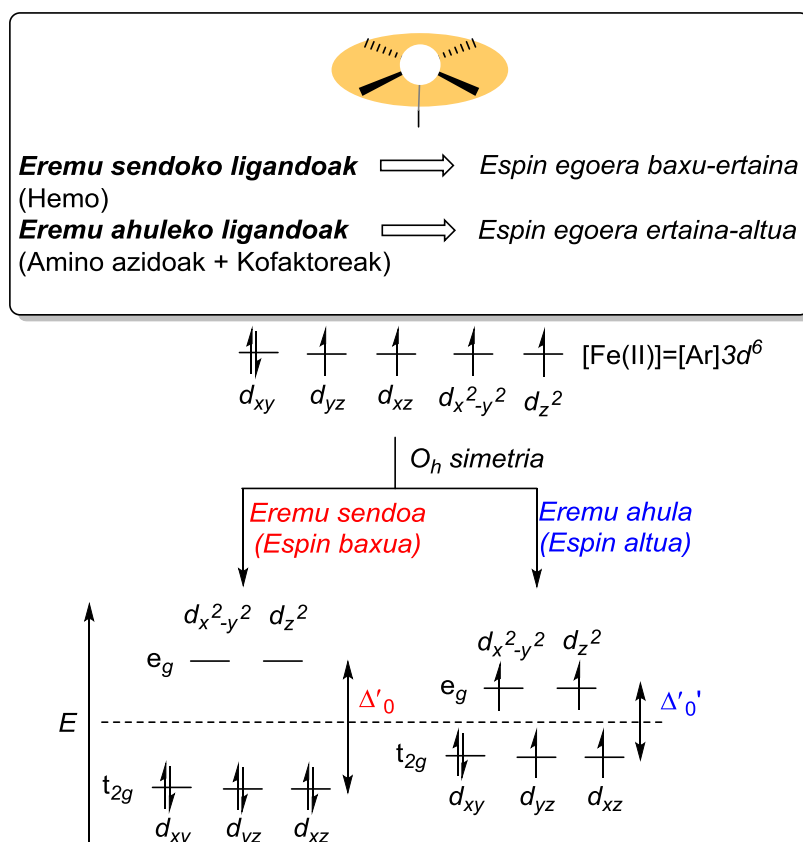
1.3. Eskema. 2-His-1-karboxilato hirukote aurkegia duten hemo talderik gabeko entzimen ziklo katalitiko orokorra.

Hemo talderik gabeko dioxigenasetan, Fe(II) edo Fe(III)-ri lehen koordinazio esferan batzen zaizkien ligandoak, histidina, glutamatoa, tirosina edo aspartato

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

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

modukoak dira. Ligando hauek eremu ahulekoak dira, hau da, Δ_o txikia sortzen dute. 1.4. Irudian ageri den bezala, konplexu oktaedriko batean d orbitalak t_{2g} eta e_g orbitaletan banatzen dira, energetikoki hurrenkera berean banatzen direlarik. Energetikoki t_{2g} eta e_g orbitalek duten diferentziari, kristal eremuaren desdoblamentuaren energia deritzaio, Δ_o . Hau guztia kontutan hartuz gero, entzima hauen t_{2g} eta e_g orbitalen arteko energia diferentzia txikia izanik, hauek katalizatutako erreakzioak espin egoera altuan burutuko dituztela espero da.



1.4. Eskema. Konplexu oktaedriko baten d orbitalen irudikapen eskematikoa eremu sendo eta ahuleko ligandoen aurrean.

2-His-1-karboxilato hirukote aurkegia duten entzimak, bost taldetan banatzen dira aurkezten duten egitura edo erreaktibitatearen arabera: α -zetoglutaratoarekiko menpeko diren entzimak, extradiol dioxigenasak, Rieske oxigenasak eta pterinarekiko menpeko diren hidroxilasak. Azkenik, aipatutako

1. Kapitulu

taldeetan sartzen ez diren entzimak, beste aparteko talde batean elkartzen dira, isopenicilin N-sintasa esaterako.^{15b} α -zetoglutaratoarekiko menpeko diren entzimek, azpifamiliarik zabalena osatzen dutela kontutan izanda, kapitulu honen ondorengo atalean familia hau sakonago aztertuko da.

1.2.1. α -zetoglutaratoarekiko menpeko diren entzimak

α -zetoglutaratoarekiko menpeko diren dioxigenasek entzima familia handia osatzen dute, bai animalia, zein landare, bakterio eta birusetan ere ageri baitira. Oxigeno molekularra aktibatzekeo gai direnez, entzima hauek dituzten bizidunetan berebiziko garrantzia duten eraldaketa oxidatzaileak burutzen dituzte. Oxidazio hoiaren adibide dira jarraian aipatuko diren hainbat eraldaketa edo transformazio. Hala nola produktu naturalen sintesian parte hartzen dute, kolagenoaren¹⁷ edo lipidoen¹⁸ sintesian esaterako, hipoxia egoeren aurrean erantzuna erregulatzen dute,¹⁹ aldaketa postranslazioan parte hartzen dute, histonen desmetilazioan adibidez,²⁰ eta ADN zein ARN konpontzeaz ere arduratzen dira.²¹ Gainera konposatu endogenoen zein exogenoen degradazioan parte hartzen dute, hots, gantz azido eta botiken degradazioan esaterako. Aipatzekoa da ere antibiotikoak sintetizatzekeo duten gaitasuna.²² Eginkizun hauek guztiak betetzeko, entzima hauek mota askotariko oxidazio erreakzioak katalizatzekeo gai

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.

dira. 1.5. Eskema, entzima hauek katalizatutako erreakzio bereizgarrienen laburpen txiki bat irudikatzen da.²³

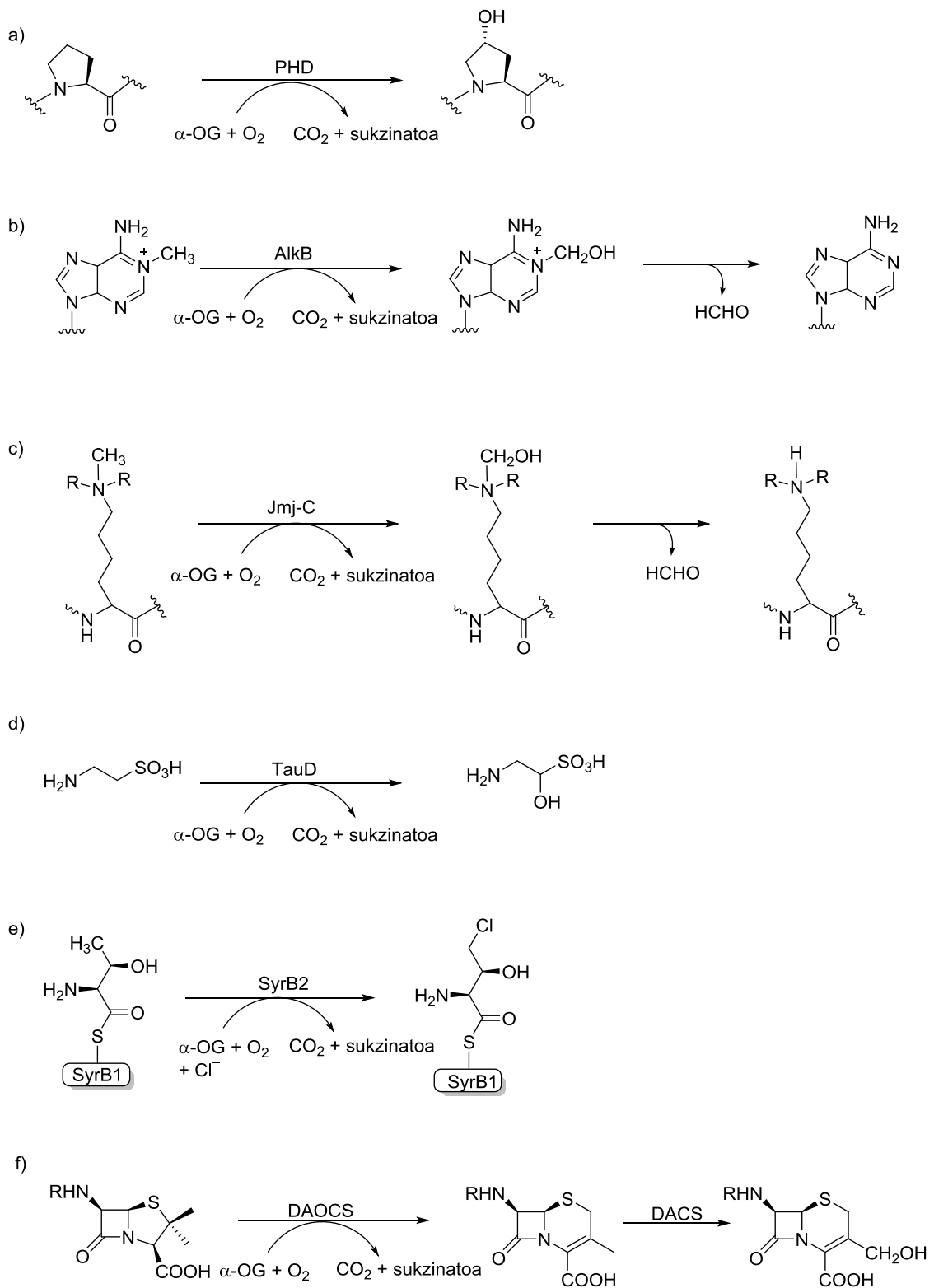
Metaloentzima hauen substratu dira aminoazido desberdinak, prolinak (Eskema 1.5a) eta lisinak (Eskema 1.5c) kasu, edota azido nukleikoak (Eskema 1.5b) zein taurina (Eskema 1.5d), eta beraz, beraiekin kontaktuan jartzerakoan hidroxilazio erreakzioak jasaten dituzte. C-H loturak aktibatzeke duten gaitasuna, halogenazio erreakzioetan (Eskema 1.5e) ere atzematen da. Halaber, aipatzekoa da antibiotiko β -lactamikoen sintesian *Streptomyces* motako mikroorganismoetan esaterako, dioxigenasek burutzen duten zikloen handitze erreakzioa ere (Eskema 1.5f).

Gaur egun, substratoen hidroxilazioa da α -zetogluturato eta Fe(II)-rekiko menpeko diren oxigenasen erreakziorik ohikoena, erreakzioa hau izanik entzima hauek animalietan katalizatzen duten oxidazio mota bakarra.²⁴

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.

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

1. Kapituluua



1.5. Eskema. Hemo talderik gabeko eta burdinaren menpeko diren entzimek katalizatutako erreakzio esanguratsuen irudikapena, a) prolin hidroxilasa (PHD), b) AlkB entzima konpontzaileak (AlkB), c) Jmj-C dominioa duten lisinen desmetilasak, d) taurina dioxigenasa (TauD), e) SyrB2 halogenasa, f) deacetoxizefalosporin C sintasa (DAOCS), deacetilzefalosporin C sintasa, (DACS).

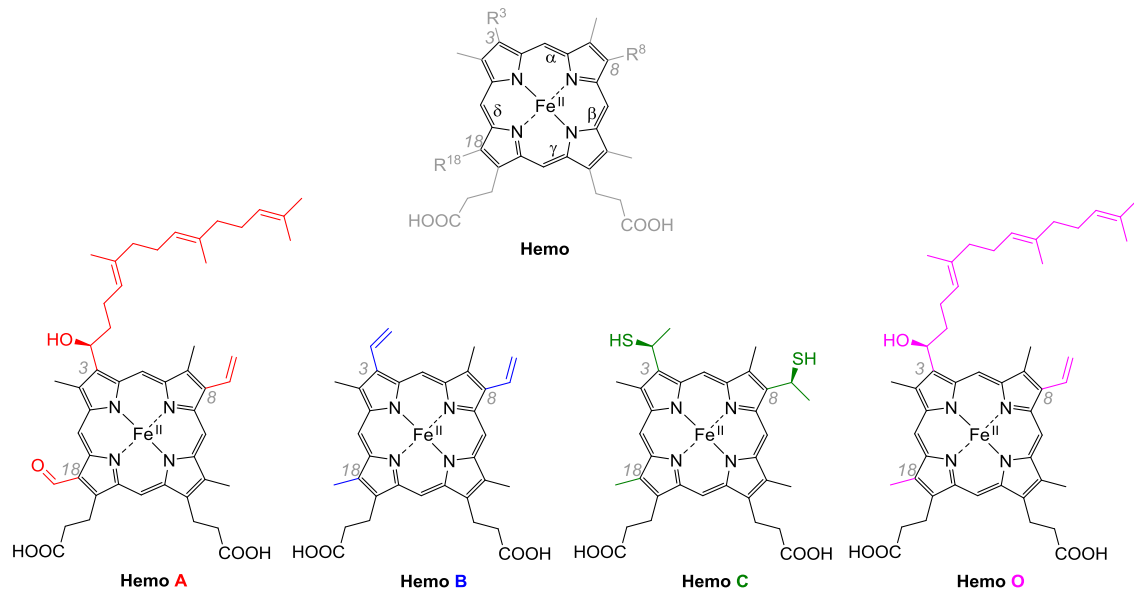
1.3 Hemo taldea duten entzimak

Hemo entzima bezala ezagutzen diren entzimak, euren egituran izen bereko konplexua izateagatik bereizten dira. Mota honetako entzimen presentzia oso nabarmena da naturan, zelula prokariotetan zein eukarioetatan ageri direlarik.²⁵

1.2. Irudian atzeman daitekeen moduan, hemo taldea protoporfirinari batzen zaion burdinezko gune metaliko batez osaturik dago. Lotura hauek pirrol eraztun bakoitzean ageri diren nitrogenu atomoen bitartez burutzen dira. Zehazki, bi imino (=N-) eta bi nitrogenu pirroliko (-NH-) izanik. Aldi berean, eraztun hauek metilideno (-CH=) taldeen bitartez lotzen dira euren artean 1.2. Irudian α , β , γ , eta δ bezala adierazten direlarik. Halaber, pirrol eraztun bakoitza metilo batez ordezkaturik dago, eta protoporfirina bakoitzak azido propanoizkoko bi albo kate dituzte. Bostgarren ligandoa proteina motaren arabera aldatu egiten da, baina beti aminoazido bat izan ohi da, zeinak balentzia asetzen duen, zisteinaren kasua, edota soilik koordinatzeko funtzioa betetzen duen, histidinaren moduan. Honenbestez, hemo talde desberdinen arteko diferentzia tetrapirrol eraztunetan ageri diren ordezkatzailetan datza (ikus 1.2. Irudia). Esaterako, naturan nagusitzen diren hemo taldeak B eta C dira, zeinak 3 eta 8 posizioko ordezkatzailetan desberdintzen diren, 2 talde biniliko eta bi talde sulfuro dituztelarik hurrenez hurren. Egitura honen kolorea, fluoreszentzia edota egitura laua izatea, egituran ageri diren lotura konjokatuen ondorio dira.

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.

1. Kapituluua



1.2. Irudia. Hemo taldearen egituraren irudikapena, baita hemo talde nagusien irudikapena ere.

1.2. Irudian ageri den Hemo B taldea da ugaztunetan gaurdaino atzeman den bakarra, protoporfirina IX bezala ere ezagutua. Hemoglobina, mioglobina, edo zitokromoak hemo talde hau duten proteinen adibide dira.

1958. urtean Klingenbergek²⁶ eta Garfinkelek²⁷ gibelesko zelulak karbono monoxidoarekin erreduzitzerakoan ez-ohiko Soret bandaren xurgapena eragin zutela ohartu ziren, 450nm xurgatu baitzuten 420 nm izan beharrean. Urte batzu beranduago, Omurak eta Satok pigmentua proteina bat zela egiaztatu zuten eta P450²⁸ bezala izendatu zuten. Estabrookek *et al.*²⁹ proteina honek esteroideen hidroxilazioan parte hartzen zutela frogatu zuten.

Urteak igaro ahala hemo taldeari, baita ageri den metaloentzimei ere, geroz eta funtzio gehiago egotzi zaizkien arren, betebeharrak hauek hiru taldetan batu

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

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

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

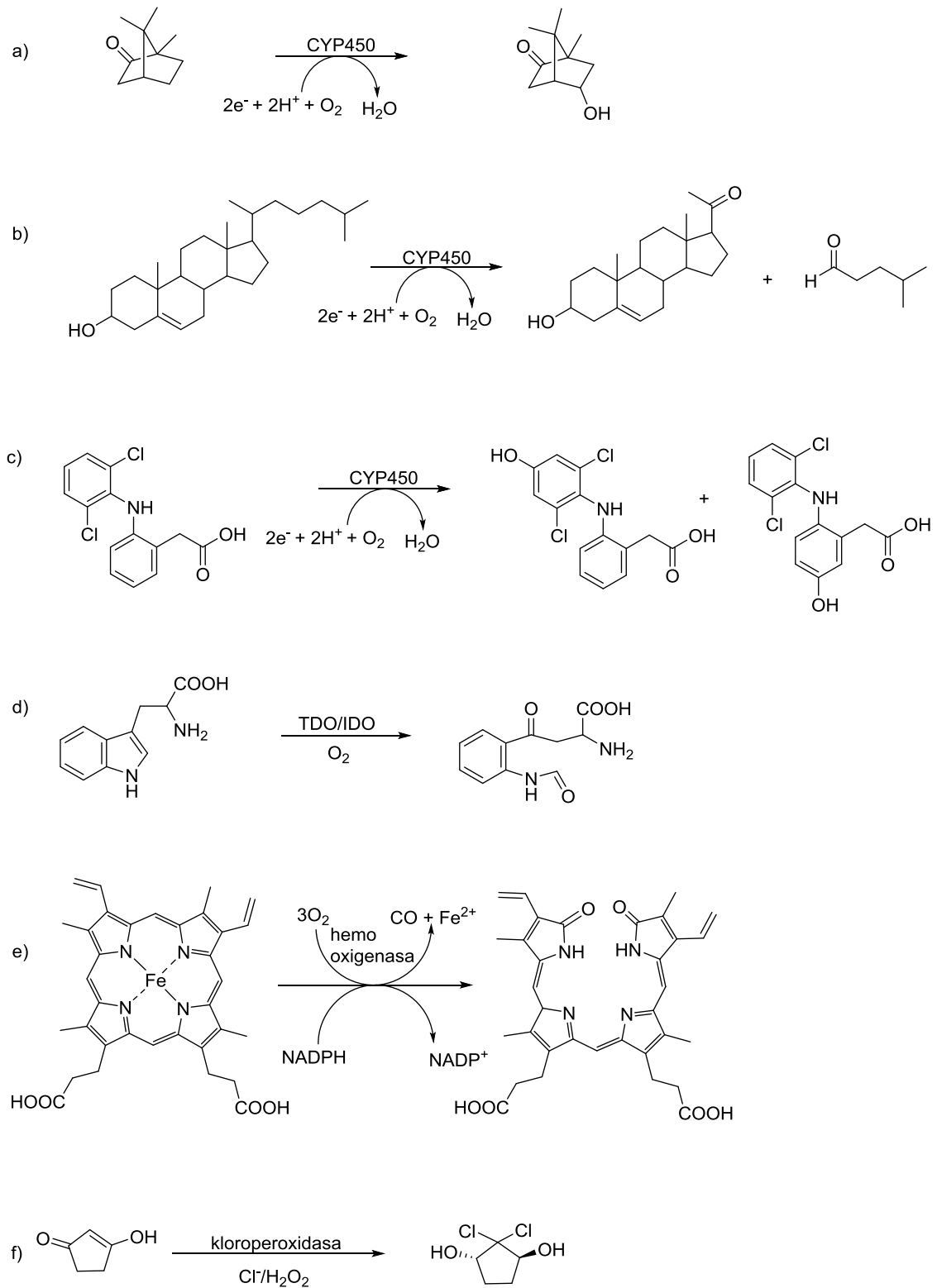
²⁹ R. W. Estabrook, O. Rosenthal, D. Y. Cooper, *Biochem. Z.* **1963**, 338, 741-755.

daitezke: oxigenoaren garraioa, erredox prozesuak eta elektroien garraioa hain zuzen ere. Gainera, betetzen duten funtzioa axial posizioan ageri den aminoazidoarekin erlazionatzen da. Zentzu honetan, oxigenoa garraiatzeaz arduratzen diren proteinetan hemoglobinarekin kasuan bezala, histidinak betetzen du axial posizioa. Erredox prozesuak katalizatzen dituzten entzimek aldiz, zitokromo P450 familiak esaterako, histidina, tirozina, metionina edo zisteina taldeak izaten dituzte. Azkenik, elektroien garraioaz arduratzen diren proteinek 5. eta 6. Posizioetako koordinazio hutsuneak aminoazidoen bitartez betetzen dituzte, eta beraz, ez dira oxigenora lotzen. Dena den, funtzio hauek guztiak bete ahal izateko, porfirina trantsizio metal batekin kelatatzen da, zeina oxigenoari batzeaz edo elektroien garraioaz arduratzen den. Lehen esan den moduan, entzima hauetan burdina izan ohi da ugaztunetan ageri den metala.

1. Kapituluia

Hemo taldea duten eta burdinaren menpeko diren entzimen familietatik, biologikoki garrantzi gehien duten entzimak zitokromoen familia anitza da. Entzima hauek oxigeno molekularra aktibatu eta sustratoei batzeko gai dira. Gainera, oxidazio erreakzio ugari katalizatzen dituzte. Ez-hemo entzimek egiten duten moduan, entzima hauek ere konposatu alifatiko eta aromatikoak hidroxilazioa, N-alkilatutako konposatuen desmetilazioa, C-H loturen halogenazioa eta hainbat substratoen O-desmetilazioa burutzen dituzte besteak beste. Katalizatzen dituzten erreakzio mordoak artean, aktibatu gabe dauden C-H loturen oxidazioa da aipagarriena, zeinak hidroxilo motako C-OH artekariak eratzen dituzten Adibide moduan, 1.6. Eskeman entzima hauek eta hemo taldea duten beste entzima batzuek katalizatutako erreakzio batzuen laburpen txiki bat irudikatzen da.^{6a, 30}

³⁰a) 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.



1.5. Eskema. Hemo taldea duten eta burdinaren menpeko diren entzimek katalizatutako erreakzioen irudikapen eskematikoa, a), b) eta c) zitokromo P450, d) triptofano 2,3-dioxigenasa, e) hemo oxigenasa, g) kloroperoxidasa.

1. Kapitulu

Bereziki aipagarria da botiken metabolismoan zitokromo P450 entzimen familiak betetzen duen papera. Entzima hauek, lehen pausoko metabolismoa jasaten duten farmako guztien metabolizazioaz arduratzen dira,³¹ zeinak beraien bioerabilgarritasunean eragiten duen zuzenean. Zentzu honetan, printzio aktiboen dosi zehatza egokitu ahal izateko, garrantzitsua da sortzen diren metabolitoak aurreikusi ahal izatea, baita persona bakoitzak metabolizatzeko duen joera jakitea ere. Gainera, hormona esteroideen eta gantz azidoen biosintesian ere parte hartzen dute entzima hauek.^{6c} Zitokromoen familiak betetzen duten funtzioen garrantziagatik, hemo motako entzimen eredu bezala bezala aukeratu zen sakonago aztertzeko Doktoretza Tesi honetan.

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

2. HELBURUAK

2.1 Helburuak

Arestian aipatu bezala, jakina da gizakietan hemo talderik gabeko eta α -zetoglutaratoarekiko menpeko diren oxigenasek katalizatzen duten oxidazio erreakzio bakarra N-metilo taldeen C-H loturen hidroxilazioa dela. Entzima hauek bide hau erabiltzen dute (poli)metilaminioen N-desmetilazioa burutzeko. AlkB entzimak, eta Jmj-C dominio duten lisina desmetilasak hurrenez hurren, ADN-aren, zein berari atxikitutako proteinen metilazio maila mantentzearen arduradun dira. Mekanismo honen aldaketa batek, proteinen transkripzioaren eredu aldaketa eragin dezake, zeina hainbat gaisotasun neurodegeneratiboen, eta beste hainbat minbizi motekin erlazionatzen den. Gainera, N-desmetilazio erreakzioek interes handia sortzen dute, printzipo aktibo ugarietan ageri baita frakzio hau, eta beraz, botiken metabolismoan parte hartzen dute. Zitokromo P450-aren familia da botiken lehen faseko metabolizazio erreakzioak katalizatzen arduradun nagusia. Erreakzio hauen bitartez, botiken eliminazio errazteaz arduratzen dira.

Gizakietan N-desmetilazio erreakzioa katalizatzen duten bi entzima familia desberdin daudela ikusirik, erreakzio hau modu sakonagoan aztertzea erabaki genuen familia bakoitzeko azpifamilia eredu bat hartuz. Honenbestez, Doktoretza Tesi honen helburu nagusiak ondorengoetan laburbildu daitezke:

1. Mekanika kuantikako metodoen bitartez, Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasek katalizatutako metilazio maila desberdineko lisinen N-desmetilazio erreakzioaren azterketa egingo da.

2. Kapitulu

2. Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasek lisinen N-desmetilazio erreakzioak burutzean lisinen metilazio maila desberdinekiko erakusten duten hautakortasunarekin erlazioa aztertuko da.

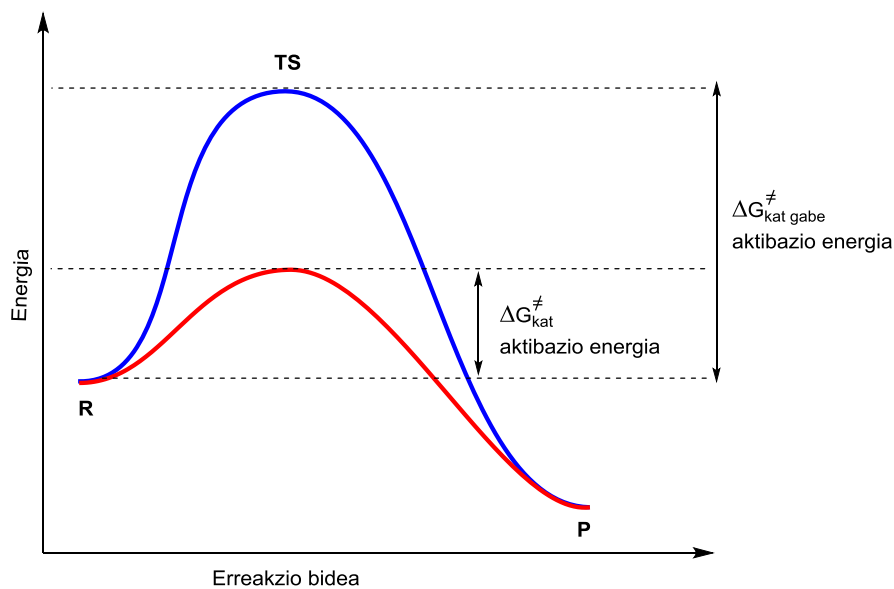
3. Mekanokuantikako metodoen bitartez, zitokromo P450 familiak katalizatutako metilazio maila desberdineko aminen N-desmetilazio erreakzioaren azterketa burutuko da.

4. Metodo desbedinak erabiliz, konputazionalki aztertuko da zitokromo P450 familiak katalizatutako erreakzioak *in siliko* botiken metabolizazio primarioak aztertzeko proposatutako eredu egokia den ikusiko da. Tamoxifenoa aukeratu dugu farmakoen azterketa burutzeko eredu bezala.

3. METODO KONPUTAZIONALAK

3.1 Sarrera

Entzimak izaki bizidunetan ageri diren katalizatzaile naturalak dira, zeinak erreakzio anitz errazten dituzten euren energia aktibazioa gutxitzerakoan (ikus 3.1 Irudia). Erreakzioko abiadura handitzen dute, trantsizio egoeraren energia gutxitzean substratoen aurre antolaketen menpeko eta/edo erreaktibo



3.1. Irudia. Katalizatu gabeko erreakzio bidea (urdinez) eta katalizatutako erreakzio bidea (gorriz).

Arlo esperimentaletik zehazki entzimek erreakzioak nola katalizatzen dituzten jakitea nahiko lan zaila izan ohi da, proteina hauek duten egituren konplexutasun eta funtzioagatik. Puntu honetantxe, simulazio eta modelizazio molekularrak oso erabilgarriak dira, teknika esperimentalen bitartez lortutako informazioa osatzen baitute, eta beraz, prozesuen ulermena erraztu. Honela, kimika konputazionala haratago doa, erreakzio kimikoei buruzko informazioa eskainiz, baita trantsizio egoeren zein artekarien egitura geometriko eta elektronikoen buruzkoa ere. Trantsizio egoeren egiturak ezin dira esperimentalki isladatu, eta erreakzioen

3. Kapitulu

artekariak ere ezin dira beti horrela lortu.¹ Gainera, posible da datu esperimentalik gabe ere *a priori* azterketa konputazionalak burutzea.

Honenbestez, teknika konputazionalak prozesu biokimikoak arlo estruktural eta elektronikotik ulertzen laguntzen dutela ondoriozta daiteke. Aldi berean, prozesu biokimikoetan ematen diren aldaketak gaisotasunekin erlazioa izan dezaketela kontutan hartuz gero, erreminta hauek ere lagungarriak izan daitezke botika berrien diseinuan. Honen erakusle dira zitokromo P450 entzimen familia. Sarreran adierazi den moduan, entzima hauek botika ugariaren metabolizazioaz arduratzen dira. Konputazionalki metabolitoek izango dituzten egiturak iragartzeak eraginkorrago eta toxizidade gutxiagoko printzipio aktiboen diseinuan lagungarri izango dira. Aldi berean, entzimek funtzio katalitikoa nola betetzen duten ulertzeko eta ezagutzeko lagungarri dira erraminta hauek. Jmj-C edo AlkB oxigenasak esaterako, epigenetikarekin erlazionatzen diren entzimak dira eta beraz, minbizi, alzheimer edo parkinson moduko gaisotasunekin erlazionatzen dira eurek eragiten dituzten aldaketa post tranlazionalak. Gainera, sistema entzimatiakoek selektibitate handia aurkezten dutenez, gune aktiboak ahalik eta hobekien ezagutzeak katalizatzaile eraginkorragoen diseinua ahalbideratuko dute.

Jarraian, entzimekin kalkulu konputazionalak burutzeko kontutan izan behar diren atal garrantzitsuenak aipatuko dira.

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

3.2 Hasierako egituraren aukeraketa

Entzimek katalizatutako erreakzio kimikoen modelizazioak abiapuntu bezala benetazko egiturei ahalik eta parekotasun gehien dituzten egituretatik abiatzea eskatzen dute. Zentzu honetan, X Izpien kristaletatik lortutako egiturak abiapuntu hartzea ohikoa izaten da. Egitura kristalino hauek ahalik eta zehaztasun handienarekin adierazi behar dute aztertu nahi den entzima-substrato konplexua. Horretarako, entzima-inhibitzaile konplexuen egitura kristalinoek eskaintzen dute informaziorik egokiena. Bertan, entzimaren gune aktiboaren tokia ikusten da, baita inhibitzailea nola batzen den, horrela sistema hauen talde garrantzitsuenak zein diren jakin daiteke. Gainera, elkarketa honek bi egiturak nola elkartzen diren ere adierazten dute, orokorrean entzima eta substratoak elkartzen diren modukoa izaten delarik, bai trantsizio egoeretan, baita artekarietan ere. Zoritxarrez, zaila izaten da konplexu hauek isladatzea, batzuetan oso erreaktiboak baitira.

Behin X Izpien egitura aukeratu denean, landu egin behar da, protoirik gabeko egiturak izaten baitira, eta beraz, eskuz gehitu egin behar dira. Gainera, entzima eta substratoa ur ingurunean jarri behar dira, egituran esplizituki ageri ez diren ur molekulak gehituz, edota egitura disolbatzaile jarrai baten ezaugarriak berregiten dituen ingurune dielektrikoan murgilduz.

Behin hasierako egitura izanda, entzimen gune aktiboa bereiztea izango da hurrengo urratsa, zeina kofaktoreei lotua egon daitekeen zenbait kasutan.

Azkenik, egiturak optimizatzeko metodo konputazionala aukeratu behar da. Lehen esan bezala, sistema biologikoen azterketak mugatuak daude duten tamaina handiagatik. Hori dela eta, metodo egokia aukeratzeko garaian kalkulo

3. Kapitulu

denbora hartu behar da kontutan, oreka egokia bilatuz zehaztasun eta bideragarritasunaren aldetik

3.3 Metodo konputazionalak

Ondorengo ataletan entzimen modelizazio molekularren azterketan erabiltzen diren metodo konputazional erabilienean laburpen bat burutuko da. Gainera, Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasek eta zitokromo P450 familiak katalizatutako N-desmetilazioaren azterketan erabilitako metodoak ere zehaztuko dira.

3.3.1 Mekanika Molekularreko Metodoak

Mekanika molekularra (MM) atomo desberdinen artean ematen diren elkarrekintzetan oinarritzen den metodoa da, molekuletan dauden elektroiak esplizituki tratatu gabe. Orokorrean, eta modu sinplean, metodo honek atomoak erradio jakin bateko esfera moduan deskribatzen ditu, beraien artean loturak malgukiak bezala direla kontutan hartuz, oszilatzaile armoniko klasikoaren legeak betez. Metodo hauek sistema guztiaren energia totala ondorengo ekuazioaren bitartez lortzen dute:

$$E = \sum E_r + \sum E_\theta + \sum E_\omega + \sum E_{coul} + \sum E_{vdw} \quad (2.1)$$

Non E sistemaren energia totala da, E_r tentsio energia, E_θ flexio energia, E_ω torsio energia, E_{coul} elkarrekintza elektrostatikoei dagokien energia eta azkenik E_{vdw} van der Waalsen energia da.

Metodo hauek sistema haundiak modu azkarrean aztertzeke erabilgarriak dira. Dena den, euren erabilera mugatua dago indar eremua parametrizatu

duten molekulentzat. Gainera, ez dute erreakzioen mekanismoa zehazteko balio, ezta erreakzio kimikoei dagokien berrantolaketa elektronikoa zehazteko ere. Biomolekulen azterketan erabilien diren MM-ko metodoak ondorengo hauek dira: CHARMM,² AMBER,³ GROMOS⁴ y MMFF.⁵

Docking-a da metodologia hau erabiltzen duen aplikazio bat. Konposatu eta makromolekula biologikoen arteko elkartzeko moduan aurreikusteko erabiltzen den aplikazioa da, hots, estekatzaile-erzeptore motako konplexuak aztertzen dira hauen bitartez. Honenbestez, botika berrien diseinu eta aurkikuntzan oso erabilia den teknika bat da hau.⁶

Azterketa osoak estekatzaile eta erzeptorearen arteko elkartzeko modu guztien analisia behar du, energetikoki kuantifikatuz. Kalkuluak sinplifikatzeko asmoarekin, aztertu nahi den sistema modu trinkoan kontsideratuko da, barneko gradu askeak finkatuz horretarako, hiru translazioak eta hiru rotazioak izan ezik. Metodo honetan, molekulak euren artean elkarrekintza izan dezaten kokatzen dira, eta elkarrekintza hoiei dagozkien energiak aztertzen dira. Hori dela eta, elkarrekintza ez lotzaileak aztertzen dira soilik.

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.

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.

3. Kapitulu

Metodo honetan erabili ohi den beste hurbilketa bat hiru dimentsioko gelaxken erabiliaz errezeptorearen gune aktiboaren ingurunea mugatzen den.

Lan honetan Glide⁷ programa erabiliaz docking froga batzu burutu dira, zeinak MMFF indar eremua erabiltzen duen.⁸

3.3.2 Metodo Mekanokuantikoak

Erreakzio kimikoen modelizazioak, lotura kimikoen haustura eta eraketa deskribatzeko gai den metodo konputazional baten beharra du. Zentzu honetan, mekanika kuantikoak (QM) molekula baten konfigurazio desberdineko nukleoentzat esplizituki kalkulatu duen distribuzio elektronikoa. Honenbestez, bere erabilera erreakzio kimikoen azterketan oso hedatua dago.

QM-kako metodo desberdinak daude, denborarekiko menpekotasunik gabeko Schrödingerren⁹ ekuazioaren ebazpenean oinarritzen direnak:

$$\hat{H}\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = E \Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \quad (2.2)$$

Non \hat{H} hamiltondar operadorea den, $\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R})$ elektroi eta nukleo desberdinei dagokien uhin funtzioa, eta E uhin funtzio horri dagokion energia izanik. Hortaz, espresio honek hamiltondarraren bitartez molekulen energia zinetikoa eta potentziala biltzen ditu, kokapen nuklearren \mathbf{R} eta kokapen elektronikoen \mathbf{r}

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.

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

mendekoa den. Ekuazio hau elektroi bat baino gehigo duen sistementzat doi-doi ebatz ezina da, eta hortaz, kasu hauetan hurbilketak erabili behar izaten dira.

Born-Oppenheimerren¹⁰ hurbilketak nukleo eta elektroien mugimenduak modu independentean hartzen ditu kontuan, euren arteko abiadura desberdinen ondorioz.

Hurbilketa honen ondorioz, zati elektronikoan nukleoaren energia zinetikoa ez da barneratzen, gainera geometria molekular zehatz batentzat nukleo-nukleo elkarrekintza Coulonbikoa konstantea dela kontsideratzen da. Konstante hau energia elektronikoari E_e gehitu behar zaio. Honenbestez, Schrödingerren ekuazioa zati elektronikoarekin ebatzen da soilik, eta beraz, ekuazioak 3.3 ekuazioan adierazten den forma hartzen du, Schrödingerren ekuazio elektroniko bezala ere ezagutzen dena.

$$\hat{H}_e \Psi_e(\mathbf{r}; \mathbf{R}) = E_e(\mathbf{R}) \Psi_e(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \quad (2.3)$$

3.3.3 Mekanika Kuantikako eta Mekanika Molekularreko Metodoak (QM/MM)

Metodo hauek QM metodoen zehaztasuna eta MM metodoen azkartasunak batzen ditu. Erreakzioetan zuzenean parte hartzen dituzten atomoak QM metodoen bidez aztertzen dira, gainontzekoak MM metodoen bitartez aztertzen direlarik. Kasu hauetan QM bidez aztertzen den zatia txikia izaten da MM bidez aztertzen dena baino. Metodo hauek Warshel eta Levittek¹¹ plazaratu zituzten.

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

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

3. Kapitulu

Molekulen energia hiru elkarrekintzen konbinaketan bidez lortzen dute molekulen energia QM/MM motako metodo hibridoek. Honela, QM eskualdean dauden atomoen elkarrekintzak hartzen dituzte alde batetik, MM eskualdean dauden atomoen elkarrekintza bestetik, eta bi eskualdeen arteko elkarrekintza deskribatzen dute azkenik.

Metodo hauen abantailarik esanguratsuen sistema oso haundiak modu eraginkorrean aztertzeko balio dutela da. Aldiz, eskualde kuantiko eta mekanika molekularren arteko deskonposaketa burutzea da metodo hauen desabantailarik nagusia.

3.3.4 Dinamika molekularreko metodoak

Dinamika Molekularreko¹² simulazio klasikoek Newtonen ekuazioak erabiltzen dituzte atomoen mugimendua deskribatzeko. Honela, metodo hauek atomoen kokapena azelerazio eta abiaduren kalkuluen bitartez lortzen dute. Orainarte azaldutako metodoak ez bezala, hauek denborarekiko menpekoak dira. Honela, simulazio hauetan denbora tarte bat ezartzen da, non atomoei libreki mugitzen eta beraien artean elkarrekintzak burutzen uzten zaien. Modu honetan aztertutako sistemen eboluzio dinamikoa lortzen da. Metodo hauek molekulek jasaten dituzten aldaketa konformazionalari buruzko informazio eskeintzen dute.

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

3.4 Ezaugarri molekularren kalkulua metodo mekanikokuantikoen bitartez

Schrödingerren ekuazioa ebazteko erabiltzen den hurbilketaren arabera, QM metodoak *ab initio*, dentsitate funtzionalaren teoria (DFT), eta metodo semi-empirikoetan sailkatu daitezke.

3.4.1 *Ab initio* Metodoak

Metodo hauek ez dituzte datu experimentaletatik lortutako parametroak erabiltzen Schrödingerren ekuazioa ebazteko. Ekuazio hauek elektroien masa edo Planken konstantea barneratzen dituzte. Dena den, ekuazioak zentzuzko denboran ebatziak izan daitezzen, ondorengo ataletan deskribatzen diren hurbilketak hartzen dira kontuan.

3.4.1.1 Hartree-Fock hurbilketa

Hartree-Focken teorian (HF),¹³ elektroien bakoitzaren distribuzio espaziala ez da gainontzeko elektroien mugimenduen menpeko.

Metodo honetan uhin funtzioa Slaterren¹⁴ determinatearen bidez lortzen da, zeina 3.4 ekuazioan ageri den.

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

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

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

3. Kapitulu

Non N elektroi guztien batura da, eta ϕ espinaren orbitala, hots, orbital espazial eta elektroien espinaren arteko funtzio propioa. Slaterren determinanteak uhin funtzio elektronikoaren Ψ_e antisimetria betetzen dela zihurtatzen du, baita Pauliren bazterte printzipioa betetzen dela ere. Hau da, bi elektroi ezin dira zenbaki kuantiko berdinen bitartez irudikatu, eta beraz, Ψ_e -ak seinuz aldatu behar du bi elektroien koordenadetan aldaketa dagoenean.

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

Gainera, orbital molekular bakoitza orbital atomikoen konbinaketa linealen bitartez adierazten da:

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

Orbital molekularra, ϕ_i , r orbital atomikoen batura χ_r zabalkunde hedapenarekin C_r biderkatzean lortzen da. Minimo energetikoa lortzeko, orbital molekularrak iteratiboki optimizatzen dira zabalkunde koefizienteen expansioarekiko. Metodo hau Eremu Auto Konsistente bezala ezagutzen da.

HF metodoan elektroi-elektroi elkarrekintza hurbilketa bat da, baita elektroiek gainontzeko elektroiekin batera duten elkarrekintza ere. Hurbilketa hau da HF metodoaren mugarik handiena. Erreakzio kimikoen energia totala kalkulatzeko akats ugari burutu daitezke. Metodo hauek konputazionalki M^4 eskalatzen dute (non M baseen funtzio kopurua den, *vide infra*)

3.4.1.2 Base atomikoak

3.6 ekuazioan ikusi den bezala, orbital molekularrak ϕ_i , orbital atomikoen χ_r konbinaketa linealen bidez deskribatzen dira. Orbital atomikoak berriz, base funtzioen konbinaketa linealen bidez deskribatzen dira. Hortaz, kalkulu teorikoak burutzerako garaian emaitz zehatzak lortu ahal izateko funtsezkoa da zein base funtzio aukeratu den. Hala ere, aukeraketa hau zehaztasun eta kalkulu hauek denborarekiko oreka on bat bilatzearekin mugatuak egon ohi dira, base funtzioaren tamaina handitzearekin kalkulu denbora ere handitzen baita.

Base funtzio desberdinak dauden arren, lan honetan 1950. urtean Boysek¹⁵ proposatutako Gaussian funtzioetan zentratuko gara.

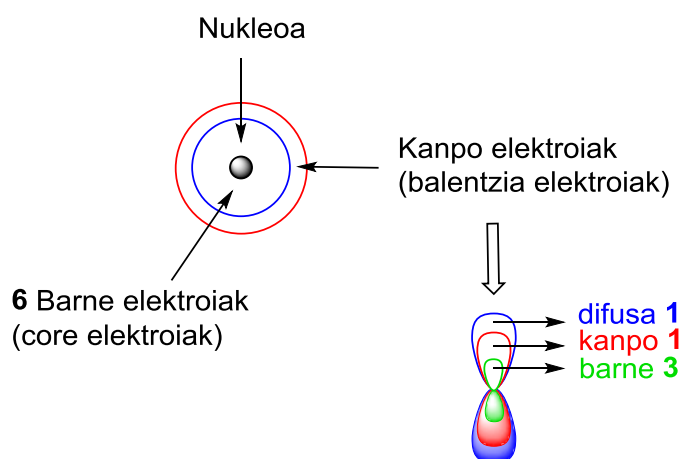
$$G_A(r) = \left(\frac{2\alpha}{\pi}\right)^{3/4} e^{-\zeta(r-R_A)^2} \quad (3.7)$$

Base funtzio desberdinak erabiliz, elektroiak aurkitzeko aukera dagoen espazioa adierazten duen uhin funtzioa bilatzea espero da. Honenbestez, base funtzioek behar adina malgutasun izan behar dute elektroiak zein dentsitate elektronikoko handi nahiz gutxi ere eremuetan mugitzeko. Helburu hau bete nahian, *split-valence basis set* izenez ezagutzen den hurbilketa garatu zen. Hurbilketa honen oinarria baseen tamaina handitzean datza, non banaketa espazial desberdineko orbitalak eratzen diren. Honela, baserik erabilienetako bat 6-31G da, non barne elektroiak (*core electrons*) sei gaussianen bidez irudikatzen diren, balentzia elektroiak hiru gaussianekin banatzen diren barne eremurako, eta gaussianen batekin kanporako (ikus 3.2 irudia).

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

3. Kapitulu

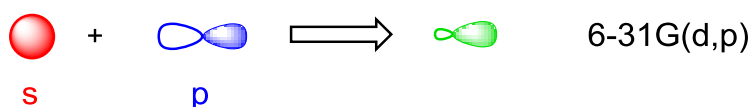
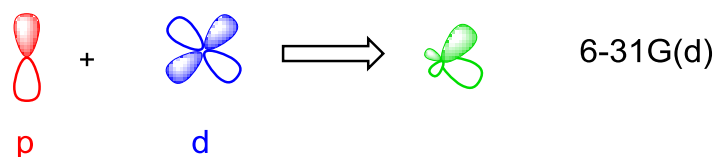
Kitzikatutako elektroien sistemetan, edota anioiak dauden kasuetan, dentsitate elektronikoa nukleotik urrun egon ohi da. Hori dela eta, sistema hauen deskribapena egoki egiteko funtzio lausoak gehitu behar zaizkie. Funtzio lausoak, ohiko “s” eta “p” funtzioen handipenak dira, zeinak orbitalei espazio zabalagoa izatea ahalbidetzen dieten. Modu honetako funtzioak erabiltzean + ikurra base funtzioaren aldamenean jartzen da (ikus 3.2 irudia).



3.2. Irudia. 6-31+G funtzio baseen Split-valencen deskribapena.

Gainera, zenbait loturen deskribapena egiteko, edo polarizazioan desberdintasunak daudenean, hidrogeno zubiekin gertatzen den moduan, polarizatutako funtzioen erabilera beharrezkoa izaten da modu egokian deskribatzeko. Funtzio hauen lana, atomo bakoitzaren oinarriko egoeran behar den baino momento angular zabalagoa duten gaussianak gehitzea ahalbidetzen dute. Modu honetan, 3.3 Irudian ageri den bezala, 6-31G(d) funtzioak “p” funtzioak polarizatzeko “d” funtzioak gehitu zaizkiela adierazten du. 6-31G(d,p) funtzioaren kasuan aldiz, hidrogeno atomoaren “s” orbitalei, “p” polarizazio gehitu zaiela adierazten du. Azkenik, elektroien deskribapenaren zehaztasuna areagotu nahian, balentzia zatituaren eskema (*split valence*) jarraitu daiteke z bikoitzetik, z hirukoitzera igaroz. Honen adibide da 6-311G kasua, non balentzia eremua 3

dominiotan banatzen den: bata barnekoa (3 gaussianak bidez deskribatua), beste barneko bat eta kanpoko bat (bakoitza gaussianak batez deskribatua).



3.3. Irudia. 6-31G basearen funtzioan polarizazioa funtzioa sartzearen irudikapen eskematikoa.

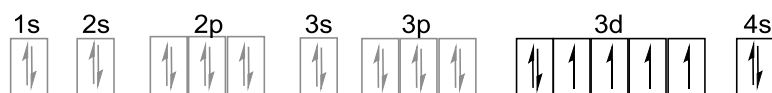
Elementu pisutsuak dituzten sistemak elektroi kopuru handia izaten dutenez konputazionalki garestik izan ohi dira, eta beraz egoki deskribatzeko base funtzio ugari behar izaten baitituzte. Hau ekiditeko, Hellmanek¹⁶ barne elektroiak deskribatzeko funtzio analitikoaren erabilera proposatu zuen. Funtzio hauei core potentzial eraginkorra edo pseudopotentziala deritzaie. Gaur egun Hay eta Wadtek¹⁷ garatutako pseudopotentziala da erabilienetako bat, Los Alamos National Laboratory edo LANL bezala ezagutzen dena.

Adibide bezala 3.4 Irudian burdinaren konfigurazio elektronikoa adierazten da. LANL2DZ pseudopotentzialak 18 barne elektroiak 18 funtzio analitikoekin deskribatzen dira, eta balentzia elektroiak zeta bikoitz base funtzioarekin.

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

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

3. Kapituluua



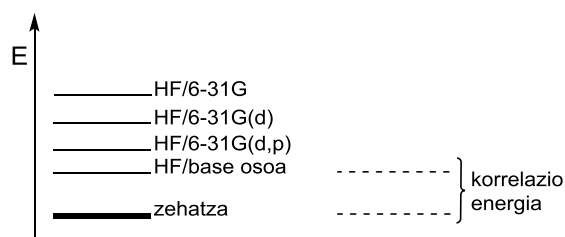
3.4. Irudia. Burdinaren konfigurazio elektronikoa (Fe^0). Balentzia elektroiak 3d eta 4s orbital atomikoei dagozkie.

Lan honetako geometrien optimizazio eta frekuentzien¹⁸ kalkuluan *split-valence* 6-31G(d,p) basea erabili da C, H, N eta O-rako, burdinarentzat aldiz LanL2DZ basea erabili delarik. Gainera, energia potentzialaren gainazalaren deskribapen hobea lortu nahian, puntu geldo guztien energiak kalkulatu dira 6-311+G(2d,2p) basea, eta burdinarentzako LanL2DZ erabiliaz.

3.4.1.3 Hartree-Focken ondorengo metodoak eta Multikonfigurazionalak

HF metodoek elektroiei errepulsioa eta energia totala altuegi kalkulatu behar da, zeina benetako energia (experimental), E , eta Hartree-Fock energiaren E_{HF} arteko diferentzia bezala definitzen den.

$$E_{corr} = E - E_{HF} \quad (3.8)$$



3.5. Irudia. Teoria maila desberdinetan lortutako energia zehatz eta benetako energiaren arteko diferentziaren irudikapen grafikoa.

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

Ab initio Metodo askok HF-en energia hartzen dute abiapuntutzat, eta ondoren korrelazio energia gehituz aldatzen dute. Metodo hauek post-Hartree-Fock bezala ezagutzen dira. Møller-Plesseten¹⁹ perturbazio teorian esaterako, hamiltoniar monoelektronikotik abiatzen dira, korrelazio elektronikoa Royleigh-Schrödinger motako perturbazio bezala gehituz. Normalean perturbazio hauek 2^o orden harte kalkulatu dira (MP2). Sistema txikiak aztertzerakoan, perturbazioak 3^o eta 4^o orden arte luzatu daitezke (MP3 eta MP4, hurrenez hurren).

Beste teoria bat konfigurazioen elkarrekintzan datza, CI,²⁰ non uhin funtzioa Slater determinante askoren koefiziente aldagarrien konbinaketa linealen bitartez lortzen den. Metodo hauen guztien artean *full CI* bezala ezagutzen dena da zehatzena. Bertan, uhin funtzioa konfigurazio elektronikoko posible guztien konbinaketa linealen bezala adierazten da. Aipatzekoa da ere *coupled cluster*²¹ bezala ezagutzen den beste post-Hartree-Fock metodoa, CCSD(T) bereziki. Erreferentziako metodo konputazionala da azken hau, baina bere kostu konputazional altuagatik sistema txikietan da soilik erabilgarria. Gainera, metodo desberdinak beraien artean ere konbinatu daitezke, metodo konposatu bezala ezagutzen direnak, G2 metodoa bezalakoak.²²

Konfigurazio elektronikoko desberdinez definitutako energia elektronikoa ezin da inoiz determinante bakun baten bitartez deskribatu. HF metodoak izaera

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

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.

3. Kapitulu

monodeterminental bat du, eta beraz, konfigurazio elektronikoko desberdinak daudenean, edota energia oso antzekoak dituzten kasuetan ez da egokia izaten egoera hauek ongi deskribatzeko. Hots, ez dute korrelazio dinamikoa aintzat hartzen. Hori ekiditeko metodo multikonfigurazionaletara jo behar da, non uhin funtzioa Slaterren determinanteen konbinazio lineal moduan definitzen duten. Hauen artean, CASSCF bezala ezagutzen den metodoa, aktiboki dauden orbital espazialen konbinaketa guztiak barneratzen dituen metodoa da. Bertan, orbital guztien suberemu batean eman daitezkeen kitzikapen guztiak hartzen dira baitan.

Korrelazio dinamikoa eta korrelazio ez dinamikoa barneratzeko burutzen diren aldaketek, nabarmen hobetzen dute lortutako energia maila, baina beti ere kostu konputazional handiago batean. MP2 metodoak M^5 eskalazten duen bitartean, *coupled cluster* metodoak M^7 egiten dute. Honenbestez, azken motako metodo hauek atomo eta elektroien gutxiako sistemetan dira soilik erabilgarriak.

Azkenik, bertako eremuko orbital natural bikoteen metodoa azaltzen da, DLPNO-CCSD(T) kitzikatze bikoitzen eta hirukoitzen estimazioarekin burutzen dena.²³ Metodo honek orbital natural bikoteen hurbilketa,²⁴ *coupled cluster* kitzikatze bikoitzekin eta hirukoitzen estimazioarekin bateratzen ditu. Honen ondorioz, lortzen diren energia balioak korrelazio energia gehiena batzen dute. Gainera, ehundaka atomoz osatutako sistemak aztertze baliagarriak dira, base atomiko nahiko onak erabiliz. Beraz, gaur egungo metodorik erabilienetako bat bihurtzen da.

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.

3.4.2 Metodo semiempirikoak

Denborarekiko menpeko ez den Schrödingerren ekuazioa ebazteko, metodo honek HF metodoak datu experimentalekin batzen ditu, eta horri dagokio ezarritako izena. HF ekuazio erabiltzen dute, baina konputazionalki garestien diren puntuak, datu experimentaletatik lortutako emaitzekin parametrizatzen dira. Honela, korrelazio energia inplizituki barneratzen da parametrizazioaren bitartez. Metodo semiempiriko ezagunenak AM1²⁵ eta PM3-6²⁶ saila dira. Metodo hauek ez dira garestiak konputazionalki, eta euren zehaztasun eta fidagarritasuna aztertutako sistema parametrizaturik dagoen erimeuan barneratua egotearen baitan dago.

3.4.3 Dentsitate Funtzionalaren Teoria

Aurrez aipaturiko metodoek ez bezala, dentsitate funtzionalaren metodoak,²⁷ DFT, molekulen energia eta geometria lortzeko beste modu bateko hurbilketak erabiltzen ditu. Orainarte aipatutako metodoak, uhin funtzioan oinarritzen dira, zeina elektroi bakoitzaren koordenatuen x , y , z eta espinaren menpekoak diren. Hala ere, uhin funtzioa lortzeko beste modu errazago bat badago, dentsitate elektronikoa, $\rho(\mathbf{r})$ erabiliz. Termino hau hiru aldagai espazialen menpekoa da, eta behatu daitekeen parametro fisikoa da. Aipamen hauen ondorioz, metodologia honek M^3 eskalatzea eragiten du. Honenbestez, DFT metodoak lehenago deskribatu diren metodoak baino azkarragoak dira.

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.

3. Kapituluua

1964. urtean, Hohenberg eta Kohn²⁸ energia eta molekulen ezaugarriak oinarritzko egoeran, oinarritzko egoeraren $\rho(\mathbf{r})$ menpeko zirela argudiatu zuten.

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

Modu honetan dentsitate elektronikoa, molekula batean ageri diren elektroien kopuru osoaren, N , menpeko dira.

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

Teoria zehatza da, baina konputazionalki inplementatzeko hurbilketen beharra du. Kasu honetan, uhin funtzioa lortzeko Slaterren determinantea erabili beharrean, Kohn-Sham orbitalek ematen dute dentsitate elektronikoa.²⁹

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

DFT metodologiek ondorengo ekuazioen bitartez lortzen dute molekulen energia:

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

Non T_{ni} energia zinetiko elektronikoari dagokion, V_{ne} nukleo eta elektroien arteko erakarpenaren energia potentziala den, V_{ee} aldiz elektroien arteko errepulsioa da, eta azken terminoek trukaketa-korrelazioei dagokien energiari dagozkie. Zentzu honetan, ΔT elektroien elkarrekintzen ondorioz eratutako energia zinetikoaren zuzenketari dagokio, eta ΔV_{ee} elkarrekintza ez klasikoak bildutako elektroien arteko errepulsioari dagokio.

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

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

Trukaketa-korrelazio uhin funtzioa kalkulatzeko zailtasunaren ondorioz, hurbilketa ugari sortu dira, tokiko dentsitatearen hurbilketa, eta gradiente orokorraren hurbilketak izanik ohikoenak. Gainera, funtzional hibridoak ere existitzen dira, non berezko DFT-aren trukaketa funtzionalak, HF-en trukaketa terminoarekin konbinatzen diren. Jarraian B3LYP funtzionalaren azalpen labur bat emango da, zeina DFT metodoko erabilienetako bat den. Doktoretza Tesi honetan erabili den metodologia ere hau izan da.

3.4.3.1 B3LYP Funtzionala

Funtzional hibrido hau, Beckek³⁰ proposatutako trukaketa analitikoaren funtzioanala, Lee, Yang eta Parren³¹ korrelazio funtzionalarekin batzean sortzen da. Metodo honen baitan, trukaketa-korrelazio energia ondorengo ekuazioaren bitartez lortzen da:

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

Non a , b eta c parametroen balioak 0.20, 0.72 eta 0.81 dira, hurrenez hurren. E_x^{LSDA} trukaketari dagokien funtzionala da, zeina espinaren dentsitatearen menpekoa den, E_x^{HF} berriz, HF-en trukaketa funtzioanal zehatza da, E_x^B Beckeren trukaketa funtzionala da. Azkenik, E_c^{LSDA} korrelazio funtzionala da, eta E_c^{LYP} Lee, Yang eta Parrek definituriko korrelazio funtzionala da.

B3LYP funtzionalaren bitartez lortutako emaitzak nahiko zehatzak dira, eta zentzuzko kostu konputazionalan lorturikoak izaten dira. Gainera, funtzional hau

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.

3. Kapituluua

oso erabilia izan da burdina duten sistemek katalizatutako erreakzioak aztertzerakoan, bai hemo motakoak, zein ez-hemo motakoak ere.³² Honen adibide da Chen *et al.*³³ burututako lana, non metanoaren hidrogenoaren abstrazioa aztertu zuten ez-hemo eredu desberdinentzat, zentru katalitikoan Fe(IV)=O izanik. Azterketa honetan erabilitako metodologia CCSD(T) eta 12 metodo DFT izan ziren. Lan honen ondorioz ikerlariek erreaktibitatea espin desberdinen artean dabilen kasuetan, B3LYP funtzional hibridoa iradoki zuten metodo egoki bezala. Honenbestez, Doktoretza Tesi honetan aurkeztutako lan konputazionalak Gaussian 09 programa paketearen ezarritako B3LYP funtzionalaren bitartez burutu dira.³⁴

3.5 Sakabanatze energiaren tratamendua

Sakabanatze indarrak, lotura kimiko bidez loturik ez dauden atomo eta molekulen artean ematen dira. Une bateko dipo-dipolo induzitu edo dipolo induzitu-dipolo induzitu elkarrekintzen ondorioz sortzen dira indar hauek. Distantzia luzean erakarri egiten dute indar hauek, aldaratzaileak dira aldiz van der Waalsen balioen gehiketa baino distantzia laburragoetan. DFT teoria osoa

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**.

izanik, London-van der Waals elkarrekintzak dagozkien funtzionalen bitartez deskribatu beharko lirateke. Dena den, eta hemen aipatu behar ez diren aipamenengatik, ez da horrela izaten. Zehazki, B3LYP funtzionalak ez du egoki deskribatzen sakabanatze energia. Hori dela eta, hainbat hurbilketa garatu dira DFT metodoan. Ez lokalizatutako DFT-D funtzionala da hurbilketa hoietako bat.³⁵

Sistemaren energia totala Kohn-Sham energia eta sakabanatze energiaren batura da. Azken termino hau ondorengo ekuazioaren bitartez lortu ohi da:

$$E_{disp}^{DFT-D} = - \sum_{AB} \sum_{n=6,8,10} S_n \frac{C_n^{AB}}{R_{AB}^n} f_{damp}(R_{AB}) \quad (3.14)$$

Non sistema osoko atomo bikoteen kontribuzio erakartzailea hartzen den kontuan (AB), zeina sakabanatze koefizientearen C_n^{AB} menpekoa den n ordenean, (n=6,8,10...), eta R_{AB} AB atomoen nukleoaren arteko distantzia izanik. Eskalatzaile faktorea S_n , dentsitate funtzionalaren izaera aldaratzailea doitzeko erabiltzen da.

n=6 (D3) balioko zabalkunde terminoak, potentzialen izaera asintotikoa ziurtatzen du. Hurbilketa hau erraz programatzeaz gain, azkarra da, beraz, praktikan ez du apenas kalkulu denbora luzatzen.

Doktoretza Tesi honetan burututako kalkuluei sakabanatze efektua Grimmeren³⁶ D3 gehitu zaie, Becke-Johnsonen³⁷ amortiguazio faktorearekin.

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 Disolbatzailearen tratamendua

Erreakzio kimiko gehienak disoluzioan ematen direnez, kalkuluak egiterako garaian disolbatzailearen eragina ere kontutan hartu behar da erreakzio bide egoki bat burutzeko. Hori egiteko bi modu desberdin daude, non disolbatzailearen molekulak esplizituki jartzen diren, edota inplizituki. Posible da bi moduak elkarren artean konbinatzea ere.³⁸

Lehen hurbilketan erreaktiboaren inguruan disolbatzailearen molekulak esplizituki kokatzen dira. Kasu honetan, gehitu daitezkeen disolbatzaileen molekula kopurua handia den arren, mugatua da. Gainera, metodo honen bitartez gune aktiboarekin koordinatutako disolbatzailearen molekulak mekanokuantikoki aztertu daitezke. Aipatzekoa da molekula hauek loturen haustura eta eraketekin erlazionatuak egon daitezkeela. Gainontzeko molekulak aldiz, mekanika molekularren bitartez aztertzen dira. Hurbilketa honen abantailarik nabarmenena solutu eta disolbatzailearen arteko elkarrekintzak kontutan hartzean, lortutako emaitzek errealitatea hobeto isladatzen dutela da. Aldiz kontutan izan behar da ere, disolbatzaile molekula minimoak kontsideratzerakoan, kalkulu denbora luzatzen dela.

Bigarren hurbilketan berriz, solutu eta disolbatzailearen arteko elkarrekintzak ere kontutan hartzen dira, baina kasu honetan disolbatzailea luzapen infinituko dielektriko jarrai bezala kontsideratzen da. Kasu hauetan, konstante dielektrikoaren bitartez deskribatzen dira, permitibitate erlatibo bezala ere ezagutua, ϵ . Balio hau disoluzioaren tenperatura eta presiopean duen konstante dielektriko experimentalari dagokio. Metodologia honetan, solutua dielektriko

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

baten barrunbean kokatzen da. Hurbilketa honek ez du kalkulu denborarekiko gainkostu handirik, ezaugarri hau izanik bere abantailarik nabarmenena.

Disolbatzailearen eragina inplizituki kalkulatzeko hurbilketa desberdinak daude. Solutua kokatzen den barrunbearen tamaina eta forman desberdintzen dira, baita solutu eta disolbatzaileen arteko elkarrekintza kalkulatzeko moduan ere. Lan honetan disolbatzailearen eragina kalkulu guztietan (optimizazioa, analisi bibrazionala, erreakzio bide intrinsekoa) kontutan izan da Polarizagarri den Eredu jarraiarekin (Polarizable Continuum Model, PCM).³⁹ Modelo honetan solutuen molekulen nukleo atomiko bakoitza, van der Waalsen erradioko 1.2 biderko esfera baten bitartez biltzen dira. Aztertutako ereduak entzima desberdinen gune aktiboak isladatze dituztenez ingurune dielektriko desberdina dute. Honenbestez, uraren solbatazio estandarra erabili da erreferentzia bezala ($\epsilon=78.39$). Energia erlatiboak disoluzioan kalkulatu dira 1M egoera.⁴⁰

3.7 Puntu geldikorren eta espinen arteko energia gutxieneko gurutzaketa puntuen karakterizazioa

3.7.1 Energia potentzialen gainazala

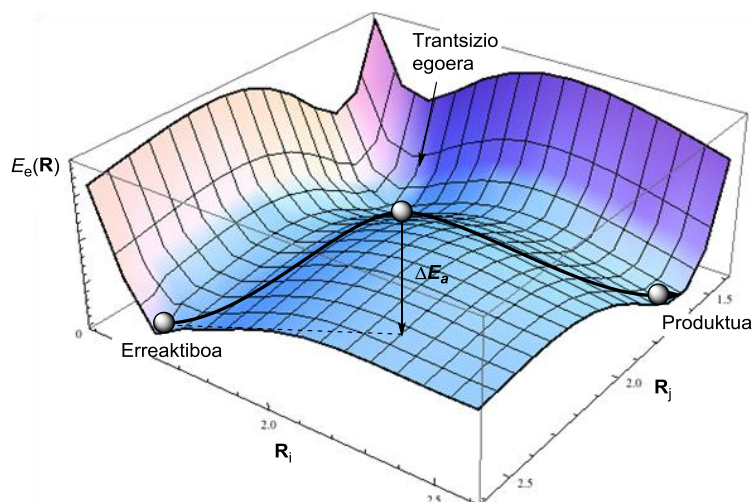
Aurrez deskribatutako metodoen bitartez atomo edo molekula multzo baterako energia balioak lortzen dira. Sistema desberdinak deskribatzeko kartesiar koordenatuak erabili daitezke, baita loturen luzerak, luturen angeluak eta angulu diedroak ere. Born-Oppenheimerren hurbilketaren baitan, energia

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.

3. Kapitulu

potentzialaren gainazala (PES) (edo hipergainazala) lortzen da energia totala nukleoaren kokalekuekiko irudikatzean (ikus 3.6 Irudia).⁴¹



3.6. Irudia. Energia elektronikoaren $E_e(\mathbf{R})$ gainazalaren irudikapena koordenada nuklearretan R_i eta R_j proiektatua. Erreakzioko erreaktiboa, trantsizio egoera eta produktua ere ageri dira.

PES-ean ageri daitezkeen puntu guztietatik, kimikoki interesgarrienak puntu geldikorak dira. Puntu hauetan energiaren gradientea koordenadarekiko zero da. Kimikaren ikuspuntutik, puntu geldikorak minimo lokalak dira, hots, erreaktiboak, erreakzio artekari eta produktuak zein trantsizio egoerak.

Minimo lokaletan, energia elektronikoaren bigarren deribatua koordenada nuklearrekiko positiboa da. Trantsizio egoerak aldiz, energia puntu maximoak dira erreakzio bide osoan zehar. Hori dela eta, energia elektronikoaren bigarren deribatua koordenada nuklearrekiko positiboa edo zero da, erreakzio kimikoari atxikitutako koordenaden kasuan izan ezik, non negatiboa den $E = \frac{1}{2}kx^2$.

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.

Masa gutxitutako osziladore armoniko baten hurbilketan, $\mu = m_1 m_2 / (m_1 + m_2)$, energia potentziala deskribatzeko parabola forma erabiltzen da $V = \left(\frac{1}{2}\right) kx^2$. Erreakzio kimikoari dagokion loturaren konstantea, energia potentzialaren bitartez erlazionatzen da ondorengo ekuazioaren bitartez:

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

Non, bibrazio honi dagokion frekuentzia jarraian ageri den ekuazioaren bitartez adierazten den:

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

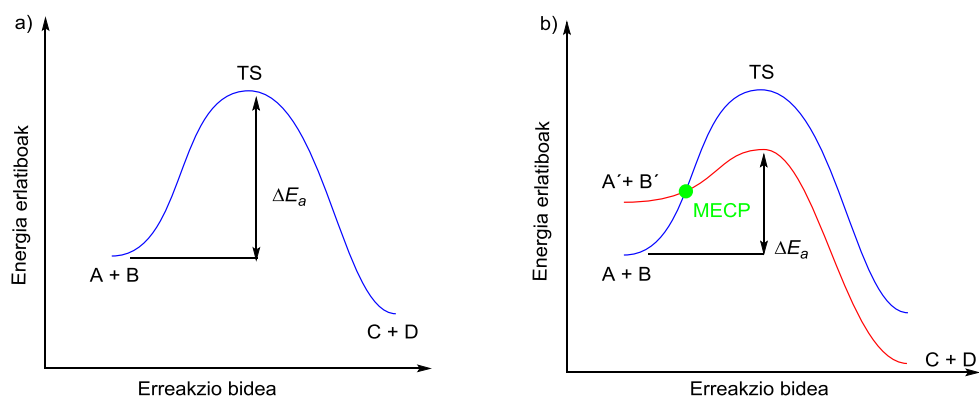
Hortaz, puntu geldikorrei dagozkien bigarren deribatuak koordenatu nuklearrekiko modu bibrazional normalari dagokion indar konstantea eta frekuentzia ematen ditu. Bigarren deribatuak koordenatu nuklearrekiko sortzen den matrizeari, konstantearen matrizea edo Hessianoa deritzaio. Hessianoaren diagonalizazioak indarren konstantearen informazio du, baita bibratzeko modu normalei dagozkien frekuentziena ere. Azaldu den bezala, minimo lokaletan energiaren bigarren deribatua positiboa da, eta beraz Hessianoa positiboa dela esaten da. Trantsizio egoeretan aldiz, erreakzio bidearekiko bigarren deribatua negatiboa denez, dagokion frekuentziak balizko balioa hartuko du 3.16 Ek.

3.7.2 Bi egoeren arteko erreaktibitatea

Orokorrean erreakzio kimikoak PES bakarrean burutu ohi dira espina egoera berean. Honek, erreakzio artekariak, trantsizio egoerak zein produktuen espina

3. Kapitulu

egoera bera dutela adierazten du (ikus 3.7a Irudia). Kasu hauetan, erreazioaren abiadura erreazio aktibazioaren menpekoa da.



3.7. Irudia. a) espin egoera bakarrekoteko erreaktibitateko erreazioaren eta b) bi espin egoeren arteko erreaktibitateko erreazioen profil energetikoa.

3.7b Irudian ageri den erreazio bidean aldiz, espin egoeraren gurutzaketa bat eman da, eta beraz, erreazioa espin egoera desberdinetan ematen da. Formalki okupatuak dauden orbitalak, hutsik dauden orbitalekin energetikoki gertu baldin badaude, edota lehen zutabeko trantsizio metalak (Fe, Co, Ni) dituzten sistemen kasuan, ohikoa izaten da erreaktibitate hau agertzea. 3.7b irudian ageri den adibidean, espin egoeraren aldaketak energia aktibazioa txikitzea dakar, eta beraz, erreazioak bide hori jarraituko du. Espin desberdineko PES-ak gainezartzen diren gurutzaketa puntuak, energia gutxienerako gurutzaketa puntu izenez ezagutzen dira (MECP).

Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasek, zein zitokromo P450 entzimek burdinezko atomo bat dute gune aktiboan. Beraz, entzima hauek parte hartzen duten erreazioak espin egoera desberdinetan burutuko direla espero da.

Espin egoera desberdinei dagozkien energia potentzialen bi hipergainazalen artean burutu diren MECP-ak Harvey *et al.*⁴² garatutako programaren bitartez lokalizatu eta karakterizatu dira. Espin elektroniko desberdineko bi gainazal adiabatikoen artean trantsizioa eraginkorra izan dadin, espinen arteko gurutzaketa emateko espinen aldaketari dagokion probabilitateak nahiko altua izan behar du. MECP-en geometriari dagokien trantsizio probabilitate hau kalkulatzeko Landau-Zenerren⁴³ eredua erabili da.

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

3.17 ekuazioan adierazitako terminoak ondorengoak dira: $H(i)_{SOC}$ MECP bakoitzari dagokion espin egoerei dagozkien Hamiltoniar matrizeko elementu ez diagonaletatik lortutako espin-orbita akoplamendua da. Termino hau MolSOC⁴⁴ programa erabiliz kalkulatu da, aurrez UB3LYP/6-31G(d,p) nibelean optimizatutako MECP-aren geometriarekiko. Espin-orbita akoplamenduaren elementuak Breit-Pauli⁴⁵ operadorearen bitartez kalkulatu dira. Bestalde, $\Delta F(i)$ errektibo eta trantsizio egoerak konektatzen dituen MECP-ari dagozkion espin egoeraren energia kurba/erreakzio koordenada arteko malden diferentzia da. Azkenik, $v(i)$ MECP-a zeharkatzeko abiadura da, non Maxwell-Boltzmann banaketarekin batazbesteko abiadura hurbildu daitekeen:

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.

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.

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

bertan $\mu(i)$ erreazio bidean zehar elkarrekin eragiten duten sistemen arteko masa gutxitua da, hau da, entzimaren gune aktiboaren eta dagokion sustratoaren artekoa.

4. Jmj-C DOMINIOA DUTEN HISTONEN DESMETILASEK KATALIZATUTAKO LISINA TALDEEN DESMETILAZIO ERREAKZIOA

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. Epigenetika

Epigenetika, ADN-an edota bere proteinetan ematen diren lotura kobalenteetan burutzen diren aldaketa itzulgarriak batzen dituen arloa da. 1975. urtean sortu zen genetikaren sail hau, hainbat ikerlarik ADN-ren metilazio maila, zatiketa zelularrean geneen adierazpen maila mantentzearen arduradun izan zitekeen aukeraz jabetu zirenean.¹ Aldaketa hauek, bai mitosis baita meiosis ere oinordetzen dira, ADN osatzen duten nukleotidoen sekuentzian eraginik izan gabe. Hau da, epigenetikak, genomak garraiatutako informazio aztertzen du, zeina ez dagoen ADN-an baseen sekuentzia bidez kodifikatua. Honen ondorioz fenotipoa, edo behagarri diren ezaugarriak, aldatzen dira norberaren eduki genetikoa, hots genotipoa, berdin gelditzen delarik.

Aldaketa hauek guztien menpekoa da geneen adierazpen maila, transkripzioa aktibatu edo eteteko gai baitira. Jakina da histonen metilazio mailak zenbait prozesu biologikoetan funtsezkoak direla, ziklo zelurraren erregulazioan, heterokromatinaren sorreran, X kromosomen inaktibazioan edota transkripzioaren erregulazioan esaterako.² Honenbestez, histonen metilazio mailari eragiten dieten edozein aldaketek hainbat gaisotasunen eragile izan daitezke, minbizi mota desberdinak edota nerbio sistema zentralaren gaisotasunak sor ditzaketelarik.³ Hori dela eta, azken urteetan aldaketa hauen guztien nondik norakoen ikerketek indarrean dihardute. Mekanismo hauen

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.

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. Kapitulu

ezagutzarako baliabide konputazionalak lagungarri dira oso, baita botika berrien diseinu eta aurkikuntzan ere, prozesu onkologiko eta neurodegeneratiboen tratamendurako hain zuzen ere.⁴

Azido desoxirribonukleikoa (ADN), 3'-5' lotura fosfodiesterren bitartez batzen diren desoxinukleotidoen polimero bat da. Bertan, ADN-ren helize bikoitza kontrako norantzan dauden bi ADN harizpiak gurutzatzean sortzen da, osagarriak diren base nitrogenadunen artean osatzen diren hidrogenozko zubien arteko elkarrekintzen bitartez. Zelula eukariotek nukleo barruan material genetiko osoa pilatu eta gorde ahal izateko modua garatu dute. Betebehar honen ardura histonek burutzen dute.⁵ Proteina hauek izaera basikoa dute, eta globulu itxurako dominio txikiz osatuak daude. Gainera, positiboki kargatuak dauden talde amaierako amino talde anitz dituzten harizpiz osatuak daude. Karga positiboek, ADN histonen inguruan biltzea ahalbideratzen dute elkarrekintza elektroestatikoaren bitartez, fosfato taldeen arteko aldarapena gutxituz aldi berean.

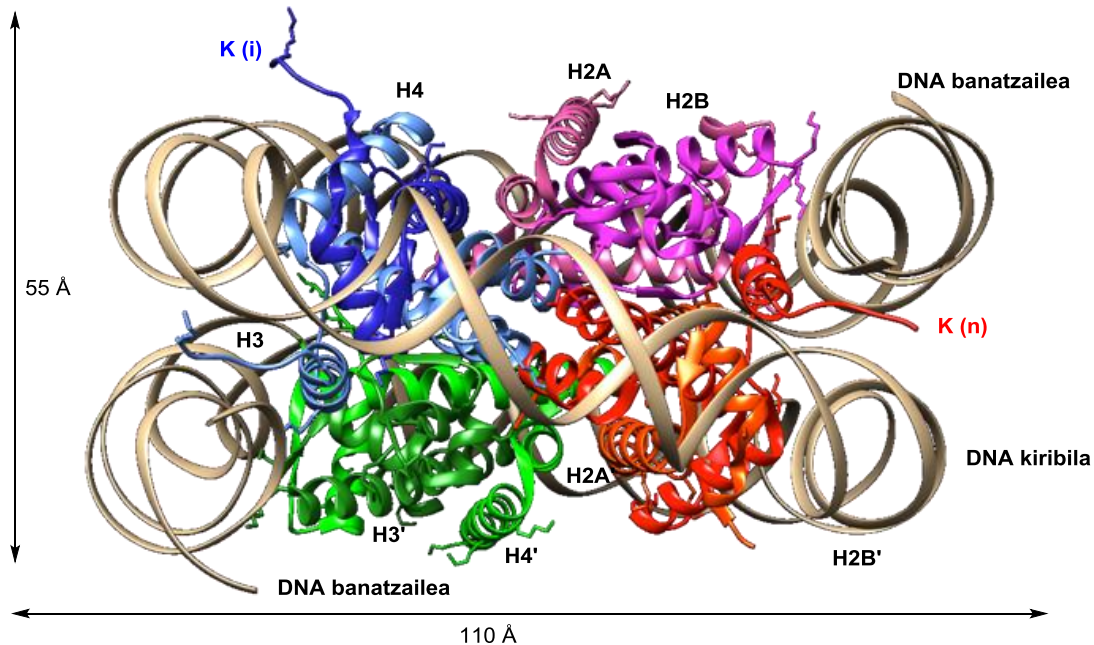
4.1. Irudian histonen antolaketa irudikatua dago. Bertan, histonak oktamerotan moldatzen direla azaltzen den. Histona pareak elkarren artean batzean, H2A, beste bi histona H2B-rekin, bi histona H3 eta beste bi histona H4-ekin batzean egitura hori eratzen da hain zuzen ere. Batura guztiari, hau da, oktameroko eta beraien inguruan bildutako 146 base bikoteez osatutako ADN kiribilari, nukleosoma deritzaio.⁶ Nukleosoma desberdinak ADN banatzaile eta histona H1-aren bitartez batzen dira. Aldi berean, nukleosoma desberdinak

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.

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.

kromatina izenez ezagutzen diren egituretan trinkotzen dira, zeinak xafla nuklearren proteinetan kokatzen diren. Antolaketa honek, ADN espazio murriz batean biltzeko aukera ematen du.



4.1. Irudia. Nukleosoma baten egituraren aldeko ikustapena. Irudi hau pdb 1AOI fitxategian argitaratutako koordenaden bitartez eratu da.

ADN-ren transkripzioa emateko ostera, ADN-k ARN bihurtu behar du eta azken hau proteina bilakatu behar da. Hori dela eta, ADN-ren trinkotzeak informazio genetikoaren jarioa ahalbideratu behar du. Horretarako, lehenik eta behin nukleosomak askatu egin behar dira, jarraian histonen inguruan dagoen harizpia askatu, eta azkenik proteinen tradukzioa emateko. Beraz, histonek ADN-ren trinkotzean parte hartzen dutela esateaz gain, are garrantzitsuagoa den transkripzioan ere erregulatzaile bezala jokatzen dutela ondoriozta daiteke.

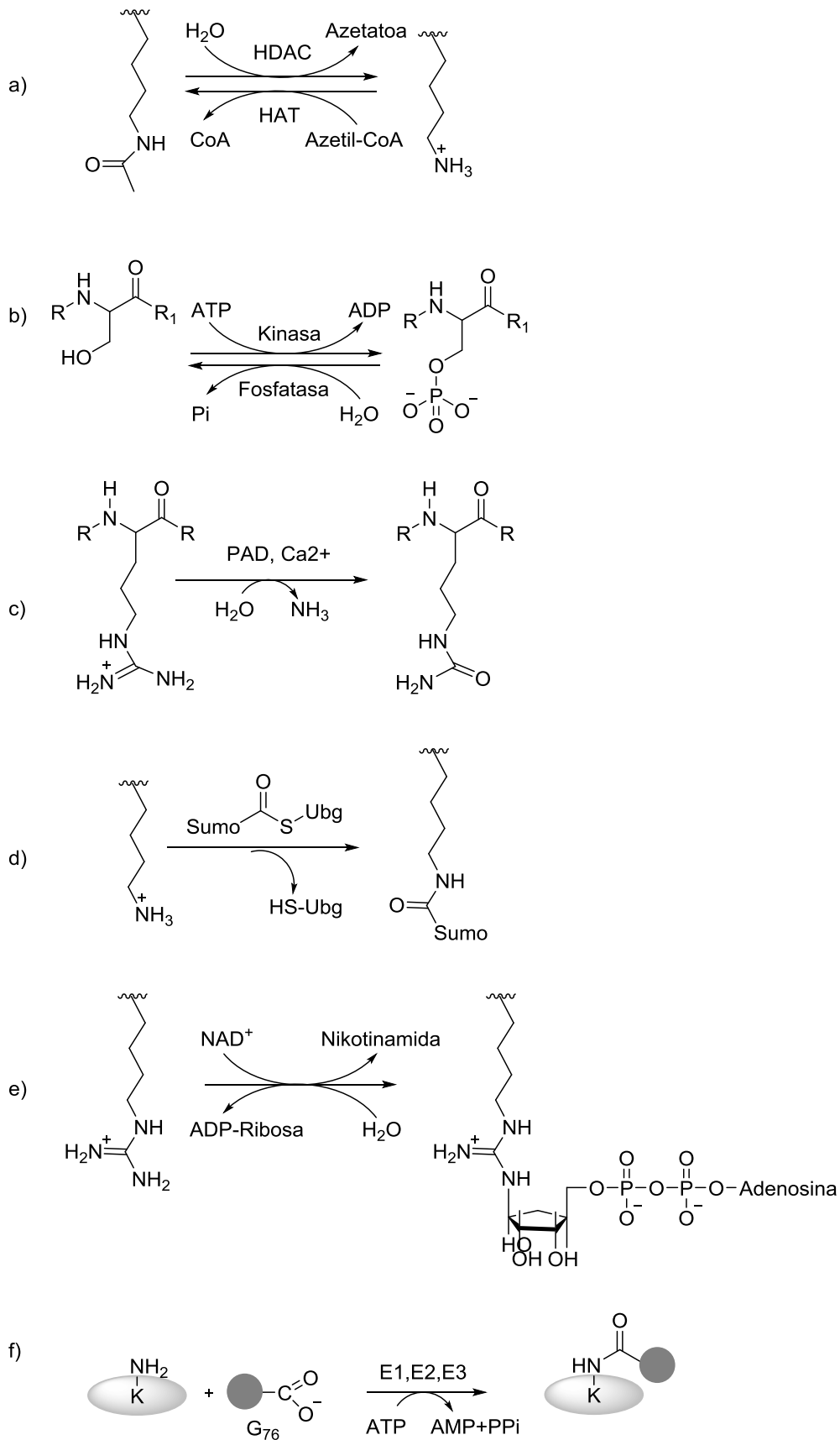
Kromatina bi modutan egon daiteke, eukromatina edo heterokromatina bezala. Lehen moduan material genetikoa ez dago trinkotua, eta hortaz, proteinen transkripzioa eman daiteke. Heterokromatinaren kasuan berriz,

4. Kapituluia

material genetikoa trinkotua dagoenez, transkripzioaren eragileak ezin dira sartu. Hortaz, transkripzioa eten egiten da, eta geneak ez dira aktibatzen. Kromatinaren trinkotze edo zabaltzea bai ADN-n baita histonetan ere ematen diren aldaketa itzulgarrien ondorioz gertatzen da. Hortaz, jarraian azalduko diren aldaketek transkripzioa erregulatzen dute.⁷

Proteina hauek izaten dituzten aldaketa arruntenak ondorengo hauek dira: lisina eta arginina taldeen metilazioa; lisinen azetilazio eta ubikitinazioa; serina eta treoninen fosforilazioa; lisinen SUMOilazioa; argininen deiminazioa eta ADP-erribosilazioa (ikus 4.1 Eskema). Histonetan ageri diren lisina taldeen azetilazioa eta desazetilazioa histonen azetiltransferasek (HAT) eta histonen desazetilasek (HDAC) burutzen dute hurrenez hurren (4.1a Eskema). Serina taldeen fosforilazioa berriz histonen kinasek burutzen dute (4.1b Eskema).

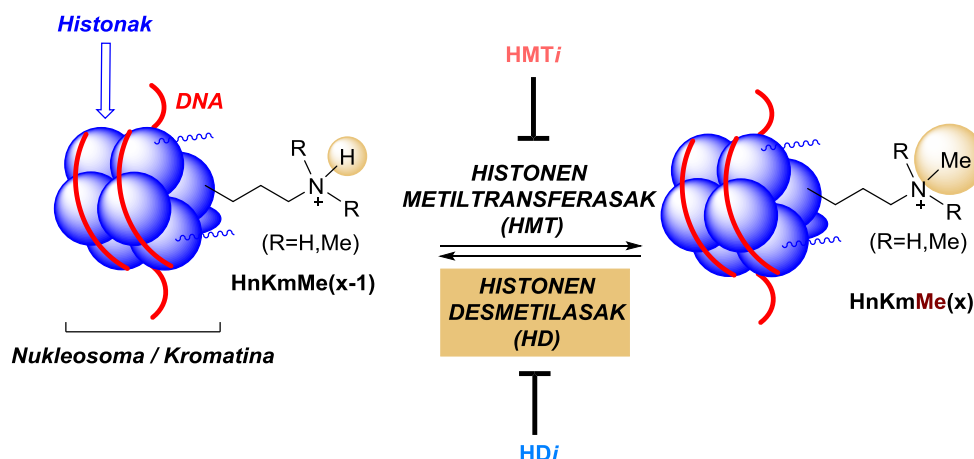
⁷ T. Kouzarides, *Cell* **2007**, 128, 693-705.



4.1. Eskema. Histonen buztanen aldaketen irudikapena: a) azetilazioa, b) fosforilazioa, c) deiminazioa, d) SUMOilazioa (SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier), e) ADP-ribosilazioa, f) ubiquitinazioa.

4. Kapituluua

Histonetan ageri diren lisina eta arginina taldeen metilazio maila histonen metiltransferasek (HMT),⁸ eta histonen desmetilasek (HD) erregulatu dute. Lehen entzimek metilo taldeak gehitzen dizkiete lisinei, (HnKmMeX → HnKmMe(X+1)), eta bigarrenek berriz kontrako lana egiten dute, hau da, lisinak desmetilatzen dituzte (HnKmMeX → HnKmMe(X-1)).



4.2. Eskema. Histonetan (Hn) ageri diren lisinen (Km) metilazio eta desmetilazio katalitikoa.

Histonen amino taldeek jasaten dituzten aldaketa multzoari "histonen kodea" deritzaio.⁹ Eraldaketa hauen guztien ondorioz, kode genetikoaren ahalmena izugarri zabaltzen da, transformazio itzulgarri hauek oso azkar gertatzen baitira. Honen ondorioz, ADN-ren transkripzioa prozesu dinamikoa dela kontsideratu daiteke, kromatinaren egitura aldatzerakoan, ADN-ren transkripzio eredia ere aldatzen baita.

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. Histonen desmetilasak

Duela urte gutxi batzu arte, N-CH₃ loturaren egonkortasunaren ondorioz, histonetan ageri diren lisinen eta argininen metilazioa itzulezina zela uste izan zen.¹⁰ 1964. urtean, Kimek beste ikerlari batzuekin batera, metilazio maila desberdineko lisinak desmetilatzen zituen entzima bat aurkitu zuten, ϵ -alkillisinasa.¹¹ Aurkiketa honek lisinen eta argininen metilazioa itzulgarria izan zitekeelaren zantzua eman zuen. 1973. urtean, ikerlari berdinek esperimentalki histonen metilazioa behatu zuten, baina ez ziren entzima isolatzeko gai izan.¹² 2004. urtean azkenik, Shikek beste ikerlari batzuekin batera, lehen histonen desmetilasa isolatu zuen, lisinen desmetilasa zehatza, LSD1, hain zuzen ere.¹³

Gaur egunerarte ezagutzen diren histonen desmetilasak bi taldetan banatzen dira, lisinen desmetilasa zehatzak, LSD, zeinak LSD1 eta LSD2 entzimen familiak batzen dituen, eta Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasak.^{7,13,14} Lehenak, flabina eta adenina dinukleotidoen, FAD, menpeko dira. Bigarrenak aldiz, hemo talderik ez duten entzimen talde barruan kokatzen dira, burdin eta α -zetoglutarato kofaktoreekiko menpeko direlarik.

Bai LSD entzimek, eta baita Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasek ere, histonetan dauden lisina desberdinetan burutzen dute desmetilatzeko duten gaitasuna. H3 eta H4 histonen buztanetan dauden H3K4, H3K9, H3K27, H3K36

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.

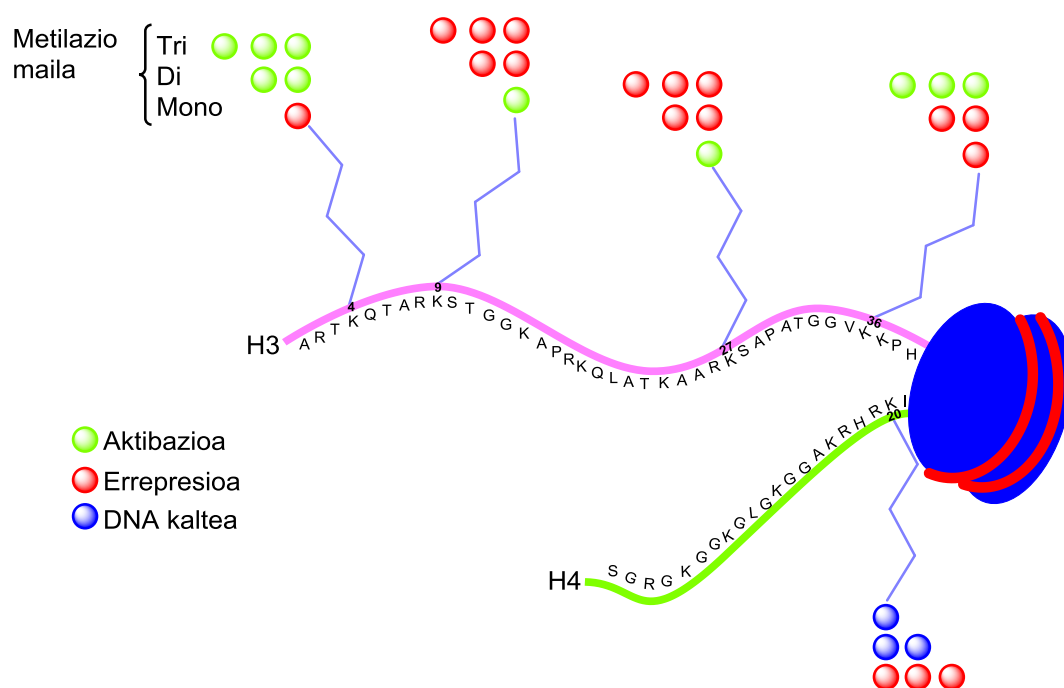
¹² W. K. Paik, S. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, 51, 781-788.

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.

4. Kapitulu

eta H4K20 taldeetan, baita H3 histona erdian dagoen H3K79 taldeari ere, (ikus 4.2. Irudia). Dena den, entzima familia hauek ez dute metilazio maila bera desmetilatzeko ahalbide berdina. Horrela LSD1/2 entzimek, di- eta monometilatuak dauden lisinak desmetilatu ditzakete soilik. Bigarren familiak, hau da, Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasek aldiz, lisina tri-, di- eta monometilatuengan bete dezakete euren funtzioa.¹⁵



4.2. Irudia. Histona H3 (arrosa) eta H4 (berdea)-ren zati bat non metilak dituzten lisinak irudikatu diren, metilazio mailak transkripzioan duen eragina ere azalduz.

Orokorrean, azetilazioak transkripzioarekiko duen eragina beti bera dela adieraztea posible da. Lisinak azetilatu gabe daudenean (karga=+1) kromatina trinkotu egiten da eta beraz, genearen transkripzioa eten egiten da ere. Lisina azetilatu dagoenean berriz (karga=0), kromatina zabalduta eta transkripzioa aktibatzen da.¹⁶ Lisinen metilazio eta desmetilazioaren eragina ordea

¹⁵ a) A. J. Bannister, T. Kouzarides, *Nature* **2005**, *436*, 1103-1106; b) J. R. Whetstone, A. Nottke, F. Lan, M. Huarte, S. Smolnikov, Z. Z. Chen, E. Spooner, E. Li, G. Y. Zhang, M. Colaiacovo, Y. Shi, *Cell* **2006**, *125*, 467-481.

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

konplexuagoa da, antzeko metilazio mailek (guztiek karga=+1) transkripzioa aktibatu edo eten baitezakete. Eraginei buruzko xehetasun gehiago emateko, lisina zehatzen metilazio maila, baita histonek jasan ditzaketen gainontzeko aldaketa itzulgarriak ere izan behar dira kontutan. 4.3. Irudian azaltzen den moduan, H3K4 eta H3K36 taldeak trimetilatuak daudenean, transkripzioa aktibatu egiten da, eta metilazio maila gutxitzerakoan berriz, eten egiten da. H4K20, H3K9 eta H3K27A taldeak trimetilatuak daudenean berriz, eragin desaktibatzailea dute transkripzioarekiko.^{2,17}

Ondorengo ataletan era laburrean histonen desmetilasen ezaugarri nagusiak azalduko dira, LSD familia lehenik, eta Jmj-C dominio duten histonen desmetilasak jarraian.

4.2.1. Lisinen desmetilasa zehatzak

Lehenago aipatu den moduan, LSD entzimak monoaminoxidasen barruan batzen dira eta FAD-a erabiltzen dute kofaktore bezala. Aldi berean, familia hau bitan banatzen da. Lehen histonen desmetilasa bezala LSD1 aurkitu zuten (KDM1A edo AOF2 izenez ere ezagutua),¹³ eta urte batzu beranduago Karytinosek beste ikerlari batzuekin batera, bigarren entzima topatu zuten, LSD2 (KDM1B o AOF1 izenez ere ezagutua).^{14e} Bi familientzat amankomunak dira muturreko amino oxidasa C dominioa eta SWIRM dominioa.¹⁸

Entzima hauek, mono- eta dimetilatu dagoen H3K4 taldea desmetilatzeke gai dira.¹³ Errezeptore androgenikoarekin batzean gainera, LSD1 entzima

^{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.

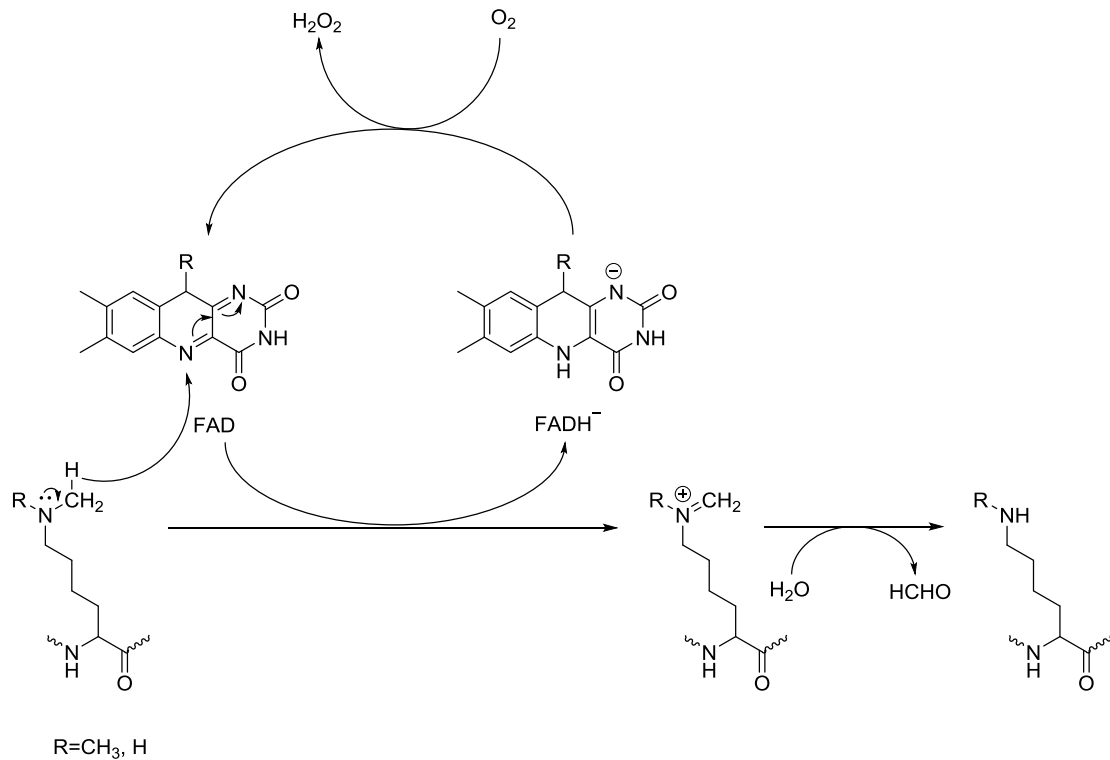
¹⁸ Y. C. Zheng, J. L. Ma, Z. R. Wang, J. F. Li, B. L. Jiang, W. J. Zhou, X. J. Shi, X. X. Wang, W. Zhao, H. M. Liu, *Med. Res. Rev.* **2015**, 35, 1032-1071.

4. Kapitulu

metilazio maila bereko H3K9 taldean ere aktiboa da.¹⁹ LSD entzimen desmetilazio erreakzioaren nondik norakoek eztabaida sortu dute, erreakzioaren artekari den imina hidruoaren transferentziaz edota mekanismo erradikal baten bitartez eman baitaiteke. Antza denez, 4.3. Eskeman ageri den moduan, LSD entzimek katalizatutako histonen desmetilazioa hidruoaren transferentzi bidez ematen dela proposatu dute hainbat ikerlarik.²⁰ Gauzak horrela, metilatutako lisinaren α posizioko C-H loturaren hausturarekin hasten da erreakzioa. Ondoren, hidruoaren transferentzia ematen da kofaktoreari FADH sortzen delarik. Jarraian O₂ medio, zeinak elektroi hartzaile moduan jokatzen du H₂O₂ emanaz, eta FAD-a birsortuz. Azkenik, sortutako iminaren hidrolisiaren ondoren, dagozkien desmetilatutako lisina eta formaldehidoa sortzen dira (ikus 4.3. Eskema). Hau guztia kontutan izanda, LSD entzimak trimetilatuak dauden lisina taldeak desmetilatzeko gai ez direla ondoriozta daiteke, erreakzioa katalizatze beharrezkoak baitira nitrogenoaren elektroi ez lotzaileak.

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.



4.3. Eskema. LSD-ak katalizatutako lisinen desmetilazio erreakzioa.

4.2.2. Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasak

Oxigenasen barruan kokatzen dira entzima hauek, α -zetoglutaratoa eta Fe(II) erabiltzen dituztelarik kofaktore bezala. Familia hau, histonetan ageri diren lisina taldeak desmetilatzen dituzten histonen desmetilasek eta hidroxilasek osatzen dute.

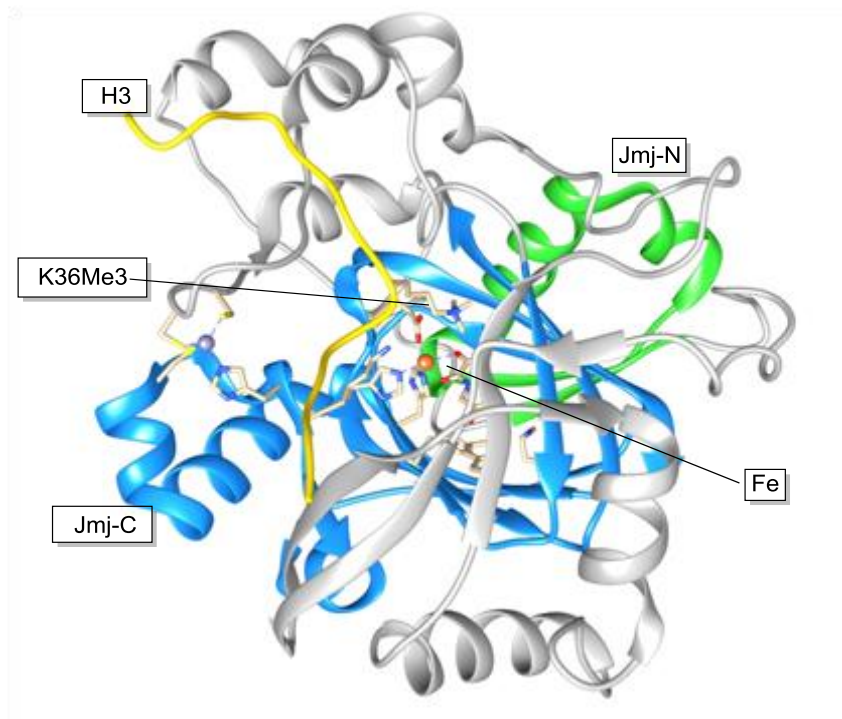
Jmj-C dominioa *knockout* arratoien zirrikito neuraletan ageri zen proteina batean ikusi zen lehen aldiz. Proteina haren gurutze itxurari zor dio izena entzima familia honek, izan ere japoneses "Jumonji"-k gurutze esan nahi du.²¹

Gaur egunerarte, Jmj-C dominioa duten 30 histona desmetilasa baina gehiago ezagutzen dira. 4.3. Irudian ageri den bezala, dominio honek Fe (II)-z

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

4. Kapitulu

osatutako gune metalikoa du, oktaedrikoki koordinatua, eta α -zetoglutaratoa erabiltzen ditu kofaktore bezala. Dominio hau zortzi lamina β , burdinari lotutako hiru aminoazido, His188, His276 eta Glu190, (zeina Asp-naz ordezkaten den batzuetan), eta α -zetoglutaratoari batzen zaizkien beste bi aminoazidok, Thr185/Phe185, (batzuetan Ser/Ala/Lys-naz ordezkatuak), eta Lys206-ak osatzen dute.^{14b,22} Kimikoki ezaugarri antzekoak dituzten aminoazidoak ageri dira dominio honetan. Honen erakusle dira Glu eta Asp aminoazidoak, edota, Thr eta Ser. Beraz, urteetan zehar eskala filogenetikoan dominio hau bere horretan mantendu dela ondoriozta daiteke.²³



4.3. Irudia. JMJD2A H3K36-arekin batera dagokion egitura kristalizatuaren irudia PDB ID: 2P5B, Jmj-C dominioa urdinez, Jmj-N dominioa berdez, Fe naranjaz, eta azkenik H3 horiz azpimarratzen direlarik.

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. Integr. Plant. Biol.* **2008**, *50*, 886-896; c) Z. Z. Chen, J. Y. Zang, J. Whetstone, 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.

Entzima hauen jarduera katalitikoak Jmj-C dominioan du jatorria, baina zenbait ikerlarik^{14,24} Jmj-N dominioak ere parte hartzen dutela diote. Gainontzeko dominioen betebeharra bestalde, entzimek lisinek duten metilazio mailarekiko aurkezten duten hautakortasunaren eragile izatea da. Hori dela eta, kofaktoreen inguruan ageri diren aminoazidoetan aldaketa gehiago antzematen dira entzimaren gune aktiboa kanpo aldearekin elkartzen duen kanalean baino. Honenbestez, sustratoek konformazio desberdinak hartzen dituzte, eta beraz, gune aktiboekin modu desberdinean lotzen dira.²⁴ Honen ondorioz metaloentzima hauek aurkezten duten hautaketa maila sustratu desberdinekiko. KDM7B-k esaterako (PHF8 bezala ere ezagutua), entzimaren PHD dominioaren, eta H3K4Me3 artean ematen den elkarrekintza katio π -hidrofobikoak, H3K9Me2/1 taldearen desmetilazioa ahalbideratzen du.²⁵

Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasek, KDM ondorengoetan, jarduera katalitikoa lisina tri-, di- eta monometilatuengan burutzen dute.^{14b,26} 4.1 Taulan ikusi daitekeen moduan, familia hau beste azpifamilietan sailkatu daiteke, KDM_n, non n=2-8. Azpifamiliako entzima talde bakoitzak, metilazioa maila desberdineko, eta posizio jakin bateko lisinak desmetilatzeko gai dira. Adibidez, KMD3-ak H3K9Me1 eta H3K9Me2 taldeengan du eragina, KDM4 azpifamiliko entzimek ordea, tri- eta dimetilatuak dauden sustratoekiko aurkezten dute lehentasuna. Zentzu honetan, KDM4A-k, KDM42B-k eta KDM4C-k H3K9MeX, H3K36MeX eta H1.4K26MeX desmetilatzen dituzte, X=2,3 delarik. KDM4D eta KDM4E berriz, ez dira gai H3K36Me2/3 taldea desmetilatzeko, H3K9Me3-an

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

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.

4. Kapitulu

soilik betetzen baitute bere jardura. Bidenabar, KDM6-ak H3K27MeX desmetilatzen du bakarrik, X=2,3 izanik.^{3b} Honenbestez, entzima hauek jardun katalitiko oso aldakorra dutela ondoriozta daiteke, ez baitute eredu zehatz bat jarraitzen. 4.1 Taulan ageri diren adibideekin ikusi daitekeen moduan, entzima bakoitzak talde eta metilazio maila zehatz batengan burutzen dute euren jardura. Honetaz gain, Jmj-C dominioa duten zenbait histonen desmetilasek metilatuak dauden argininetan ere jardura katalitikoa dutela ikusi da.²⁷ Azken prozesu hau ez dago hain aztertua, eta hortaz, ikerketa gehiagoren beharra dago erreakzioaren mekanismoa zehazteko, baita bere eragin biologikoaren garrantzia ikusteko ere.

Aurrerago aipatuko den moduan, Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasen adierazpen genetikoan ematen diren aldaketak zenbait minbizirekin erlazionatzen dira. Gaisotasun eta entzimen arteko erlazio zuzena ezezaguna da, minbizi motaren arabera entzimen adierazpen maila handitua edo txikitua egon baitaiteke, gainera geneak mutatuak, translokatuak edo ezabatuak egon daitezke. Laburpen moduan 4.1 Taulan Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasak aipatzen dira, gaurdaino ezagutzen diren histona talde zehatzekin duten elkarrekintza, eta jakina den kasuetan, erlazionatzen diren minbizi mota zehatzekin ere.²⁸

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.

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.

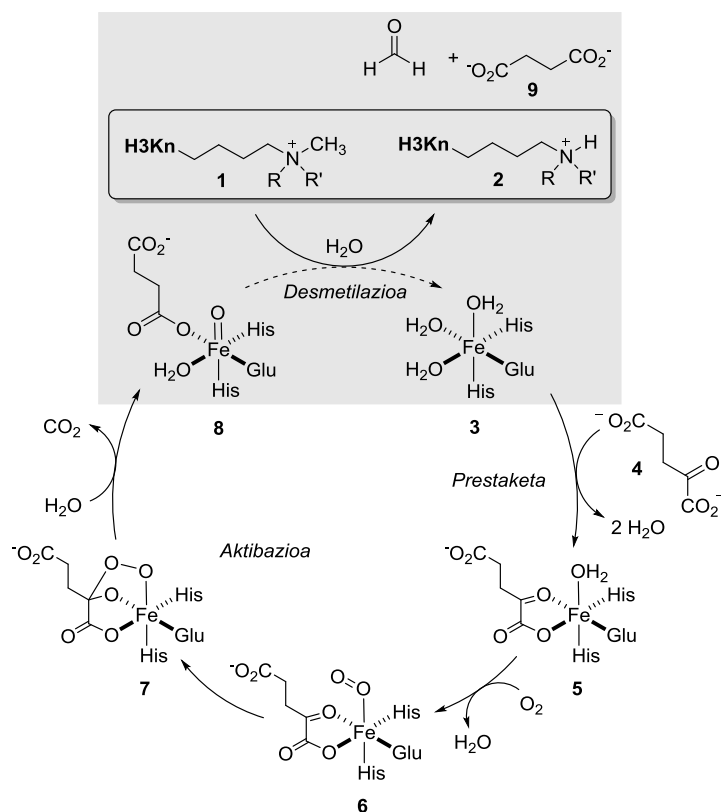
Subfamilia	Ordezko izenak	Sustratoa	Minbiziarekiko erlazioa	
KDM2	2A	JHDM1A,FBXL11	H3K36Me2/1	birikak, bularra, gastrikoa, prostata, glioblastoma
	2B	JHDM1B, FBXL10	H3K36Me2/1, H3K4Me3	leuzemia, maskuri, pankreas, prostata, glioblastoma
KDM3	3A	JHDM2A, JMJD1A, TSGA	H3K9Me2/1	bularra, prostata, kolorektala, giltzurrun, hepatozelularra
	3B	JHDM2B, JMJD1B,5qNCA		minbizietan maiz baztertua
		JHDM2C, JMJD1C, TRIP8		erregistratu gabea
KDM4	4A	JHDM3A, JMJD2A	H3K9Me3/2/1 H3K36Me3/2/1 H1.4K26Me3/2	bularra, maskuria
	4B	JHDM3B, JMJD2B		tumorea nerbio periferikoko zorroan
	4C	JHDM3C, JMJD2C, GASC1		bularra, prostata, eskamadun zelulak, linfoma, B zelulak
	4D	JHDM3D, JMJD2D	H3K9Me3/2/1 H1.4K26Me3/2	erregistratu gabea
	4E	JMJD2E	H3K9Me3/2/1 H1.4K26Me3/2	erregistratu gabea
	4F	JMJD2F	No registrado	erregistratu gabea
KDM5	5A	JARID1A, RBP2	H3K4Me3/2/1	birikak, hematopoietikoa, melanoma, gastrikoa
	5B	JARID1B, PLU1		bularra, prostata, maskuri, lepo, testikularra
	5C	JARID1C, SMCX		prostata
	5D	JARID1D, SMCY		prostata
KDM6	6A	UTX, MGC141941	H3K27Me3/Me2	bularra, birikak, gibela, mieloma anitza
	6B	JMJD3, KIAA0346		leuzemia, birikak, gibela, prostata
	6C	UTY		erregistratu gabea
KDM7	7A	JHDM1D, KIAA1718	H3K9Me2/Me1 H3K27Me2/1 H4K20Me1	erregistratu gabea
	7B	PHF8, JHDM1F, KIAA1111, ZNF422	H3K9Me2/Me1 H4K20Me1	eskamadun zelulak, prostata, birikak
	7C	PHF2, KIAA0662, JHDM1E,CENP35, GRC5	H3K9Me2/Me1 H4K20Me3 H3K27me2/1	bularra, kolorektala, urdail, buru, eskamadun zelulak
KDM8	JMJD5	H3K36me2	erregistratu gabea	

4.1. Taula. Jmj-C dominio duten histonen desmetilasen familia, minbiziarekiko erlazioa zuzentzen duten sustratoekin batera.

4. Kapitulu

4.2.3 Ziklo katalitiko

Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasek burutzen duten desmetilazio erreakzioa burutzeko, 4.4 Eskeman adierazten den erreakzioa da arrunki onartzen dena.²⁹ Ziklo katalitiko hau, hemo talderik gabeko eta kofaktoretzat burdina duten entzimen ziklo katalitikoan oinarrituta dago.³⁰



4.4. Eskema. Jmj-C dominio duten histonen ziklo katalitiko orokorra. Desmetilazioaren urratsa grises irudikatua dago.

Lehen aipatu den moduan, entzimaren gune aktiboa egoera estarian, Fe(II)-ez eraturiko zentru metalikoak **3** osatzen du, zeina Glu bati eta bi His taldeei koordinatua dagoen. α -zetoglutarato **4** batzen zaienean, **5** artekaria sortzen da.

²⁹ 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.

³⁰ *Iron-Containing Enzymes Versatile Catalysts of Hydroxylation Reactions In Nature*, (Eds.: S. P. de Visser, D. Kumar), RSC Publishing, Cambridge, **2011**.

Jarraian, oxigeno atomoarekin erreakzionatzeak gune metalikoa aktibatzen du **6** konposatua sortuz, burdin superoxidoa, non oxigeno molekula bakarra lotzen zaion metalari. Patonek, beste ikerlari batzuekin batera,³¹ elkarrekintza energiak deskonposatu ostean, elkarrekintza energiaren erdia kintuplete egoeran dagoen O₂-Fe loturari dagokiola ikusi zuten. Gainontzeko energia N-metilatutako lisina, eta beste taldeen arteko elkarrekintzei dagozkie. Gainera, His182, Asp187 eta Lys200 taldeek oxigeno molekularrarekiko elkarrekintzan eragin positiboa dutela ikusi zuten, energia elektroestatikoa balio negatiboa gehitzen baitio. Honenbestez, oxigenoarekiko afinitatea handitu egiten da. Aipatutako gune aktiboko talde zehatz hoiek aldatzearekin, berekiko afinitate maila nabarmen aldatuko litzatekeela ondoriozta daiteke adierazpen hauetatik. Ezagutza hauek guztiak lagungarri dira oso botika berrien garapenean.

Ziklo katalitikoaren ondorengo urratsa, **6**. konposatuaren eraldaketari dagokio, **8**. artekari ferriloa sortzeko. Pauso hau beste α -zetoglutaratoarekiko menpeko diren entzimetarako ikertua dago.³² **6** artekariaren zetoni oxigeno atomoa adizionatzean eraldaketa hasten da, [2.1.1] bizikloa **7** emanez. Urrats honek, **5**. konposatua **8**. konposatuan eraldaketaren erreakzioaren abiadura mugatzen du.³³ Jarraian, **7**. artekariaren deskarboxilazioaren ondorioz **8**. konposatua sortzen da. Urrats honen aktibazio energia oso handia da, eta

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.

4. Kapitulu

beraz, deskarboxilazioaren pausoa itzulezina dela ondorioztatzen da.³⁴ Gainera, arrazoi beragatik, DFT kalkuluek **7.** peroxosukzinato artekaria, desmetilazioaren prozesuan oxidatzailea ezin zitekela izan iradokitzen dute.³⁵ **8.** konposatua kintuplete egoeran dago, eta aurrekoak baino egonkorragoa da. Ildo berean, Visserrek beste ikerlari batzuekin batera, QM/MM kalkuluen bitartez, **5.** konposatua **8.** konposatuan eraldaketzeko prozesua, α -zetoglutaratoarekiko menpeko diren beste entzima batzuetan ere ematen dela egiaztatu zuten. Halaber, inguru desberdinak dituzten gune katalitikoetan ere, prozesu hau berdintsu mantentzen dela ikusi zuten.³⁶

4.5 Eskeman lisina taldearen desmetilazio erreakzioaren ziklo katalitiko

ageri da. Bertan, **8.** artekaria sortu eta N-metilutako lisina taldearen sarrerak, lisinaren desmetilazioa ematen dela ikus daiteke. Onartutako mekanismoa aintzat hartuz, **8.** konplexuak Fe(IV)=O **1** sustratoaren metilo taldearekin erreakzionatzen duenean **10.** hidroxilatutako artekaria, eta **11** katio erradikala sortzen dira. Honen segidan, **10** eta **11** konposatuak konbinatzen dira, **12.** artekaria sortuz. Azken konposatu honek, **13** katioi hidroxilatua, eta **9** sukzinatoa askatzen ditu zentru metalikotik, **3.** artekaria birsortuz. Ondoren, ziklo katalitiko osatzeko **13.** artekariaren hidrolisia ematen da, formaldehidoa eta desmetilatutako lisina emanaz.³⁷ Azkenik, **3.** Konplexuari oxigeno molekularra

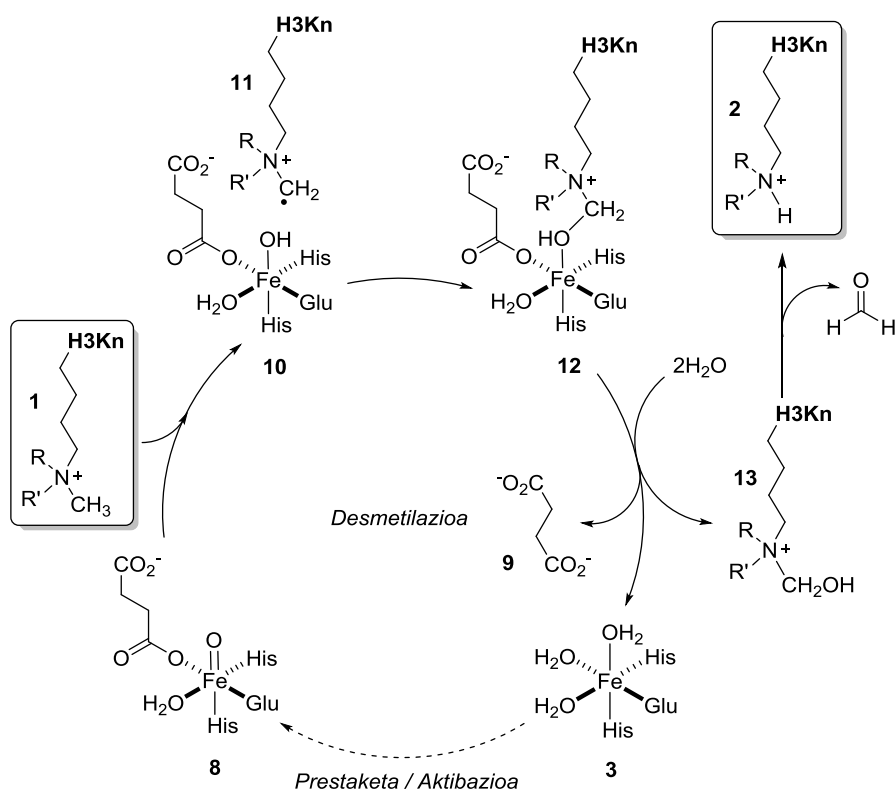
³⁴ S. P de Visser, in *Experimental and Computational Studies on the Catalytic Mechanism of Non-Heme Iron Dioxygenases*. In *Iron-Containing Enzymes-Versatile Catalysts of Hydroxylation Reactions in Nature*, (Eds.: S. P. de Visser, D. Kumar), RSC Publishing, Cambridge, **2011**, pp. 1-41.

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.

eta α -zetoglutaratoa gehitzen zaizkionean, ziklo katalitikoa berrabiarazten da (ikus 4.4 Eskema).



4.5. Eskema. Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasen desmetilazio erreakzioari dagokion mekanismoa.

Deskribatutako erreakzio mekanismoa $8 + 1 \rightarrow 10 + 11 \rightarrow 12$ da. Mekanismo hau Shaik-ek beste ikertzaile batzuekin batera, hemo taldea duten entzimentzat deskribatu zutenaren antzekoa da.³⁸ Entzima hauen artean, ikertuena P450 zitokromoak direla esan daiteke. Aztertutako erreakzioen artean, entzima hauek katalizatutako amina tertziarioen oxidazio dago. Erreakzio horretarako, bi mekanismo desberdin aztertu dira: desmetilazioa batetik, eta N-oxidoen sorrera bestetik.³⁹ Bestalde, amina di- eta monometilatuentzat, N-

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.

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; b) C. Li, W. Wu, K.-B. Cho, S. Shaik, *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 8492-8503.

4. Kapituluua

hidroxiaminen sorrera ere aztertu da.⁴⁰ Aipatutako ziklo katalitikoak, zitokromo P450-az gain, hemo talderik ez duten beste entzima batzuentzat ere bateragarria da, AlkB entzimarentzat esaterako.⁴¹ Dena den, hemo talderik ez duten entzimek katalizatutako desmetilazio erreakzioaren xehetasunak ez dira hain ongi ezagutzen, eta Jmj-C dominioa duten entzimentzat aztertu gabea zen gure lana burutu arte.

Aurreko kapituluetan aipatu den moduan, hemo taldea duten entzimek katalizatutako desmetilazio erreakzioa, espin baxuko egoeran egonda burutzen dute, hots, parekatu gabeko elektroiei gutxi dituztelarik. Gertakari hau, hemo taldearen eremu sendoko ligandoen izaerarekin bat dator. Jmj-C dominioa duten entzimetan ordea, eremu ahuleko ligandoak izanik, erreakzio bera espin egoera altuan, edo erdian emango dela aurreikusten da, hau da, triplete edo kintuplete egoeretan. Ziklo katalitikoaren aktibazio zein prestaketan gertatzen den bezala, desmetilazioa ere, bi egoera desberdinetan zehar emango den prozesua izango dela espero da.⁴² Hori dela eta, erreakzio bidean zehar espinen gurutzaketak burutzea posible izango da. Hori gertatu ahal izateko, bi espin desberdinen artean espin azelerazioa eman dadin gutxieneko espinen arteko gurutzaketa bat eman behar da.⁴³

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.

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**.

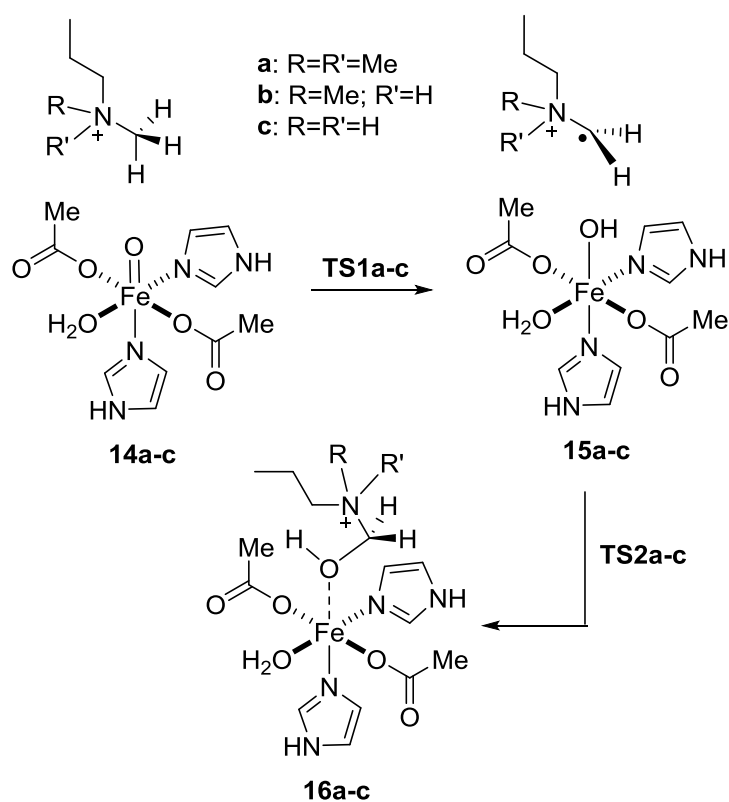
⁴³ P. L. Holland, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1696-1702.

8. artekariak Fe(IV)=O burututako desmetilazio erreakzioa aztertu nahian, erreakzioa egoki isladatuko duen modelo konputazionala aukeratu zen jarraian.

4.6 Eskeman ageri da eraikitako ereduak. Berau prestatzeko, irizpide nagusi bezala UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan, $\epsilon=78.39$ -ekin modu egokian lan egin ahal izateko ahalik eta atomo gehien izango zituen ereduak hartu zen kontuan. Hortaz, Jmj-C dominioa duten histonen desmetilazioaren gune aktiboetan dauden talde amankomunak aintzat hartu ziren soilik. Honen baitan, **14a-c** erreaktiboaren His eta Glu taldeak, 1H-imidazol eta azetato taldeen bitartez irudikatu ziren hurrenez hurren. Halere, aurreko lanek α -zetoglutaratoaren deskarboxilazioan sortutako CO₂ gune aktiboaren ingurunean gelditzen dela iradokitzen zuten arren, eredu honetan ez zen kontutan izan.²⁹ Ez dago argi konposatu hau ziklo katalitikotik noiz kanporatzen den, eta beraz, burdinaren koordinazio eremuaren inguruan ugariak diren ur molekula batez asetzeari erabaki zen. Sukzinato taldea berriz, azetato batez irudikatu zen, eta lisina taldea, (poli)metil n-propilamonio katioi taldez adierazi zen. Aztertu nahi den desmetilazio erreakzioaren ezaugarri elektronikoak zein egiturari dagozkionak jasotzen ditu proposatutako gure ereduak. Onartutako mekanismoa haintzat hartuz, 4.6 Eskeman adierazten da aztertutako den erreakzio bidea. Honela, erreakzioa ϵ -N-metilutako substratuak ferrilo taldeari (Fe(IV)=O) hidrogeno atomo bat transferitzean hasten da **15a-c** emanaz. Bigarren urrats batean, artekari hauek dagokizkien Fe-ari koordinatutako aminokarbinoletan eraldatzen dira, **16a-c**. Lan honetan aztertutako erreakzio bidea urrats honetan amaitzen da. Dena den, gure erreakzio bidearen produktuak ziklo katalitikoko artekari dira. Ziklo katalitiko osoa osatzeko N-(hidroximetil)propan-1-aminio katioiaren

4. Kapituluua

hidrolisia falta da, zeinak formaldehidoa eta dagokion desmetilatutako amina taldea ematen dituen (4.5 eta 4.6 Eskemak).



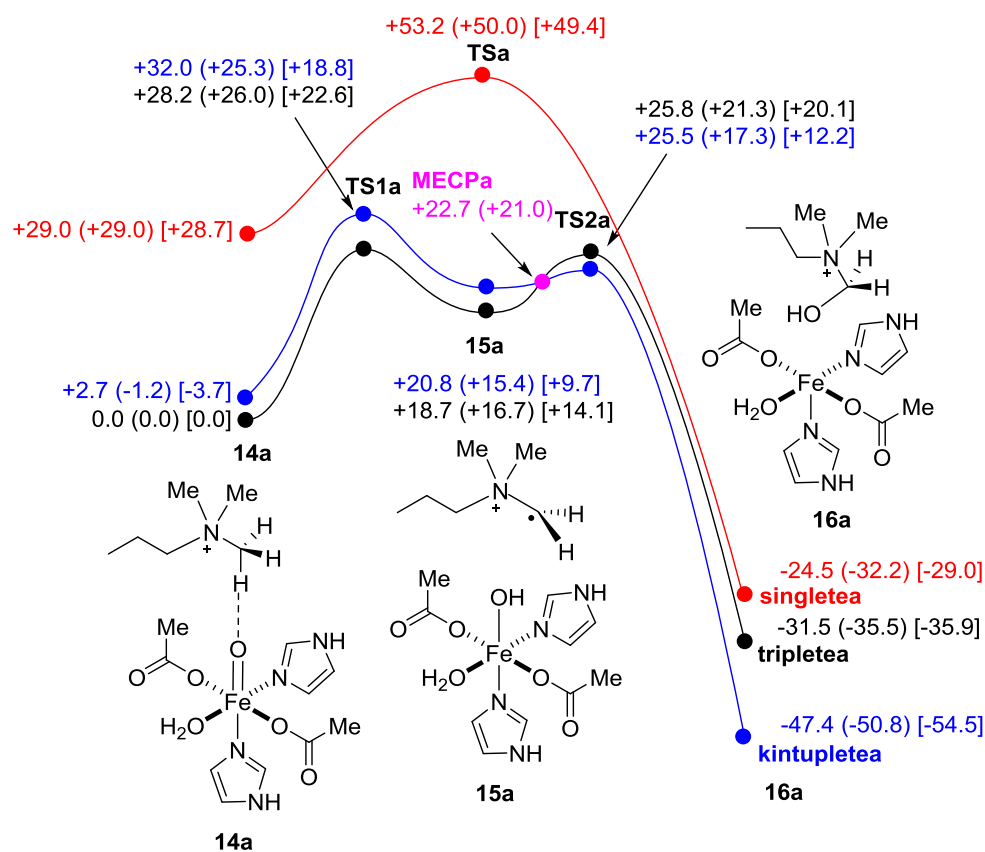
4.6. Eskema. Amonio tri, di- eta monometilatuen desmetilazio erreaktziorako proposatutako eredu konputazionala.

4.3. Emaitza konputazionalak eta hausnarketa

Ondorengo ataletan lisinen metilazio maila desberdinentzat aztertutako erreakzio bideen emaitzak ageri dira. Zehazki, Jmj-C dominio duten histonen desmetilasek katalizatutako histonen lisina tri-, di- eta monometilatuen desmetilazioa erreakzioak banan bana adieraziko ditugu. Kasu guztietan desmetilazio erreakzioa hiru espin egoera desberdinetan aztertu ziren, baxuan (singletea, S=0), ertainean (tripletea, S=1) eta altuan (kintupletea, S=2).

4.3.1 Trimetilalutako Substratoak

4.4. Irudian lisina trimetilatuaren desmetilazioaren erreakzio bidea ageri da. Bertan **14a** erreaktiboa, **16a** produktu desmetilatuan eraldatzeko erreakzioa irudikatu da. Erreakzio bidean ikusi daitekeen moduan, erreakzioaren mekanismoa espin egoerarekin aldatzen da. Honela, espin baxuan erreakzioa kontzertatua da, triplete zein kintuplete egoeretan ordea, erreakzio bera urratsetan ematen da. Azken prozesu hau entzima mota hauetarako proposatutako erreakzioekin bat dator (ikus 4.5. eta 4.6. Eskemak).



4.4. Irudia. **14a** **16a**n eraldatzeko erreakzio bidea UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan kalkulatu eta $\epsilon=78.39$ -rekin. Energiak kcal/mol-an adieraziak, erlatiboak dira triplete egoeran dagoen **14a**-rekiko. Halaber, energia baxueneko gurutzaketa puntua, **MECPa** adierazita dago. Parentesi eta kortsxeteetan adierazitako energiak energia erlatibo eta Gibbs-en energiari dagozkie (298K) hurrenez hurren, UB3LYP (PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ //UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ teoria mailan kalkulatu.

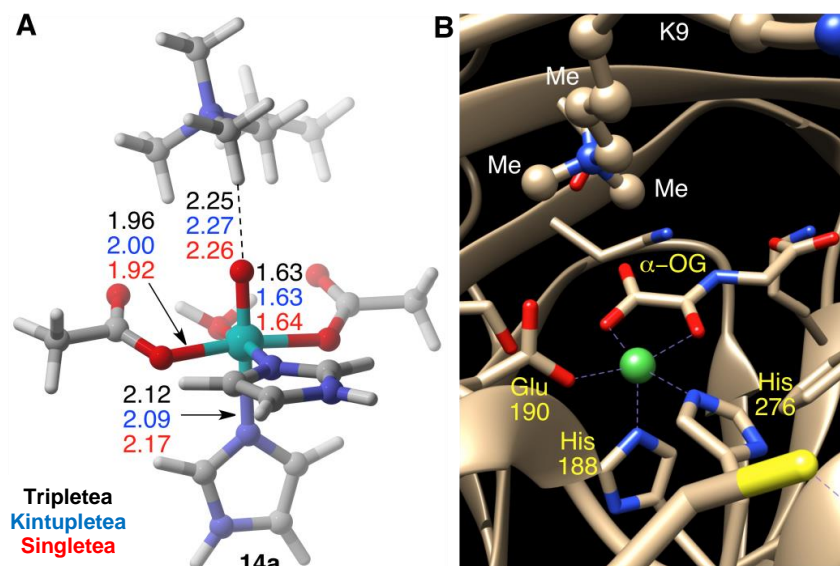
Gure emaitzek erreakzio bide osoan zehar espin baxuko egoera askoz energetikoa dela adierazten dute. Espin ertain eta altuko egoerekin alderatuz, 20

4. Kapitulu

eta 30 kcal/mol bitarteko diferentziak ikusten dira. Orokorrean, energia mailen sailkapenean espin altuarekiko aldeko joera bat antzematen da, ondorengo sekuentziaren jarraituz kintupletea < tripletea < singleteko hurrenkera dutela nabari da. Emaiza hauek Patonek beste ikerlari batzuekin batera lortutakoekin bat datoz,³¹ baita hemo talderik gabeko beste entzima batzuentzat lortutakoekin ere, AlkB esaterako.⁴⁴ Erreakzio bideko konposatuen azterketan gehiago sakonduz, **14a** erreaktibo konplexua triplete eta kintuplete espin egoerekiko ia isoenergetikoa dela ikusten da. Singlete egoera ordea, 29 kcal/mol energetikoagoa da. Diferentzia hauek ikustean, optimizatutako geometriak ere nahiko desberdinak izango direla pentsarazten dute. Dena den, 4.5. Irudian ikus daitekeen moduan, burutapen hau ez da zuzena, ez baita desberdintasun nabarmenik antzematen hiru espin egoeren artean, egitura ia berdinak lortu baitziren. Konplexu erreaktiboekin jarraituz, hiru egituretan lortu den metilo taldeen orientazioa JMJD2A-k eta K9H3Me3 kristalizatutako egiturek duten orientazio bera lortu zela aipatu behar da, (pdb kodea: 2q8c, ikus 4.5. irudia).⁴⁵

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.



4.5. Irudia. (A) **14a** konposatuaren optimizatutako geometria triplete egoeran UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) mailan. Loturen luzerak (Å-tan) adierazten dira triplete (beltzez), kintuplete (urdinez), eta singlete (gorriz) egoeretarako. (B) Histonen desmetilasa den JMJD2A-k (pdb kodea 2q8c), H3 histonako lisina K9 trimetilatuarekin eta α -oxalil glizinarekin (α -oxoglutaratoaren orde), osatzen duten gune aktiboaren X-izpien difrakzioa.

4.5. Irudian ageri den moduan, **14a** konplexuko Fe=O taldeak, trimetilamina baten metilo batekin elkarrekintza egiten duela ikus daiteke. Honen ondorioz, erreakzio bide desberdinak suertatzen dira espin egoeren arabera. Honela, S=0 denean, 21 kcal/mol-eko aktibazio energia gainditu ostean erreakzio kontzertatu bitartez **16a** hidroximetilamonio produktua lortzen da. Elkarrekintza berak ordea, triplete eta kintuplete espin egoeretan **15a** artekaria ematen dute gutxi gorabehera 22.5 kcal/mol-eko aktibazio energia bat gainditu eta gero (ikus 4.4. Irudia). Beraz, egoera elektroniko hauetan desmetilazio erreakzioa urratsetan ematen da. Berriz ere, 4.6. Irudian ikusten den moduan, bi desmetilazio erreakzioen prozesuak desberdinak izan arren, **TSa** eta **TS1a** geometriak oso antzekoak dira. Trantsizio egoera hauek O-H loturaren eraketatik gertuago daude metiloaren C-H lotura homolitikoaren hausturatik baino, eta beraz trantsizio egoera hauek berantiarak direla esaten da. Karbinolaren eraketan ordea ez da gauza bera gertatzen, eta hortaz **TS2a**-n 0.4 Å-eko diferentziak antzematen dira

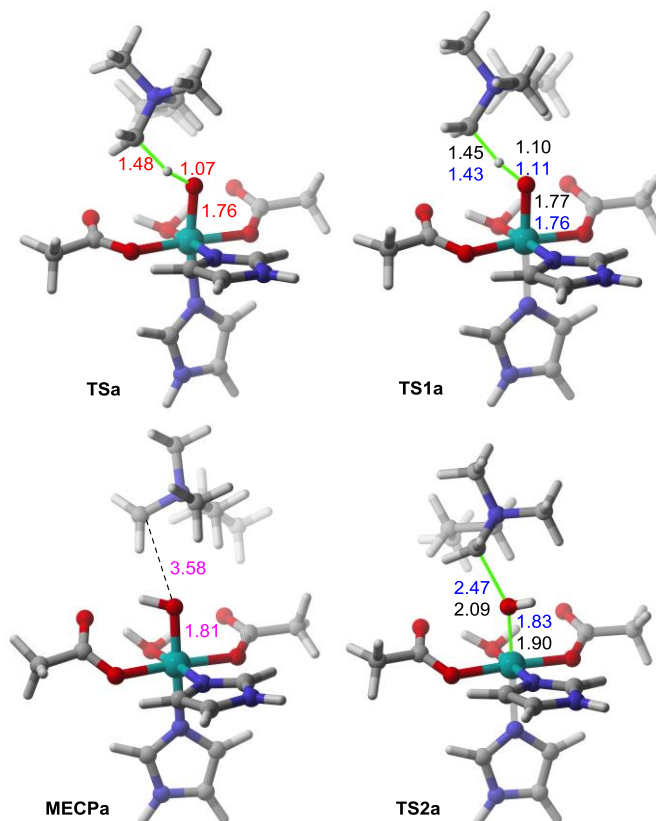
4. Kapitulu

triplete eta kintuplete espin egoeretan. Hala eta guztiz ere, desberdintasun honek ez du aktibazio energian eraginik izan bi espin egoeretan.

Erreakzio bidearen azterketarekin jarraituz, **14a** eta **TS1a** konplexuak espin ertaineko egoeran hobesten dira, **TS2a** eta **16a** konplexuak berriz espin altuan daudela ikusi da, non 8 kcal/mol-eko eta 20 kcal/mol-eko diferentziak antzeman diren. Beraz, erreakzio bidean zehar espin egoeren gurutzaketa puntu bat egongo dela ondoriozta daiteke. Ohikoa da erreaktibitate mota hau hemo talderik gabeko eta Fe=O frakzioa duten entzimetan ikustea, non gune katalitikoak espin egoera desberdinak izaten dituen erreakzio bide berean.⁴⁶ Beraz, arestian esan bezala, Jmj-C dominioa duten entzimek katalizatutako desmetilazio erreakzioa bi espin egoeretako erreakzioa dela berresten da.

Egoera bikoitzeko erreaktibitatea aurkezten zutela ikustean, UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ (Fe) mailan energia baxueneko gurutzaketa puntua MECP kalkulatzeko erabaki zen. 4.6. Irudian optimizatutako **MECPa** egitura irudikatzen da, zeina **15a** artekariaren oso antzekoa den.

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



4.6. Irudia. UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) mailan optimizatutako **TSa**, **TS1a** eta **TS2a** trantsizio egoeren geometriak, baita energia baxueneko gurutzaketa puntua **MECPa** ere. Geometriak espin egoera triplete (beltzez), kintuplete (urdinez) eta singleteei (gorriz) dagozkie. Loturen luzerak (Å-tan) adieraziak daude. **TS1a** eta **TS2a**-n irudikatutako geometriak espin egoera triplete eta kintupleteenak dira hurrenez hurren.

Jarraian, espinaren gurutzaketak erreakzio abiaduraren konstantean duen eragina kalkulatu zen.

Triplete-kintupleteen arteko hesi adiabatikoa ΔG_{TQ}^a behagarri den konstante zinetikoarekin k_{obs} erlazionatua dago ondorengo erreakzioaren bitartez:⁴⁷

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

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

4. Kapituluua

Non P_{TQ} , **MECPa** egituran triplete eta kintuplete bitartean igartzeko probabilitatea den. Aktibazio energi eragingarria Eyringen ekuazioaren marko barruan ΔG_{eff}^a bezala definitzen bada, eta espin egoeren gurutzaketa ez bada kontutan hartzen, ondorengo erlazioa lortzen da:

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

Beraz, Harveyek⁴⁷ ezarritakoaren arabera, P_{TQ} aktibazio entropiaren termino gehigarri bezala irudikatu daiteke.

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

Ondorioz, 3.17 eta 3.18 ekuazioak aintzat hartuz P_{TQ} kalkulatu ahal izateko beharrezkoak diren terminoak zenbatetsi ziren. **MECPa**-rentzat ondorengo balioak lortu ziren: $H_{SOC}^2 = 163.4 \text{ cm}^{-1}$, $\Delta F = 0.0425 \text{ hartree/bohr}$, eta $\mu = 78.2 \text{ a.m.u.}$ Balio hauekin gurutzaketa probabilitatearen balioa $P_{TQ} = 0.92$ zela kalkulatu zen, 1 baliotik nahiko urbilekoa. Hori dela eta, energia aktibazio efektiboarentzat $\Delta G_{eff}^a = 2.52$ -eko balioa lortu zen, UB3LYP(PCM)/6-31(d,p) & LanL2DZ (Fe) mailan kalkulaturako ΔG_{TQ}^a balioaren oso antzekoa.

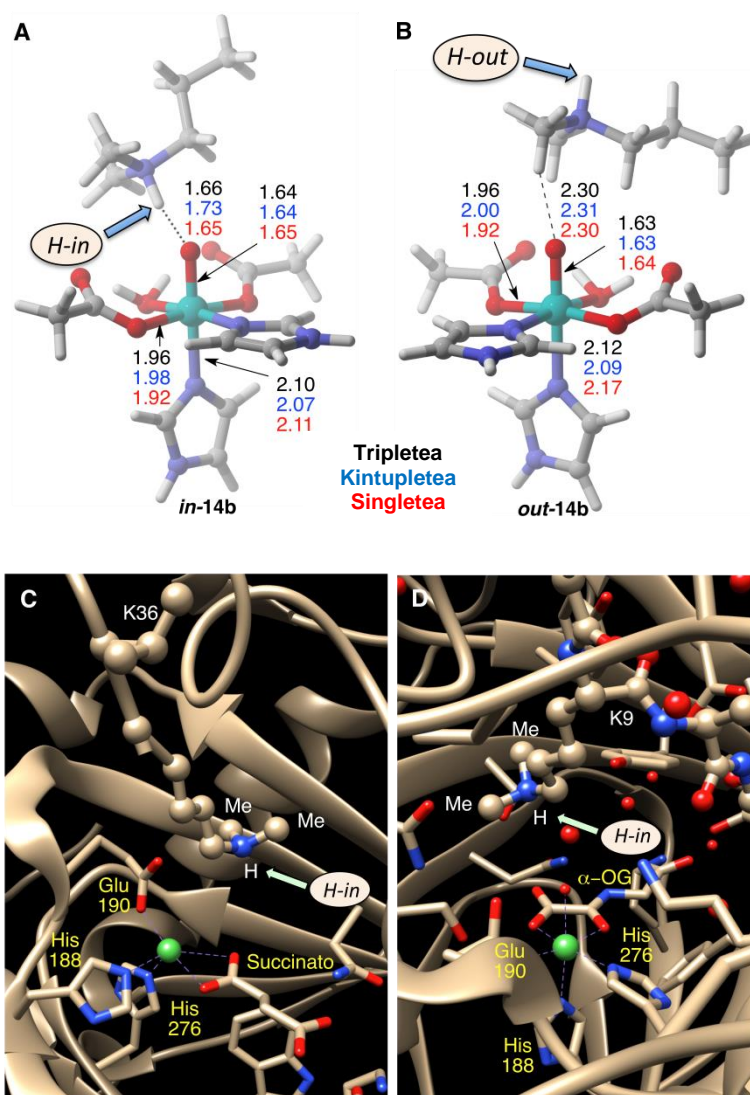
Erreakzio bidearen azterketarekin jarraituz, **15a** eta **TS2a** konplexuen energia azterketak $G(\text{kintupletea}) < G(\text{tripletea})$ joera dutela sumatu zen (ikus 4.4 Irudia). Zentzu honetan, energia orokorreari zero puntuaren bibrazio energia, dispertsio energia, termikoa eta zuzenketa entropikoa batuz gero, espin gurutzaketaren kalkulua egitea ez zen beharrezkoa. Honenbestez, **16a** karbinolaren eraketarako bigarren urratsak gutxi gorabeherako 2.5 kcal/mol-ko

aktibazio energia du. Hori dela eta, desmetilazio erreakzioaren abiadura **TS1a**-ren hidrogeno transferentziak baldintzatzen du.

Lortutako emaitzak aintzat hartuz, **14a** trimetilamonioren desmetilazio erreakzioa kintuplete egoeran ematen da bi urratsetan, lehenak 22.5 aktibazio energia gainditu eta gero erradikal kationiko **15a** artekaria ematen du. Azkenik, espin egoera berean dagoen **16a** karbinola eratzen da. Gainera, erreakzioaren bide osoan zehar triplete eta kintuplete espin egoerek energia maila antzekoa dute, apur bat egonkorragoa izanik azken hau. Halaber, triplete-kintuplete espin gurutzaketak 1 inguruko probabilitatea duela ikusi da.

4.3.2 Dimetilatutako Substratoak

4.7. Irudian ageri den moduan, gune katalikoan histona ϵ -N-Dimetilatuen lisinen metiloek eta protoien kokalekuaren arabera, bi konformazio desberdin hartu daitezke haintzat. Bietako batean, lisinaren Me_2NH taldeak eta $\text{Fe}=\text{O}$ frakzioak hidrogenozko zubi bitartez elkarrekintza egiten dute oxigenoarekin. Egitura hau ***in-14b*** bezala adierazita dago 4.7A irudian. Bigarren konformazioan berriz, N-H taldea $\text{Fe}=\text{O}$ frakzioarekiko antiperiplanar disposizioan kokatua ageri da. Egitura hau ***out-14b*** bezala izendatu da, eta 4.7B irudian ageri da. Hala eta guztiz ere, azken egitura hau ez da atzematen kristalizatutako egituretan. Izan ere, JMJD2A-k H3 histonan dimetilatutako lisina K36⁴⁵ eta K9²⁹-ekin koordinatua ageri diren X-izpien difrakzioak aztertzean, egitura kristalizatuetan soilik H-*in* konformazio ageri dela frogatu zen (ikus 4.7C eta 4.7D irudiak). Dena den, azterketa konputazionala egiterako garaian, bi konformazioak hartu ziren kontutan, eta beraz, bi desmetilazio erreakzio desberdin aztertu ziren. Jarraian, kalkulaturako bi erreakzio bideak azalduko dira.

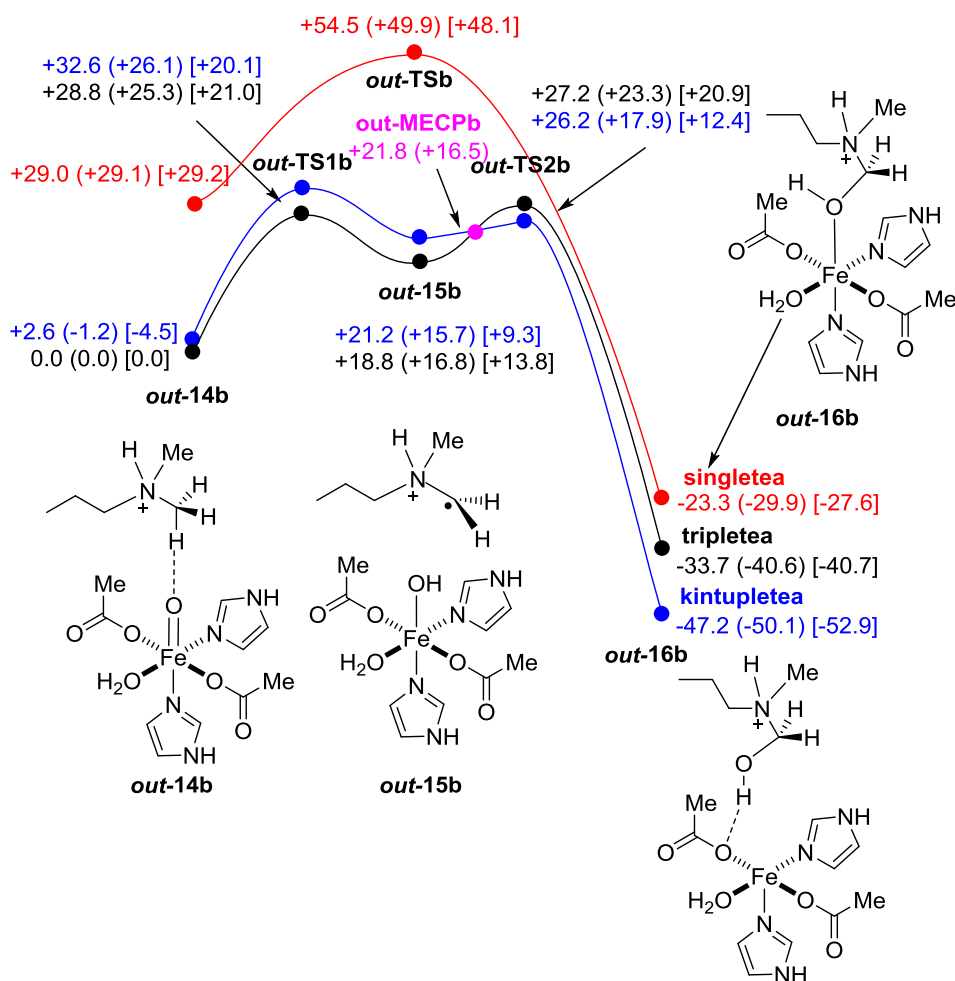


4.7. Irudia. (A) *in-14b* eta (B) *out-14b* konposatuen optimizatutako geometriak triplete egoeran UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) mailan. Loturen luzerak (Å-tan) adierazten dira triplete (beltzez), kintuplete (urdinez), eta singlete (gorriz) egoeretarako. C) Histonen desmetilasa den JMJD2A-k (pdb kodea 2q8d), H3 histonako lisina K36 dimetilatuarekin eta α -oxalil glizinarekin (α -oxoglutaratoaren ordeztan), osatzen duten gune aktiboaren X-izpien difrakzioa. D) Histonen desmetilasa den JMJD2A-k (pdb kodea 2ox0), H3 histonako lisina K9 dimetilatuarekin eta α -oxalil glizinarekin (α -oxoglutaratoaren ordeztan), osatzen duten gune aktiboaren X-izpien difrakzioa

4.3.2.1 Out orientazioa duten dimetilatuak substratoak

out-14b konposatua *out-16b*-an eraldatzeko lortu zen erreakzio bidea, lehenago lisina trimetilatuentzat lortutakoaren oso antzekoa da. 4.8. Irudian ikusi daitekeen moduan, *out-14b* erreaktibo konplexua isoenergetikoa da espin ertain ($S=1$) eta altuko ($S=2$) egoeretan. Espin baxuan ($S=0$) aldiz, konplexu bera energetikoki 29 kcal/mol-ko ezegonkorragoa da. Berrito ere, singlete espin

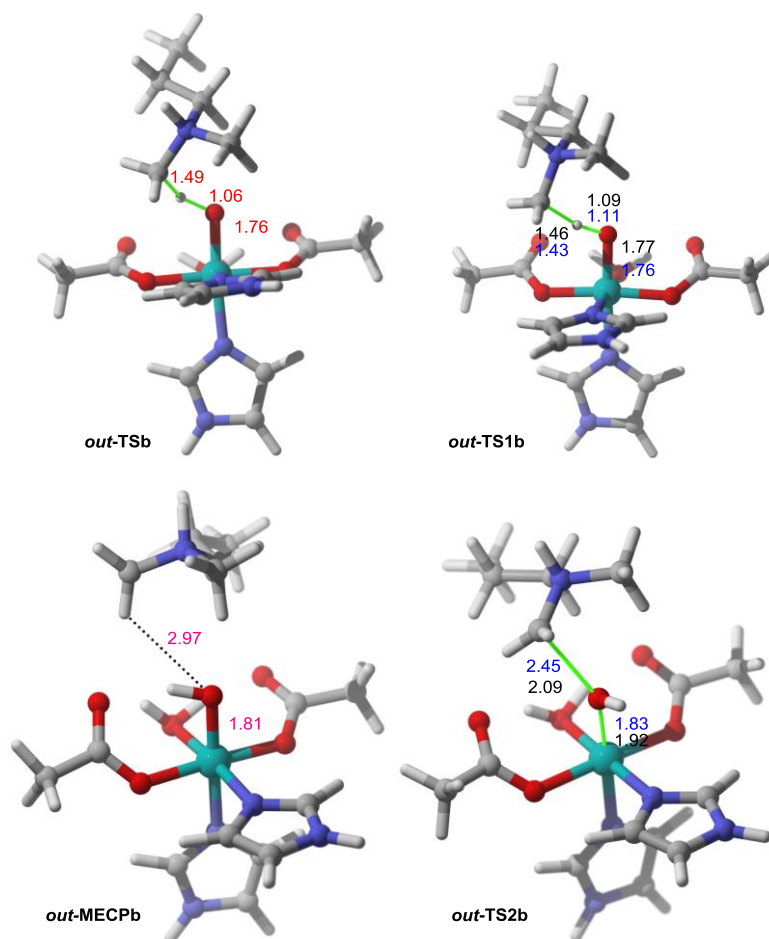
egoeran erreakzioa kontzertatua da, triplete eta kintuplete egoeretan ordea erreakzio bera urratsetan ematen da. Espin ertain eta altuko egoeran, metiloaren hidrogenoaren transferentziak, 20 kcal/mol inguruko aktibazio energia gainditu eta gero, **out-15b** artekari hidroximetilatua ematen dute. Jarraian, konplexu hau hidroxikarbinol **out-16b** produktuan eraldatzen da mekanismo erradikalario baten bitartez **out-TS2b** trantsizio egoeratik igaro ostean. Bigarren urrats honen aktibazio energia 3 kcal/mol-takoa da gutxi gorabehera. Erreakzio bide honetan ere espinen arteko gurutzaketa bat ematen da, **out-MECPb**, zeina **out-15b** artekaritik oso gertu dagoen. Lortutako emaitzak aintzat hartuz, erreakzioaren abiadura mugatzen duen urratsa protoiaren transferentzia dela ondoriozta daiteke. Azkenik, erreakzioa oso exotermikoa dela antzematen da, eta beste behin ere, bi egoeren arteko errektibitate bat ematen dela ikusi da, triplete eta kintuplete espinen artean hain zuzen ere.



4.8. Irudia. **out-14b** **out-16b** eraldatzeko erreazio bidea UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan kalkulatu eta $\epsilon=78.39$ -rekin. Energiak kcal/mol-an adieraziak, erlatiboak dira triplete egoeran dagoen **out-14b** -rekiko. Halaber, energia baxueneko gurutzaketa puntua, **out-MECPb** adierazita dago. Parentesi eta kortexeetan adierazitako energiak energia erlatibo eta Gibbs-en energiari dagozkie (298K) hurrenez hurren, UB3LYP (PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ //UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ teoria mailan kalkulatu.

Lortutako emaitzat haintzat hartuz, optimizatutako egiturek lisina trimetilatuaren (ikus 4.6. Irudia) desmetilazioan ikusitako joera errepikatzen dutela antzeman zen, eta 4.9. Irudian azaltzen den moduan, hemen ere ez ziren desberdintasun nabarmenak nabaritu espin egoera desberdinen artean. Xehetasun gehiagorekin aztertzean, **out-TSb** eta **out-TS1b** konplexuaren egitura ia berdinak direla ikusi zen aztertutako hiru espin egoerentzat, eta berriro ere, **out-MECPb** gurutzaketaren egitura **out-15b** artekariarenaren oso antzekoa

zela. Bigarren trantsizio egoeran ordea, **out-TS2b**, C-O distantzia, gutxi gorabehera 0.4 Å laburragoa lortu zen triplete egoeran.



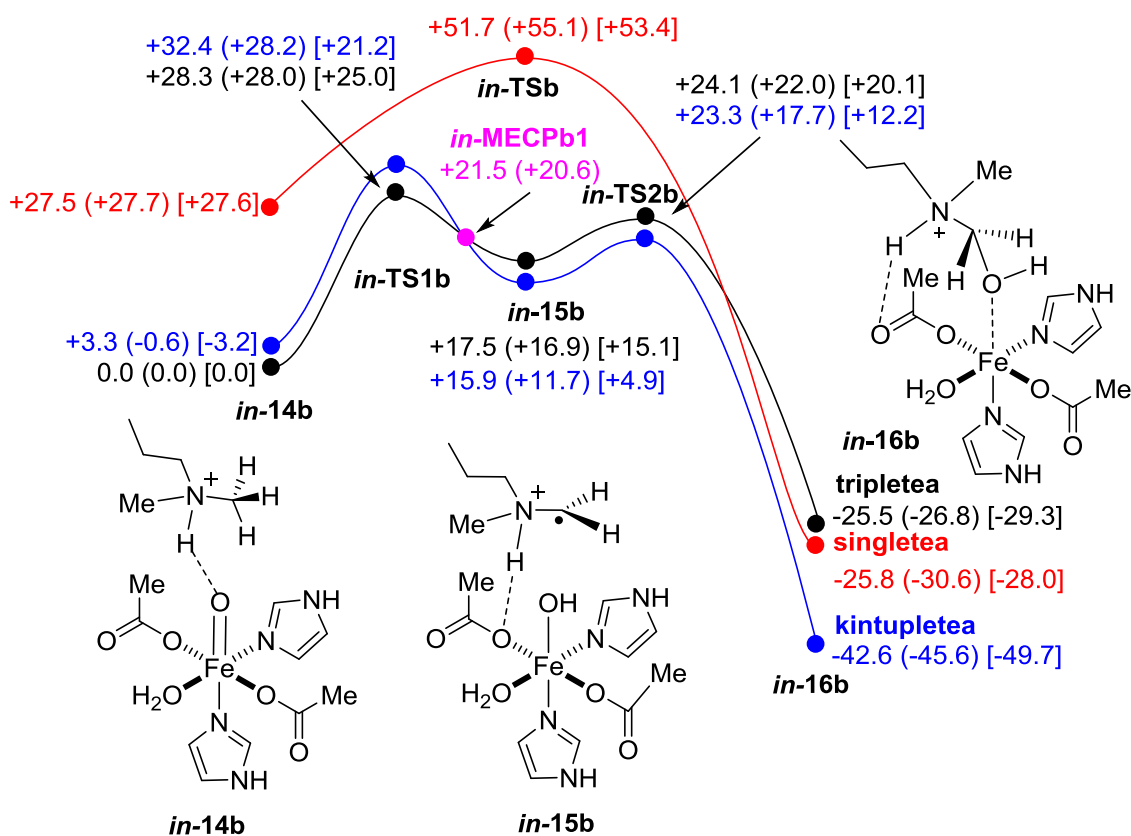
4.9. Irudia. UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) mailan optimizatutako **out-TSb**, **out-TS1b** eta **out-TS2b** trantsizio egoeren geometriak, baita energia baxueneko gurutzaketa puntua **out-MECPb** ere. Geometriak espin egoera triplete (beltzez), kintuplete (urdinez) eta singleteei (gorriz) dagozkie. Loturen luzerak (Å-tan) adieraziak daude. **out-TS1b** eta **out-TS2b** -n irudikatutako geometriak espin egoera triplete eta kintupleteenak dira hurrenez hurren.

4.3.2.2 In orientazioa duten dimetilutako substratoak

4.10 Irudian *in* orientazioa duten dimetilutako lisinen desmetilazio erreakzioa ageri da. Gure emaitzen arabera, **in-14b** konplexu errektiboen energia erlatiboak kintuplete ~ triplete << singlete hurrenkera jarraitzen dutela ikusi zen. Beste behin ere, triplete eta kintuplete egoeren energia potentzialaren gainazalak euren artean oso gertu zeuden, Gibbsen energia askea zertxobait

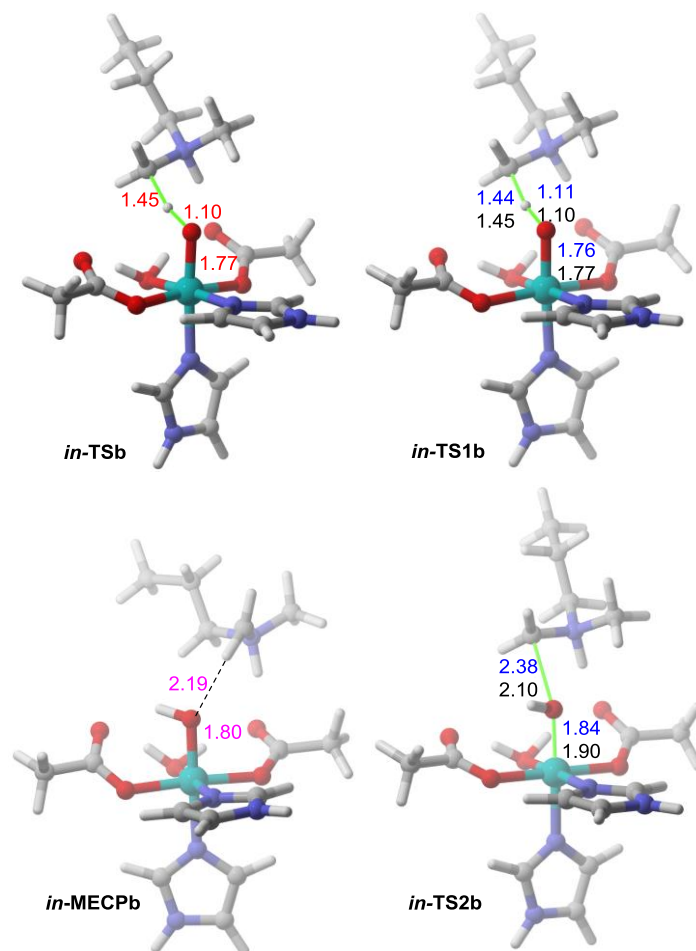
4. Kapitulu

egonkorragoa izanik kintupletearentzat. $S=1$ eta $S=2$ egoeretan, metiloaren hidrogeno transferentziak ***in-15b*** artekaria ematen dute 25 kcal/mol-eko inguruko aktibazio energia gainditu eta gero. Halaber, deskribatu berri diren erreazioetan gertatu den moduan, aztertutako trantsizio egoeren ezaugarri estrukturalak oso antzekoak zirela ikusi da espin egoera guztientzat ***in-TS1b*** eta ***in-TSb*** konplexuetan. Honetaz gain, ezaugarri estrukturalari dagokienez, ***in-TS1b*** konplexuan ez ziren desberdintasun nabarmenak antzeman ***TS1a***-rekiko. (4.11, 4.9 eta 4.6 irudiak).



4.10. Irudia. ***in-14b*** ***in-16b***-an eraldatzeko erreazio bidea UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan kalkulatu eta $\epsilon=78.39$ -rekin. Energiak kcal/mol-an adieraziak, erlatiboak dira triplete egoeran dagoen ***in-14b*** -rekiko. Halaber, energia baxueneko gurutzaketa puntua, ***in-MECPb1*** adierazita dago. Parentesi eta kortexteetan adierazitako energiak energia erlatibo eta Gibbs-en energiari dagozkie (298K) hurrenez hurren, UB3LYP (PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ //UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ teoria mailan kalkulatu.

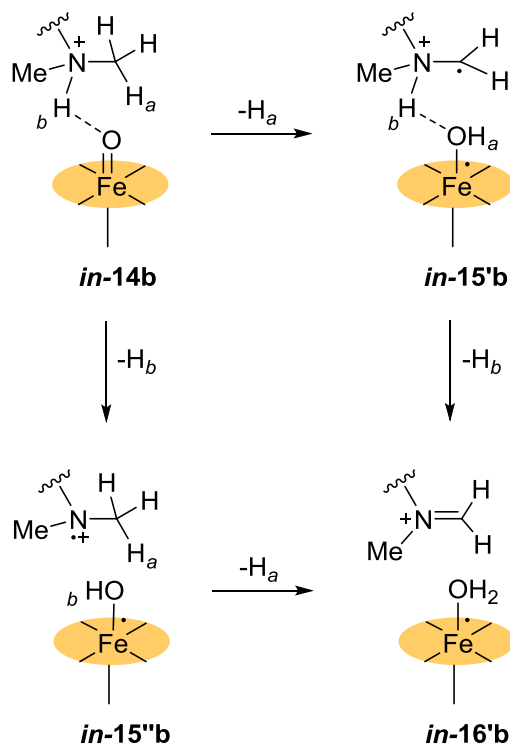
in-15b erreakzio artekaria ***in-16b*** produktu hidroxilatuan eraldatzen da ***in-TS2b*** trantsizio egoeratik igaro eta gero. Hori gerta dadin, 7.3 kcal/mol Gibbsen aktibazio energia gainditu behar du kintuplete egoeran. Beraz, erreakzio bide honetan ere, abiadura mugatzen duen urratsa dimetilatuako substratuaren ***in-14b*** hidrogeno atomoaren abstrakzioari dagokio. Halaber, erreakzio honetan ematen den gurutzaketa puntua ere neurtu zen, ***in-MECPb1*** bezala izendatua, zeina kasu honetan ***in-TS1b***-a ***in-15b*** eraldatzeko urratsean eman zen. Dena den, aurrez aipatutako erreakzio bideetan bezala, ***in-15b*** artekaritik oso gertu zegoen. Aipatu beharra dago, Gibbsen energia kontutan hartuz gero, kalkulu hau ez zela beharrezkoa, egonkorrena baita kintuplete egoera erreakzio bide osoan zehar. Azkenik, 4.10 Irudian ageri den moduan, deskribatu berri den erreakzioa oso exergonikoa dela ikus daiteke, -50 kcal/mol inguruko erreakzio energia askea baitu. Laburbilduz, eta lortutako emaitzak kontutan hartuz gero, *in* orientazioa duten dimetilatuako lisinen desmetilazio erreakzioak, aurrez deskribatu diren substratu trimetilatu eta *out* orientazioa duten dimetilatuakoen joera jarraitzen zuela ondorioztatu genuen ***in-16b*** karbinol motako eraketa haintzat hartuz gero. Hala ere, beste mekanismo posible bat ere kontutan hartu zitekeen, zeina ondorengo puntuetan azalduko den xehetasun gehiagorekin.



4.11. Irudia. UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) mailan optimizatutako *in*-TSb, *in*-TS1b eta *in*-TS2b trantsizio egoeren geometriak, baita energia baxueneko gurutzaketa puntua *in*-MECPb ere. Geometriak espin egoera triplete (beltzez), kintuplete (urdinez) eta singleteei (gorriz) dagozkie. Loturen luzerak (Å-tan) adieraziak daude. *in*-TS1b eta *in*-TS2b -n irudikatutako geometriak espin egoera triplete eta kintupleteenak dira hurrenez hurren.

N-H lotura gune aktiboko Fe(IV)=O taldeetik gertu gelditzen zela ikustean, beste erreakzio bide bat aztertzea erabaki zen, non desmetilazioa, oxigenoak aminaren protoia abstraitu eta gero eman zitekeen. Hidrogeno transferentzia hau bi modu desberdinetan eman daiteke 4.7 Eskeman irudikatu den moduan. Lehen aukera bezala, *in*-14b erreaktiboak metiloaren hidrogenoa abstraitu dezake, 4.7 Eskeman H_a bezala izendatua, *in*-15'b artekaria emateko. Jarraian, konplexu honek nitrogenoaren hidrogenoa, H_b, abstraitu dezake bigarren urrats batean *in*-16'b produktua emanez. Erreakzio honen lehen urratsa aurrez deskribatutako hidroximetilamonio desmetilazio erreakzioaren bera da. Bigarren aukera bezala

alderantzizko prozesua gerta zitekeela planteatu zen, hau da, lehen nitrogenoaren hidrogenoaren, H_b , transferentzia gertatzea, ***in-15''b*** artekaria emanaz. Ondoren, 4.7 Eskeman laburtuta dagoen moduan, metiloaren hidrogenoaren transferentziarekin, H_a , ***in-16'b*** iminio katioia emanaz. Beraz, proposatutako bi erreakzioak produktu bera ematen dute, ***in-16'b*** iminio katioia. Azken produktu honek gune aktibotik atera eta gero hidrolisia jasan dezake desmetilazio erreakzioaren produktuak emanaz, hots, formaldehidoa eta monometilatutako lisina. Beraz, prozesu hauek aztertu ahal izateko, bi erreakzio bide berriren azterketa burutu zen, zeinak ondorengo puntuetan azalduko diren.

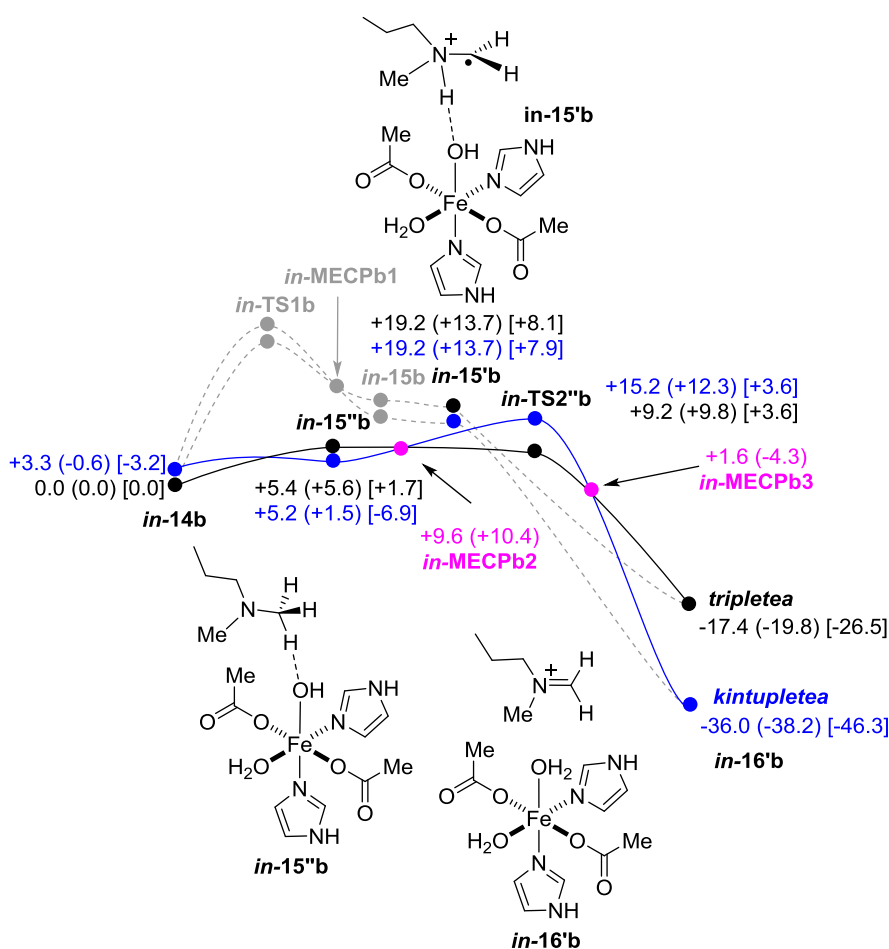


4.7. Eskema. ***in-14b***-a substratua dagokion ***in-16'b*** iminio katioian eraldatzeko eman daitezkeen desmetilazio mekanismo desberdinen irudikapena.

4.12 Irudian, lehen urratsaren ondorioz, ***in-14b*** konplexuaren H_a -ren transferentzia eta gero, ***in-15b*** artekaria sortzen dela erreparatu daiteke. Urrats hau lehenago deskribatutako desmetilazioaren amankomuna da. Ondoren,

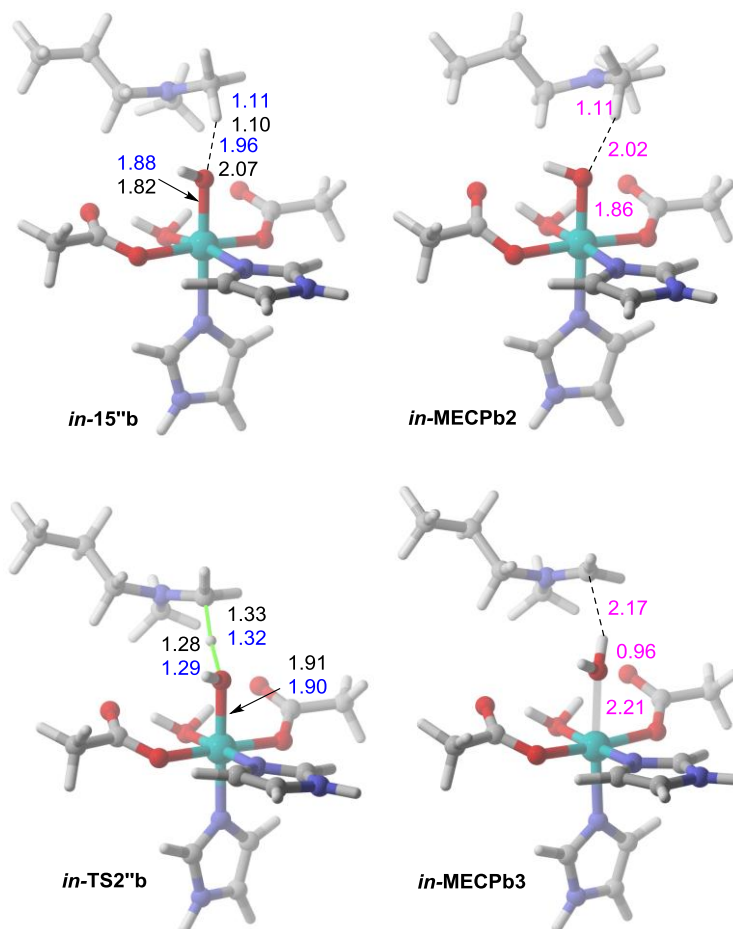
4. Kapitulu

artekari horren isomeroa, ***in-15'b***, sortu daiteke. Bi artekari hauek isoenergetikoak dira. Artekari honetan, hidrogeno zubi ahul bat ageri da N-H eta Fe-OH taldeen artean. Jarraian, aminio katioi erradikala ***in-15'b*** konplexuaren hidrogenoaren transferentzia eta gero, ***in-16'b*** iminio katioia sortzen da. Azken urrats hau oso exotermikoa da, eta ezinezkoa izan da trantsizio egoera isolatzea (ikus 4.12 Irudia). Erreakzio bide honetatik, iminio katioiaren sorrera aurrez deskribatutako ***in-16b*** hidroximetilatutako produktuarekiko lehenetsia dagoela ondoriozta daiteke (ikus 4.10 Irudia).



4.12. Irudia. ***in-14b*** ***in-16'b***-an eraldatzeko erreakzio bidea UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan kalkulatua eta $\epsilon=78.39$ -rekin. Energiak kcal/mol-an adieraziak, erlatiboak dira triplete egoeran dagoen ***in-14b*** -rekiko. Halaber, energia baxueneko gurutzaketa puntuak ***in-MECPb2*** eta ***in-MECPb3*** adierazita daude. Parentesi eta kortxeteetan adierazitako energiak energia erlatibo eta Gibbs-en energiari dagozkie (298K) hurrenez hurren, UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p) &LanL2DZ //UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ teoria mailan kalkulatu.

4.7 Eskeman desmetilaziorako proposatutako bigarren mekanismoa, hots, ***in-14b*** → ***in-15''b*** → ***in-16'b*** eraldaketa, 4.12 Irudian ageri den erreakzio bidean azaldua dago. Bertan, mekanismo hau aurrekoa baino azkarragoa dela ikus daiteke. Izan ere, ***in-14b*** errektiboaren N-H taldearen desprotonazioa, hau da, ***in-15''b*** artekariaren sorrera, energia aktibazio gabea dela kontsideratu baitaiteke. Energia askearekiko, azken konplexu hau ***in-14b*** errektiboarena baino 7 kcal/mol inguru egongonkorragoa da. Jarraian, H_a hidrogenoaren abstrakzioa ematen da (4.7 Eskema) ***in-TS2''b*** trantsizio egoeratik igaro eta gero, non triplete egoera kintupletea baino 2.5 kcal/mol egonkorragoa den energia erlatiboekiko. Hortaz, C-H_a loturaren haustura eman dadin beharrezkoa da espinen arteko gurutzaketa bat egotea, 4.12 Irudian ***in-MECPb2*** bezala izendatu dena. Gurutzaketa puntu hau, ***in-14b*** errektiboa baino 10 kcal/mol inguru desegonkorragoa da, eta egiturari dagokionez, ***in-15''b*** artekariaren oso antzekoa da, baina H_a...O elkarrekintza ahul bat dagoela atzematen da (ikus 4.13 Irudia). Kalkulatutako bigarren trantsizio egoera, ***in-TS2''b***, nahiko asinkronoa da, eta soilik 11 kcal/mol inguruko aktibazio energia askea behar du eraldaketa hau eman ahal izateko. Azken prozesu honen probabilitatea handia da, 1 ingurukoa. Ondoren, trantsio egoera hori ***in-16'b*** produktuan eraldatzen da, zeina berriro ere kintuplete egoeran hobetsia dagoen. Hori dela eta, beste espinen arteko gurutzaketa beharrezkoa da erreakzioa gauzatu dadin, ***in-MECPb3***. 12. eta 13. Irudietan ikusi daitekeen moduan, konplexu honen egituran, iminio katioia eratua dagoela atzeman daiteke, baita ur molekula bat gune metalikoari lotua ageri dela ere. Honenbestez, konplexu honen geometria erreakzioaren ***in-16'b*** produktuarenaren oso antzekoa dela ondoriozta daiteke.

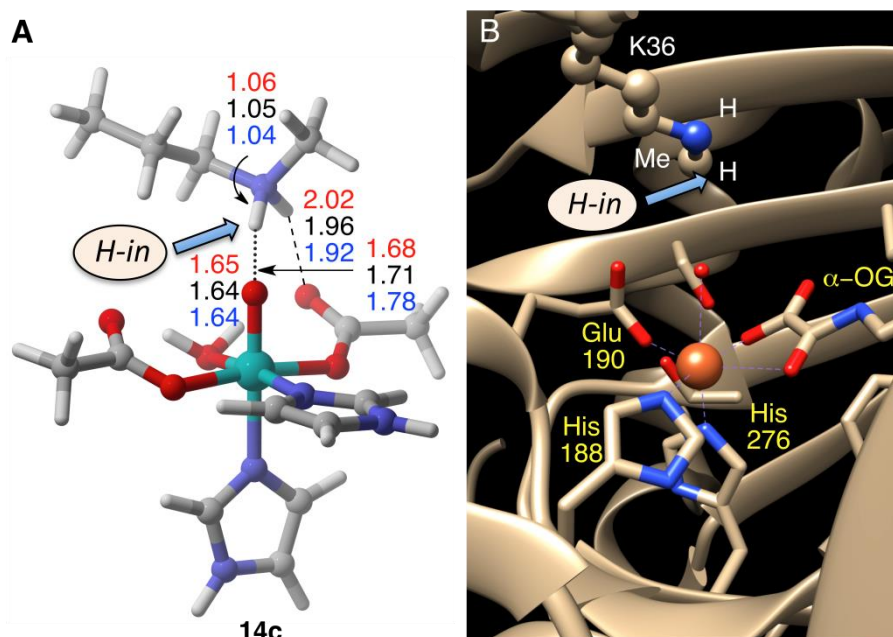


4.13. Irudia. UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) mailan optimizatutako artekari, *in-15''b* eta energia baxueneko gurutzaketa puntuen *in-MECPb2* eta *in-MECPb3* geometriak, baita trantsizio egoera *in-TS2''b*-arena ere. Geometriak espin egoera triplete (beltzez), kintuplete (urdinez) eta singleteei (gorriz) dagozkie. Loturen luzerak Å-tan adieraziak daude. *in-15''b* eta *in-TS2''b* -n irudikatutako geometriak espin egoera triplete eta kintupleteenak dira hurrenez hurren.

4.3.3 Monometilatutako substratoak

ϵ -N-monometilatutako lisina taldeen kasuan, aminaren bi N-H loturek, Fe=O eta karboxilato taldeekin hidrogenozko zubiak eratu ditzakete. Elkarrekintza honen ondorioz, konformazionalki mugatua dagoen egitura bat eratzen da, non gutxienez, N-H taldearen hidrogeno bat Fe(IV)=O taldearen barru aldera orientatua gelditzen den (ikus 4.14A Irudia). Naturan, aipatutako antolaketa bera antzematen da 4.14B Irudian ageri diren X-izpien difrakzioan, JMJD2A eta

histona 3-ko monometilatutako Lys 36a (H3K36Me1) lisinen artean.⁴⁸ Beraz, dimetilutako lisina taldeekin gertatzen den moduan, kasu honetan ere, monometilutako lisina taldeen desmetilazio erreakzioa bi mekanismo desberdinen bitartez eman daiteke. Ondorengo ataletan, mekanismo hauen xehetasunak azalduko dira, karbinolaren erreakzio bidea lehen, eta iminio katioiarena jarraian.



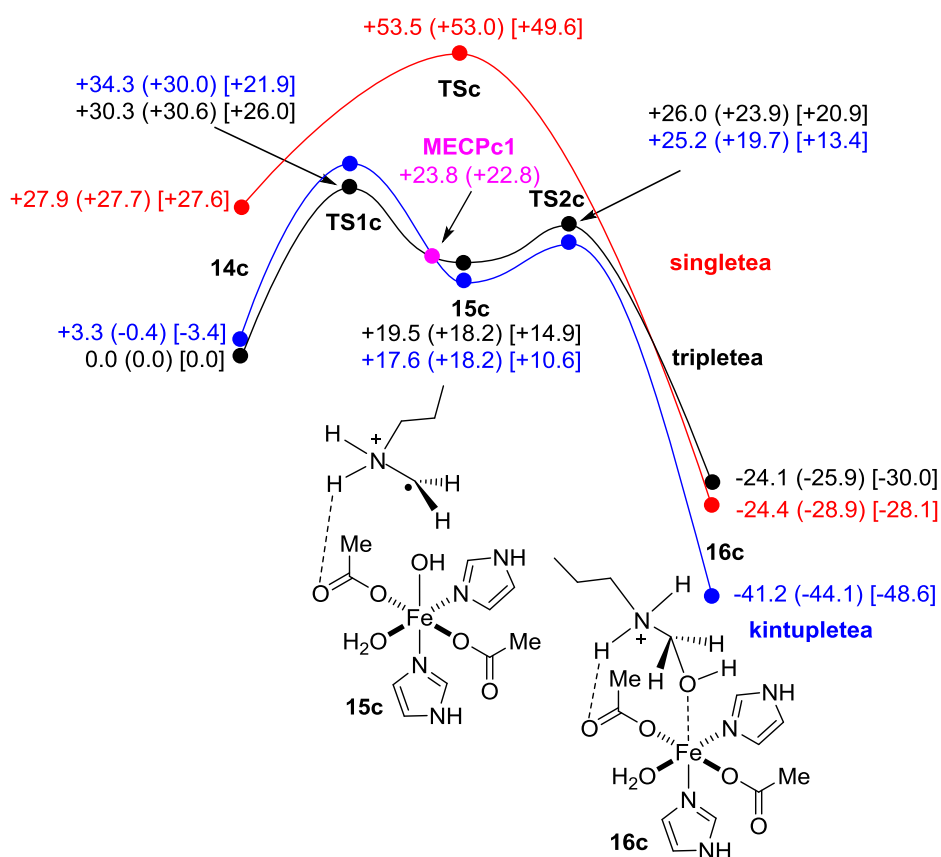
4.14. Irudia. (A) **14c** konposatuaren optimizatutako geometria triplete egoeran UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) mailan. Loturen luzerak (Å-tan) adierazten dira triplete (beltzez), kintuplete (urdinez), eta singlete (gorriz) egoeretarako. (B) Histonen desmetilasa den JMJD2A-k (pdb kodea 2pxj), H3 histonako lisina K36 monometilatuarekin eta α -oxalil glizinarekin (α -oxoglutaratoaren orde), osatzen duten gune aktiboaren X-izpien difrakzioa.

Monometilatutako lisinen desmetilazioaren karbinolaren erreakzio bideak, aurrez aipatutako lisina tri- eta dimetilatuena joera bera du. Mekanismoaren xehetasunak 4.15. Irudian azaltzen dira. Bertan ikusi daiteke berriro ere S=1 eta S=2 energia potentzialaren gainazalak energetikoki ia maila berekoak direla, beste behin ere singletea askoz energetikoagoa izan delarik. Metiloaren

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.

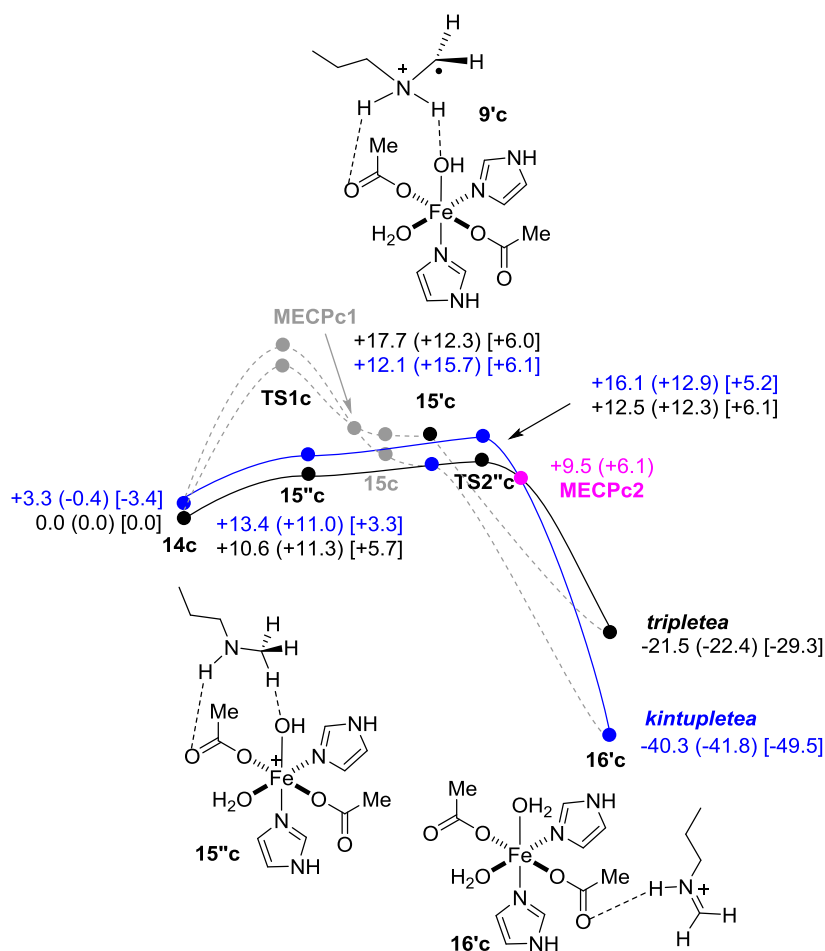
4. Kapitulu

hidrogenoaren transferentziarekin **15c** artekaria sortzen da, 26 kcal/mol inguruko energia aktibazioa gainditu ostean. Erreakzioaren bigarren trantsizio egoera **TS2c** lortzeko, 2.8 kcal/mol inguru behar dira eta beraz, erreakzio bide honen abiadura berriro ere lehen urratsak mugatzen du. Behin **TS2c** trantsizio egoeraren langa gaindituta, dagokion hidroximetilamonio **16c** produktua sortzen da (Ikus 4.15 eta 4.17 Irudiak). Erreakzio bide honetan ere, espinen arteko gurutzaketa bat eman da triplete eta kintuplete egoeren artean, **TS1c** eta **15c** egituren artean, **MECPc1** bezala izendatu dena. Optimizatutako geometrie dagokienez, erreakzioaren artekariak, baita trantsizio egoerak ere lisina tri- eta dimetilutako (in eta out orientazioak) egitura oso antzekoak isolatu ziren.



4.15. Irudia. **14c** **16c**-an eraldatzeko erreakzio bidea UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan kalkulatu eta $\epsilon=78.39$ -rekin. Energiak kcal/mol-an adieraziak, erlatiboak dira triplete egoeran dagoen **14c** -rekiko. Halaber, energia baxueneko gurutzaketa puntua **MECPc1** adierazita dago. Parentesi eta kortxeteetan adierazitako energiak energia erlatibo eta Gibbs-en energiari dagozkie (298K) hurrenez hurren, UB3LYP (PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ //UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ teoria mailan kalkulatu.

Iminio katioiaren erreakzio bidearentzat lortutako emaitzak 4.16 Irudian ageri dira. Bertan ikus daitekeen moduan, *in* orientazioko lisina dimetilatuekin gertatzen den bezala, **16'c** produktua bi mekanismo desberdinetatik sortu daiteke.



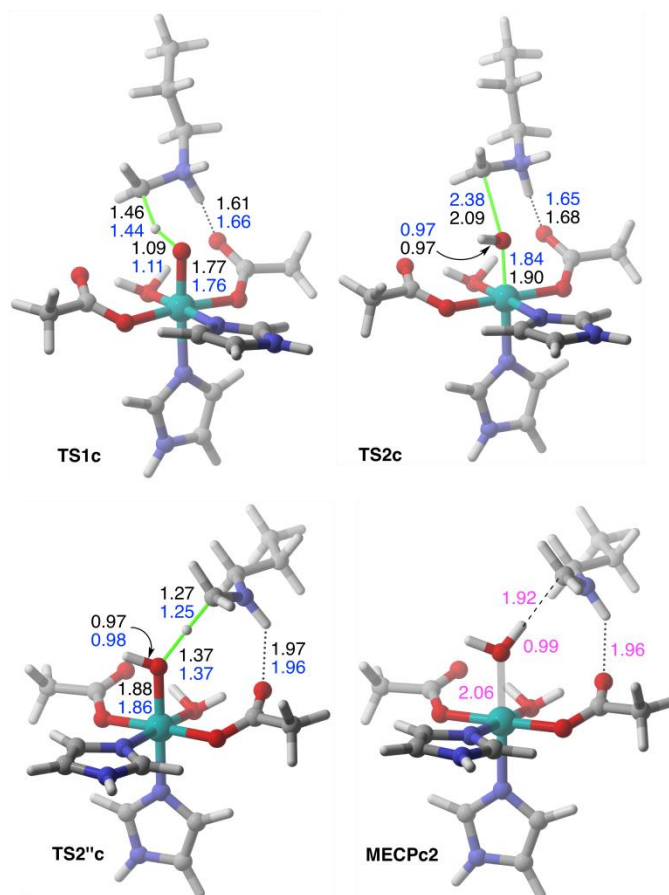
4.16. Irudia. **14c** **16'c**-an eraldatzeko erreakzio bidea UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan kalkulatu eta $\epsilon=78.39$ -rekin. Energiak kcal/mol-an adieraziak, erlatiboak dira triplete egoeran dagoen **14c** -rekiko. Halaber, energia baxueneko gurutzaketa puntua **MECPc2** adierazita dago. Parentesi eta kortexteetan adierazitako energiak energia erlatibo eta Gibbs-en energiari dagozkie (298K) hurrenez hurren, UB3LYP (PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ //UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ teoria mailan kalkulatu.

C-H loturaren hidrogenoaren transferentzia gertatzen bada lehen, **15c** produktua sortzen da, zeina **15'c** konformeroan eraldatu daitekeen. Egitura honek N-H loturaren hidrogenoaren transferentzia ahalbideratzen du, non energia langarik gabeko urrats baten ostean **16'c** produktua sortzen den. Lehen

4. Kapitulu

urrats hau, aurrez deskribatutako karbinolaren bideko erreakzioaren bera da (ikus 4.15. Irudia). Baina *in* orientazioko lisina dimetilatuaren joera bera jarraitzen du monometilatutako lisinen desmetilazioak. Izan ere, **15c** eta **15'c** artekariak isoenergetikoak dira, eta iminio katioia energia langarik gabe eratzen denez, bigarren erreakzio bide hau lehenetsia dago hidroximetilatutako produktuen eraketarekiko.

N-H loturaren hidrogenoaren transferentzia ematen bada lehen urratsean aldiz, **15''c** artekaria sortzen da, eta pauso hau energia aktibaziorik gabe gertatzen da. Jarraian, gure kalkuluen arabera **16'c** iminio katioia sortzen da C-H-ren transferentziarekin, energia askean 0.5 kcal/mol inguruko energia aktibazioa duen **TS2''c** trantsizio egoeratik igaro eta gero. Isolatutako trantsizio egoera honen egituraren ezaugarriak, *in*-**TS2''b**-arenaren oso antzekoak dira, N-H eta karboxilato taldeen arteko hidrogenozko zubia izan ezik (ikus 4.17. Irudia). Lehenago aipatutako desmetilazio erreakzioen moduan, gure lanek erreakzio bide hau ere triplete eta kintuplete espin egoeren artean igarotzen zela erakutsi zuten. Erreakzio bide honetan ere, espinen arteko gurutzaketa berri bat ematen da, **MECPc2**, oraingoan **TS2''c** eta **16'c** produktuaren artean. Lehena 0.9 kcal/mol egonkorragoa da triplete egoeran, azken konplexua aldiz kintuplete egoeran.



4.17. Irudia. UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) mailan optimizatutako **TS1c**, **TS2c** eta **TS2''c** trantsizio egoeren geometriak, baita energia baxueneko gurutzaketa puntua **MECPc2**-arena ere. Geometriak espin egoera triplete (beltzez), kintuplete (urdinez) eta singleteei (gorriz) dagozkie. Loturen luzerak (Å-tan) adieraziak daude. Irudikatutako trantsizio egoerak tripletearen dira, **TS2c** izan ezik, kintupletea dela.

Lortutako emaitzak aintzat hartuz, monometilatutako lisina taldeen desmetilazio erreakzioak iminio katioiaren erreakzio bidea jarraitzen duela ondoriozta daiteke, mekanismo hau lehenetsia baitago hidroximetilatutako konplexuaren eraketarekiko. Gainera, lehen urratsa energia aktibaziorik ez duen N-H taldearen desprotonazioa da. Azkenik, lortutako produktuak inguruneke urarekin hidrolisia jasan dezake entzimaren gune aktibotik ateratzean, formaldehidoa eta desmetilatutako lisina emanaz.

Erreakzio bide guztien emaitzak kontutan hartuz gero, JMJD2A entzimek trimetilutako substratoekiko duten selektibitatea hiru metiloek duten eragin

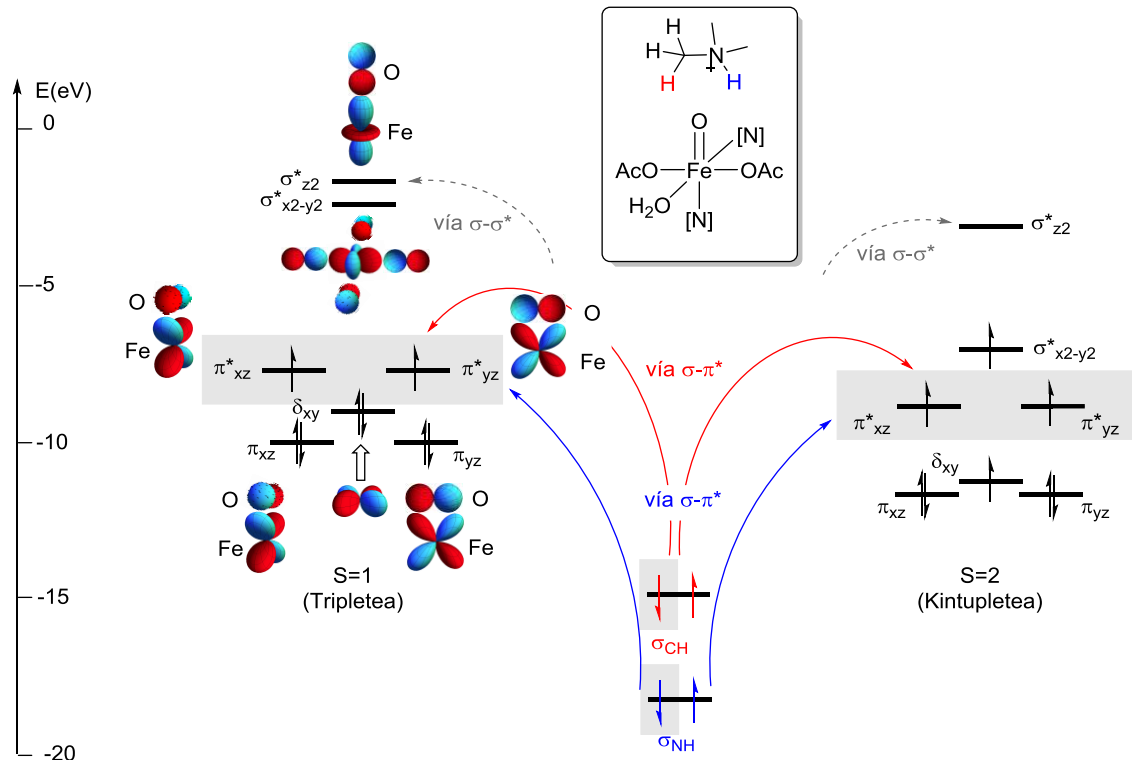
4. Kapitulu

entropikoari edo/eta hidrogenozko zubien ondorio izan behar duela ondoriozta daiteke.⁴⁹ Jarraian, entzima hauek lisina desberdinak eta metilazio maila desberdinak atzemateko eta bereizteko duten gaitasunaren zergatiak laburtuko dira.

Lortutako emaitzei zentzua eman nahian, 4.18. Irudian agertzen diren orbital molekularren analisisa burutu zen. Horretarako, Fe=O taldearen orbital molekularrak C-H eta N-H taldeenekin aztertu ziren. Bertan ikusi daiteke burdinari lotutako oxigenoa gai dela X-H (non X=C, N) loturako elektroiei batekin elkarrekintza egiteko, partzialki beteta dauden π_{xz}^*/π_{yz}^* orbital molekularren bitartez. Elkarrekintza hau posible da bai triplete, hau da, S=1, baita kintuplete egoeran ere, S=2. δ_{xy} orbital molekularra ordea, partzialki beteta dago S=2 kasurako. Honenbestez, baita $S_{x^2-y^2}^*$ orbitala, zeina biziki egonkortua dagoen tripletearekiko, partzialki beteta dago ere. Hala eta guztiz ere, Fe=O taldeari dagozkien p_{xz}^*/p_{yz}^* eta $S_{z^2}^*$ orbital molekularren energiak oso parekoak dira aipatutako bi egoera elektronikoentzat. Lortutako emaitza hauek bat datoz isolatutako trantsizio egoera eta O-H lotura duten artekariaren egituren arteko antzekotasunarekin bi espin egoerentzat. Halaber, bi egoera elektronikoen $S_{z^2}^*$ orbitalak aztertu dira eta oso energetikoak direla ikusi da. Beraz, ezin dute C-H eta N-H loturekin elkarrekintzarik egin, $\sigma \rightarrow \sigma^*$ bidea bertan bera geldituz $s \rightarrow p^*$ orbitalen arteko bidea hobesten delarik. Hori dela eta, isolatutako bai H-O-Fe loturaren egitura angeluarra, baita trantsizio egoerena ere bat dator $s \rightarrow p^*$ orbitalen arteko erlazioarekin. Azkenik, **in-14b** eta **14c** errektiboaren N-H loturaren hausturei dagozkien aktibazio energiak erreparatuz, N-H lotura C-H

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

loturarekiko hobetsia dagoela ikusten da. Izan ere N-H lotura, bai termodinamikoki baita zinetikoki ere, C-H lotura baino egonkorragoa eta errektiboagoa dela ikusi da.



4.18. Irudia. C-H eta N-H loturen orbitalen elkarrekintzak JMJD entzimen Fe(IV)=O unitatearekiko triplete eta kintuplete espin egoeretan.

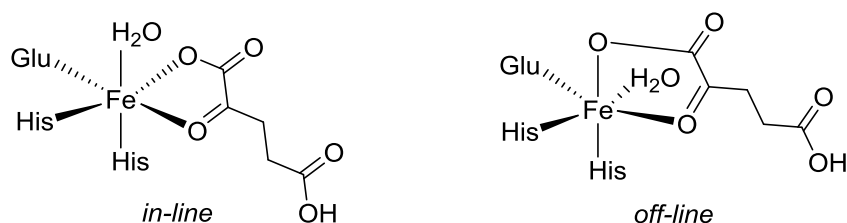
JMJD2A entzimek metilazio maila desberdina duten lisina taldeekiko desmetilazioan duten selektibitatea ulertzea izan zen hurrengo betebeharra. Arestian aipatu den moduan, Jmj-C dominioa duten entzimen mekanismoen azterketak oztopatuak daude aurkezten duten substratu desberdinekiko selektibitateagatik. Entzima hauen gune katalitikoa amankomuna den arren, ez dira selektiboak substratu mota berdinentzat.

Ildo honetan Hausingerrek,⁵⁰ α -zetoglutarato eta Fe-aren menpeko diren entzimek, gune metalikoarekin dituzten kelazio desberdinak izendatzeko *off-line*

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

4. Kapitulu

eta *in-line* kontzeptuak aurkeztu zituen. 4.8 Eskeman ikus daitekeen moduan, bi konformazio hauek uraren posizioan bereizten dira. *In line* deituriko konformazioan, oxigeno molekularrak axial posizioan dagoen ura desplazatu dezake ferrilo taldea eratuz. Aldaketa honek, ziklo katalitikoaren hasiera ahalbidetzen du, eta substratoaren sarrerarako antolaketa egokia ematen du. *off-line* konformazioan aldiz, α -zetoglutaratoaren karboxilatoaren oxigenoa axial posizioan dagoenez, ur molekula posizio ekuatorialen kokatzen da, eta beraz, oxigenoaren sarrera eragotzia gelditzen da. Honenbestez, konformazio honetan ezinezkoa da ziklo katalitikoaren hasiera ematea.



4.8. Eskema. α -zetoglutarato eta Fe-aren menpeko diren dioxigenasek dituzten koordinatze *in-line* eta *off-line* moduen irudikapen laburtua.

Ildo berean, urte batzu beranduago Chengek beste ikerlari batzuekin batera ⁵¹, KDM2A entzimaren selektibitatea aztertu zuen. Entzima honek, JHDM1A izenez ere ezagutua dena, H3K36Me₂/1 taldea desmetilatzen du selektiboki, aldiz talde bera trimetilatua dagoenean, ez du aktibitaterik erakusten. Joera honi zentzua eman nahian, entzima honen egitura kristalizatu zuten 3 substratu desberdinekin. Kristalizazio hoietan, gune aktiboarekin aurkeztu zuten elkarrekintza aztertu zuten, eta ez ziren desberdintasun nabarmenak antzeman. Beraz, trimetilatatutako lisina ez desmetilatzearen arrazoia ezin zitekeen

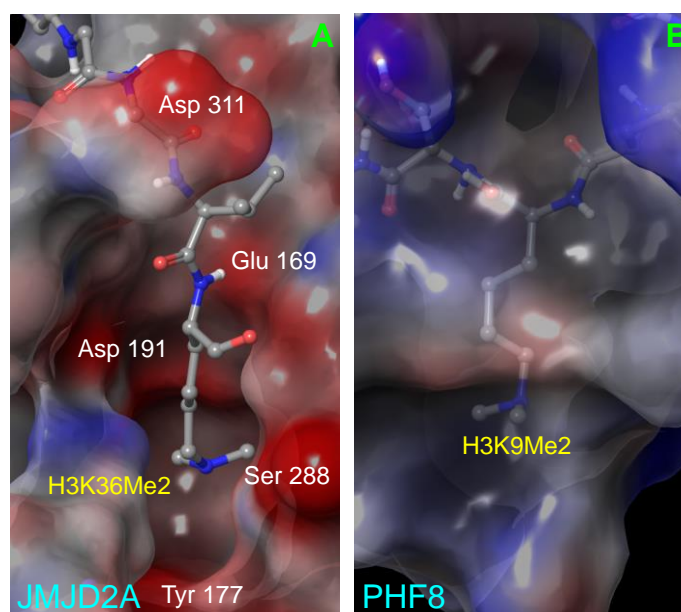
⁵¹ Z. J. Cheng, P. Cheung, A. J. Kuo, E. T. Yukl, C. M. Wilmot, O. Gozani, D. J. Patel, *Gene. Dev.* **2014**, 28, 1758-1771.

eragozpen esterikoa izan, KDM2A entzimaren gune katalitikoak substratu hori barneratzeko tokia bai baitu. Ikerlari hauek orduan, Hausingerrek proposatutako *off-line* kontzeptua proposatu zuten selektibitatearen eragile moduan. Horrela, trimetilatatutako lisinek ziklo katalitikoa hasteko beharrezkoa den aldaketa konformazionala eragotzia dutela formulatu zuten. Honenbestez, substrato hau gune katalitikoan dagoenean, α -zetoglutaratoak Fe *off-line* konformazioan kelatatzen du soilik. Maila gutxiagoa duten lisinek ordea, oxigeno molekularren sarrera ahalbidetzen duen *off-line-etik in-line-ra* aldaketa konformazionala burutzen dute. Kontzeptu honek entzima hauen selektibitatea azaltzen duen beste arrazoi posible bat plazaratzen du.

Selektibitatearen jatorriaren arrazoia bilatu nahian, Jmj-C dominioa duten beste hainbat entzimen potentzial elektrostatikoaren analisia egitea izan zen hurrengo pausoa. Azterketa honek, entzimek gune aktibora iristeko bidean izan ditzaketen desberdintasunak, selektibitatean duen eragina bilatzea du helburu. Horretarako bi entzima desberdin hautatu ziren eredu bezala. Bata $KMe_3 > KMe_2 >> KMe_1$ taldeekiko lehentasuna duena, JMJD2A (ikus 4.19A Irudia), eta trimetilatatutako lisinengan aktibitaterik ez duena bestea, PHF8, KDM7B edo JHDM1F izenez ere ezagutua (ikus 4.19B Irudia). Azterketa burutzeko, JMJD2A H3K36Me2 taldearekin kristalizatutako X-lzpien egitura miatu zen. 4.19A irudian ikus daitekeen moduan, burututako potentzial elektrostatikoak barrunbe zabal eta polaritate handiko ingurune bat dagoela ezagutarazi zuten. Hortaz, N-H taldea duten lisinek, hau da, lisina di- eta monometilatuek, gune aktibora iritsi aurretik, inguruan dauden hainbat taldeekin eta partzialki karga negatiboa dutenekin elkarrekintzak burutu ditzakete. Burututako analisiak, nagusiki Ser-288 eta Tyr-177 taldeak proposatu zituen elkarrekintza izateko aukera gehien izan

4. Kapitulu

ditzaketen talde bezala. Lortutako emaitza hauek bat datoz aurrez Couturek eta bere taldeak,⁴⁵ baita Chenek *et al.*,⁴⁸ proposatutakoarekin, non beste aminoazidoen artean, gure lanek azpimarratutako berak gailendu zituzten. Aminoazido hauen oxigenoek, lisinen N-H taldearekin hidrogenozko zubiak eratu ditzakete. Elkarrekintza honek Fe=O taldea gune aktibora iristea eragozten du. Egoera hau 4.20B irudian adierazia dago.



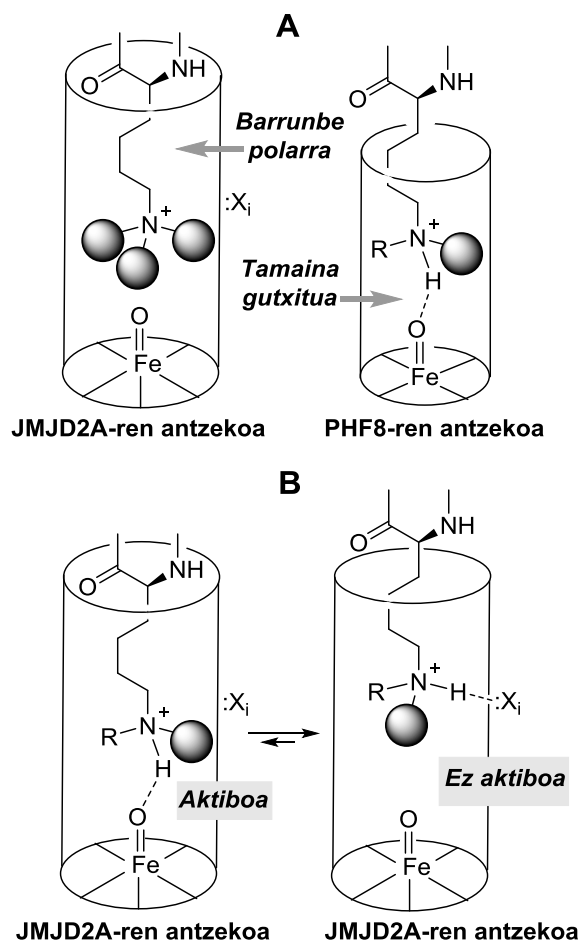
4.19. Irudia. H3K36Me2-ak JMJD2A-rekin (A, pdb kodea 2q8d) eta H3K9Me2-ak PHF8-rekin (B, pdb 3k3n kodea) duten elkarrekintzari dagozkien potentzial elektrostatikoen gainazalak. Karga negatibo eta positiboak gorritz eta urdinez adieraziak daude hurrenez hurren.

Arestian aurkeztutako emaitzak kontutan hartuz, lisina di- eta monometilatuen desmetilazio erreakzioa iminio katioiaren bidetik ematen dela ikusi da, N-H protoiaren transferentziarekin lehenengo urrats bezala. Hortaz, posible da mekanismoa hau dimetilutako lisinentzat oztopatua dagoela ondorioztatzea, eta galarazia monometilatuentzat. Gainera, hidroximetilamonioaren bidea proposatuz gero desmetilazioa emateko beste erreakzio bide bezala, zenbait lanetan argitaratu den moduan, ferrilotik gertu metilo bat izateko probabilitatea metilazio maila txikitzean asko gutxitzen da.²⁹

Bide honetan, Ulucanek *et al.*⁴⁹ dinamika molekularren kalkuluen bitartez, 4.7Å baino gutxiagora metilo bat aurkitzeko probabilitatea neurtu zuten metilazio maila desberdinetan. Trimetilatatutako lisinentzat, %86 aukera zela neurtu zuten, di- eta monometilatutako lisinentzat ordea, %4.5 eta %1.5-eko balioetara gutxitzen zela ikusi zuten. Gainera, ikerlari berdinek di- eta monometilatutako substratoetan, metilo talderik gabeko guneak ur molekulez beteak egon zitezkeela iradoki zuten, substratoa gune metalikoetatik aldenduz.

Lehenago aipatutako PHF8 entzimaren kasuan aldiz, aztertutako H3K9Me2 taldearekin ez ziren emaitza berak aurkitu (ikus 4.19B Irudia). Espero zitekeen moduan, entzimaren gune aktiboaren barrunbea txikiagoa dela atzeman zen. Datu hau Yuk beste ikertzaile batzuekin batera aurkeztutakoarekin bat dator, non PHF8 entzimaren guneak 169 Å³ neurtzen zutela zenbatetsi zuten, JMJD2A-ren barrunbea aldiz 722 Å³ izanik.⁵² Beraz, PHF8-aren bidearen estutasunak, trimetilatatutako taldeen sarrera ezintzen du entzima mota honetan (4.20A Irudia). Gainera, 4.19B irudian ageri den moduan, potentzial elektroestatikoaren gure analisiak gune aktiboaren barrunbea talde hidrofobikoz inguratua dagoela erakusten du. Honen ondorioz, di- eta monometilatutako lisina taldeak entzimen gune aktiboetara iritsiko dira askatasun osoz aurrez proposatutako mekanismo bitartez desmetilazio erreakzioa katalizatzeke, hidrogeno hartzaileak diren atomoek ez baitituzte harrapatuko. Gogoeta hauek guztiak 4.20. Irudian jasotzen dira modu grafikoan.

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.



4.20. Irudia. (A) Trimetila (ezkerrean) eta di- eta monometilaren (eskuian) tamaina eta polartasunarekiko duten hautakortasunaren irudikapen laburtua. (B) Trimetilatuak dauden taldearekiko hautakorrek diren histonen desmetilasen barrunbe polarren irudikapen laburtua sustratu dimetilatu ($R=Me$) eta monometilatuen ($R=H$) konplexu aktibo eta ez aktiboekin.

4. 4 Ondorioak

Kapitulu honetan Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasek, lisiinak desmetilatzean jarraitzen duten mekanismoaren bilaketa sistematiko bat burutu da. Lortutako emaitzen arabera, behin $Fe(IV)=O$ frakzioa eratu denean, entzima hauen gune aktiboak espin egoera triplete eta kintuplete artean aldatu daitezke, hori burutzeko, hau da, espinen gurutzaketa emateko, 1 inguruko probabilitatea izanik.

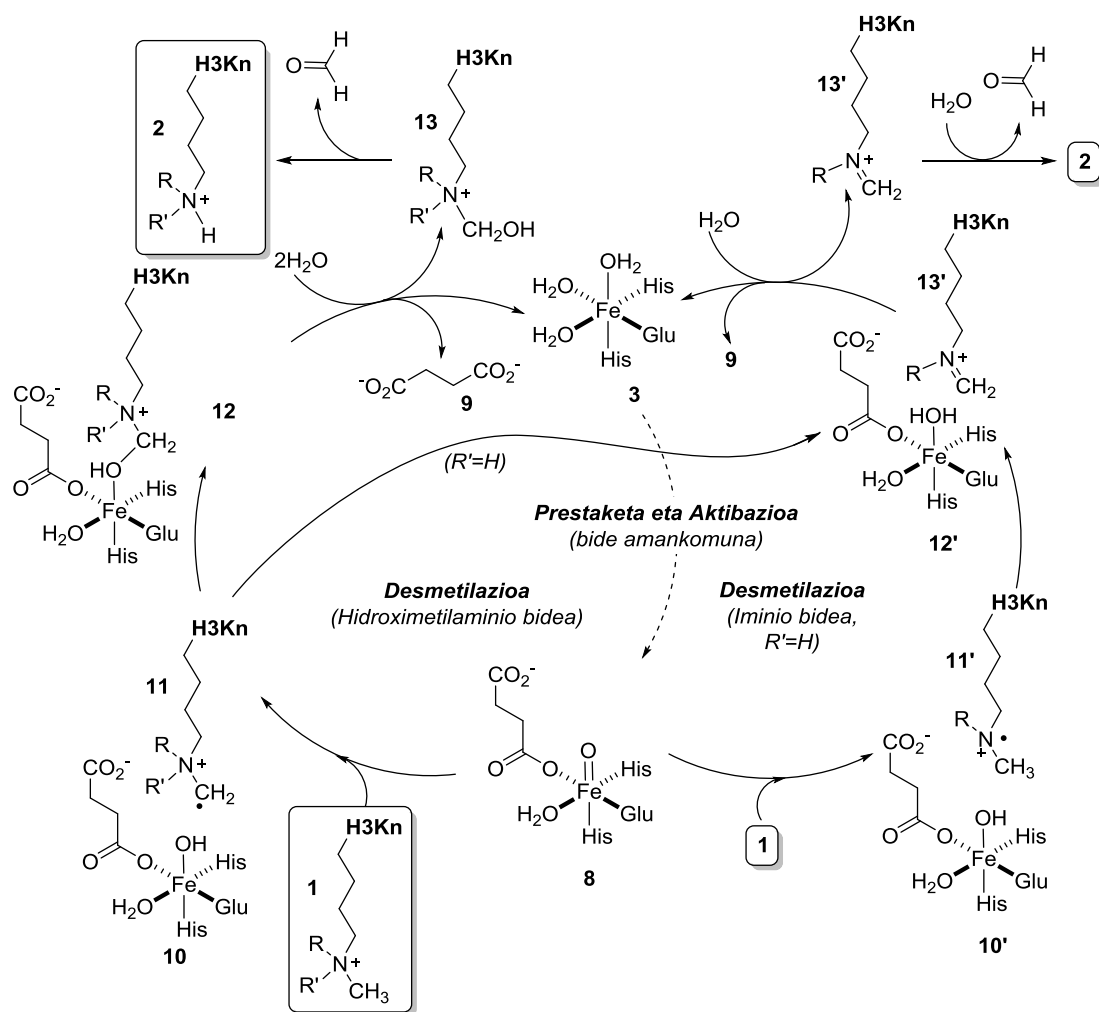
Emaitzak aintzat hartuz, behin ziklo katalitikoaren prestaketa eta aktibazioa eman ostean (ikus 4.5. Eskema, **3** → **8** eraldaketa), Jmj-C dominioa duten entzimek katalizatutako lisinen desmetilazioa, 2 erreakzio bide desberdinetatik burutu daiteke: hidroximetilamonioaren bidea bata, eta iminio katioiarena bestea (4.9. Eskema).

Hidroximetilamonioaren erreakzio bidea, **8** artekariaren Fe(IV)=O frakzioak, **1** substratoak duen metilo batekin elkarrekintzaren ondorioz, C-H loturaren haustura homolitikoa ematean hasten da. Trimetilutako lisinen kasuan, C-H loturaren hidrogenoaren transferentzia burutu eta gero, **10** artekaria eta **11** katioi erradikala sortzen dira, zeinak eraso erradikalario bitartez, **12** koordinatutako konposatua eratzen duten. Azkenik, **13** hidroximetilamonio artekaria askatzen da, hidrolisi bitartez formaldehidoa eta desmetilatutako produktua **2** sortuz. Hortaz, mota honetako substratoek desmetilazio burutu ahal izateko, aipatu berri den erreakzio bidea jarraitu dezakete soilik, hidroximetilamonioarena hain zuzen ere.

Lehenago aipatu den moduan, dimetilutako eta monometilatutako lisinen kasuan, laburbildu berri den erreakzio bidez gain, iminio katioiaren mekanismo bitartez ere eman daiteke. Desmetilazioa azken erreakzio bide honetatik eman dadin, ezinbestekoa da **10** eta **11** artekariak eratzean, Fe-OH taldeari N-H loturaren hidrogeno transferentzia ematea, **12'** konplexua eta **13'** iminio artekaria emanaz. Berriro ere, hidroximetilamonioaren erreakzio bidean ematen den moduan, **13'** konplexua gune aktibotik irteteen hidrolizatu egiten da, formaldehidoa eta desmetilatutako substratoa emateko. Halaber, posible da **13'** produktu bera hidrogenoen transferentzien ordena aldatuz lortu daiteke, hau da, lehen urratsean N-H loturarena, zeinak **10'** + **11'** artekariak ematen dituen.

4. Kapituluua

Jarraian, C-H loturaren haustura homolitikoa eta gero, **13'** iminio katioia eratzen da. Beraz, gure emaitzen arabera, di- eta monometilatutako substratoen desmetilazio erreakzioa, azaldutako azken mekanismo honen bidez ematen da. Izan ere, C-H haustura eman dadin, 22 kcal/mol inguruko energia behar da, zeina N-H loturaren hausturarena baino askoz gehiago. Hori dela eta, 4.5 Eskeman ageri den desmetilazioaren ziklo katalitiko, azaldu berri diren bi erreakzio bide hauekin osatu behar da, 4.9 Eskeman irudikatu den moduan.



Azkenik, guk burututako lanak, zeinak emaitza esperimentalekin bat datozen,^{45,48} **Error! Marcador no definido.** entzima hauek substratoekiko aurkezten

duten selektibitatea azaltzeko, gune aktiboan ageri diren taldeak kontutan hartzeaz gain, bertara iristeko bidearen polaritatea, zein α -zetoglutaratoaren *off-line* eta *in-line* konformazioak eta barrunbearen bolumena ere aintzat hartu behar direla erakutsi zuten. Eragile hauek guztiak, entzimek aurkezten duten selektibitatean funtsezko eragina izango dute. Ildo honetan, di- eta monometilatutako substratoekiko hautakorrak diren entzimek, gune aktibora iristeko bide estuago eta apolarra dutela ikusi da. Honenbestez, trimetilutako taldeek ezin dute bertan sartu. Bestalde, barrunbe nahiko handia duten entzimen kasuan, trimetilutako lisinak entzimen gune aktibora iristen dira, baina posible da ziklo katalitikoari hasiera emateko beharrezkoa den α -zetoglutaratoaren *off-line*-tik *in-line*-rako konformazio aldaketa ezindua egotea. Trimetilutako lisinekiko hautakorrak diren entzimek aldiz, barrunbe askoz handi eta zabalagoa dute, aminoazido polarrez inguratua dutelarik entzimen kanala. Aldaketa honek, lisina dimetilutuen kasuan N-H taldea Fe=O frakzioara iristea oztopatzen du, eta monometilatutako taldeei ezindu egiten die. Honenbestez, entzima hauentzat di- eta monometilatutako taldeen desmetilazioa moteldua edo ezindua dago. Beraz, entzimek duten aktibitatea gune katalitikoaren inguruak erregulatzen dutela ondorioztatzen da, eta inguruko aminoazidoek substratoak metilazio maila desberdinen artean bereiztearen arduradunak izan daitezkeela.

5. ZITOKROMO P450 FAMILIAK KATALIZATUTAKO AMINEN DESMETILAZIO ERREAKZIOA

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.

5.1 Zitokromo P450aren familia

Doktoretza Tesi honen lehen kapitulu

P450¹ entzimek familia handi bat osatzen dute, zeinak izaki bizidun guztietan ageri diren, (landare, bakter

endogeno zein exogenoak oxidatzearen sustapenaz arduratzen dira. Halaber, oso deigarria da agertzen diren espezie guztien artean, oxigenasa hauek kodifikatzeko 20000 gen baino gehiago daudela.³ Aniztasun handia aurkezten duten arren, hemo taldea amankomuna da familia honetako entzima guztien artean, protoporfirina IX zehatzago, zeina cisteina bati lotzen zaion, talde prostetikoaren S-H eta Fe (III)aren arteko loturaren bitartez.

Arestian aipatu bezala, entzima hauek oxidoreduktasen barruan kokatzen dira, gehiago zehaztuz gero monooxigenasa entzimetan biltzen dira. Oxidazio funtzioak bete ahal izateko, oxidatzaile papera betetzen duen oxigeno molekularra edo H₂O₂ behar izaten dute. Monooxigenasen ziklo katalitikoak antzekotasun ugari dituztenez, peroxidasen,⁴ katalasen⁵ eta zitokromo P450^{2,6} ziklo katalitikoak elkarrekin irudikatzen dira 5.1 Eskeman.

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.

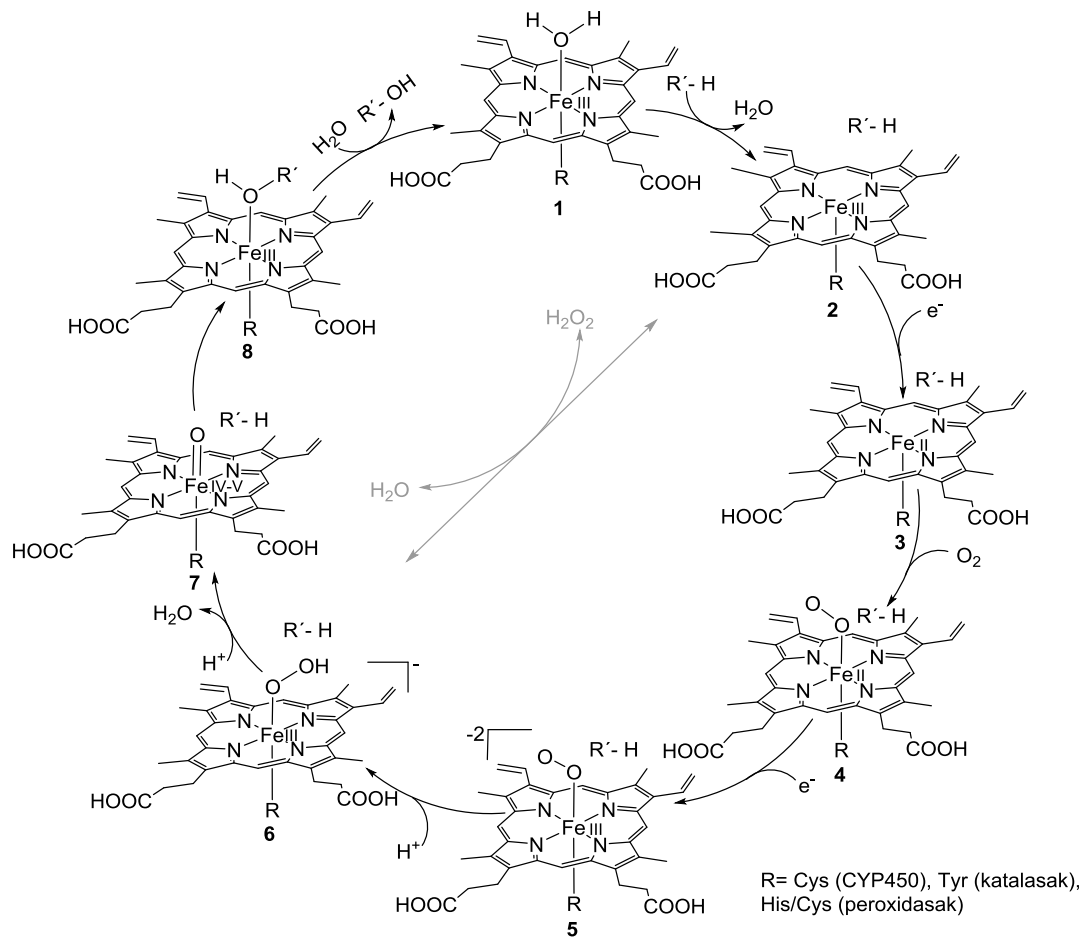
² B. Meunier, S. P. de Visser, S. Shaik, Chem. Rev. 2004, 104, 3947-3980.

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.



5.1. Eskema. Peroxidasen, katalasen eta zitokromo P450aren ziklo katalitiko.

Ziklo katalitiko guztiak **1** konposatutik abiatzen dira, non ur molekula batekin hexakoordenatutako hemo taldea espin bajaran aurkitzen den. Hemo talderik gabeko eta α -zetoglutaratoarekiko menpeko diren entzimen ziklo katalitikoan gertatzen den moduan, gune aktiboaren ingurura substratoa inguratzeak ur molekula lerratzen du, espin altuan dagoen **2** konposatua emanaz eta koordinatzeko posizio bat libre utziz. Gainera, zitokromo P450aren kasuan, espin egoeraren aldaketak orokorrean hemo taldearen erreodox potentzialaren hazkundera eragiten du, elektroien transferentzia erraztuz. Honen ondorioz, elektroien transferentzia burutzeko, gune aktiboaren erredukzioa ematen da, **3** konposatu ferrosoa sortuz. Jarraian, ziklo katalitikoan oxigenoa sartzean, lotu eta artekari oxiferriso **4a** lortzen da. Hurrengo pausoa, bere erreodox bikotetik

5. Kapitulu

beste elektroien baten transferentzia burutzean ematen da, peroxo artekari **5a** eratuz, zeina erraz protonatzen da konposatu hidroperoxo **6a** sortzeko, 0 konposatu izenez ezagutua. Oxigeno distal berean bigarren protonazioa burutzen da, O-O loturaren haustura heterolitikoa gertatzea eragiten duelarik, ura askatuz eta **7** artekari oxo-ferriloa emanaz. Azken hau, I konposatu bezala ezagutzen da, aurrerantzean Cpd I, eta erreaktibitate handia duen konposatua da.⁷ Jakina da, oxidazioaren azken ardura Konposatu I-arena dela. Ziklo katalitikoarekin jarraituz, substratoaren protoiaren transferentzia ematen da, artekari Fe-OHR' **8a** eratuz. Azkenik, ur molekula baten sarrerak ziklo katalitikoa isten du **1** konposatua eratuz berriro.

Laburbilduz, jarraian agertzen den ekuazioan ikusi daitekeen moduan, zitokromo P450 entzima familiaren ziklo katalitikoa osatzeko, hemo taldearen erredukzioa burutuko duten 2 elektroien zein beste bi protoien transferentzia ere behar dira Cpd I osatzeko.



Elektroien hauen jatorria NAD(P)H kofaktorea izan ohi da, zeinak agente erreduzitzaile moduan jokatzen duen. Elektroien transferentzia hau NAD(P)H kofaktoretik protoporfirina IX-ra, elektroien garraiatzaileak diren proteinen bitartez burutzen da. Proteina hauek, talde prostetiko bezala flaboproteinak eta azufreari

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.

lotutako burdindun proteinak erabiltzen dituzte. Beste zenbait kasuetan, flaboproteinak izaten dira soilik funtzioa honen arduradunak.⁸

Peroxidasen ziklo katalitikoari dagokionez, H_2O_2 kontaktuan jartzerakoan, ziklo katalitiko osatzen dute, zuzenean **2** artekaritik **6**ra. Behin Cpd I sortu denean, entzima hauek elektroizazioaren bidez diren konposatuak oxidatzen dituzte ziklo katalitiko osatuz.⁹ Arestian aipatu bezala, familia honetako entzimek H_2O_2 erabiltzen dute oxigeno atomo iturri moduan.

Azkenik, eta 5.1. Eskeman irudikatutako monooxigenasen ziklo katalitikoekin amaitzeko, katalasena azalduko da. Entzima hauek, peroxidasek egiten duten moduan, H_2O_2 gehitzen diote **2** konposatuari, eta **6**. Artekariaren protonazioaren ostean **7**. Cpd I eratuz. Peroxidasek konposatuak oxidatzen dituzten moduan, katalasek beste H_2O_2 molekula bat oxidatzen dute euren ziklo katalitiko itxiz, hau da, Cpd I-a berriro **2** konposatura erreduzituz, H_2O eta O_2 emanaz.⁹ Beraz, katalasak H_2O_2 deskonposaketaz arduratzen diren entzimak dira, ura eta oxigeno molekularra eratuz, erradikal askerik sortu gabe egiten dutelarik. Honenbestez, peroxidasek eta katalasek zelulak erradikal askeen zein hidrogeno peroxidoaren eragin kaltegarriaz babesteaz arduratzen diren entzimak direla ondoriozta daiteke. Lehenak H_2O_2 konposatuak oxidatzeko erabiltzen duten bitartean, bigarrenak H_2O_2 beraren dismutazioa katalizatzen dute.

Cpd I-ak energetikoki gertu dauden egoera elektroniko desberdinak izan ditzake, zeinak espin egoera desberdinetan aurkitzea ahalbideratzen duen, dolete eta kuadruplete egoeran hain zuzen. Jakina da Cpd I-aren egoera

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.

elektronikoaren arabera, erreaktibitatea desberdina izan dezakela, edota erreakzio berean espin egoera aldatu daitekeela. Lehenago aipatu den moduan, entzima hauek bi egoeretako erreaktibitatea aurkeztu dezakate, beraiek parte hartzen duten erreakzioen azterketa zailduz.

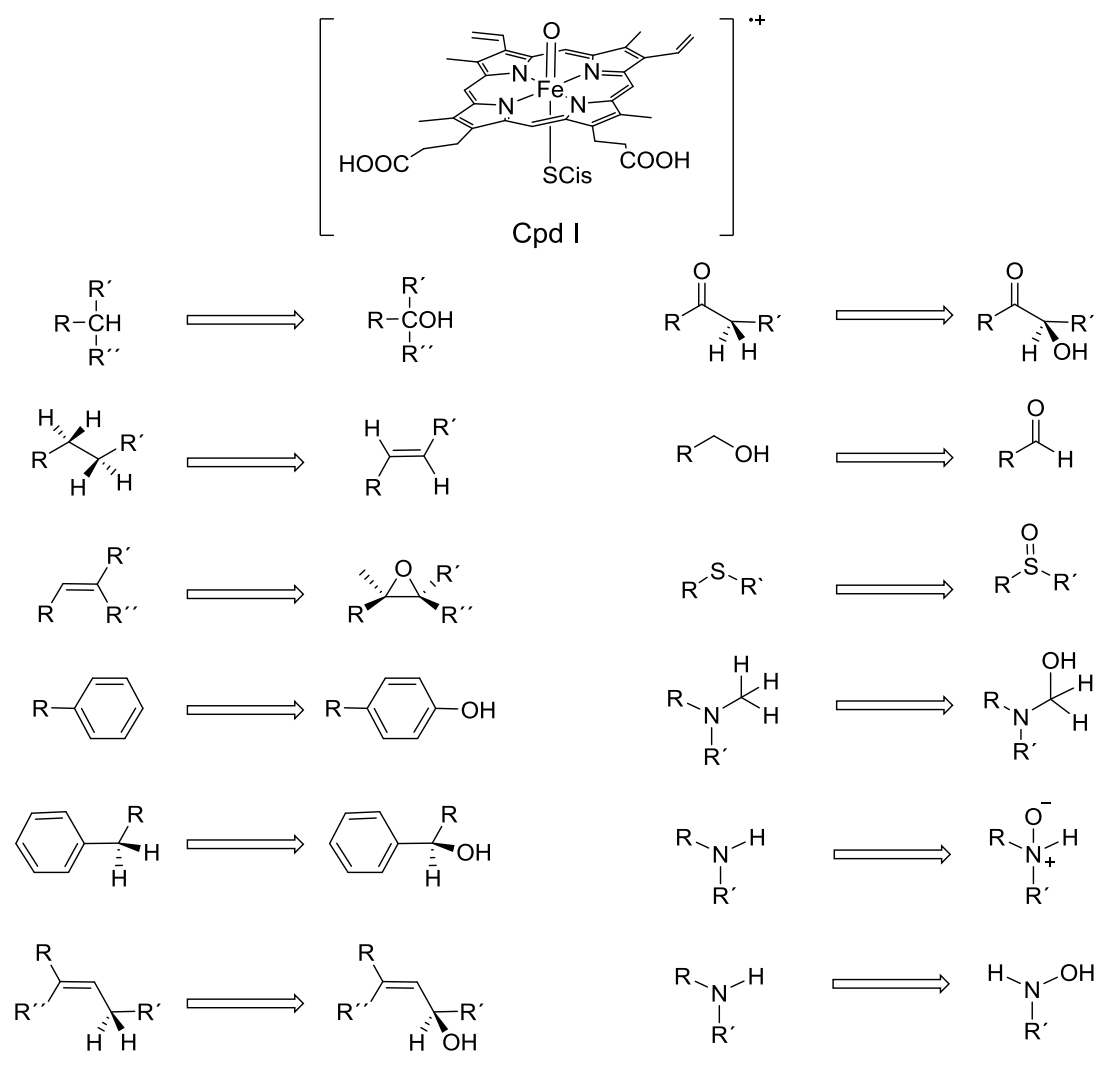
Cpd I-a esperimentalki aztertu nahi denean, konplexotasuna areagotzen da erreaktibitate handiko konposatua baita. Aurrekari hauek ikusita, nabarmentzekoa da lan ildo honetan kimika konputazionalak eskaintzen dituen abantailak, oso erreminta erabilgarriak baitira konposatu honen egitura eta erreaktibitatea aztertzerako garaian.¹⁰

5.2 CYP450ek katalizatutako oxidazio erreakzioak

5.2 Eskeman erreparatu daitekeen moduan, entzima hauek katalizatutako erreakzioak anitzak dira. Honela, lotura bikoitzen epoxidazioa burutzen dute, konposatu aromatikoak, alkoholak, aldehidoak eta heteroatomoak oxidatzen dituzte. Dena den, entzima familia hau aktibatu gabeko C-H loturak hidroxilatzeke, zein N-, S- eta O- dealkilazioak burutzeko duten gaitasunagatik gailentzen dira.^{2,10b}

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.

Entzima hauek ez-ohiko erreazio artekariak izaten dituzte, eta potentzial sintetiko handia izaten dute.¹¹ Honenbestez, CYP450 familiak katalizatutako erreazioen azterketek interes handia sortzen dute. Hori dela eta, azken urteotan konposatu hauen erreaktivitatea aztertzen duten lan esperimental eta teoriko ugari plazaratu dira.^{2,10b}



5.2. Eskema. CYP450en espezie aktibo Cpd I-ak burututako erreazio kimiko nagusien irudikapen eskematikoa.

Entzima hauen ziklo katalitiko azaltzerakoan ikusi den moduan, erreaktivitate desberdina aurkezten duten konposatuak ageri dira bertan, non

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

Cpd I nabarmentzen den oxidazioak burutzeko artekari funtsezkoa bezala (ikus 5.1 Eskema).^{2,12}

Euren egituran heteroatomoak dituzten substratoak, mekanismo desberdinen bitartez oxidatu daitezke. Zentzu honetan, 5.3 Eskeman irudikatu den moduan, aminak N-oxidazioz baita N-dealkilazioz ere oxidatu daitezke. Azken erreakzio hau burutzeko, mekanismo desberdinak proposatu dira.^{10b,12,13}

Hortaz, N-dealkilazioa bi mekanismo desberdinen bitartez garatu daiteke, zeinak lehen urratsean desberdintzen diren. Lehen mekanismoa, ferrilo taldeari Fe(IV)=O α posizioko karbono baten protoiaren transferentzia burutzean hasten da, karbinola eratuz oxigenoaren birkonbinaketa eta gero Fe(IV)-OH taldearekin. Mekanismo hau *Hydrogen Atom Transfer* bezala ezagutzen da, aurrerantzean HAT.

Bigarren mekanismoa aldiz, aminaren nitrogenoak entzimaren Fe(IV)=O taldeari elektroi bat transferitzean hasten da, *Single Electron Transfer* edo SET bezala izendatutako mekanismoaz, aminio erradil katioia eratuz. Artekari hau desprotonatzen da jarraian karbinolamina eratuz berriro ere (5.3 Eskema). Azkenik, espezia hau gune aktibotik kanpo hidrolizatzen da, formaldehidoa eta desmetilatutako amina eratuz. Jakina da urrats hau hemo taldearen parte hartze

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

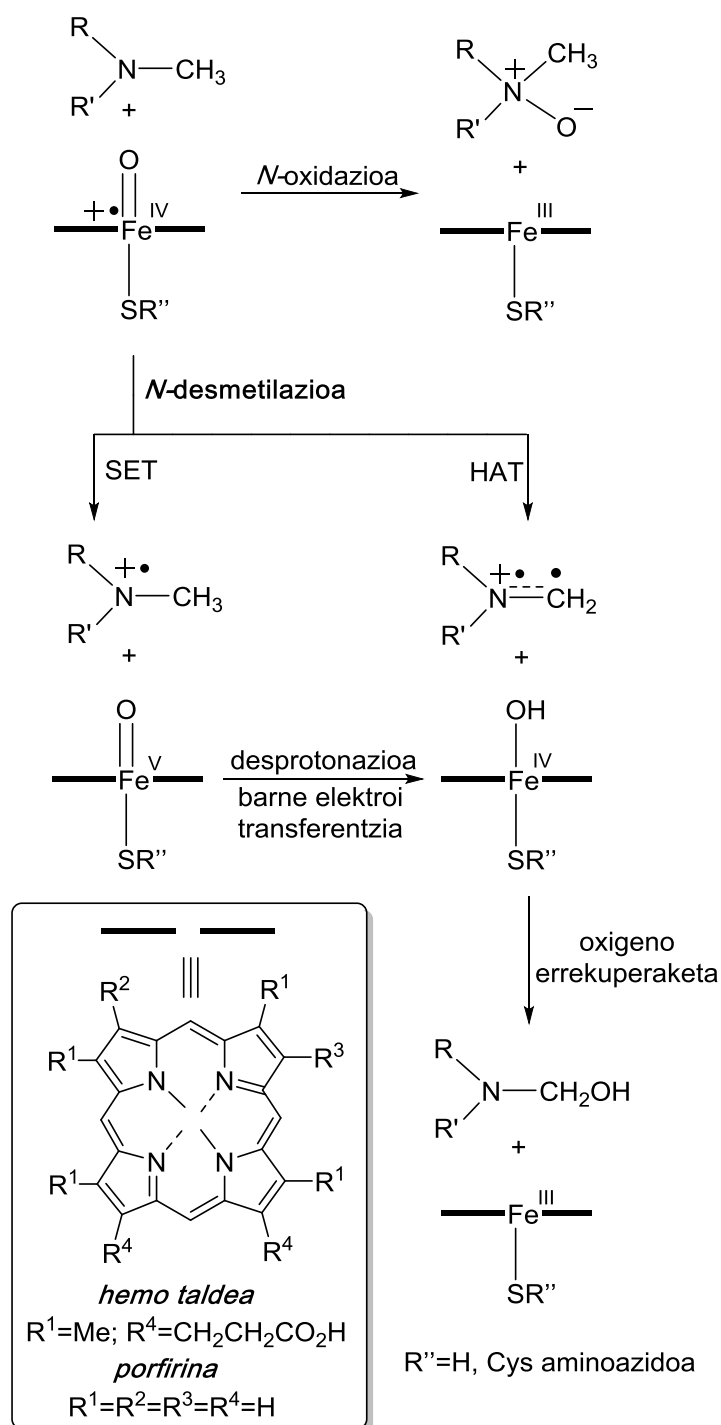
¹³ a) C. L. Shaffer, M. D. Morton, R. P. Hanzlik, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 8502-8508; b) C. L. Shaffer, S. Harriman, Y. M. Koen, R. P. Hanzlik, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 8268-8274; c) K. B. Cho, Y. Moreau, D. Kumar, D. A. Rock, J. P. Jones, S. Shaik, *Chem. -Eur. J.*, **2007**, 13, 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.

gabe burutzen dela.¹⁴ N-dealkilazioa burutzeko bi mekanismo desberdinak bai teorikoki baita espermentalki aztertuak izan dira.^{10b} Halere, N-dealkilazioa burutzeko lehen mekanismoa, hots, HAT-ari dagokiona da gehien onartzen dena.

5.3 Eskeman ageri den moduan, aminak oxidatzeko hirugarren mekanismoa N-oxigenazioari dagokio. Hau burutzeko, CYP450-aren oxigenoa zuzenean aminaren nitrogenoari adizionatzen zaio.¹⁵ Hala eta guztiz ere, zenbait lan teoriko zein espermentalek adierazten duten moduan, aminadun konposatuek nahiago dute N-dealkilazioa burutzea N-oxidazioa baino.^{13e,13f,15}

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.

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.



5.3. Eskema. Protoporfirinak eta cisteinaren kide konputazionalak katalizatutako aminen N-oxidazioa eta N-dealkilaziorako proposatutako oxidazio mekanismoak. SET: Single electron transfer; HAT: hydrogen atom transfer.

5.3 Farmakoen metabolismoa

Irentsitako botikak bizidunen gorputzetatik kanporatu beharreko konposatuak izan ohi dira, baita konposatu xenobiotikoak ere, euren pilaketak potentzialki toxikoak baitira. Baina eginkizun hau betetzea ez da guztiz erraza, absortzioa errazten duten ezaugarri fisiko-kimikoek elimazioa eragotzi edo zailtzen baitute. Hori dela eta, bizidunek entzimen bitartez kimikoki konposatuak eraldatu behar izaten dituzte eliminatuak izan daitezen.

Honenbestez, botiken metabolizazioaren helburu nagusia konposatuen polaritatea handitzea izango da, uretan disolbagarriagoak eginez, eta beraz, irazitasa edo kanporatzea erraztuz. Hori burutzeko, bizidunek hainbat eraldaketa burutzen dituzte bi fasetan banatuta: lehen mailako metabolismoa edo I. fasea, eta II. faseko metabolismoa.¹⁶ Dena den, aipatzekoa da botika guztiek ez dituztela aldaketa hauek jasaten eta aldatu gabe eliminatzen direla, Valsartanaren kasuan bezala. Gainera, konjokatzeko errazak diren talde funtzionalak dituzten konposatuak ere, metabolismoko 2. fasera igarotzen dira zuzenean, lehen pausoko metabolismoa jasan gabe.

Aurrerago aipatuko den bezala, hainbat entzima dira eraldaketa hauen arduradun. Organismoan oso hedatuak dauden arren, hesteetan eta gibelean dauden entzimak dira aintzat hartu beharrekoak, organo hauetan burutzen baita nagusiki ahotik irentsitako botiken metabolizazioa.

Konposatu exogenoen metabolizazioaz gehien arduratzen den organoa gibela da, non funtzio hau betetzen duten entzima ugari dauden. Entzima huen artean, gibeledako CYP450 taldea nagusitzen da. Gainera, organo honek urdail-

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

hesteetako isuri ugari jasotzen du. Hortaz, gibela da botiken eta konposatu exogenoen garbiketa eta eliminazioaz arduratzen den organo nagusia.

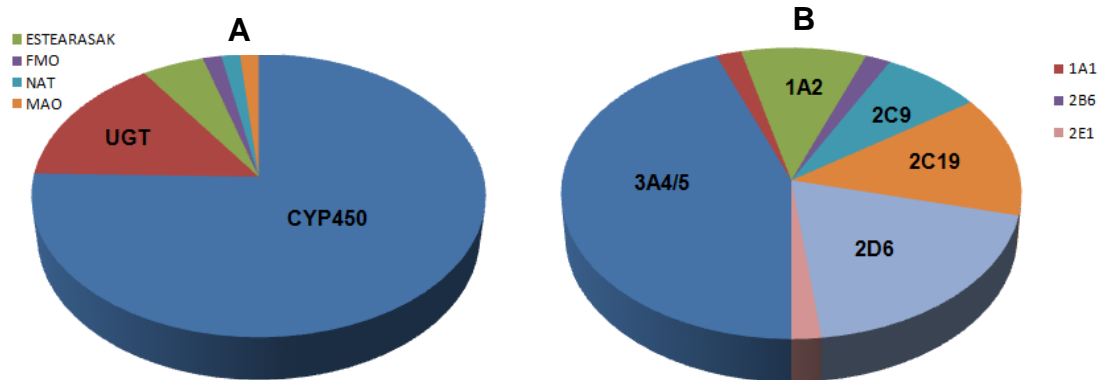
Arestian esan bezala, metabolizazioa bi prozesuetan zatitzen da. Zentzu honetan I. fasea, II. fasea erraztuko duten talde funtzionalen sarrera edo eraketan datza. Gehitzen diren talde ohikoenak –OH, -SH, -NH₂ eta -COOH motakoak dira. Fase honetan burutzen diren erreakzioen artean, oxidazio erreakzioak nagusitzen dira, hots, konposatu alifatiko zein aromatikoen hidroxilazioa, edota N-/O-dealkilazioak.¹⁷ Fase honetako erreakzio ohikoak izaten dira ere ester eta amiden hidrolisiak, azido karboxiliko, alkohol edo aminak sortzeko, baita nitro edo eter taldeen erreduzioak ere, aminak eta alkoholak eratzeko, hurrenez hurren. II. faseko erreakzioetan aldiz, azido glukuronikoa, sulfatoa, glutamatoa edo aminoazidoekin konjugatzeko erreakzioak burutzen dira. Erreakzio hauen guztien helburua, konposatuek uretan duten disolbagarritasuna handitzea da, gernu eta behazun bidez errazago eliminatuak izan daitezen.

5.1 Irudian botiken metabolizazioaz arduratzen diren entzima nagusien irudikapen eskematikoa ageri da. Bertan CYP450 familia, UDT-glukoronosiltransferasa, UGT, estearasak, flabinmonoaminoxigenasa, FMO, N-azetiltransferasa, NAT, edo monoaminoxidasa, MAO, nabarmentzen dira, konposatu exogenoen metabolismoaren arduradun nagusi moduan. Lehenago adierazi den bezala, hauen artean CYP450 familia nabarmentzen da. 5.1A irudian ikusi daitekeen moduan, iresten diren botiken %75-aren metabolizazioa gizakion gorputzean ageri diren CYP450-aren 57 isoformek burutzen dute.¹⁸ Aipatzekoa da, soilik 5 isoforma direla botiken %95-aren metabolizaziorako erreakzioak burutzen dituztenak, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 eta 3A4¹⁹ (ikus 5.1B Irudia).

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

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

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



5.1. Irudia. Farmakoen metabolizazioaz arduratzen diren entzima nagusien irudikapen eskematikoa. A) farmakoen metabolismoan entzima desberdinek duten ekarpenaren zenbatezpena CYP450, UDT-glukoronosiltransferasa, UGT, estearasak, flabin monoaminoxigenasa, FMO, N-azetiltransferasa, NAT, monoaminooxidasa, MAO; B) farmakoen metabolismoan CYP450aren isoforma desberdinen ekarpenaren zenbatezpena.

Isoformek substratoekiko aurkezten duten selektibitatea, gune aktiboaren baitakoa da.¹⁷ Honela, jakina da CYP1A2 isoformak gune aktibo txiki, hidrofobiko eta laua duela. Honenbestez, isoforma honek nagusiki geometria molekular laua duten konposatuen metabolizazioa burutzea lehenesten du. CYP2C9 isoformak aldiz, konposatu txiki eta anioi izaera dutenak hobesten ditu. Azkenik, CYP2D6 isoformak ordea, nitrogeno protonatuak dituzten konposatuengan adierazten du lehenetasuna.²⁰

Baina CYP450-ren isoforma guztien artean CYP3A4 isoforma nagusitzen da, zeina izaera anitzeko konposatuen metabolizazioaz arduratzen den. Entzima hauek konposatu lipofiloengan nolabaiteko lehenetasuna aurkezten dute. Halaber, botiken %30-40-aren metabolizazioaz arduratzen dira. Funtsean, entzima hauek aktibatu gabeko C-H loturen hidroxilazioaz eta N-dealkilazioaz arduratzen dira.

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.

5. Kapituluua

Jakina da konposatuek ez dutela orientazio zehatz bat hartzen isoforma honen gune aktiboan. Gainera, CYP3A4-aren guneak duen zabalkundea dela eta, aldi berean substrato bat baino gehiago bildu daitezke bertan. Honek guztiak CYP3A4 isoformak katalizatutako konposatuen metabolismoaren ulermena hare gehiago zailtzen du.

CYP450 entzima familiaren betebeharren artean, lehen adierazi bezala botiken zein konposatu xenobiotikoen metabolizazioa daude. Gainera, metaloentzima hauen funtzioak zabalagoak dira, zenbait konposatu endogenoen biosintesiaren ere arduratzen baitira, hormona esteroide edota gantz azidoena esaterako.^{20b}

Metabolizazioan zehar sortutako metabolitoek euren berezko toxizitate eta jarduera farmakologikoa dute, zeinak ez duen zertan jatorrizko konposatuaren bera izan behar. Hori kontutan izanda, metabolizazioan zehar sortuko diren metabolitikoak iragartzea oso interesgarria da, hauek sor ditzaketen aurkako eragin zein bioerabilgarritasunarekin erlazionatzen diren arazoak ekiditen laguntzen baitu.

Farmako berrien aurkikuntzari atxikitutako eraginkortasuna handitu ahal izateko, garrantzitsua da konposatuen metabolismoa *in silico* iragartzeko modua izatea. Botika gehienek CYP450-ek oxidatu ahal dituzten puntu bat baino gehiago izaten dituztenez, QM kalkuluak konposatu xenobiotioen metabolizazioan CYP450-ek duten erreaktibitatea ulertu eta auresateko oso erabilgarriak dira. Aurreko kapituluetan aipatu den moduan, DFT metodoek molekulen puntu erreaktiboenen neurketa burutzea ahalbidetzen dute.^{2,10,21}

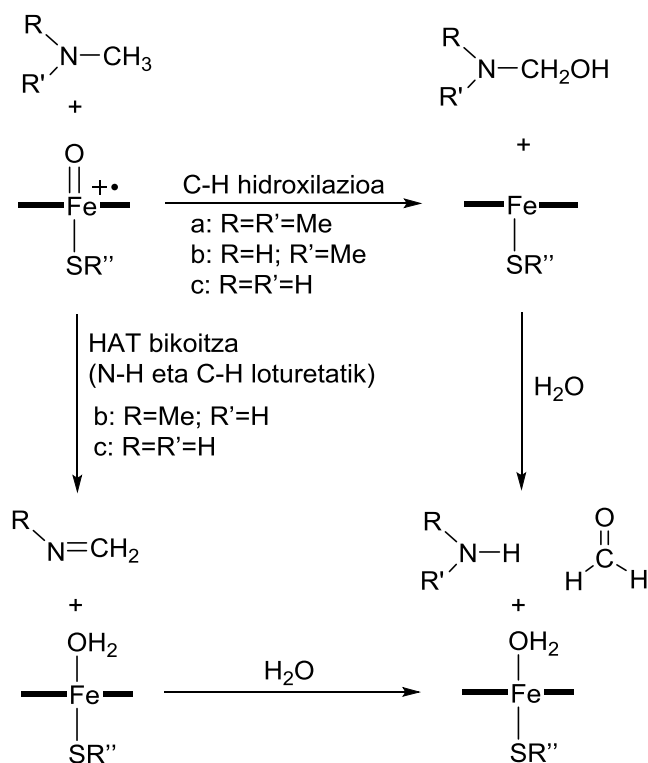
²¹ P. Rydberg, F. S. Jorgensen, L. Olsen, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2014**, *10*, 215-227.

Doktoretza Tesi honen 3. kapitulan, Jmj-C dominioa duten histona desmetilasek katalizatutako lisinen desmetilazioa aminen metilazio mailarekin aldatzen zela ikusi zen.²² Aurrekari hauek ikusirik, CYP450 familiak katalizatutako N-dealkilazioak ere erreaktibitate bikoitza izan zezakeela planteatu zen.

Lan hau burutzeko, CYP450 entzimen gune katalitikoaren porfirina bati lotutako Fe(IV)=O talde baten bidez modelatu zen, non albo kateak hidrogenoz, eta axial posizioan zegoen zisteina bisulfuro anioiez laburtu ziren. Aurrez egindako hainbat lanek, eredu honek beste eredu konplexuagoen antzeko eraginkortasuna adierazten duela frogatu dute.^{10a-c}

N-dealkilazio erreakzioa aztertzeko aukeratutako substratoak trimetilamina, dimetilamina eta monometilamina neutroak izan ziren. Erreakzio orokorrak 5.4 Eskeman laburbiltzen dira. Bertan ikusi daitezkeen moduan, Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasek N-desmetilazioan aztertutakoaren antzeko eskema bat jarraitu da kasu honetan ere.

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



5.4. Eskema. Aminen ordezkapen mailarekiko proposatutako N-dealkilaziorako mekanismoak.

5.4 Eskeman ikus daitekeen moduan, N-dealkilazioa bi mekanismo desberdinen bitartez burutu daiteke. Lehen mekanismoa C-H loturaren hidroxilazioari dagokiona da, non metiloa Fe(IV)=O talderuntz bideratzen denean ematen den erreakzioa den, karbinolamina sortuz. Jarraian, produktu honen hidrolisiak formaldehidoa eta N-desmetilatutako amina ematen ditu.

Amina sekundario eta primarioen kasuan aldiz, N-H talde bat gutxienez Fe(IV)=O talderuntz bideratu daiteke. Honek hidrogenoen transferentzi bikoitza ahalbideratzen du (HAT bikoitza, 5.4 Eskema), N-H taldearena lehenik eta C-H loturarena jarraian dagokion imina eratzuz. Produktu hau ere, karbinolaminaren kasuan bezala, formaldehidoa eta N-desmetilatutako amina emateko hidrolizatzen da.

Kapitulu amaitzeko, entzimen familia hau farmakoen metabolismoarekin erlazionatua dagoenez, erreaktibitate bikoitz honek amina taldeak dituzten farmakoen oxidazioan eraginik izan dezakeen aztertu zen. Honela, CYP450 entzima familiak metabolizatutako aminadun botika moduan aukeratutako eredu Tamoxifenoa izan zen.

Lan hau burutzeko erabilitako metodo konputazionalen zehaztasunak Doktoretza Tesi honen 2. Kapitulan azalduak daude.

5.4 Emaiza konputazionalak eta hausnarketa

Atal honen ondorengo puntuetan, CYP450 katalizatutako trimetilamina, dimetilamina eta monometilamina neutroen desmetilazio erreakzioen emaitzak eta erreakzio bideak adieraziko dira.

Bai N-oxidaziorako, zein elektroien transferentzia bidezko, (SET), N-dealkilaziorako ere, amina neutroak behar dira erreakzioa eman dadin, hots pare bat elektroiz ez lotzaile dituztenak. Hori dela eta, zenbait azterketa esperimentalek,^{13a,13b,13g} zein teorikoek ere,^{13c-m,23} aminadun substrato neutroak erabili dituzte. Halaber, zenbait X-izpien egituretan amina tertziarioen piramidalizazioari erreparatuz gero, datu hau bat datorrela atzematen da. Horren adibide dira bromoergokriptinari lotutako CYP3A4-aren kristala²⁴ (pdb 3UA1), CYP2D6 eta tiordazinak osatutakoa (pdb 4WNW) baita ajmalicinarekin²⁵ (pdb 4WNT) osatutakoa ere, non amina tertziarioen agerpena izatearekin bat datozen.

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

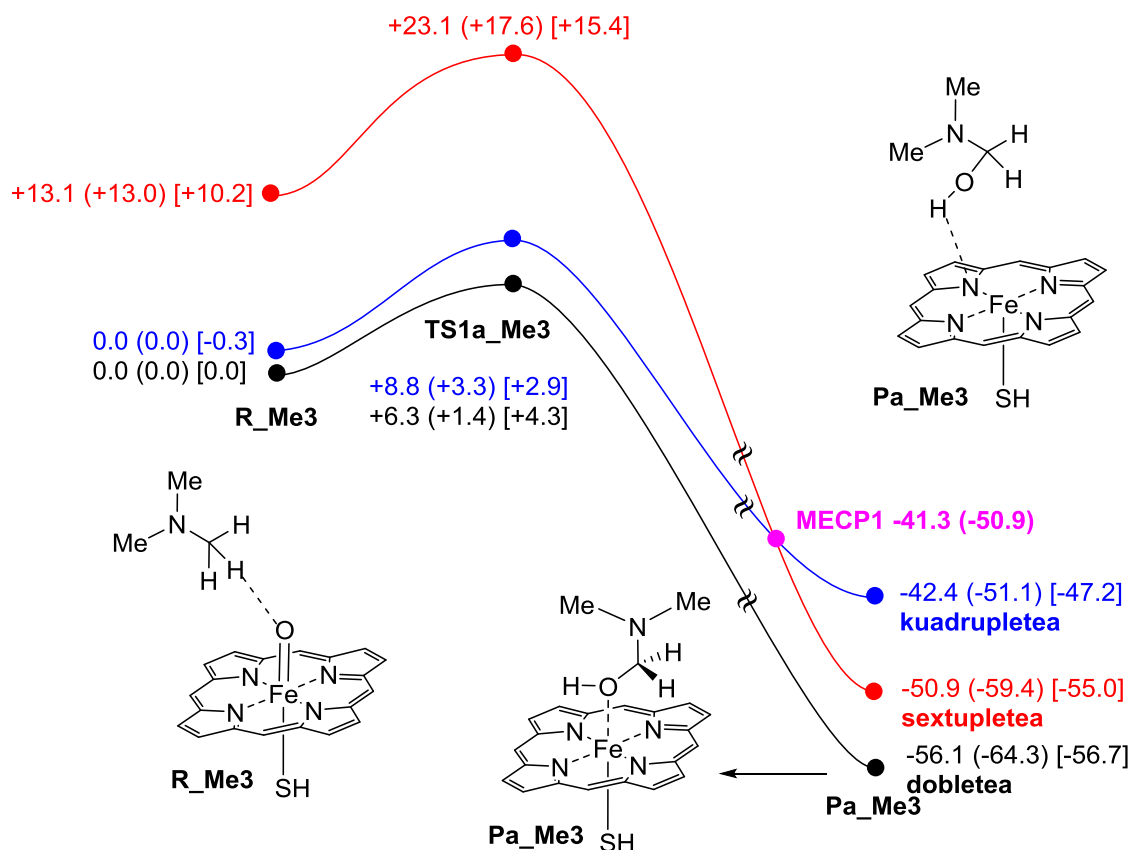
²⁴ I. F. Sevrioukova, T. L. Poulos, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 3510-3517.

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

Erreakzio bide guztietan desmetilazio erreakzioa espin baxuan (dobletea, $S=1/2$), ertainean (kuadrupletea, $S=3/2$) eta altuan (sextupletea, $S=5/2$) kalkulatu ziren.

5.4.1 Trimetilaminaren desmetilazioa

Cpd I-ek katalizatutako trimetilaminaren desmetilazio erreakzioa 5.2 Irudian laburbilduta dago. Gure emaitzek adierazten duten moduan, trimetilaminaren hidroxilazio erreakzioa mekanismo kontzertatu bidez ematen dela ikus daiteke. Halaber, espin egoera doblete eta kuadrupleteen kasuan, energia potentzialen gainazalak isoenergetikoak direla ere ikus daiteke. Sextupletean aldiz, bai erreaktibo zein trantsizio egoerak, 10 kcal/mol inguru energetikoagoak dira. Espin baxuko eta ertainen kasuan, erreakzioa burutzeko behar den aktibazio energia 5 kcal/mol baina gutxiago da. Honela, **R_Me3**-aren metiloaren hidrogenoa hemo taldearen ferriloak abstraitzean, dimetilaminometanolean eraldatzen da **Pa_Me3** produktua sortuz. Azkenik, entzimaren gune aktibotik at produktuaren hidrolizazioa burutzen da formaldehidoa, dimetilamina eta ura emateko.



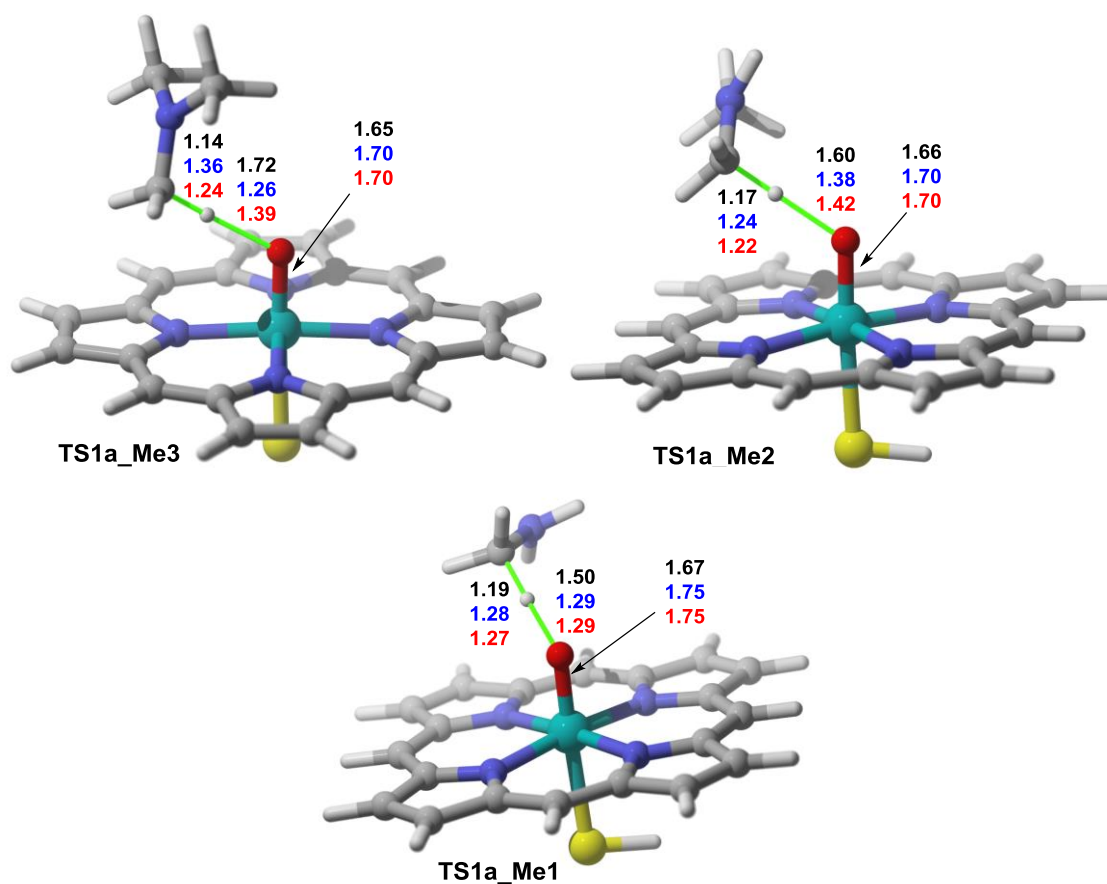
5.2. Irudia. Cpd I-ak katalizatutako trimetilaminaren hidroxilazioaren erreakzio bidea R_Me3 -a Pa_Me3 -an eraldatzeko UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan kalkulatu eta $\epsilon=78.39$ -rekin dolete, kuadruplete eta sextupletean. Energiak kcal/mol-an adieraziak, erlatiboak dira R_Me3 dolete egoerarekiko. Halaber, energia baxueneko gurutzaketa puntua, **MECP1** adierazita dago. Parentesi eta kortxeteetan adierazitako energiak energia erlatibo eta Gibbs-en energiari dagozkie (298K) hurrenez hurren, UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ teoria mailan kalkulatu.

Optimizatutako konposatuen geometriak aztertzerakoan, R_Me3 -ak hemo taldeko ferriloaren oxigenoarekin hidrogeno zubia eratzen dutela ikusi da, 2.9 Å inguruko distantziara. Aurrez aipatu bezala, konposatu hau isoenergetikoa da espin baxu eta ertainerako. **TS1a_Me3a** berriz apur bat egonkorragoa da dolete egoeran, 1.9 kcal/mol inguru. Energia termal eta entropikoen zuzenketak energia totalarekiko aintzat hartuz gero, egoeren egonkortasuna kuadrupletearen aldekoa da 1.4 kcal/mol-en diferentziagatik doletearekiko.

Optimizatutako trantsizio egoeren geometriari dagokienez, 5.3 Irudian adierazita dauden moduan, espin egoeren arabera desberdintasun ugari

5. Kapitulu

erreparatu daitezke **TS1a_Me3**-aren kasuan. Zentzu honetan, Fe=O taldearen hidrogenoaren transferentziari egokitutako urratsean, 0.4 Å baino gehiagoko diferentziak atzematen dira aztertutako espin egoera desberdinen artean. Erreakzio bidearen azken konposatua begitatzuz gero, **Pa_Me3**, S=1/2 (doblete) egoeran egonkorragoa dela ikusten da. Halaber, erreakzio bidean ez bezala, konposatu hau sextuplete egoeran kuadrupletean baino egonkorragoa da.



5.3. Irudia. UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan kalkulaturako **TS1a_Me3**, **TS1a_Me2** eta **TS1a_Me1**-en trantsizio egoeren optimizatutako geometriak. Geometriak espin egoera doblete, kuadruplete eta sextupleteei dagozkie beltz, urdin eta gorri adieraziak hurrenez hurren. Irudikatutako geometriak dobletearenak dira. Loturen luzerak Å-tan irudikatuak daude.

Hortaz, gure emaitzek kuadruplete eta sextupleteen energia potentzialen artean, energia gutxienerako gurutzaketa puntu bat, **MECP1**, ematea beharrezkoa dela erakusten dute **TS1a_Me3** eta **Pa_Me3** artean. **MECP1**-aren optimizatutako geometriak **Pa_Me3** konposatuaren ezaugarri beretxuak dituela ikusi da.

Espin egoera altuan eta ertainean ez bezala, dolete egoeran dagoen Fe(III)-porfirina eta Me₂NCH₂OH konplexuak elkarrekintza ahul bat aurkezten du HO...Fe alkohol taldearen oxigenoaren eta gune metalikoaren artean. S=3/2 eta S=5/2 egoeretan aldiz, porfirinaren nitrogenu atomo baten eta hidroxilo taldearen artean hidrogeno zubia eratzen da. Azkenik, 5.2 Irudian egiaztatu daitekeen moduan, desmetilazio erreakzioa oso exergonikoa eta itzulezina da.

CYP450-ak katalizatutako trimetilaminaren desmetilazio erreakzioan lortutako emaitzak aintzat hartuz gero, erreakzioa kontzertatua dela ondorioztatzen dugu, nagusiki espin egoera dolete eta kuadrupletean.

5.4.2. Dimetilaminaren desmetilazioa

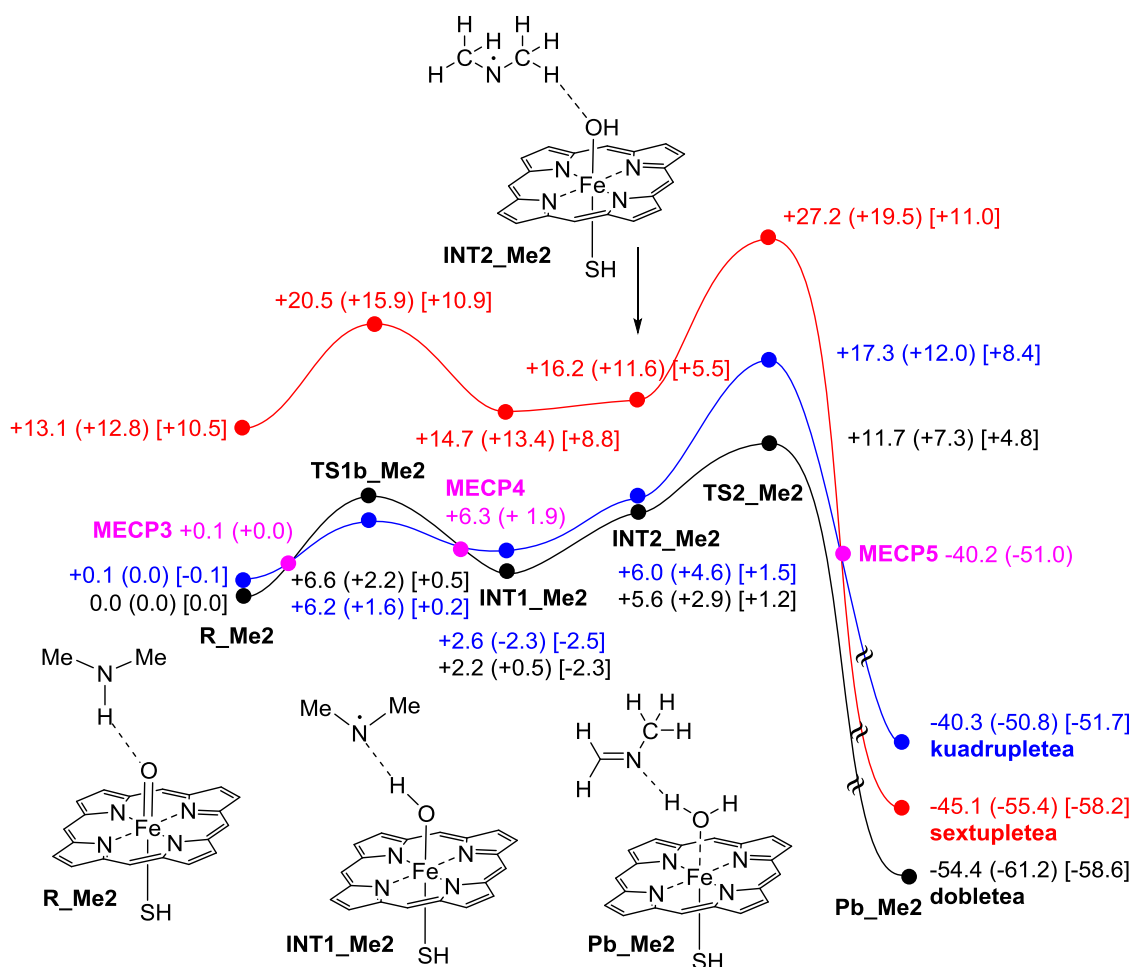
Jmj-C dominioa duten histonen desmetilasek katalizatutako lisina di- eta monometilatuen desmetilazio erreakzioan gertatzen den moduan, N,N-dimetilaminaren desmetilazio erreakzioa bi mekanismo desberdinen bitartez burutu daiteke. Arestian azaldutako 5.4 Eskeman ageri den moduan, N-H lotura Fe=O taldetik urbil dagoenean, jarraian ematen diren bi hidrogenoen transferentziek aipatutako desmetilazio erreakzioa ematen dute.

5.4 Irudian ageri den erreakzio bidean, **R_{Me2} Pa_{Me2}**-en eraldatzeko prozesua irudikatzen da. Bertan ikusi daitekeen moduan, azaldu berri den trimetilaminaren desmetilazio prozesuaren oso antzekoa da.

eratzen duten hidrogenozko lotura izan daiteke, **R_Me2** konplexuak **R_Me3**-ak baino motzagoa, eta beraz sendoagoa baitu, 2.1 eta 2.9 Å-eko distantziak neurtu zirelarik hurrenez hurren. Halaber, C-H loturaren hidroxilazio erreakzioak erradikal baten konfigurazioa du. Artekari hauek ordezkapen maila handitzearekin egongorkortzen direnez, alkil amina tertziario bat, sekundario bat baino egonkorragoak izango dira, eta hauek aldi berean primarioak baino egonkorragoak. Honenbestez, aminen C-H loturaren hidroxilazioaren aktibazio energiak ondorengo hurrenkera izango duela espero da: $Me_3 < Me_2 < Me_1$.

Lortutako karbinolaminak, **Pa_Me2** konplexua, berriro ere Fe eta karbinolaren oxigenoarekin elkarrekintza egiten dute espin egoera baxuan. Elkarrekintza hau ez da kuadruplete eta sextuplete espin egoeretan atzematen, non $OH \cdots N-Fe$ artean hidrogeno lotura bat eratzen den (ikus 5.4 Irudia). Azkenik, aipatzekoa da erreakzio bide honetan ere energia gutxieneko gurutzaketa puntu bat neurtu dela kuadruplete eta sextuplete egoeren artean, **MECP2** bezala izendatua. Bere geometria optimizatutako **Pa_Me2**-aren oso antzekoa izan da.

Dimetilaminaren desmetilazioa burutzeko bigarren erreakzio bidea 5.5 Irudian adierazita dago. Erreakzioa $Fe(IV)=O$ taldeak N-H loturako protoia abstraitzen duenean hasten da, **TS1b_Me2** trantsizio egoeraren bitartez **INT1_Me2** artekaria eratuz. Urrats honen aktibazio energia 0.2 kcal/mol-ekoa da, eta beraz, aktibazio langarik ez duela kontsideratu daiteke.

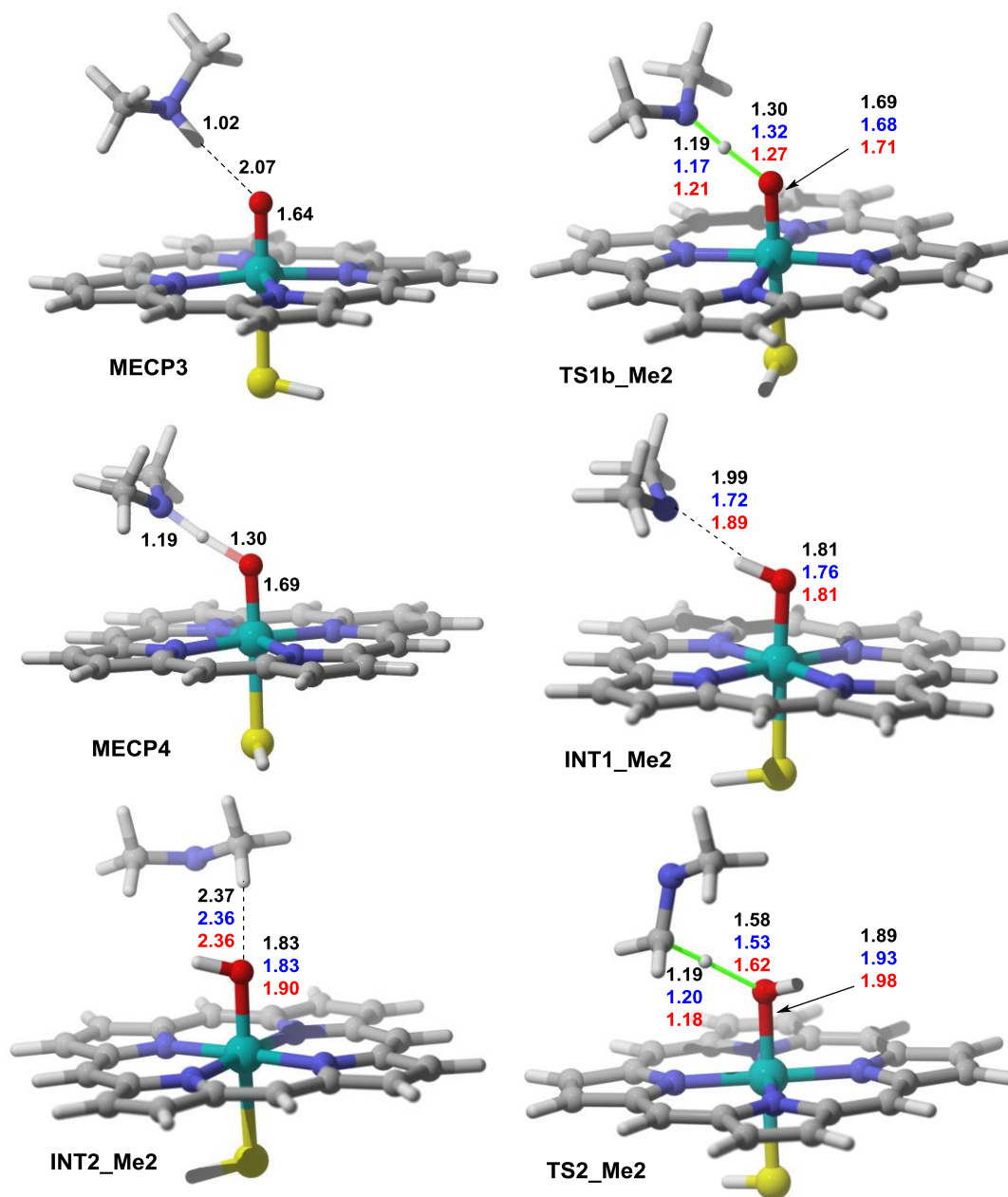


5.5. Irudia. Cpd I-ak katalizatutako hidrogeno bikoitzaren transferentzia **R_Me2**-a **Pb_Me2**-arako eraldaketaren erreakzio bidea UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan kalkulatu $\epsilon=78.39$ -rekin, doblete, kuadruplete eta sextupletean. Energiak kcal/mol-an adieraziak, erlatiboak dira **R_Me2** doblete egoerarekiko. Halaber, energia baxueneko gurutzaketa puntuak, **MECP3**, **MECP4** eta **MECP5** adieraziak daude. Parentesi eta kortexeteetan adierazitako energiak energia erlatibo eta Gibbs-en energiari dagozkie (298K) hurrenez hurren, UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ teoria mailan kalkulatu.

Lehen protoi transferentzia hau energia potentzial doblete eta kuadrupleteen gainazalen artean burutzen da. Energetikoki oso hurbil daudenez, bi energia gutxieneko gurutzaketa puntu burutzen dira, **MECP3** eta **MECP4**, **TS1b_Me2**-aren aurretik eta ondoren hurrenez hurren. Konposatu hauen geometriak erreaktibo konplexuaren **R_Me2** eta artekari **INT1_Me2** konplexuaren oso antzekoak dira (ikus 5.6 Irudia). Artekari honek Fe^{III} -OH talde eta dimetilaminaren nitrogenu erradikalaren artean hidrogeno lotura bat eratzen du. Jarraian, **INT1_Me2** artekaria **INT2_Me2**-an eraldatu daiteke, zeina 3.5

kcal/mol inguru ezegonkorragoa den. **INT1_Me2** artekariak N...HO elkarrekintza aurkezten du, baina **INT2_Me2**-ak duen C-H...OH elkarrekintza baino 0.4 Å laburragoa da. Bi artekarien arteko energia desberdintasunaren arrazoia azaldu berri den elkarrekintzen aldea izan liteke. Bigarren artekari honetan, C-H lotura Fe^{III}-OH talderuntz bideratzen da, zeinak C-H loturaren haustura errazten duen. Hori gauzatzeko, 7 kcal/mol inguruko langa gainditu behar da **INT1_Me2** artekariarekiko, **TS2_Me2** trantsizio egoeratik igaroz **Pb_Me2** konplexua eratzeko. Azken hau, imina H₂C=N-Me eta hemo taldea dituen konplexua da, zeinak burdinari lotutako ur molekula bat duen. Bigarren urrats honek aktibazio energia nahiko baxua izanda ere, erreakzio bidearen abiadura mugatzen du. Gainera, azken pauso honetan kuadruplete eta sextuplete egoeren artean beste gurutzaketa bat burutu da, **MECP5**.

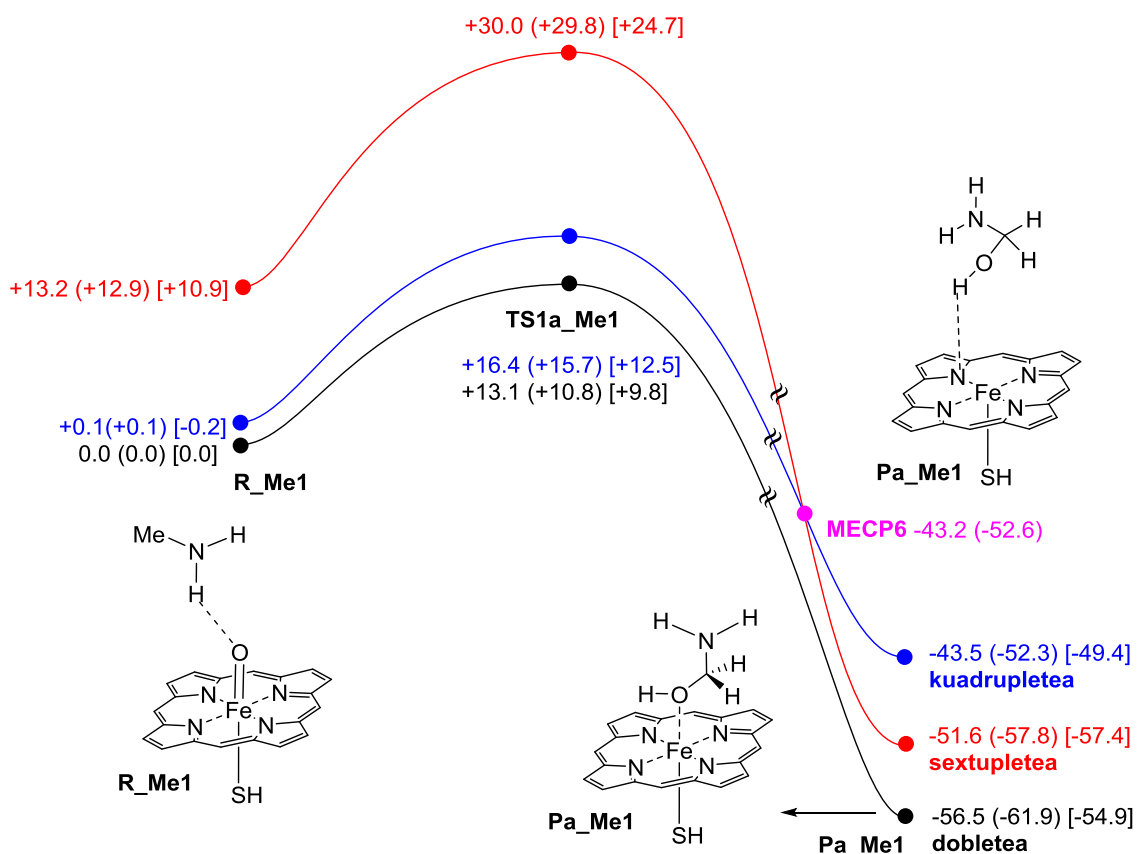
Laburbilduz, CYP450 entzimek katalizatutako amina sekundarioen desmetilazioa, bai C-H loturaren hidroxilazioz, zein hidrogeno transferentzi bikoitzaren bidez burutu daitekeela ondorioztatzen dugu.



5.6. Irudia. UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan kalkulaturako **MECP3**, **TS1b_Me2**, **MECP4**, **INT1_Me2**, **INT2_Me2** eta **TS2_Me2**-ren optimizatutako geometriak. Geometriak espin egoera doblete, kuadruplete eta sextupleteei dagozkie beltz, urdin eta gorritz adieraziak hurrenez hurren. Irudikatutako geometriak dobletearenak dira **TS1b_Me2**-arena izan ezik, kuadrupletearena dela. Loturen luzerak Å-tan irudikatuak daude.

5.4.3. Metilaminaren desmetilazioa

CYP450-ek katalizatutako metilaminaren desmetilazio erreakzioak, aurkeztu berri den dimetilaminaren eredu bera jarraitzen du. Honenbestez, erreakzio hau ere bi bide desberdinez burutuko da, C-H hidroxilazio bidez (ikus 5.7. Irudia), zein hidrogenoen transferentzi bikoitzaren bidez ere (ikus 5.8. Irudia).



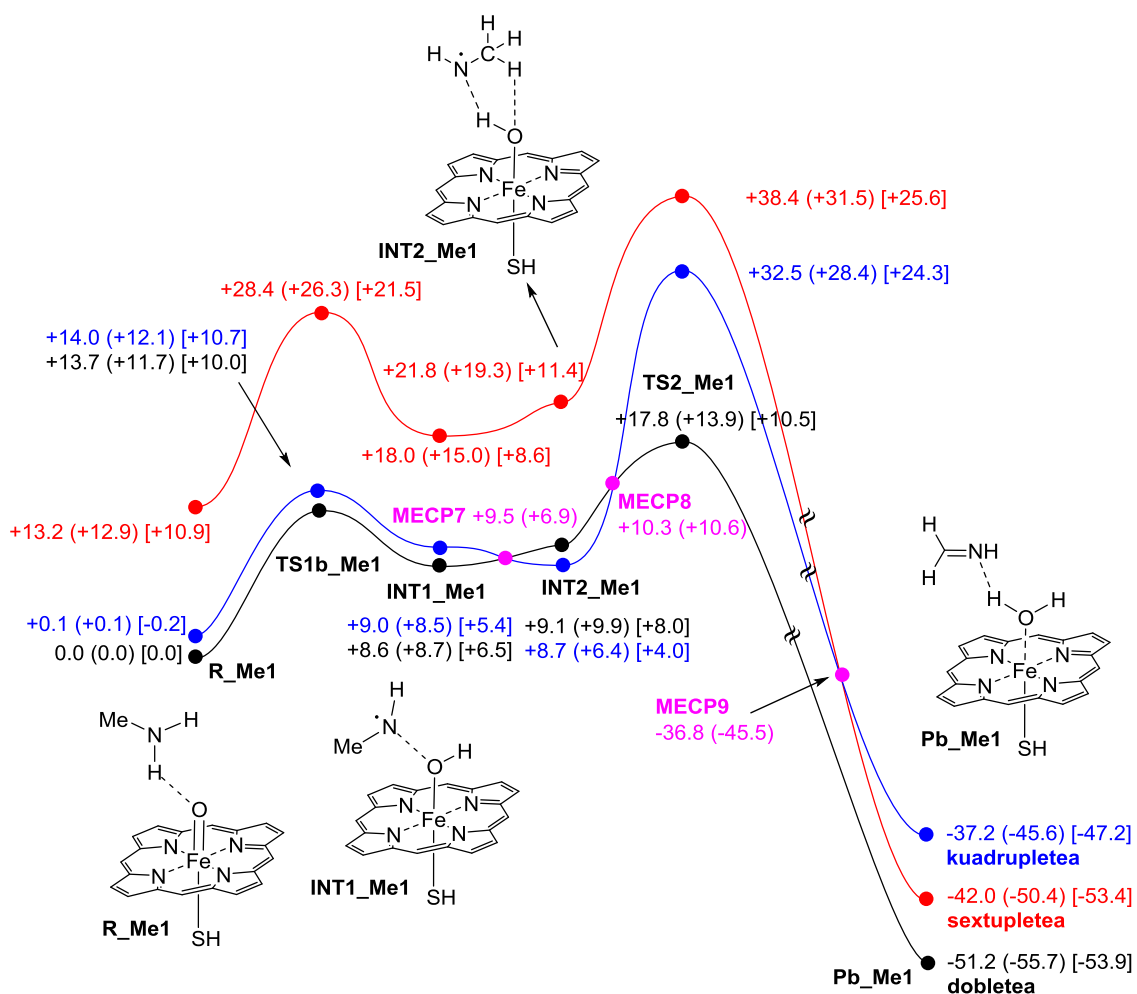
5.7. Irudia. Cpd I-ak katalizatutako monometilaminaren hidroxilazioaren erreakzio bidea **R_Me1-a Pa_Me1-an** eraldatzeko UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan kalkulatu eta $\epsilon=78.39$ -rekin dolete, kuadruplete eta sextupletean. Energiak kcal/mol-an adieraziak, erlatiboak dira **R_Me1** dolete egoerarekiko. Halaber, energia baxueneko gurutzaketa puntua, **MECP6** adierazita dago. Parentesi eta kortsxeteetan adierazitako energiak energia erlatibo eta Gibbs-en energiari dagozkie (298K) hurrenez hurren, UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ teoria mailan kalkulatu.

Bi mekanismoak burutzeko, 10 kcal/mol-eko energia aktibazioa gainditu behar da. Honenbestez, aurrez azaldu den moduan, amina primarioak desmetilatzeko behar den energia langa amina sekundario eta tertziarioen

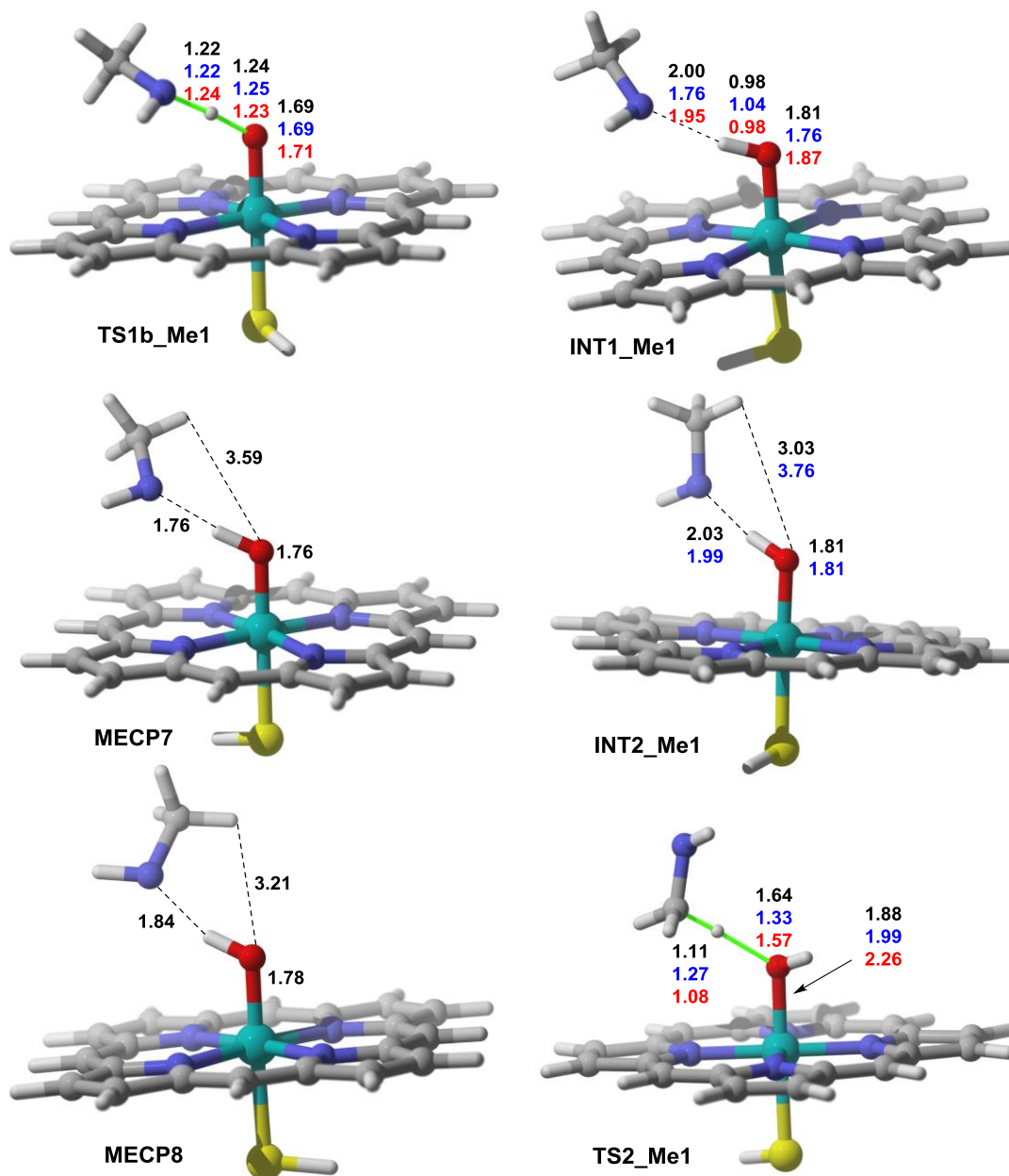
5. Kapituluia

desmetilazioa burutzekoa baino handiagoa da. Gainera, dimetilaminan gertatzen zen moduan, C-H loturaren hidroxilazioa erreakzio kontzertatu bidez burutzen da espin baxu eta ertainean batik bat (ikus 5.7 Irudia). Erreakzio honetan energia potentzialen gainazalen arteko gurutzaketa puntu berri bat burutu da, **MECP6**, **TS1a_Me1** eta **Pa_Me1** konposatuen bitartean, espin kuadruplete eta sextupleteen artean. Metilazio maila handiagoetan burutu den moduan, espin egoera baxu eta ertainean, Fe eta karbinolaren oxigenoaren artean elkarrekintza atzematen da. Espin egoera altuan aldiz, OH...N-Fe motako hidrogeno zubia dagoela sumatu da. (ikus 5.7 Irudia).

Metilamina eta CYP450-aren arteko hidrogeno transferentzi bikoitzaren erreakzioari dagokion erreakzioa, 5.8 Irudian ageri da. N,N-dimetilaminaren desmetilazioaren antzera, erreakzioa N-H taldearen H atomoaren ferriloarekiko transferentziarekin (HAT) hasten da. Urrats hau burutzeko 10 kcal/mol inguruko aktibazio langa gainditu behar da, **INT1_Me1** artekaria eratzeko. Konposatu honek ere hidrogeno zubi bat du Fe^{III}-OH talde eta monometilaren nitrogenoaren artean. Jarraian, espin baxu eta ertainen arteko gurutzaketa gauzatu ostean, **INT2_Me1** artekaria eratzen da, zeina kuadruplete egoeran dagoen. Artekari honek C-H loturaren hidrogeno transferentzia ematea ahalbideratzen du 6.5 kcal/mol inguruko energia langa gainditu eta gero. Pauso hau ematean beste espinen arteko gurutzaketa puntu bat burutzen da, **MECP8**, doblete eta kuadruplete egoeren artean. Azkenik, **Pb_Me1** konplexua eratzen da, zeina iminaz eta hidratatutako hemo taldeaz osaturik dagoen. N,N-dimetilaminaren desmetilazioan ez bezala, erreakzio bide honetan N-H loturaren protoiaren lehen transferentziak mugatzen du erreakzioaren abiadura H₂C=NH formazioan.



5.8. Irudia. Cpd I-ak katalizatutako hidrogeno bikoitzaren transferentzia R_Me1-a Pb_Me1-arako eraldaketaren erreakzio bidea UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan kalkulatu $\epsilon=78.39$ -rekin, dolete, kuadruplete eta sextupletean. Energiak kcal/mol-an adieraziak, erlatiboak dira R_Me1 dolete egoeretik. Halaber, energia baxueneko gurutzaketa puntuak, **MECP7**, **MECP8** eta **MECP9** adieraziak daude. Parentesi eta kortexeetan adierazitako energiak energia erlatibo eta Gibbs-en energiari dagozkie (298K) hurrenez hurren, UB3LYP(PCM)-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ teoria mailan kalkulatu.



5.9. Irudia. UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan kalkulaturako **TS1b_Me1**, **INT1_Me1**, **MECP7**, **INT2_Me1**, **MECP8** eta **TS2_Me1**-ren optimizatutako geometriak. Geometriak espin egoera doblete, kuadruplete eta sextupleteei dagozkie beltz, urdin eta gorritz adieraziak hurrenez hurren. **INT2_Me1**-ak sextupletean beste konformero bat eman zuen eta ez da irudikatu. Adierazitako geometriak dobletearenak dira **INT2_Me1**-arena izan ezik, kuadrupletearena dela. Loturen luzerak Å-tan irudikatuak daude.

Lortutako emaitzak aintzat hartuz, CYP450 entzimek katalizatutako aminen desmetiazio erreakzioen abiadura erlatiboak ondorengo hurrenkera jarraitzen duela ondoriozta daiteke, $\text{Me}_3 > \text{Me}_2 > \text{Me}_1$. Halaber, amina tertziarioek erreakzio hau burutzeko erreakzio bide bakarra dutela ikusi zen. Ordezkapen maila

baxuagoko aminek ordea, C-H loturaren hidroxilazio bidez, nahiz hidrogenoen transferentzi bikoitzaren bidez ere burutu dezakete erreakzioa.

5.4.4. Farmakoen metabolismoa: tamoxifenoa aztertzeko eredu moduan

Kapitulu honen hasieran aipatu den moduan, CYP450-ak funtsezko entzimak dira farmakoak metabolizatzeko garaian. Aipatu berri diren N-desmetilazioa burutzeko erreakzioak kontutan hartuz gero, amina taldeak dituzten botikek ere euren metabolizazioaren I. fasean, erreakzio hauek jasango dituztela esperoko da N-desmetilazioa burutzeko.

5.5 Eskeman amina talde dimetilatuak eta monometilatuak dituzten printzio aktiboen adibide batzu irudikatzen dira. Honela, amina tertziarioen printzipio aktiboen adibide dira Amitriptilina,²⁶ Imipramina,²⁷ Citaloprama,²⁸ N,N-dimetilamfetamina²⁹ edo Tamoxifenoa (TMX)³⁰ esaterako. Botika hauek guztiak CYP450 entzimek metabolizatzen dituzte C-H loturaren hidroxilazioaren bitartez dagozkien N-desmetilatutako metabolitoak eratuz. Jarraian, metabolito hauek, zein amina sekundarioak dituzten printzio aktiboak ere, Sertralina,³¹ Fluoxetina³²

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.

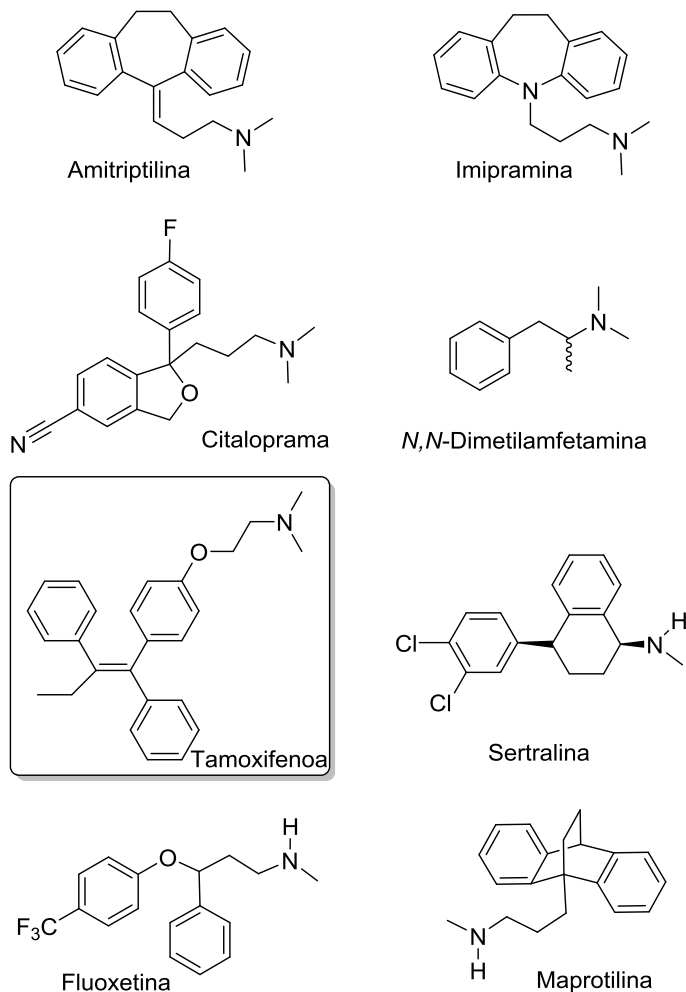
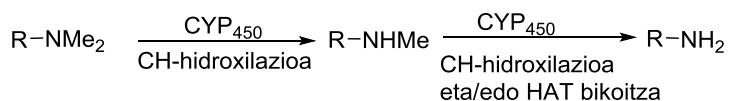
³⁰a) H. K. Crewe, L. M. Notley, R. M. Wunsch, M. S. Lennard, E. M. J. Gillam, *Drug Metab. Dispos.*, **2002**, *30*, 869-874; b) Z. Desta, B. A. Ward, N. V. Soukhova, D. A. Flockhart, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, *310*, 1062-1075.

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.

5. Kapituluua

edo Maprotilina³³adibidez, dagozkien desmetilatutako produktua eratuko dute C-H hidroxilazio bidez, edota protoi transferentzi bikoitzaren bitartez (ikus 5.5 Eskema).

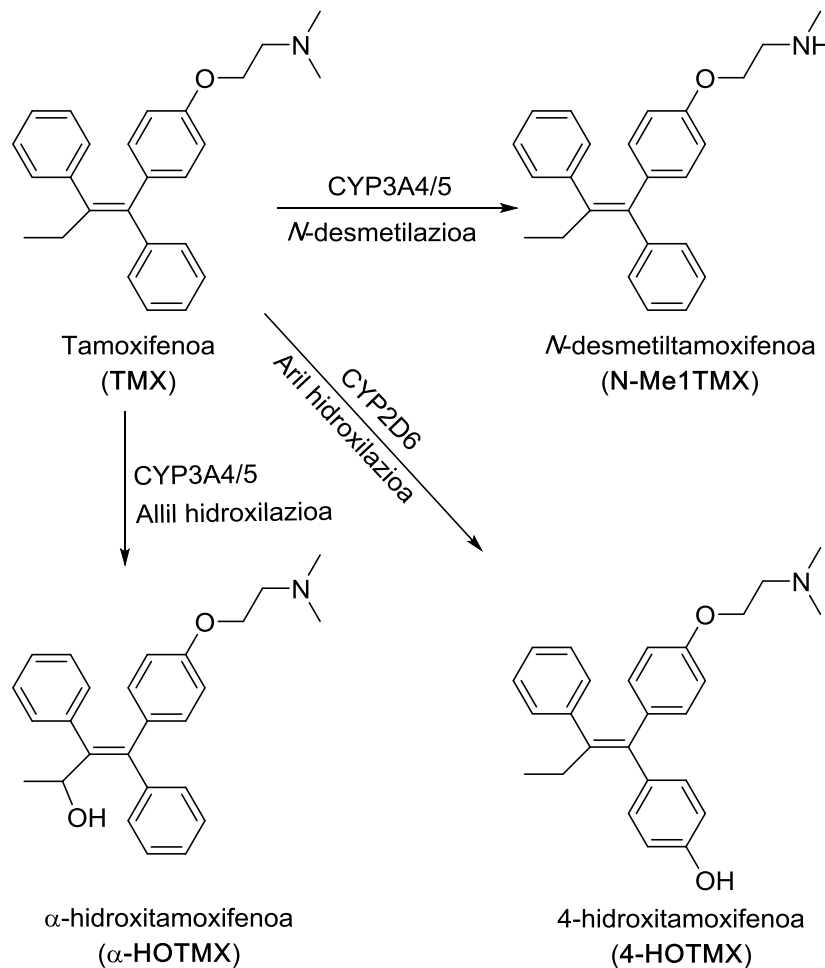


5.5. Eskema. CYP450-ak katalizatutako N,N-dimetil eta N-metil amina desberdinen biodesmetilazio bidea.

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

Hau guztia aintzat hartu eta gero, DFT kalkuluen bitartez Tamoxifenoaren (TMX) metabolizazioan zehar ematen diren oxidazio erreakzioak aztertzea erabaki zen N-metilatumoaren eredu moduan.

TMX estrogenoen errezeptoreen modulatuzaile hautakorren talde barruan sartzen da. Konposatu honek errezeptore hoiek blokeatzen dituenez, estrogenoen menpeko diren tumoreen hazkundera galarazten du. Honenbestez, bularreko minbizien tratamendu eta prebentziorako erabiltzen den botika da TMX.



5.6. Eskema. Tamoxifenoaren lehen mailako metabolizazio bidea.

CYP450 familia da gibelean TMX-aren metabolizazioaz oxidazio erreakzioen bitartez arduratzen diren entzimak. Metabolizazio prozesu hau

5. Kapitulu

konplexua da, eta hainbat urratsetan burutzen da. Doktoretza Tesi honetan 5.6 Eskeman irudikatuta dauden metabolizazio primarioan sortutako metabolito nagusiak aztertuko dira soilik. Guztietan metabolito nagusia N-desmetiltamoxifenoa (**N-Me1TMX**) da. Konposatu hau CYP3A4/5-ak³⁴ isoformekTMX-aren %90 aminoetoxi katea desmetilatzen dutenean sortzen da. Proportzio txikiagoan 4-hidroxitamoxifenoa (**4-HOTMX**) sortzen da, CYP2D6 entzimak TMX-aren aril hidroxilazio bideratzerakoan.³⁵ Metabolito honen jarduera farmakologikoa TMX-arena baino handiagoa da. Azkenik, α -hidroxitamoxifenoa, (**α -HOTMX**) aztertu zen hirugarren metabolito bezala. Konposatu hau neurri txikiagoan sortzen da CYP3A4/5 isoformek TMX-aren alil hidroxilazioa katalizatzen dutenean. Metabolito hau potentzialki TMX baino toxikoagoa da.³⁰

CYP450-aren isoforma desberdinek oxidazio erreakzio desberdinak katalizatzerako garaian aurkezten duten selektibitatea, eragile anitzen ondorio izan daiteke. Lehenik kontutan izan behar da gune aktiboen aldamenetan dauden taldeak desberdinak direla isoforma bakoitzean, eta beraz, konposatuak ez direla berdin kokatzen gune aktiboetan, ezta orientazio berarekin ere. Gainera, gune aktibora iristeko bidea, zein bere tamaina ere aldatu egiten da isoforma batetik bestera. Amaitzeko, oxidazio erreakzio desberdinek berezko desberditasunak izan ditzakete eta aktibazio langa desberdinak aurkeztu ditzaketela ere aintzat hartu behar da.

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

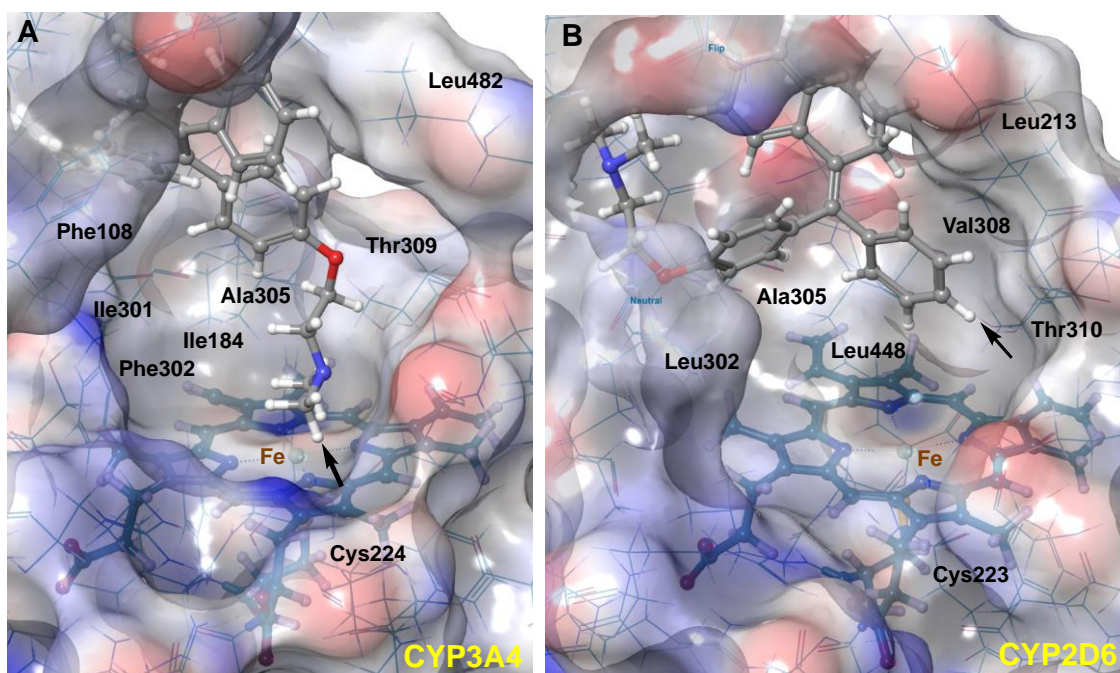
³⁵ a) Y. Jin, Z. Desta, V. Stearns, B. Ward, H. Ho, K. H. Lee, T. Skaar, A. M. Storniolo, L. Li, A. Araba, R. Blanchard, A. Nguyen, L. Ullmer, J. Hayden, S. Lemler, R. M. Weinsilbourn, J. M. Rae, D. F. Hayes, D. A. Flockhart, *J. Natl. Cancer Inst.* **2005**, *97*, 30-39; b) R. Ferraldeschi, W. G. Newman,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

Hortaz, lehenik dockingeko zenbait esperimentu burutu genituen TMX eta . CYP450 isoforma desberdinen artean lehenetsiak dituzten konformazioak badituzten edo ez aztertzeko helburuarekin. Egindako frogak, TMX bi isoformekin burutu ziren, CYP3A4 eta CYP2D6 hain zuzen ere. Lehen entzimak TMX-aren N-desmetilazioa burutzen du, **N-Me1TMX** metabolitoa sortuz. CYP2D6-ak aldiz, TMX oxidatzeko eratzun aromatikoaren para-hidroxilazioa burutzen du, **4-HOTMX** eratuz (5.6 Eskema). CYP3A4 eta CYP2D6 isoformen koordenadak X-lzpien egituretatik lortu dira, bromoergokriptinarekin²⁴ (pdb 3UA1) eta (4a*R*,6*R*,8a*S*)-8a-(2,4-difluorofenil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-4,4a,5,6,8,8a-hexahidropirano[3,4-*d*][1,3]-tiazin-2-aminarekin,³⁶ (pdb 4XRY), hurrenez hurren. Lortutako docking frogen emaitzak 5.10. Irudian adierazten dira.

Burututako bai CYP3A4-aren, zein CYP2D6-aren simulazioek, bi entzimen gune aktiboen barruan TMX-ak orientazio desberdinak hartu ditzakela erakutsi dute. 5.10 Irudian ikusi daitekeen moduan, bi entzimek ingurune hidrofobikoa dutela atzematen da, hemo taldearen inguruan balina, leuzina, isoleuzina, treonina eta fenilalanina motako hainbat talde baitituzte. 5.10A irudian TMX-ak CYP3A4-aren barruan hartzen duen orientazioa ikusten da. Bertan ikusi daitekeen bezala, hemo taldeko Fe(III) gertuen dagoen taldea N,N-dimetilaminoa da. Hau guztiz bat dator TMX-ak N-desmetilazioa burutzeko duen lehentasunarekin, **N-Me1TMX** eratuz metabolito nagusi bezala. Botika honek beste orientazio bat hartu dezake entzimaren gune aktiboan, etilo taldea Fe (III)

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.

inguruan kokatuz. Konbinaketa hau burutzeko aukerak laburragoak badira ere, energetikoki posible dira, eta bat datoz α -HOTMX metabolitoaren sorrerarekin.

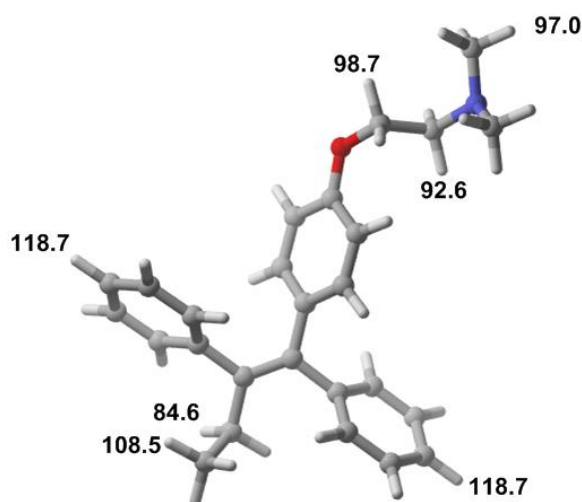


5.10. Irudia. Energia baxueneko kokapenak CYP3A4-ari (A) eta CYP2D6-ari (B) tamoxifenoa txertatu eta gero. Geziek Fe-hemo sistemarekiko gertuen dauden C-H loturak adierazten dituzte. CYP3A4-aren kasuan (A), orientazioan N-desmetilazioak du lehentasuna, eta CYP2D6-ak (B) aldiz 4-hidroxilazioa da alde duen oxidazio erreakzioa.

5.10B Irudiari erreparatuz gero, TMX-ak CYP2D6 barruan hartzen duen orientazioan, fenilo taldea hemo taldeko Fe (III)-aren inguruan kokatzen dela ikusten da. Orientazio honek bentzenoaren para-hidroxilazioa hobesten du, **4-HOTMX** eratuz metabolito nagusi bezala. Docking esperimentuetan lortutako emaitzak aintzat hartuz gero, berriro ere emaitza esperimentalekin bat datoztela ikusten da. Halaber, CYP450-aren isoforma desberdinek substratoen orientazioak aurrez antolatu ditzaketela ere ikusi da, baita isoforma bakoitzak oxidazio erreakzio desberdinekiko lehentasuna dutela ere.

Behin TMX-ak CYP450-aren isoforma desberdinen barruan orientazio desberdinak hartzen zituela ikusirik, TMX-ak berez zein oxidazio erreakzio

burutzeko zuen joera aztertu zen. Hori zehazteko, TMX-aren hainbat C-H loturen disoziazio energiak neurtu ziren. Lortutako emaitzak 5.11 Irudian adierazten dira. Bertan, TMX-aren metabolizazio primarioaren arduradun diren hiru erreakzioen artean, berez allil α -hidroxilazioa (84.6 kcal/mol) lehenetsia dagoela ikusi zen. Jarraian, TMX-aren N-desmetilazioa burutzeko (97.0 kcal/mol) joera dagoela atzeman zen, eta azkenik aril 4-hidroxilazioa (118.7 kcal/mol) kokatuko litzateke. Balio hauez gain, erreakzio desberdinek duten lehentasun zinetikoa energia aktibazioekin dago erlazionatua. Hori dela eta, TMX-aren metabolismoaren azterketa osatzeko, aurrez adierazitako hiru erreakzioak burutu ziren aminen N-desmetilazioaren analisisian erabilitako Cpd I eredu bera erabiliz. Halaber, CYP450-ak erreakzioak espin egoera baxuan katalizatzen duela ikusirik, N-desmetilazio, 4-hidroxilazio eta α -hidroxilazioen energia potentzialen gainazakak soilik egoera horretan aztertu ziren. Lortutako emaitzak 5.1 Taulan bildu dira.



5.11. Irudia. Aztertutako tamoxifenoaren zenbait C-H loturen disoziazio energiak UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ mailan kalkulatuak. Energiak kcal/mol-etan daude.

5. Kapitulu

5.1. Taula: Energia erlatiboak (ΔE), Energias erlatiboak zero puntuaren ekarpen bibrazionalarekin ($\Delta E + ZPE$), Entalpias erlatiboak (ΔH) eta Energia erlatibo askeak (ΔG), kcal/mol eta 298 K-tan, tamoxifenoaren bide metabolitoarentzat kalkulatuak HS-Fe(O)-porfirinak katalizatua CYP450aren zentru aktibo moduan.^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

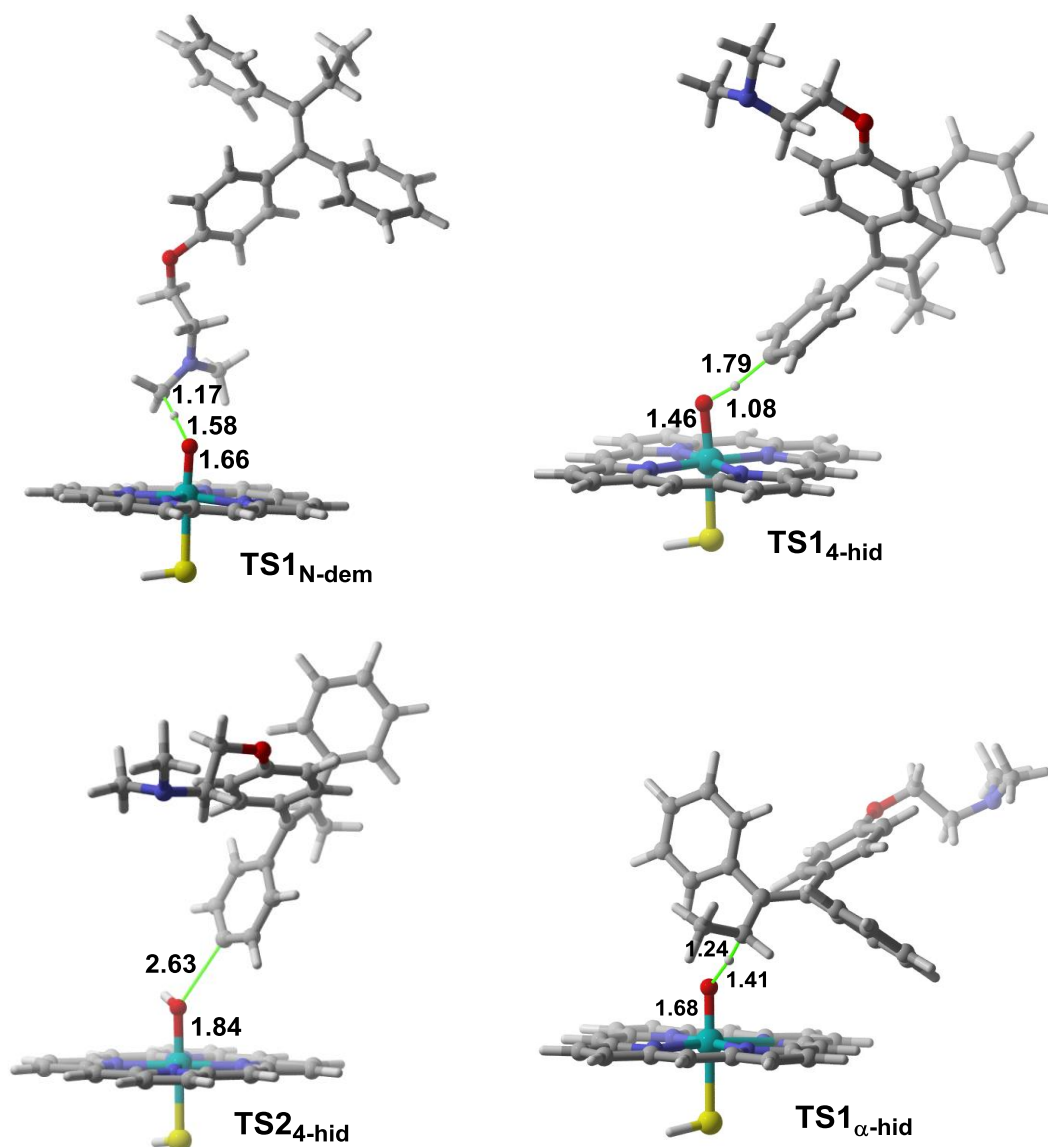
(a) Energiak espin egoera dobletean kalkulatuak UB3LYP-GD3BJ/6-311+G(2d,2p)&LanL2DZ//UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ teoria mailan, eta PCM soluzioan, $\epsilon = 78.39$ -rekin. ZPE, entalpia, eta Gibbs-en energia askeak UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ teoria mailan kalkulatu dira.

Goiko taulan bildutako emaitzak ikusirik, TMX-aren N-desmetilazioa energia aktibazio langarik gabe burutzen dela ondoriozta daiteke. Gainera, erreakzioa kontzertatua dela ere atzeman da, ezinezkoa izan baitzen oxigenoaren birkonbinaketari dagokion bigarren urratseko trantsizio egoera topatzea. TS1_{N-dem} -arentzat lortu ziren ezaugarri geometrikoak, TS1_{a_Me3}-arentzat lortutakoen oso antzekoak dira (ikus 5.12 eta 5.3 Irudiak, hurrenez hurren). Bestalde, α -hidroxilazioak ere aktibazio energia baxua duela ikusi zen, 7.1 kcal/mol ingurukoa, eta erreakzio hau ere mekanismo kontzertatu bidez burutzen da. TS1 _{α -hid}-ak (1.24 Å), TS1_{N-dem}-ak (1.17 Å) baino trantsizio egoera aurreratuago bat aurkezten du C-H loturaren protoi transferentzian.

Aztertutako azken hidroxilazioak, 4-hidroxilazioak, aurreko bi oxidazioekiko desberdintasun ugari dituela ikusi zen. Diferentzia nagusia erreakzio hau bi urratsetan ematen dela da, non bi trantsizio egoerak isladatzea lortu zen, TS1_{4-hid} eta TS2_{4-hid}. Lehen urratsa protoiaren transferentziari dagokiona da, zeinak

erreakzioaren abiadura mugatzen duen, bigarren urratsa baino 15 kcal/mol inguru energetikoagoa baita (energia askea). Erreakzio honen trantsizio egoerei dagokienez, **TS1_{4-hid}**-ak izaera berantiarra aurkezten du, non O-H loturaren eraketa, C-H loturaren hausturatik baino gertuagoa dagoen. Optimizatutako **TS2_{4-hid}**-aren egiturak aldiz, trantsizio egoera goiztiarra aurkezten duela ikusi zen.

Lortutako emaitzak aintzat hartuz, TMX-aren metabolizazioko erreakzio nagusia N-desmetilazioa dela ondoriozta daiteke, aztertutako gainontzeko erreakzioek baino aktibazio energia gutxiena baitu. Datu hau emaitza esperimentalekin guztiz bat dator, non TMX-aren %90 **N-Me1TMX** eraldatzen dela ikusi da, bere metabolito nagusi bezala kokatuz. Ildo berean jarraituz, eta 23 kcal/mol inguruko energia askeko aktibazio langa gainditu ostean, **4-HOTMX** sortzen da esperimentalki proportzio txikiagoan. Azkenik, **α-HOTMX** aurreko bi metabolitoen tartean kokatuko litzateke, 7 kcal/mol inguruko energia askeko aktibazioa izanik.



5.12. Irudia. TS1_{N-dem}, TS1_{4-hid}, TS2_{4-hid} eta TS1_{α-hid} transizio egoeren geometriak espin egoera dobletean. Loturen distantziak Å-an adieraziak daude.

Egindako bai docking frogak, baita loturen disoziazio zein hemo eta TMX-aren arteko DFT-ko kalkuluen emaitzak aintzat hartuz gero, metabolito nagusi den **N-Me1TMX**-aren sorrera, N-desmetilazioarekiko berezko joerari CYP450-aren gune aktiboak NMe₂ taldeak duen lehentasuna gehitzearen ondorio dela adierazten dugu. Ondorioz, CYP3A4 moduko isoformek gune aktibo zabalagoa izan dezakete, non substratoaren sorrera ez dagoen hain mugatua. CYP2D6 isoformaren kasuan aldiz, substratoek aurrez gune aktiborako sarrera organizatu

egin behar dute. Isoforma honen gune aktiboa askoz mugatuagoa da, **4-HOTMX** metabolitoa sortzeko duen berezko joera baxua sahiestuz.

5.5 Ondorioak

Kapitu honetan CYP450-ak katalizatutako trimetilamina, dimetilamina eta monometilaminaren N-desmetilazio erreakzioak bildu eta eztabaidatu dira. Hau aztertzeko porfirina eraztunari lotutako Fe(IV)=O eta bisulfuro anioia erabili dira eredu bezala. Substrato trimetilatuak C-H loturaren hidroxilazioa burutzen dute, Shaikkek proposatutako oxigenoaren birkonbinaketak produktu N-hidroxilatua ematen duelarik mekanismo kontzertatu bidez. Ondoren, konposatu honek formaldehidoa eta dagokion produktu N-desmetilatua ematen du. Dimetilatuak eta monometilatutako substratoek aldiz, N-H lotura bat hemo taldeetik gertu kokatzen dutenez, C-H loturaren hidroxilazioaren ordezkotzat hidrogeno transferentzi bikoitza ematen dute. Honenbestez, mekanismo hau urratsetan burutzen da. Produktu bezala imina sortzen da, zeina berriro ere formaldehidoa eta dagokion produktu N-desmetilatua ematen duen. Lortutako emaitzek bi mekanismoak ia isoenergetikoak direla adierazi zuten.

Aipatutako bi erreakzioak espin egoera doblete eta kuadrupleten burutzen direnez, erreakzio bideetan zehar hainbat energia gutxieneko gurutzaketa puntu ematen dira.

Azkenik, TMX-aren metabolismo primarioa aztertu da farmako N,N-dimetilatutako eredu moduan. Horretarako docking frogak, loturen disoziazio energia, zein DFT kalkuluak ere burutu ziren. Lortutako emaitzek N-desmetiltamoxifenoa aurkezten dute metabolito nagusi bezala, 4-

5. Kapitulu

hidroxitamoxifenoa eta α -hidroxitamoxifenoa aldiz proportzio gutxieneko metabolitoak direla ikusi zen. Modu kualitatiboan lortutako emaitzak datu esperimentalekin bat datoz.

6. ONDORIO OROKORRAK

6.1 Ondorioak

Doktoretza Tesi honetan aminen N-desmetilazio erreakzioa aztertu da. Zehazki, α -zetoglutaratoaren menpeko diren entzimek katalizatua, JMJD2A entzima adibide hartuz, zein hemo motako entzimek katalizatua ere, zitokromo P450 eredu bezala erabiliaz. Lortutako emaitzetatik jarraian aipatzen diren ondorioak atera daitezke:

1. Bai hemo motako entzimak, zein α -zetoglutaratoaren menpeko entzimak ere, aminen N-desmetilazioa katalizatzeke gai dira.
2. Bi familien artean desberdintasunak atzeman dira metilazio mailarekiko erreakzioa burutzeko mekanismoen artean:

Biek amina trimetilatu

N-desmetilazioa karbinolaren erreakzio bidetik burutzen dute (N-metilo taldearen C-hidroxilazioa). Erreakzio hau kontzertatua da zitokromo P450-ak katalizatzen duenean, JMJD2A-k burutzen duenean aldiz, urratsetan ematen da.

Amina dimetilatu eta monometilatuek ordea, iminio katioiaren erreakzio bidea jarraitzen dute JMJD2A entzimak katalizatzean, zitokromo P450 familiak aldiz, karbinolaren erreakzio bidez, zein iminio katioiaren bitartez burutzen dute amina di-, eta monometilatuen N-desmetilazioa.

3. Ez-hemo motako entzimek N-desmetilazio erreakzioa espin egoera ertain eta altuan burutzen dute, hemo entzimek oster
- axu eta ertainean dihardute. Honenbestez, bi entzima familiek katalizatutako erreakzio bideetan energia gutxi
- eneko gurutzaketa puntuak burutuko dira.

Histonen desmetilasek lisinen metilazio mailarekiko duten selektibitateak ez du N-desmetilazio erreakzioarekin erlazio zuzenik.

4. Hortaz, entzima hauek duten hautakortasuna eragile anitzen ondorio da, entzimaren gune aktibora iristeko kanalaren polaritatea edota gune aktiboaren tamaina, zein (poli)metilamino taldearena esaterako, non inguruko taldeek berebiziko garrantzia hartzen duten funtzio hau betetzeko. Trimetilatutako taldeekiko hautakorrak diren entzimek talde polarragoak dituzte kanalean, eta ondorioz lisina dimetilatuaren N-desmetilazioa zaildu egiten da, edo guztiz eragozten da lisina monometilatuaren kasuan. Izan ere, sustratoen N-H taldeek elkarrekintzak burutzen dituzte gune aktibora sartzeko kanalean dauden talde polarrekin. Lisina di- eta monometilatutako lisinak desmetilatzeke hautakorrak diren entzimen selektibitatea ordea, gune aktiboaren tamainaren ondorio da, ez baitu lisina trimetilatuak barneratzeko behar adina leku. Kasu hauetan, entzimaren gune aktibora iristeko kanalean talde apolarrak egon ohi dira, zeinak metilazio maila gutxiagoko taldeei gune aktibora iristea ahalbidetzen dieten.
5. Proposatutako zitokromo P450-aren eredu konputazionala, farmakoen lehen faseko metabolizazioko metabolitoak *in-silico* kalkulatzeko balio duela egiaztatu da. Gure kalkuluek tamoxifenoak lehen mailako metabolitoak sortzeko dituen lehentasunak kalkulatzeko ahalbidetu dute, eta lortutako emaitzak bat datoz esperimentalki lortzen denarekin. Kalkulu hauek erabilgarriak izan daitezke aztertutako farmako N-metilatuaren metabolito primarioak zein diren zehazteko.
6. Azkenik, gorputzean erreakzio bera katalizatzen duten bi entzima familia desberdin izatearen arrazoia, baliteke sustrato desberdinak katalizatzeke duten hautakortasun maila izatea. Zentzu honetan,

zitokromo P450-aren familiak, gune aktibo lau eta handiagoa izateak, aktibitate katalitiko zabalagoarekin erlazionatzen da, sustrato mota ugariagoen sarrera eta oxidazioa burutzeko gai baitira, euren artean xenomolekulena. Jmj-C dominioa duten lisina desmetilasek ordea, selektibitate maila handiagoa dute euren funtzioa betetzerako orduan. Badirudi, N-metilazio/desmetilazio bezain garrantzizkoa den markadore epigenetikoa hau, geneen transkripzioaren aktibazio edo errepresioa burutzeko behar diren prozesu nahitaez xeheekin erlazionatzen dela.

GEHIGARRIAK

Chemical Biology

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

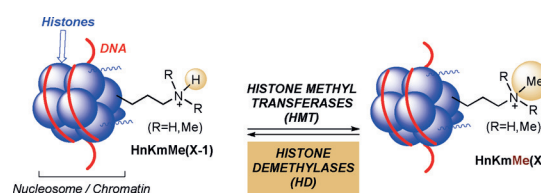
Nerea Alberro,^[a] Miquel Torrent-Sucarrat,^[a, b, c] Iosune Arrastia,^[b] Ana Arrieta,^[a] and Fernando P. Cossío*^[a, b]

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 $[(\text{AcO})_2(\text{imidazole})_2(\text{H}_2\text{O})\text{Fe}=\text{O}]$ 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 ($\text{HnKmMeX} \rightarrow \text{HnKmMe(X+1)}$) are known as histone methyl transferases.^[8] The corresponding eraser proteins that catalyze the demethylation reaction ($\text{HnKmMeX} \rightarrow \text{HnKmMe(X-1)}$) 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)

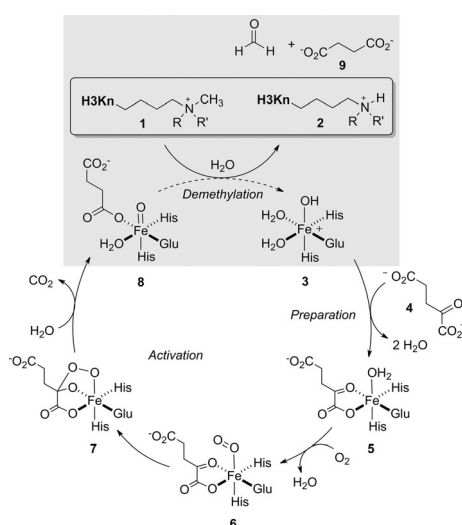
[c] Dr. M. Torrent-Sucarrat
Ikerbasque, Basque Foundation for Science
María Díaz de Haro 3, 6 floor, 48013 Bilbao (Spain)

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]

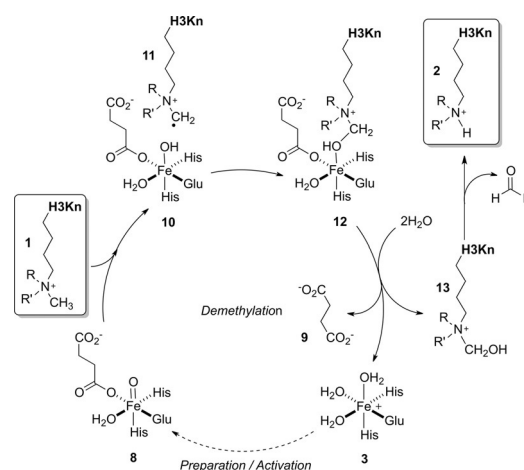
The accepted reaction mechanism for JMJC-containing histone demethylases is depicted in Scheme 2^[15] and closely resembles similar catalytic cycles proposed for other demethylation processes in non-heme iron-containing enzymes.^[16] Thus, the enzyme active site at its resting state contains a Fe^{II} 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 hydroxymethyl 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 triqua 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]

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

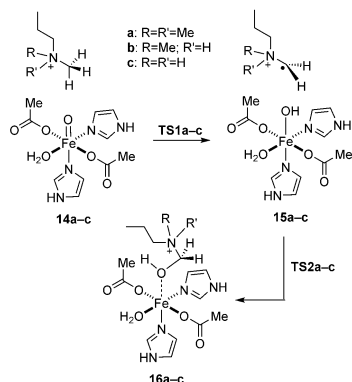
in which $H(i)_{SOC}$ is the spin-orbit coupling (SOC) derived from off-diagonal Hamiltonian matrix elements between the triplet and quintet states at the corresponding MECP. This term was calculated using the MolSOC program^[50] on previously optimized UB3LYP/6-31G(d,p) geometry of the MECP under study. 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,

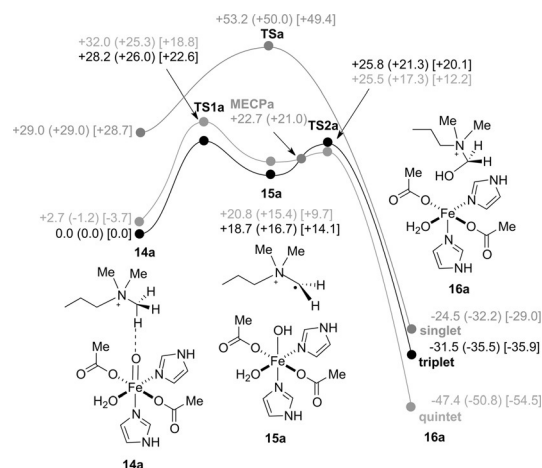


Figure 1. Reaction profiles for the transformation of **14a** into **16a** at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$. Relative energies refer to **14a** at the triplet state and are given in kcal mol^{-1} . Minimum energy crossing point **MECPa** is also indicated. 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]

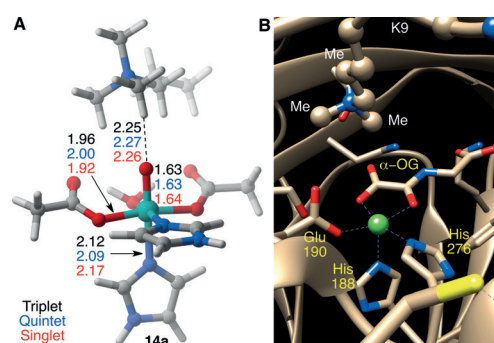


Figure 2. A) Fully optimized UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) geometry of complex **14a** at the triplet state. Bond distances (in Å) at the quintet, triplet, and singlet states are also given. B) X-ray diffraction analysis data of the active site of human histone demethylase JMJD2A (pdb code: 2q8c) with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

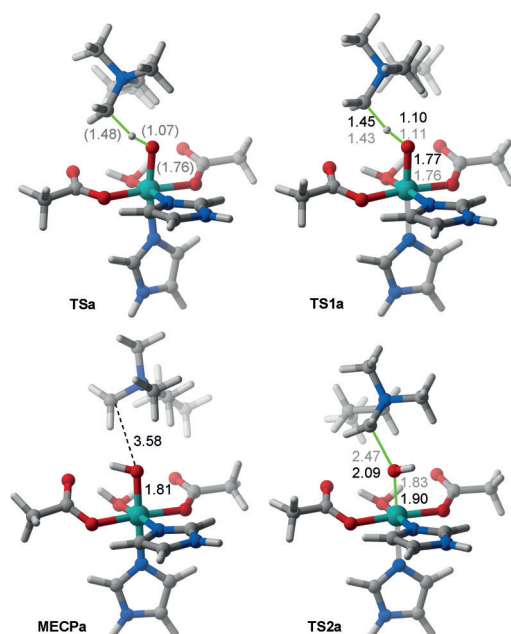


Figure 3. Fully optimized UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) geometries of transition structures **TSa**, **TS1a**, and **TS2a**, as well as minimum-energy crossing point **MECPa**. Geometric data of triplet, quintet, and singlet states are represented in black, light grey, and dark grey (in parenthesis), 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

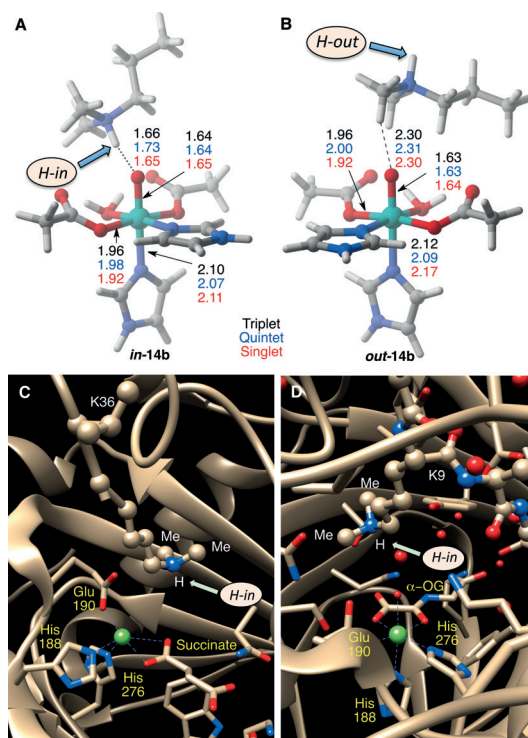


Figure 4. Fully optimized UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) geometries of complexes *in-14b* (A) and *out-14b* (B) at the triplet state. Bond distances (in Å) at the quintet, triplet, and singlet states are also given. C) X-ray diffraction analysis data of the active site of human histone demethylase JMJD2A (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

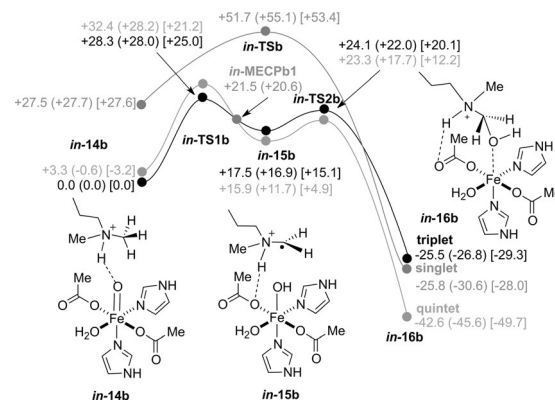


Figure 5. Reaction profiles for the transformation of *in-14b* into *in-16b* at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$. Relative energies refer to *in-14b* at the triplet state and are given in kcal mol⁻¹. Minimum energy crossing point *in-MECPb1* is also indicated.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

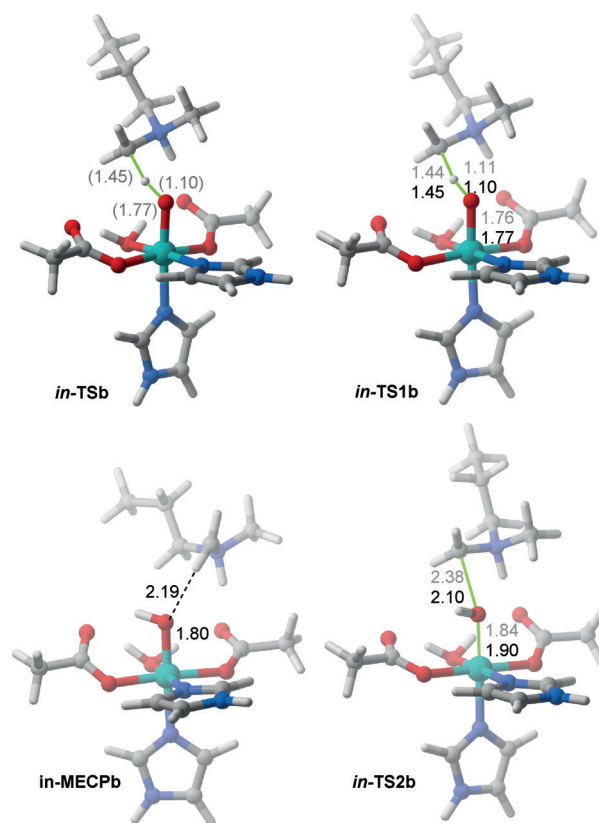
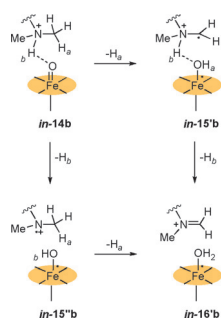


Figure 6. Fully optimized UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) geometries of transition structures *in-TSb*, *in-TS1b*, and *in-TS2b*, as well as the minimum energy crossing point *in-MECPb1*. Geometric data of triplet, quintet, and singlet states are represented in black, light grey, and dark grey (in parenthesis), 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.

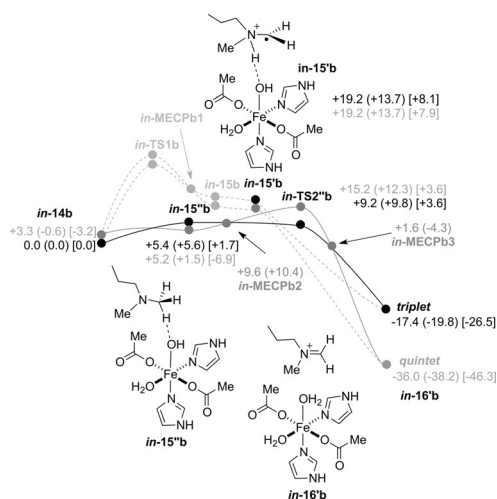


Figure 7. Reaction profiles for the transformation of *in-14b* into iminium species *in-16'b* at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$. Relative energies refer to *in-14b* at the triplet state and are given in kcal mol⁻¹. Minimum-energy crossing points *in-MECPb2* 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.

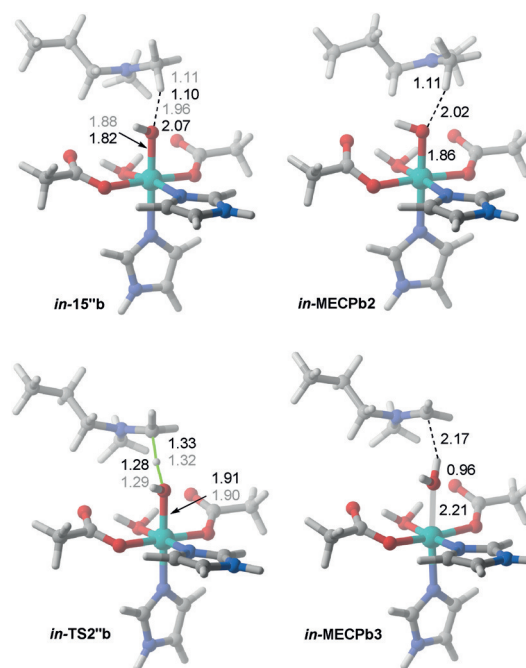


Figure 8. Fully optimized UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) geometries of intermediate *in-15'b*, minimum-energy crossing points *in-MECPb2* and *in-MECPb3*, and transition structure *in-TS2''b*. Geometric data of triplet and quintet states are represented in black and light grey, respectively. Bond distances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

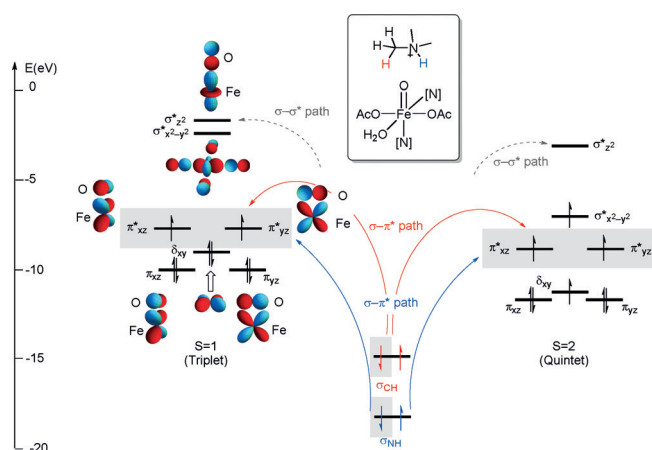


Figure 9. Orbital interactions between localized C–H and N–H bonds and the Fe^{IV}=O moiety of JMJD enzymes at triplet and quintet states.

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

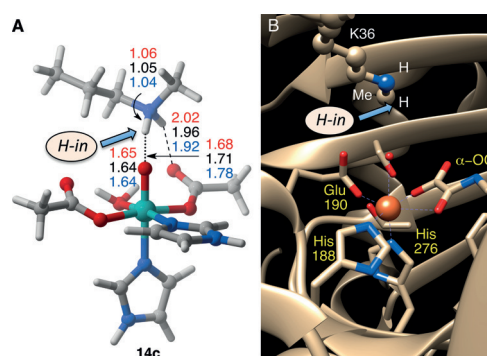


Figure 10. A) Fully optimized UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) geometry of complex **14c** at the triplet state. Bond distances (in Å) at the quintet (blue) and singlet (red) states are also given. B) X-ray diffraction analysis data of the active site of human histone demethylase JMJD2A (pdb code: 2pxj)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

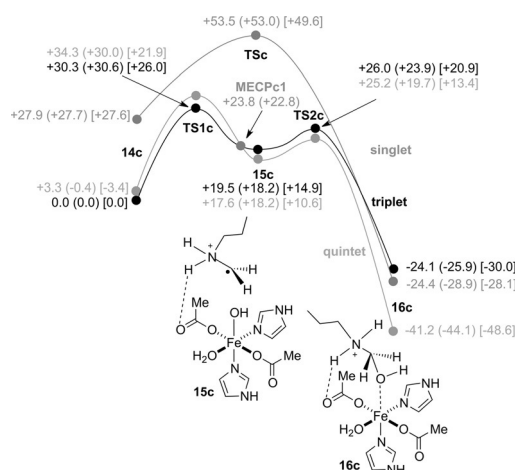


Figure 11. Reaction profiles for the transformation of monomethylated complex **14c** into **16c** at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon=78.39$. Relative energies refer to **14c** at the triplet state and are given in kcal mol⁻¹. Minimum-energy crossing point **MECPC1** 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.

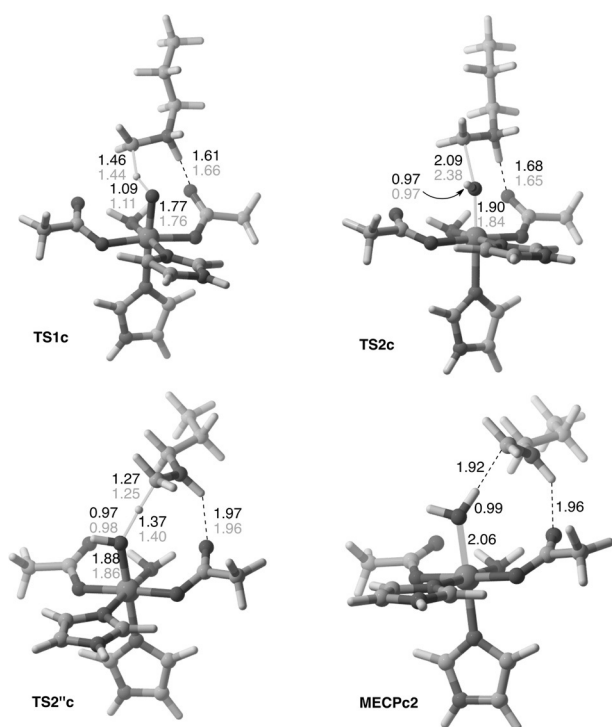


Figure 12. Fully optimized UB3LYP/6-31G(d,p)&LanL2DZ(Fe) geometries of transition structures **TS1c**, **TS2c**, and **TS2''c** and minimum-energy crossing point **MECPC2**. Geometric data of triplet and quintet states are represented in black and light grey, respectively. Bond distances are given in 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

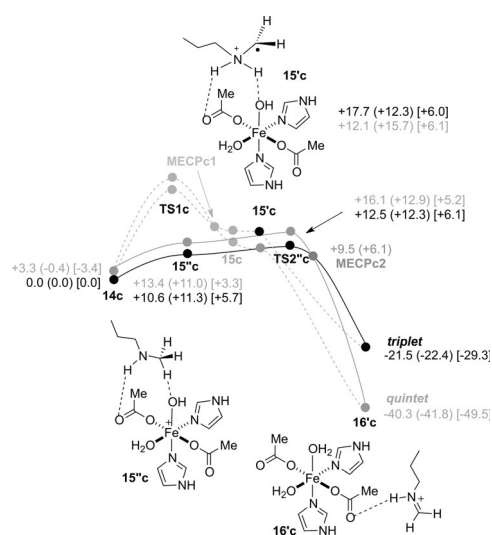


Figure 13. Reaction profiles for the transformation of **14c** into iminium species **16'c** at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$. Relative energies refer to **14c** at the triplet state and are given in kcal mol⁻¹. Minimum-energy crossing point **MECPC2** is 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

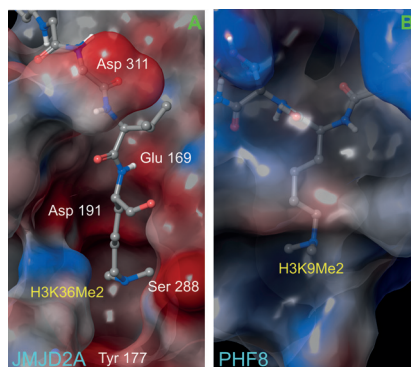


Figure 14. Electrostatic surfaces of the cavities associated with the binding of H3K36Me2 with JMJD2A (A, pdb code 2q8d) and H3K9Me2 with PHF8 (B, pdb code 3k3n). Negative and positive charges are represented in red and blue, respectively.

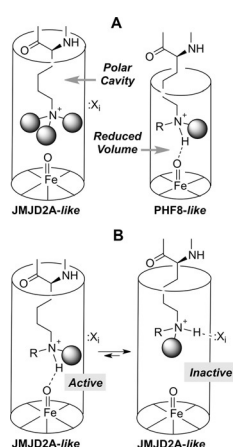


Figure 15. A) Schematic representation of the size and polarity of trimethyl selective (left) and di- and monomethyl selective histone demethylases (right). B) Schematic representation of the active and inactive complexes of dimethylated ($R=Me$) and monomethylated ($R=H$) substrates in a polar cavity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

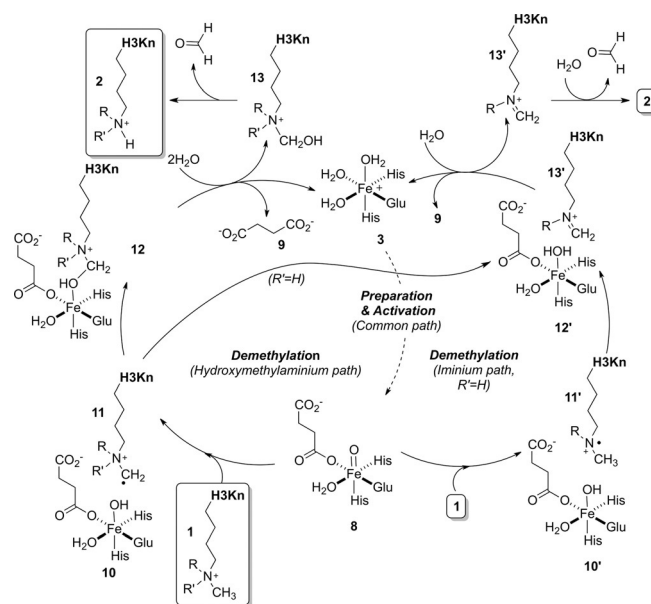
In this work we have performed a systematic search of the possible reaction mechanisms associated with the demethylation of lysine residues catalyzed by histone demethylases con-

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 MECP 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. Wondimagegn, A. Rauk, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 10301–10310.
- [34] T. Wondimagegn, 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^{*,†,‡,§}

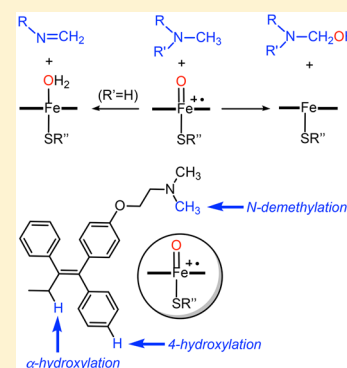
[†]Department of Organic Chemistry I, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Centro de Innovación en Química Avanzada (ORFEO-CINQA), Manuel Lardizabal Ibilbidea 3, 20018 San Sebastián/Donostia, Spain

[‡]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

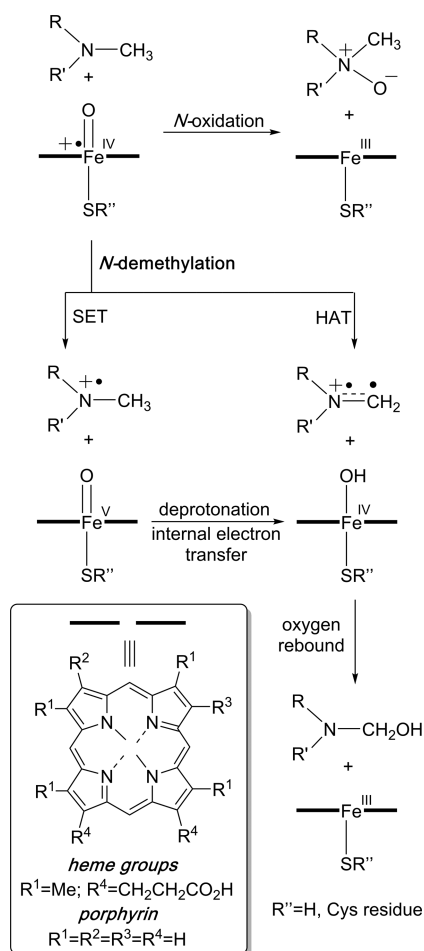
chemistry has become a powerful tool to measure and understand the Cpd I reactivity.^{8,9,15–23}

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

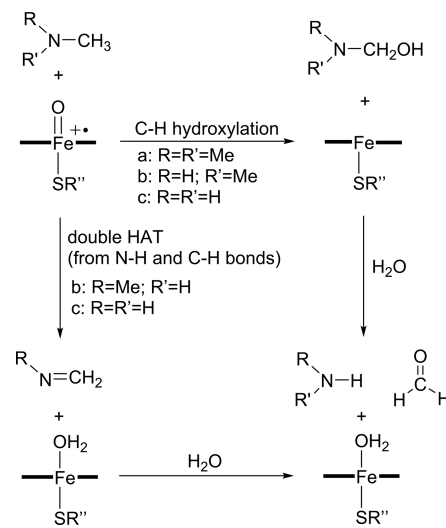
^aThe different heme groups and cysteine residues present in cytochromes, as well as the porphyrin and bisulfide computational analogs, are indicated. SET: single electron transfer. HAT: hydrogen atom transfer.

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

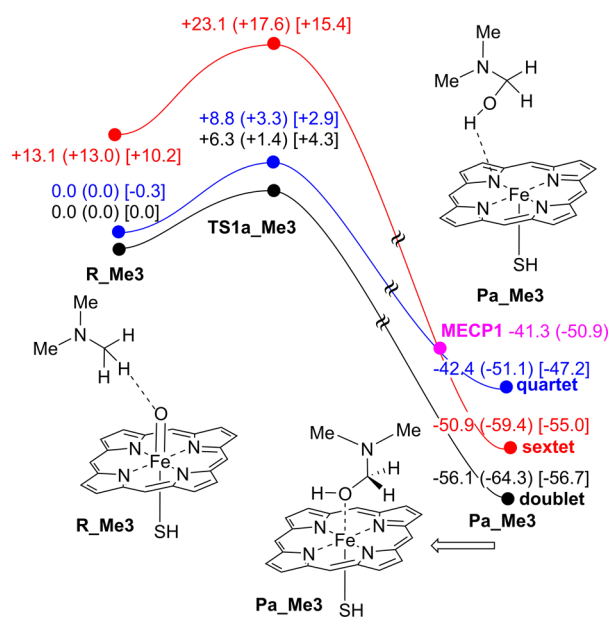


Figure 1. Potential energy landscapes of trimethylamine hydroxylation by Cpd I at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$ in doublet, quartet, and sextet states. Relative energies refer to **R_Me3** at the doublet state, and their values are given in kcal/mol. The minimum 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.

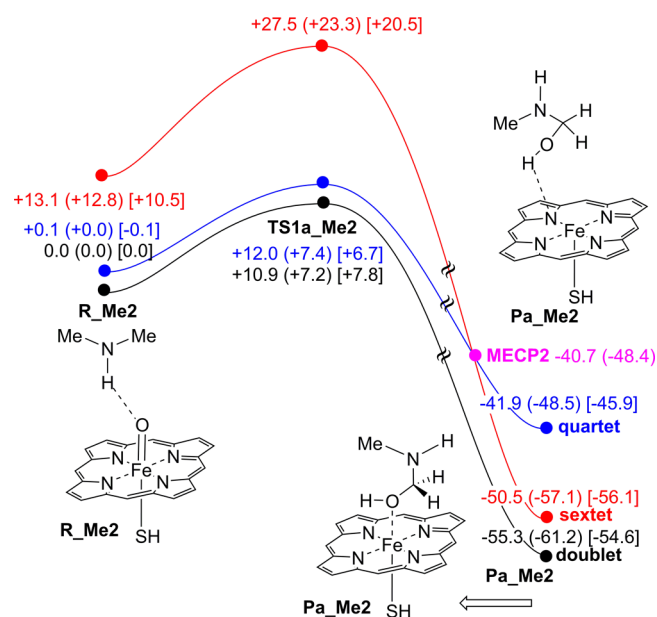


Figure 3. Potential energy landscapes of dimethylamine hydroxylation by Cpd I the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$ in doublet, quartet and sextet states. Relative energies refer to **R_Me2** at the doublet state, and their values are given in kcal/mol. Minimum energy 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.

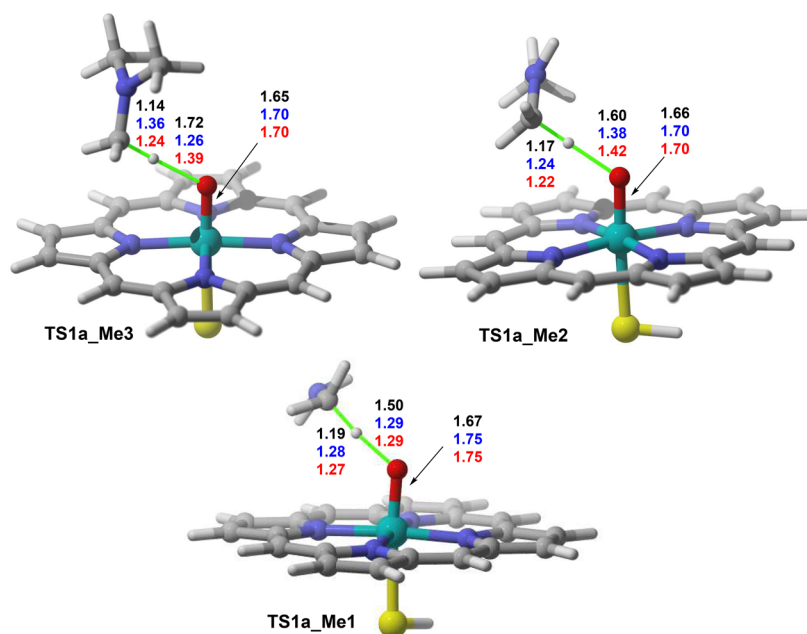


Figure 2. Fully optimized UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz geometries of transition structures **TS1a_Me3**, **TS1a_Me2**, and **TS1a_Me1**. Geometric data of doublet, quartet, and sextet spin states are represented in black, blue, and red, respectively. Ball and stick representations correspond to the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

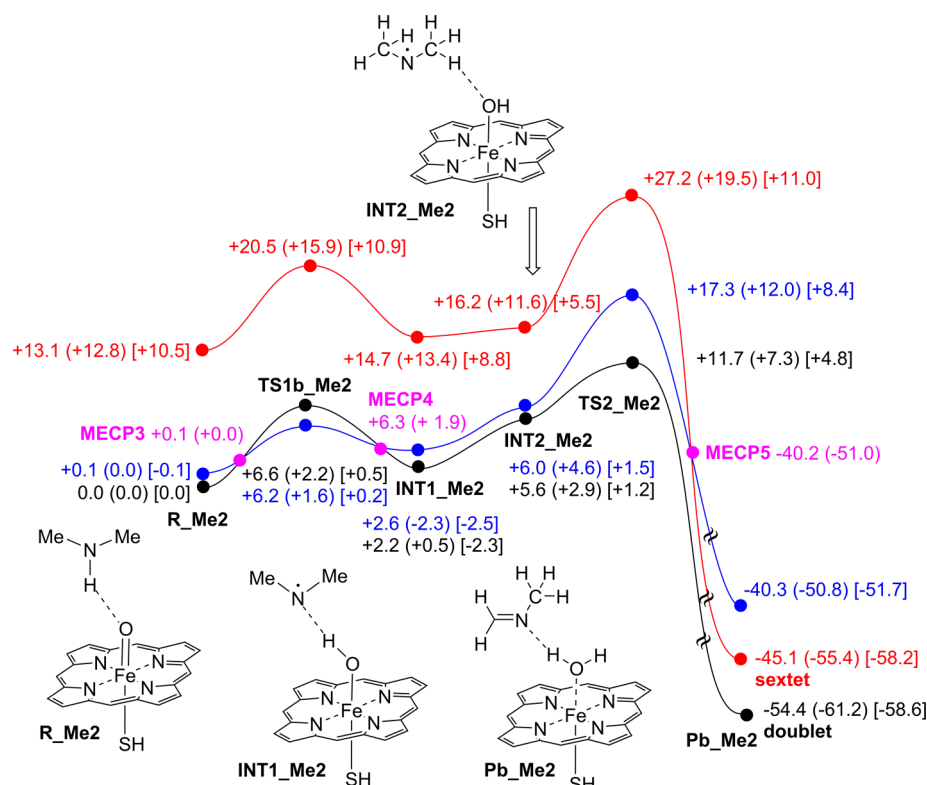


Figure 4. Potential energy landscapes of the double H-abstraction (from N–H and C–H bonds) of dimethylamine by Cpd I at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2DZ level of theory with $\epsilon = 78.39$ in doublet, quartet, and sextet states. Relative energies refer to R_Me2 at the doublet state, and their values 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

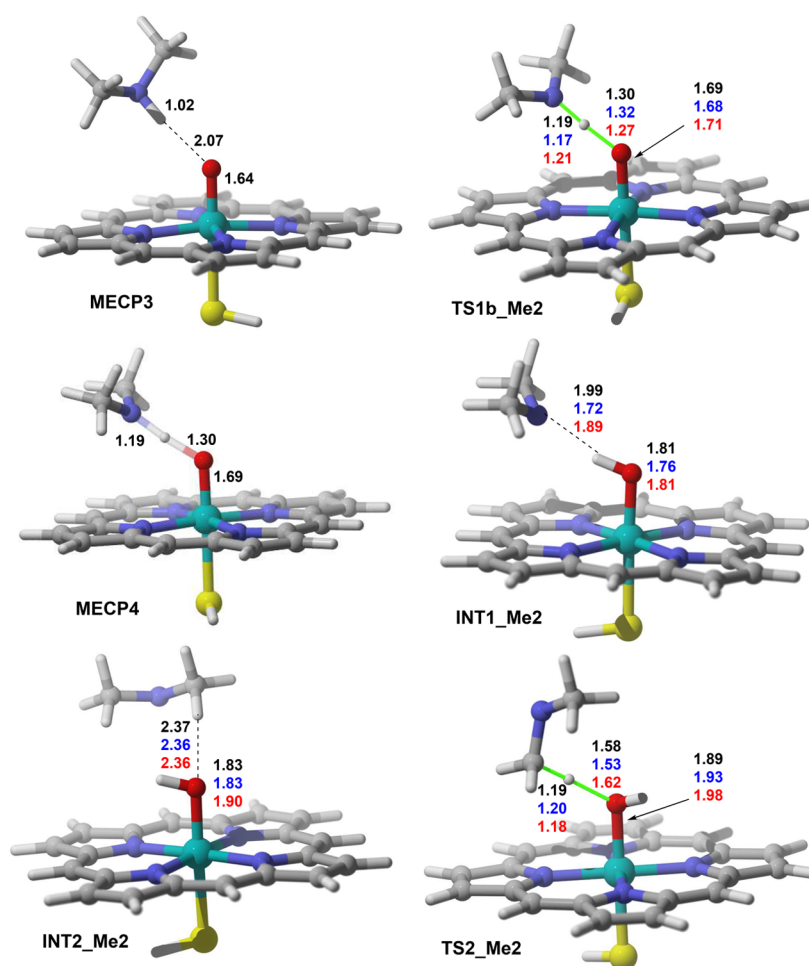


Figure 5. Fully optimized UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz geometries of transition structures **MECP3**, **TS1b_Me2**, **MECP4**, **INT1_Me2**, **INT2_Me2**, and **TS2_Me2**. Geometric data of doublet, quartet, and sextet spin states are represented in black, blue, and red, respectively. Ball and stick 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

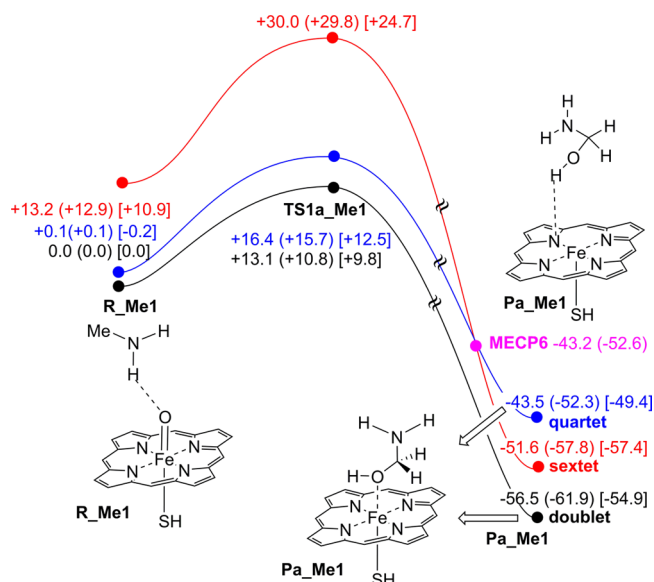


Figure 6. Potential energy landscapes of methylamine hydroxylation by Cpd I at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$ in doublet, quartet, and sextet states. Relative energies refer to **R_Me1** at the doublet state, and their values are given in kcal/mol. Minimum 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

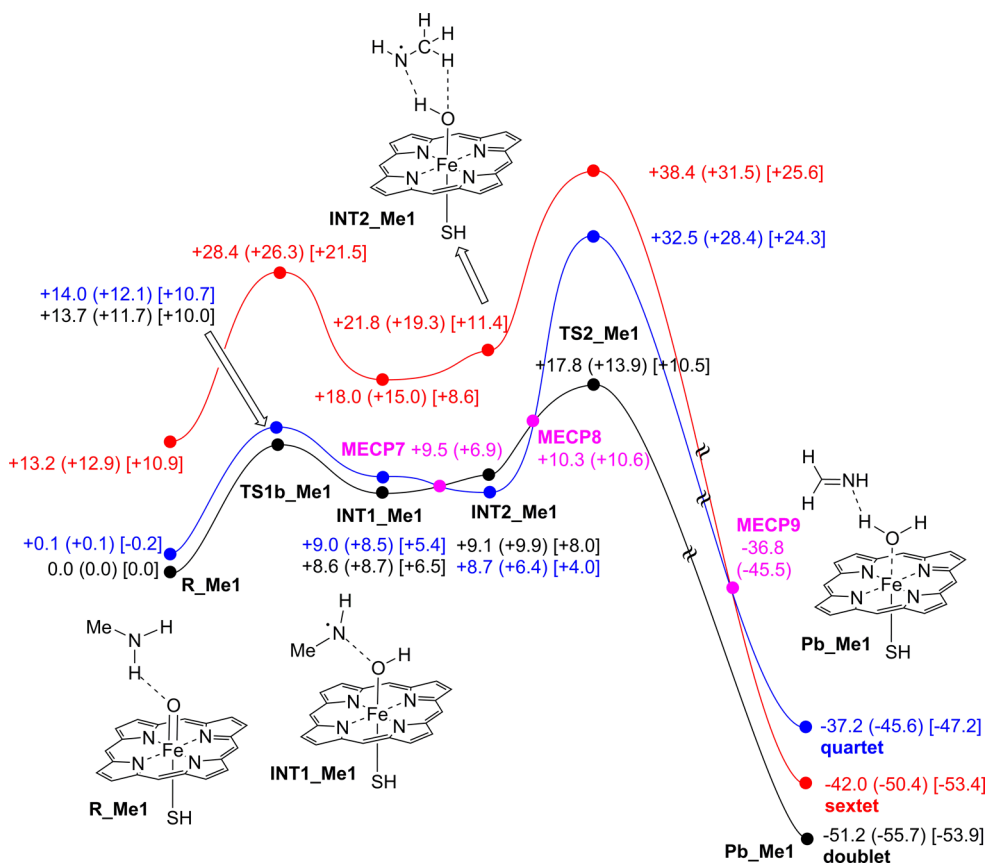


Figure 7. Potential energy landscapes of the double H-abstraction (from N–H and C–H bonds) of methylamine by Cpd I at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz level of theory with $\epsilon = 78.39$ in doublet, quartet, and sextet states. Relative energies refer to **R_Me1** at the doublet state and their 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

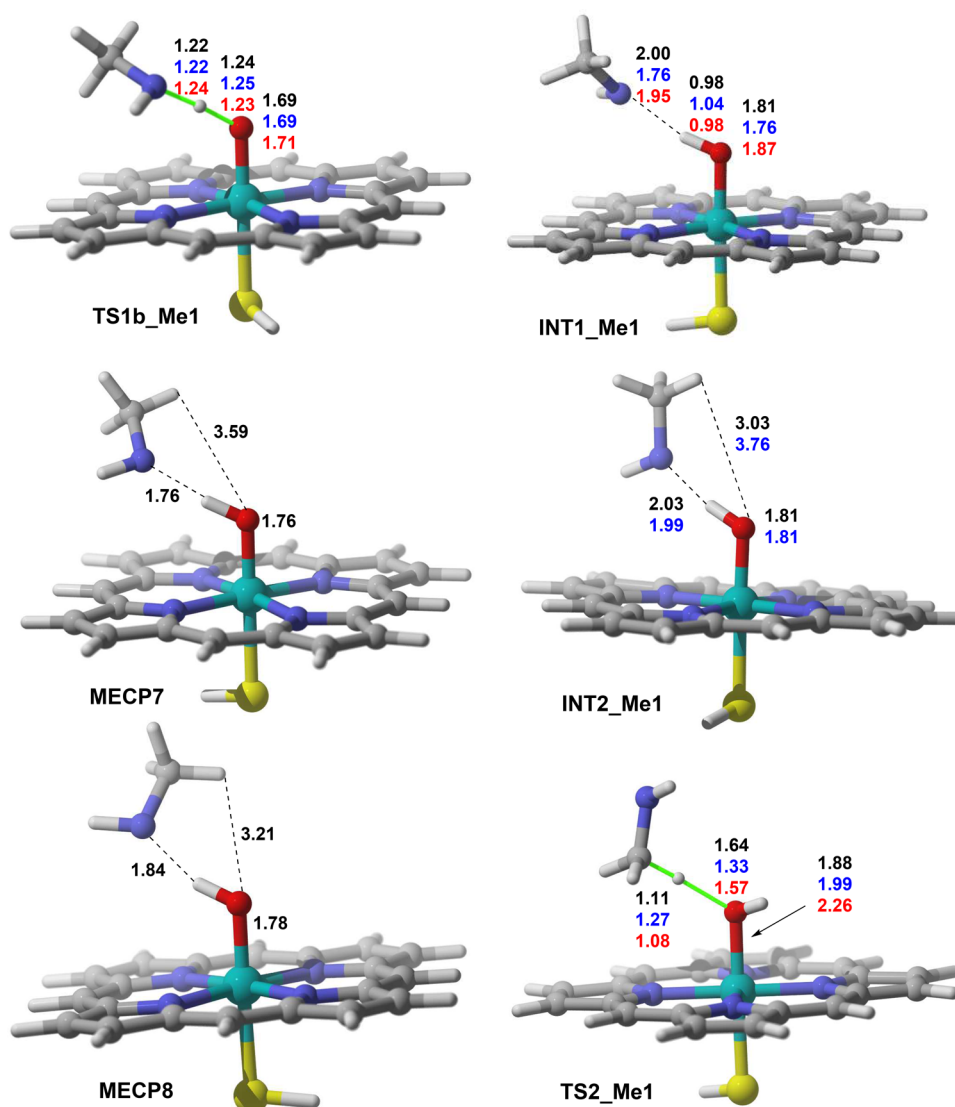


Figure 8. Fully optimized UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz geometries of transition structures **TS1b_Me1**, **INT1_Me1**, **MECP7**, **INT2_Me1**, **MECP8**, and **TS2_Me1**. Geometric data of doublet, quartet, and sextet spin states are represented in black, blue, and red, respectively. In the sextet 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

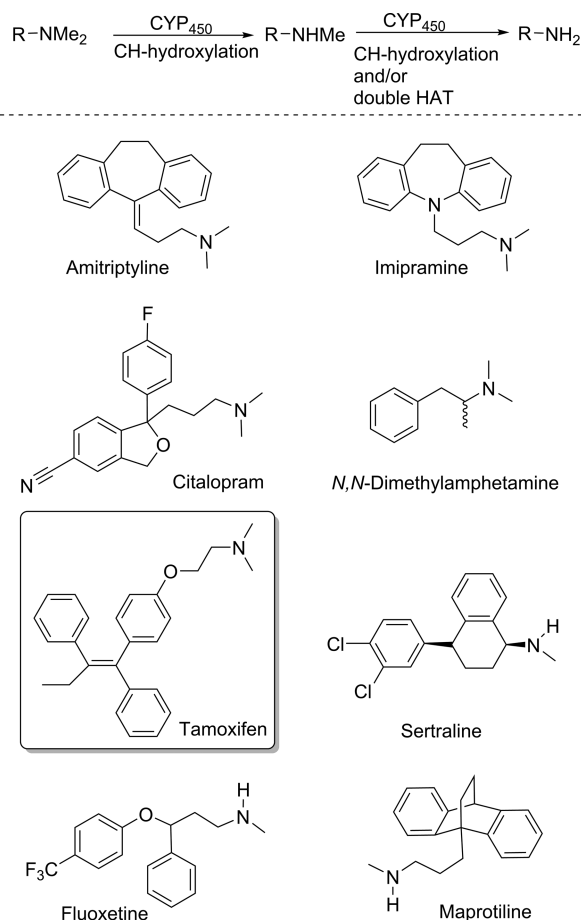


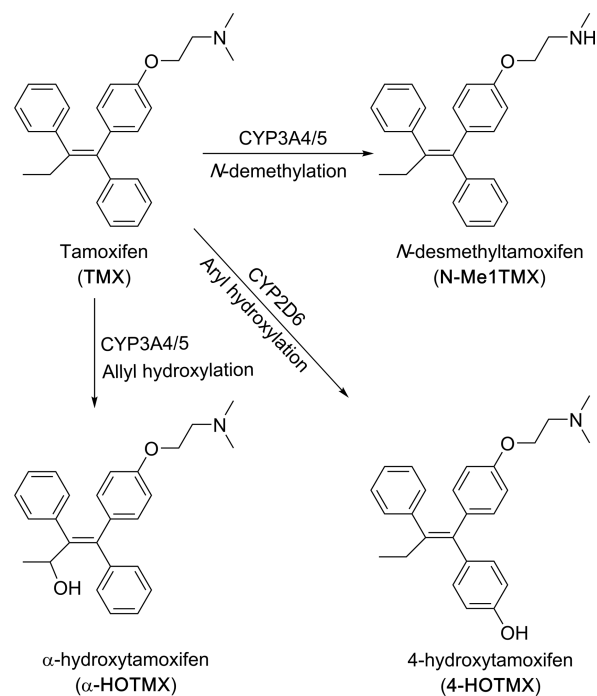
Table 1 collects the relative energy values from the reaction pathways of these three primary routes. Figure 11 displays the optimized geometries of the different transition structures with their most relevant geometrical parameters. On the basis of our previous results, the potential energy landscapes 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 $\text{TS1}_{\text{N-dem}}$ and $\text{TS1}_{\alpha\text{-hyd}}$ structures in Figure 11. The geometric features of $\text{TS1}_{\text{N-dem}}$ 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 $\text{TS1}_{\alpha\text{-hyd}}$ geometry (1.24 Å) than in $\text{TS1}_{\text{N-dem}}$ (1.17 Å).

In the 4-hydroxylation reaction mechanism, two transition states were found, $\text{TS1}_{4\text{-hyd}}$ and $\text{TS2}_{4\text{-hyd}}$, with free energy barriers of 19.0 and 4.5 kcal/mol, respectively. $\text{TS1}_{4\text{-hyd}}$ 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 $\text{TS2}_{4\text{-hyd}}$ 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 NMe₂ 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

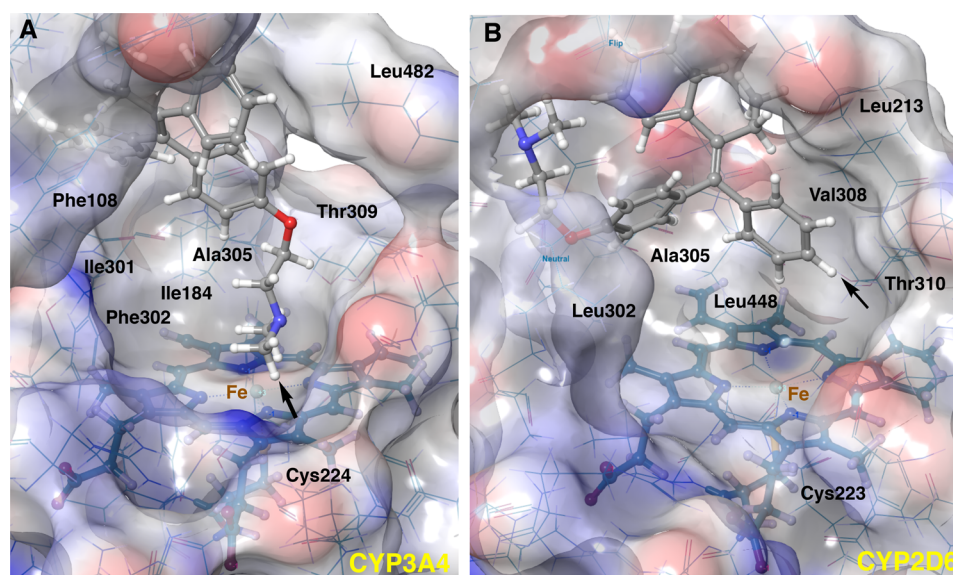


Figure 9. Less energetic poses of tamoxifen docked to CYP3A4 (A) and CYP2D6 (B). The arrows point to the C–H bonds of tamoxifen that are closer to the Fe–heme system. In the case of CYP3A4 (A) the orientation of the substrate points to a N-demethylation reaction, whereas in the case of CYP2D6 (B) the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

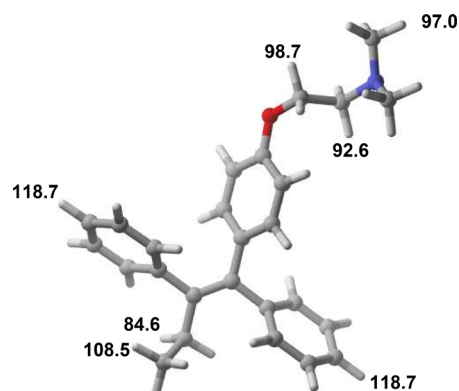


Figure 10. Bond dissociation energy strengths for some selected C–H bonds of tamoxifen evaluated at the UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p) level of theory. All values are given in kcal/mol.

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.

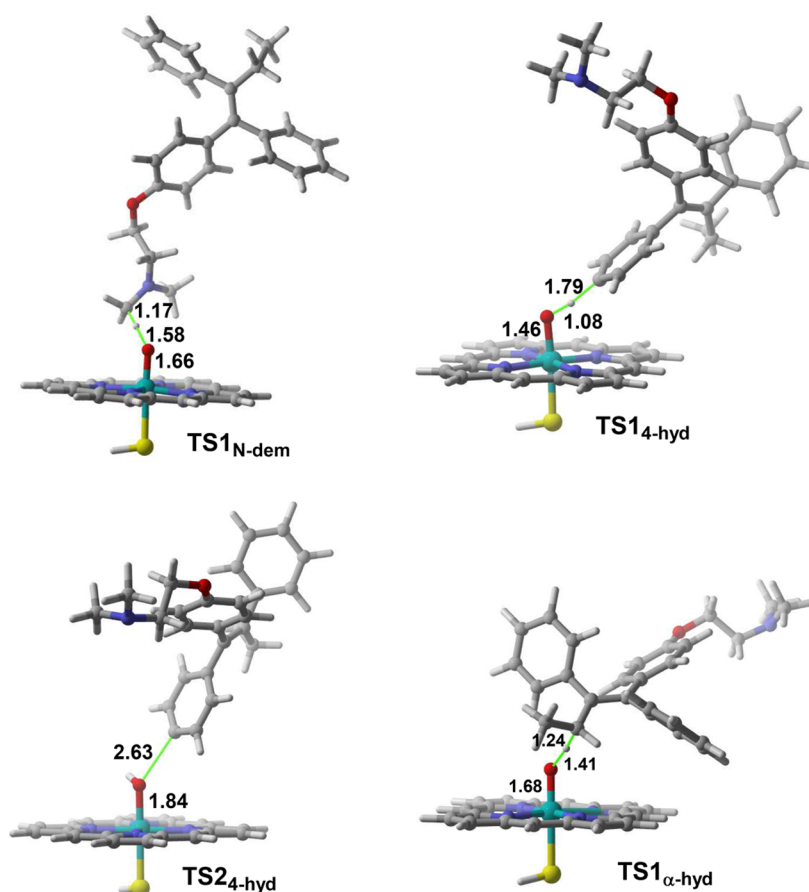


Figure 11. Fully optimized UB3LYP(PCM)/6-31G(d,p)&LanL2dz geometries of transition structures TS1_{N-dem}, TS1_{4-hyd}, TS2_{4-hyd}, and TS1_{α-hyd} in doublet spin state. Bond distances are given in Å.

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 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 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.; Chuanpravit, 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.; Moënne-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*, S648–S652.
- (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 Dioxxygenase (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 Dioxxygenase 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. Dioxxygen 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 Peroxxygenase: 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.