



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Químicas-Programa de Doctorado en Ciencias con mención en
Química

**Estudio de la Catálisis Enzimática de Catecol
O-Metiltransferasa a través de Simulaciones de Dinámica
Molecular**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en
Química

David Adrián Sáez San Martín
Concepción-Chile
Año 2017

Profesor Guía: Dr. Eduardo Delgado Ramírez
Profesor Co-Guía: Dr. Esteban Vöhringer-Martinez
Dpto. de Físico Química, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad de Concepción



*«An expert is a man who has made
all the mistakes that can be made
in a very narrow field.»*
Niels Bohr

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a Dios la posibilidad que me dio de realizar esta tesis doctoral. También deseo expresar gratitud a mis padres, Ana María y Víctor, por su temprano estímulo a seguir el camino de la ciencia, así como por su incondicional y constante apoyo en todo período de mi vida. Agradezco asimismo a mi compañera Fabiola y nuestro hijo Martín, quienes me han ayudado, esperado y comprendido en los momentos difíciles, con bondad y paciencia. Sin ellos (incluyendo a nuestro pequeño Felipe) nada de esto habría sido posible.

Quisiera también saludar a la Universidad, mi segundo hogar desde los años de pregrado, y agradecer a mis profesores, en especial a mi guía doctoral, Esteban Vöhringer-Martinez, quien ha sido siempre una luz y un sostén en el a veces sinuoso camino de la ciencia.

Incluyo también en mis agradecimientos a mis compañeros y amigos científicos: Pablo, Maximiliano, Alejandro, Óscar, Danilo, Javier y Aharón, con quienes he compartido varias temporadas de risas, almuerzos y filosofía.

Por último, pero no menos importante, quisiera agradecer a Conicyt y a la gente de mi país, por darme la oportunidad de iniciar una carrera en el ámbito de la investigación.

Tabla de Contenido

Lista de Figuras	vi
Lista de Tablas	ix
Resumen	x
1. Introducción	1
1.1. Reacciones de transmetilación	1
1.2. Catecol O-Metiltransferasa	2
1.3. Estructura del sitio activo de COMT	3
1.4. Características cinéticas de COMT	5
1.5. Antecedentes sobre la catálisis efectuada por COMT	6
Hipótesis	11
Objetivos	11
2. Métodos	12
2.1. Métodos de estructura electrónica	12
2.1.1. Métodos <i>ab initio</i>	12
2.1.2. Teoría del funcional de la densidad	13
2.1.3. Métodos semiempíricos	14
2.2. Métodos de mecánica molecular	16
2.3. Métodos QM/MM	18
2.4. Dinámica molecular y energía libre	19
2.4.1. Termodinámica estadística	20
2.4.2. Dinámica molecular	23
2.4.3. Coordenada de reacción	25
2.4.4. Camino de mínima energía libre	26
2.4.5. Método de la cuerda	27
2.5. <i>Umbrella Integration</i> y Fuerza de Reacción Media	28
2.6. Configuración del sistema reactivo	30

3. Resultados	32
3.1. Derivación de un campo de fuerzas para <i>S</i> -adenosilmetionina	32
3.1.1. Parametrización del ángulo diedro C-S-C-C	33
3.1.2. Cálculo de cargas atómicas	39
3.1.3. Estabilidad en dinámica molecular de los parámetros derivados	42
3.1.4. Conclusión	44
3.2. Efecto del entorno sobre la transferencia de metilo en un sistema modelo.	45
3.2.1. Energética de la reacción	46
3.2.2. Mecanismo de reacción	48
3.2.3. Simulaciones de dinámica molecular en agua	53
3.2.4. Conclusión	57
3.3. Transferencia de metilo a dopamina en COMT, Y68A y entorno acuoso	59
3.3.1. Parámetros de la simulación	59
3.3.2. Perfil de energía libre y fuerza de reacción media	62
3.3.3. Cambios estructurales que contribuyen a W_1	64
3.3.4. Cambios electrónicos y su contribución a W_2	70
3.3.5. Conclusión	74
3.4. Influencia del tiempo de simulación sobre la energética de la reacción	75
3.4.1. Preparación del sistema de reacción	75
3.4.2. Comportamiento de la energía libre en función del tiempo	76
4. Conclusiones	80
4.1. Perspectivas futuras	81
Bibliografía	83
A. Anexo: Derivación de un campo de fuerzas para S-Adenosilmetionina	96
B. Anexo: Energética del sistema Trimetilsulfonio + Fenolato en diferentes ambientes.	99

Lista de Figuras

1-1.	Estructura del cofactor <i>S</i> -adenosilmetionina.	2
1-2.	Topología de la metiltransferasa dependiente de SAM Catecol O-metiltransferasa de <i>H. sapiens</i>	2
1-3.	Reacción de inactivación de moléculas catecólicas catalizada por COMT.	3
1-4.	Tipos de COMT presentes en roedores y humanos junto a algunas de sus características.	4
1-5.	Modelo del sitio activo de la enzima COMT.	5
1-6.	Origen del 1°-KIE.	7
1-7.	Origen del 2°-KIE	8
2-1.	Acoplamiento entre los subsistemas QM y MM en el esquema aditivo	20
2-2.	Representación esquemática del camino de mínima energía libre.	27
2-3.	Representación esquemática de la evolución de los nodos en el método de la cuerda.	28
2-4.	<i>Umbrella integration</i> y Fuerza de reacción media	29
2-5.	Representación esquemática de la configuración del sitio activo que se utilizó en este trabajo.	31
3-1.	Representación de SAM con los átomos etiquetados en el orden usado a lo largo de este capítulo	33
3-2.	Sistema modelo empleado para derivar los parámetros de enlace del grupo sulfonio.	34
3-3.	Comparación de la energía potencial como función del ángulo diedro CT-CT-S-CT para el sistema modelo	35
3-4.	Distancias entre H-25 y el grupo metilo sulfónico a diferentes tiempos de simulación.	36
3-5.	Distribución de distancias entre los protones del grupo metilo y los protones sobre el carbono beta	37
3-6.	Conformaciones <i>syn</i> y <i>anti</i> que puede adoptar el nucleósido adenosina	38
3-7.	Distribución de distancia entre H42-H46 y ángulo diedro O26-C27-N29-C41	39
3-8.	Cargas atómicas HI de SAM	40

3-9. Superposición de estructuras representativas de las simulaciones de dinámica molecular y cristalina	44
3-10. RMSD de las posiciones atómicas de SAM en simulaciones de dinámica molecular	44
3-11. Esquema de la reacción entre fenolato y trimetilsulfonio para formar dimetilsulfuro y anisol	45
3-12. Esquema que muestra la energía potencial relativa de los reactivos libres, el precomplejo, estado de transición, complejo de productos y finalmente productos libres en tres entornos	46
3-13. Energía potencial (superior) y fuerza de reacción (inferior) a lo largo de la coordenada intrínseca de reacción para la transferencia de metilo entre trimetilsulfonio y fenolato.	50
3-14. Flujo electrónico de reacción (superior) y derivada del orden de enlace de Wiberg (inferior) para el enlace O-C (línea sólida) y el enlace S-C (línea discontinua) a lo largo de la coordenada intrínseca de reacción .	52
3-15. Suma de las cargas atómicas de trimetilsulfonio como función de la coordenada intrínseca de reacción	53
3-16. Energía libre (superior) y fuerza de reacción media (inferior) a temperatura constante (T=298K) para la reacción de transmetilación entre trimetilsulfonio y fenolato como función de la coordenada de reacción	55
3-17. Carga total obtenida como la suma de las cargas atómicas de Hirshfeld-I pertenecientes a la molécula de trimetilsulfonio (azul) y carga del grupo metilo transferido (rojo).	56
3-18. Representación esquemática de la configuración del sitio activo que se utilizó en este trabajo.	60
3-19. Desviación de la cuerda para los sistemas estudiados	62
3-20. Perfil de energía libre (superior) y fuerza de reacción media (inferior) para la reacción de transferencia de metilo en los diferentes entornos .	64
3-21. Evolución de la distancia C-O (línea continua) y la distancia S-C (línea discontinua) a lo largo de la coordenada de reacción para los entornos WT (rojo), Y68A (verde) y AQ (azul).	65
3-22. Evolución del ángulo SCO a lo largo de la coordenada de reacción para los entornos testeados	66
3-23. Cargas atómicas para átomos implicados en la transferencia de metilo	67
3-24. Perfil de energía libre para cada coordenada colectiva	69
3-25. Perfil de fuerza de reacción media (MRF) para cada coordenada colectiva	72

3-26. Distancia mínima promedio a lo largo de la coordenada de reacción entre los hidrógenos presentes en el grupo metilo y el átomo de oxígeno del esqueleto proteico en Asp141	73
3-27. Ilustración de las interacciones no-covalentes presentes en el estado de transición al interior de la cavidad enzimática de los sistemas WT e Y68A.	74
3-28. Perfil de energía libre para la reacción en WT	77
3-29. Perfil de energía libre para la reacción en WT con un tiempo total de simulación de 500 ps por valor de coordenada de reacción	78
3-30. Comportamiento promedio del ángulo SCO para 500 ps de simulación QM/MM (izquierda) y distancia mínima promedio entre el átomo de oxígeno en el esqueleto de Asp141 y los protones metílicos de SAM (derecha)	79



Lista de Tablas

1-1. Valores experimentales de 2°-KIE medidos en diferentes sistemas.	8
2-1. Expresiones de la energía en un campo de fuerzas de mecánica molecular	18
3-1. Comparación de las distancias NOE proton-proton experimentales en Å	36
3-2. RMSD de todas las cargas atómicas en cada conformación calculado con respecto a las cargas obtenidas para la estructura de inicial	41
3-3. Energía potencial de precomplejo, estado de transición y postcomplejo, además de los productos aislados	47
3-4. Energía de activación, energía de reacción y contribuciones W_{1-4} (kJ mol ⁻¹) en diferentes entornos de solvente	50
3-5. Puntos de la coordenada de reacción donde se sitúan el mínimo y el máximo de la fuerza de reacción en diferentes entornos de solvente	51
3-6. Valores experimentales de E_a medidos en diferentes sistemas.	63
3-7. Energía libre asociada a cada región definida por la MRF y energía libre de activación calculada para la reacción bajo estudio en tres ambientes diferentes.	64
3-8. Energía libre asociada a W_1 para cada coordenada colectiva	68
3-9. Energía libre asociada a W_2 para cada coordenada colectiva	70
3-10. Contribuciones de energía libre en función del tiempo de simulación en la enzima WT.	77
3-11. Contribuciones de energía libre a lo largo del tiempo de simulación en la mutante Y68A.	78
A-1. Cargas atómicas obtenidas con los métodos RESP, HI y DH-HI	97
A-2. Parámetros de campo de fuerzas adicionales usados junto los parámetros clásicos de adenosina y metionina para describir a SAM	98
B-1. Energía Hartree-Fock para sistema TMS-Fenolato	99
B-2. Energía libre derivada de análisis vibracional para sistema TMS-Fenolato	99
B-3. Entalpía derivada de análisis vibracional para sistema TMS-Fenolato	100

Resumen

Las reacciones de transmetilación juegan un rol relevante en la química de los seres vivos, abarcando desde la modificación del ADN hasta el metabolismo de hormonas y neurotransmisores. El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia del entorno enzimático sobre la reacción de transmetilación entre *S*-adenosilmetionina y dopamina. Para ello, se utilizaron simulaciones de dinámica molecular que recrearon la reacción en una enzima nativa, en una mutante, y en un entorno acuoso no enzimático. Luego de determinar parámetros de mecánica molecular para el co-factor y métodos de estructura electrónica capaces de describir la reacción de manera adecuada se determinó en cada entorno el camino de mínima energía libre entre reactantes y productos, con la metodología QM/MM. A través de la Fuerza de Reacción Media, se evaluó la importancia que tienen los cambios estructurales y electrónicos que sufre el sistema al alcanzar el estado de transición. La variación del tiempo de simulación permitió observar posibles deficiencias en el muestreo de las conformaciones durante la reacción que pudiesen afectar el comportamiento de las diferentes contribuciones.

Los resultados indican que, considerando el costo computacional, la reacción es descrita de manera adecuada con el método semiempírico DFTB3. Se observa que un factor clave en la disminución de la barrera de activación enzimática es el aislamiento del sitio activo desde el entorno acuoso, favoreciendo una configuración electrostáticamente óptima y más rígida para acoger la transformación desde el complejo de Michaelis hasta el estado de transición. La importancia de esta etapa se visibiliza en la disminución tanto absoluta como relativa que muestra el análisis de Fuerza de Reacción Media para la contribución estructural a la energía libre, al pasar de la descripción acuosa a la enzimática. Es posible concluir que el desafío planteado a la naturaleza para disminuir la energía libre de activación fue resuelto a través de un sitio activo optimizado electrostáticamente para facilitar, en mayor medida, los rearrreglos estructurales en el paso desde el complejo reactivo al estado de transición. Los cambios estructurales aquí observados son favorecidos electrostáticamente por la enzima, y simulaciones extensas no arrojaron variaciones significativas atribuibles a grados de libertad que involucran cambios conformacionales asociados a la dinámica propia de la enzima.

1. Introducción

1.1. Reacciones de transmetilación

La metilación de sustratos tiene una importancia capital en la naturaleza. Mediante este tipo de reacciones se cumplen, entre otras, funciones de detoxificación, biosíntesis, señalización intracelular y procesamiento de ácidos nucleicos y proteínas [73, 1]. Considerando la diversidad de contextos en las que se presentan, es llamativo que ciertas características de estos procesos se mantengan conservadas [58, 76] entre los diferentes reinos y especies que habitan nuestro planeta [83, 7]. A modo de ejemplo, si bien una pequeña fracción ocurre mediante mecanismos que involucran radicales [31, 2], la gran mayoría de las reacciones de transmetilación en el ámbito biológico implican una sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2) en la cual un sustrato, actuando como nucleófilo, ataca al grupo metilo del cofactor *S*-adenosilmetionina (SAM, ver Figura 1-1). SAM es la fuente principal de grupos metilo que posee la naturaleza, siendo el segundo cofactor más utilizado después del trifosfato de adenosina (ATP), y constituye un primer punto común a las reacciones de transmetilación. Su reactividad, que supera a otros potenciales donadores como los tetrametilammonios [12, 14], se basa en la activación del grupo metilo por la presencia del azufre deficiente en electrones, lo que origina, al pasar a su forma no metilada *S*-adenosil-L-homocisteína (SAH), una diferencia de energía libre de Gibbs de $-17 \text{ kcal mol}^{-1}$. [77] Formado por 50 átomos, con una masa molar de 398.44 g/mol, SAM es sintetizado en el organismo a partir de ATP y metionina, por la enzima SAM-sintetasa.

Una segunda característica común a la mayoría de las transmetilaciones biológicas es la presencia de una estructura proteica específica para la catálisis, similar a la que se conoce como plegamiento de Rossmann [49, 76]. De esta manera, la mayoría de las metiltransferasas pertenecen al grupo *Rossmann-like fold family* (RLFF), que significa familia de plegamiento similar a Rossmann [49, 55]. Este ordenamiento estructural se ha definido como una serie de siete hojas beta empareadas entre dos grupos de hélices alfa (ver Figura 1-2), y ha sido optimizado evolutivamente para la unión de nucleótidos. Si bien las diferentes metiltransferasas dependientes de SAM muestran una gran homología espacial, la similitud de sus secuencias no necesariamente es alta [77].

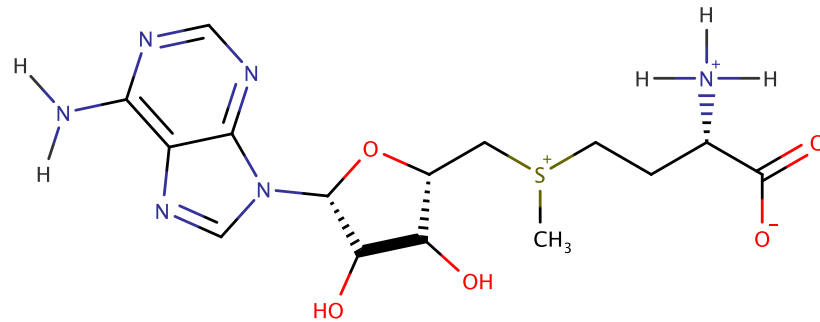


Figura 1-1.: Estructura del cofactor *S*-adenosilmetionina. Fuente: Elaboración propia.

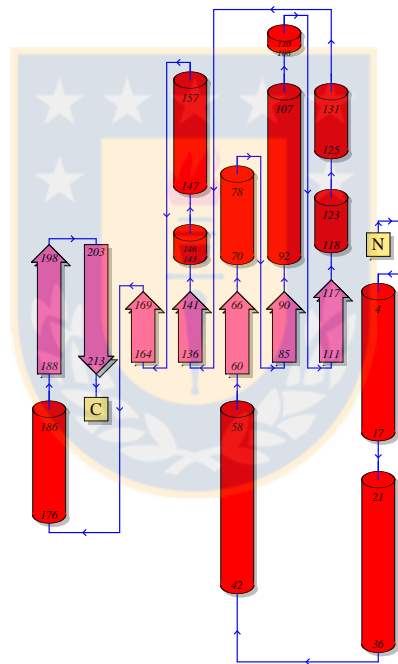


Figura 1-2.: Topología de la metiltransferasa dependiente de SAM Catecol O-metiltransferasa de *H. sapiens*. Los cilindros rojos muestran las zonas plegadas en forma de hélice α . Las flechas indican la presencia de hojas β . Fuente: Elaboración propia.

1.2. Catecol O-Metiltransferasa

Catecol O-Metiltransferasa (COMT) es una enzima muy abundante en la naturaleza y pertenece a la familia RLFF. Posee una importancia particular debido a que se encarga de inactivar los neurotransmisores dopamina, adrenalina y noradrenalina en el sistema nervioso central de los mamíferos. Al igual que otras metiltransfera-

sas, realiza esto a través de una reacción de transferencia de grupo metilo desde el azufre del cofactor SAM a un oxígeno en el grupo hidroxilato de un sustrato con una estructura derivada del catecol (2-hidroxifenol, ver Figura 1-3). Las especies

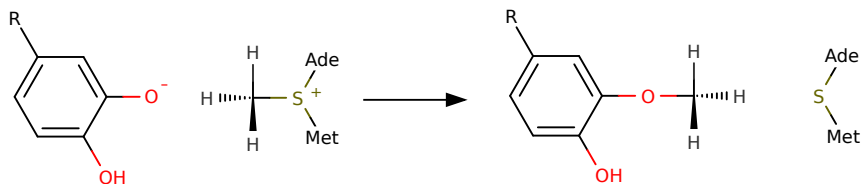


Figura 1-3.: Reacción de inactivación de moléculas catecólicas catalizada por COMT. Fuente: Elaboración propia.

en las cuales se ha investigado más exhaustivamente esta enzima son *Mus musculus* y *Homo sapiens*. Como muestra el esquema en la Figura 1-4, en ambos organismos existen dos isoformas de COMT: una soluble, llamada S-COMT, y una forma anclada a membrana, denominada MB-COMT. Ambas se originan a partir de un mismo gen, siendo la única diferencia entre ellas una porción adicional de aminoácidos hidrofóbicos, resultado de modificaciones post-transcripcionales que permiten el anclaje de MB-COMT a la bicapa fosfolipídica. Esta variación no altera la estructura del sitio activo ni la capacidad catalítica de la enzima, por lo que este proyecto se enfocó exclusivamente en S-COMT humana. Es importante señalar que S-COMT presenta ciertos polimorfismos, de los cuales el más frecuente es la mutación en el residuo 108, que transforma un residuo de valina a uno de metionina. Se presenta con una frecuencia de hasta 25 % en ciertas poblaciones de Europa y Norteamérica y se ha vinculado a la aparición de enfermedades psiquiátricas. Experimentos han demostrado que esta variación no afecta la eficiencia catalítica de la enzima, ya que se encuentra a unos 16 Å de la zona activa. Sin embargo, existe evidencia de que la mutante es más sensible a la elevación de temperatura y a la inactivación por oxidación [72]. El sistema de estudio en este trabajo fue la enzima S-COMT de *Homo sapiens* en su variante 108V, al ser la más común y poseer características cinéticas similares a la variante 108M.

1.3. Estructura del sitio activo de COMT

Las estructuras cristalinas determinadas hasta ahora [91, 72] utilizan el inhibidor 3,5-dinitrocatecol (DNC) para simular la presencia del sustrato catecólico. En la Figura 1-5 tomada de la estructura cristalina de COMT humana (PDB ID:3BWM) [72] se han suprimido por claridad los grupos nitro de DNC, convirtiéndolo en catecol

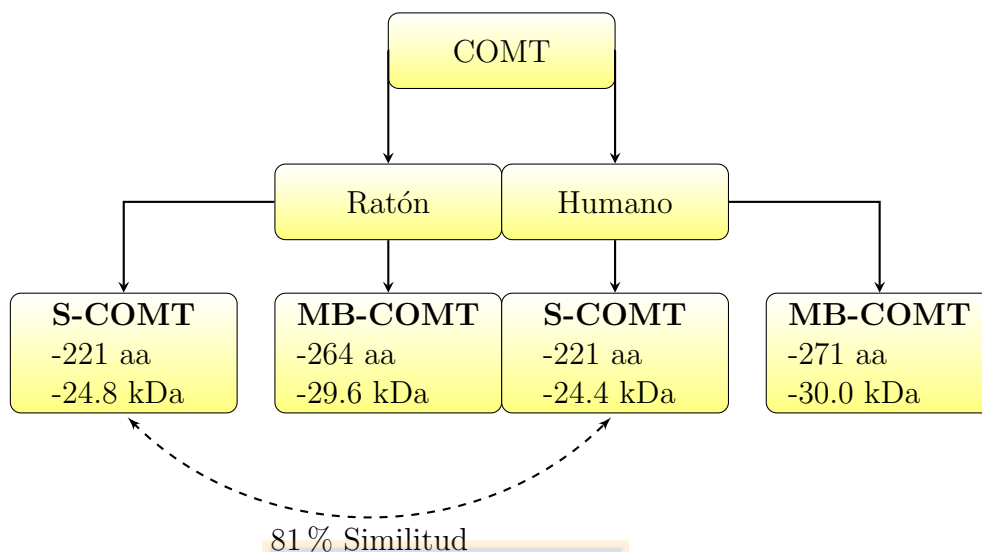


Figura 1-4.: Tipos de COMT presentes en roedores y humanos junto a algunas de sus características. Fuente: Elaboración propia.

(CAT). El cofactor SAM en el sitio activo se ubica cercano a CAT. Se puede ver que Glu90 forma puentes de hidrógeno con la porción ribosídica de SAM, mientras que la parte adenosínica del cofactor se asocia de la misma manera a los oxígenos de las cadenas laterales de Ser119 y Gln120, manteniendo esta molécula en su correcta orientación [72]. La imagen muestra también que Asp141, Asp169, Asn170, junto con CAT y una molécula de agua están coordinados al ion Mg^{2+} , formando con él un complejo octaédrico. Trp38, Trp143 y Pro174 generan un bolsillo hidrofóbico que otorga selectividad sobre los potenciales sustituyentes del sustrato catecólico.

En la cristalografía no es posible determinar la posición de los átomos de hidrógeno, lo que complica la definición del estado de protonación del sustrato al interior de la cavidad enzimática. Para el DNC es sabido que la presencia de dos grupos sustractores de electrones provoca un aumento significativo de acidez y una disminución de la nucleofilicidad [46], por lo cual es probable que esta molécula se coordine en forma dianiónica al magnesio. Esta baja reactividad es lo que hace que se catalogue usualmente a DNC como un inhibidor, si bien sería más correcto hablar de un sustrato de reactividad extremadamente baja. En el caso de sustratos como catecol o dopamina, cuyos pKa experimentales bordean el valor 8.8, la presencia del metal y la cercana Lys144 podrían inducir la disociación de uno de los hidroxilos, el cual actúe atacando al grupo metilo de SAM. Sin embargo, el segundo pKa de dopamina es 10.43 (13.07 en catecol), lo que hace poco probable una ionización del segundo grupo hidroxilo. En la sección de Métodos se entregan más detalles acerca de la orientación y protonación del sustrato considerados en este trabajo.

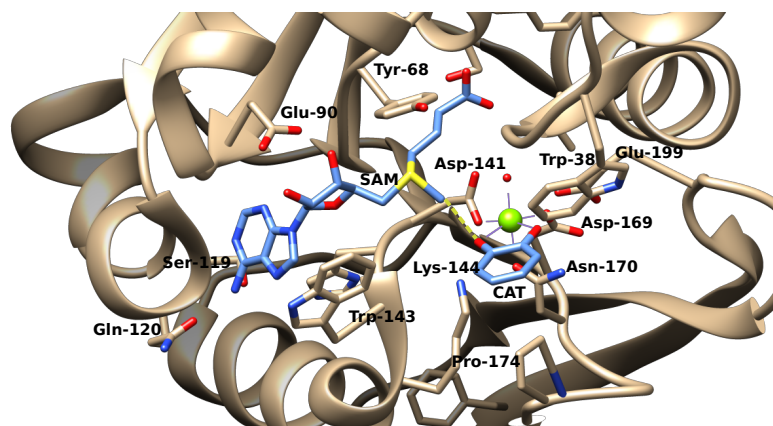


Figura 1-5.: Modelo del sitio activo de la enzima COMT. Por claridad, los grupos nitro del inhibidor catecólico se han suprimido. Fuente: *RCSB Protein Data Bank*.

1.4. Características cinéticas de COMT

Por su relevancia en el metabolismo de neurotransmisores y su implicación en enfermedades del sistema nervioso, la reacción catalizada por COMT constituye un proceso de gran interés desde el punto de vista químico-biológico, lo que ha quedado demostrado a través de los años con la constante búsqueda de moléculas que modifiquen la actividad de la enzima. En el estudio de los detalles a nivel atómico/molecular, se trabajó con la estructura cristalina de S-COMT de *Mus musculus* hasta el año 2008, fecha en que se logró cristalizar las variantes 108V y 108M de S-COMT en *Homo sapiens*. Debido a la similitud de esta enzima entre ambas especies, que alcanza un 81 %, la mayoría de los conocimientos sobre el mecanismo para la enzima murina son aplicables a su símil humana. No obstante, es importante para el desarrollo de fármacos trabajar con la última, ya que existen diferencias cinéticas interespecie. A modo de ejemplo, los valores de la constante de Michaelis, K_m , en COMT de rata y COMT humana para dopamina son $826 \pm 16\text{mM}$ y $188 \pm 16\text{mM}$ respectivamente, mientras que los mismos datos para 4-hidroxiestradiol son $27,5 \pm 2,3\text{mM}$ y $12,4 \pm 2,6\text{mM}$. Con estos datos podemos aquilatar las diferencias interespecie recordando que K_m nos indica la concentración de sustrato a la cual la velocidad de formación de producto es la mitad de V_{max} , la velocidad observada a concentración de saturación.

Desde el punto de vista estrictamente químico, la transmetilación catalizada por COMT también es interesante, ya que su relativa sencillez ha permitido comparar datos experimentales relativos a su cinética tanto en la enzima, como en solución acuosa. Así, por ejemplo, se sabe que la enzima acelera la reacción por un factor de 10^{16} [60]. La energía de activación para la reacción en solución acuosa se ha estimado

cercana a 30.8 kcal/mol [85, 70] con base en los datos experimentales del sistema trimetilsulfonio-fenolato [85]. En tanto, se ha calculado en base a datos cinéticos la energía de activación para la reacción enzimática en las proteínas nativa y mutante, obteniendo valores de 18.4 y 20.0 kcal mol⁻¹, [78, 53] respectivamente.

1.5. Antecedentes sobre la catálisis efectuada por COMT

La elucidación del mecanismo de acción de COMT comenzó a abordarse en la segunda mitad del siglo XX, mediante estudios cinéticos. La primera técnica utilizada para obtener información de nivel microscópico fue la sustitución isotópica [32]. Moléculas de SAM fueron marcadas en el grupo metilo con ¹³C y utilizadas para estudiar la velocidad de reacción de metilación de 3,4-dihidroxiacetofenona catalizada por COMT de rata. La relación entre constantes de velocidad de moléculas no marcadas y marcadas arrojó un resultado de $k_{12}/k_{13} = 1,09 \pm 0,05$. El interés por comparar estas mediciones con otras realizadas fuera del entorno enzimático se satisfizo mediante un estudio análogo para la reacción entre el ion metóxido y *S*-metildibenzotiofeno, en metanol. El valor obtenido en este caso fue $k_{12}/k_{13} = 1,08 \pm 0,01$ [29].

La alteración de la velocidad de una reacción como producto de la sustitución isotópica del átomo directamente involucrado en la ruptura y formación de un enlace se conoce como efecto isotópico cinético primario [98] (1°-KIE, del inglés *Kinetic Isotope Effect*). En este caso es relativamente directo racionalizar el 1°-KIE en términos de las constantes de fuerza en el estado de transición de los enlaces que se rompen y que se forman. La Figura 1-6 ilustra dichos conceptos. Los valores obtenidos en ambos experimentos fueron cercanos al máximo teóricamente esperable [32], indicando un estado de transición simétrico en lo relativo al orden de ambos enlaces. Este estudio proveyó la certeza de estar observando, tanto en la enzima como fuera de ella, una reacción de tipo *S_N2*.

Paralelamente se realizaron experimentos similares a los anteriores, pero esta vez sustituyendo los átomos de hidrógeno del grupo metilo de SAM por deuterio [32, 29]. En la reacción enzimática, la relación de constantes de velocidad fue $k_H/k_D = 0,83 \pm 0,05$. Para la reacción de *S*-metildibenzotiofeno en metanol fue de $k_H/k_D = 0,975 \pm 0,02$. La diferencia en velocidad de reacción respecto de una sustitución isotópica de esta naturaleza se denomina efecto isotópico cinético secundario (2°-KIE). El valor menor a 1 indica que la reacción marcada isotópicamente es más rápida, lo que se conoce como inversión del 2°-KIE. Estos resultados experimentales se han visto confirmados por estudios isotópicos con tritio, [104, 105] realizados re-

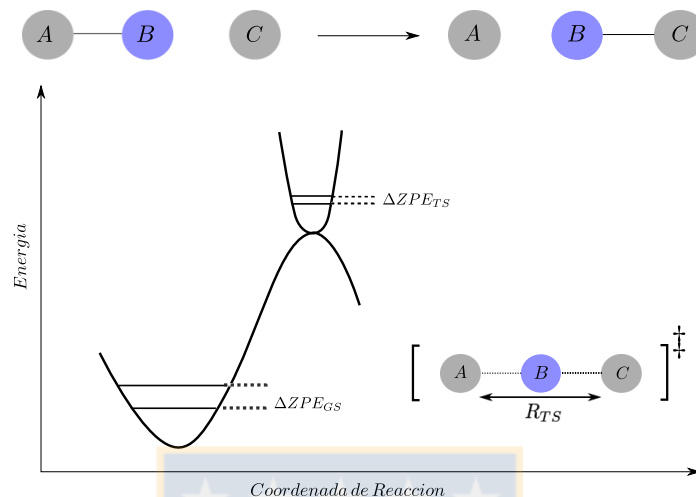


Figura 1-6.: Origen del 1°-KIE. La presencia de un isótopo pesado del átomo B da origen a una disminución de la energía vibracional de punto cero (ZPE) tanto del estado fundamental como del estado de transición. En un estado de transición con dos semienlaces simétricamente energéticos (abajo, derecha), el modo vibracional correspondiente a la coordenada de reacción permanecerá virtualmente inmóvil, razón por la que su energía será independiente de la sustitución isotópica y la barrera que separa al estado fundamental y al estado de transición será mayor para el sistema marcado con el isótopo pesado. Fuente: Elaboración propia.

cientemente en COMT humana. Ellos muestran nuevamente una inversión del 2°-KIE para la enzima nativa con un valor de $k_H/k_T = 0,791 \pm 0,012$. Además, estos estudios indican que la mutación del residuo de tirosina en posición 68 y su reemplazo por alanina (mutante Y68A) o fenilalanina (mutante Y68F) disminuyen la inversión del 2°-KIE y la eficiencia catalítica, generando probablemente un estado de transición más similar al que existiría en solución acuosa. El valor de 2°-KIE para la mutante Y68A es $k_H/k_T = 0,850 \pm 0,012$. Respecto a las causas de la menor inversión del 2°-KIE observada en las mutantes y su relación con la disminuida actividad catalítica que ellas exhiben, no se ha encontrado una explicación clara. Observaciones experimentales basadas en fluorescencia [105] indican que, cuando existe la mutación en posición 68, la relajación del estado excitado de Trp143 es más rápida, revelando una conexión entre ambas posiciones y un entorno menos estructurado para este residuo, si bien no se entregó una descripción detallada de la naturaleza de tal efecto.

Efectuar una asignación directa del 2°-KIE a enlaces específicos no es una tarea sencilla, ya que los átomos sustituidos no participan directamente del paso químico. Tradicionalmente se acepta que existe una correlación inversa entre el grado de in-

Sistema	k_H/k_D	k_H/k_T
Wild-type	0.83 ± 0.05	0.791 ± 0.012
Y68A	(0.893)	0.850 ± 0.012
SMDBT	0.975 ± 0.02	-

Tabla 1-1.: Valores experimentales de 2°-KIE medidos en diferentes sistemas. SMDBT: *S*-metildibenzotiofeno. El valor en paréntesis fue calculado a partir del valor observado para la reacción marcada con tritio. Fuente: Elaboración propia.

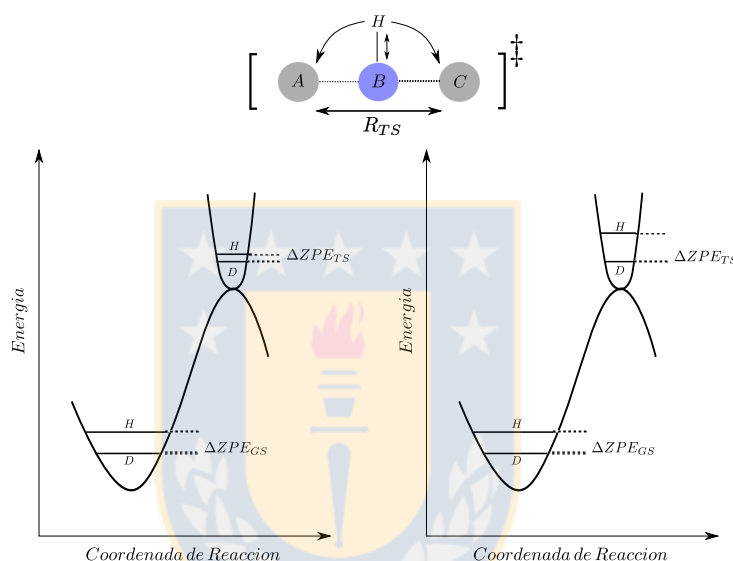


Figura 1-7.: Origen del 2°-KIE. En el caso de la transferencia de metilo marcado con deuterio o tritio, la principal contribución al 2°-KIE proviene de los modos vibracionales de elongación y oscilación fuera del plano de los enlaces carbono-isótopo. La elongación contribuye siempre a la inversión del 2°-KIE, mientras que el sentido de la contribución que hace la oscilación fuera del plano puede variar. Si la oscilación es relativamente libre (esquema de la izquierda), se espera que en el estado de transición la diferencia energética ZPE entre isótopos se mantenga, lo que generaría un 2°-KIE cercano a 1. En el caso de una oscilación impedida por factores estéricos o electrostáticos (esquema de la derecha), se espera un incremento de ZPE para el estado de transición en la especie no deuterada y, en consecuencia, una mayor inversión. Fuente: Elaboración propia.

versión del 2°-KIE y la distancia R_{TS} existente entre el átomo nucleófilo (oxígeno en este caso) y el átomo unido al grupo saliente (azufre en este caso). Como indica la Figura 1-7, en el estado de transición, la oscilación fuera del plano del grupo metilo se dificulta (aumento de la energía vibracional y aumento de la constante de fuerza) en un estado de transición con R_{TS} reducido. La interpretación dada a la mayor inversión del 2°-KIE en la enzima nativa fue que dentro de la macromolécula, el TS

se hallaba comprimido, con una distancia R_{TS} menor que la de una reacción análoga en solución acuosa [32, 60]. Basados en la observación de mayores velocidades de transmetilación para reacciones no enzimáticas intramoleculares, [17, 60] se propuso este acortamiento como parte importante del efecto catalítico [60]. Respecto a los resultados de mutación sitio-dirigida, se ha sugerido que Y68 jugaría un rol clave en la compresión del estado de transición [104], razón que explicaría la ineficiente catálisis efectuada por las mutantes y la menor inversión del 2°-KIE.

Uno de los problemas que enfrenta esta propuesta es que hasta el día de hoy, simulaciones computacionales capaces de reproducir el 2°-KIE [71, 8, 44] y las diferencias en energías de activación en diferentes ambientes, no han registrado un acortamiento de la distancia R_{TS} . En dichas investigaciones se ha postulado que los cambios de constantes de fuerza para elongación y oscilación fuera del plano no tienen relación con la distancia R_{TS} . Quienes defienden la hipótesis de la compresión argumentan que un mayor muestreo del espacio de configuraciones,[104] así como la utilización de una zona más extensa descrita por mecánica cuántica [50] podrían contribuir a reproducir este acortamiento. Dichos argumentos no generan consenso entre la comunidad científica, donde algunos investigadores indican que el aumento del número de átomos QM solamente produciría un efecto marginal sobre las distancias[40], y que el poder catalítico de COMT puede explicarse por la estabilización energética del estado de transición gracias a interacciones electrostáticas no presentes en un solvente como agua o metanol[70, 69, 53].

Una perspectiva novedosa que se hace cargo de la inversión del 2°-KIE fue expuesta por Ruggiero *et al.* [71] Su hipótesis indicó que no necesariamente era el acortamiento de la distancia R_{TS} lo que generaba la inversión del 2°-KIE, sino cualquier interacción que impusiera restricciones a los modos vibracionales del grupo metilo. En efecto, utilizando el argumento expuesto en la Figura 1-7, que atribuye la mayor o menor inversión del 2°-KIE a la mayor o menor resistencia asociada a la oscilación fuera del plano del grupo metilo sp_2 , es posible decir que cualquier impedimento (estérico o electrostático) que impida esta libre oscilación podría generar una variación de constantes de fuerza traducible en una mayor inversión del 2°-KIE. Como se dijo, esto se podría producir sin un acortamiento de distancias interatómicas entre nucleófilo y grupo saliente. La posterior observación[38] de un posicionamiento particular de ciertos residuos aminoacídicos portadores de átomos aceptores de puente de hidrógeno en estructuras cristalinas de metiltransferasas motivó una investigación [100] acerca de la posible modulación del 2°-KIE generada por interacciones puente de hidrógeno CH—O, establecidos entre el protón metílico y átomos aceptores de puente de hidrógeno presentes en el entorno. La conclusión tomada del sistema modelo indica que estas interacciones podrían explicar las diferencias de 2°-KIE ob-

servadas entre COMT y sus mutantes. Sin embargo, no se aclaró la real contribución de estos efectos a la catálisis ni a las observaciones de fluorescencia de Trp143.[105]

Hasta aquí, ha sido imposible generar un consenso sobre el mecanismo exacto y las contribuciones explícitas a la formación y modificación de la barrera de activación. Esto se debería a que las herramientas que hasta ahora se han usado para analizar este tema presentan dos deficiencias importantes:

- No se ha utilizado un método capaz de identificar y cuantificar aportes característicos a la energía de activación. Ejemplo de ellos podrían ser diferencias en las alteraciones estructurales y electrónicas que sufre el sistema durante la reacción acuosa y enzimática,
- Los cambios conformacionales de la proteína que pueden influir de manera importante en la barrera de activación ocurren en escalas de tiempo mayores a las que se han simulado, impidiendo una adecuada exploración del espacio de fase y por ende, no permitiendo generar una adecuada superficie de energía libre para la reacción.

De lo expuesto previamente, se desprende que conocer las contribuciones a la barrera de energía de activación de la reacción en solución acuosa, las modificaciones a estas contribuciones en COMT; y el poder expresarlas en términos químicamente intuitivos en diferentes puntos de la superficie de reacción permitiría describir el mecanismo por el cual la enzima lleva a cabo la catálisis, exponiendo los puntos clave que causan este efecto. Además de facilitar la investigación médico-biológica relacionada con el desarrollo de nuevos inhibidores, este conocimiento arrojaría luz sobre la forma en la cual una macromolécula como COMT es capaz de alterar el perfil de energía de una reacción S_N2 .

Hipótesis

La catálisis enzimática que lleva a cabo COMT se describe por una estabilización del estado de transición debida a la influencia del ambiente proteico.

Objetivos

- **Objetivo General:** Determinar los factores mediante los cuales COMT cataliza la transferencia de un grupo metilo a catecolato a través de simulaciones de dinámica molecular.
- **Objetivos Específicos:**
 1. Estudiar el mecanismo de reacción de transmetilación en un sistema modelo mediante métodos *ab initio* y derivar parámetros de mecánica molecular que reproduzcan este mecanismo.
 2. Identificar interacciones importantes entre el sustrato, SAM y los residuos aminoacídicos mediante simulaciones de dinámica molecular.
 3. Estudiar el mecanismo de reacción con los parámetros obtenidos mediante simulación de dinámica molecular en la enzima y en solución acuosa.
 4. Obtener perfiles de energía libre a lo largo de la coordenada de reacción con simulaciones QM/MM.
 5. Determinar contribuciones estructurales y electrónicas a la barrera de activación de la reacción en solución acuosa y en la enzima a través de la Fuerza de Reacción Media.

2. Métodos

La descripción a nivel atómico del comportamiento de un sistema químico requiere la resolución de la ecuación de Schrödinger correspondiente.

En un sistema como el que se estudió, sea en un solvente acuoso o en un medio enzimático, el número de átomos es extremadamente grande, por ello fue necesario realizar aproximaciones que permitieron obtener resultados en tiempo razonable.

La aproximación de Born-Oppenheimer (BO) [84, 59] consiste en expresar la función de onda del sistema como un producto de una función electrónica y una nuclear. La función de onda electrónica depende paramétricamente de las posiciones nucleares y ella nos permite obtener, al resolver la ecuación de Schrödinger, valores de energía electrónica para diferentes geometrías moleculares. El conjunto de estos valores forma lo que se conoce como una superficie de energía potencial (PES). Una vez obtenida esta superficie, el movimiento nuclear puede tratarse de manera clásica o cuántica suponiendo que los núcleos se mueven bajo la influencia de la energía potencial electrónica. Esta separación permite simplificar considerablemente los cálculos requeridos para describir a un sistema químico.

2.1. Métodos de estructura electrónica

Una forma de generar superficies de energía potencial para un sistema químico bajo estudio es el empleo de métodos de cálculo de estructura electrónica. Existe una gran variedad de software, tanto comercial como gratuito, que permite llevar a cabo estos análisis. A lo largo de este trabajo, se han utilizado los programas Gaussian03 [27], Gaussian09 [28] y Orca 3.0 [62]. Con ellos fue posible efectuar tanto cálculos semiempíricos como otros desde primeros principios, usualmente denominados *ab initio*.

2.1.1. Métodos *ab initio*

Los métodos *ab initio* consideran todos los electrones de una molécula. El método *ab initio* más sencillo capaz de dar resultados químicamente consistentes es el método de Hartree-Fock, también llamado método del campo autoconsistente (SCF, del

inglés *Self-consistent field*) [39]. En éste, se supone que la función de onda del sistema viene dada por una determinante de Slater de orbitales moleculares, los que a su vez son una combinación lineal de orbitales atómicos (CLOA). El teorema variacional y una metodología de cálculo autoconsistente permiten optimizar los coeficientes de esta combinación lineal hasta alcanzar el mínimo de energía, correspondiente a la función de onda del estado fundamental en el contexto de la base utilizada.

Este método tiene éxito al reproducir en aproximadamente 99 % la energía electrónica [86]. La energía restante corresponde a la correlación electrónica, como se conoce a la interacción entre electrones. El método de Hartree-Fock, al usar sólo una determinante de Slater no permite describir este efecto. Esto se convierte en un limitante cuando corresponde describir procesos como la transferencia de metilo entre SAM y dopamina. Para paliar esta deficiencia se hizo necesario utilizar métodos que describan la correlación electrónica. Dentro de éstos se pueden encontrar los llamados “Post-Hartree-Fock” [86], entre los cuales se cuentan Moller-Plesset (MP), Cúmulos acoplados (CC, del inglés *Coupled Clusters*), y los métodos basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT, del inglés *Density Functional Theory*) [39].

2.1.2. Teoría del funcional de la densidad

Los métodos basados en la teoría del funcional de la densidad, varios de los cuales se usaron en este trabajo, se basan en los teoremas de Hohenberg-Kohn [64]:

- Las propiedades del estado fundamental de un sistema de N-electrones dependen solamente de la densidad electrónica, ρ .
- La densidad electrónica correcta del estado fundamental de un sistema es aquella que minimiza la energía total a través del funcional $E[\rho]$

Con estos teoremas es posible aplicar el método variacional a la búsqueda de estados fundamentales. El hecho de que el funcional exacto que relaciona densidad y energía sea desconocido, obliga a utilizar un esquema llamado método de Kohn-Sham. En él, se introducen orbitales que permiten abordar la expresión de la energía cinética y las interacciones coulómbicas en términos de la densidad electrónica. Los términos de correlación e intercambio se expresan de manera aproximada. Luego, un esquema de cálculo iterativo similar a Hartree-Fock permite hallar una densidad electrónica autoconsistente.

Si bien la descripción sigue siendo aproximada, ya que el funcional de correlación e intercambio es elaborado de manera empírica, en términos de costo computacional DFT es generalmente un buen compromiso entre los métodos HF y post-HF, permitiendo el análisis de moléculas con varias decenas de átomos.

Uno de los aportes más significativos de la DFT a la química ha sido el proveer una descripción matemáticamente sólida de conceptos que nacieron producto de observaciones empíricas realizadas por los químicos. La electronegatividad, definida por Pauling en base a la observación de propiedades atómicas fue redefinida por Parr como la derivada de la energía con respecto al número de electrones, reforzando lo conceptual. Además, esta definición hizo posible determinar la electronegatividad en base a datos experimentales concretos como potencial de ionización y afinidad electrónica. Esta rama de la DFT encargada de caracterizar cualitativamente la influencia de la densidad electrónica sobre las propiedades moleculares pasó a llamarse DFT conceptual [64] y su avance ha supuesto una gran ayuda para la química computacional. De hecho, como se verá en algunas secciones de este trabajo, permite tender un puente entre los datos numéricos obtenidos de un cálculo de estructura electrónica y características importantes para el trabajo químico.

2.1.3. Métodos semiempíricos

En la metodología semiempírica, se reduce el número y costo de ciertas integrales a calcular para resolver el problema electrónico al introducir simplificaciones como, por ejemplo, considerar solamente electrones de valencia y parametrizar ciertas magnitudes de manera que se ajusten a datos experimentales [18, 39]. AM1 (del inglés *Austin Model 1*), PM3 (del inglés *Parameterized Model 3*) y PM6 (del inglés *Parameterized Model 6*) son ejemplos de modelos semiempíricos de amplio uso en la actualidad.

AM1 tendrá importancia en este trabajo ya que la rutina que permite buscar caminos de mínima energía libre utiliza este método semiempírico. Se basa en la aproximación de cero traslape diferencial, ZDO (del inglés *zero differential overlap*), en la cual las integrales que dan cuenta de la repulsión interelectrónica se consideran nulas en caso que los electrones estén "habitando" diferentes funciones del conjunto base. AM1 aplica el esquema ZDO de manera intermedia, solamente cuando las funciones de base están centradas en átomos diferentes. La pérdida de información que supone esta aproximación se suple en este caso con una parametrización de las integrales remanentes, diseñada de manera que se reproduzcan datos de entalpías de formación [18, 39].

Otro método semiempírico relativamente reciente que será útil en uno de los objetivos de esta tesis, el aumento de tiempo de simulación, se deriva de la teoría del funcional de la densidad. Basado también en los tradicionales métodos de Electrones Fuertemente Enlazados o *Tight Binding* usados para el cálculo de bandas electrónicas, se le conoce como *Self-Consistent Charge Density Functional Tight-Binding* [22]

(SCC-DFTB o simplemente DFTB de aquí en adelante). En él, el funcional energía se expande en términos de la densidad electrónica hasta segundo orden, originando tres términos [48]:

$$E = E_{BS} + E_{coul} + E_{rep} \quad (2-1)$$

Aquí, E_{BS} representa el primer orden de la expansión, físicamente identificable como la energía electrónica de un sistema de átomos libres y neutros, es decir, sin transferencia de carga y con una densidad electrónica del sistema igual a ρ_0 ,

$$E_{BS} = \sum_i^{occ} \langle \psi_i | \psi_i \rangle \quad (2-2)$$

donde el índice i representa los diferentes estados electrónicos ψ (orbitales moleculares de nuestro sistema idealizado). En esta sumatoria se consideran solamente los electrones de valencia y se usa una base mínima, que sea suficiente para tener en cuenta los estados de momento angular asociados a cada orbital atómico que forma la base, es decir una función radial para estados de tipo s, tres para p, cinco para estados d, etc. Los elementos matriciales del Hamiltoniano para diferentes pares de átomos a diferentes distancias se almacenan en archivos de Slater-Koster, con extensión .skf.

El término llamado E_{coul} describe las fluctuaciones de carga que la aproximación a primer orden no alcanza a capturar. Esta contribución a la energía del sistema tiene la forma:

$$E_{coul} = \frac{1}{2} \sum_{AB} \gamma_{AB}(R_{AB}) \Delta q_A \Delta q_B \quad (2-3)$$

con,

$$\gamma_{AB}(R_{AB}) = \begin{cases} U_A, & \text{if } A = B. \\ \frac{erf(C_{AB}R_{AB})}{R_{AB}}, & \text{if } A \neq B. \end{cases} \quad (2-4)$$

Aquí R_{AB} representa la distancia que separa a los átomos A y B , Δq_A corresponde a la variación en la carga de Mulliken del átomo A , U_A es la derivada de Hubbard, o la segunda derivada de la energía con respecto a la variación de carga, identificable con la diferencia entre el potencial de ionización del átomo y la afinidad electrónica. Finalmente, el término C_{AB} es análogo a la derivada de Hubbard, pero da cuenta de la interacción, principalmente carga-carga, entre diferentes átomos.

El término repulsivo, E_{rep} , es una función de potencial que da cuenta de la repulsión entre dos átomos y su valor a diferentes distancias está también tabulado previamente

en los archivos de Slater-Koster.

Como puede verse, la imposibilidad práctica de describir un sistema químico-biológico mediante métodos *ab initio* podría convertirse en una amenaza para el modelado de sistemas biológicos. Afortunadamente, varios de los métodos descritos contribuyen a disminuir el tiempo de cálculo y a obtener resultados químicamente útiles. Con todo, en la mayoría de las enzimas y reacciones químicas acuosas, la zona crítica o sitio activo involucra directamente a un número relativamente reducido de átomos y su densidad electrónica circundante, mientras los demás átomos tienen una influencia de tipo principalmente coulombico. Además, existen etapas del trabajo en química computacional que no involucran una necesaria ruptura o formación de enlaces, por ejemplo en los procesos de equilibración. Esto hace del uso de modelos mecanocuánticos o semiempíricos una estrategia que podría ser simplificada.

2.2. Métodos de mecánica molecular

A fin de disminuir el costo computacional que significa describir el comportamiento de un sistema biológico o en presencia de solvente, se recurre a expresiones analíticas que modelen las interacciones intra e intermoleculares del sistema. Así el movimiento de *stretching* de los enlaces químicos pueden representarse por un potencial armónico, donde b sería la distancia entre los átomos, b_0 la distancia interatómica de equilibrio y K_b la constante de fuerza asociada a este enlace en particular (ver Cuadro 2-1). El *bending* puede modelarse con una expresión análoga, donde θ representa el ángulo entre los enlaces y K_θ indica la constante de fuerza para este movimiento. La misma expresión es válida para expresar la variación energética debida a vibraciones fuera del plano, señaladas por el parámetro ξ . La energía asociada a la torsión en pares de átomos con relación 1-4 se expresa como una serie de Fourier truncada, donde K_{ϕ} es la barrera energética a la rotación, n representa la periodicidad, ϕ el ángulo diedro y δ la fase. Las interacciones electrostáticas y de Van der Waals se expresan usualmente mediante la ley de Coulomb y el potencial de Lennard-Jones, respectivamente. El conjunto de expresiones que permiten calcular la energía de cada grado de libertad del sistema y los parámetros correspondientes a cada tipo de átomo, enlace, ángulo, etc. constituyen lo que se conoce como un campo de fuerzas. En este trabajo, utilizamos el campo de fuerzas Amber99SB [37], apto para describir proteínas, implementado tanto en el software GROMACS [35] como en fDynamo [23].

De los términos que describen las interacciones no enlazantes, las cargas atómicas han recibido especial atención a través de los años [36, 3, 9]. Al no ser un observable mecanocuántico, no existe una definición unívoca de este concepto, pero dada su importancia en la comprensión de la química juegan un rol muy importante en

los métodos computacionales. De la variedad de metodologías existentes hay dos categorías principales que se usaron a través de este trabajo:

- Cargas de potencial electrostático restringido (del inglés *Restrained Electrostatic Potential*, RESP): Son cargas atómicas que están presentes en los parámetros del campo de fuerzas AMBER99 [3, 37, 96]. Reproducen el potencial electrostático de una molécula calculado por métodos *ab initio*, ajustando los valores de un grupo de cargas puntuales que representan a los átomos. Existe una versión previa no restringida llamada ESP (Cargas de Potencial Electrostático, del inglés *Electrostatic Potential*). La diferencia radica en que, en el modelo RESP, los carbonos cuaternarios tienen una restricción sobre los valores de carga atómica que pueden tomar. Esta restricción no tiene un origen físico, pero se utiliza para evitar grandes fluctuaciones de carga que daba ESP en los carbonos mencionados.
- Cargas de Hirshfeld-I: Son cargas atómicas que se basan en la partición propuesta por Hirshfeld [36]. Las porciones de densidad electrónica molecular, $\rho_{mol}(\mathbf{r})$ son repartidas a cada átomo A en forma proporcional a un factor de ponderación $\omega_A(\mathbf{r})$. Este factor es la razón entre la densidad del átomo A aislado, $\rho_A^0(\mathbf{r})$, y la densidad promolecular $\rho_{mol}^0(\mathbf{r})$, que corresponde a la superposición de las densidades proatómicas,

$$\rho_A(\mathbf{r}) = \omega_A \rho(\mathbf{r}) = \frac{\rho_A^0(\mathbf{r})}{\rho_{mol}^0(\mathbf{r})} \rho_{mol}(\mathbf{r}) \quad (2-5)$$

El esquema de Hirshfeld entrega cargas cercanas a cero en todos los casos, lo que muchas veces contradice la intuición química. Además es fuertemente dependiente de la densidad proatómica escogida. El esquema de Hirshfeld-I [9] aborda estos problemas realizando un proceso iterativo, en que la densidad proatómica inicial es la misma que en el método original, pero luego la densidad proatómica escogida es una que reproduce la población obtenida para el proátomo en la iteración anterior. Cargas fraccionarias se obtienen interpolando entre las densidades de proátomos con carga entera.

En este trabajo, estas cargas atómicas han sido utilizadas además para cuantificar la influencia polarizante del entorno sobre sistemas químicos, así como para desarrollar conjuntos de datos de carga atómica que reproduzcan de mejor manera propiedades experimentales.

A modo de resumen, los valores de diferentes parámetros que caracterizan el comportamiento de una molécula pueden expresarse como parámetros en un modelo de


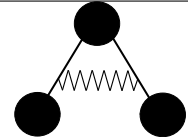
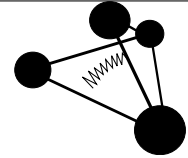
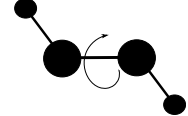


	$V_{stretch} = \sum_{enlaces} \frac{1}{2} K_b (b - b_0)^2$
	$V_{bend} = \sum_{angulos} \frac{1}{2} K_\theta (\theta - \theta_0)^2$
	$V_{oop} = \sum_{impropio} \frac{1}{2} K_\xi (\xi - \xi_0)^2$
	$V_{diedro} = \sum_{diedro} K_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)]$
	$V_q = \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{i,j}}$
	$V_{vdw} = \sum_{i,j} \frac{C_{12}(i,j)}{r_{i,j}^{12}} - C_6(i,j)/r_{i,j}^6$

Tabla 2-1.: Expresiones de la energía en un campo de fuerzas de mecánica molecular. Fuente: Elaboración propia.

mecánica clásica que se derivan de mediciones experimentales o de cálculos mecano-cuánticos.

Una limitación importante que surge del uso de un campo de fuerzas es la imposibilidad de representar reacciones químicas, al no poder romper o formar enlaces. Para sobrellevar este problema, se debe utilizar una metodología híbrida, que combine los métodos de estructura electrónica descritos previamente con la descripción clásica que acabamos de revisar.

2.3. Métodos QM/MM

La incapacidad de representar reacciones químicas que posee la mecánica molecular se aborda usualmente incluyendo subsistemas calculados a nivel cuántico (zona QM) dentro un sistema descrito por el campo de fuerzas (zona MM) [30, 79]. Un inconveniente asociado a esta técnica es el alto costo computacional que implica la descripción cuántica, la aparición de interacciones espurias entre las zonas QM y MM y el posible truncamiento de fragmentos moleculares compartidos entre ambas zonas. Para generar una adecuada descripción del sistema es necesario minimizar estos efectos. Utilizaremos lo que se conoce como un esquema QM/MM aditivo, en

que el hamiltoniano total se debe a diferentes contribuciones

$$H_{QM/MM} = H_{MM} + H_{QM} + H_{QM-MM} \quad (2-6)$$

En la expresión (2-6), H_{MM} corresponde al hamiltoniano de la zona descrita por mecánica molecular, H_{QM} el hamiltoniano de la zona descrita por estructura electrónica y H_{QM-MM} es el hamiltoniano que describe la interacción de ambas zonas. H_{QM-MM} se compone de interacciones de Van der Waals y electrostáticas, como muestra la ecuación (2-7)

$$H_{QM-MM} = H_{VdW} - \sum_i^N \sum_J^L \frac{q_J}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_J|} + \sum_\alpha^M \sum_J^L \frac{q_J Q_\alpha}{|\mathbf{R}_\alpha - \mathbf{R}_J|} \quad (2-7)$$

Donde el índice i corre sobre los electrones de la zona QM, el índice J sobre los núcleos de la zona MM y el índice α cuenta los núcleos de la zona QM. Una representación del tratamiento del sistema se muestra en la Figura 2-1. Esta forma de tratar la interacción coulombica se conoce como inclusión electrostática (en inglés *electrostatic embedding*, panel f de la Figura 2-1)[79]. La elección de la zona QM es clave. En este caso, el que la enzima no forme enlaces covalentes con el sustrato ni con el cofactor es una ventaja, ya que en principio se podrían definir zonas QM y MM que no comparten enlaces covalentes. En caso de que existan enlaces compartidos, estos deben tratarse según método MM (paneles a-c, Figura 2-1) y las valencias en la zona QM pueden cerrarse usando la estrategia conocida como *link-atom* (panel e, Figura 2-1). En ella, los enlaces en la frontera QM-MM se saturan (en el sistema QM) con átomos de masa pequeña, como hidrógeno. Ello permite definir satisfactoriamente la zona QM. Las interacciones enlazantes ubicadas en esta frontera se tratan a nivel MM. Las interacciones no enlazantes se resuelven realizando cálculos de MM que asignan cargas atómicas y parámetros de Van der Waals a los núcleos de la zona QM, que entonces pueden interactuar con sus símiles de la zona MM. La influencia de las cargas de la zona MM sobre el sistema cuántico se introduce como un término de energía potencial en el Hamiltoniano QM. En este trabajo no fue necesario usar un esquema de partición QM/MM ya que la frontera entre ambas zonas no cortó ningún enlace.

2.4. Dinámica molecular y energía libre

Las simulaciones de sistemas químicos se fundan en la posibilidad de asociar observables macroscópicos con propiedades microscópicas. Esta asociación, realizada a

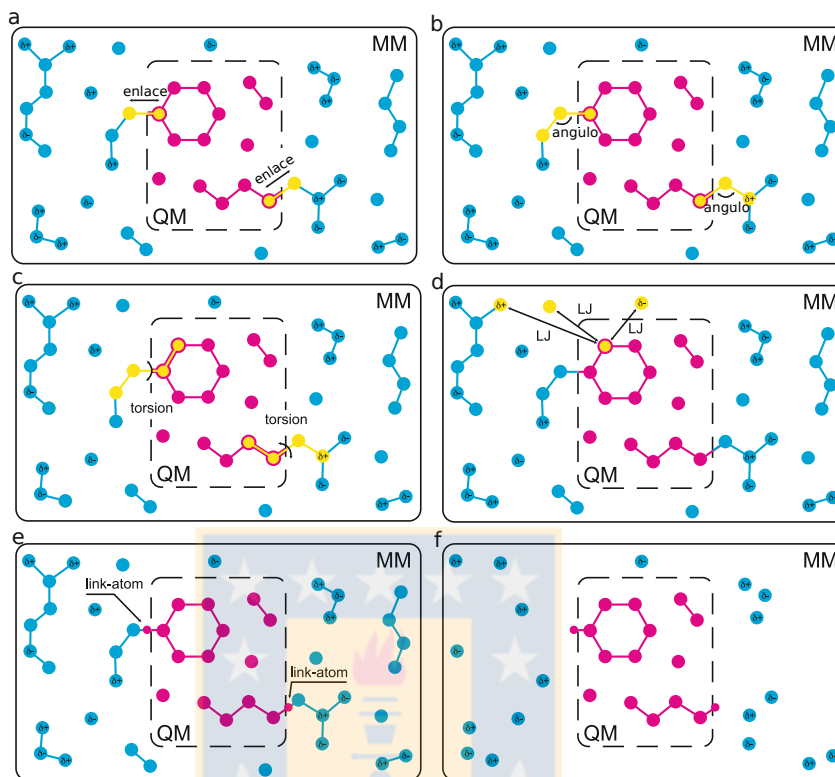


Figura 2-1.: Acoplamiento entre los subsistemas QM y MM en el esquema aditivo. Los paneles a-c muestran interacciones enlazantes entre átomos QM y MM. Éstas se manejan a nivel de campo de fuerzas (MM). El panel d muestra la interacción de Van der Waals entre un átomo en la región QM y tres átomos MM. Estas interacciones se modelan utilizando el potencial de Lennard-Jones. El panel e ilustra el concepto de *link-atom*. El panel f muestra cómo se manejan las interacciones electrostáticas QM/MM. Los átomos MM cargados entran al Hamiltoniano del sistema QM como cargas puntuales que polarizan la nube electrónica. Fuente: referencia [30]

finis del siglo XIX por científicos como Gibbs, Boltzmann, Planck, etc. permitió darle un sustento detallado a la termodinámica, que hasta ese momento era una ciencia meramente fenomenológica [54]. Una vez que el poder de cómputo permitió calcular mecánicamente el comportamiento de un número considerable de partículas, fueron estas investigaciones fundamentales las que guiaron el camino para hacer simulaciones cada vez más congruentes con el mundo físico. Revisaremos brevemente estas teorías.

2.4.1. Termodinámica estadística

Las propiedades macroscópicas de un sistema químico en equilibrio definen su estado y son descritas a través de la termodinámica. Es posible efectuar una aso-

ciación entre dichas propiedades y ciertas características microscópicas del sistema. Por ejemplo, la temperatura medida a nivel macroscópico puede identificarse con la velocidad promedio que tienen las partículas que conforman el sistema. Es fácil darse cuenta que para un mismo valor de propiedades macroscópicas existe más de una configuración microscópica satisfactoria. En jerga técnica, se dice que para un estado macroscópico dado, existen múltiples microestados compatibles. Haciendo uso de dicha idea, Gibbs propuso el esquema de colectivos para deducir la conexión entre el mundo micro y el macro.

Un colectivo es un conjunto de réplicas de un sistema en el mismo estado macroscópico, es decir, con igual valor de ciertas propiedades termodinámicas que lo definen [89]. Sin embargo, cada réplica está preparada en un microestado diferente y existe una réplica para cada microestado posible. Si, por ejemplo, queremos predecir cuál será la energía observada a nivel macroscópico para el colectivo que estamos estudiando, es necesario aplicar el operador hamiltoniano, $H(q, p)$ a cada una de las réplicas. Este operador nos entrega la energía total asociada a cada microestado y es una función de las posiciones (\mathbf{q}) y momentos (\mathbf{p}) de las partículas que conforman cada réplica. Luego, debemos promediar los resultados obtenidos y tendremos el valor observado macroscópicamente.

Es más sencillo concebir un colectivo como una nube de puntos en un espacio de fase. En dicho espacio cada dimensión corresponde a un grado de libertad de alguna partícula, de manera que cada réplica o configuración puede visualizarse como un punto en este espacio. La evolución de un microestado a otro, que siempre puede interpretarse como un cambio en posiciones y momentos, puede visualizarse como una trayectoria en el espacio de fase. Este movimiento puede describirse mediante las ecuaciones de Hamilton:

$$\dot{q} = \frac{\partial H}{\partial p} \quad (2-8)$$

$$\dot{p} = -\frac{\partial H}{\partial q} \quad (2-9)$$

en las que q representa coordenadas generalizadas, p representa momentos generalizados y H es el hamiltoniano. La derivada temporal se indica con un punto sobre el factor correspondiente.

Intuitivamente, es posible comprender que el valor observado de una propiedad macroscópica corresponde al promedio de la correspondiente magnitud microscópica, promedio calculado sobre todos los miembros del colectivo. De manera que, si tuviésemos un tamaño subatómico, una forma de calcular el valor de una propiedad

macro sería registrar la correspondiente magnitud subatómica para cada miembro del colectivo y luego obtener su valor promedio. Por otro lado, si conociéramos la función de distribución de probabilidad de nuestro sistema sobre los posibles microestados, entonces no sería necesario el conteo, ya que el valor promedio de una propiedad macroscópica C , conectada a una propiedad microscópica c vendría dado simplemente por :

$$C = \langle c(x) \rangle = \frac{1}{Q} \int c(x)F(H(x))dx \quad (2-10)$$

donde x representa el espacio de fase, que hemos supuesto continuo, F representa a la función de distribución de probabilidad de los microestados del sistema y el denominador Q es necesario para normalizar F , ya que como toda densidad de probabilidad, debe sumar 1. Q se conoce como función de partición y su forma depende del colectivo, es decir, de las variables de estado que definen nuestro sistema. Q nos entrega una medida del número de microestados accesibles. En el caso en que se fijan el número de partículas (N), el volumen (V) y la temperatura (T) estamos en presencia del colectivo canónico. La función F que pondera las contribuciones microscópicas es proporcional a $\exp(-\frac{H}{kT})$ donde k es la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. La función de partición canónica es:

$$Q(N, V, T) = \frac{1}{N!h^{3N}} \int \exp(-\frac{H}{kT})dx = C_N \int \exp(-\frac{H}{kT})dx \quad (2-11)$$

siendo la función de distribución sobre el espacio de fases igual a:

$$\frac{F(x)}{Q(N, V, T)} = \frac{C_N \exp(-\beta H(x))}{Q(N, V, T)} \quad (2-12)$$

La función de partición juega un rol de enorme importancia en el estudio de las propiedades macroscópicas de un sistema. En el colectivo canónico, la energía libre de Helmholtz, A , se asocia a ella según la ecuación:

$$A(N, V, T) = -kT \ln Q(N, V, T) = -\frac{1}{\beta} \ln Q(N, V, T) \quad (2-13)$$

mientras que, como ya se dijo, el promedio de una propiedad microscópica c puede calcularse según:

$$C = \langle c(x) \rangle = \frac{1}{Q} \int c(x)F(x)dx \quad (2-14)$$

Una consecuencia notable de estas definiciones es que una diferencia de energía

libre ΔA entre dos estados 1 y 2 formados por iguales partículas puede expresarse como:

$$\Delta A_{21} = kT \ln \frac{Q_1(N, V, T)}{Q_2(N, V, T)} = kT \ln \frac{Z_1}{Z_2} \quad (2-15)$$

donde Z representa la función de partición configuracional, dependiente sólo de las coordenadas ya que la integración sobre los momentos se ha cancelado.

2.4.2. Dinámica molecular

A fin de estimar las propiedades termodinámicas de un sistema químico, sería necesario generar en principio, todas las configuraciones posibles para un colectivo dado. En teoría existen dos formas de lograr esto. Una es generar de forma aleatoria diferentes configuraciones, lo que se puede lograr a través de múltiples estrategias como por ejemplo, el método de Monte Carlo. Otra, que es la que adoptaremos nosotros, consiste en hacer evolucionar al sistema siguiendo las leyes de la mecánica, técnica conocida como dinámica molecular. Esta estrategia hace uso de lo que se conoce como hipótesis ergódica [54, 89]: Suponemos que efectuar una medición instantánea sobre los infinitos miembros de un colectivo es equivalente a observar un único sistema durante un tiempo infinitamente largo. Si el sistema es ergódico, las configuraciones observadas en ambos casos serán las mismas y el promedio macroscópico coincidirá. La suposición de ergodicidad es la piedra angular de las simulaciones de dinámica molecular.

Una simulación basada en la mecánica molecular parte con la definición del hamiltoniano que describe al sistema [26], H :

$$H(p_i, r_i) = \sum_{i=1}^N (K(p_i) + V(r_i)) \quad (2-16)$$

donde p_i representa el momento de cada partícula i , r_i su posición, $K(p_i)$ su energía cinética, y $V(r_i)$ la energía potencial. Las ecuaciones de movimiento de tal sistema pueden escribirse a partir de las ecuaciones de Hamilton,

$$\dot{p}_i = -\frac{\partial H}{\partial r_i} = -\frac{\partial V}{\partial r_i} = F_i \quad (2-17)$$

$$\dot{r}_i = \frac{\partial H}{\partial p_i} = \frac{p_i}{m_i} \quad (2-18)$$

Conociendo la fuerza F_i sobre la partícula i al tiempo t_0 , es posible calcular su posición al cabo de un tiempo Δt utilizando la ecuación de Newton:

$$F_i(t_0) = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} \quad (2-19)$$

La solución de la ecuación de Newton para las partículas de un sistema en fase condensada debe realizarse en forma numérica y para ello existen múltiples códigos de software. En nuestro caso hemos utilizado GROMACS [35] y fDynamo [23]. Todos los integradores parten de una idea base, que la posición de una partícula (\mathbf{r}) en función del tiempo (t) puede expresarse como una serie de Taylor truncable, por ejemplo, en el término cuadrático:

$$r(t + \Delta t) \approx r(t) + v(t)\Delta t + a(t)\Delta t^2 \quad (2-20)$$

Si bien la resolución de esta ecuación para determinar la futura posición de una determinada partícula podría parecer trivial, el truncamiento de esta serie y la necesidad de utilizar un Δt de tamaño finito (en este trabajo, 1 fs en simulaciones de mecánica cuántica y 2 fs en simulaciones de mecánica clásica) lleva a una descripción pobre. Nosotros hemos utilizado un integrador basado en el algoritmo de *Leap-Frog* (Salto de Rana) que utiliza velocidades y posiciones en tiempos alternados para seguir la evolución del sistema [26], teniendo las ventajas de ser reversible en el tiempo y respetar el teorema de Liouville, es decir, conservar el volumen del sistema a través del espacio de fase. En este algoritmo las ecuaciones para determinar posiciones y velocidades a un tiempo t serían:

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v(t + \Delta t/2) \quad (2-21)$$

$$v(t + \Delta t/2) = v(t - \Delta t/2) + \Delta t \frac{a(t)}{m} \quad (2-22)$$

Diferentes algoritmos permiten hacer evolucionar el sistema sujeto a condiciones como la mantención de una temperatura (distribución de velocidades de las partículas) constante o una presión específica. Se les conoce como termostatos y barostatos, en analogía a sus contrapartes del mundo real. En este trabajo se utilizó el termostato V-rescale [11], el cual básicamente modifica las ecuaciones de movimiento añadiendo un componente de fricción que re-escala las velocidades de las partículas. El factor de escala busca reproducir la energía cinética extraída de una distribución canónica que cumple el requisito de temperatura deseado.

El control de presión se logró tanto a través del barostato de Berendsen [4], que modifica el volumen de la caja de simulación escalando todos sus vectores por un fac-

tor común, como también con el barostato de Parrinello-Rahman [65], que modifica de manera variable los vectores de la caja, alterando su forma.

Un defecto importante que presenta toda dinámica molecular que busque reproducir observables macroscópicas es que el muestreo del espacio configuracional será incompleto, ya que el número de microestados disponibles para un sistema en fase condensada es tan grande que su exploración exhaustiva requeriría un tiempo excesivamente largo. Si bien hemos asumido desde un principio ergodicidad del sistema, en la práctica no es posible visitar todas las configuraciones posibles. A esto puede contribuir la presencia de barreras energéticas que separen configuraciones de mínima energía libre. Esta limitación se traduce en la imposibilidad de acceder a la verdadera función de partición del sistema.

Por ello se han desarrollado técnicas que permiten acelerar el muestreo del espacio de configuraciones. Si bien estas técnicas a menudo no entregan, en principio, un conjunto de configuraciones correspondientes a un sistema físico real, es posible recuperar esta información en tratamientos subsiguientes. Son ellas las que describiremos a continuación.

2.4.3. Coordenada de reacción

Simular mediante dinámica molecular una reacción química en fase condensada, y en condiciones ambientales realistas (por ejemplo en el colectivo canónico) puede ser una tarea difícil. Una de las principales contrariedades, aparte de la complejidad interna de las moléculas es que las configuraciones correspondientes a reactivos y productos constituyen mínimos en la superficie de energía libre que a menudo están separados por una barrera energética considerable. El paso espontáneo del sistema de un pozo energético al otro requeriría la poco probable acumulación de la energía suficiente en ciertos modos vibracionales, y como la probabilidad de esta acumulación es proporcional a $\exp(-E/kT)$, podría transcurrir un tiempo muy largo antes de poder observar siquiera una transición.

Sin embargo, a menudo se da el caso que una reacción química puede ser descrita bastante bien por un conjunto relativamente pequeño de coordenadas generalizadas. Por ejemplo, una transferencia de metilo podría describirse en función de las distancias entre el grupo transferido y los átomos donador y receptor. En otro ejemplo, un ángulo diedro podría representar de forma apropiada un cambio conformacional de algún sustrato enzimático [93]. A estas variables se les da usualmente el nombre de coordenadas de reacción o variables colectivas. Su elección puede ser trivial en algunos casos, pero en otros deben seleccionarse con cuidado. La elección de una coordenada de reacción deficiente (que no represente bien el cambio experimentado

por el sistema) puede llevar a artefactos y errores considerables en la determinación las propiedades cinéticas del sistema.

Si la coordenada de reacción se elige correctamente, entonces puede ser de gran ayuda para remontar las barreras energéticas que separan mínimos en una superficie de energía libre. En los métodos de cálculo que usan este recurso, se busca generar la función de distribución de probabilidad del sistema sobre estas coordenadas. De esta manera, si tenemos un conjunto de n coordenadas generalizadas $q_\alpha = f_\alpha(r_1, \dots, r_N)$, definibles en función de N coordenadas cartesianas, entonces la probabilidad de que estas n coordenadas tengan valores $q_\alpha = s_\alpha$ en el colectivo canónico viene dada por

$$P(s_1, \dots, s_n) = \frac{C_N}{Q(N, V, T)} \int d^N r d^N p \exp(-\beta H(r, p)) \prod_{\alpha=1}^n \delta(f_\alpha(r_1, \dots, r_N) - s_\alpha) \quad (2-23)$$

donde la función delta de Dirac se usa para fijar los valores de q_α en los correspondientes valores de s_α . Una vez conocida esta distribución, es posible escribir la superficie de energía libre en términos de las variables colectivas mediante la fórmula

$$A(s_1, \dots, s_n) = -kT \ln P(s_1, \dots, s_n) \quad (2-24)$$

De esta última ecuación se desprende que en los puntos del espacio de coordenadas con una alta probabilidad de ser visitados, la energía libre será baja, mientras que en los puntos donde la densidad de probabilidad de visita sea baja, la energía libre será alta. Cuando se utiliza una única coordenada generalizada s_i el término A pasa a llamarse perfil de energía libre en s_i .

2.4.4. Camino de mínima energía libre

En base a lo comentado anteriormente, es posible definir un tubo de reacción en el espacio de coordenadas generalizadas como el conjunto de trayectorias que más probablemente serán recorridas por el sistema al transformarse de reactivos a productos. Este tubo es adyacente a lo que se conoce como el camino de mínima energía libre (MFEP, *Minimum Free Energy Path*). A lo largo de este camino, el gradiente de energía libre es siempre nulo en direcciones perpendiculares a la coordenada de reacción. Matemáticamente, podemos decir que para una superficie de energía libre formada por un conjunto de n variables colectivas agrupadas en un vector $q = (q_1(r), q_2(r), \dots, q_n(r))$ el MFEP $\mathbf{z}(\alpha)$, donde α es una parametrización arbitraria, es un camino que satisface la siguiente ecuación:

$$\forall \alpha : \frac{d}{d\alpha} \parallel \mathbf{M}(\mathbf{z}(\alpha)) \nabla A(\mathbf{z}(\alpha)) \quad (2-25)$$

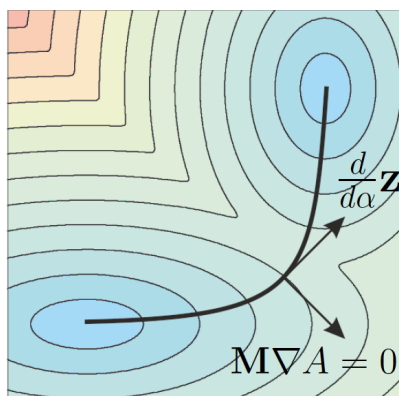


Figura 2-2.: Representación esquemática del camino de mínima energía libre. Fuente: referencia [107].

con $\nabla A(\mathbf{z}(\alpha))$ el gradiente de la superficie de energía libre n -dimensional en el punto $\mathbf{z}(\alpha)$ y \mathbf{M} el tensor métrico:

$$\mathbf{M}(\mathbf{z}) = \langle \tilde{M}(r) \rangle_{q(r)=z} = \langle J_q(r) m^{-1} J_q^T(r) \rangle_{q(r)=z} \quad (2-26)$$

donde $J_q(r)$ es el jacobiano para el conjunto de variables colectivas, es decir $J_q(r)_{ij} = \frac{\partial \theta_i}{\partial x_j}$ y m es la matriz diagonal de masas atómicas. Se puede observar que el tensor métrico es un promedio canónico sobre las diferentes configuraciones que tienen valores de z que satisfacen el vector de coordenadas q . M es una definición de la distancia entre diferentes puntos del espacio de configuraciones, definida en términos de las coordenadas generalizadas. \tilde{M} define la misma distancia, pero para hipersuperficies que cumplen las condiciones requeridas.

$$d(q(r), q(r) + \delta q) = (\delta q^T \tilde{M}(r)^{-1} \delta q)^{\frac{1}{2}} \quad (2-27)$$

La importancia práctica del MFEP reside en que una vez conocido, no es necesario explorar otras regiones del espacio de configuraciones para obtener un perfil de energía libre, ya que las regiones visitadas de manera significativa por el sistema están incluidas o muy cercanas a este camino.

2.4.5. Método de la cuerda

Una forma de obtener el MFEP es el método de la cuerda o *String Method*. La idea básica es partir con una secuencia (cuerda) $z(\alpha)$ de configuraciones (nodos) que sea una suposición inicial del posible camino de reacción. Este camino se define en un espacio formado por ciertas coordenadas colectivas elegidas previamente y los

diferentes nodos z_i se numeran desde 1 hasta n . Una vez establecido este camino preliminar, cada nodo se hace evolucionar de acuerdo a

$$\dot{z}_i = -M(z_i)\nabla A(z_i) + \lambda^{\parallel} \quad (2-28)$$

El término λ^{\parallel} es tangencial al camino y se aplica a todos los nodos, excepto al inicial y al final. Su función es garantizar que estos nodos intermedios se mantengan equidistantes y no caigan a los mínimos de reactivos y productos. Luego de sucesivas iteraciones, se alcanzará un punto donde el gradiente de energía libre tendrá solamente componentes paralelos al camino de reacción, que a su vez, serán contrarrestados por el término tangencial. En ese punto se habrá alcanzado el MFEP. Entre cada actualización del camino de reacción, se ejecuta una dinámica molecular interna de cada nodo, restringido a un valor de q particular. En esta dinámica se obtienen diversos valores del jacobiano $J_q(r)$, que permiten calcular el tensor métrico promedio \tilde{M} . Además se obtiene un pseudo-potencial de fuerza media sobre la correspondiente coordenada, que nos entrega el valor de ∇A . Una propiedad importante de este método es que nos permite conocer la contribución a la energía libre de diferentes variables colectivas y su importancia para ser incluidas en una coordenada de reacción definitiva.

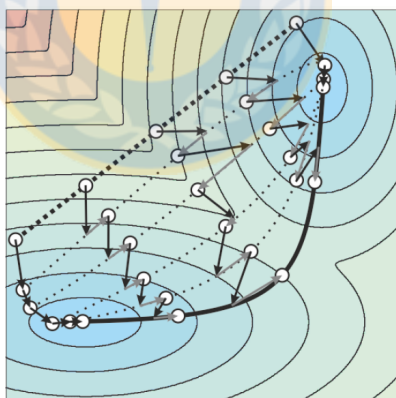


Figura 2-3.: Representación esquemática de la evolución de los nodos en el método de la cuerda. Fuente: [107].

2.5. Umbrella Integration y Fuerza de Reacción Media

Con las herramientas anteriormente descritas, es posible describir la evolución temporal de nuestro sistema químico a través de simulaciones de dinámica molecular y

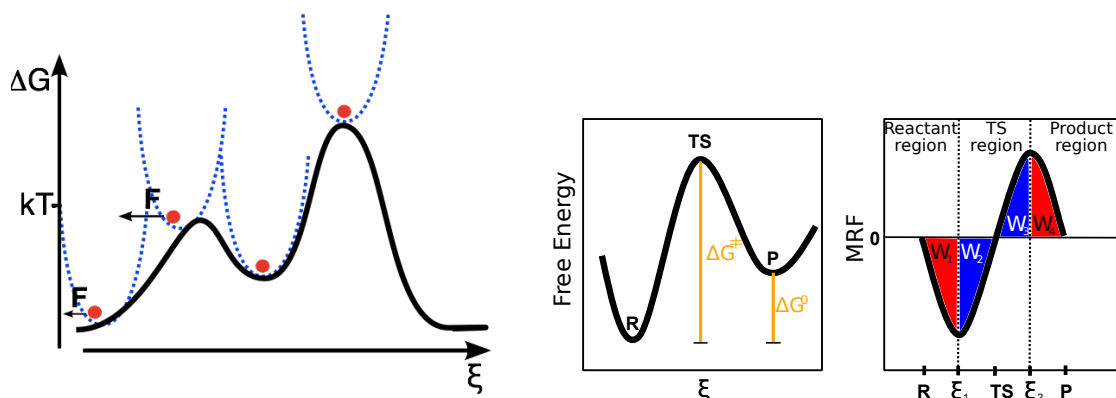


Figura 2-4.: *Umbrella integration* y Fuerza de reacción media. Izquierda: Restricción del sistema en diferentes puntos de la coordenada de reacción. Derecha: Esquema general de la fuerza de reacción media. Fuente: referencia [94]

encontrar un camino de mínima energía libre. Para incrementar el tiempo de simulación y el muestreo del espacio de configuraciones, en fase acuosa y enzimática, se utilizará una metodología similar a *umbrella sampling* para guiar el sistema a lo largo de una coordenada de reacción ξ , escogida en base al camino de mínima energía libre [45]. Esta coordenada está compuesta por la combinación antisimétrica de las distancias que describen al enlace que se rompe, S-C, y al que se forma, C-O. Es decir, $\xi = d(S - C) - d(C - O)$ [70]. La Figura 2-4 muestra un esquema del proceso.

Restringiendo el grado de libertad correspondiente a la coordenada de reacción en una simulación de dinámica molecular, con un potencial

$$w_i(\xi) = \frac{1}{2}K(\xi - \xi_i)^2 \quad (2-29)$$

podemos permitir el muestreo de los grados de libertad perpendiculares a ella, lo que genera una “Fuerza media” en la dirección de ξ . (véase Figura 2-4). Al desplazar el punto de aplicación de la restricción, será posible obtener la fuerza media para distintos valores de ξ , a través del método *Umbrella Integration* [45].

$$\frac{\partial A_i^u}{\partial \xi} = \frac{\partial A_i^b}{\partial \xi} - \frac{dw_i}{d\xi} = -\left(\frac{1}{\beta}\right)\ln P_i^b(\xi) - \frac{dw_i(\xi)}{d\xi} \quad (2-30)$$

El negativo de esta magnitud se ha denominado Fuerza de Reacción Media (MRF, del inglés *Mean Reaction Force*; $MRF = -dG/d\xi$) [93].

Para el cálculo de MRF se supondrá una distribución normal para P_i^b , obteniendo

la ecuación de trabajo (2-31):

$$\langle F_r \rangle = -\frac{\partial A_i^u}{\partial \xi} = \left(\frac{1}{\beta}\right) \frac{\xi - \hat{\xi}^b}{(\sigma_i^b)^2} - K(\xi - \xi_i^{ref}) \quad (2-31)$$

donde $\langle F_r \rangle$ representa la fuerza de reacción media, $\frac{\partial A_i^u}{\partial \xi}$ es la derivada del potencial de fuerza media bajo la influencia del potencial de restricción con respecto a la coordenada de reacción. $\hat{\xi}^b$ y $(\sigma_i^b)^2$ son el promedio y la varianza de la coordenada de reacción en cada ventana de simulación, donde se le ha restringido con un potencial de constante de fuerza K a un valor ξ_i^{ref} . Basado en la técnica conocida como Fuerza de Reacción [87] es posible descomponer el cambio en energía libre durante una reacción química en contribuciones estructurales y electrónicas. Un esquema ilustrativo se muestra en la parte derecha de la Figura 2-4. El mínimo y máximo de la fuerza de reacción media dividen a la coordenada en tres zonas: reactivos, estado de transición y productos. Como se ha demostrado [33, 68], las zonas de reactivo y producto implican principalmente rearrreglos estructurales de los átomos que permiten llegar a la configuración de estado de transición desde los reactivos o los productos. En la zona del estado de transición se concentran los cambios electrónicos producidos por la ruptura y formación de enlaces.

2.6. Configuración del sistema reactivo

Este trabajo se ha basado en la estructura cristalina publicada en 2008 por Rutherford [72], usando dopamina, que es un sustrato natural de COMT, como molécula catecólica. Se introdujeron modificaciones que tienen en cuenta la observación experimental de una metilación preferente de dopamina en el oxígeno ubicado en posición *meta*-. Esto se basó en análisis anteriores hechos sobre la enzima murina [70, 69]. En particular, una vez sustituido el ligando DNC presente en el cristal por dopamina, se ha dejado solamente el oxígeno en posición *para*- dentro de la esfera de coordinación de magnesio. Para conservar el número de coordinación durante la equilibración del sistema, uno de los oxígenos carboxílicos de Glu199 se hizo interactuar con el catión divalente. Como se muestra en la Figura 2-5 la estructura resultante tiene al oxígeno nucleofílico en la posición de ataque apropiada de acuerdo al producto mayoritario que se observa experimentalmente.

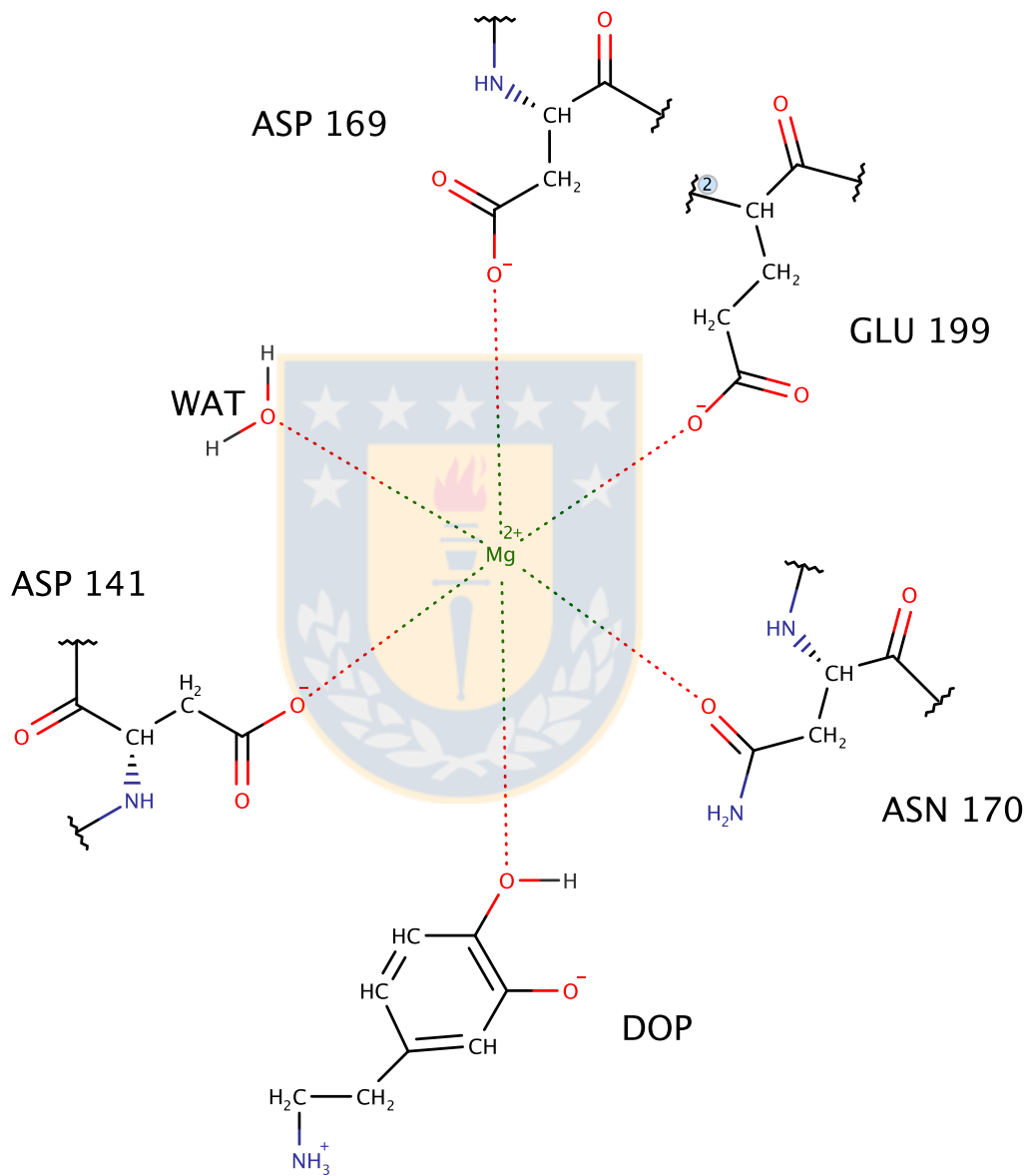


Figura 2-5.: Representación esquemática de la configuración del sitio activo que se utilizó en este trabajo. Fuente: Elaboración propia.

3. Resultados

3.1. Derivación de un campo de fuerzas para S-adenosilmetionina

SAM (Figura 3-1) es el agente alquilante primario en la naturaleza. Está presente en todos los organismos vivos y participa en la biosíntesis de múltiples compuestos donando el grupo metilo unido a su azufre trivalente. Además de la metilación de neurotransmisores que se ha señalado, SAM se involucra en la metilación de ácidos nucleicos y también en la regulación de procesos metabólicos a través de modificaciones en proteínas específicas [42, 5, 81].

Descubierto por Cantoni en 1952 [13], SAM fue conocido por ser inestable en condiciones básicas o a altas temperaturas, las que causan la ruptura de su enlace glicosídico. Sin embargo, en su caracterización también se descubrió que puede mantenerse inerte por varias horas a temperatura ambiente y pH relativamente bajo (3-7) [63, 6]. Bajo estas condiciones se realizaron estudios de espectroscopía ultravioleta y actividad óptica cuyos resultados fueron interpretados en términos de una configuración preferentemente *anti* del enlace glicosídico N29-C27 (ver Figura 3-1) [24, 25, 47]. Esto se confirmó luego a través de mediciones de resonancia magnética nuclear efectuadas en D₂O a pD 3.4 [82]. En este nivel de pH, sin embargo, el grupo carboxilo de metionina y la amina primaria de la porción adenina (pKa=4.15) debieron estar protonados, estado muy diferente al esperable para SAM en condiciones fisiológicas. Ante la duda, un estudio más reciente efectuado por Markham *et al.* [57] confirmó estas observaciones a pH 7 con datos NOESY y ROESY, dando además información valiosa sobre las distancias intramoleculares.

Los estudios computacionales sobre SAM y su implicación en el metabolismo requieren una descripción apropiada de las conformaciones del cofactor en solución acuosa y su interacción con sistemas biológicos. Un tratamiento *ab initio* a través de cálculos de estructura electrónica queda prohibido debido a la extrema flexibilidad de dichos sistemas. Por ello, es preciso contar con parámetros que formen un campo de fuerzas capaz de reproducir correctamente la dinámica conformacional de SAM y sus interacciones, principalmente electrostáticas, con otras moléculas.

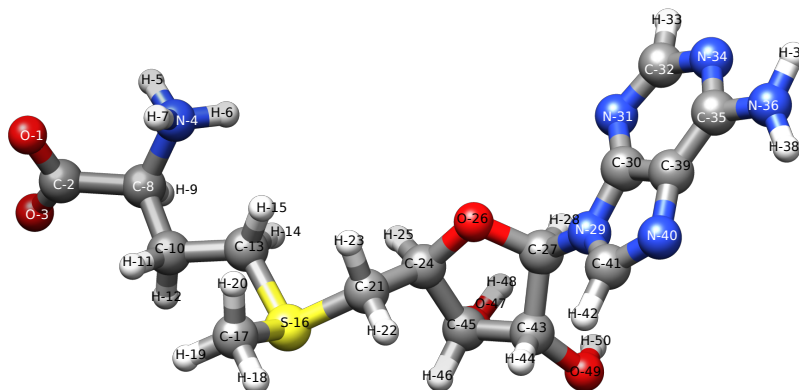


Figura 3-1.: Representación de SAM con los átomos etiquetados en el orden usado a lo largo de este capítulo. Los átomos 1-20 representan el fragmento de metionina, mientras que el resto corresponde a la porción adenosina. Tomado de referencia [74].

En el desarrollo de campos de fuerzas, la descripción de las interacciones intra e intermoleculares es crucial. Existen múltiples ejemplos ampliamente utilizados en el ámbito biológico (CHARMM, OPLS-AA, GROMOS, etc.) que difieren principalmente en su forma funcional y en la manera en la cual se obtienen sus parámetros. El trabajo de este capítulo se enfocó en la derivación de parámetros para SAM directamente desde cálculos de estructura electrónica. Dichos parámetros deben ser capaces de describir la interacción de este cofactor con sistemas biológicos de manera correcta. De los campos de fuerzas disponibles se escogió AMBER99[95] debido a su amplia aplicabilidad, su transferibilidad y su derivación directa desde cálculos *ab initio*.

3.1.1. Parametrización del ángulo diedro C-S-C-C

Como se explica en el capítulo Métodos, la energía potencial de un sistema biológico descrito a nivel de campos de fuerzas se separa en interacciones enlazantes (*e*) y no enlazantes (*ne*).

$$V = V_e + V_{ne} \quad (3-1)$$

Las términos de enlaces, ángulos y ángulos diedros están comprendidos en el potencial enlazante. SAM (ver Figura 3-1) está formado por fragmentos de adenosina y metionina ya presentes en el campo de fuerzas AMBER99 [95]. A fin de asegurar una máxima compatibilidad con el campo de fuerzas original, se mantuvieron sus parámetros de Lennard-Jones y se adoptaron sus parámetros enlazantes, cuando

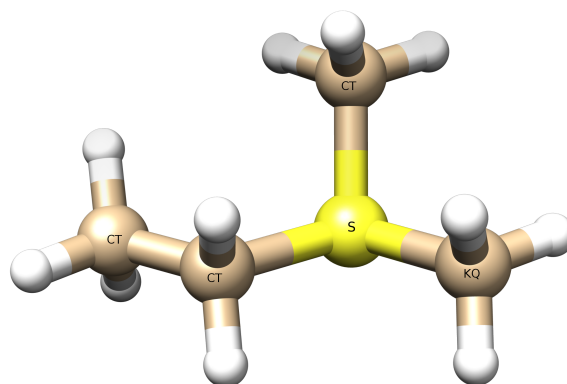


Figura 3-2.: Sistema modelo empleado para derivar los parámetros de enlace del grupo sulfonio. Fuente: referencia [74]

éstos existían. Sin embargo, el grupo sulfonio no está representado en AMBER99 y su descripción requiere parámetros particulares. En principio, se adoptaron aquellos presentes en el campo de fuerzas GAFF [96] verificando la calidad de su descripción por comparación con cálculos de estructura electrónica. Para efectuar esta verificación se definió, de acuerdo al procedimiento estándar de AMBER99 [95], un modelo simplificado de SAM, que combina las estructuras de ángulo y torsiones faltantes en el campo de fuerzas original (ver Figura 3-2).

Los parámetros de ángulo CT-S-CT y CT-CT-S presentes en GAFF reprodujeron de manera correcta la variación de la energía potencial con respecto a la coordenada de ángulo, calculada a nivel HF-6/31G(d) (se usó este nivel de teoría para mantener la consistencia con los demás parámetros existentes en AMBER99). Por otro lado, los parámetros de GAFF para el diedro CT-S-CT-CT mostraron una pronunciada desviación de los resultados *ab initio*. Por ende, se procedió a derivar un nuevo conjunto de parámetros capaces de describir de mejor manera este grado de libertad. Primero, se realizó un barrido relajado de energía potencial *ab initio* (tamaño de paso=1°) a nivel HF/6-31G(d) sobre el diedro CT-S4-CT-CT, presente en la molécula etilmetilsulfonio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SCH}_3$). El software utilizado fue Gaussian03 [27]. Para comparar los resultados *ab initio* con los obtenidos por el campo de fuerzas, se calcularon las cargas RESP para el sistema modelo (posteriormente se hizo lo mismo para las cargas HI). Luego, se optimizaron los parámetros de una serie de Fourier ($n \leq 3$) que representara la energía potencial como función del diedro. La optimización se realizó mediante un algoritmo genético implementado en Pyevolve [66] y su objetivo fue igualar la curva de energía descrita por el campo de fuerzas con la curva *ab initio*. En un segundo paso, se realizó un barrido de energía potencial sobre el ángulo diedro CT-S4-CT-CT del sistema modelo etildimetilsulfonio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$, ver Figura

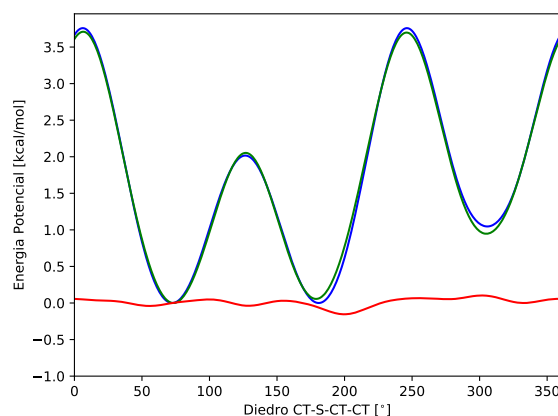


Figura 3-3.: Comparación de la energía potencial como función del ángulo diedro CT-S-CT-CT para el sistema modelo. Nivel de teoría HF-6/31G(d) (línea verde) y parámetros optimizados (línea azul). La delgada línea roja muestra la diferencia energética entre ambas curvas. Fuente: referencia [74].

3-2). Debido a que los parámetros de diedro en el contexto de AMBER se basan en la identificación de un tipo de átomo, en este segundo paso se renombró el átomo CT del grupo metilo presente en el primer paso a KQ, a fin de evitar un doble conteo del potencial antes derivado. Es necesario enfatizar que el tipo de átomo KQ posee los mismos parámetros enlazantes y de Van der Waals que el átomo CT del paso anterior. Tal como se describió para el paso inicial, se obtuvieron parámetros de Fourier capaces de describir la torsión del diedro CT-S4-CT-CT del grupo metilo adicional presente en etildimetilsulfonio. Dichos parámetros fueron nuevamente calculados a través de comparación con resultados *ab initio* y posterior optimización.

La Figura 3-3 compara la energía potencial como función del ángulo diedro, tanto en el caso de cálculos *ab initio* HF-6/31G(d), como en el del sistema descrito a nivel de campo de fuerzas con parámetros optimizados. Se reprodujo la energía *ab initio* con una diferencia menor a $0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Para testear la calidad de los parámetros optimizados en la descripción de SAM se calcularon las cargas atómicas con el método RESP para la molécula completa, de acuerdo al procedimiento estándar de parametrización en AMBER. Luego, se realizó una simulación de dinámica molecular de 500 ns en solvente explícito. El objetivo fue asegurar un muestreo completo de las conformaciones relevantes. Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron con el software GROMACS 4.6.5. El Δt utilizado fue de 2 fs en combinación con el termostato V-rescale [11] ($\tau = 0,1 \text{ ps}$, $T = 298 \text{ K}$) y el barostato Parinello-Rahman ($P = 1 \text{ bar}$). [65] Las interacciones electrostáticas se calcularon con el método Particle Mesh Ewald, un radio de corte de 0.9 nm, orden 4

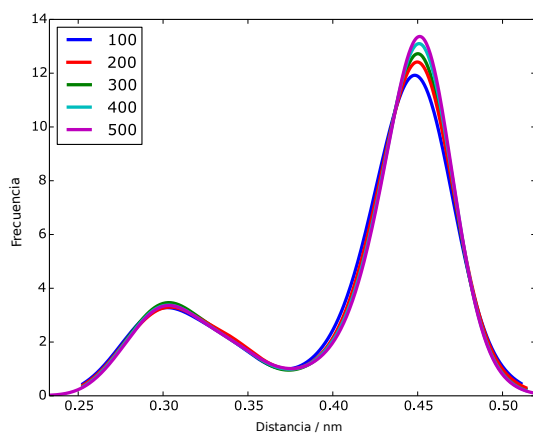


Figura 3-4.: Distancias entre H-25 y el grupo metilo sulfónico a diferentes tiempos de simulación. Fuente: Elaboración propia.

y un espaciado de 0.16 nm. Las interacciones de Van der Waals se describieron con una función de cambio que anula las fuerzas entre 0.8 y 0.9 nm. Todos los enlaces a átomos de hidrógeno fueron restringidos con el algoritmo LINCS, orden 4. SAM se solvató en una caja dodecaédrica de 295 nm³ de volumen, llena con 9807 moléculas de agua descritas por el modelo SPC/E, 28 iones sodio y 29 iones cloruro, a fin de mantener neutralidad eléctrica. La validación de los parámetros se realizó calculando las distancias intramoleculares NOE proton-proton, obtenidas de las simulaciones de acuerdo al procedimiento descrito por Daura *et al.* [19] con los valores experimentales reportados por Markham *et al.* [57]

La distribución de distancias interprotónicas y las distancias NOE derivadas convergieron después de aproximadamente 200 ns (ver Figura 3-4).

H _i	H _j	RESP	HI	D-HI	Exp.
Metilo(18-20)	Beta(14-15)	3.6	3.4(3.5)	3.4(3.6)	3.7
42	44	3.6	3.1	3.4	3.1
42	46	3.7	3.1	3.4	2.9
42	28	2.7	2.8	2.7	2.6
44	28	2.9	2.9	2.9	2.9
Metilo(18-20)	25	4.0	3.7	3.5	3.8

Tabla 3-1.: Comparación de las distancias NOE proton-proton experimentales en Å. [57] Las etiquetas de los átomos se indican en Fig. 3-1. La comparación se hace con respecto a las distancias obtenidas en simulaciones de dinámica molecular de SAM en solvente explícito con cargas calculadas usando métodos RESP, HI o D-HI. Los valores en paréntesis corresponden a simulaciones para las cuales la parametrización de CT-CT-S-CT se hizo con cargas HI. Fuente: Elaboración propia.

El conjunto completo de los valores experimentales reportados para las distancias se muestra en la Tabla **3-1**. Como comparación se realizó una segunda simulación con los parámetros reportados por Stacklies *et al.* [80] usando los valores estándar de GAFF. En primer lugar, la distancia beta(H14,H15)-metilo(H18-H20) (ver Figura **3-1**) resultó ser la más sensible a los nuevos parámetros obtenidos. El nuevo conjunto reprodujo el valor experimental reportado de 3.7 Å, mientras que los parámetros de Stacklies subestiman la distancia en un 14 % (3.2 Å). Se debe enfatizar que esta distancia no se usó en la parametrización, por tanto representa una mejora considerable sobre los valores de GAFF empleados por Stacklies *et al.* Adicionalmente, aunque un error de 14 % puede considerarse aceptable, es importante notar que la distribución de distancia y por tanto, la distribución conformacional, varían considerablemente entre los dos conjuntos de parámetros (ver Figura **3-5**).

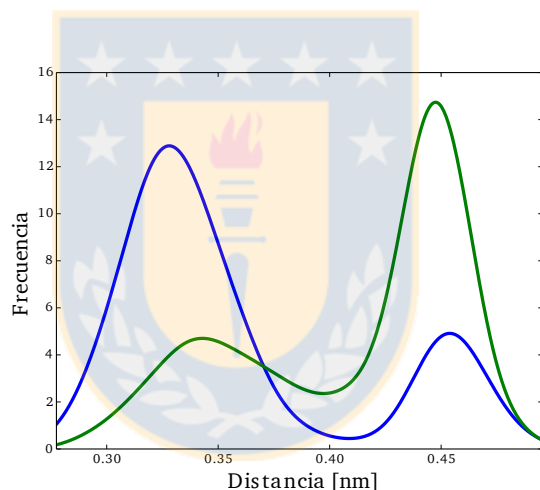


Figura 3-5.: Distribución de distancias entre los protones del grupo metilo y los protones sobre el carbono beta. Para los parámetros de Stacklies (azul) y para los parámetros optimizados (verde). Aunque el error numérico de las distancias NOE reportadas es de sólo 14 % para los parámetros de Stacklies [80], la distribución muestra una gran variación, indicando cambios significativos en las conformaciones más estables. Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados confirman estudios experimentales previos que han indicado que el promedio $r^{1/6}$ de las señales NOE es sensible principalmente a cambios en la distribución de distancias protón-protón cortas, mientras que no captura de manera adecuada cambios notorios en las poblaciones de diferentes estados conformacionales [19, 10, 103].

Observaciones adicionales basadas en espectroscopía IR, UV, dicroísmo circular y espectroscopía NMR concluyeron que el enlace glicosídico podría adoptar una configuración *anti*, además de la *syn* encontrada en múltiples proteínas cristalizadas

[24, 25, 47].

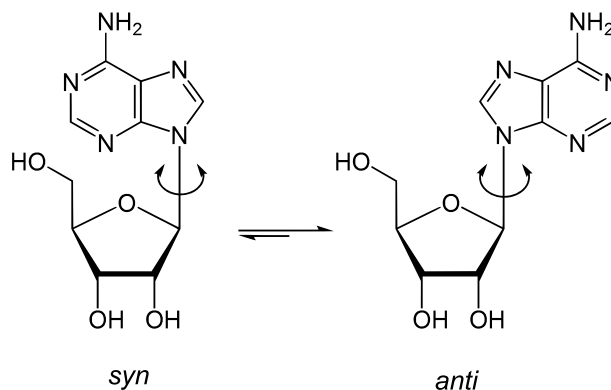


Figura 3-6.: Conformaciones *syn* y *anti* que puede adoptar el nucleósido adenosina. Fuente: Elaboración propia.

En términos de las distancias NOE intramoleculares, las distancias H42-H44 y H42-H46 son las más sensibles a cambios en el ángulo glicosídico. En las simulaciones con parámetros optimizados no se observó ninguna conformación *anti*, y la desviación de la distancia H42-H46 con respecto al valor experimental fue de aproximadamente 1.42Å. Recientemente, Yildirim *et al.* [102] reportó la deficiencia del campo de fuerzas AMBER99 para reproducir la distribución conformacional del enlace glicosídico en adenosina y propuso nuevos parámetros en la forma de una variante del campo de fuerzas original llamada AMBER χ . Se repitieron los 500ns de simulación reemplazando los parámetros para la torsión del enlace glicosídico, logrando reducir el error en la distancia H42-H46 a 0.4Å. Con este conjunto de parámetros enlazantes optimizados fue posible observar la conformación *anti*, y la distribución de distancias H42-H46 reveló un cambio pronunciado que incrementó especialmente la frecuencia de distancias cortas, correspondientes a una conformación *anti* (ver Figura 3-7). Este aumento de población a distancias cortas explica, de acuerdo a Burgi *et al.* [10], la mejora en la predicción de las distancias NOE.

Habiendo validado los parámetros enlazantes para el grupo sulfonio y reemplazado los parámetros de torsión para el enlace glicosídico con los valores de AMBER χ se obtuvo un conjunto de parámetros enlazantes que son consistentes con las distancias intramoleculares reportadas experimentalmente. Adicionalmente, estos valores reproducen el valor experimental de pliegue conformacional (*puckering*, conformación C_3 -endo) del anillo de ribosa [57] y la conformación *gauche-trans* ($\theta \approx -60^\circ$) observada experimentalmente para el diedro S16-C21-C24-H28 [82]. Este conjunto de parámetros se muestra en la Tabla A-2.

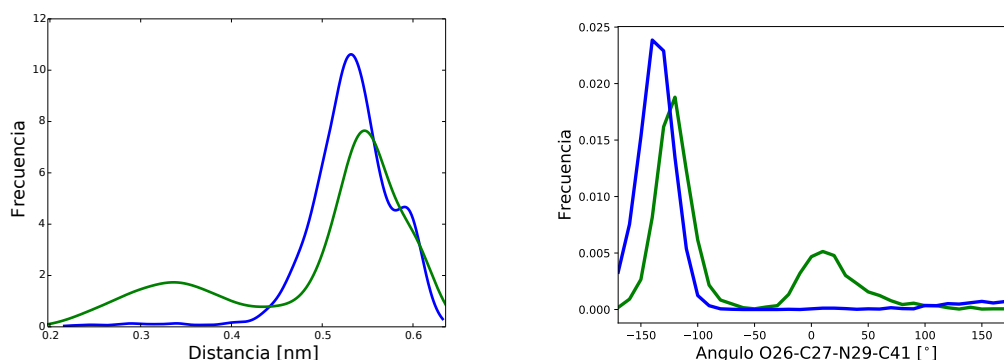


Figura 3-7.: Distribución de distancia entre H42-H46 y ángulo diedro O26-C27-N29-C41. Izquierda: Distribución de distancia entre H42-H46 en simulación de dinámica molecular de 500ns empleando los parámetros de torsión optimizados para el diedro CT-S-CT-CT y AMBER99 (azul) y con la misma torsión CT-S-CT-CT pero esta vez AMBER χ (verde). Las conformaciones *anti* corresponden a menores distancias y las *syn* a distancias mayores. Derecha: Distribución del ángulo diedro O26-C27-N29-C41. La línea azul representa los parámetros de AMBER99 y la línea verde el desempeño de los parámetros AMBER χ . En esta última, se observa un incremento en las conformaciones cerca de 0°, lo que es concordante con las observaciones experimentales que asignan un rol predominante a la conformación *anti*. Fuente: Elaboración propia.

3.1.2. Cálculo de cargas atómicas

En un segundo paso, se abordó la descripción de las interacciones electrostáticas de SAM con proteínas. Además de recurrir al método RESP normalmente usado en el campo de fuerzas AMBER, se derivaron cargas atómicas directamente desde la densidad electrónica. La ventaja de este enfoque en comparación al ajuste al potencial electrostático molecular implicado en RESP yace en su localidad. Es conocido que las cargas atómicas derivadas del potencial electrostático no describen de manera adecuada las cargas de átomos distantes de la superficie molecular. Para evitar este problema se utilizaron las cargas de Hirshfeld-I (HI) [9] derivables a partir de cálculos de estructura electrónica. Para el cálculo de cargas RESP se utilizó el software Gaussian 03 [27] en la generación del potencial electrostático *ab initio*, mientras que con RED III.5 [20] se realizó el ajuste. La densidad electrónica necesaria para el esquema de Hirshfeld-I, en cambio, fue calculada con Gaussian 03 y luego las cargas se obtuvieron con Horton 1.2.0. Como se demostrará, estas cargas reproducen el potencial electrostático molecular de manera correcta y adicionalmente son independientes de la conformación molecular, que es otra desventaja presente en los esquemas ESP y RESP [90]. Un conjunto completo de las cargas atómicas calculadas se da en la Tabla A-1.

La Figura 3-8 muestra, a través de un código de colores, las cargas HI calculadas

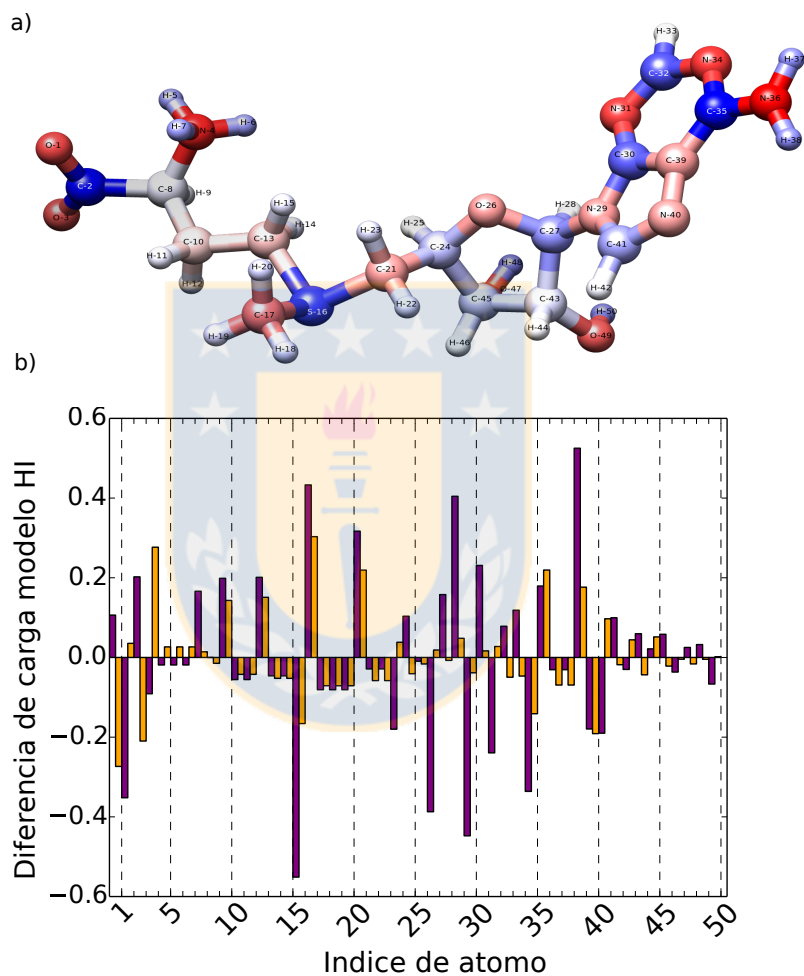


Figura 3-8.: a Cargas atómicas HI de SAM. Codificación en base a colores (azul: positivo, rojo: negativo). b Diferencia en unidades atómicas entre las cargas HI y RESP (barras púrpura) junto a HI y D-HI (barras amarillas) para cada átomo en SAM. Fuente: Elaboración propia.

para SAM optimizado en vacío a nivel HF/6-31G(d). Las mayores cargas se observan sobre los átomos en el grupo carboxilo, amino y sulfonio del fragmento de metionina, los grupos hidroxilo de la ribosa, y los heteroátomos de la base púrica. Para verificar que estas cargas describen de manera correcta la electrostática de la molécula en vacío, se ha comparado el potencial electrostático *ab initio* con el obtenido en base a las cargas RESP y HI. Hirshfeld-I entrega un valor de RMSD de 0.045 unidades de carga con respecto al cálculo de estructura electrónica el mismo comportamiento que muestra el esquema RESP. Análogamente, se han comparado los valores de momento dipolar obtenido en las tres formas ya descritas, esta vez para la molécula *S*-adenosilhomocisteína (SAM desmetilado). Los valores entregados por HI siguen siendo cercanos a los entregados por las cargas RESP. En conclusión, se puede argumentar que las cargas HI describen la electrostática global de SAM tan bien como las cargas RESP. En un segundo paso, se testeó la dependencia conformacional de las cargas RESP y HI, que en simulaciones de dinámica molecular con campos de fuerzas no polarizables debería ser mínima. Se tomaron cuatro estructuras representativas con conformaciones diferentes (distintos valores de torsión, ángulos, etc.) de la dinámica molecular de 500 ns con parámetros optimizados y se recalcaron las cargas RESP y HI. Para excluir cualquier artefacto debido a las diferentes orientaciones las cargas RESP se calcularon con el software RED III.5, que primero orienta la molécula siguiendo un algoritmo definido. Como medida de los cambios sufridos por las cargas en cada conformación se calculó el RMSD de todas las cargas con respecto a las cargas en la estructura inicial.

Método	Conf. 1 [e]	Conf. 2 [e]	Conf. 3 [e]	Conf. 4 [e]
RESP (antechamber)	0.93	1.24	1.07	1.16
RESP (RED-III.5)	0.94	0.79	0.84	0.82
Hirshfeld-I	0.27	0.26	0.28	0.26

Tabla 3-2.: RMSD de todas las cargas atómicas en cada conformación calculado con respecto a las cargas obtenidas para la estructura de inicial. Unidades de carga elemental. Fuente: Elaboración propia.

El RMSD observado para las cargas RESP fue de 1.1 unidades de carga elemental, mientras que las cargas HI mostraron un RMSD de 0.26e. Esto muestra claramente que las cargas HI son mucho menos dependientes de la conformación que las cargas RESP y por ende, serían más apropiadas para simulaciones de dinámica molecular.

Pese a esto, las cargas HI no son capaces de tener en cuenta el efecto del solvente, debido a que se derivan de la densidad electrónica calculada en vacío. En solución acuosa, se espera que la densidad electrónica muestre una mayor polarización. Por ende, es posible que las conformaciones adoptadas por la molécula difieran de las

observadas para cargas HI. Para tener en cuenta esto, se realizó 1 ns de simulación de dinámica molecular en solvente explícito, donde las cargas se actualizaron cada 1 ps a través de un cálculo QM/MM (SAM en zona QM, zona MM para el solvente) hasta que los valores de carga convergieron. Para distinguirlas de las cargas anteriores, se les ha llamado cargas D-HI.

Como se ha mencionado antes, las cargas atómicas se muestran en la Tabla **A-1**. Para visualizar las diferencias entre los métodos de derivación de carga, la Figura **3-8b** indica la variación entre las cargas HI en vacío y las cargas D-HI para cada átomo, calculadas en solvente (barras amarillas). Tal como se esperaba, la polarización del solvente de la densidad electrónica origina valores absolutos mayores de carga atómica para los átomos en los grupos carboxilo, amino y sulfonio, como también el grupo amino de la adenina. En la misma figura se muestra, para comparación, la diferencia entre las cargas HI y las cargas derivadas con RESP (barras púrpura). Claramente existen diferencias pronunciadas en los átomos internos lejanos a la superficie, como el azufre del grupo sulfonio y hay también un cambio notorio en las cargas de adenina, que podría deberse a la restricción artificial impuesta por el método RESP sobre la carga de los átomos de carbono.

3.1.3. Estabilidad en dinámica molecular de los parámetros derivados

Con estos tres conjuntos de cargas atómicas, junto a los parámetros enlazantes optimizados previamente, se realizaron 500 ns de dinámica molecular en solvente explícito y se compararon las distancias NOE interprotónicas con sus análogos experimentales (ver Tabla **3-1**). Las cargas HI y D-HI mejoran la mayoría de las distancias, llevando sus valores más cerca de los observados experimentalmente. Solamente las distancias que implican al grupo metilo difieren de los valores experimentales. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que las cargas RESP se utilizaron en la parametrización de los diedros implicados en tales distancias. Por tanto, se calcularon las cargas HI del sistema modelo (Figura **3-2**) y se emplearon para derivar nuevos parámetros para el diedro CT-S-CT-CT. Las simulaciones con estos parámetros optimizados nuevos entregan distancias metilo-beta de 3.5 y 3.6 Å respectivamente para los métodos HI y D-HI.

Las cargas D-HI, junto a los parámetros optimizados para el diedro CT-CT-S-CT constituyen un conjunto de parámetros que reproduce las distancias NOE experimentales y las conformaciones observadas en solución acuosa [24, 25, 47]. Estas cargas reflejan el potencial electrostático molecular promedio de la molécula polarizada por el solvente, ya que se ha demostrado previamente que las cargas HI reproducen es-

ta magnitud en vacío. Debido a esto, la inclusión del solvente en forma de cargas puntuales en la simulación de dinámica molecular debería entregar la polarización promedio. Por ende, el potencial electrostático molecular promedio derivado de las cargas D-HI debería ser representativo para simulaciones en fase condensada y para reproducir interacciones entre SAM y proteínas o ácidos nucleicos. Esto se cumple siempre que la polarización por parte de las moléculas biológicas pueda ignorarse. De surgir efectos importantes de polarización que no puedan despreciarse, un nuevo conjunto de cargas podría derivarse incluyendo esos efectos.

Una vez que se derivaron los parámetros óptimos, se estudió su capacidad de describir las interacciones de SAM con diferentes proteínas. Para seleccionar posibles candidatos se realizó una búsqueda en la base de datos PDB a fin de hallar estructuras cristalinas de proteínas humanas determinadas por rayos X que contuviesen SAM a una resolución máxima de 2.0Å. Considerando solamente estructuras publicadas, la búsqueda arrojó tres resultados: Leucina Carboximetiltransferasa 1 (LCMT1, PDB-ID:3O7W), homólogo humano FtsJ 2 (PDB-ID:2NYU) y SET7/9 (PDB-ID:1N6A).

La función biológica de estas proteínas da una buena panorámica de la importancia de SAM en el mundo vivo. LCMT1 [88] transfiere un grupo metilo al carboxilo terminal de la leucina 309 en la Proteína Fosfatasa 2 (PP2A). El estado de metilación de PP2A influye sobre una subunidad reguladora que controla la actividad y la localización de la proteína. EL homólogo humano FtsJ 2 [52] está implicado en el ciclo celular y la reparación de DNA. Set7/9 [51] es una metiltransferasa de histonas. Transfiere un metilo a la Lys 4 de la histona H3. Está implicada en el proceso de replicación de DNA.

Estas tres proteínas, con SAM unido a ellas, fueron simuladas por 500ns en solvente explícito, siguiendo los protocolos de las anteriores simulaciones. A continuación se efectuó análisis de clusters [35] con el método de enlace único, a fin de obtener estructuras representativas de estas trayectorias. La estructura promedio del cluster más extenso representó 75-100% de todas las estructuras generadas y se tomó como estructura representativa. La Figura **3-9** muestra las cavidades de las tres proteínas con SAM en su configuración cristalizada (café). En la misma figura se representa la estructura representativa obtenida desde las simulaciones de dinámica molecular (azul). Se observa que SAM mantiene su conformación dentro de la cavidad y la proteína mantiene su conformación global, lo que se refleja en un RMSD constante de aproximadamente 1 Å. Todas las interacciones importantes de SAM con residuos proteicos deducibles de la cristalografía se conservan durante las simulaciones. A fin de cuantificar la desviación de SAM con respecto a la estructura determinada por rayos X se calculó el RMSD de las posiciones atómicas con respecto a la estructura experimental como función del tiempo (ver Figura **3-10**). En los tres casos, SAM

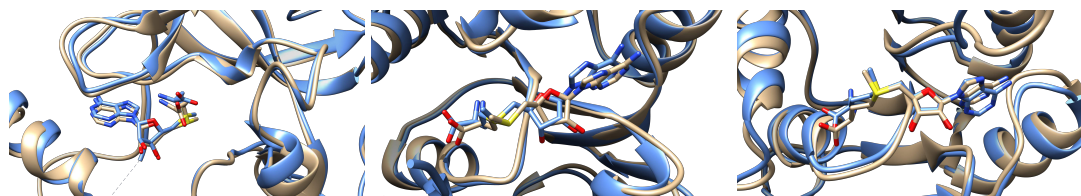


Figura 3-9: Superposición de una estructura representativa de las simulaciones de dinámica molecular (azul) y cristalina (café). Sistemas Set7/9 histona metiltransferasa, Leucina Carboximetiltransferasa 1, y PtsJ homólogo humano (de izquierda a derecha). Fuente: Elaboración propia.

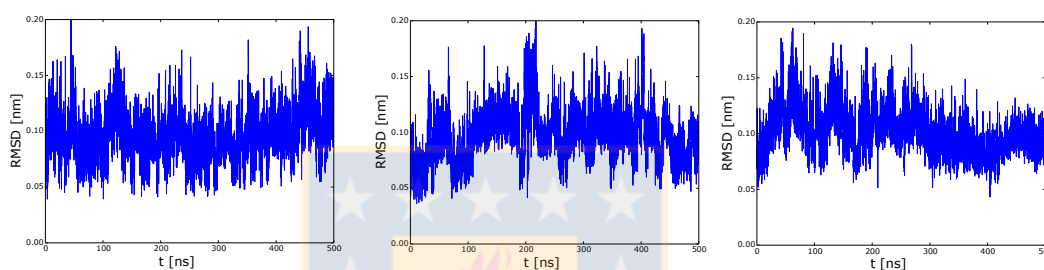


Figura 3-10: RMSD de las posiciones atómicas de SAM en simulaciones de dinámica molecular. Sistemas Set7/9 histona metiltransferasa, Leucina Carboximetiltransferasa 1, y PtsJ homólogo humano (de izquierda a derecha). Fuente: Elaboración propia.

se mantiene en su posición durante la simulación con un RMSD constante, de valor esperable debido a las fluctuaciones térmicas. Algunos cambios conformacionales locales y menores se observaron en algunas proteínas y pueden estar relacionados con rotaciones en las cadenas laterales de los residuos interactuantes.

3.1.4. Conclusión

En resumen, en esta sección se ha mostrado el desarrollo de un campo de fuerzas para SAM con cargas D-HI derivadas directamente de la densidad electrónica polarizada en solución acuosa. Este campo de fuerzas reproduce las distancias NOE experimentales y las preferencias conformacionales de SAM de acuerdo a varias evidencias experimentales. En concordancia con las cargas HI, las cargas D-HI reproducen el potencial electrostático polarizado promedio de SAM en solución acuosa y dan cuenta de sus interacciones al interior de cavidades proteicas. Este campo de fuerzas se utilizó en las posteriores simulaciones de SAM involucradas en esta tesis.

3.2. Efecto del entorno sobre la transferencia de metilo en un sistema modelo.

Las reacciones de metilación constituyen una parte importante del metabolismo de los seres vivos. El proceso catalizado por COMT exhibe complejidades, tanto a nivel general como particular, que debieron ser ponderadas antes de abordarse en un estudio de química computacional. Dentro de las definiciones necesarias destacaron la elección de un método de mecánica cuántica capaz de generar una dinámica extensa en un tiempo de cálculo razonable y también la necesidad de conocer anticipadamente las características principales de la coordenada de reacción, a fin de describirla correctamente. Por último, fue necesario tener en cuenta el entorno de la reacción de transmetilación: La desaparición de la carga eléctrica en los átomos directamente implicados puede resultar en una influencia significativa del entorno molecular, el cual en primera aproximación se puede describir por distintos modelos de solvente.

En este capítulo se abordaron estas interrogantes a través de un sistema modelo simplificado. Se estudió la reacción entre trimetilsulfonio y fenolato (ver Figura 3-11) empleando cálculos *ab initio* de alto nivel para obtener la barrera de activación de energía potencial en vacío (como valor de referencia) en combinación con varios modelos de solvente implícito. También se evaluó la factibilidad de reproducir cambios termodinámicos a través de cálculos QM/MM con métodos semiempíricos (AM1 y DFTB3) en dinámica molecular. La elección del sistema reactivo se basó en la existencia de mediciones experimentales sobre la energética de la reacción [85], que permiten efectuar comparaciones con diferentes métodos computacionales. Esto permitió validar el nivel de teoría, visualizar la coordenada de reacción intrínseca y aplicar múltiples descriptores a lo largo de ella, con el fin de identificar en este sistema simplificado procesos de importancia físico-química, como los rearrreglos estructurales, transferencias electrónicas, rompimiento y formación de enlaces.

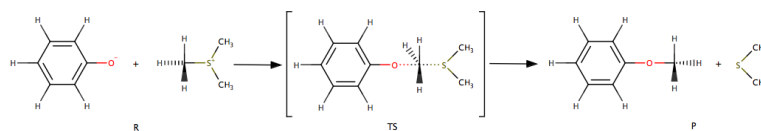


Figura 3-11.: Esquema de la reacción entre fenolato y trimetilsulfonio para formar dimetilsulfuro y anisol. Fuente: Elaboración propia.

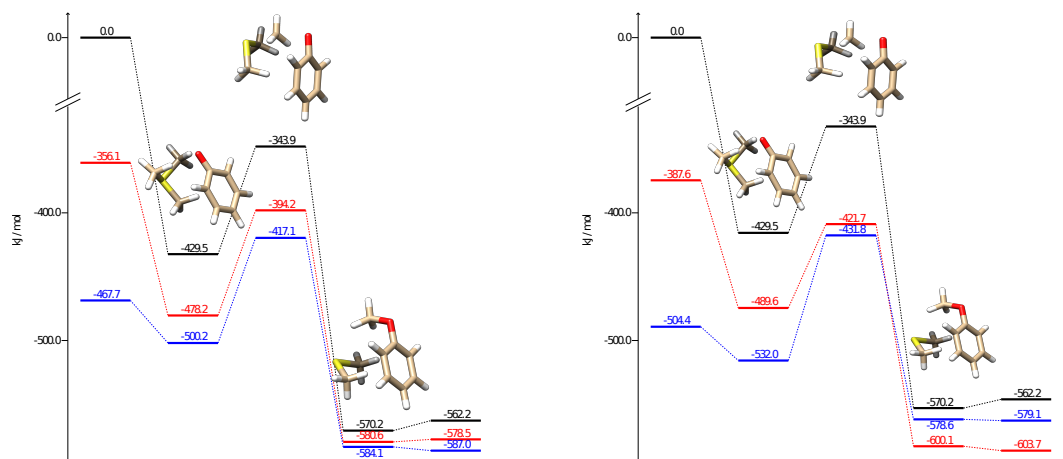


Figura 3-12.: Esquema que muestra la energía potencial relativa de los reactivos libres, el precomplejo, estado de transición, complejo de productos y finalmente productos libres en tres entornos. Vacío (negro), dietiléter (rojo) y agua (azul) a nivel de teoría M06-2X/6-311+G(d,p) sin incluir la energía de punto cero. Las estructuras corresponden al complejo de la configuración reactiva, de la configuración de productos y al estado de transición en vacío. Izquierda: modelo solvente PCM, Derecha: modelo solvente SMD. Fuente: referencia [73].

3.2.1. Energética de la reacción

El primer paso en la reacción de transferencia de metilo es la aproximación de los dos reactantes aislados - trimetilsulfonio y fenolato - para formar un precomplejo que luego evoluciona, pasando por el estado de transición, hasta llegar a la configuración de productos. Los dos productos - anisol y dimetilsulfuro - forman un postcomplejo, representado por un mínimo de energía potencial, el cual luego se disocia en moléculas aisladas. Para hallar la estructura molecular del precomplejo y postcomplejo mostrados en la Figura 3-12, primero se halló la configuración del estado de transición. Esto se hizo en vacío y en dos solventes implícitos, escogiendo constantes dieléctricas correspondientes a dietiléter y agua. La elección de dietiléter se debió a que esta constante dieléctrica, se ha supuesto similar a la existente dentro de una cavidad proteica. A continuación, se obtuvo la coordenada intrínseca de reacción (IRC) empleando el funcional M06-2X [106] con la base 6-311+G(d,p). Mediante ella se hallaron las configuraciones de mínima energía potencial correspondientes a los reactivos interactuantes (precomplejo) y los productos interactuantes (postcomplejo). Todos los puntos estacionarios se verificaron mediante un análisis vibracional. Se utilizó el software Gaussian 09 para estas tareas [28]. Las diferencias de energía en cada uno de estos pasos con respecto a los reactivos libres en vacío se resumen en la Tabla 3-3 y se muestran esquemáticamente en la Figura 3-12.

	Reactivos Aislados	Precomplejo	Estado Transición	Postcomplejo	Productos Aislados
DFTB3 (3ob)	0	-407.2	-337.3	-577.9	-600.1
M06-2X/6-311+G(d,p)	0	-429.5	-343.9	-570.2	-562.2
ΔE_{comp}	0	-426.3	-337.2	-553.9	-546.6

Tabla 3-3.: Energía potencial de precomplejo, estado de transición y postcomplejo, además de los productos aislados. Valores relativos a los reactivos aislados. Unidades: kJ mol⁻¹. Fuente: Elaboración propia.

En vacío todas las etapas de la reacción se encuentran por debajo de la energía de los reactivos libres, ya que el carácter catiónico de trimetilsulfonio y aniónico de fenolato les hace menos estables que los productos neutros o que el precomplejo formado por moléculas con cargas opuestas.

Si bien el funcional M06-2X se parametrizó para entregar barreras de activación precisas, en este trabajo se efectuaron cálculos de correlación explícita para cada una de las estructuras importantes del proceso (reactivos y productos libres, estado de transición, precomplejo y postcomplejo) con funciones de onda cc-pVXZ[43, 99] y cc-pVXZ-F12 (X=T,Q)[67]. El objetivo fue contar con una referencia adecuada para validar la exactitud de otros métodos más sencillos en la descripción de esta reacción (ver Tabla 3-3). La energía resultante de este cálculo se refiere como ΔE_{comp} (Ver Ecuación 3-2) y fue obtenida con el software Molpro [97].

$$\Delta E_{comp} = \Delta E(MP2 - F12/VQZ - F12) + \Delta E_{CC}(VTZ - F12) \quad (3-2)$$

$$\Delta E_{CC}(VTZ) = E(DF-LCCSD(T)-F12/VTZ-F12) - E(DF-LMP2/VTZ-F12) \quad (3-3)$$

La comparación muestra que el funcional M06-2X se comporta relativamente bien en el precomplejo reactivo y el estado de transición, pero se desvía considerablemente en el postcomplejo y los productos aislados. Predice una energía de reacción 16 kJ mol⁻¹ más exotérmica (reactivos aislados *vs* productos aislados) que la energía ΔE_{comp}

Debido a que el estudio del mecanismo de reacción también incluyó simulaciones de dinámica molecular, se necesitó recurrir a un método semiempírico de bajo costo. Considerando que el funcional M06-2X demostró resultados aceptables, se escogió el método semiempírico DFTB3 con el set de parámetros 3ob, desarrollados para cálculos en el ámbito biológico. La Tabla 3-3 muestra las energías obtenidas usando DFTB3, en comparación a M06-2X y el cálculo de referencia. El método semiempírico reproduce la energías del estado de transición relativamente bien y sus valores, tal

como se esperaba, se acercaron a los obtenidos por M06-2X. El buen desempeño de DFTB3 con parámetros 3ob se debe probablemente a la inclusión, en su fase de parametrización, de reacciones comparables como $CH_3SH + H_2O \rightarrow CH_3OH + H_2S$, $S_2 + 2H_2 \rightarrow 2H_3S$ y $O_2 + 2H_2 \rightarrow 2H_2O$. Ellas fueron descritas de manera bastante satisfactoria por este método semi-empírico con un error de 4-8 kJ mol⁻¹ en las energías de reacción.

Habiendo validado el método de estructura electrónica, se procedió a evaluar la influencia del entorno, representada implícitamente por los solventes dietiléter y agua. Esto se aplicó en todos los pasos de análisis arriba descritos, en combinación con el funcional M06-2X. En esta etapa, a fin de recrear el efecto de los solventes se utilizó el modelo polarizable continuo (PCM) con radio UFF y una constante dieléctrica de 78.322 (agua) y 4.24 (dietiléter). Las energías en cada entorno se muestran a la izquierda en la Figura 3-12, tomando los reactantes libres en fase gaseosa como estado de referencia. También se utilizó el modelo de solvente implícito SMD [56], cuyo esquema de energías se muestra a la derecha en la Figura 3-12. La influencia del solvente se observa claramente en los reactivos aislados, cuya carga eléctrica hace que se estabilicen considerablemente dependiendo de la polaridad del solvente, asociada a la constante dieléctrica del medio continuo. Para el agua, la barrera de activación yace sobre la energía de los reactivos aislados y la energía de reacción es más pequeña, lo que se relaciona con la solvatación favorable de los reactivos cargados, incrementando la diferencia energética con el estado de transición y disminuyéndola con respecto a los productos eléctricamente neutros.

3.2.2. Mecanismo de reacción

Para estudiar el mecanismo de reacción, se ha seguido la coordenada de reacción intrínseca desde la estructura del estado de transición hasta reactivos y productos. Por el lado de los reactivos, se encontró el precomplejo, mientras que por el lado de los productos se alcanzó la configuración de postcomplejo (ver Figura 3-12 izquierda). El precomplejo corresponde a un par iónico, mientras que el postcomplejo se mantiene unido a través de interacciones dipolo-dipolo entre dimetilsulfuro y anisol. En todos los entornos testeados, excepto el agua, los complejos se sitúan energéticamente por debajo de los productos y reactivos aislados. En agua, el postcomplejo es ligeramente menos estable que los productos aislados.

Como se ha demostrado en una reciente revisión [101], en vacío, la formación de precomplejos y el mecanismo de reacción dependen de la energía de impacto. Dada la energía de activación fuertemente negativa, es válido suponer que para la reacción estudiada la interacción electrostática eliminaría cualquier barrera que dificulte el

acercamiento (sin considerar barreras rotacionales). Sin embargo, este trabajo no se enfocó en el mecanismo de reacción en vacío, el interés apuntó a la reacción desde el precomplejo, pasando por el estado de transición, hasta el postcomplejo (etapas mostradas con estructuras químicas en la Figura 3-12). En fase condensada, la formación del complejo está controlada por difusión, y depende de la polaridad del solvente. De acuerdo a esto, y coincidiendo con la evidencia experimental, el paso limitante de la velocidad es la ruptura y formación de enlaces que surgen en el estado de transición.

La Figura 3-13 muestra la energía potencial y la fuerza de reacción como función de la coordenada IRC para la transferencia de metilo entre trimetilsulfonio y fenolato. La línea negra indica un entorno vacío, rojo dietiléter y azul agua. A la izquierda podemos observar los resultados en el medio PCM, mientras que a la derecha se observan en el solvente implícito SMD. La fuerza de reacción provee un marco de trabajo que permite separar el costo energético correspondiente a rearrreglos estructurales, de aquellos cambios con origen electrónico, por ejemplo la migración de la densidad electrónica entre ambos reactivos. En los diferentes entornos, los perfiles comienzan con variaciones estructurales que buscan alinear los átomos de azufre, carbono y oxígeno en un ángulo cercano a los 180° , que es el alcanzado en el estado de transición (ver estructuras en Figura 3-12). Durante estos cambios estructurales, la fuerza de reacción tiene un valor pequeño en todos los ambientes. Cerca del valor de $\xi = -2amu^{-1/2}a_0$ se observa una pronunciada disminución en la fuerza de reacción, también común en todos los ambientes. El mínimo se alcanza en $\xi \simeq 1amu^{-1/2}a_0$, donde la mayoría de los cambios estructurales se ha completado. Desde el mínimo al máximo de la fuerza de reacción (puntos marcados por líneas discontinuas verticales) se generan principalmente cambios electrónicos, que luego se confirmaron al observar el comportamiento del flujo electrónico y los cambios en el orden de los enlaces implicados en ruptura y formación. Es interesante notar que la energía de activación no se ve afectada fuertemente por el solvente, mientras que la energía de reacción cambia dramáticamente al comparar los procesos en vacío y agua.

El análisis de fuerza de reacción permitió cuantificar las contribuciones energéticas a la barrera de activación. Estas contribuciones tienen una naturaleza más estructural (W_1), o bien pueden describir cambios de origen preferentemente electrónico (W_2). Como se muestra en la Tabla 3-4 la contribución W_1 es siempre mayor que W_2 . La influencia del solvente se observa claramente en este último término, que se incrementa considerablemente con la polaridad del solvente. La explicación de este hecho se relaciona con la redistribución de carga requerida para alcanzar el estado de transición desde los reactivos. A esta redistribución se le asocia un mayor costo energético en solventes polares, que tienden a estabilizar más fuertemente la

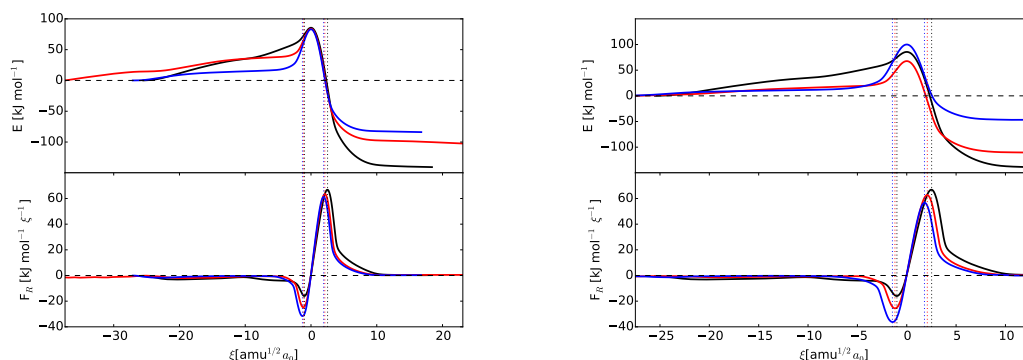


Figura 3-13. Energía potencial (superior) y fuerza de reacción (inferior) a lo largo de la coordenada intrínseca de reacción para la transferencia de metilo entre trimetilsulfonio y fenolato. La línea negra indica un entorno vacío, rojo dietiléter y azul, agua. La fuerza de reacción muestra las tres regiones definidas por sus valores extremos. Izquierda: solvente PCM, Derecha: solvente SMD. Fuente: Elaboración propia.

distribución de cargas separada en los reactivos individuales.

	ΔE^\ddagger	ΔE°	W_1	W_2	W_3	W_4
Vacío	85.6	-140.8	75.0	10.6	-100.3	-126.1
DEE-PCM	84.0	-102.4	65.0	19.0	-81.2	-105.2
DEE-SMD	67.7	-110.6	47.7	20.0	-77.9	-100.4
Agua-PCM	83.1	-84.0	56.9	26.2	-72.1	-95.0
Agua-SMD	100.08	-46.7	65.3	34.8	-62.8	-84.0

Tabla 3-4. Energía de activación, energía de reacción y contribuciones W_{1-4} (kJ mol^{-1}) en diferentes entornos de solvente. DEE: Dietiléter. Fuente: Elaboración propia.

Además de las diferencias absolutas en W_1 y W_2 , su contribución relativa a la barrera energética total también cambia. La contribución estructural en vacío es de un 88 %, que baja a un 77 y 68 % en dietiléter-PCM y agua-PCM, respectivamente. En el caso del modelo SMD, estos valores son 70 y 65 %. De acuerdo a esto, al pasar a solvente acuoso, la contribución electrónica a la barrera se incrementa a más de un 30 % con respecto a su símil en vacío. Una explicación a la elevada contribución estructural en vacío se puede encontrar en las interacciones electrostáticas de las dos moléculas cargadas las que, sin el efecto atenuante del solvente, dificultan los rearrreglos estructurales. De manera interesante, W_3 mostró una tendencia opuesta a W_2 en función de la polaridad del solvente: Su mayor valor se observó en vacío, y el menor en agua. Esto puede atribuirse al hecho de que la nueva distribución de carga se alcanzó en el agua de manera parcial antes del estado de transición, mientras que en vacío el proceso se extendió hacia la región de los productos. Esta suposición se

confirma por la posición del máximo de la fuerza de reacción en el solvente apolar y en vacío, ocurriendo en ambos casos a valores de coordenada más positivos que para el agua, como muestra la Tabla 3-5. La menor energía de reacción con la polaridad del solvente se debe mayoritariamente a los efectos de W_3 y W_4 .

	Mínimo	Máximo
Vacío	-0.99	2.52
DEE-PCM	-1.15	2.10
DEE-SMD	-1.20	2.08
Agua-PCM	-1.30	1.92
Agua-SMD	-1.45	1.79

Tabla 3-5.: Puntos de la coordenada de reacción donde se sitúan el mínimo y el máximo de la fuerza de reacción en diferentes entornos de solvente. (M06-2X/6-311G+(d,p)). Fuente: Elaboración propia.

Habiendo identificado las contribuciones energéticas ligadas a cambios estructurales y electrónicos, se calcularon el flujo de reacción y el orden de enlace, con el fin de estudiar más profundamente la naturaleza de los cambios electrónicos en la región del estado de transición.

La Figura 3-14 muestra el flujo electrónico de reacción (para valores de la coordenada de reacción menores y mayores de -10 amu^{1/2} a_0 el flujo fue cero y constante). Este descriptor se conoce por caracterizar cambios electrónicos en mecanismos de reacción como procesos espontáneos y no espontáneos. [34, 21, 15, 61, 92] Como se muestra en la Figura 3-14 para el medio PCM, el flujo electrónico es mayor a cero en la región del estado de transición, confirmando lo deducido del análisis de fuerza de reacción. Además, su valor positivo nos indica un proceso espontáneo en los tres entornos mostrados. La naturaleza espontánea del proceso se asocia con la transferencia de electrón desde el fenolato con carga negativa al trimetilsulfonio positivo y se confirmará en el análisis de cargas atómicas. El máximo del flujo electrónico de reacción se alcanza primero en agua, luego en dietiléter y finalmente en vacío. Esto concuerda con los valores extremos de la fuerza de reacción, evidenciando que la transferencia de densidad electrónica comienza tempranamente para solventes polares.

Para analizar cómo los cambios electrónicos se reflejan en los procesos de formación y ruptura de enlaces, en la Figura 3-14 se muestra la derivada de los órdenes de enlace en formación y en ruptura. Los cambios de orden de enlace se concentran significativamente en la región del estado de transición, y muestran una formación y ruptura casi sincrónicas, confirmando el mecanismo de reacción S_N2. Existen, sin embargo, leves diferencias que muestran el inicio más temprano de la ruptura en los

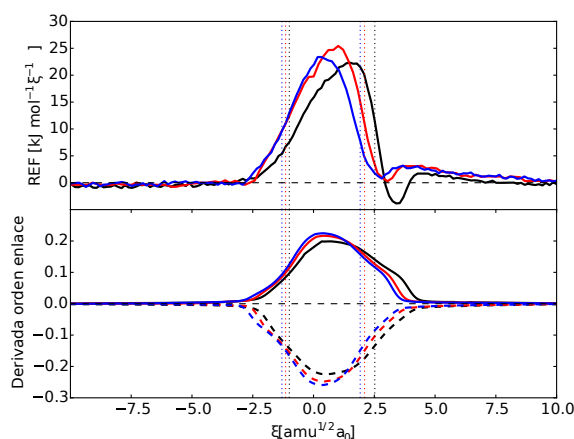


Figura 3-14.: Flujo electrónico de reacción (superior) y derivada del orden de enlace de Wiberg (inferior) para el enlace O-C (línea sólida) y el enlace S-C (línea discontinua) a lo largo de la coordenada intrínseca de reacción. Se muestra solamente PCM, ya que en SMD el comportamiento fue similar. Fuente: Elaboración propia.

solventes más polares, diferencia que también se aprecia en el proceso de formación del enlace O-C. Esto explica los ligeros corrimientos en la posición de los mínimos y máximos de la fuerza de reacción y el flujo electrónico.

Finalmente, se abordó la transferencia de la carga neta desde fenolato a trimetil-sulfonio. Para este fin, se calcularon las cargas atómicas de Hirshfeld-I para todas las estructuras a lo largo de la coordenada de reacción intrínseca. A fin de monitorear la transferencia de carga, se sumaron las cargas de todos los átomos de trimetilsulfonio (TMS), que en un estado aislado debería ser igual a +1. Como se muestra en la figura, la carga de TMS no es exactamente +1 debido a que una parte de la densidad electrónica del fenolato se ha delocalizado al fenolato al inicio de la IRC. En vacío, esta delocalización temprana es mayor que en dietiléter o agua, debido a la ausencia de una cavidad de solvente y la poca estabilización ejercida sobre los reactivos separados, en contraste a lo observado en un solvente más polar. En los tres entornos, la primera etapa de la coordenada de reacción muestra un ligero incremento de carga positiva en TMS hasta el mínimo de la fuerza de reacción, donde se alcanza la configuración de 180° . Luego, se observa una pronunciada disminución de la carga, coincidente con la zona cercana al estado de transición. Esto confirma los resultados de flujo electrónico y la naturaleza espontánea del proceso. La transferencia de carga no depende del entorno, sino que ocurre espontáneamente cuando se alcanza la configuración correspondiente al mínimo de la fuerza de reacción. Después de que el electrón ha sido transferido, la carga remanente sobre TMS corresponde al grupo metilo, que está covalentemente unido al fenolato. Si se resta la carga correspondien-

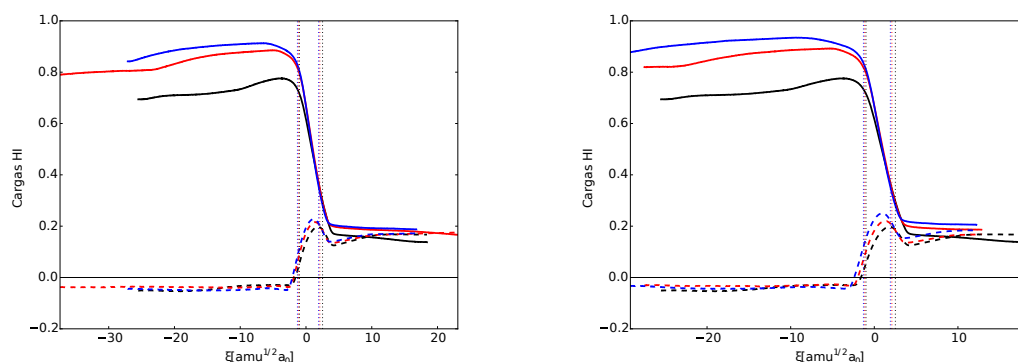


Figura 3-15. Suma de las cargas atómicas de trimetilsulfonio como función de la coordenada intrínseca de reacción. Vacío (negro), dietiléter (rojo) y agua (azul). Modelo de solvente PCM a la izquierda y SMD a la derecha. La línea discontinua muestra la evolución de la carga del grupo metilo. Fuente: Elaboración propia.

te al grupo metilo de la carga total de TMS, se obtiene un valor de cero, lo que es esperable para productos neutros. En la misma figura se muestra la carga del grupo metilo transferido. La disminución de la carga de TMS en la región del mínimo de la fuerza de reacción se acompaña por un incremento en la carga del grupo metilo, y luego un decremento posterior al estado de transición, antes de alcanzar su valor final en la región de productos. La máxima carga sobre el grupo metilo se alcanza cuando este adopta una configuración plana, luego de lo cual el ángulo diedro impropio definido por el carbono y sus tres hidrógenos invierte su signo para unirse al oxígeno de fenolato.

En resumen, es posible concluir que el electrón de fenolato es transferido a través de los dos enlaces involucrados en la reacción y que el grupo metilo altera su carga como función de la geometría adoptada por el sistema reactivo a lo largo de la coordenada de reacción. La densidad electrónica transferida nunca se localiza en el grupo metilo, sino que se transfiere entre el donador y aceptor a través de los enlaces o el espacio.

3.2.3. Simulaciones de dinámica molecular en agua

El análisis de varios descriptores a lo largo de la coordenada de reacción intrínseca, realizado en la sección anterior, entregó nuevos conocimientos sobre el mecanismo de reacción. Sin embargo, las posibles contribuciones entrópicas e interacciones específicas con el entorno no se tomaron en cuenta debido a la naturaleza continua del medio solvente. De especial importancia es la posibilidad de formar puentes de hidrógeno. Para estudiar la influencia de estos efectos sobre la reacción en agua se realizaron simulaciones de dinámica molecular QM/MM empleando el método semi-

empírico DFTB3 (parámetros 3ob). Previamente, se había validado la utilidad de este método para describir la energética de la reacción al compararlo con cálculos *ab initio*. Para seguir la reacción, primero se equilibró el complejo reactivo en solvente agua explícita (SPC/E) usando el software GROMACS 5.0.5. Para el tratamiento de la electrostática se utilizó PME de orden 4, un espaciado de 0.16 nm y una distancia de corte en el espacio real de 1.0nm. Para las interacciones de Lennard Jones se utilizó el mismo radio de corte junto a una frecuencia de actualización de la lista de vecinos de 10 pasos. El tamaño de paso para la dinámica fue de 1fs y se utilizó el algoritmo LINCS para restringir la vibración de los enlaces que contenían átomos de hidrógeno (orden 4).

Los reactivos se solvataron en una caja cúbica que contenía 10418 moléculas de agua (arista de 7nm). Luego de una pequeña minimización, la temperatura se incrementó a 298K en 10ps y el sistema fue simulado por 100ps en un colectivo NPT usando el termostato V-rescale (constante de acoplamiento de 0.1ps) y el barostato de Parrinello-Rahman (constante de acoplamiento 2ps) a 1 bar.

La reacción fue luego seguida a temperatura constante (298K) restringiendo la coordenada de reacción, que se definió como la combinación antisimétrica de la distancia C-S (d_{CS}) y C-O (d_{CO}) $\zeta = d_{CS} - d_{CO}$. Estudios previos han indicado que esta coordenada da una aceptable descripción de la reacción, y así se pudo comprobar al observar la correlación entre los valores de IRC y los de ζ . En la etapa inicial, ζ fue variada en 500ps desde -4 a 6 Å en pasos de 1 Å con una constante de fuerza de 5000 kJ mol⁻¹ nm⁻¹ usando el software Plumed 2.2. Adicionalmente, los ángulos entre azufre-carbono metílico-oxígeno y carbono bencílico-oxígeno-carbono metílico se restringieron a 180° con una constante de fuerza de 1000 kJ mol⁻¹ rad⁻¹.

De esta simulación, se tomaron configuraciones de partida a valores específicos de ζ en un régimen NVT y se aplicó Umbrella Sampling. Los valores empleados fueron: -4, -3, -2, -1.5, -1.25 -1Å; desde -0.9 a 1.6 en pasos de 0.1Å; y los restantes valores fueron 0.18, 2, 3, 4 y 5Å. La constante de fuerza se estableció en 74000 para el rango $\zeta = -0.4$ —1.3Å y 30000 kJ mol⁻¹ nm⁻¹ para los demás valores. Aquí, solamente se restringió el ángulo azufre-carbono metílico-oxígeno. En total, se efectuaron 37 simulaciones de 500ps cada una y la convergencia de la fuerza de reacción media se confirmó variando el tiempo de simulación.

Los efectos dinámicos originados en la solvatación de no equilibrio del estado de transición, efectos reportados para otras reacciones similares, no fueron considerados. La Figura **3-16** muestra la energía libre de Helmholtz como función de la coordenada de reacción. La energía libre calculada es de 105 kJ mol⁻¹. Considerando que los tres grupos metilo pueden reaccionar debe agregarse una corrección entrópica de 2.7 kJ mol⁻¹, dando un valor final de 107.7 kJ mol⁻¹ (25.7 kcal mol⁻¹). Se ha reportado un

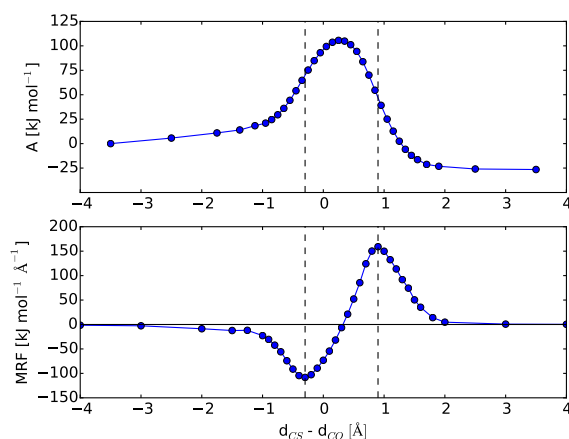


Figura 3-16.: Energía libre (superior) y fuerza de reacción media (inferior) a temperatura constante ($T=298\text{K}$) para la reacción de transmetilación entre trimetilsulfonio y fenolato como función de la coordenada de reacción. Para la fuerza de reacción media se muestran las cuatro regiones definidas por sus valores extremos. Fuente: Elaboración propia.

valor experimental de 126 kJ mol^{-1} . Suponiendo que no existió dependencia de la temperatura en las contribuciones entálpicas ($\Delta H^\ddagger = 119,3 \text{ kJ mol}^{-1}$) y entrópicas ($\Delta S^\ddagger = 18 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) reportadas en el mismo estudio, el valor corregido calculado a 25°C sería de $124,7 \text{ kJ mol}^{-1}$. Sin embargo, la suposición de independencia de la temperatura debe tomarse con cuidado, ya que la constante dieléctrica del agua cambia de 78.3 (25°C) a 61.3 (80°C). La menor constante dieléctrica desestabilizaría los reactivos con respecto al estado de transición, dando origen a una barrera reducida. Bajo estas consideraciones, y la previa validación del método semiempírico de estructura electrónica, el valor de energía libre de activación que aquí se reporta podría tomarse como un nuevo valor de referencia en espera de futura validación experimental. Es interesante notar, además, que la barrera de energía libre obtenida de la simulación de dinámica molecular QM/MM es mucho más cercana a los valores experimentales que las energías potenciales calculadas en solvente continuo, las que se desviaban por más de 40 kJ mol^{-1} . La inclusión de contribuciones entrópicas en el modelo continuo genera resultados poco claros, muy dependientes de la metodología empleada. Una tabla con ellos se entrega como apéndice. En resumen se puede concluir que los grados de libertad del solvente son cruciales para obtener una contribución entrópica correcta y describir de manera adecuada la física subyacente a la reacción de transmetilación.

La energía libre de reacción calculada es de -25 kJ mol^{-1} , significativamente menor que el valor de -84 kJ mol^{-1} obtenido utilizando PCM. Es notable que al utilizar

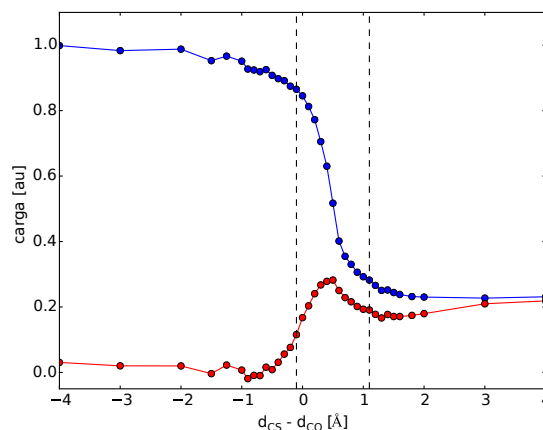


Figura 3-17.: Carga total obtenida como la suma de las cargas atómicas de Hirshfeld-I pertenecientes a la molécula de trimetilsulfonio (azul) y carga del grupo metilo transferido (rojo). Fuente: Elaboración propia.

SMD como solvente continuo se produjo una reducción de este valor a la mitad. Teniendo en cuenta el hecho que SMD fue parametrizado para reproducir energías de solvatación, el valor que entrega podría considerarse más correcto. Las desviaciones podrían deberse a que una molécula como trimetilsulfonio no estuvo presente en el conjunto de calibración utilizado para ese modelo. La falta de un estándar experimental hace difícil juzgar la calidad de los diferentes resultados, pero en base a lo observado para la barrera de activación, la simulación QM/MM podría tomarse como la más precisa y razonable.

En analogía con el análisis de fuerza de reacción basado en la energía potencial, la fuerza de reacción media permitió observar contribuciones estructurales y electrónicas a la barrera de energía libre a lo largo de la coordenada de reacción. La comparación de los perfiles de fuerza de reacción y fuerza de reacción media muestran que la posición del estado de transición se desplazó a un valor positivo de 0.3\AA comparado con el valor de cero donde se situaba en los cálculos con solvente continuo. La fuerza de reacción media divide la barrera de energía libre en una contribución estructural W_1 que suma en este caso 70 kJ mol^{-1} , y una contribución electrónica W_2 igual a 35 kJ mol^{-1} . De la misma forma que en el cálculo con solvente implícito, la contribución estructural es mayor que la electrónica, ($67\% vs 33\%$) y es parecida a la distribución porcentual observada en el solvente implícito. El aumento de la barrera de activación en la simulación QM/MM se da en ambas contribuciones por igual, y es probable que se deba a la omisión en modelos de solvente continuo de puentes de hidrógeno y contribuciones entrópicas.

Finalmente, los cambios electrónicos que tienen lugar entre los extremos de la fuer-

za de reacción media se analizaron con el método de cargas de Hirshfeld-I para cada ventana a lo largo de la coordenada de reacción. La Figura **3-17** muestra la suma de cargas de todos los átomos pertenecientes a trimetilsulfonio (azul) en función de la coordenada de reacción. Nuevamente, las regiones definidas por los extremos de la fuerza de reacción media definen los límites donde se produce la transferencia de carga. La disminución en la carga de TMS es acompañada de una carga progresivamente menos negativa en fenolato, hasta alcanzar los productos neutros. En rojo se muestra la suma de cargas del grupo metilo. La carga positiva del fragmento se incrementa cerca del mínimo de la fuerza de reacción media y alcanza un valor máximo en el estado de transición. Luego, la carga se redistribuye en el anillo de fenol, neutralizando al grupo metilo. Sin embargo, el grupo metilo no gana densidad electrónica, sino que se va volviendo más positivo al acercarse a una configuración plana, resultados concordantes con lo observado en los cálculos anteriores.

3.2.4. Conclusión

Durante esta sección se demostró que la barrera de activación para la reacción de transferencia de metilo entre fenolato y trimetilsulfonio en vacío es correctamente descrita por el método DFTB3 y que el funcional M06-2X presenta un error pequeño de algunos kJ mol^{-1} en comparación a los métodos *ab initio* más exactos. Las diferencias más notorias se observaron en las exotermicidades, que difieren de los valores de referencia en 54 (DFTB3) y 16 kJ mol^{-1} (M06-2X), respectivamente. El tamaño del conjunto de base empleado en los cálculos M06-2X puede excluirse como fuente de error, ya que los cálculos MP2 con conjuntos base triple zeta comparables a los utilizados para DFT entregaron energías de reacción cercanas a los valores alcanzados por métodos *ab initio* de alto nivel. El error observado en DFTB3 y M06-2X se debe, por tanto, a la deficiencia de los métodos DFT para representar estados aniónicos.

Los entornos polares como el agua, representados por dos modelos de solvatación estabilizan los reactantes cargados, incrementando las barreras de activación y reduciendo las energías de reacción debido a la energía de solvatación.

El mecanismo de reacción en fases condensadas y la influencia del entorno molecular se analizaron desde la configuración de precomplejo, pasando por el estado de transición hasta llegar al postcomplejo. El entorno molecular brindado por los solventes dietiléter y agua aproximados de manera implícita tuvo poca influencia sobre la barrera energética entre precomplejo y estado de transición. Sin embargo, el análisis de fuerza de reacción en combinación con descriptores tales como el flujo electrónico y la derivada de orden de enlace identificaron diferencias específicas en la transferencia electrónica a lo largo de la reacción. El entorno molecular alteró sobre

todo la energía asociada a estas fluctuaciones electrónicas, de manera que la energía requerida fue mayor al aumentar la polaridad del solvente. El inicio de la transferencia espontánea de densidad electrónica se identificó a través del flujo electrónico y las cargas atómicas, revelando una transferencia efectuada a través de los enlaces.

Finalmente, la dinámica molecular QM/MM en solvente explícito junto al Hamiltoniano DFTB3 permitieron hallar una energía de activación concordante con lo reportado experimentalmente. La inclusión de puentes de hidrógeno soluto-solvente y las posibles contribuciones entrópicas permiten superar el desempeño de los modelos de solvente implícito, los que se desvían por más de 40 kJ mol^{-1} en el cálculo de las barreras de activación.

Estos resultados validaron un conjunto de herramientas de estructura electrónica de distinta exactitud y costo computacional las que serán aplicadas en COMT, a fin de contrastar el mecanismo de reacción mostrado en este capítulo con el que se encuentra en la enzima.



3.3. Transferencia de metilo a dopamina en COMT, Y68A y entorno acuoso

El objetivo central de este trabajo de tesis es contribuir a elucidar los orígenes de la catálisis que efectúa COMT. La capacidad de acelerar una reacción química sin intervenir de manera covalente con el sustrato es una cualidad asombrosa de las enzimas, y el manejo y comprensión de esta herramienta calificaría como una contribución importante al desarrollo y conocimiento de nuevas funcionalidades enzimáticas.

En este capítulo, el mecanismo molecular por el cual COMT es capaz de reducir la barrera de activación para una reacción de transmetilación entre SAM y el neurotransmisor dopamina (DOP), se analizó a través del método de la cuerda. El objetivo fue comparar la reacción enzimática natural (WT) con la que ocurre en la mutante menos activa Y68A, así como también en entorno acuoso (no enzimático, AQ).

Las simulaciones de dinámica molecular llevadas a cabo para este fin se basaron en la estructura cristalina de COMT humana publicada en 2008 [72]. Las modificaciones introducidas a esta estructura tomaron en cuenta la evidencia experimental sobre una metilación preferente de DOP en el átomo de oxígeno *meta*- y se basaron en hallazgos anteriores para la enzima COMT de *Mus musculus*. [70] En particular, el ligando dinitrocatecol en la estructura cristalina fue reemplazado por DOP, quedando solamente el átomo de oxígeno en *para*- dentro de la esfera de coordinación del magnesio. Durante el proceso inicial de equilibración el número de coordinación del magnesio (6) se alcanzó por interacción de uno de los átomos de oxígeno carboxílico de Glu199 con el catión divalente. Como se muestra en la Figura 3-18, la estructura resultante de estos cambios ubica al átomo de oxígeno *meta*- en la posición de ataque nucleofílico adecuado, en acuerdo con el producto preferente que se ha reportado experimentalmente. La configuración del sitio activo fue estable en simulaciones MM y QM/MM.

3.3.1. Parámetros de la simulación

Los sistemas enzimáticos estudiados consistieron en una caja cúbica de 8 nm de lado. Dentro de ella se ubicaron, de acuerdo al caso, la correspondiente enzima, SAM y la molécula de dopamina (DOP). Cada caja contenía 15572 moléculas de agua y cinco iones sodio para alcanzar neutralidad. Se llevó a cabo una minimización con restricción de posición sobre todos los átomos no pertenecientes al solvente, seguida por una minimización clásica. Luego, el sistema se equilibró por 30ns con el barostato Parrinello-Rahman [65] y el termostato V-rescale [11], usando GROMACS [35] y el campo de fuerzas AMBER99SB [37]. Los parámetros para describir a SAM y DOP

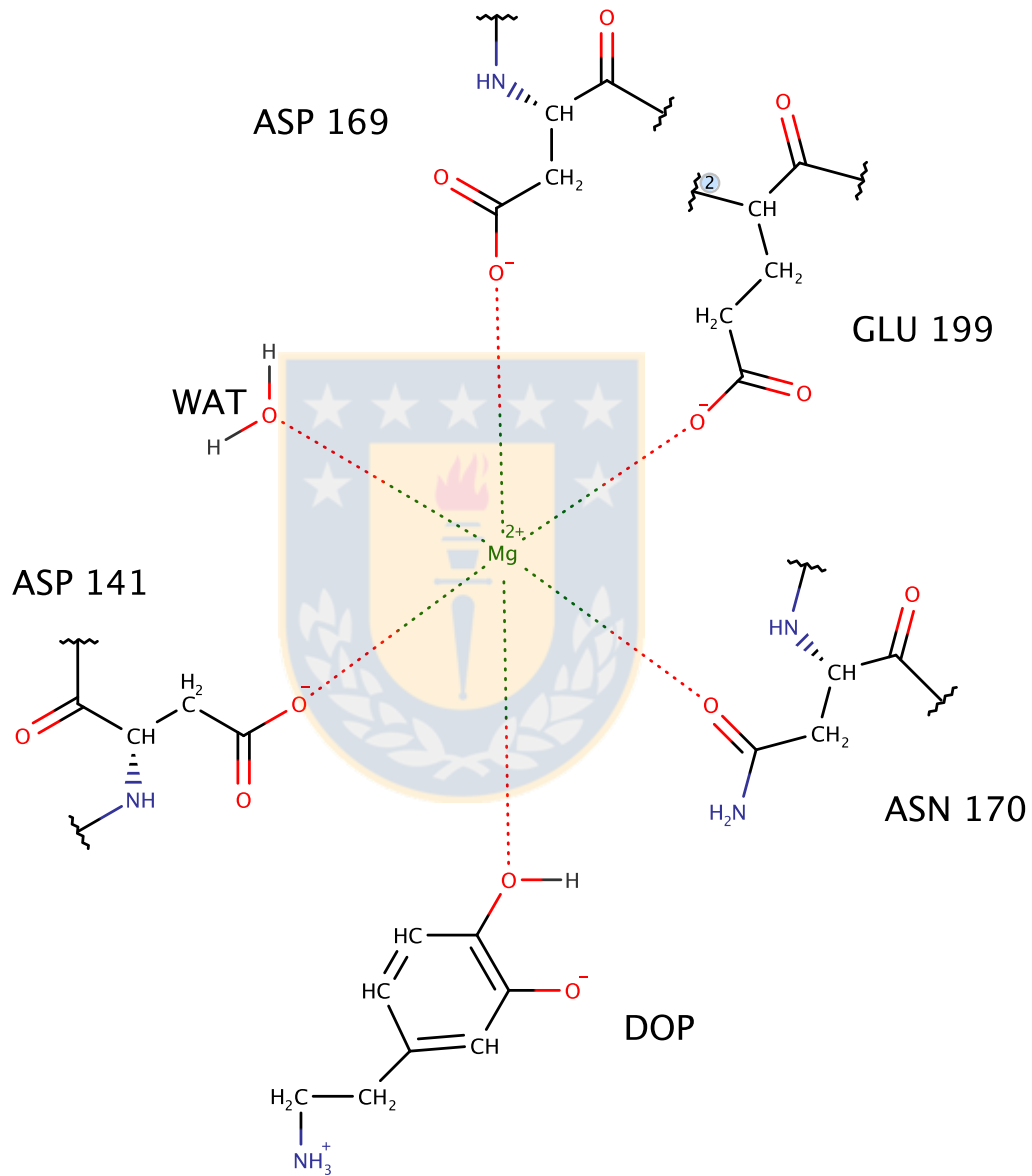


Figura 3-18.: Representación esquemática de la configuración del sitio activo que se utilizó en este trabajo. Fuente: Elaboración propia.

se tomaron de publicaciones anteriores [74] y de GAFF, respectivamente.

El cálculo del camino de mínima energía libre se efectuó a través de simulaciones de dinámica molecular QM/MM con el software fDYNAMO [23]. Todo átomo a una distancia superior a 25 Å de DOP fue inmovilizado. La región QM comprendió a SAM y DOP, descritos con el Hamiltoniano AM1. El resto de los átomos se modeló con AMBER99SB.[37]

Luego de minimizar la energía de la estructura, se realizó una dinámica molecular de 20 ps. La estructura del producto fue obtenida mediante la transferencia del grupo metilo al oxígeno cargado de DOP. Esta estructura se equilibró por otros 20 ps. Las estructuras de producto y reactivo resultantes en la enzima WT se usaron como nodos iniciales para el cálculo del camino de mínima energía libre en el entorno enzimático.

El sistema acuoso consistió de una caja cúbica de 14050 moléculas de solvente y un ion cloruro para dar neutralidad eléctrica. Los protocolos de simulación QM/MM fueron similares a los descritos para las simulaciones con enzima.

Para obtener el camino de mínima energía libre (MFEP) se usó el método de la cuerda, ya descrito en el capítulo 2. El progreso de la reacción en WT se siguió a través de tres variables colectivas (CVs) directamente involucradas en el proceso de transferencia de metilo. La cuerda consistió en 100 nodos, con los nodos inicial y final definidos, como ya se dijo, por las geometrías obtenidas en equilibraciones QM/MM para reactivos y productos, respectivamente. En el cálculo de MFEP para WT ningún nodo se dejó fijo, permitiendo la libre migración y relajación de reactivos y productos. En orden a mantener los sistemas comparables, los valores de las CVs para el nodo inicial (reactivo) y final (producto) en los sistemas mutante (Y68A) y acuoso (AQ), se igualaron a aquellos obtenidos en la cuerda WT convergida. Esto permitió que el estudio se enfocara en comparar aquellas etapas verdaderamente influenciadas por el entorno enzimático.

En orden a mejorar el muestreo del espacio conformacional, se realizó intercambio de réplicas cada 20 pasos de dinámica. La convergencia de la cuerda se monitoreó midiendo el RMSD de los nodos con respecto a su posición inicial en la superficie de energía libre. Para el modelo WT, se obtuvo convergencia del MFEP luego de 15 ps, y se continuó la simulación por otros 25 ps. Es prudente recordar que, una vez que la cuerda convergió, los valores de las variables colectivas para cada nodo, promediadas sobre el intervalo 15-40 ps, se usaron como conjunto de prueba inicial para definir la cuerda en los sistemas mutante y acuoso a fin de mantener sistemas comparables. Luego de alcanzar convergencia en la simulación (15 ps), la simulación de la cuerda continuó por 25 ps.

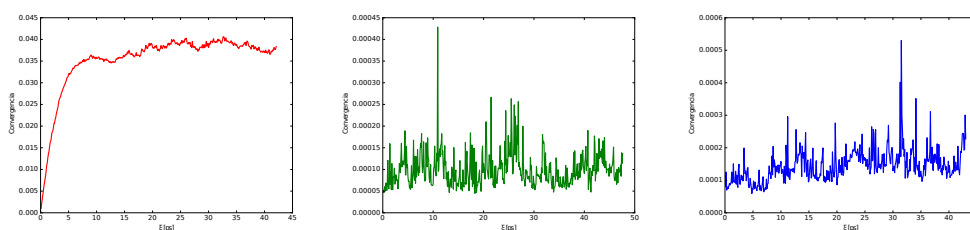


Figura 3-19.: Desviación de la cuerda para los sistemas estudiados. WT (rojo), Y68A (verde), y AQ (azul). El lapso convergido entre 15 y 40 ps para WT se usó para modelar la reacción enzimática. En AQ e Y68A las fluctuaciones son menores, ya que los nodos terminales se mantuvieron fijos. Las cuerdas para AQ e Y68A se calcularon a partir de la cuerda ya convergida para WT. Fuente: Elaboración propia.

3.3.2. Perfil de energía libre y fuerza de reacción media

Para estudiar el mecanismo de reacción se trazó, a través del método de la cuerda implementado en fdynamo[23, 107], el camino de mínima energía libre en la enzima wild-type (WT), en el mutante Y68A y en un entorno de solución acuosa (AQ). La región QM (SAM y DOP) se trató con el método semiempírico AM1, mientras la región MM se describió con el campo de fuerzas AMBER99SB [37]. Las variables colectivas que definieron la cuerda fueron:

- CV1, la distancia entre el átomo de azufre de SAM y el átomo de carbono del grupo metilo donado por esta molécula,
- CV2, la distancia entre el átomo de carbono del grupo metilo de SAM y el átomo de oxígeno *meta*- de DOP,
- CV3, la hibridación del carbono que forma el grupo metilo lábil, definida como la distancia entre este átomo y el plano formado por sus tres átomos de hidrógeno.

Las barreras resultantes fueron $12.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la enzima de tipo silvestre WT (experimental $18.4 \text{ kcal mol}^{-1}$), $13.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la enzima mutante Y68A (experimental 20 kcal mol^{-1}), y $14.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la reacción en solución (AQ), energías libres medidas desde la configuración de complejo de Michaelis para el sistema WT.

Los valores para el sistema WT se acercaron a aquellos reportados en otros estudios que utilizan métodos semiempíricos[40], y concordaron con los valores anteriormente obtenidos para la enzima murina tratada a nivel AM1. [70, 69]

Con respecto a la barrera en solución, se ha demostrado anteriormente [70] que a este nivel de teoría el mínimo real corresponde al par iónico separado por solvente, que se ubica 7 kcal mol^{-1} por debajo de la energía asignada al complejo reactivo. Como ya

Sistema	E_a [kcal mol ⁻¹]
WT	18.4
Y68A	20.0
AQ*	27.0

Tabla 3-6.: Valores experimentales de E_a medidos en diferentes sistemas. El valor presente en AQ es una estimación reportada a partir de la reacción entre trimetilsulfonio y fenolato. Fuente: referencia [53].

se dijo, el interés de este capítulo se centró en comparar eventos que ocurren dentro del sitio activo de la enzima durante la reacción química, no se han considerado las etapas previas que tienen lugar en la reacción acuosa, por lo que hemos comenzado en ambas etapas desde la configuración del mínimo reactivo presente en la enzima.

Adicionalmente, se validaron las energías AM1 obtenidas en la enzima WT con cálculos MP2 realizados sobre geometrías de origen semiempírico. A nivel MP2 la energía de activación es de 20.6 kcal mol⁻¹, cercano al valor experimental de 18 kcal mol⁻¹[70] basado en experimentos con la enzima hepática de rata. [78]

A pesar de la diferencia con las barreras experimentales, fue interesante abordar los diferentes procesos que tienen lugar durante la reacción. La Fuerza de Reacción Media (MRF) divide de manera natural la coordenada de reacción en diferentes zonas, donde distintos tipos de procesos tienen lugar a medida que ocurre el cambio químico. Dichas regiones se definen en base a la derivada de la energía libre con respecto a la coordenada de reacción (Ver capítulo 2).

La Figura 3-20 muestra los perfiles de energía libre y fuerza de reacción media obtenidos para los sistemas WT (rojo), Y68A (verde) y AQ (azul). Se observan energías libres mayores en solución acuosa, seguida por el mutante y luego por la enzima WT. Estos cambios se reflejan en el perfil de fuerza de reacción, el cual revela máximos ligeramente desplazados de diferentes magnitudes en los tres entornos. La contribución de cada región a la barrera de activación, definida a través de los extremos de la MRF, se dan en la Tabla 3-7. Analizando W_1 y W_2 fue posible observar que W_1 , asociada a cambios estructurales, presentó las mayores diferencias entre los sistemas WT y AQ (1.5 kcal mol⁻¹). Una menor diferencia surge de la contraparte electrónica W_2 (0.5 kcal mol⁻¹). En el caso del mutante Y68A, los valores para W_1 y W_2 se encontraron en una situación intermedia respecto a los de WT y AQ.

Existieron también diferencias en el proceso de relajación desde el estado de transición hacia los productos (W_3 y W_4). La relajación electrónica (W_3) dentro de WT fue menor que en Y68A o en el medio acuoso, lo que puede ser un indicador de una cavidad preorganizada para favorecer la configuración de estado de transición. La relajación estructural (W_4) es también mayor en el medio acuoso que en la enzima,

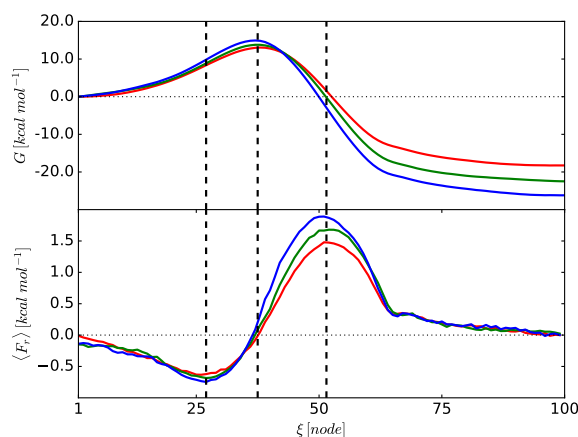


Figura 3-20.: Perfil de energía libre (superior) y fuerza de reacción media (inferior) para la reacción de transferencia de metilo en los diferentes entornos. WT (rojo), Y68A (verde) y AQ (azul). Las líneas verticales discontinuas representan los valores mínimo, cero, y máximo de la MRF. Fuente: Elaboración propia.

Sistema	W1	W2	W3	W4	E_a
WT	8.3	-4.6	-10.7	-20.6	12.9
Y68A	8.8	-4.9	-13.2	-23.1	13.7
AQ	9.8	5.1	-16.9	-24.2	14.9

Tabla 3-7.: Energía libre asociada a cada región definida por la MRF y energía libre de activación calculada para la reacción bajo estudio en tres ambientes diferentes. Nivel de teoría AM1/AMBER99SB. Unidades en kcal mol^{-1} . Fuente: Elaboración propia.

posiblemente debido a que la ganancia de entropía que se produce en el solvente es mayor que en la cavidad enzimática. En las siguientes dos secciones, se usaron múltiples descriptores estructurales y electrónicos para racionalizar las diferencias en las contribuciones W_1 y W_2 a la barrera.

3.3.3. Cambios estructurales que contribuyen a W_1

En términos globales, la Fuerza de Reacción Media (MRF) demostró que los cambios inducidos por la enzima para disminuir la barrera de energía libre, se localizan de manera principal en la región asociada a cambios estructurales.

Los primeros descriptores estructurales que se usaron para analizar la progresión del complejo reactivo fueron las distancias entre los átomos involucrados en la transferencia de metilo. Como se puede ver en la Figura 3-21, las distancias S-C y C-O se comportan de igual forma en los tres ambientes moleculares. Durante los primeros pasos, la distancia C-O disminuye, mientras la distancia S-C permanece constan-

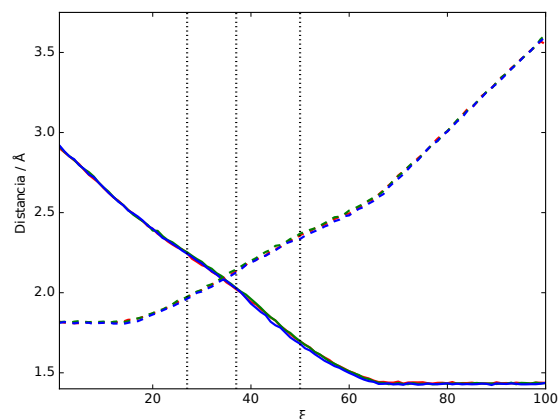


Figura 3-21.: Evolución de la distancia C-O (línea continua) y la distancia S-C (línea discontinua) a lo largo de la coordenada de reacción para los entornos WT (rojo), Y68A (verde) y AQ (azul). Las líneas punteadas verticales representan el valor mínimo, cero y máximo de la fuerza de reacción media. Fuente: Elaboración propia.

te. En la región del estado de transición ambas distancias cambian y al final de la reacción el producto metilado se aleja de SAM.

Otra característica estructural considerada durante esta reacción es el ángulo S-C-O, formado por el átomo de azufre de SAM, el carbono en el grupo metilo transferido, y el oxígeno nucleofílico presente en DOP. En el capítulo anterior que estudio la reacción en un sistema modelo, se mostró que se necesita un alineamiento apropiado de estos átomos, con un ángulo cercano a 180° a fin de llevar a cabo exitosamente la transferencia de metilo. La evolución de este ángulo a lo largo de la coordenada de reacción se muestra en la Figura 3-22, y confirma que en el estado de transición las moléculas se orientan de la forma descrita. Para alcanzar esta configuración el mayor costo en energía libre se observa en AQ, seguido por Y68A y luego WT, lo que se indica en los valores que adquirió W_1 (ver Tabla 3-7). Esto evidencia que en la enzima, los reactivos se encuentran mejor alineados para reaccionar que en solución acuosa. Es notable que, aunque la configuración inicial en la mutante fue más cercana que en WT al ángulo del estado de transición, el requerimiento de energía libre para alcanzar el alineamiento fue mayor, evidenciando interacciones poco favorables dentro de la cavidad del mutante. Debido a que el alineamiento adecuado es una condición necesaria para la transferencia de grupo metilo por S_N2 , este hallazgo confirmó que la enzima posiciona al reactivo en una orientación apropiada para la ocurrencia de la reacción.

La transferencia del grupo metilo está asociada directamente con el desplazamiento de densidad electrónica entre SAM y DOP. Como se hizo en el capítulo anterior

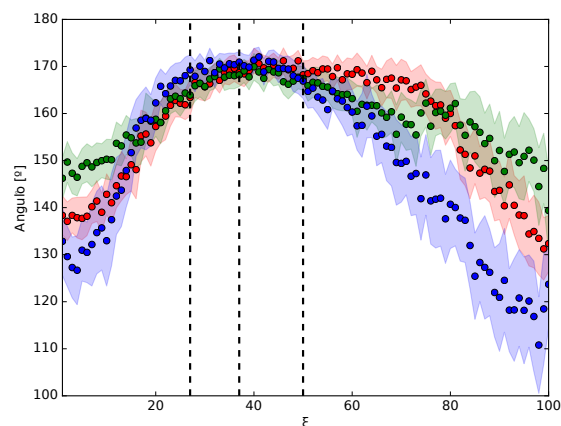
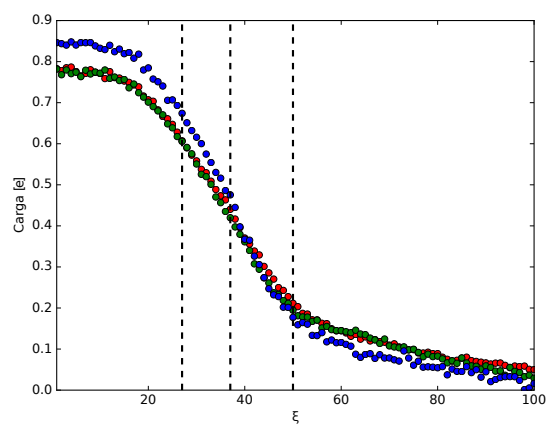


Figura 3-22.: Evolución del ángulo SCO a lo largo de la coordenada de reacción para los entornos testeados. WT (rojo), Y68A (verde) y AQ (azul). El área sombreada indica media desviación estándar. Fuente: Elaboración propia.

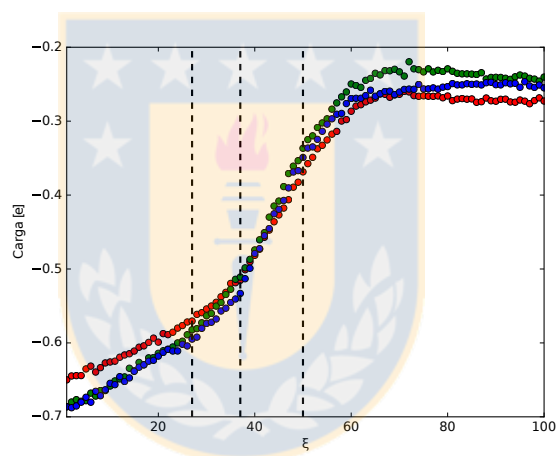
[73], se estudió la transferencia electrónica a través de la evolución de las cargas de Hirshfeld-I sobre los átomos azufre, carbono y oxígeno involucrados en la reacción. Las cargas de Hirshfeld-I, en este caso, se basan en la densidad electrónica polarizada debido a la presencia de cargas puntuales en el entorno MM, asignando diferentes porciones de densidad electrónica a diferentes átomos de la zona QM (ver capítulo 2). Si un átomo como oxígeno está rodeado por cargas positivas se espera un mayor carácter aniónico y una mayor carga negativa sobre ese átomo.

La Figura 3-23a muestra claramente que la carga sobre el azufre permanece constante antes del alineamiento de los átomos. Este hecho se relaciona, probablemente, con la invariancia de la distancia S-C en los primeros veinte nodos de la cuerda (Ver Figura 3-21). Una vez los reactivos alcanzan el mínimo de la MRF, las cargas sobre el azufre y el grupo metilo (Figura 3-23b) cambian. Durante la aproximación inicial de las dos moléculas, la carga sobre el oxígeno nucleofílico sufrió una variación constante (Figura 3-23c). Estos resultados confirman que los cambios electrónicos previos no ocurren de manera significativa hasta que los átomos se encuentran correctamente alineados.

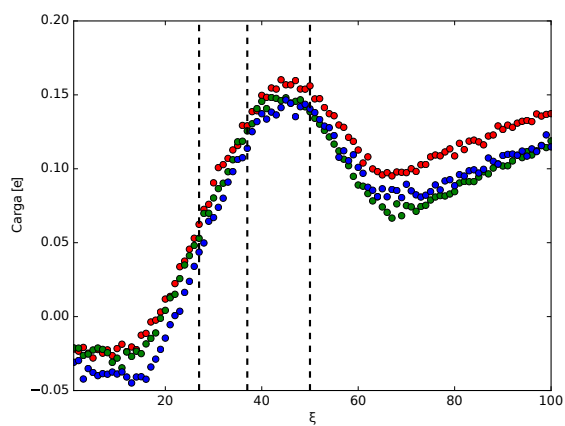
Comparando los valores absolutos de carga atómica en los diferentes entornos, se observó que las cargas sobre el átomo de azufre y sobre el grupo metilo son similares en ambas enzimas, pero diferentes de las cargas obtenidas en el sistema AQ. Esto sugiere que, al menos en el principio de la reacción, el entorno electrostático de SAM es muy similar en las enzimas WT e Y68A, mientras que es muy diferente del sistema AQ. La idea de una similitud en los entornos enzimáticos se refuerza por la observación previa de efectos isotópicos de unión similares en ambos sistemas.[105]



(a)



(b)



(c)

Figura 3-23: Cargas atómicas para átomos implicados en la transferencia de metilo. Superior: azufre, centro: oxígeno, inferior: grupo metilo. Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, para el átomo de oxígeno nucleofílico en DOP, la similitud en carga atómica se halla entre el sistema Y68A y el acuoso AQ, evidenciando que la enzima WT provee un entorno electrostático distinto para este átomo.

Más allá de los cambios estructurales y sus efectos asociados a las cargas de átomos específicos, es interesante conocer la energía libre asociada al cambio de una distancia en particular. Es posible obtener esta información de manera directa a partir del método de la cuerda. [107, 75] Debido a que el mínimo de energía libre se ha definido en un espacio tridimensional formado por las distancias S-C (CV1), C-O (CV2) y la hibridación del grupo metilo (CV3), la energía libre puede descomponerse como una suma de contribuciones individuales de energía libre calculadas para cada coordenada colectiva.

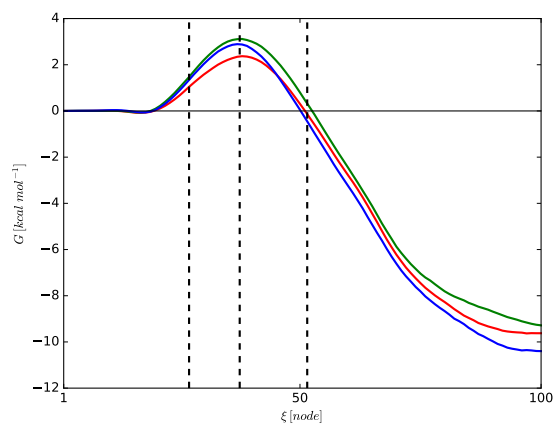
Usando el esquema de la fuerza de reacción media, se usaron las contribuciones estructurales y electrónicas de cada variable colectiva para evaluar su importancia en la formación de las diferencias de barrera en cada entorno. La Figura 3-24 muestra la energía libre asociada a cada variable colectiva y la Tabla 3-8 provee sus contribuciones a W_1 .

Sistema	CV1	CV2	CV3
WT	1.0	7.5	-0.2
Y68A	1.5	7.6	-0.2
AQ	1.3	8.7	-0.2

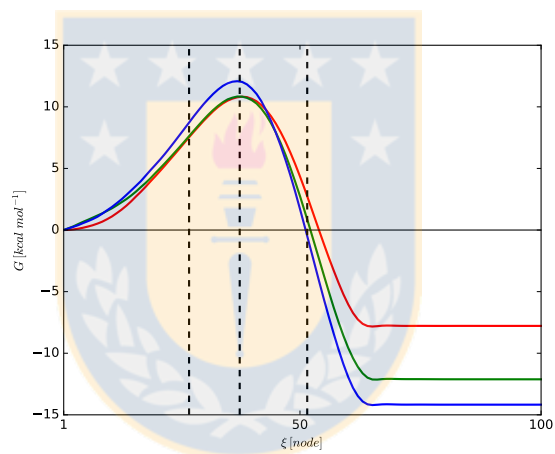
Tabla 3-8.: Energía libre asociada a W_1 para cada coordenada colectiva. Unidades en kcal mol⁻¹. Fuente: Elaboración propia.

El principal cambio de energía libre en esta región se debe a CV2, asociado con la aproximación del oxígeno nucleofílico al grupo metilo, lo que es un movimiento requerido antes de que cualquier interacción significativa pueda ocurrir. El entorno enzimático facilita este paso inicial, lo que se refleja en la diferencia de 1.2 kcal mol⁻¹ con respecto al sistema acuoso.

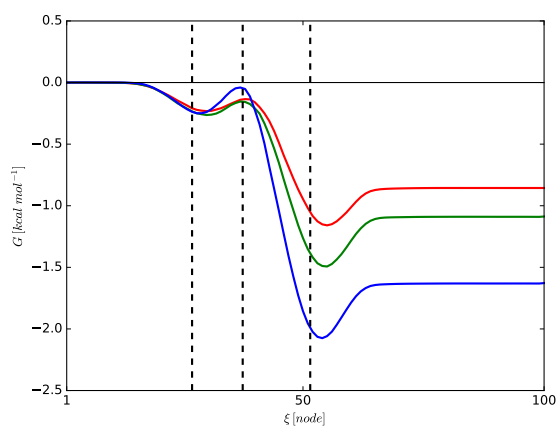
Para CV1, no existe contribución en los primeros veinte nodos de la cuerda, lo que es esperable debido a que el enlace S-C permanece constante en longitud. Pero, luego de haber alcanzado un alineamiento apropiado, los valores de energía libre para Y68A y AQ son claramente más grandes que los observados en WT. Considerando la similitud de las cargas de Hirshfeld sobre azufre y metilo, y las diferencias observadas en el oxígeno, se concluye que el último paso en la aproximación C-O requiere más energía libre en la mutante y en AQ debido a la necesaria ruptura de enlaces de hidrógeno entre moléculas de agua y el oxígeno nucleofílico. Si este es el caso, el número promedio de enlaces de hidrógeno al oxígeno presentes en el estado reactivo debería ser diferente para cada entorno. Se calculó este número, arrojando valores



(a)



(b)



(c)

Figura 3-24. Perfil de energía libre para cada coordenada colectiva. Superior: CV1 (distancia S-C), centro: CV2 (distancia C-O), inferior: CV3 (hibridación del grupo metilo). WT (rojo), Y68A (verde) y AQ (azul). Fuente: Elaboración propia.

de 0.11 para WT, 0.53 para Y68A y 0.83 para AQ, en dinámica molecular de 30 ns. Por tanto, las diferencias de energía libre observadas en la contribución de CV1 a W_1 , con respecto al sistema WT, se originan parcialmente por el mayor número de puentes de hidrógeno hacia el solvente que deben romperse en Y68A y en AQ para alcanzar el mínimo de la MRF. Este mayor número de puentes de hidrógeno hacia el oxígeno de DOP en Y68A y AQ también es confirmado por la mayor carga negativa que exhibe con respecto a WT, lo que se espera en el caso de una solvatación más extensa.

3.3.4. Cambios electrónicos y su contribución a W_2

En esta sección se analizan las contribuciones electrónicas a la energía de activación (W_2) en los tres entornos estudiados. Esta serie de cambios comenzó una vez alcanzado el correcto alineamiento entre los átomos y finalizó cuando se alcanzó el estado de transición. Los cambios de energía libre fueron consecuencia casi exclusiva de transferencias electrónicas implicadas en la transferencia de metilo. La diferencia de energía libre entre WT y AQ fue de 0.5 kcal mol⁻¹, y 0.3 kcal mol⁻¹ entre WT e Y68A. El análisis de cargas atómicas expuesto anteriormente reveló que esta región, posterior al mínimo de la MRF, concentró la casi totalidad de transferencia electrónica, proceso evidenciado por el cambio en las cargas atómicas, pero también reveló que en todos los entornos estas cargas alcanzan igual valor en función de la coordenada de reacción. Por ende, no se observa una influencia directa del entorno sobre las cargas de los átomos implicados en la reacción.

Sistema	CV1	CV2	CV3
WT	1.3	3.2	0.1
Y68A	1.6	3.2	0.2
AQ	1.5	3.4	0.2

Tabla 3-9.: Energía libre asociada a W_2 para cada coordenada colectiva. Unidades en kcal mol⁻¹. Fuente: Elaboración propia.

Aunque la transferencia electrónica reflejada en los cambios de carga pareció progresar de igual forma en todos los entornos, la contribución de las variables colectivas a la energía libre total puede ser de ayuda en la exploración de esta etapa. La descomposición de la energía libre según las diferentes coordenadas colectivas muestra que también aquí la contribución de energía libre de CV2, asociada con la distancia C-O, es superior a CV1, pero con un valor absoluto inferior al observado en la región antes descrita. Lo mismo se observa para el sistema acuoso. El entorno también ejerce influencia sobre la contribución de CV1 que representa a la distancia S-C. La menor

contribución se asocia con la enzima WT. Interesantemente, AQ e Y68A presentan valores similares, que difieren de WT. La hibridación del grupo metilo (CV3) hace una pequeña contribución al cambio de energía libre en los sistemas. La contribución de esta variable colectiva a W_2 es menor en ambas enzimas, si se la compara con AQ y su perfil de MRF en ambos casos es también menos negativo, como muestra la Figura **3-25**, lo que podría sugerir que la inversión del grupo metilo es más fácil dentro del entorno enzimático.

Basados en esta observación y en estudios recientes [38, 100] que proponen una contribución importante a la catálisis originada por las interacciones entre los hidrógenos metílicos y átomos de oxígeno externos, se ha examinado el sitio activo en busca de residuos capaces de establecer este tipo de interacción, en esta etapa del proceso. La interacción más favorable se observó entre el átomo de oxígeno presente en el esqueleto del residuo Asp141 y los átomos de hidrógeno del grupo metilo. Esta interacción se midió comparando la proximidad de estos hidrógenos a los oxígenos de moléculas de agua presentes en el sistema AQ (ver Figura **3-26**).

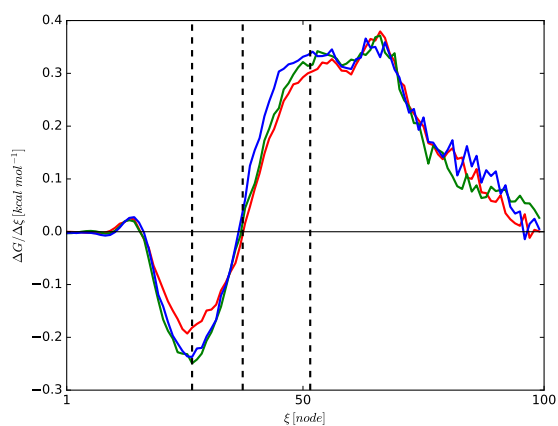
En la enzima WT la distancia entre el oxígeno y los hidrógenos metílicos es claramente menor que la que se observa en solución acuosa. Para la enzima Y68A esta distancia parte a niveles comparables al sistema acuoso y luego se reduce en la región W_2 , explicando probablemente, junto a otras interacciones electrostáticas, la progresiva reducción de la MRF en el sistema mutante y su solapamiento con la enzima WT (ver Figura **3-20**).

Este tipo de interacción claramente asiste la hibridación del grupo metilo hacia el estado de transición y podría explicar el 2°-KIE inverso que se observa para esta reacción. A fin de confirmar la naturaleza de esta interacción, la Figura **3-27** muestra las interacciones no covalentes presentes en una estructura representativa del estado de transición para las enzimas WT e Y68A.

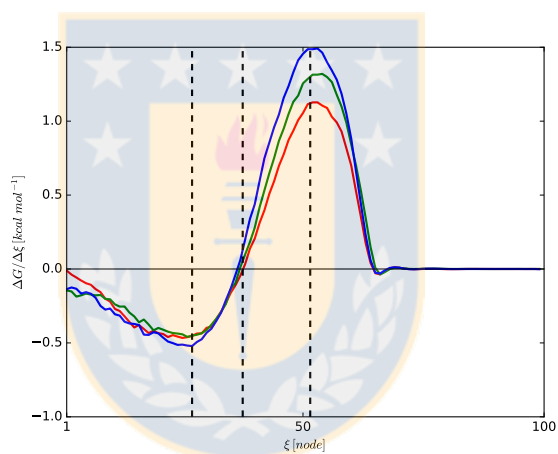
Para visualizar las interacciones entre los reactivos y la enzima en el estado de transición, se ha utilizado el programa NCIPLOT [41, 16] sobre una estructura representativa extraída de las simulaciones de dinámica molecular. Este programa calcula el índice NCI basado en la densidad electrónica (ρ) y el gradiente reducido de la densidad (RDG), que se define como:

$$RDG = \frac{1}{2(3\pi^2)^{\frac{1}{3}}} \frac{|\nabla\rho|}{\rho^{\frac{4}{3}}} \quad (3-4)$$

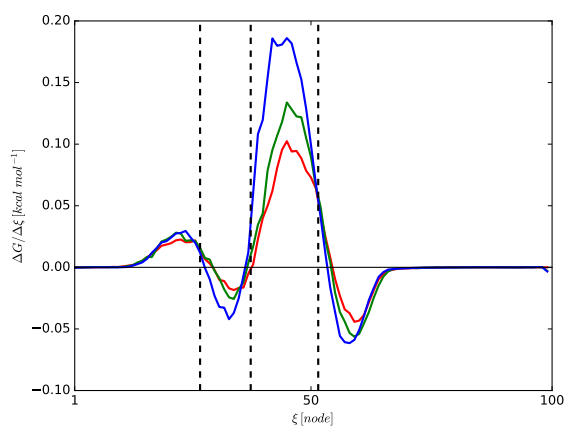
Las regiones de baja densidad electrónica, como las colas de densidad ubicadas lejos de los núcleos, muestran un valor significativo de RDG. Por otro lado, las regiones del espacio donde se establecen interacciones débiles entre dos fragmentos moleculares deberían mostrar una densidad electrónica baja acoplada a un RDG casi



(a)



(b)



(c)

Figura 3-25.: Perfil de fuerza de reacción media (MRF) para cada coordenada colectiva. Superior: CV1 (distancia S-C), centro: CV2 (distancia C-O), inferior: CV3 (hibridación del grupo metilo). WT (rojo), Y68A (verde) y AQ (azul). Fuente: Elaboración propia.

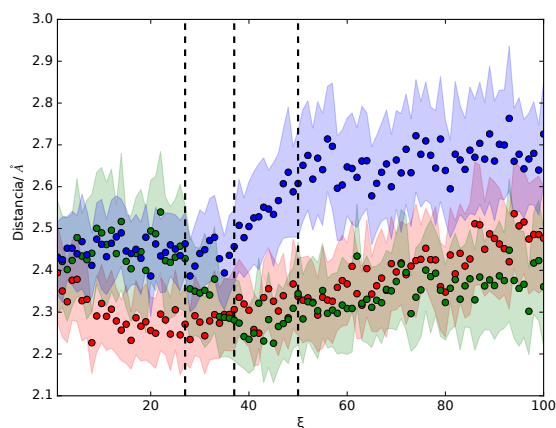


Figura 3-26.: Distancia mínima promedio a lo largo de la coordenada de reacción entre los hidrógenos presentes en el grupo metilo y el átomo de oxígeno del esqueleto proteico en Asp141. WT (rojo), Y68A (verde). Se incluye también la distancia mínima promedio entre los hidrógenos metílicos y los oxígenos de las moléculas de agua. Fuente: Elaboración propia.

nulo, debido a la presencia de un punto crítico de enlace.

Los contactos no covalentes se identifican luego con las regiones de RDG pequeño a baja densidad. Se localizan mediante la generación de isosuperficies de gradiente que encierran a regiones del espacio real. La naturaleza atractiva o repulsiva de dichas interacciones, así como su magnitud, se identifican basado en el signo y magnitud del segundo valor propio de la matriz Hessiana de densidad electrónica [41].

Aparte de los característicos anillos alrededor de los dos enlaces que se forman y rompen, se confirma la aparición de interacciones estabilizantes en WT entre el oxígeno nucleofílico de DOP y los átomo de oxígeno y azufre en Asp141 y Met40, respectivamente. En el caso de Y68A se puede observar la presencia de una molécula de solvente cercana al oxígeno nucleofílico de DOP, que además interactúa de manera atractiva con el oxígeno de Asp141, lo que probablemente debilita el puente de hidrógeno CH—O. De este análisis es posible concluir que la enzima WT asiste el proceso de hibridación del grupo metilo a través de interacciones específicas con átomos del esqueleto proteico en Asp141. Esto también disminuye la contribución a W_2 de la variable colectiva CV2 asociada a la distancia C-O. Por ende, los procesos de ruptura y formación de enlaces requieren menor energía libre en la enzima que en medio acuoso.

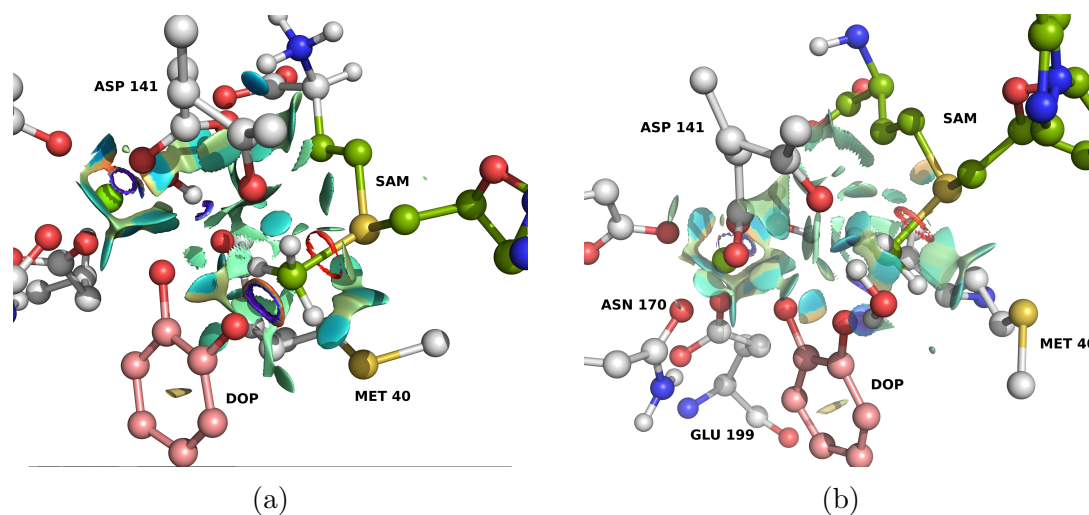


Figura 3-27.: Ilustración de las interacciones no-covalentes presentes en el estado de transición al interior de la cavidad enzimática de los sistemas WT e Y68A. En el segundo caso las superficies se han hecho semitransparentes, para dar una mejor visualización. Rojo: interacciones repulsivas/estéricas, azul: interacciones carga-carga, verde: puentes de hidrógeno. Por claridad, algunos átomos de hidrógeno fueron omitidos. Fuente: Elaboración propia.

3.3.5. Conclusión

A través de una combinación de métodos se estudió el mecanismo por el cual COMT cataliza la transferencia de metilo entre SAM y dopamina. El método de la cuerda permitió identificar el camino de mínima energía libre en tres entornos diferentes. El análisis de distancias no respalda la hipótesis de la compresión para explicar el 2° -KIE inverso que se observa experimentalmente en la enzima WT. Se propuso una explicación alternativa, en que una interacción específica de la proteína con los hidrógenos metílicos cambia la energía libre asociada a la inversión del grupo metilo.

Del análisis de fuerza de reacción media se concluye que la enzima posiciona los reactivos en una conformación de ataque favorable, revelada por el ángulo S-C-O y que la energía libre requerida para llevar a cabo los cambios estructurales es mucho menor en el sistema WT que en Y68A o AQ. Además, la contribución de energía libre de cada variable colectiva a los cambios electrónicos y estructurales reveló que el aumento de la contribución de CV1 (distancia S-C) a los cambios estructurales en AQ y en Y68A se originan por puentes de hidrógeno a las moléculas de agua, las que deben ser desplazadas para alcanzar el estado de transición. Esto se confirmó adicionalmente por el análisis de Hirshfeld-I, que identificaron los cambios electrónicos en la región comprendida entre el mínimo de MRF y el estado de transición. Para los cambios

ocurridos en esta zona la enzima provee un entorno favorable a través de interacciones específicas que favorecen la inversión del grupo metilo.

En resumen, la enzima WT facilita los cambios estructurales necesarios para alcanzar el estado de transición a través de interacciones específicas, que ubican a los reactivos de manera adecuada y asisten el proceso de inversión del grupo metilo hacia el estado de transición. La actividad disminuida de la enzima mutante Y68A se relacionó con la entrada de moléculas de agua a la cavidad catalítica y el debilitamiento de las interacciones específicas en el estado de transición. Esto podría explicar la tendencia observada en el 2°-KIE y la falta de estructura de la cavidad enzimática reportada por Zahng *et al.* [105]

3.4. Influencia del tiempo de simulación sobre la energética de la reacción

Dentro de las múltiples investigaciones relacionadas con el origen de la catálisis causada por COMT, algunos investigadores han propuesto la importancia de cambios conformacionales de la enzima como un factor crucial en la consecución de estructuras de reactivos y de estado de transición. Sin embargo en las simulaciones de dinámica molecular hasta la fecha no se han observado cambios conformacionales, lo que los defensores de esta propuesta han sugerido que esta relacionado por el corto tiempo de simulación generalmente usado, el cual sería insuficiente para observar dichas fluctuaciones.

A fin de testear esta hipótesis se han efectuado simulaciones QM/MM extensas del sistema enzimático WT descrito en el capítulo anterior. Sobre el camino de mínima energía libre se ha efectuado Umbrella Sampling en 50 puntos, durante 500 ps. Esto significa una multiplicación de 20 veces el tiempo que se ha muestreado el espacio conformacional circundante al ya definido camino de mínima energía libre, con respecto a lo efectuado en el capítulo anterior.

3.4.1. Preparación del sistema de reacción

El camino de mínima energía libre obtenido en el capítulo anterior entregó valores de cada una de las variables colectivas a lo largo de la coordenada de reacción. Para cada uno de estos puntos se definió una variable colectiva igual a la combinación antisimétrica de CV1 y CV2 (CV1-CV2), ξ . Siendo CV1 la distancia entre el azufre y el carbono metílico, y CV2 la distancia entre el mismo carbono metílico y el oxígeno nucleofílico. De esta manera, el estado de reactivos queda asociado a valores negativos

de la coordenada de reacción, mientras que el sistema de productos se asocia con valores positivos.

Se tomó la estructura de proteína y ligandos del último cuadro de cada trayectoria existente en el camino de mínima energía libre. Utilizando el software GROMACS, el campo de fuerzas AMBER99SB [37] y el método semiempírico DFTB3 implementado en GROMACS, se procedió a solvatar cada estructura con moléculas de agua TIP3P en una caja dodecahédrica, dejando 1 nm de distancia hasta el borde. La zona QM comprendió SAM, DOP y el ion magnesio. La elección de este método semiempírico para tratar la zona QM se hizo basada en los resultados favorables obtenidos en el sistema modelo (ver capítulo 3.2), donde el error con respecto a la reacción experimental fue de solamente 4.1 kcal mol⁻¹.

Posteriormente, se procedió a minimizar la energía del sistema y equilibrarlo, conservando el valor individual de ξ para cada ventana de simulación. La equilibración se hizo en dos etapas, primero 50 ps con restricción absoluta sobre cada átomo QM y posteriormente 10 ps con una restricción aplicada a la coordenada de reacción. En todo momento se utilizó el termostato V-rescale [11].

Una dinámica preliminar de 50 ps permitió equilibrar la presión bajo el barostato de Berendsen, y a continuación se efectuaron las dinámicas de producción, 500 ps para cada ventana aplicando el barostato de Parrinello-Rahman [65].

3.4.2. Comportamiento de la energía libre en función del tiempo

Para la enzima WT se efectuaron 500 ps de dinámica molecular NPT. La Figura 3-28 muestra el perfil obtenido para la energía libre y de fuerza de reacción media luego de 500 ps. La tabla 3-10 muestra los valores de las contribuciones por región de MRF a la energía libre, evaluada a través de *Umbrella Integration* [45]. Es posible observar que la convergencia de los valores de cada contribución se produjo después de 200 ps en donde todos los valores se mantuvieron estables. Las ubicaciones en la coordenada de los puntos de mínimo y máximo de la MRF se mantuvieron estables también, con pequeñas variaciones en la región correspondiente a W_3 .

La barrera de activación obtenida fue de 14.9 kcal mol⁻¹, lo que, si se compara con la barrera calculada en el capítulo anterior a nivel AM1 (12.9 kcal mol⁻¹) resulta más cercana al valor de 18 kcal mol⁻¹ reportado experimentalmente. En el caso del sistema modelo, se obtuvo una barrera de energía libre 4.3 kcal mol⁻¹ menor que la reportada experimentalmente. En este caso, la tendencia se repite: se obtiene un valor 3.1 kcal mol⁻¹ menor que el observado.

En términos relativos, la contribución W_1 aporta un 67% de la energía libre que

t	ξ_{min}	ξ_{max}	W1	W2	W3	W4	E_a
25	-0.41	0.91	10.0	4.9	-17.8	-17.0	14.9
50	-0.41	0.84	10.0	4.8	-15.1	-19.6	14.8
100	-0.41	0.84	10.0	4.8	-15.1	-19.7	14.8
200	-0.42	0.91	10.0	4.9	-17.7	-17.1	14.9
300	-0.42	0.91	10.0	4.8	-17.7	-17.1	14.8
400	-0.42	0.91	10.0	4.9	-17.7	-17.1	14.9
500	-0.42	0.91	10.0	4.9	-17.7	-17.0	14.9

Tabla 3-10.: Contribuciones de energía libre en función del tiempo de simulación en la enzima WT. Para diferentes cantidades de tiempo transcurrido (ps) se muestran los valores del mínimo y máximo de la MRF (Å), las diferentes contribuciones al perfil de energía libre (kcal mol⁻¹) y la energía de activación, E_a (kcal mol⁻¹). Fuente: Elaboración propia.

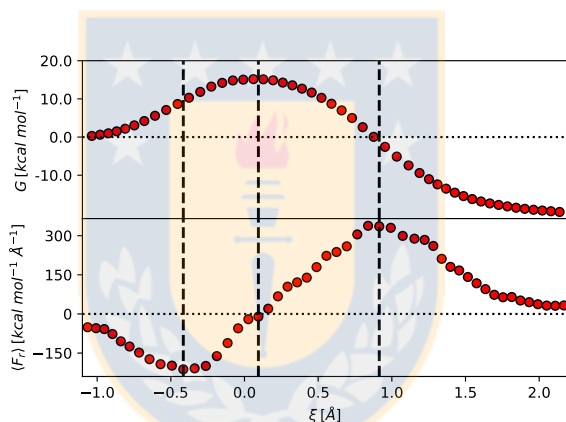


Figura 3-28.: Superior: Perfil de energía libre para la reacción en WT, calculado a con trayectoria de 500 ps. Inferior: Perfil de la fuerza de reacción media, para la misma trayectoria. Fuente: Elaboración propia.

forma la barrera de activación, quedando el resto (33 %) en la zona correspondiente a W_2 . De esta manera, se mantiene la tendencia observada en el cálculo AM1, donde los porcentajes fueron de 64 y 36 %.

Para la enzima mutante, se efectuó una simulación similar, pero solamente hasta 250 ps, debido a la poca variación observada. La Figura 3-29 muestra los perfiles energéticos, mientras que la Tabla 3-11 nos indica las diferentes contribuciones. Se puede ver que la barrera de activación obtenida es 0.7 kcal mol⁻¹ mayor que en el caso WT, diferencia similar a la observada para el cálculo AM1. En cuanto contribuciones relativas, en este cálculo W_1 representa un 60 % de la energía libre implicada en la barrera de activación, para AM1 este valor fue de 64 %.

El ángulo SCO (Figura 3-30a) muestra que, nuevamente, la configuración que favorece el estado de transición es un estricto alineamiento, a fin de maximizar el

t	ξ_{min}	ξ_{max}	W1	W2	W3	W4	E_a
25	-0.49	0.83	9.5	6.1	-17.0	-19.6	15.7
50	-0.49	0.83	9.4	6.2	-17.0	-19.6	15.6
100	-0.49	0.83	9.4	6.2	-17.0	-19.5	15.6
200	-0.49	0.83	9.4	6.2	-17.0	-19.6	15.6
250	-0.49	0.83	9.4	6.2	-17.0	-19.6	15.6

Tabla 3-11.: Contribuciones de energía libre a lo largo del tiempo de simulación en la mutante Y68A. Para diferentes cantidades de tiempo transcurrido (ps) se muestran los puntos del mínimo y máximo de la MRF (\AA), las diferentes contribuciones al perfil de energía libre (kcal mol^{-1}) y la energía de activación, E_a (kcal mol^{-1}). Fuente: Elaboración propia.

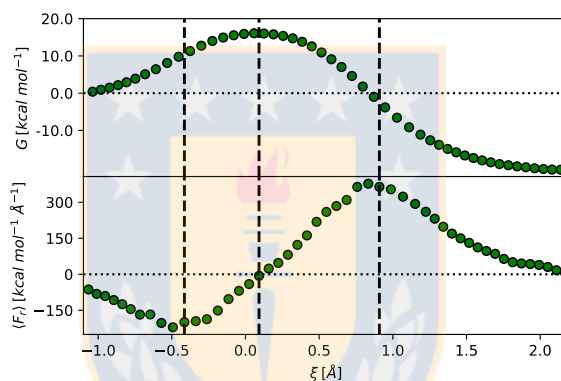


Figura 3-29.: Superior: Perfil de energía libre para la reacción en WT con un tiempo total de simulación de 500 ps por valor de coordenada de reacción. Inferior: Perfil de la fuerza de reacción media para las mismas condiciones. Fuente: Elaboración propia.

solapamiento orbital. En la mutante este ángulo tiene fluctuaciones ligeramente superiores, lo que es concordante con la suposición de un sitio activo menos rígido y estructurado. La distancia mínima entre el átomo de oxígeno en el *backbone* de Asp141 y los protones metílicos de SAM se mantiene baja (Figura 3-30b), indicando que los puentes de hidrógeno atípicos, que contribuyen a estabilizar la transferencia de metilo, se reproducen nuevamente a este nivel de teoría. Sin embargo, en la mutante estas distancias son ligeramente mayores, lo que es concordante con una oscilación más libre del grupo metilo y podría traducirse en una menor inversión del 2°-KIE en Y68A.

A nivel AM1, los resultados obtenidos indicaron que la mutación en Y68A afectaba a W_1 y W_2 de igual manera, por lo que en ambos casos W_1 representó un 64% de la energía de activación. En el caso de DFTB, el paso de WT a Y68A implicó una disminución relativa de la importancia de W_1 de 67% a 60%. Esto puede explicarse

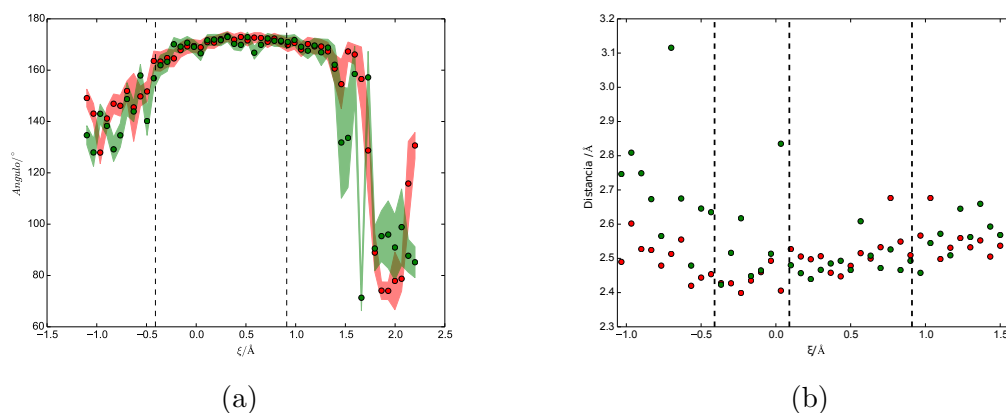


Figura 3-30.: Comportamiento promedio del ángulo SCO para 500 ps de simulación QM/MM (izquierda) y distancia mínima promedio entre el átomo de oxígeno en el esqueleto de Asp141 y los protones metílicos de SAM (derecha). En ambos casos, el rojo representa a la enzima WT, mientras el verde a la mutante Y68A. Fuente: Elaboración propia.

por el hecho de que el mínimo de MRF se alcanzó más tempranamente en Y68A. Es probable que las interacciones poco favorables al interior de la cavidad mutante dificultaran el correcto posicionamiento de los átomos implicados en la transferencia, resultando más costosos energéticamente los cambios electrónicos que comprende el ataque nucleofílico. En la zona de productos, se observan amplias variaciones tanto en ángulo como en la distancia mínima. Esto, que no se observó en las simulaciones llevadas a cabo con AM1 lo que se debe al aumento del tiempo de simulación. En la simulación más extensa, el entorno estructural tendría tiempo suficiente para acomodarse a los significativos cambios que implica la reacción, como la desaparición de dos cargas atómicas para dar paso a un complejo de productos más cercano a la neutralidad (excepto por el grupo amino de DOP, que permanece cargado siempre).

Vistos estos resultados, la ausencia de grandes variaciones en función del tiempo en las regiones correspondientes a reactivos, puede explicarse debido al aislamiento que la enzima entrega a la reacción. En efecto, la cavidad catalítica, con sus dipolos preorganizados entrega un entorno relativamente invariante, que se ve menos alterado por la desaparición de la carga una vez terminada la reacción, que el entorno presente en la matriz de un solvente.

4. Conclusiones

A lo largo de este trabajo se ha analizado en profundidad la reacción de transferencia de metilo entre SAM y DOP, comparando la influencia del entorno a través de simulaciones de dinámica molecular.

En primer lugar se logró mejorar la descripción de las interacciones inter- e intramoleculares del cofactor *S*-adenosilmetionina, a través del desarrollo de parámetros de torsión y cargas atómicas que mejoran su descripción en el contexto del campo AMBER99. Con ello, es posible describir de manera adecuada sus conformaciones en solución y dentro de cavidades enzimáticas, lo que se verificó con una mejor predicción de las distancias NOE reportadas a través de resonancia magnética nuclear. Un punto importante que poseen los parámetros aquí desarrollados es la capacidad de describir la conformación *anti* que se ha observado experimentalmente, objetivo no cumplido por los parámetros para adenosina presentes en AMBER99. El conjunto de cargas HI y D-HI entrega, además, una descripción electrostática molecular más independiente de factores conformacionales y/o de orientación, virtud no presente en otro tipo de cargas atómicas como RESP. Con esto se espera contribuir a describir de mejor forma las interacciones intermoleculares entre SAM y su entorno en fases condensadas.

También fue posible validar la aplicación de un método semiempírico de mecánica cuántica (DFTB3) capaz de describir esta reacción de manera adecuada, considerando el costo computacional y la exactitud del resultado comparado contra un modelo experimental y un cálculo *ab initio* de alto nivel. La desaparición de carga que ocurre durante el proceso estudiado mostró ser una limitante para los modelos de solvente implícito, revelando la necesidad de utilizar moléculas explícitas que consideren las alteraciones entrópicas del entorno, a fin de describir de manera correcta los cambios energéticos que ocurren en la reacción. El valor sugerido para la energía de activación de la reacción entre trimetilsulfonio y fenolato, obtenido a través de dinámica molecular, cumple los requisitos para constituir una referencia en espera de futura validación experimental.

En segundo lugar, se ha podido contribuir aspectos relevantes a la catálisis efectuada por COMT. La comparación del perfil de energía libre enzimático con su análogo acuoso permite ver que la cavidad que aloja el sitio activo facilita la trans-

formación estructural desde el complejo reactivo hasta la configuración del estado de transición. El análisis de ángulos de enlace y distancias interatómicas sugiere que dichos parámetros varían con menor resistencia en la enzima, y las diferentes distribuciones de carga sobre átomos clave en los diferentes entornos testeados, indican que la influencia del sitio activo es netamente electrostática.

La comparación de la enzima nativa con la reacción en la mutante Y68A sugiere que la diferencia de energía libre observada entre ambos procesos puede deberse a una alteración del sitio activo que favorece la entrada del solvente a la cavidad y disminuye el poder nucleofílico del oxígeno catecólico, generando a su vez lo que se ha llamado un sitio activo menos rígido y estructurado en concordancia con un reciente estudio experimental.

La simulación en tiempos extensos ha indicado que la convergencia de la barrera de energía libre se produce alrededor de 200 ps de tiempo de simulación por ventana de muestreo.

La hipótesis planteada al inicio de esta tesis, que supone que a la catálisis enzimática contribuyen elementos estructurales y electrónicos ha resultado ser cierta, sin embargo es necesario puntualizar que los cambios estructurales, (que son los más importantes, abarcando un sesenta por ciento del total de la energía libre de activación), no se relacionan con grados de libertad lentos de la enzima, sino con un alivio de las tensiones presentes entre los reactivos, gracias a la presencia de un sitio activo preorganizado. Gracias a este marco electrostático es posible alcanzar una configuración de estado de transición más fácilmente. Un factor clave en este proceso parece ser la habilidad de la enzima para aislar al oxígeno catecólico, favoreciendo su nucleofilicidad. La importancia de este átomo se refleja en la contribución prioritaria de la coordenada C-O a la barrera de reacción. Es importante también la presencia de interacciones con residuos enzimáticos como Asp141 y Met40, cuyos grupos cargados negativamente tienden a favorecer la configuración del estado de transición a través de puentes de hidrógeno establecidos con los protones del grupo metilo.

Se ha observado que la coordinación divalente generalmente reportada con el sustrato catecol no ocurre cuando la simulación involucra a dopamina, la que junto a otros neurotransmisores, forma parte del conjunto de sustratos naturales de la enzima.

4.1. Perspectivas futuras

Para el desarrollo de esta tesis se ha tomado una de las formas estables de posicionamiento del reactivo DOP en el interior de la enzima, considerando que es solamente uno de sus grupos hidroxilo se ha ionizado(Figura 2-5).

Durante el último tiempo se ha investigado la factibilidad de abordar otras formas de coordinación entre el reactivo DOP y Mg^{2+} , a fin de cuantificar la influencia que tienen las condiciones iniciales sobre la barrera de reacción. Es notable que el posicionamiento del sustrato utilizado por un amplio porcentaje de investigadores (un oxígeno con carga negativa y ambos coordinados al metal divalente) no parezca ser estable en el caso de DOP, que es un sustrato natural, sino solamente cuando se utiliza catecol. El grupo amino cargado positivamente de la dopamina puede ser el responsable. Esto podría explicar el mucho mayor K_M (188 vs 49.7, μM) que exhibe DOP con respecto a CAT. Si suponemos la validez del modelo Michaelis-Menten, la llegada de catecol es facilitada por su menor tamaño y las múltiples formas de coordinación disponibles. En el caso de DOP, como se ha dicho, su mayor tamaño, sumado a la imposibilidad de unirse al catión divalente en una configuración bidentada, hace más difícil el establecimiento del complejo de Michaelis, dando lugar a una mayor K_M , entendida como la concentración de sustrato necesaria para lograr $0.5 V_{max}$. Una perspectiva importante es estudiar y racionalizar la variación de estos parámetros a lo largo de un gran grupo de catecoles.

Un tema que pretende ser abordado en el futuro es la protonación de los grupos hidroxilo de diferentes sustratos, en presencia del metal divalente y los residuos proteicos que conforman el sitio activo. Considerando que el primer y segundo pKa de un sustrato como dopamina se ubica en 8.91 y 10.43, esta molécula en solución a pH fisiológico debería tener sus dos grupos hidroxilo protonados. Es importante investigar la influencia que ejercen sobre su estado de protonación factores enzimáticos, como la presencia del magnesio y las diferentes poses de coordinación a éste. Factores intramoleculares no menos importantes parecen ser los diferentes sustituyentes que posee el anillo aromático. La evolución de la esfera de coordinación a Mg^{2+} a lo largo de la coordenada de reacción es otro desafío que aún no ha sido atacado desde la química computacional.

Como trabajo preliminar, en las simulaciones MM y QM/MM con DFTB3 de esta tesis ha sido posible hallar dos conformaciones estables: la que se mostró en la Figura 2-5, utilizada en este trabajo, y otra forma de coordinación también monodentada, en la cual el mismo oxígeno aniónico es el que se coordina a Mg^{2+} y posteriormente realizaría el ataque nucleofílico. La factibilidad de este mecanismo, posibles cambios de coordinación durante el proceso y su barrera de activación asociada están actualmente en vías de ser analizadas.

Bibliografía

- [1] BARREIRO, Eliezer J. ; KÜMMERLE, Arthur E. ; FRAGA, Carlos A. M.: The Methylation Effect in Medicinal Chemistry. En: *Chemical Reviews* 111 (2011), Nr. 9, p. 5215–5246
- [2] BAUERLE, Matthew R. ; SCHWALM, Erica L. ; BOOKER, Squire J.: Mechanistic Diversity of Radical S-Adenosylmethionine (SAM)-dependent Methylation. En: *Journal of Biological Chemistry* 290 (2015), Nr. 7, p. 3995–4002
- [3] BAYLY, Christopher I. ; CIEPLAK, Piotr ; CORNELL, Wendy ; KOLLMAN, Peter A.: A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. En: *The Journal of Physical Chemistry* 97 (1993), Nr. 40, p. 10269–10280
- [4] BERENDSEN, H. J. C. ; POSTMA, J. P. M. ; VAN GUNSTEREN, W. F. ; DINOLA, A. ; HAAK, J. R.: Molecular dynamics with coupling to an external bath. En: *The Journal of Chemical Physics* 81 (1984), Nr. 8, p. 3684–3690
- [5] BERGER, Shelley L.: The Histone Modification Circus. En: *Science* 292 (2001), Nr. 5514, p. 64–65. – ISSN 0036–8075
- [6] BORCHARDT, Ronald T.: Mechanism of alkaline hydrolysis of S-adenosyl-L-methionine and related sulfonium nucleosides. En: *Journal of the American Chemical Society* 101 (1979), Nr. 2, p. 458–463
- [7] BORIACK-SJODIN, P. A. ; SWINGER, Kerren K.: Protein Methyltransferases: A Distinct, Diverse, and Dynamic Family of Enzymes. En: *Biochemistry* 55 (2016), Nr. 11, p. 1557–1569
- [8] BRUCE, Thomas C. ; ZHENG, Ya-Jun: A theoretical examination of the factors controlling the catalytic efficiency of a transmethylation enzyme: Catechol O-Methyltransferase. En: *Journal of the American Chemical Society* 119 (1997), p. 8137–8145

- [9] BULTINCK, Patrick ; VAN ALSENOY, Christian ; AYERS, Paul W. ; CARBÓ-DORCA, Ramon: Critical analysis and extension of the Hirshfeld atoms in molecules. En: *The Journal of Chemical Physics* 126 (2007), Nr. 14
- [10] BÜRGI, Roland ; PITERA, Jed ; VAN GUNSTEREN, Wilfred F.: Assessing the effect of conformational averaging on the measured values of observables. En: *Journal of Biomolecular NMR* 19 (2001), Nr. 4, p. 305–320. – ISSN 1573–5001
- [11] BUSSI, Giovanni ; DONADIO, Davide ; PARRINELLO, Michele: Canonical sampling through velocity rescaling. En: *The Journal of Chemical Physics* 126 (2007), Nr. 1, p. 014101
- [12] CALLAHAN, Brian P. ; WOLFENDEN, Richard: Migration of Methyl Groups between Aliphatic Amines in Water. En: *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003), Nr. 34, p. 10481–10481
- [13] CANTONI, G. L.: THE NATURE OF THE ACTIVE METHYL DONOR FORMED ENZYMATICALLY FROM L-METHIONINE AND ADENOSINETRIPHOSPHATE^{1,2}. En: *Journal of the American Chemical Society* 74 (1952), Nr. 11, p. 2942–2943
- [14] CASTEJON, Henry ; WIBERG, Kenneth B. ; SKLENAK, Stepan ; HINZ, Wolfgang: Solvent Effects on Methyl Transfer Reactions. 2. The Reaction of Amines with Trimethylsulfonium Salts. En: *Journal of the American Chemical Society* 123 (2001), Nr. 25, p. 6092–6097
- [15] CERÓN, María L. ; ECHEGARAY, Eleonora ; GUTIÉRREZ-OLIVA, Soledad ; HERRERA, Bárbara ; TORO-LABBÉ, Alejandro: The reaction electronic flux in chemical reactions. En: *Science China Chemistry* 54 (2011), Nr. 12, p. 1982–1988. – ISSN 1869–1870
- [16] CONTRERAS-GARCÍA, Julia ; JOHNSON, Erin R. ; KEINAN, Shahar ; CHAUDRET, Robin ; PIQUEMAL, Jean-Philip ; BERATAN, David N. ; YANG, Weita: NCIPLOT: A Program for Plotting Noncovalent Interaction Regions. En: *Journal of Chemical Theory and Computation* 7 (2011), Nr. 3, p. 625–632
- [17] COWARD, James K. ; LOK, Roger ; TAKAGI, Orinne: General base catalysis in nucleophilic attack at sp³ carbon of methylase model compounds. En: *Journal of the American Chemical Society* 98 (1976), Nr. 4, p. 1057–1059
- [18] CUEVAS, Gabriel ; FERNANDO, Cortés: *Introducción a la química computacional*. Fondo de Cultura Económica, 2003 (La ciencia en el nuevo milenio.)

- [19] DAURA, Xavier ; ANTES, Iris ; VAN GUNSTEREN, Wilfred F. ; THIEL, Walter ; MARK, Alan E.: The effect of motional averaging on the calculation of NMR-derived structural properties. En: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 36 (1999), Nr. 4, p. 542–555. – ISSN 1097–0134
- [20] DUPRADEAU, Francois-Yves ; PIGACHE, Adrien ; ZAFFRAN, Thomas ; SAVINEAU, Corentin ; LELONG, Rodolphe ; GRIVEL, Nicolas ; LELONG, Dimitri ; ROSANSKI, Wilfried ; CIEPLAK, Piotr: The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building. En: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010), p. 7821–7839
- [21] ECHEGARAY, Eleonora ; TORO-LABBÉ, Alejandro: Reaction Electronic Flux: A New Concept To Get Insights into Reaction Mechanisms. Study of Model Symmetric Nucleophilic Substitutions. En: *The Journal of Physical Chemistry A* 112 (2008), Nr. 46, p. 11801–11807
- [22] ELSTNER, M. ; POREZAG, D. ; JUNGnickEL, G. ; ELSNER, J. ; HAUGK, M. ; FRAUENHEIM, Th. ; SUHAI, S. ; SEIFERT, G.: Self-consistent-charge density-functional tight-binding method for simulations of complex materials properties. En: *Phys. Rev. B* 58 (1998), Sep, p. 7260–7268
- [23] FIELD, Martin J. ; ALBE, Marc ; BRET, Céline ; PROUST-DE MARTIN, Flavien ; THOMAS, Aline: The dynamo library for molecular simulations using hybrid quantum mechanical and molecular mechanical potentials. En: *Journal of Computational Chemistry* 21 (2000), Nr. 12, p. 1088–1100. – ISSN 1096–987X
- [24] FOLLMANN, Hartmut ; GREMELS, Georg: Adenine Nucleosides in Solution: Stabilisation of the anti-Conformation by C-5 Substituents. En: *European Journal of Biochemistry* 47 (1974), Nr. 1, p. 187–197. – ISSN 1432–1033
- [25] FOLLMANN, Hartmut ; KUNTZ, Irmtrud ; ZACHARIAS, Wolfgang: Adenine Nucleosides in Solution: Circular Dichroism Studies and Base Conformation. En: *European Journal of Biochemistry* 58 (1975), Nr. 1, p. 31–41. – ISSN 1432–1033
- [26] FRENKEL, Daan: *Understanding molecular simulation : from algorithms to applications*. San Diego : Academic Press, 2002. – ISBN 9780122673511
- [27] FRISCH, M. J. ; TRUCKS, G. W. ; SCHLEGEL, H. B. ; SCUSERIA, G. E. ; ROBB, M. A. ; CHEESEMAN, J. R. ; MONTGOMERY, J. A. ; VREVEN, T. ; KUDIN, K. N. ; BURANT, J. C. ; MILLAM, J. M. ; IYENGAR, S. S. ; TOMASI,

- J. ; BARONE, V. ; MENNUCCI, B. ; COSSI, M. ; SCALMANI, G. ; REGA, N. ; PETERSSON, G. A. ; NAKATSUJI, H. ; HADA, M. ; EHARA, M. ; TOYOTA, K. ; FUKUDA, R. ; HASEGAWA, J. ; ISHIDA, M. ; NAKAJIMA, T. ; HONDA, Y. ; KITAO, O. ; NAKAI, H. ; KLENE, M. ; LI, X. ; KNOX, J. E. ; HRATCHIAN, H. P. ; CROSS, J. B. ; BAKKEN, V. ; ADAMO, C. ; JARAMILLO, J. ; GOMPERTS, R. ; STRATMANN, R. E. ; YAZYEV, O. ; AUSTIN, A. J. ; CAMMI, R. ; POMELLI, C. ; OCHTERSKI, J. W. ; AYALA, P. Y. ; MOROKUMA, K. ; VOTH, G. A. ; SALVADOR, P. ; DANNENBERG, J. J. ; ZAKRZEWSKI, V. G. ; DAPPRICH, S. ; DANIELS, A. D. ; STRAIN, M. C. ; FARKAS, O. ; MALICK, D. K. ; RABUCK, A. D. ; RAGHAVACHARI, K. ; FORESMAN, J. B. ; ORTIZ, J. V. ; CUI, Q. ; BABOUL, A. G. ; CLIFFORD, S. ; CIOSLOWSKI, J. ; STEFANOV, B. B. ; LIU, G. ; LIASHENKO, A. ; PISKORZ, P. ; KOMAROMI, I. ; MARTIN, R. L. ; FOX, D. J. ; KEITH, T. ; AL-LAHAM, M. A. ; PENG, C. Y. ; NANAYAKKARA, A. ; CHALLACOMBE, M. ; GILL, P. M. W. ; JOHNSON, B. ; CHEN, W. ; WONG, M. W. ; GONZALEZ, C. ; POPLE, J. A.: *Gaussian 03, Revision C.02*. – Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004
- [28] FRISCH, M. J. ; TRUCKS, G. W. ; SCHLEGEL, H. B. ; SCUSERIA, G. E. ; ROBB, M. A. ; CHEESEMAN, J. R. ; SCALMANI, G. ; BARONE, V. ; PETERSSON, G. A. ; NAKATSUJI, H. ; LI, X. ; CARICATO, M. ; MARENICH, A. V. ; BLOINO, J. ; JANESKO, B. G. ; GOMPERTS, R. ; MENNUCCI, B. ; HRATCHIAN, H. P. ; ORTIZ, J. V. ; IZMAYLOV, A. F. ; SONNENBERG, J. L. ; WILLIAMS-YOUNG, D. ; DING, F. ; LIPPARINI, F. ; EGIDI, F. ; GOINGS, J. ; PENG, B. ; PETRONE, A. ; HENDERSON, T. ; RANASINGHE, D. ; ZAKRZEWSKI, V. G. ; GAO, J. ; REGA, N. ; ZHENG, G. ; LIANG, W. ; HADA, M. ; EHARA, M. ; TOYOTA, K. ; FUKUDA, R. ; HASEGAWA, J. ; ISHIDA, M. ; NAKAJIMA, T. ; HONDA, Y. ; KITAO, O. ; NAKAI, H. ; VREVEN, T. ; THROSELL, K. ; MONTGOMERY, J. A. ; PERALTA, J. E. ; OGLIARO, F. ; BEARPARK, M. J. ; HEYD, J. J. ; BROTHERS, E. N. ; KUDIN, K. N. ; STAROVEROV, V. N. ; KEITH, T. A. ; KOBAYASHI, R. ; NORMAND, J. ; RAGHAVACHARI, K. ; RENDELL, A. P. ; BURANT, J. C. ; IYENGAR, S. S. ; TOMASI, J. ; COSSI, M. ; MILLAM, J. M. ; KLENE, M. ; ADAMO, C. ; CAMMI, R. ; OCHTERSKI, J. W. ; MARTIN, R. L. ; MOROKUMA, K. ; FARKAS, O. ; FORESMAN, J. B. ; FOX, D. J.: *Gaussian 09 Revision A.02*. 2009. – Gaussian Inc. Wallingford CT
- [29] GRAY, Carmen H. ; COWARD, James K. ; SCHOWEN, K. B. ; SCHOWEN, Richard L.: α -Deuterium and carbon-13 isotope effects for a simple, intermolecular sulfur-to-oxygen methyl-transfer reaction. Transition-state structures

- and isotope effects in transmethylation and transalkylation. En: *Journal of the American Chemical Society* 101 (1979), p. 4351–4358
- [30] GROENHOF, Gerrit: Introduction to QM/MM Simulations. En: MONTICELLI, Luca (Ed.) ; SALONEN, Emppu (Ed.): *Biomolecular Simulations* Vol. 924. Humana Press, 2013. – ISBN 978–1–62703–016–8, p. 43–66
- [31] GROVE, Tyler L. ; BENNER, Jack S. ; RADLE, Matthew I. ; AHLUM, Jessica H. ; LANDGRAF, Bradley J. ; KREBS, Carsten ; BOOKER, Squire J.: A Radically Different Mechanism for S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases. En: *Science* 332 (2011), Nr. 6029, p. 604–607. – ISSN 0036–8075
- [32] HEGAZI, Mohamed F. ; BORCHARDT, Ronald T. ; SCHOWEN, Richard L.: α -Deuterium and Carbon-13 isotope effects for methyl transfer catalyzed by catechol O-Methyltransferase. S_N2 -like transition state. En: *Journal of the American Chemical Society* 101 (1979), p. 4359–4365
- [33] HERRERA, Bárbara ; TORO-LABBÉ, Alejandro: The role of the reaction force to characterize local specific interactions that activate the intramolecular proton transfers in DNA basis. En: *The Journal of Chemical Physics* 121 (2004), Nr. 15, p. 7096–7102
- [34] HERRERA, Barbara ; TORO-LABBE, Alejandro: The Role of Reaction Force and Chemical Potential in Characterizing the Mechanism of Double Proton Transfer in the Adenine Uracil Complex. En: *The Journal of Physical Chemistry A* 111 (2007), Nr. 26, p. 5921–5926
- [35] HESS, B. ; KUTZNER, C. ; VAN DER SPOEL, D. ; LINDAHL, E.: GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. En: *Journal of Chemical Theory and Computation* 4 (2008), p. 435–447
- [36] HIRSHFELD, F. L.: Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities. En: *Theoretica chimica acta* 44 (1977), Nr. 2, p. 129–138. – ISSN 1432–2234
- [37] HORNAK, Victor ; ABEL, Robert ; OKUR, Asim ; STROCKBINE, Bentley ; ROITBERG, Adrian ; SIMMERLING, Carlos: Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. En: *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics* 65 (2006), p. 712–725
- [38] HOROWITZ, Scott ; DIRK, Lynnette M. ; YESSELMAN, Joseph D. ; NIMTZ, Jennifer S. ; ADHIKARI, Upendra ; MEHL, Ryan A. ; SCHEINER, Steve ; HOUTZ,

- Robert L. ; AL-HASHIMI, Hashim M. ; TRIEVEL, Raymond C.: Conservation and Functional Importance of Carbon Oxygen Hydrogen Bonding in AdoMet-Dependent Methyltransferases. En: *Journal of the American Chemical Society* 135 (2013), Nr. 41, p. 15536–15548
- [39] JENSEN, Frank: *Introduction to Computational Chemistry*. John Wiley & Sons, 1999
- [40] JINDAL, Garima ; WARSHEL, Arieh: Exploring the Dependence of QM-MM Calculations of Enzyme Catalysis on the Size of the QM Region. En: *The Journal of Physical Chemistry B* 0 (0), Nr. 0, p. null
- [41] JOHNSON, Erin R. ; KEINAN, Shahar ; MORI-SÁNCHEZ, Paula ; CONTRERAS-GARCÍA, Julia ; COHEN, Aron J. ; YANG, Weitao: Revealing Noncovalent Interactions. En: *Journal of the American Chemical Society* 132 (2010), Nr. 18, p. 6498–6506
- [42] JONES, Peter A. ; TAKAI, Daiya: The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. En: *Science* 293 (2001), Nr. 5532, p. 1068–1070. – ISSN 0036–8075
- [43] JR., Thom H. D.: Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. En: *The Journal of Chemical Physics* 90 (1989), Nr. 2, p. 1007–1023
- [44] KANAAN, Natalia ; JAVIER, Pernía J. ; WILLIAMS, Ian H.: QM/MM simulations for methyl transfer in solution and catalysed by COMT:ensemble-averaging of kinetic isotope effects. En: *Chemical Communications* 46 (2008), p. 6114–6116
- [45] KASTNER, Johannes: Umbrella integration in two or more reaction coordinates. En: *The Journal of Chemical Physics*. 131 (2009), p. 34109–1–34109–8
- [46] KISS, László E. ; DA SILVA, Patrício S.: Medicinal Chemistry of Catechol O-Methyltransferase (COMT) Inhibitors and Their Therapeutic Utility. En: *Journal of Medicinal Chemistry* 57 (2014), Nr. 21, p. 8692–8717
- [47] KLEE, Werner A. ; MUDD, S. H.: The Conformation of Ribonucleosides in Solution. The Effect of Structure on the Orientation of the Base*. En: *Biochemistry* 6 (1967), Nr. 4, p. 988–998
- [48] KOSKINEN, Pekka ; MÄKINEN, Ville: Density-functional tight-binding for beginners. En: *Computational Materials Science* 47 (2009), Nr. 1, p. 237 – 253. – ISSN 0927–0256

- [49] KOZBIAL, Piotr Z. ; MUSHEGIAN, Arcady R.: Natural history of S-adenosylmethionine-binding proteins. En: *BMC Structural Biology* 5 (2005), Nr. 1, p. 1–26. – ISSN 1472–6807
- [50] KULIK, H. J. ; ZHANG, J. ; KLINMAN, J. P. ; MARTINEZ, T. J.: How large should the QM region be in QM/MM calculations? The case of catechol O-methyltransferase. En: *Journal of Physical Chemistry B* 120 (2016), p. 11381–11393
- [51] KWON, Taewoo ; CHANG, Jeong H. ; KWAK, Eunyee ; LEE, Chang W. ; JOACHIMIAK, Andrzej ; KIM, Young C. ; LEE, Jae W. ; CHO, Yunje: Mechanism of histone lysine methyl transfer revealed by the structure of SET7/9—AdoMet. En: *The EMBO Journal* 22 (2003), Nr. 2, p. 292–303. – ISSN 0261–4189
- [52] LAI, Cheng-Wei ; CHEN, Hsiao-Ling ; LIN, Ken-Yo ; LIU, Fang-Chueh ; CHONG, Kowit-Yu ; CHENG, Winston T. K. ; CHEN, Chuan-Mu: FTSJ2, a Heat Shock-Inducible Mitochondrial Protein, Suppresses Cell Invasion and Migration. En: *PLOS ONE* 9 (2014), 03, Nr. 3, p. 1–11
- [53] LAMEIRA, Jeronimo ; BORA, Ram P. ; CHU, Zhen T. ; WARSHEL, Arieh: Methyltransferases do not work by compression, cratic, or desolvation effects, but by electrostatic preorganization. En: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 83 (2015), Nr. 2, p. 318–330. – ISSN 1097–0134
- [54] LANDAU, Lev: *Fisica estadistica*. Barcelona : Reverte, 1975. – ISBN 9788429140866
- [55] LISCOMBE, David K. ; LOUIE, Gordon V. ; NOEL, Joseph P.: Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases. En: *Nat. Prod. Rep.* 29 (2012), p. 1238–1250
- [56] MARENICH, Aleksandr V. ; CRAMER, Christopher J. ; TRUHLAR, Donald G.: Universal Solvation Model Based on the Generalized Born Approximation with Asymmetric Descreening. En: *Journal of Chemical Theory and Computation* 5 (2009), Nr. 9, p. 2447–2464
- [57] MARKHAM, George D. ; NORRBY, Per-Ola ; BOCK, Charles W.: S-Adenosylmethionine Conformations in Solution and in Protein Complexes Conformational Influences of the Sulfonium Group. En: *Biochemistry* 41 (2002), Nr. 24, p. 7636–7646

- [58] MARTIN, Jennifer L. ; MCMILLAN, Fiona M.: {SAM} (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. En: *Current Opinion in Structural Biology* 12 (2002), Nr. 6, p. 783 – 793. – ISSN 0959-440X
- [59] MAYER, István: *Simple proofs, theorems and derivations in quantum chemistry*. Springer Science+Business Media, 2003 (Mathematical and computational chemistry.)
- [60] MIHEL, Ivan ; KNIPE, Jay O. ; COWARD, James K. ; SCHOWEN, Richard L.: α -Deuterium isotope effects and transition-state structure in an intramolecular model system for methyl-transfer enzymes. En: *Journal of the American Chemical Society* 101 (1979), p. 4349–4351
- [61] MORELL, Christophe ; TOGNETTI, Vincent ; BIGNON, Emmanuelle ; DUMONT, Elise ; HERNANDEZ-HARO, Noemi ; HERRERA, Barbara ; GRAND, André ; GUTIÉRREZ-OLIVA, Soledad ; JOUBERT, Laurent ; TORO-LABBÉ, Alejandro ; CHERMETTE, Henry: Insights into the chemical meanings of the reaction electronic flux. En: *Theoretical Chemistry Accounts* 134 (2015), Nr. 11, p. 133. – ISSN 1432-2234
- [62] NEESE, Frank: The ORCA program system. En: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 2 (2012), Nr. 1, p. 73–78. – ISSN 1759-0884
- [63] PARKS, L. W. ; SCHLENK, F.: THE STABILITY AND HYDROLYSIS OF S-ADENOSYL-METHIONINE; ISOLATION OF S-RIBOSYLMETHIONINE. En: *Journal of Biological Chemistry* 230 (1958), Nr. 1, p. 295–305
- [64] PARR, Robert ; YANG, Weitao: *Density-functional theory of atoms and molecules*. New York Oxford England : Oxford University Press Clarendon Press, 1989. – ISBN 0195092767
- [65] PARRINELLO, M. ; RAHMAN, A.: Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. En: *Journal of Applied Physics* 52 (1981), Nr. 12, p. 7182–7190
- [66] PERONE, Christian S.: Pyevolve: A Python Open-source Framework for Genetic Algorithms. En: *SIGEVolution* 4 (2009), November, Nr. 1, p. 12–20. – ISSN 1931-8499
- [67] PETERSON, Kirk A. ; ADLER, Thomas B. ; WERNER, Hans-Joachim: Systematically convergent basis sets for explicitly correlated wavefunctions: The

- atoms H, He, B–Ne, and Al–Ar. En: *The Journal of Chemical Physics* 128 (2008), Nr. 8, p. 084102
- [68] RINCÓN, Elizabeth ; JAQUE, Pablo ; TORO-LABBÉ, Alejandro: Reaction Force Analysis of the Effect of Mg(II) on the 1,3 Intramolecular Hydrogen Transfer in Thymine. En: *The Journal of Physical Chemistry A* 110 (2006), Nr. 30, p. 9478–9485
- [69] ROCA, Maite ; ANDRÉS, Juan ; MOLINER, Vicent ; TUÑÓN, Iñ. ; BERTRÁN, Juan: On the nature of the transition state in catechol O-methyltransferase. A complementary study based on molecular dynamics and potential energy surface explorations. En: *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005), p. 10648–10655
- [70] ROCA, Maite ; MARTÍ, Sergio ; ANDRÉS, Juan ; MOLINER, Vicent ; TUÑÓN, Iñ. ; BERTRÁN, Juan ; WILLIAMS, Ian H.: Theoretical modeling of enzyme catalytic power: analysis of cratic and electrostatic factors in catechol O-methyltransferase. En: *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003), p. 7726–7737
- [71] RUGGIERO, Giuseppe D. ; WILLIAMS, Ian H. ; ROCA, Maite ; MOLINER, Vicent ; TUÑÓN, Iñ.: QM/MM determination of kinetic isotope effects for COMT-catalyzed methyl transfer does not support compression hypothesis. En: *Journal of the American Chemical Society*. 126 (2004), p. 8634–8635
- [72] RUTHERFORD, K. ; LE TORNG, I. ; STENKAMP, R. E. ; W., Parson W.: Crystal structures of human 108V and 108M Catechol O-Methyltransferase. En: *Journal of Molecular Biology* 380 (2008), p. 120–130
- [73] SAEZ, David A. ; VOGT-GEISSE, Stefan ; INOSTROZA-RIVERA, Ricardo ; KUBAR, Tomas ; ELSTNER, Marcus ; TORO-LABBE, Alejandro ; VOHRINGER-MARTINEZ, Esteban: The effect of the environment on the methyl transfer reaction mechanism between trimethylsulfonium and phenolate. En: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016), p. 24033–24042
- [74] SAEZ, David A. ; VÖHRINGER-MARTINEZ, Esteban: A consistent S-Adenosylmethionine force field improved by dynamic Hirshfeld-I atomic charges for biomolecular simulation. En: *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 29 (2015), Nr. 10, p. 951–961. – ISSN 1573–4951

- [75] SANCHEZ-MARTINEZ, Melchor ; FIELD, Martin ; CREHUET, Ramon: Enzymatic Minimum Free Energy Path Calculations Using Swarms of Trajectories. En: *The Journal of Physical Chemistry B* 119 (2015), Nr. 3, p. 1103–1113
- [76] SCHLUCKEBIER, Gerd ; O’GARA, Margaret ; SAENGER, Wolfram ; CHENG, Xiaodong: Universal Catalytic Domain Structure of AdoMet-dependent Methyltransferases. En: *Journal of Molecular Biology* 247 (1995), Nr. 1, p. 16 – 20. – ISSN 0022–2836
- [77] SCHUBERT, Heidi L. ; BLUMENTHAL, Robert M. ; CHENG, Xiaodong: Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. En: *Trends in Biochemical Sciences* 28 (2003), may, Nr. 6, p. 329–335. – ISSN 0968–0004
- [78] SCHULTZ, Eija ; NISSINEN, Erkki.: Inhibition of rat liver and duodenum soluble catechol-O-methyltransferase by a tight-binding inhibitor OR-462. En: *Biochemical Pharmacology* 38 (1989), p. 3953–3956
- [79] SENN, Hans M. ; THIEL, Walter: QM/MM methods for biomolecular systems. En: *Angewandte Chemie International Edition* 48 (2009), p. 1198–1229
- [80] STACKLIES, Wolfram ; XIA, Fei ; GRÄTER, Frauke: Dynamic Allostery in the Methionine Repressor Revealed by Force Distribution Analysis. En: *PLOS Computational Biology* 5 (2009), 11, Nr. 11, p. 1–11
- [81] STOCK, J B. ; SURETTE, M G. ; MCCLEARY, W R. ; STOCK, A M.: Signal transduction in bacterial chemotaxis. En: *Journal of Biological Chemistry* 267 (1992), Nr. 28, p. 19753–19756
- [82] STOLOWITZ, Mark L. ; MINCH, M. J.: S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine, an NMR study. En: *Journal of the American Chemical Society* 103 (1981), Nr. 20, p. 6015–6019
- [83] STRUCK, Anna-Winona ; THOMPSON, Mark L. ; WONG, Lu S. ; MICKLEFIELD, Jason: S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications. En: *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 13 (2012), dec, Nr. 18, p. 2642–55. – ISSN 1439–7633
- [84] SUTCLIFFE, Brian T. ; WOOLLEY, R. G.: On the quantum theory of molecules. En: *The Journal of Chemical Physics* 137 (2012), p. 22A544–1–22A544–8
- [85] SWAIN, C. G. ; TAYLOR, Lynn J.: Catalysis by secondary valence forces. En: *Journal of the American Chemical Society* 84 (1962), p. 2456–2457

- [86] SZABO, Attila ; OSTLUND, Neil S.: *Modern Quantum Chemistry*. Dover Publications, 1996
- [87] TORO-LABBÉ, Alejandro: Characterization of chemical reactions from the profiles of energy, chemical potential and hardness. En: *The Journal of Physical Chemistry A*. 103 (1999), p. 4398–4403
- [88] TSAI, Meng-Lin ; CRONIN, Nora ; DJORDJEVIC, Snezana: The structure of human leucine carboxyl methyltransferase 1 that regulates protein phosphatase PP2A. En: *Acta Crystallographica Section D* 67 (2011), Jan, Nr. 1, p. 14–24
- [89] TUCKERMAN, Mark: *Statistical mechanics : theory and molecular simulation*. New York : Oxford University Press, 2010. – ISBN 9780198525264
- [90] VAN DAMME, Sofie ; BULTINCK, Patrick ; FIAS, Stijn: Electrostatic Potentials from Self-Consistent Hirshfeld Atomic Charges. En: *Journal of Chemical Theory and Computation* 5 (2009), Nr. 2, p. 334–340
- [91] VIDGREN, J. ; SVENSSON, L.A. ; LILJAS, A.: Crystal structure of catechol O-methyltransferase. En: *Nature* 368 (1994), p. 354–358
- [92] VOGT-GEISSE, Stefan ; TORO-LABBÉ, Alejandro: The mechanism of the interstellar isomerization reaction $\text{HOC}^+ \text{HCO}^+$ catalyzed by H_2 : New Insights from the reaction electronic flux. En: *The Journal of Chemical Physics* 130 (2009), Nr. 24, p. 244308
- [93] VÖHRINGER-MARTINEZ, Esteban ; DUARTE, Fernanda ; TORO-LABBÉ, Alejandro: How does Pin1 catalyze the Cis-Trans prolyl peptide bond isomerization? A QM/MM and Mean Reaction Force study. En: *The Journal of Physical Chemistry B*. 116 (2012), p. 12972–12979
- [94] VÖHRINGER-MARTINEZ, Esteban ; TORO-LABBÉ, Alejandro: The mean reaction force: A method to study the influence of the environment on reaction mechanisms. En: *The Journal of Chemical Physics* 135 (2011), Nr. 6
- [95] WANG, Junmei ; CIEPLAK, Piotr ; KOLLMAN, Peter A.: How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? En: *Journal of Computational Chemistry* 21 (2000), Nr. 12, p. 1049–1074. – ISSN 1096–987X
- [96] WANG, Junmei ; WOLF, Romain M. ; CALDWELL, James W. ; KOLLMAN, Peter A. ; CASE, David A.: Development and testing of a general amber force

- field. En: *Journal of Computational Chemistry* 25 (2004), Nr. 9, p. 1157–1174. – ISSN 1096–987X
- [97] WERNER, Hans-Joachim ; KNOWLES, Peter J. ; KNIZIA, Gerald ; MANBY, Frederick R. ; SCHÜTZ, Martin: Molpro: a general-purpose quantum chemistry program package. En: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 2 (2012), Nr. 2, p. 242–253. – ISSN 1759–0884
- [98] WESTAWAY, Kenneth C.: Determining transition state structure using kinetic isotope effects. En: *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 50 (2007), Nr. 11-12, p. 989–1005. – ISSN 1099–1344
- [99] WILSON, Angela K. ; VAN MOURIK, Tanja ; DUNNING, Thom H.: Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. VI. Sextuple zeta correlation consistent basis sets for boron through neon. En: *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 388 (1996), p. 339 – 349. – ISSN 0166–1280
- [100] WILSON, Philippe B. ; WILLIAMS, Ian H.: Influence of Equatorial CH-O Interactions on Secondary Kinetic Isotope Effects for Methyl Transfer. En: *Angewandte Chemie International Edition* 55 (2016), Nr. 9, p. 3192–3195. – ISSN 1521–3773
- [101] XIE, Jing ; OTTO, Rico ; MIKOSCH, Jochen ; ZHANG, Jiayu ; WESTER, Roland ; HASE, William L.: Identification of Atomic-Level Mechanisms for Gas-Phase X⁻ + CH₃Y S_N2 Reactions by Combined Experiments and Simulations. En: *Accounts of Chemical Research* 47 (2014), Nr. 10, p. 2960–2969
- [102] YILDIRIM, Ilyas ; STERN, Harry A. ; KENNEDY, Scott D. ; TUBBS, Jason D. ; TURNER, Douglas H.: Reparameterization of RNA X Torsion Parameters for the AMBER Force Field and Comparison to NMR Spectra for Cytidine and Uridine. En: *Journal of Chemical Theory and Computation* 6 (2010), Nr. 5, p. 1520–1531
- [103] ZAGROVIC, Bojan ; VAN GUNSTEREN, Wilfred F.: Comparing atomistic simulation data with the NMR experiment: How much can NOEs actually tell us? En: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 63 (2006), Nr. 1, p. 210–218. – ISSN 1097–0134
- [104] ZHANG, J. ; KLINMAN, Judith P.: Enzymatic methyl transfer: Role of an active site residues in generating active site compaction that correlates with catalytic efficiency. En: *Journal of the American Chemical Society* 133 (2011), p. 17134–17137

- [105] ZHANG, Jianyu ; KULIK, Heather J. ; MARTINEZ, Todd J. ; KLINMAN, Judith P.: Mediation of donor–acceptor distance in an enzymatic methyl transfer reaction. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (2015), Nr. 26, p. 7954–7959
- [106] ZHAO, Yan ; TRUHLAR, Donald G.: The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. En: *Theoretical Chemistry Accounts* 120 (2008), Nr. 1, p. 215–241. – ISSN 1432–2234
- [107] ZINOVJEV, Kirill ; RUIZ-PERNÍA, J. J. ; NAKI TUÑÓN, I Toward an Automatic Determination of Enzymatic Reaction Mechanisms and Their Activation Free Energies. En: *Journal of Chemical Theory and Computation* 9 (2013), Nr. 8, p. 3740–3749



A. Anexo: Derivación de un campo de fuerzas para S-Adenosilmetionina

ID Atomo	Tipo Atomo	Nombre Atomo	Carga RESP	Carga HI	Carga D-HI
1	O2	OXT	-0.5240	-0.67836	-0.92
2	C	C	0.6424	0.99459	1.03
3	O2	O	-0.5240	-0.67836	-0.92
4	N3	N	-0.9578	-0.86672	-0.59
5	H	H1	0.3746	0.39345	0.42
6	H	H2	0.3746	0.39345	0.42
7	H	H3	0.3746	0.39345	0.42
8	CT	CA	0.2620	0.09577	0.11
9	HP	HA	0.0647	0.06471	0.05
10	CT	C1	0.0155	-0.18313	-0.04
11	HC	H	0.0369	0.09244	0.05
12	HC	H4	0.0369	0.09244	0.05
13	CT	C2	-0.0498	-0.25095	-0.10
14	H1	H5	0.0763	0.12245	0.07
15	H1	H6	0.0763	0.12245	0.07
16	S4	S	0.2047	0.75592	0.59
17	KQ	C3	-0.1302	-0.56322	-0.26
18	H1	H7	0.1200	0.20099	0.13
19	H1	H8	0.1200	0.20099	0.13
20	H1	H9	0.1200	0.20099	0.13
21	CT	C4	-0.0823	-0.39923	-0.18
22	H1	H10	0.1293	0.15813	0.10
23	H1	H11	0.1293	0.15813	0.10
24	CT	C5	0.1018	0.28184	0.32
25	H1	H12	0.1143	0.01081	-0.03

26	OS	O1	-0.4131	-0.40367	-0.42
27	CT	C6	0.0541	0.44131	0.46
28	H2	H13	0.1552	-0.00262	-0.01
29	N*	N1	-0.0136	-0.41808	-0.37
30	CB	C7	0.1909	0.63850	0.60
31	NC	N2	-0.5256	-0.75653	-0.74
32	CQ	C8	0.4430	0.68244	0.71
33	H5	H14	0.0879	0.00957	-0.04
34	NC	N3	-0.6747	-0.79331	-0.84
35	CA	C9	0.6651	1.00121	0.86
36	N2	N4	-0.8801	-1.05940	-0.84
37	H	H15	0.4185	0.44924	0.38
38	H	H16	0.4185	0.44924	0.38
39	CB	C10	0.1187	-0.40643	-0.23
40	NB	N5	-0.5683	-0.38882	-0.58
41	CK	C11	0.1829	0.37292	0.47
42	H5	H17	0.1579	0.05826	0.04
43	CT	C12	0.1257	0.15577	0.20
44	H1	H18	0.0931	0.03358	-0.01
45	CT	C13	0.2300	0.20840	0.26
46	H1	H19	0.0699	0.01171	-0.01
47	OH	O2	-0.7022	-0.66558	-0.67
48	HO	H20	0.4914	0.46625	0.45
49	OH	O3	-0.6129	-0.64531	-0.65
50	HO	H21	0.3816	0.44832	0.45

Tabla A-1.: Cargas atómicas obtenidas con los métodos RESP, HI y DH-HI. Fuente: Elaboración propia.

Angulo diedro	n	V_n	ϕ
KQ(C-17)-S4-CT-CT	1	0.9	360
	2	0.1	325
	3	0.3	100
CT-S4-CT-CT	1	1.0	350
	2	0.2	50
	3	0.4	315
OS-CT-N*-CK	1	1.355570	0
	2	0.504875	0
	3	-1.699430	0
	4	0.152425	0
CT-CT-N*-CK	1	1.603540	0
	2	-0.278197	0
	3	1.267980	0
	4	0.228818	0

Tabla A-2.: Parámetros de campo de fuerzas adicionales usados junto los parámetros clásicos de adenosina y metionina para describir a SAM. Los últimos dos diedros se han extraído de AMBER χ , Yildirim *et al.* Fuente: Elaboración propia.

B. Anexo: Energética del sistema Trimetilsulfonio + Fenolato en diferentes ambientes.

Medio	TMS	Fenolato	TS	DMS	Anisol
Vacío	-517.6177276	-306.8572403	-824.6059478	-477.9777979	-346.7113042
DEE/SMD	-517.6931917	-306.929415	-824.635595	-477.9833182	-346.7215746
WAT/SMD	-517.7080849	-306.9590203	-824.6394131	-477.979209	-346.7163259
DEE/PCM	-517.6830511	-306.9275492	-824.6251154	-477.9804024	-346.71492
/WAT/PCM	-517.7023595	-306.9507626	-824.6338257	-477.9816975	-346.7168571

Tabla B-1.: Energía Hartree-Fock para sistema TMS-Fenolato. Unidades E_h . Nivel de teoría: M06-2X/6-311G+(d,p). Unidades: E_h . Fuente: Elaboración propia.

Medio	TMS	Fenolato	TS	DMS	Anisol
Vacío	-517.531432	-306.794911	-824.437584	-477.928675	-346.608188
DEE/SMD	-517.606698	-306.866744	-824.467756	-477.934598	-346.619231
WAT/SMD	-517.621357	-306.896119	-824.473262	-477.93046	-346.614546
DEE/PCM	-517.596412	-306.864769	-824.456652	-477.93132	-346.611962
/WAT/PCM	-517.615616	-306.887872	-824.466871	-477.93261	-346.613926

Tabla B-2.: Energía libre derivada de análisis vibracional para el sistema TMS-Fenolato. Nivel de teoría: M06-2X/6-311G+(d,p). Unidades: E_h . Fuente: Elaboración propia.

Medio	TMS	Fenolato	TS	DMS	Anisol
Vacío	-517.494523	-306.759878	-824.383665	-477.895848	-346.569615
DEE/SMD	-517.56992	-306.831749	-824.413213	-477.901514	-346.580181
WAT/SMD	-517.584784	-306.861215	-824.41738	-477.897424	-346.575057
DEE/PCM	-517.559459	-306.829803	-824.403818	-477.898481	-346.573344
/WAT/PCM	-517.578811	-306.85297	-824.411372	-477.899784	-346.575321

Tabla B-3.: Entalpía derivada de análisis vibracional para el sistema TMS-Fenolato. Nivel de teoría: M06-2X/6-311G+(d,p). Unidades: E_h . Fuente: Elaboración propia.