DESARROLLO DE UN MODELO COMPUTACIONAL DEL SITIO ACTIVO DE LA METIONINA SINTASA

Natalia Yuan Chen

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE QUÍMICA Y QUÍMICA FARMACÉUTICA

Santiago de Cali

2018

DESARROLLO DE UN MODELO COMPUTACIONAL DEL SITIO ACTIVO DE LA METIONINA SINTASA

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE PREGRADO EN QUÍMICA Y QUÍMICA FARMACÉUTICA

Presentado por

Natalia Yuan Chen

Tutor

Dr. James Fairbanks Weston

Santiago de Cali

2018

UNIVERSIDAD ICESI

APROBADO POR:

Carlos Alberto Arango Mambuscay
Evaluador

James Fairbanks Weston
Tutor del Proyecto.

AGRADECIMIENTOS

“La gratitud debería ser un acto constante de cada hora, de cada día, de toda la vida”

N. Leight DeMoss

“Cuando la gratitud es tan absoluta, las palabras sobran”

A.Mutis

Agradezco a:

Los profesores quienes contribuyeron con mi formación a nivel académico y profesional

Al profesor James Weston, mi tutor, quién me orientó a lo largo de todo el proyecto de investigación, y me enseñó que la parte compleja de desarrollar un modelo computacional no subyace en los cálculos que se le efectúe, sino en el proceso de llegar al modelo

“No es el conocimiento, sino el acto de aprendizaje, y no la posesión, sino el acto de llegar allí, que concede el mayor disfrute”

- Carl Friedrich gauss-

A mis compañeros y amigos; quienes compartimos interesantes discusiones no sólo académicas, llegar a preguntas sin respuestas que muchas veces se tienen por sentado o se asume. A errar y ser humano

Por último, y no menos,

A mi familia, mi madre Chen Xue Hong, mi padre Yuan Jia Liang, mis hermanas Victoria, Catalina y Sofía que me apoyaron a lo largo de toda la carrera y a demostrar que con perseverancia todo se puede.

CONTENIDO

DESARROLLO DE UN MODELO COMPUTACIONAL DEL SITIO ACTIVO DE LA METIONINA SINTASA 1
GLOSARIO 6
RESUMEN DEL TRABAJO 7
ABSTRACT 8
1. INTRODUCCIÓN 9
2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO 10
2.1. PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA O PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN EN TÉRMINOS DE NECESIDADES Y PERTINENCIA 10
2.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE 11
2.2.1. Función de la metilcobalamina en la metionina sintasa 11
2.2.2. Metiltransferencia coordinada por el centro de cobalto 12
2.2.3. Análisis del modo de acción de la metiltransferencia entre la metilcobalamina y la metionina sintasa 13
2.2.4. Oxidación de complejos organometálicos con cobalto 14
2.2.5. Nivel de Cálculo computacional 15
2.3. OBJETIVOS 17
2.3.5. Objetivo general 17
2.3.6. Objetivos específicos 17
2.4. METODOLOGÍA UTILIZADA 17
2.2.5. Búsqueda Bibliográfica 17
2.4.2. Análisis del modo de acción 17
2.4.3. Obtención de estructuras cristalinas de la MetH 18
2.4.4. Visualización de estructuras cristalinas 18
2.4.5. Determinación de modelo computacional 18
2.4.6. Cálculos computacionales 18
2.4.7. Matriz de marco lógico 19
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 21
2.5.1. Análisis de la estructura del sitio activo de la metionina sintasa e identificación de factores estructurales y electrónicos 21
2.5.1.1. Estructura general de la Metionina Sintasa 21

2.5.1.2. Sitio activo de la Metionina Sintasa.....22
2.5.1.3. Identificación del papel de los residuos en la Metiltransferencia.....23
2.5.2. Modelo propuesto y pre-optimización de la estructura.....26
2.6. CONCLUSIONES.....28
2.7. RECOMENDACIONES.....29
3. BIBLIOGRAFÍA.....29
4. ANEXO.....37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Matriz de marco lógico 19
Tabla 2. Descripción de estructuras reportadas en PDB de MetH. 37
Tabla 3. Coordenadas pre-optimizadas para modelo con Co(III) 41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de cobalamina 9
Figura 2. Síntesis metabólica de la metionina 11
Figura 3. Ciclo catalítico y reacción de reactivación del cofactor MeCbl en la metionina sintasa 12
Figura 4. Rupturas homolíticas y heterolíticas del enlace Cobalto-Metilo 13
Figura 5. Mecanismo S_N2 para la transferencia de metilo de la reacción 1....14
Figura 6. Mecanismo de transferencia de un solo electrón para la formación de metionina a partir de homocisteína. Paso 1: transferencia de grupo y, paso 2: transferencia de electrón 14
Figura 7. Estados de coordinación de Co(III),Co(II) y Co(I).....15
Figura 8. Transiciones electrónicas de Im- [CoIII (corrin)] - CN+ en dependencia del set de bases y el método empleado. 16
Figura 9. Estructura secundaria de MetH con MeCbl como cofactor. 21
Figura 10. Presentación modular de la MetH. 21
Figura 11. Conformaciones de MetH. 22
Figura 12. Superficie de MetH 1BMT con MeCbl en su sitio activo 23
Figura 13. Función de elementos estructurales en el sitio activo de MetH 1BMT 23
Figura 14. Interacción entre His y Asp 24
Figura 15. Histidina dentro fuera de MetH. 25
Figura 16. Estructura de CH_3-THF 26
Figura 17. Modelo simplificado de la MetH y la MeCbl. a) Visualización desde la estructura cristalina. b) Adaptación implementada con cadena de carbonos con posibilidad de ser sintetizado.....27
Figura 18. Curvas de energía potencial de los estados singlete (rojo) y triplete (azul) de excitación mínima de complejo corrinoide reportado en teoría con TD-DFT / BP86 / TZVP 28
Figura 19. Posicionamiento de residuo aromático (Tyr o Phe) sobre MeCbl ...38
Figura 20. MeCbl con Cbl como ligando en MetH.....39
Figura 21. MeCbl con H2O como ligando en MetH.....39
Figura 22. MeCbl con SO4 como ligando en MetH 40
Figura 23. MeCbl con SAM como ligando en MetH 40

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Estructuras proteicas reportadas en PDB con EC. 2.1.1.13. 37
Anexo 2. Visualización de estructuras cristalinas de la MetH con ligandos 38
Anexo 3. Coordenadas pre-optimizadas para modelo con Co(III).....41

GLOSARIO

Biomimética: Término originado del griego “bios” (vida) y “mimesis” (imitación), que implica la creación de forma de tecnología que imita a la naturaleza para mejorar la vida humana. En este caso, compuestos químicos que tienen la función de imitar procesos biológicos. [1]

Cofactor: Componente fuera de la porción proteica de muchas enzimas, que si se elimina de una enzima completa (holoenzima), el componente proteico (apoenzima) no posee actividad catalítica. [2]

Número de Comisión de Enzima EC: Clasificación numérica para una enzima acorde a la reacción química que cataliza; el cuál, en este caso resulta ser una metiltransferencia.[3]

RESUMEN DEL TRABAJO

Las transferencias de grupos metilo resultan de interés a nivel biológico por su influencia en el mantenimiento de la integridad del material genético. En los seres vivos, esta reacción se lleva a cabo por medio de complejos enzimáticos. Un sistema conocido es el de la Metionina Sintasa que tiene a la Metilcobalamina como su cofactor. Dicha reacción puede ser aprovechada para la síntesis de moléculas orgánicas de interés industrial que requieran la adición de un grupo metilo a su estructura. Actualmente, sólo se cuenta con estrategias estequiométricas y no catalíticas como la reacción de Grignard. Así, el estudio de este sistema enzimático puede llevar en un futuro a la síntesis de biomiméticas con interés industrial.

Este proyecto desarrolló un modelo computacional del complejo metálico con la capacidad teórica de reproducir la actividad catalítica de transferencia de un grupo metilo por parte de la metionina sintasa con la metilcobalamina en su bolsillo molecular. Para esto, se analizó en la literatura el modo de acción de la transferencia que implica la formación y ruptura del enlace cobalto-metilo, encontrando que la sustitución nucleofílica bimolecular, la oxidación aditiva del enlace cobalto metilo y la transferencia de un simple electrón son los principales mecanismos.

Por otra parte, mediante el análisis de 18 estructuras cristalinas de la enzima reportadas en *Protein Data Bank*, se identificaron los componentes electrónicos y estructurales que influyen en la transferencia. Estableciendo que un residuo de histidina ejerce una función catalítica al coordinarse con el centro de cobalto; mientras que otros residuos presentes en el bolsillo molecular desempeñan una función de anclaje y posicionamiento del sustrato. Acorde a estos análisis, se determinó un modelo simplificado del sistema con posibilidad de ser sintetizado. El modelo fue pre-optimizado con un nivel de cálculo computacional DFT con BVP86, un set de bases 6-31G (d) y *fitting set* DEF2SV.

Palabras claves: Metionina Sintasa, metilcobalamina, Modelo computacional

ABSTRACT

Transference of a methyl group has relevance in biology due to their influence on the integrity of genetic material. In diverse organisms, this reaction is carried out by enzymatic complexes. A known system is the enzyme Methionine Synthase with Methylcobalamin as a cofactor. This reaction can be used for the synthesis of organic molecules of industrial interest that require the addition of a methyl group to its structure. Currently, only stoichiometric and non-catalytic strategies such as the Grignard reaction are available. Therefore, the study of this enzyme system may lead in the future to the synthesis of biomimetics with industrial interest.

This project developed a computational model of a metal complex with the theoretical capacity to reproduce the catalytic activity of transference of a methyl group by methionine synthase with methylcobalamin in its molecular pocket. To do this, the mode of action that involves formation and rupture of cobalt-methyl bond was analyzed in the literature, finding that the bimolecular nucleophilic substitution, additive oxidation of the cobalt methyl bond and transference of a single electron are the main mechanisms.

On the other hand, by analyzing 18 crystalline structures of the enzyme reported in Protein Data Bank, the electronic and structural components that influence the transference were identified. Establishing that a histidine residue exerts a catalytic function by coordinating with the cobalt center; while other residues present in the molecular pocket play a function of anchoring and positioning of substrate. According to these analyzes, a simplified model of the system was determined with the possibility of being synthesized. The model was pre-optimized with a computational calculation level DFT with BVP86, a set of bases 6-31G (d) and fitting set DEF2SV.

Keyword: *Methionine Synthase, Methylcobalamin, Computational model*

1. INTRODUCCIÓN

La Cobalamina (Cbl) es un cofactor presente en la mayoría de los organismos; [4-6] que participa principalmente en 3 tipos de reacciones: reordenamientos intramoleculares, metilaciones y reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos.[2, 7] En este sentido, la deficiencia de Cbl puede estar asociada a la manifestación de diversas enfermedades en los seres vivos relacionadas a la integridad genética, como lo es la anemia perniciosa en *el Homo sapiens*.[8-28]

Los Cbl son complejos organometálicos constituidos por un centro de cobalto que coordina con un anillo de corrina y un ligando axial (Figura 1); el cuál, dependiendo de su grupo funcional reciben distintas denominaciones e implicaciones en sus funciones bioquímicas, tales como la adenosilcobalamina (AdoCbl), la Metilcobalamina (MeCbl) y la Vitamina B_{12} (CNCbl). [5, 29-34]

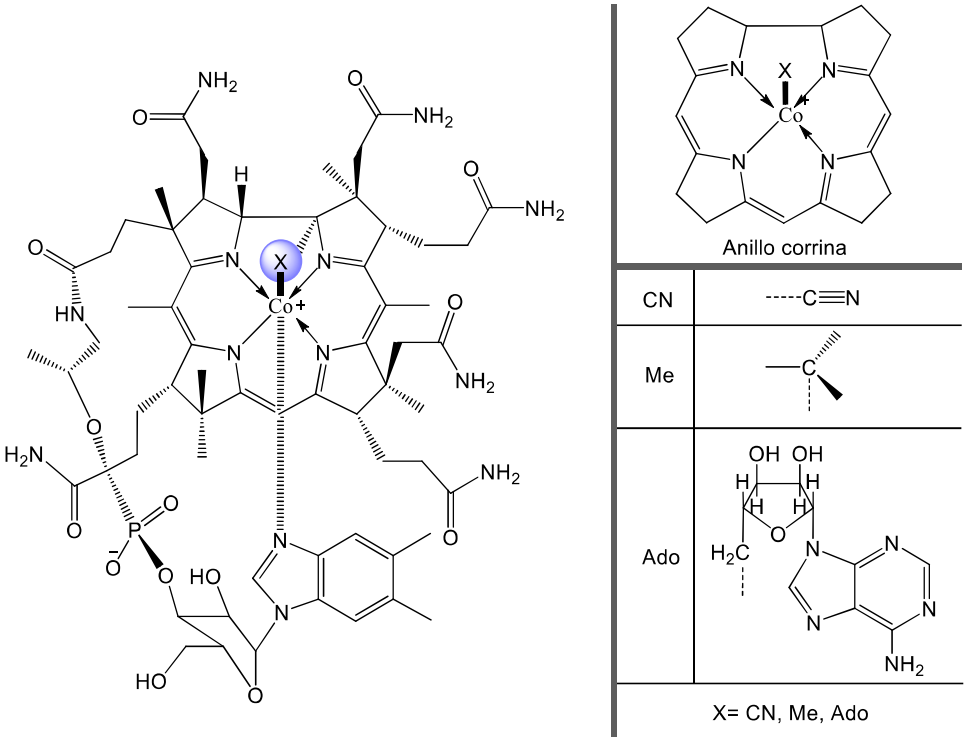


Figura 1. Estructura general de cobalamina [5]

Bajo este contexto, la Cbl unida al ligando axial CH_3 se conoce como MeCbl y está presente en la transferencia del grupo metilo de la N-metil-tetrahidrofolato (CH_3-THF) a la homocisteína (Hcy) para producir tetrahidrofolato (H-THF) y metionina; que es catalizada por la Metionina Sintasa dependiente de Cbl (MetH).[17, 35-37] Esta transferencia catalítica del anión CH_3^- es de gran importancia y su principio podría ser aprovechada para la síntesis de moléculas orgánicas de interés industrial que requieran la adición de un grupo metilo a su estructura; ya que, actualmente se

cuenta sólo con estrategias estequiométricas y no catalíticas como la reacción de Grignard.

La reacción de Grignard descrita en 1900 por Victor Grignard se destaca en la química orgánica sintética por la formación de un enlace carbono-carbono o enlaces carbono-heteroátomo a partir del reactivo R-Mg-X (donde R es la cadena carbonada a introducir y X, es un halógeno). El carbono del R posee una alta densidad electrónica haciendo que reaccione con compuestos como ésteres, nitrilos y cetonas. [38-41] De hecho permite la síntesis de compuestos de interés industrial y farmacéutico como Tamoxifeno y Fluconazol.[42-45]

A pesar de que la reacción de Grignard no es de tipo catalítica, se ha visto que los productos de su síntesis poseen un amplio rango de aplicaciones. En este sentido, a través del análisis de la MetH y su cofactor la MeCbl surge una oportunidad de llegar a desarrollar en un futuro biomiméticas que lleven a cabo la metiltransferencia de manera catalítica.

Bajo este contexto, el proyecto desarrolló un modelo computacional del sitio activo de la MetH que potencialmente tiene la capacidad de reproducir la transferencia. Generando así una valiosa información que contribuya a futuras investigaciones relacionadas al desarrollo de biomiméticas que puedan ser empleadas para la síntesis de compuestos orgánicos con amplia aplicación y utilidad industrial.

Con el fin de obtener este modelo computacional, se requirió de una revisión en la literatura sobre los estudios químicos, bioquímicos, cinéticos y computacionales sobre el sistema enzimático MetH-MeCbl. A partir de esto, se obtuvo la información del modo de acción de la metiltransferencia; es decir la formación y el rompimiento del enlace Co-C entre el cofactor y el grupo metilo. Similarmente, se analizaron las estructuras cristalinas de la MetH reportadas en *Protein Data Bank* (PDB) para la identificación de los factores estructurales y electrónicos presentes en el bolsillo molecular que influyen en la transferencia. Con todo este análisis acompañada de revisión bibliográfica se procedió a establecer un modelo computacional lo suficientemente simplificado que fuese posible de calcular en Gaussian. El nivel de cálculo teórico fue acorde a la complejidad del modelo, los estados de oxidación y la información brindada por el análisis del modo de acción.

2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1. PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA O PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN EN TÉRMINOS DE NECESIDADES Y PERTINENCIA

A partir del presente proyecto, se busca el desarrollo de un modelo computacional de un complejo metálico que tenga la capacidad teórica de reproducir la actividad catalítica de transferencia de un grupo metilo a una molécula orgánica, acorde al

sitio activo de la MeCbl en la MetH. Por lo que, se espera que al final proyecto se genere un conocimiento que contribuya a investigaciones futuras vinculadas al diseño de metalocomplejos con potencial como catalizadoras y permitan la producción de nuevos compuestos con relevancia industrial.

La principal incógnita de la investigación es ¿Qué modelo computacional tiene la capacidad teórica de reproducir la metiltransferencia en el sitio activo de la MetH?

Frente a esta inquietud principal se derivaron las siguientes preguntas que son requeridas en la investigación:

¿Cuáles son los elementos estructurales y electrónicos indispensables para la actividad catalítica?

¿Cómo es el modo de acción de la metiltransferencia? O ¿Cómo sucede la formación y el rompimiento del enlace Co-C?

¿Qué modelo es lo suficientemente simplificado para poder aplicar cálculos computacionales?

2.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.2.1. Función de la metilcobalamina en la metionina sintasa

La MetH cataliza la transferencia del grupo metilo de la N-metil-tetrahidrofolato (CH_3-THF) a la homocisteína (Hcy) para producir tetrahidrofolato (H-THF) y metionina, empleando la MeCbl como cofactor de corrina con un cobalto (I), que actúa transportando el grupo metílico (Figura 2)[46-54]. Dicha transferencia es de gran relevancia a nivel fisiológico; ya que la metionina mantiene la concentración de folato (vitamina B_9) para preservar la integridad del ADN (ácido desoxirribonucléico). Su deficiencia está involucrada en la manifestación de desórdenes neurológicos, tipos de anemia y anormalidades en el nacimiento vinculados al tubo neural.[34, 55]

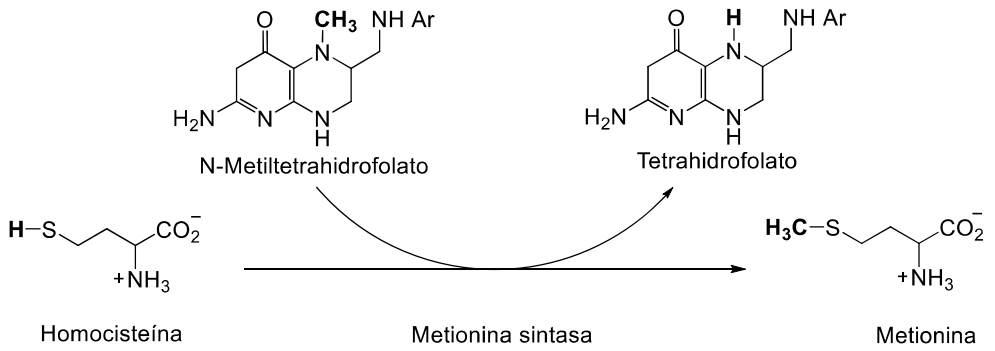


Figura 2. Síntesis metabólica de la metionina[46]

2.2.2. Metiltransferencia coordinada por el centro de cobalto

La metilcobalamina actúa como portador del grupo metilo. Para que se pueda llevar adecuadamente, el cobalto que lo coordina debe tener una oxidación de Co (I) para que pueda aceptar el grupo metilo proveniente del CH_3-THF. Adicionalmente, es necesario un estado de oxidación de Co(III) para luego transferir el grupo metilo a la homocisteína y formar metionina.[29, 56,57] Los estados de coordinación del cobalto se regulan a través de reacciones de oxidación y reducción.[15, 58-61]

A continuación, se explicará el ciclo catalítico y la reactivación de este cofactor en la metionina sintasa (Figura 3).

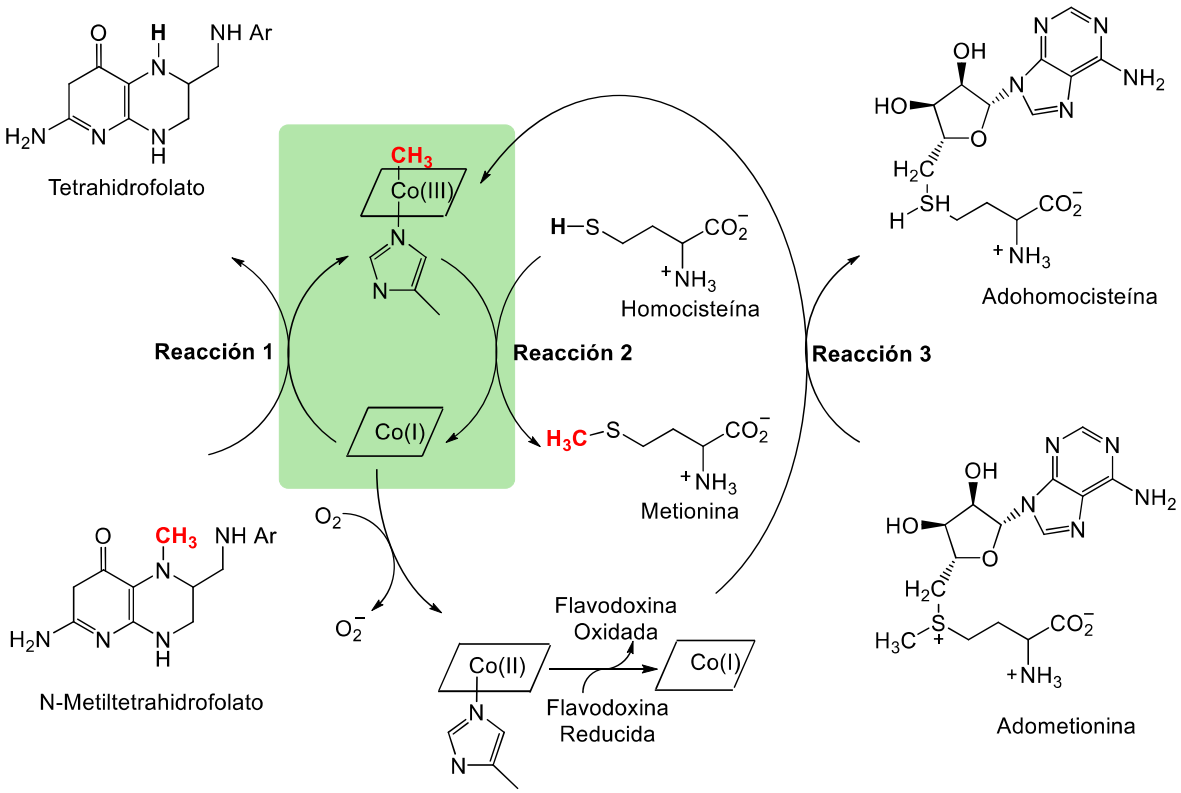


Figura 3. Ciclo catalítico y reacción de reactivación del cofactor MeCbl en la metionina sintasa[29]

La primera reacción es la desmetilación del CH_3-THF a THF acompañado de la oxidación del Co (I) a Co (III) por la formación del enlace Co-CH_3 (Figura 3, reacción 1).[62] Luego, una vez esté el cobalto portando y/o enlazado al CH_3, sucede la reacción de transferencia del grupo metilo a la homocisteína para formar metionina (Figura 3, reacción 2), haciendo que el cobalto vuelva a un estado de oxidación +I y esté disponible para volver a aceptar el grupo CH_3 estableciéndose así un ciclo catalítico entre la MeCbl y la cob(I)alamina.

No obstante, la cob(I)alamina se oxida en presencia de oxígeno (O_2) y se convierte en una especie inactiva en la que el cobalto tiene une un estado de oxidación de +II. La cob(II)alamina puede retornar al ciclo catalítico por medio de dos reacciones principales subsecuentes. La primera, es la reducción de Co(II) a Co(I) acompañada por la oxidación de la flavodoxina y, la segunda es la conversión de adenosilmetionina (AdoMet) a adenosilhomocisteína (AdoHcy) junto a la oxidación del Co(I) a Co(III) (Figura 3, reacción 3) [61]

2.2.3. Análisis del modo de acción de la metiltransferencia entre la metilcobalamina y la metionina sintasa

El modo de acción de la metiltransferencia mediada por la MetH y la MeCbl se analizó a través de los mecanismos que se involucran tanto en la ruptura como en la formación del enlace Co-CH_3, ya sea de forma homolítica o heterolítica (Figura 4).[63]

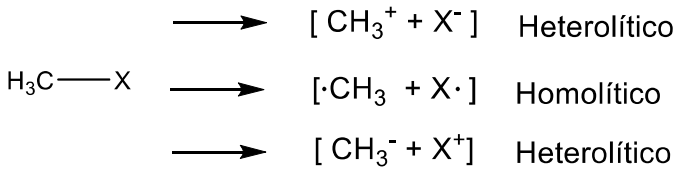


Figura 4. Rupturas homolíticas y heterolíticas del enlace Cobalto-Metilo

En la literatura se ha reportado principalmente 3 mecanismos: una transferencia por un mecanismo S_N2[15] (Figura 5), una transferencia que involucre la oxidación aditiva del enlace CH_3-X al cobalto del corrinoide o la transferencia que involucre la transferencia de un simple electrón (Figura 6)[4].

En el mecanismo S_N2 una base abstrae un hidrógeno del residuo de la serina 810, de tal manera que deja al oxígeno son una gran densidad electrónica y forma un enlace con un hidrógeno del aspartato 757. El rompimiento heterolítico del enlace OH del aspartato conlleva a un flujo de electrones que termina enlazando al N en posición 3 de la His759 con el Co.

En este mecanismo S_N2 se da la transferencia coordinada del grupo y de un protón. El catalizador ácido es el hidrógeno unido a la histidina 759. La Cobalamina (I) ataca al grupo metilo y el protón se transfiere del ácido catalizador a THF. La Cbl(I) es convertida en MeCbl, un protón se libera al solvente y la histidina coordina a la cobalamina por debajo de la posición axial.[4, 64]

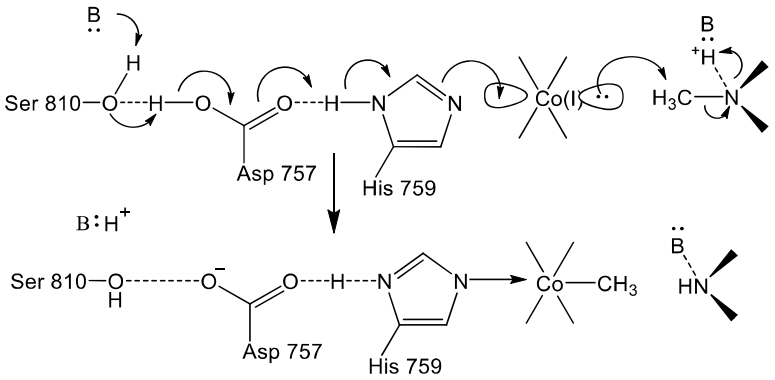


Figura 5. Mecanismo S_N2 para la transferencia de metilo de la reacción 1 [4]

Por otra parte, una vez esté el enlace Co-CH_3 se puede presentar un mecanismo de transferencia de un solo electrón para formar la Hcy. En este mecanismo se distinguen dos pasos. En el primero se da la transferencia de grupo, esto se lleva a cabo mediante un rompimiento homolítico del enlace Co-CH_3, que deja al Co con un radical libre y la formación del enlace CH_2-S. El segundo paso consiste en la transferencia de un electrón para la reducción del Co a +I, formando finalmente un sistema corrinoide con Co(I) y Hcy.

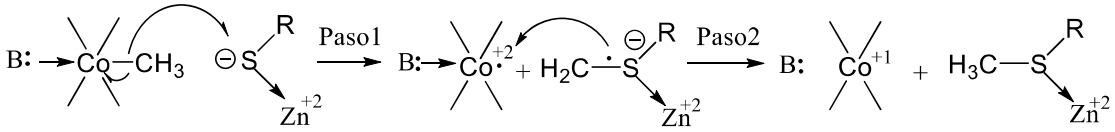


Figura 6. Mecanismo de transferencia de un solo electrón para la formación de metionina a partir de homocisteína. Paso 1: transferencia de grupo y, paso 2: transferencia de electrón [4]

En otros casos, se ha reportado que la cobalamina (I) en estado superreducido de la vitamina B12 accede a los sistemas enzimáticos por medio de un rompimiento heterolítico del enlace Co-C del cofactor de la MeCbl; en la cual, el Co presenta un espín bajo de estado de oxidación +III.[65]

2.2.4. Oxidación de complejos organometálicos con cobalto

La mayoría de los compuestos de cobalto presentan estados de oxidación +II; sin embargo, también existen aquellos que tienen un estado de oxidación mayor como +IV y +V que se estabilizan con átomos de flúor u oxígeno. Respecto a los complejos de Cobalto pueden variar el número de oxidación de -I a +V, siendo el más frecuente el Co(III).[66]

Las Co(III) forman metalocomplejos en donde los átomos de nitrógeno ocupan cuatro sitios de coordinación ecuatorial; mientras que la quinta coordinación está en la parte axial inferior ocupado por un átomo de nitrógeno de la unidad de 5,6-dimetilbenzimidazol de la cadena nucleótida o por un átomo de oxígeno de una molécula de agua (forma base-afuera de la Cbl o corrinoides incompletos).

Se ha reportado que las vibraciones de los orbitales 3d ocupados del Co y los orbitales π^* vacíos del tetrapirrol[67] entre $Co(II)Cbl$ y $Co(I)Cbl$; de tal manera que las vibraciones de estiramiento de enlaces conjugados C-C y C-N orientados a lo largo del eje de la corrina puede unirse a una transición electrónica polarizada.[57]

La actividad de reducción y oxidación de los sistemas de cobalamina depende del estado de coordinación del cobalto.[68] Además, las propiedades de coordinación afectan directamente el potencial redox de los pares Co(III)/Co(II) y Co (II) / Co(I) (Figura 7). [59, 68, 69]

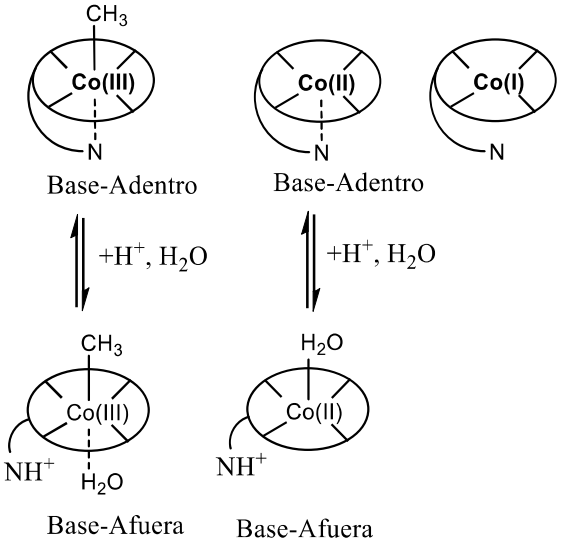


Figura 7. Estados de coordinación de Co(III),Co(II) y Co(I)[68]

Por otra parte, el sexto sitio de coordinación está dispuesto para la coordinación a varios grupos exógenos, tales como CN^-, CH_3^-, H_2O, entre otros.

Según la literatura, la mayoría de los corrinoides con Co(III) están hexacoordinados; mientras que las formas Co(II) tienden a estar pentacoordinados. Los de Co(I) resultan estar tetracoordinados.[70]

2.2.5. Nivel de Cálculo computacional

Una vez que en el proyecto se establezca un modelo computacional adecuado para la reacción de metiltransferencia mediada por la MeCbl en MetH es necesario

optimizar dicho modelo; además, de realizarle cálculos computacionales que permitan brindar más información acerca de ella.

Los cálculos computacionales más empleados para los sistemas corrinoides son DFT con un nivel BP86 con un set de bases Def2-SV para optimizar los corrinoides; ya que, a este nivel de cálculo reproducen las geometrías y algunas propiedades de los corrinoides.[71-73]

Por otra parte, además de BP86, también se ha estudiado con CAM-B3LYP. Se prefiere al CAM-B3LYP en vez del B3LYP debido a que es más apropiados para la transferencia de caga y da una descripción más uniforme sobre los estados excitados. Y otras bases empleadas son la 6-31G(d) y aug-cc-pVDZ. La base no debe ser menor a 6-31G(d).[74]

También se ha obtenido buenos resultados predictivos con un nivel de teoría con cálculos DFT [75]y TDDFT[76-81] ejecutados con una correlación de intercambio funcional de BP86[82-84] y sets de calidad triple-ζ TZVPP para Co, C, N, y TZVP para H.[85-87] En adición se ha reportado que los cálculos TDDFT que se realizan en modelos de corrina truncados producen resultados más afines a los experimentales cuando se trabaja con GGA (BP86) en vez de híbridos (B3LYP) en el caso de excitaciones; ya que, la energía de excitación es más sensible a lo funcional que al set de bases.[88-90]

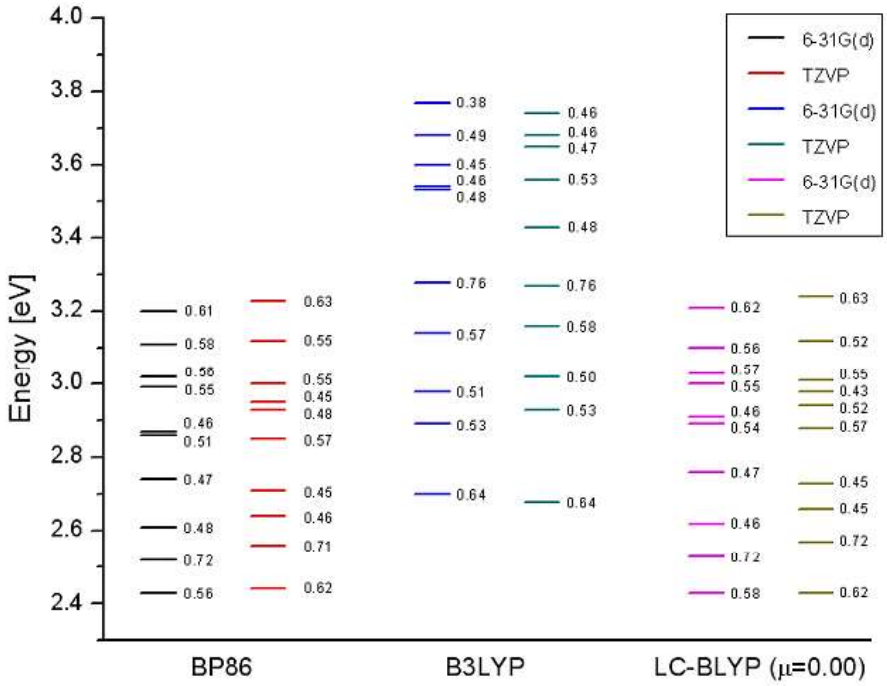


Figura 8. Transiciones electrónicas de Im- [CoIII (corrin)] - CN+ en dependencia del set de bases y el método empleado. Tomado de Kornabis y otros, 2011

2.3. OBJETIVOS

2.3.5. Objetivo general

Desarrollar un modelo computacional de un complejo metálico que sea teóricamente capaz de reproducir la actividad catalítica de transferencia de un grupo metilo por parte de la metionina sintasa con la metilcobalamina como su coenzima.

2.3.6. Objetivos específicos

2.3.6.1. Revisar el estado del arte de los estudios pertinentes a la metilcobalamina y su comportamiento en la metionina sintasa como sistema enzimático
2.3.6.2. Analizar el modo de acción de la metiltransferencia entre la metilcobalamina y la metionina sintasa a partir de los estudios reportados en la literatura
2.3.6.3. Analizar las estructuras detalladas de la metilcobalamina en el sitio activo de la metionina sintasa e Identificar con base a la literatura los factores estructurales y electrónicos que influyen en la metiltransferencia
2.3.6.4. Diseñar y evaluar computacionalmente un sistema modelo simplificado del sitio activo de la metilcobalamina en la metionina sintasa

2.4. METODOLOGÍA UTILIZADA

El proyecto de investigación fue completamente teórico y computacional. La metiltransferencia mediada por la MeCbl se estudió en el bolsillo enzimático de la MetH.

2.2.5. Búsqueda Bibliográfica

Se revisó la literatura reportada en las bases de datos proporcionadas por la Universidad Icesi: *Science Direct, Scorpus, Web of Science y American Chemical Society*, asociada a los estudios bioquímicos, cinéticos, espectroscópicos y teóricos que involucran al sistema enzimático y la reacción de la metiltransferencia.

2.4.2. Análisis del modo de acción

A partir del material bibliográfico obtenido, se analizó lo que es conocido sobre el modo de acción de la metiltransferencia, estableciendo los mecanismos que expliquen dicho modo. Se analizó la literatura vinculada a la formación y el

rompimiento del enlace Co-C. Los resultados de este análisis se desarrollaron en el marco teórico y estado de arte (sección 2.2).

2.4.3. Obtención de estructuras cristalinas de la MetH

Se emplearon las estructuras cristalinas de la MetH reportadas en *Protein Data Bank (PDB)* con el número de registro de comisión de en enzima (EC) de 2.1.1.13 con sus respectivos ligandos.

2.4.4. Visualización de estructuras cristalinas

Se visualizaron las estructuras de la MetH con el programa de visualización PyMOL 2.1 y el visualizador NGL (WebGL) fundamentado en Formato de Transmisión Macromolecular (MMTF). Se analizó el bolsillo molecular y las interacciones presentes entre los residuos de la MetH y la MeCbl.

2.4.5. Determinación de modelo computacional

Empleando la literatura asociada al efecto de las mutaciones de aminoácidos y/o grupos funcionales de la MetH en la actividad catalítica, y la visualización de las estructuras de la MetH se identificaron los factores estructurales y electrónicos que influyen en transferencia del grupo metilo.

A partir de lo anterior, se estableció un modelo computacional simplificado con potencial catalítico y con probabilidad de síntesis en el laboratorio (biomimética).

2.4.6. Cálculos computacionales

Se ajustó la estructura de la MetH al modelo simplificado y se optimizaron las estructuras correspondientes al estado de oxidación del Cobalto: Co(I), Co(II) y Co(III) y su unión a sus ligandos axiales superior e inferior. El nivel de cálculo computacional utilizado para la preoptimización fue DFT (Density Functional Theory), BPV86, con un set de bases 6-31G (d) y *Fitting Set* de DEF2SV.

Una vez preoptimizado, se procedió a un cálculo de optimización con DFT (Density Functional Theory), *Unrestricted spin* BPV86, con un set de bases 6-311G ++ (d,p) y *Fitting Set* de DEF2TZV, que conforme a la literatura es el más adecuado para los sistemas corrinoides.

2.4.7. Matriz de marco lógico

De manera más detallada, las actividades a realizar se encuentran en la matriz de marco lógico.

Tabla 1. Matriz de marco lógico

OBJETIVO GENERAL			
Desarrollar un modelo computacional de un complejo metálico que sea teóricamente capaz de reproducir la actividad catalítica de transferencia de un grupo metilo por parte de la metionina sintasa con la metilcobalamina como su coenzima			
OBJETIVO ESPECÍFICO	**ACTIVIDADES**	**INDICADOR**	**SUPUESTO**
Revisar el estado del arte de los estudios pertinentes a la metilcobalamina y su comportamiento en la metionina sintasa como sistema enzimático	-Capacitación en bases de datos, particularmente *Uniprot y Protein Data Bank (PDB)* -Búsqueda bibliográfica sobre la función de la metilcobalamina en la metionina sintasa -Análisis de la literatura sobre la actividad de metiltransferencia coordinada por el Centro de Cobalto	Documento que indique el estado del arte de los estudios sobre la metilcobalamina y su comportamiento en un sistema enzimático (metionina sintasa)	Acceso a bases de datos y/o artículos científicos
OBJETIVO ESPECÍFICO	**ACTIVIDADES**	**INDICADOR**	**SUPUESTO**
Analizar el modo de acción de la metiltransferencia entre la metilcobalamina y la metionina sintasa a partir de los estudios reportados en la literatura	-Estudio de las propiedades físicas y químicas de los complejos organometálicos que tienen como centro de coordinación al cobalto -Analizar de las reacciones de oxidación y reducción que realizan los sistemas de cobalamina -Búsqueda bibliográfica sobre el modo de acción de la metiltransferencia -Analizar los diversos mecanismos que sustentan el modo de acción	Modo de acción reportado en la literatura sobre la metiltransferencia entre la metilcobalamina y la metionina sintasa analizada	Acceso a bases de datos y/o artículos científicos

OBJETIVO ESPECÍFICO	ACTIVIDADES	INDICADOR	SUPUESTO
Analizar las estructuras detalladas de la metilcobalamina en el sitio activo de la metionina sintasa e identificar con base a la literatura los factores estructurales y electrónicos que influyen en la metiltransferencia	-Obtener las estructuras 3D de la metionina sintasa reportadas en PDB -Analizar las estructuras 3D de la metionina sintasa reportadas en PDB -Determinar las interacciones favorables que se presentan entre la metionina sintasa y la metilcobalamina -Comparar los resultados reportados por diferentes grupos de investigación (bioquímicos, moleculares, espectroscópicos, cinéticos, y teóricos) que indiquen una alteración en la transferencia del grupo metilo	Parámetros estructurales y electrónicos reportados en la literatura que influyen en la metiltransferencia identificados	Número reducido de estructuras cristalinas de la metionina sintasa con la metilcobalamina en su bolsillo molecular
OBJETIVO ESPECÍFICO	**ACTIVIDADES**	**INDICADOR**	**SUPUESTO**
Diseñar y evaluar computacionalmente un sistema modelo simplificado del sitio activo de la metilcobalamina en la metionina sintasa	-Establecer un sistema de estudio inicial entre la metionina sintasa y la metilcobalamina -Analizar las interacciones más importantes entre la metilcobalamina y la metionina sintasa -Proponer un modelo de estudio simplificado y viable para calcular -Efectuar los cálculos computacionales requeridos para el modelo propuesto -Verificar los resultados de los cálculos realizados	Presentación de un sistema modelo computacional simplificado, fundamentado en la metiltransferencia coordinada por el centro de Cobalto en la metionina sintasa	Demasiado tiempo requerido en la ejecución de los cálculos necesarios para evaluar el modelo establecido

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Análisis de la estructura del sitio activo de la metionina sintasa e identificación de factores estructurales y electrónicos

2.5.1.1. Estructura general de la Metionina Sintasa

La MetH es una proteína compuesta de cuatro módulos que se diferencian tanto a nivel estructural como funcional, constituida por hélices α y hojas β (Figuras 9 y 10). [91] Los primeros dos módulos presentan sitios para la unión a Hcy y CH_3-THF ,[92] el tercer dominio se une a la MeCbl y, el modulo C-terminal se une a la AdoMet. [93]

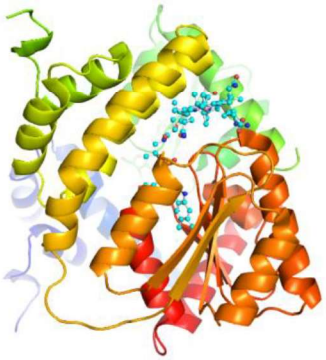


Figura 9. Estructura secundaria de MetH con MeCbl como cofactor

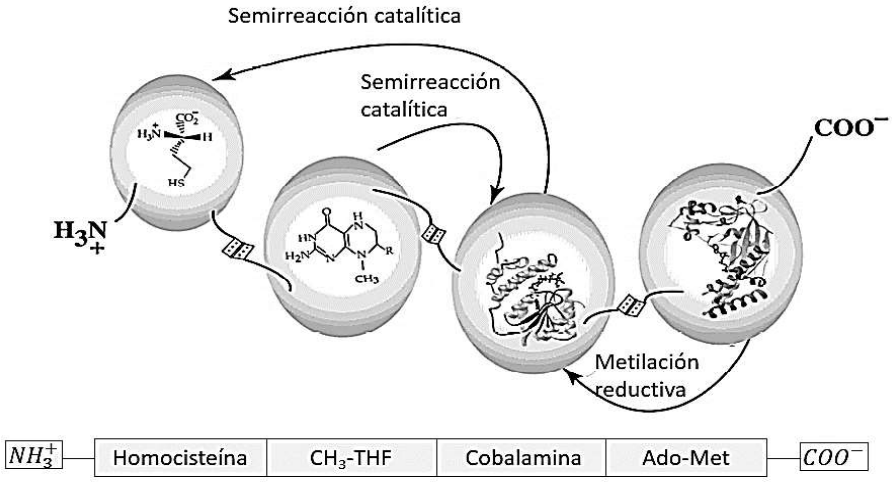


Figura 10. Presentación modular de la MetH [4]

La MetH adquiere diferentes conformaciones entre sus dominios, la disposición espacial de cada uno varía según la reacción del ciclo catalítico que se esté llevando a cabo. Dichos cambios de conformación se fundamentan en la adaptación del bolsillo molecular para el ingreso de la metilcobalamina[29].

Dentro de las 4 conformaciones reportadas en la teoría, se destacan las que ejercen la reacción 1 y 2 ya que se involucran directamente en la metiltransferencia, que corresponden a la desmetilación de CH_3-THF a THF y la formación de metionina a partir de homocisteína (Figura 11).

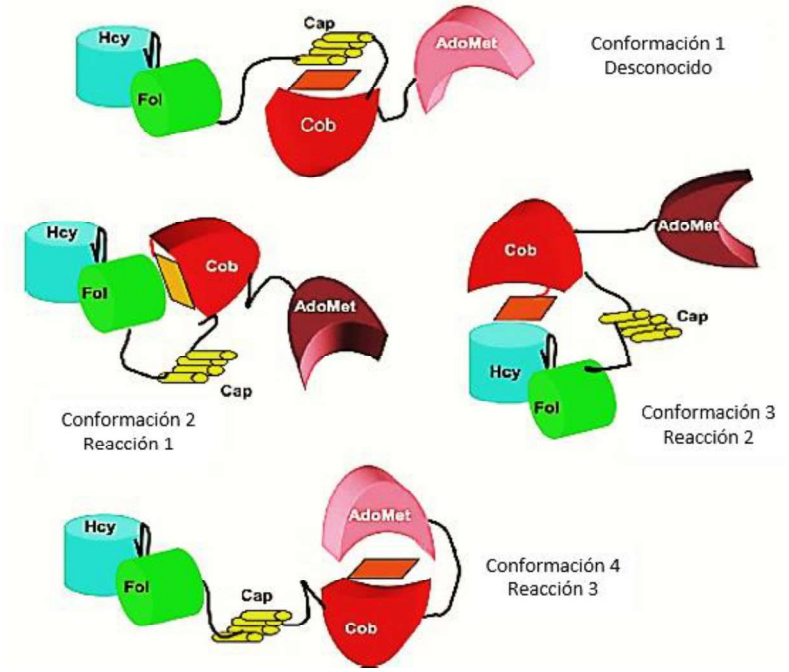


Figura 11. Conformaciones de MetH. Tomado de Randaccio y otros, 2007

2.5.1.2. Sitio activo de la Metionina Sintasa

Después de revisar la estructura general de la MetH y sus conformaciones se procedió con el estudio del sitio activo de la MetH. Se obtuvo las estructuras cristalinas de la MetH cristalinas reportadas en PDB (Protein Data bank) registradas con el número de la comisión de enzima EC: 2.1.1.13. Acorde al número EC, en la base de datos se presentaron 18 estructuras proteicas en las cuales 6 tienen como ligando la Cbl (Anexo tabla 1). [35, 92, 94-98]

A continuación, se estudiaron las interacciones presentes en cada una de las estructuras proteicas mencionadas, iniciando con aquellas que contenían a la Cbl en su sitio activo. Teniendo en cuenta que debe haber unas interacciones que permita el adecuado posicionamiento y orientación tanto del cofactor Cbl como del sustrato CH_3-THF para que se dé la metiltransferencia. Acorde a la superficie de la MetH, el bolsillo molecular con la MeCbl no se encuentra en la parte interna de ella, por lo que permite el posterior acceso de los sustratos (Figura 12).

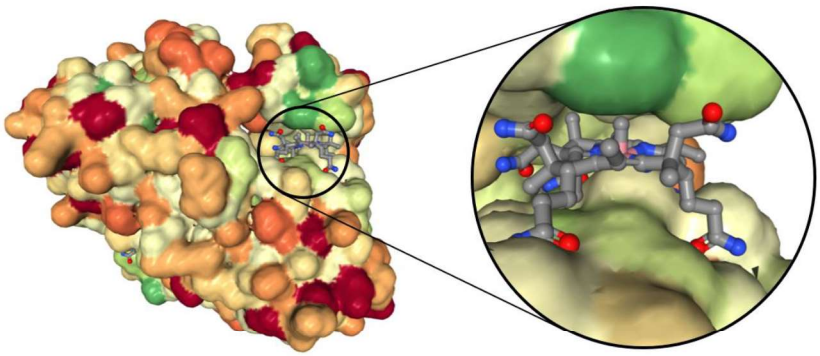


Figura 12. Superficie de MetH 1BMT con MeCbl en su sitio activo[99]

2.5.1.3. Identificación del papel de los residuos en la Metiltransferencia

En el bolsillo molecular de la MetH, se puede establecer diversas interacciones con su cofactor la Cbl, que está dispuesto para aceptar el grupo metilo y generar la MeCbl. Al analizar las estructuras cristalinas de la MetH se identificó tres elementos principales que cumplen distintas funciones en el sitio activo: función catalítica, función de anclaje de la Cbl a la MetH y, función de posicionamiento de la CH3-THF (Figura 13).

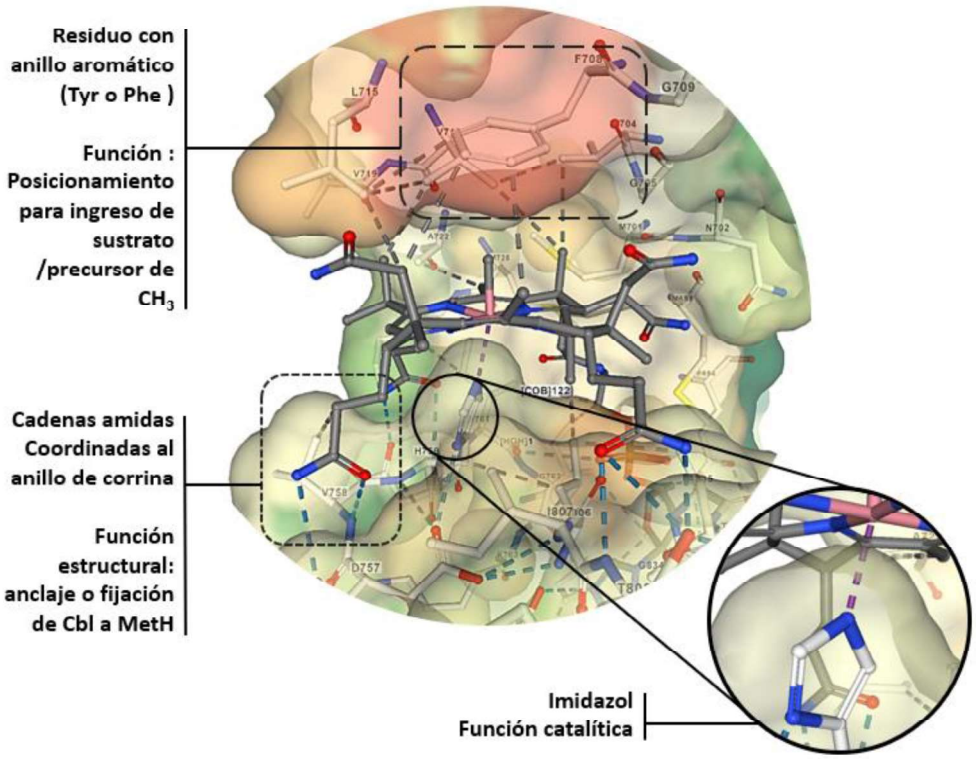


Figura 13. Función de elementos estructurales en el sitio activo de MetH 1BMT[99]

Uno de estos elementos es el imidazol proveniente de la Histidina H 759 que cumple una función catalítica, y es necesario su coordinación con el centro de Cobalto para que la unión con el grupo metilo; ya que, al analizar diversos cristales de la MetH, se encontró que aquellas enzimas cristalizadas sólo con la Cbl (sin el grupo metilo) la H759 no presenta dicha coordinación metálica y está localizada en una posición lejana del centro de Co (Anexo 2, Figura 20). [3] Esto también ocurre con aquellas estructuras de Cbl que estaban coordinadas con H20, SO4 y SAM (Anexo 2, Figuras 21, 22 y 23).

En adición, se ha reportado que la ausencia de la H 759 en la MetH implica una significante pérdida de la funcionalidad de la MetH.[100] De hecho se han obtenido resultados bastante positivos en la modulación de una biomimética inspirada en la MetH; en la cual se tuvo en cuenta a la H759.[101] No obstante, por medio de estudios de mutación, se ha determinado que la Histidina requiere actuar en conjunto con un residuo de Aspartato para la llevarse a cabo la transferencia (Figura 14); y que la pérdida de alguno de los dos residuos afecta la actividad enzimática. [102] La influencia del residuo de Aspartato puede ser debido a un requerimiento como elemento de posicionamiento de la histidina, o es probable que cumpla un papel catalítico, al establecer un enlace de hidrógeno con la histidina de tal forma que el flujo de los electrones establezca el enlace Co-N según el mecanismo S_N2 descrito en el marco teórico.

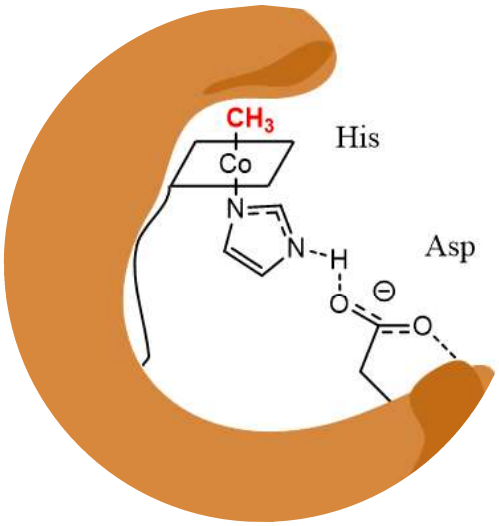


Figura 14. Interacción entre His y Asp[102]

Adicionalmente, se encontró que la His 759 se disocia de la cobalamina (Figura 15) y forma contactos inter-modulares con los residuos del módulo de unión a AdoMet (transferencia de un grupo Ado), lo que demuestra que tiene un papel crucial también en la reactivación de los ciclos de oxidación y reducción en la MetH. [98, 103, 104]

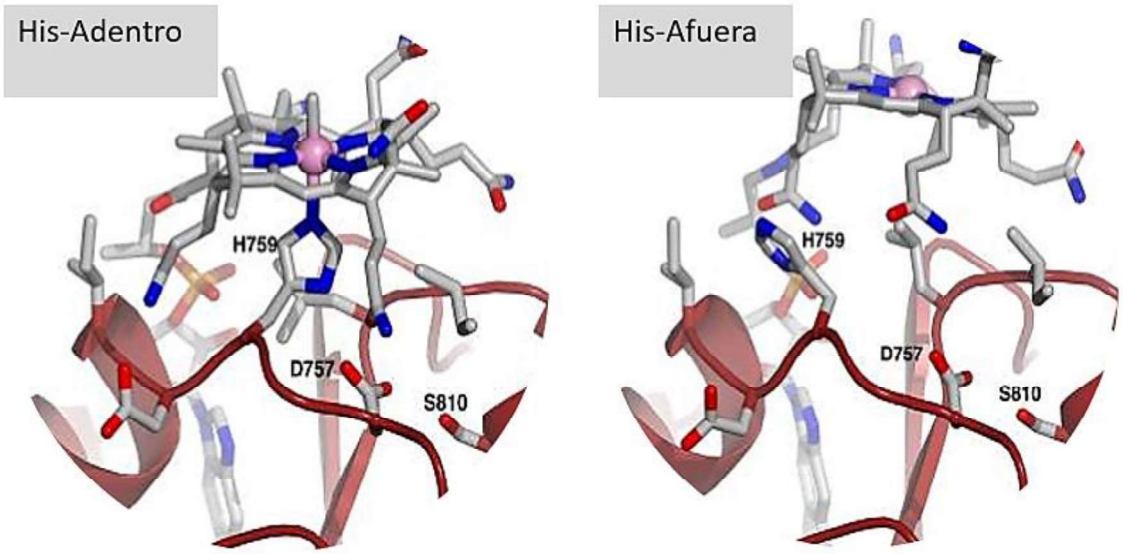


Figura 15. Histidina dentro fuera de MetH. Tomado de Drennan, C.L. y otros, 1994

Por otra parte, otro elemento funcional son las cadenas más largas con grupos amida adyacentes al anillo de corrina, estos cumplen una función de anclaje o fijación del cofactor a la MetH; es decir, actúan como si fueran "sogas pegantes" que por medio de interacciones dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno con los grupos aminos del esqueleto de la MetH, permiten su unión adecuada a ella.

Por último, similarmente a los elementos de anclaje, se encuentran los del posicionamiento del sustrato, que, mediante interacciones hidrofóbicas, permite que el sustrato pueda acceder y aceptar la Cbl el grupo metilo. En este punto, es necesario recordar que la estructura de una enzima es empaquetada y sólo dispone de espacio para el ingreso del sustrato; de tal manera, que el correcto posicionamiento depende en gran medida de las interacciones presentes.

En este sentido, se puede analizar que los residuos de Tirosina (Tyr) y /o Fenilalanina (Phe) que se presentan en la parte superior del bolsillo molecular pueden presentar una función de posicionamiento del sustrato (Anexo 2, Figura 19); es decir, del precursor del grupo metilo (CH_3-THF).

Como se puede apreciar la estructura de CH_3-THF (Figura 16) presenta también un anillo aromático, de esta manera a través de las interacciones no covalentes de tipo "π -stacking" o apilamiento, la (CH_3-THF) logra orientarse en el bolsillo molecular y dejar el grupo metilo. De hecho, se ha reportado que las interacciones de tipo "π -stacking", en un sistema biológico contribuye en gran medida a la estructura dimensional, estabilidad y actividad de la enzima. [105]

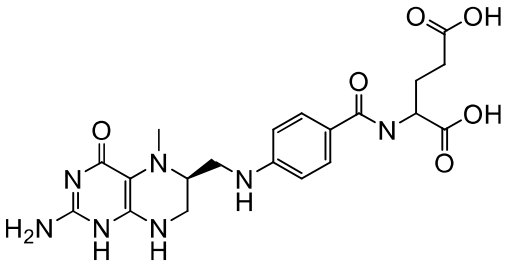


Figura 16. Estructura de CH_3-THF

2.5.2. Modelo propuesto y pre-optimización de la estructura

Por medio del anterior análisis acerca del bolsillo molecular, se determinó que el principal elemento estructural y electrónico asociado con la metiltransferencia es un residuo de Histidina, teniendo en cuenta que los otros ejercen una función de posicionamiento del sustrato.

Cabe destacar que se prefirió descartar del modelo al residuo de Aspartato, ya que aún con la información de las mutaciones con ausencia de este residuo, es probable que sea un componente posicional de la histidina. De lo contrario, retomando la idea central del proyecto de generar información para en un futuro desarrollar un biomimética para la síntesis de compuestos con aplicación industrial, en el momento de emplearse se puede realizar por medio de una superficie que le brinde la carga negativa o incluirla en el medio de uso.

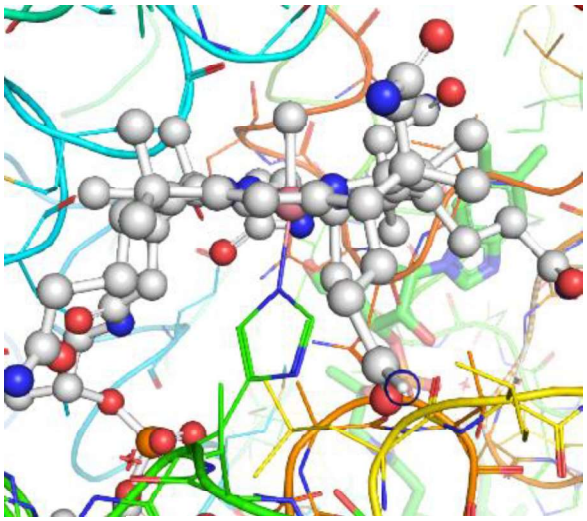
Por otra parte, debido a que el modelo debe ser lo suficientemente simplificado, también se eliminó los elementos de anclaje de la MeCbl (Cadenas amida adyacentes a la corrina).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se estableció un modelo computacional del sitio activo de la MetH con la Cbl que teóricamente presenta actividad catalítica. Para esto, se trabajó sobre la estructura reportada en PDB con la MetH como ligando (Figura 17 a), manteniendo a la corrina y la histidina.

No obstante, como el modelo debe ser análogo a un compuesto que pueda ser sintetizado, fue necesario establecer un elemento de unión en la corrina y la histidina. Esto, fue posible mediante la implementación de una cadena constituida por 8 carbonos, lo suficiente para que la estructura sea flexible y permita la unión de la histidina con el centro de cobalto a la hora de realizar la transferencia.

En adición a la flexibilidad de la cadena, se tomó en cuenta la distancia de enlace entre el cobalto y la histidina de 2.24077 A° (Figura 17 b) que estaba en la estructura reportada en PDB.

a)



b)

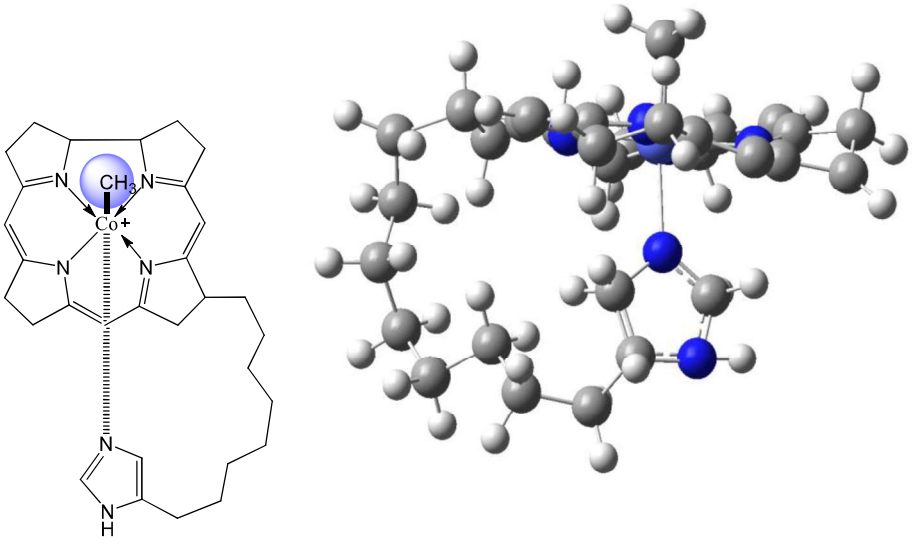


Figura 17. Modelo simplificado de la MetH y la MeCbl. a) Visualización desde la estructura cristalina. b) Adaptación implementada con cadena de carbonos con posibilidad de ser sintetizado y estructura 3D

Al modelo establecido se le realizó un cálculo de pre-optimización para el modelo con Co(III); es decir, unido tanto a la Histidina como al grupo metilo. Las coordenadas pre-optimizadas en el anexo 4 para el Co (III). Con esta estructura, se procedió a efectuar un cálculo de optimización acorde al nivel de cálculo descrito en la metodología.

No obstante, el tiempo de cálculo requerido para el nivel de cálculo establecido es bastante y para efectos del proyecto es insuficiente. Esto, subyace en la caracterización del pozo energético de los metalocomplejos;[82] el cuál, tiende a ser flaqueado y no muy pronunciado (Figura 18), lo que hace que requiera una gran cantidad de ciclos para llegar a su mínimo energético en una optimización.

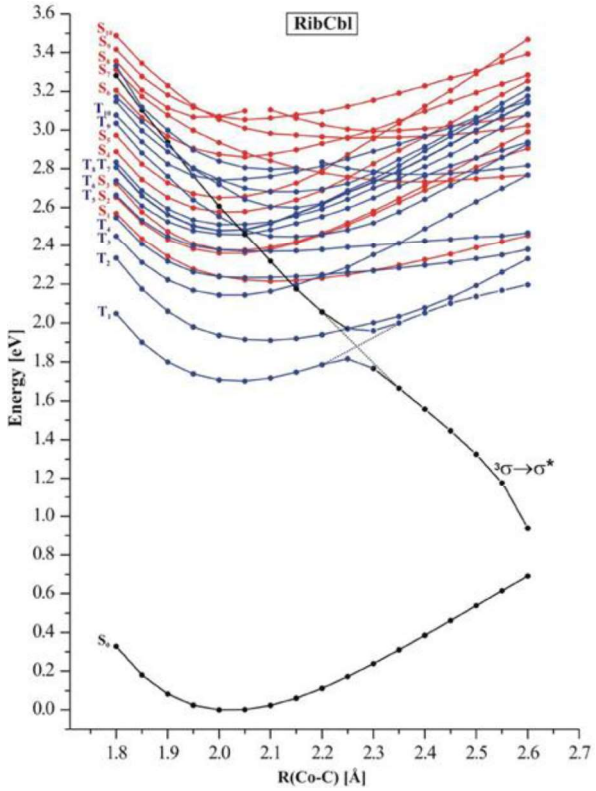


Figura 18. Curvas de energía potencial de los estados singlete (rojo) y triplete (azul) de excitación mínima de complejo corrinoide reportado en teoría con TD-DFT / BP86 / TZVP. Tomado de Liu, H. y otros, 2013

2.6. CONCLUSIONES

Se obtuvo un modelo computacional del sitio activo de la MetH con la MeCbl como su cofactor, con capacidad teórica de reproducir la Metiltransferencia y con posibilidad de ser sintetizado en el laboratorio como biomimética.

Se identificó la función catalítica de un residuo de Histidina en coordinación con el centro de Cobalto de la Corrina para efectuar la Metiltransferencia.

Se analizó que los principales mecanismos de acción involucrados en el modo de acción de la transferencia metílica se realizan por medio de transferencia de un solo electrón y de sustitución nucleofílica bimolecular.

2.7. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un estudio posterior sobre el análisis del método computacional más adecuado para la optimización del modelo propuesto evaluando los métodos reportados en la teoría.

3. BIBLIOGRAFÍA

1. Hwang, J.; Jeong, Y.; Park, J. M.; Lee, K. H.; Hong, J. W.; Choi, J., Biomimetics: forecasting the future of science, engineering, and medicine. *International Journal of Nanomedicine* **2015,** *10*, 5701-5713.
2. Stryer, L.; Berg, J.; Tymoczko, J., *Bioquímica*. Reverté: Barcelona, España, 2008.
3. Papadopoulos, H.; Andreou, A. S.; Iliadis, L. S.; Maglogiannis, I., Artificial Intelligence Applications and Innovations: 9th IFIP WG 12.5. Springer: 2013; p 82.
4. Matthews, R. G., Cobalamin-Dependent Methyltransferases. *Accounts of Chemical Research* **2001**, 681-689.
5. Bridwella, R. J.; Drennan, C. L., Vitamin B12 in the spotlight again. *Current Opinion in Chemical Biology* **2017,** *37*, 63-70.
6. Scott, A. I.; Roessner, C. A., Biosynthesis of cobalamin (vitamin B-12). *Biochemical Society Transactions* **2002,** *30*, 613-620.
7. Gruber, K.; Puffer, B.; Krautler, B., Vitamin B12-derivatives-enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids. *Chem Soc Rev* **2011,** *40* (8), 4346-63.
8. Briani, C.; Dalla Torre, C.; Citton, V.; Manara, R.; Pompanin, S.; Binotto, G.; Adami, F., Cobalamin Deficiency: Clinical Picture and Radiological Findings. **2013,** *5* (11), 4521-4539.
9. Banerjee, R.; Gherasim, C.; Padovani, D., The tinker, tailor, soldier in intracellular B12 trafficking. *Current Opinion in Chemical Biology* **2009,** *13* (4), 484-491.
10. Watanabe, F.; Yabuta, Y.; Tanioka, Y.; Bito, T., Biologically Active Vitamin B12 Compounds in Foods for Preventing Deficiency among Vegetarians and Elderly Subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013,** *61* (28), 6769-6775.
11. Elmore, C. L.; Wu, X.; Leclerc, D.; Watson, E. D.; Bottiglieri, T.; Krupenko, N. I.; Krupenko, S. A.; Cross, J. C.; Rozen, R.; Gravel, R. A.; Matthews, R. G., Metabolic derangement of methionine and folate metabolism in mice deficient in methionine synthase reductase. *Molecular Genetics and Metabolism* **2007,** *91* (1), 85-97.
12. Padmanabhan, N.; Jia, D.; Geary-Joo, C.; Wu, X.; Ferguson-Smith, Anne C.; Fung, E.; Bieda, Mark C.; Snyder, Floyd F.; Gravel, Roy A.; Cross, James C.; Watson, Erica D., Mutation in Folate Metabolism Causes Epigenetic Instability and Transgenerational Effects on Development. *Cell* **2013,** *155* (1), 81-93.
13. Mandaviya, P. R.; Stolk, L.; Heil, S. G., Homocysteine and DNA methylation: A review of animal and human literature. *Molecular Genetics and Metabolism* **2014,** *113* (4), 243-252.

14. McCaddon, A., Vitamin B12 in neurology and ageing; Clinical and genetic aspects. *Biochimie* **2013,** *95* (5), 1066-1076.
15. Matthews, R. G.; Koutmos, M.; Datta, S., Cobalamin-dependent and cobamide-dependent methyltransferases. *Current Opinion in Structural Biology* **2008,** *18* (6), 658-666.
16. Hyperhomocysteinemia and cobalamin disorders. *Molecular Genetics and Metabolism* **2007,** *90* (2), 113-121.
17. Guéant, J.-L.; Caillerez-Fofou, M.; Battaglia-Hsu, S.; Alberto, J.-M.; Freund, J.-N.; Dulluc, I.; Adjalla, C.; Maury, F.; Merle, C.; Nicolas, J.-P.; Namour, F.; Daval, J.-L., Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie* **2013,** *95* (5), 1033-1040.
18. Loewy, A. D.; Niles, K. M.; Anastasio, N.; Watkins, D.; Lavoie, J.; Lerner-Ellis, J. P.; Pastinen, T.; Trasler, J. M.; Rosenblatt, D. S., Epigenetic modification of the gene for the vitamin B12 chaperone MMACHC can result in increased tumorigenicity and methionine dependence. *Molecular Genetics and Metabolism* **2009,** *96* (4), 261-267.
19. Zhu, H.; Wicker, N. J.; Shaw, G. M.; Lammer, E. J.; Hendricks, K.; Suarez, L.; Canfield, M.; Finnell, R. H., Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects. *Molecular Genetics and Metabolism* **2003,** *78* (3), 216-221.
20. Braschi, C.; Doucette, J.; Chari, A., Characteristics of Vitamin B12 Deficiency in Patients With Plasma Cell Disorders. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* **2017,** *17* (12), e65-e69.
21. Bulut, E. A.; Soysal, P.; Aydin, A. E.; Dokuzlar, O.; Kocyigit, S. E.; Isik, A. T., Vitamin B12 deficiency might be related to sarcopenia in older adults. *Experimental Gerontology* **2017,** *95*, 136-140.
22. Bizzaro, N.; Antico, A., Diagnosis and classification of pernicious anemia. *Autoimmunity Reviews* **2014,** *13* (4), 565-568.
23. Banerjee, R., B12 Trafficking in Mammals: A Case for Coenzyme Escort Service. *ACS Chemical Biology* **2006,** *1* (3), 149-159.
24. D'Addario, C.; Maccarrone, M., Chapter 21 - Alcohol and Epigenetic Modulations A2 - Patel, Vinood B. In *Molecular Aspects of Alcohol and Nutrition*, Academic Press: San Diego, 2016; pp 261-273.
25. Stover, P. J., Vitamin B12 and older adults. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **2010,** *13* (1), 24-27.
26. Obeid, R.; Fedosov, S. N.; Nexo, E., Cobalamin coenzyme forms are not likely to be superior to cyano- and hydroxyl-cobalamin in prevention or treatment of cobalamin deficiency. *Molecular Nutrition & Food Research* **2015,** *59* (7), 1364-1372.
27. Krautler, B., Biochemistry of B12-cofactors in human metabolism. *Subcell Biochem* **2012,** *56*, 323-46.
28. Combs Jr, G. F.; McClung, J. P., Chapter 18 - Vitamin B12. In *The Vitamins (Fifth Edition)*, Academic Press: 2017; pp 431-452.
29. Randaccio, L.; Geremia, S.; Wuerges, J., Crystallography of vitamin B12 proteins. *Journal of Organometallic Chemistry* **2007**, 1198-1215.

30. Dolker, N.; Maseras, F.; Siegbahn, E., Stabilization of the adenosyl radical in coenzyme B12- a theoretical study. **2004,** *386*, 174-178.
31. Shimakoshi, H.; Hisaeda, Y., Electrochemistry and catalytic properties of vitamin B12 derivatives in nonaqueous media. *Current Opinion in Electrochemistry* **2018,** *8*, 24-30.
32. Toraya, T., Cobalamin-dependent dehydratases and a deaminase: Radical catalysis and reactivating chaperones. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2014,** *544*, 40-57.
33. Fedosov, S. N.; Ruetz, M.; Gruber, K.; Fedosova, N. U.; Kräutler, B., A Blue Corrinoid from Partial Degradation of Vitamin B12 in Aqueous Bicarbonate: Spectra, Structure, and Interaction with Proteins of B12 Transport. *Biochemistry* **2011,** *50* (37), 8090-8101.
34. Kung, Y.; Ando, N.; Doukov, I.; Blasiak, C.; Bender, G.; Seravelli, J.; Ragsdale, W., Visualizing molecular juggling within a B12-dependent methyltransferase complex. *Nature* **2012**, 264-269.
35. Koutmos, M.; Datta, S.; Pattridge, K. A.; Smith, J. L.; Matthews, R. G., Insights into the reactivation of cobalamin-dependent methionine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009,** *106* (44), 18527.
36. Frasca, V.; Banerjee, R. V.; Dunham, W. R.; Sands, R. H.; Matthews, R. G., Cobalamin-dependent methionine synthase from Escherichia coli B: electron paramagnetic resonance spectra of the inactive form and the active methylated form of the enzyme. *Biochemistry* **1988,** *27* (22), 8458-65.
37. Sukumar, N., Crystallographic studies on B12 binding proteins in eukaryotes and prokaryotes. *Biochimie* **2013,** *95* (5), 976-988.
38. Garst, J. F.; Easton Lawrence, K.; Batlaw, R.; Boone, J. R.; Ungváry, F., Magnesium bromide in Grignard reagent formation. *Inorganica Chimica Acta* **1994,** *222* (1), 365-375.
39. Ignatov, S.; Panteleev, S.; Maslennikov, S.; Spirina, I., Mechanism of the Grignard reaction in terms of the cluster model of reaction center. A quantum-chemical study. *Russian Journal of General Chemistry* **2012,** *82* (12), 1954-1961.
40. Huryn, D. M., 1.2 - Carbanions of Alkali and Alkaline Earth Cations: (ii) Selectivity of Carbonyl Addition Reactions A2 - Trost, Barry M. In *Comprehensive Organic Synthesis*, Fleming, I., Ed. Pergamon: Oxford, 1991; pp 49-75.
41. D., T.; Waugh, R. C., Grignard Reagents. In *METAL-ORGANIC COMPOUNDS*, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY: 1959; Vol. 23, pp 73-81.
42. Korwar, S.; Amir, S.; Tosso, P. N.; Desai, B. K.; Kong, C. J.; Fadnis, S.; Telang, N. S.; Ahmad, S.; Roper, T. D.; Gupton, B. F., The Application of a Continuous Grignard Reaction in the Preparation of Fluconazole. *European Journal of Organic Chemistry* **2017,** *2017* (44), 6495-6498.
43. Endoma-Arias, M. A. A.; Cox, D. P.; Hudlicky, T., General Method of Synthesis for Naloxone, Naltrexone, Nalbuphone, and Nalbuphine by the Reaction of Grignard Reagents with an Oxazolidine Derived from Oxymorphone. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2013,** *355* (9), 1869-1873.
44. Chronopoulos, D. D.; Bakandritsos, A.; Lazar, P.; Pykal, M.; Čépe, K.; Zbořil, R.; Otyepka, M., High-Yield Alkylation and Arylation of Graphene via Grignard Reaction with Fluorographene. *Chemistry of Materials* **2017,** *29* (3), 926-930.

45. Yonova, I. M.; Johnson, A. G.; Osborne, C. A.; Moore, C. E.; Morrissette, N. S.; Jarvo, E. R., Stereospecific Nickel-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Alkyl Grignard Reagents and Identification of Selective Anti-Breast-Cancer Agents. *Angewandte Chemie* **2014,** *126* (9), 2454-2459.
46. Chen, S. L.; Blomberg, R. A.; Siegbahn, E. M., How is a Co-methyl intermediate formed in the reaction of cobalamin-dependet methionine synthase? Theoretical evidence for a two step methyl cation transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, 4066-4077.
47. Alfonso-Prieto, M.; Biarnés, X.; Kumar, M.; Rovira, C.; Kozlowski, P. M., Reductive Cleavage Mechanism of Co−C Bond in Cobalamin-Dependent Methionine Synthase. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010,** *114* (40), 12965-12971.
48. Fleischhacker, A. S.; Matthews, R. G., Ligand Trans Influence Governs Conformation in Cobalamin-Dependent Methionine Synthase. *Biochemistry* **2007,** *46* (43), 12382-12392.
49. Kumar, N.; Jaworska, M.; Lodowski, P.; Kumar, M.; Kozlowski, P. M., Electronic Structure of Cofactor−Substrate Reactant Complex Involved in the Methyl Transfer Reaction Catalyzed by Cobalamin-Dependent Methionine Synthase. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011,** *115* (20), 6722-6731.
50. Jensen, K. P.; Ryde, U., Conversion of Homocysteine to Methionine by Methionine Synthase: A Density Functional Study. *Journal of the American Chemical Society* **2003,** *125* (46), 13970-13971.
51. Kumar, N.; Kozlowski, P. M., Mechanistic Insights for Formation of an Organometallic Co–C Bond in the Methyl Transfer Reaction Catalyzed by Methionine Synthase. *The Journal of Physical Chemistry B* **2013,** *117* (50), 16044-16057.
52. Ludwig, M. L.; Matthews, R. G., B₁₂-Dependent Methionine Synthase: A Structure That Adapts to Catalyze Multiple Methyl Transfer Reactions. In *Structures and Mechanisms*, American Chemical Society: 2002; Vol. 827, pp 186-201.
53. Bandarian, V.; Matthews, R. G., Quantitation of Rate Enhancements Attained by the Binding of Cobalamin to Methionine Synthase. *Biochemistry* **2001,** *40* (16), 5056-5064.
54. Dorweiler, J. S.; Finke, R. G.; Matthews, R. G., Cobalamin-Dependent Methionine Synthase: Probing the Role of the Axial Base in Catalysis of Methyl Transfer between Methyltetrahydrofolate and Exogenous Cob(I)alamin or Cob(I)inamide. *Biochemistry* **2003,** *42* (49), 14653-14662.
55. Wolthers, K. R.; Scrutton, N. S., Protein Interactions in the Human Methionine Synthase−Methionine Synthase Reductase Complex and Implications for the Mechanism of Enzyme Reactivation. *Biochemistry* **2007,** *46* (23), 6696-6709.
56. Jensen, K. P., Electronic Structure of Cob(I)alamin: The Story of an Unusual Nucleophile. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005,** *109* (20), 10505-10512.
57. Park, K.; Brunold, T. C., Combined Spectroscopic and Computational Analysis of the Vibrational Properties of Vitamin B12 in its Co3+, Co2+, and Co1+ Oxidation States. *The Journal of Physical Chemistry B* **2013,** *117* (18), 5397-5410.

58. Kozlowski, P.; Kumar, M., Can the local enzyme scaffold act as an H-donor for a Co(I)--H bond formation? The curious case of Methionine Synthase-bound cob(I)alamin. **2013,** *126*, 26-34.
59. Kozlowski, P. M.; Kuta, J.; Galezowski, W., Reductive Cleavage Mechanism of Methylcobalamin: Elementary Steps of Co−C Bond Breaking. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007,** *111* (26), 7638-7645.
60. Kozlowski, P.; Kumar, M., Can the local enzyme scaffold act as an H-dinor for a Co(I)--H bond formation? The curious case of Methionine Synthase-bound cob(I)alamin. **2013,** *126*, 26-34.
61. Kozlowski, P.; Kumar, M., Electronic and Structural Properties of Cob(I)alamin: Ramifications for B12-Dependent Processes. **2017,** *333*, 71-81.
62. Hall, D. A.; Jordan-Starck, T. C.; Loo, R. O.; Ludwig, M. L.; Matthews, R. G., Interaction of Flavodoxin with Cobalamin-Dependent Methionine Synthase. *Biochemistry* **2000,** *39* (35), 10711-10719.
63. Ragsdale, S. W., Catalysis of Methyl Group Transfers Involving Tetrahydrofolate and B(12). *Vitamins and hormones* **2008,** *79*, 293-324.
64. Doukov, T.; Seravalli, J.; Stezowski, J. J.; Ragsdale, S. W., Crystal structure of a methyltetrahydrofolate- and corrinoid-dependent methyltransferase. *Structure* **2000,** *8* (8), 817-30.
65. Mathew, D.; Liptak; Brunold, C., Spectroscopic and computational studies pf Co1+ Cobalamin: Spectral and electronic properties of the superreduced" B12 cofactor. *Journal of American Chemistry Society* **2006**, 9144-9156.
66. Blackman, A. G., Cobalt: Inorganic & Coordination Chemistry. **2006**.
67. Rury, A. S.; Wiley, T. E.; Sension, R. J., Energy Cascades, Excited State Dynamics, and Photochemistry in Cob(III)alamins and Ferric Porphyrins. *Accounts of Chemical Research* **2015,** *48* (3), 860-867.
68. Dereven'kov, I. A.; Salnikov, D. S.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Makarov, S. V.; Koifman, O. I., Redox chemistry of cobalamin and its derivatives. *Coordination Chemistry Reviews* **2016,** *309*, 68-83.
69. Ahuja, D. K.; Gavalas, V. G.; Bachas, L. G.; Bhattacharyya, D., Aqueous-Phase Dechlorination of Toxic Chloroethylenes by Vitamin B12 Cobalt Center: Conventional and Polypyrrole Film−Based Electrochemical Studies. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2004,** *43* (4), 1049-1055.
70. Kräutler, B., Vitamin B₁₂: chemistry and biochemistry. *Biochemical Society Transactions* **2005,** *33* (4), 806.
71. Pavlova, A.; Parks, J. M.; Gumbart, J. C., Development of CHARMM-Compatible Force-Field Parameters for Cobalamin and Related Cofactors from Quantum Mechanical Calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2018,** *14* (2), 784-798.
72. Johnston, R. C.; Zhou, J.; Smith, J. C.; Parks, J. M., Toward Quantitatively Accurate Calculation of the Redox-Associated Acid-Base and Ligand Binding Equilibria of Aquacobalamin. *J Phys Chem B* **2016,** *120* (30), 7307-18.
73. Kuta, J.; Wuerges, J.; Randaccio, L.; Kozlowski, P. M., Axial bonding in alkylcobalamins: DFT analysis of the inverse versus normal trans influence. *J Phys Chem A* **2009,** *113* (43), 11604-12.

74. Solheim, H.; Kornobis, K.; Ruud, K.; Kozlowski, P. M., Electronically Excited States of Vitamin B12 and Methylcobalamin: Theoretical Analysis of Absorption, CD, and MCD Data. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011,** *115* (4), 737-748.
75. Kozlowski, P. M., Quantum chemical modelling of Co-C bond activation in B12-dependent enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, 736-743.
76. Conrad, K. S.; Jordan, C. D.; Brown, K. L.; Brunold, T. C., Spectroscopic and computational studies of cobalamin species with variable lower axial ligation: implications for the mechanism of Co-C bond activation by class I cobalamin-dependent isomerases. *Inorg Chem* **2015,** *54* (8), 3736-47.
77. Stich, T. A.; Brooks, A. J.; Buan, N. R.; Brunold, T. C., Spectroscopic and computational studies of Co3+-corrinoids: spectral and electronic properties of the B12 cofactors and biologically relevant precursors. *J Am Chem Soc* **2003,** *125* (19), 5897-914.
78. Stich, T. A.; Buan, N. R.; Brunold, T. C., Spectroscopic and computational studies of Co2+corrinoids: spectral and electronic properties of the biologically relevant base-on and base-off forms of Co2+cobalamin. *J Am Chem Soc* **2004,** *126* (31), 9735-49.
79. Brooks, A. J.; Fox, C. C.; Marsh, E. N.; Vlasie, M.; Banerjee, R.; Brunold, T. C., Electronic structure studies of the adenosylcobalamin cofactor in glutamate mutase. *Biochemistry* **2005,** *44* (46), 15167-81.
80. Brooks, A. J.; Vlasie, M.; Banerjee, R.; Brunold, T. C., Spectroscopic and computational studies on the adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl-CoA mutase: evaluation of enzymatic contributions to Co-C bond activation in the Co3+ ground state. *J Am Chem Soc* **2004,** *126* (26), 8167-80.
81. Lodowski, P.; Jaworska, M.; Kornobis, K.; Andruniów, T.; Kozlowski, P. M., Electronic and Structural Properties of Low-lying Excited States of Vitamin B12. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011,** *115* (45), 13304-13319.
82. Liu, H.; Kornobis, K.; Lodowski, P.; Jaworska, M.; Kozlowski, P. M., TD-DFT insight into photodissociation of the Co-C bond in coenzyme B(12). *Frontiers in Chemistry* **2013,** *1*, 41.
83. Jaworska, M.; Lodowski, P.; Andruniow, T.; Kozlowski, P. M., Photolysis of methylcobalamin: identification of the relevant excited states involved in Co-C bond scission. *J Phys Chem B* **2007,** *111* (10), 2419-22.
84. Lodowski, P.; Jaworska, M.; Andruniow, T.; Kumar, M.; Kozlowski, P. M., Photodissociation of Co-C bond in methyl- and ethylcobalamin: an insight from TD-DFT calculations. *J Phys Chem B* **2009,** *113* (19), 6898-909.
85. Jensen, K. P.; Ryde, U., How the Co−C Bond Is Cleaved in Coenzyme B12 Enzymes: A Theoretical Study. *Journal of the American Chemical Society* **2005,** *127* (25), 9117-9128.
86. Jensen, K. P.; Ryde, U., Theoretical Prediction of the Co−C Bond Strength in Cobalamins. *The Journal of Physical Chemistry A* **2003,** *107* (38), 7539-7545.
87. Kozlowski, P. M.; Kumar, M.; Piecuch, P.; Li, W.; Bauman, N. P.; Hansen, J. A.; Lodowski, P.; Jaworska, M., The Cobalt-Methyl Bond Dissociation in Methylcobalamin: New Benchmark Analysis Based on Density Functional Theory and Completely Renormalized Coupled-Cluster Calculations. *J Chem Theory Comput* **2012,** *8* (6), 1870-94.

88. Lodowski, P.; Jaworska, M.; Garabato, B. D.; Kozlowski, P. M., Mechanism of Co–C Bond Photolysis in Methylcobalamin: Influence of Axial Base. *The Journal of Physical Chemistry A* **2015,** *119* (17), 3913-3928.
89. Hirao, H., Which DFT functional performs well in the calculation of methylcobalamin? Comparison of the B3LYP and BP86 functionals and evaluation of the impact of empirical dispersion correction. *J Phys Chem A* **2011,** *115* (33), 9308-13.
90. Kornobis, K.; Kumar, N.; Wong, B. M.; Lodowski, P.; Jaworska, M.; Andruniow, T.; Ruud, K.; Kozlowski, P. M., Electronically excited states of vitamin B12: benchmark calculations including time-dependent density functional theory and correlated ab initio methods. *J Phys Chem A* **2011,** *115* (7), 1280-92.
91. Matthews, R.; R. Hondorp, E., *Methionine*. 2013; Vol. 1.
92. Evans, J. C.; Huddler, D. P.; Hilgers, M. T.; Romanchuk, G.; Matthews, R. G.; Ludwig, M. L., Structures of the N-terminal modules imply large domain motions during catalysis by methionine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004,** *101* (11), 3729-3736.
93. Randacio, L.; Geremia, S.; Wuerges, J., Crystallography of vitamin B12 proteins. *Journal of Organometallic Chemistry* **2007**, 1198-1215.
94. Bandarian, V.; Pattridge, K. A.; Lennon, B. W.; Huddler, D. P.; Matthews, R. G.; Ludwig, M. L., Domain alternation switches B12-dependent methionine synthase to the activation conformation. *Nature Structural Biology* **2001,** *9*, 53.
95. Dixon, M. M.; Huang, S.; Matthews, R. G.; Ludwig, M., The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B12. *Structure* **1996,** *4* (11), 1263-1275.
96. Wolthers, K. R.; Toogood, H. S.; Jowitt, T. A.; Marshall, K. R.; Leys, D.; Scrutton, N. S., Crystal structure and solution characterization of the activation domain of human methionine synthase. *Febs j* **2007,** *274* (3), 738-50.
97. Koutmos, M.; Pejchal, R.; Bomer, T. M.; Matthews, R. G.; Smith, J. L.; Ludwig, M. L., Metal active site elasticity linked to activation of homocysteine in methionine synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008,** *105* (9), 3286-91.
98. Datta, S.; Koutmos, M.; Pattridge, K. A.; Ludwig, M. L.; Matthews, R. G., A disulfide-stabilized conformer of methionine synthase reveals an unexpected role for the histidine ligand of the cobalamin cofactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008,** *105* (11), 4115.
99. Drennan, C. L.; Huang, S.; Drummond, J. T.; Matthews, R. G.; Lidwig, M. L., How a protein binds B12: A 3.0 A X-ray structure of B12-binding domains of methionine synthase. *Science* **1994,** *266* (5191), 1669.
100. Jarrett, J. T.; Amaratunga, M.; Drennan, C. L.; Scholten, J. D.; Sands, R. H.; Ludwig, M. L.; Matthews, R. G., Mutations in the B12-binding region of methionine synthase: How the protein controls methylcobalamin reactivity. *Biochemistry* **1996,** *35* (7), 2464-2475.
101. Sonnay, M.; Fox, T.; Blacque, O.; Zelder, F., Modulating the cobalt redox potential through imidazole hydrogen bonding interactions in a supramolecular biomimetic protein-cofactor model. *Chemical Science* **2016,** *7* (6), 3836-3842.
102. Chen, H.-P.; Lung, F.-D.; Yeh, C.-C.; Chen, H.-L.; Wu, S.-H., The role of the conserved histidine-aspartate pair in the 'base-off' binding of cobalamins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004,** *12* (3), 577-582.

103. Männel-Croisé, C.; Zelder, F., Immobilised vitamin B12 as a biomimetic model for base-off/histidine-on coordination. *Chemical Communications* **2011,** *47* (40), 11249-11251.
104. Zhou, K.; Zelder, F., "Intra base off/inter base on" coordination: self-assembly of a dimeric vitamin B12 derivative with a versatile tail. *Chemical Communications* **2011,** *47* (43), 11999-12001.
105. Madhusudan Makwana, K.; Mahalakshmi, R., Implications of aromatic–aromatic interactions: From protein structures to peptide models. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* **2015,** *24* (12), 1920-1933.
106. PDB, Protein Data Bank. In *RCSB PDB*, 2018.

4. ANEXO

Anexo 1. Estructuras proteicas reportadas en PDB con EC. 2.1.1.13.[106]

Tabla 2. Descripción de estructuras reportadas en PDB de MetH.

PDB ID	NOMBRE MACROMOLÉCULA	TÍTULO DE ESTRUCTURA	LIGANDO
1BMT	Methionine synthase	How a protein binds b12: a 3.o angstrom x-ray structure of the b12-binding domains of methionine synthase	COB
1J6R	Methionine synthase	Crystal structure of Activation (AdoMet binding) domain of Methionine synthase (TM0269) from Thermotoga maritima at 2.2 A resolution	
1K7Y	methionine synthase	E. coli MetH C-terminal fragment (649-1227)	B12, SO4
1K98	Methionine synthase	AdoMet complex of MetH C-terminal fragment	B12, SO4
1MSK	Cobalamin-dependent methionine synthase	Methionine synthase (activation domain)	ACT, SAM
1Q7M	5-methyltetrahydrofolate S-homocysteine methyltransferase	Cobalamin-dependent methionine synthase (MetH) from Thermotoga maritima (Oxidized, Monoclinic)	
1Q7Q	5-methyltetrahydrofolate S-homocysteine methyltransferase	Cobalamin-dependent methionine synthase (1-566) from T. maritima (Oxidized, Orthorhombic)	
1Q7Z	5-methyltetrahydrofolate S-homocysteine methyltransferase	Cobalamin-dependent methionine synthase (1-566) from Thermotoga maritima (Cd2+ complex)	CD
1Q85	5-methyltetrahydrofolate S-homocysteine methyltransferase	Cobalamin-dependent methionine synthase (1-566) from Thermotoga maritima (Cd2+ complex, Se-Met)	CD, MSE
1Q8A	5-methyltetrahydrofolate S-homocysteine methyltransferase	Cobalamin-dependent methionine synthase (1-566) from Thermotoga maritima (Cd2+:L-Hcy complex, Se-Met)	CD, HCS, MSE,
1Q8J	5-methyltetrahydrofolate S-homocysteine methyltransferase	Cobalamin-dependent methionine synthase (1-566) from Thermotoga maritima (Cd2+, Hcy, methyltetrahydrofolate complex)	C2F, CD, HCS

2O2K	Methionine synthase	Crystal Structure of the Activation Domain of Human Methionine Synthase Isoform/Mutant D963E/K1071N	
3BOF	5-methyltetrahydrofolate S-homocysteine methyltransferase	Cobalamin-dependent methionine synthase (1-566) from Thermotoga maritima complexed with Zn2+ and Homocysteine	HCS, K, YT3, ZN
3BOL	5-methyltetrahydrofolate S-homocysteine methyltransferase	Cobalamin-dependent methionine synthase (1-566) from Thermotoga maritima complexed with Zn2+	K, ZN,
3BUL	Methionine synthase	E. coli I690C/G743C MetH C-terminal fragment (649-1227)	B12
3IV9	Methionine synthase	Structure of the B12-dependent Methionine Synthase (MetH) C-teminal half in a "His-On" conformation	B12
3IVA	Methionine synthase	Structure of the B12-dependent Methionine Synthase (MetH) C-teminal half with AdoHcy bound	B12, NO3, SAH
4CCZ	METHIONINE SYNTHASE	Crystal structure of human 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase, the homocysteine and folate binding domains	THG

Anexo 2. Visualización de estructuras cristalinas de la MetH con ligandos

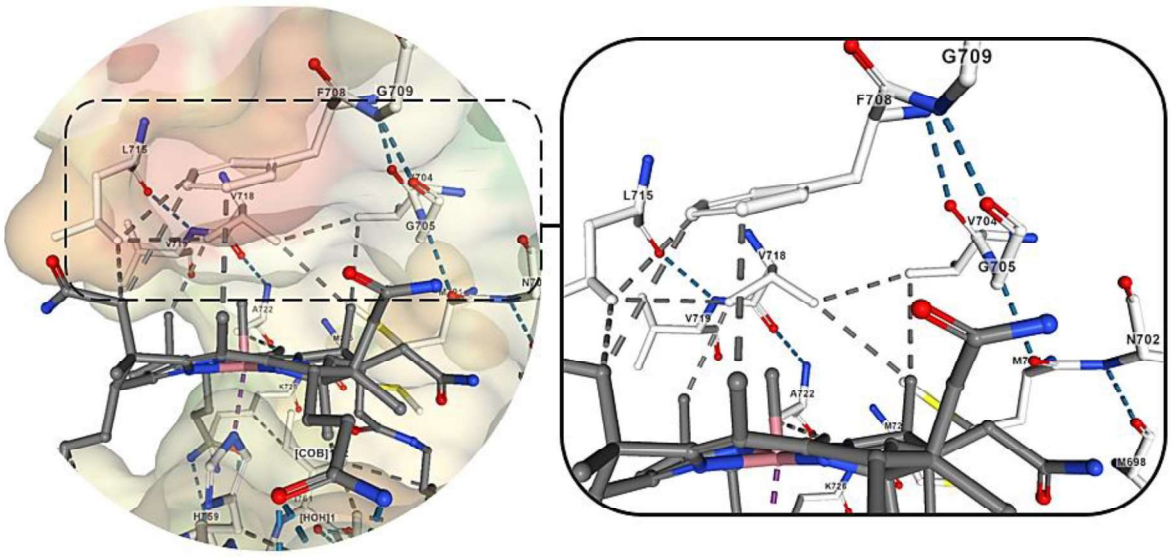


Figura 19. Posicionamiento de residuo aromático (Tyr o Phe) sobre MeCbl

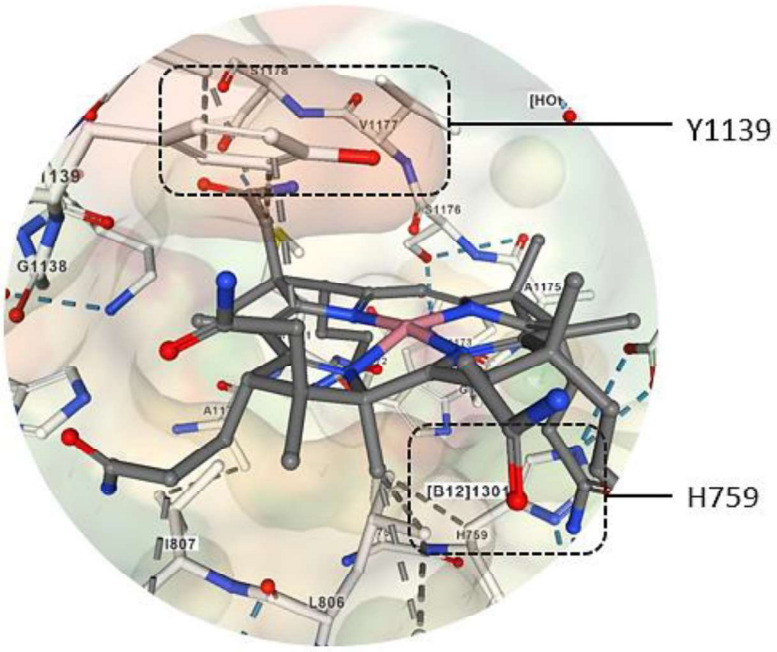


Figura 20. MeCbl con Cbl como ligando en MetH

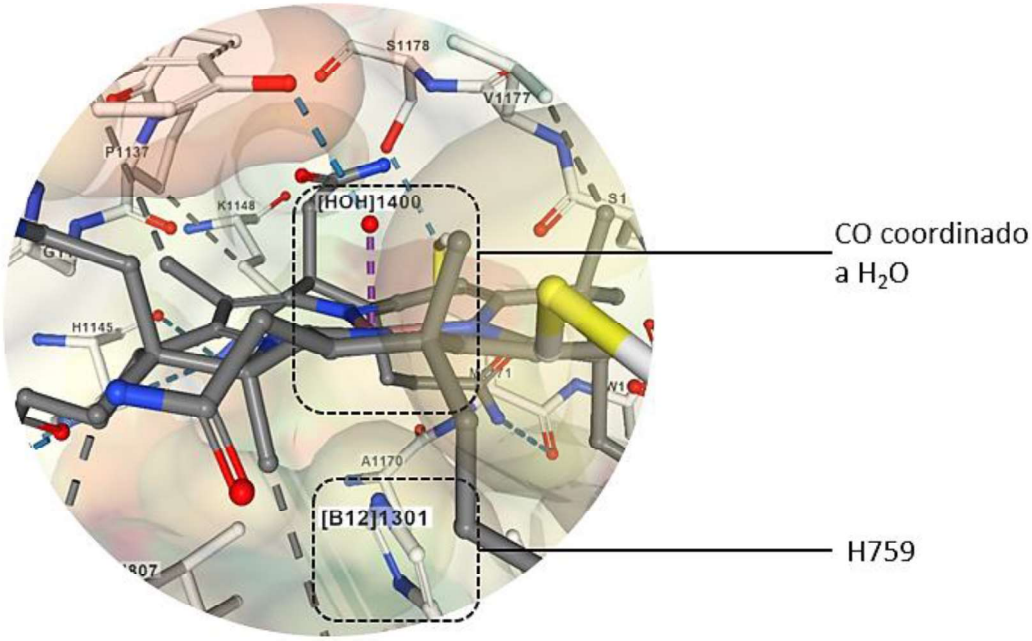


Figura 21. MeCbl con H2O como ligando en MetH

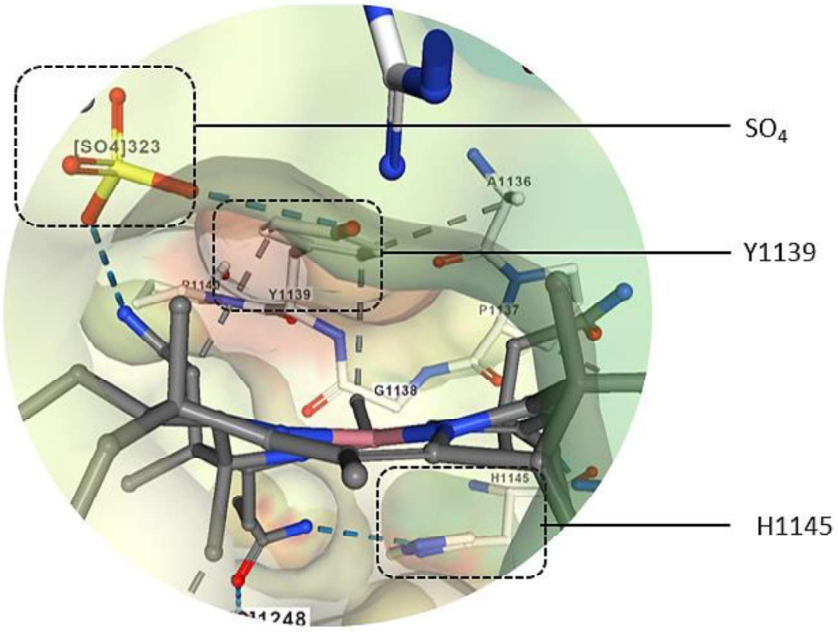


Figura 22. MeCbl con SO4 como ligando en MetH

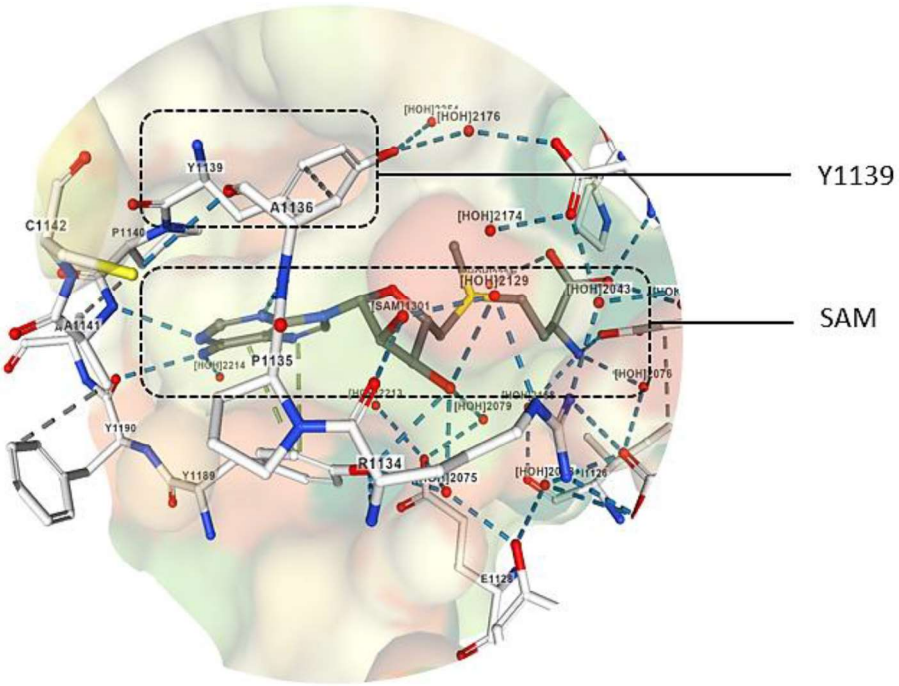


Figura 23. MeCbl con SAM como ligando en MetH

Anexo 3. Coordenadas pre-optimizadas para modelo con Co(III)

Tabla 3. Coordenadas pre-optimizadas para modelo con Co(III)

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms) X	Y	Z
1	27	0	1.343076	0.350862	0.514924
2	7	0	1.835260	1.669606	-0.723813
3	7	0	2.965870	-0.586503	0.160286
4	7	0	0.696292	-0.852819	1.850703
5	7	0	-0.153003	1.454710	0.752996
6	6	0	0.777878	2.618923	-1.126350
7	6	0	1.562416	3.832337	-1.669189
8	6	0	2.900697	3.207267	-2.142917
9	6	0	3.002494	1.943413	-1.297316
10	6	0	4.120502	1.090270	-1.198301
11	6	0	4.020035	-0.159414	-0.565114
12	6	0	5.016519	-1.299816	-0.732811
13	6	0	4.276120	-2.452445	-0.124766
14	6	0	3.124189	-1.973228	0.478060
15	6	0	2.293930	-2.667279	1.389159
16	6	0	1.358357	-2.050419	2.171396
17	6	0	0.758636	-2.604870	3.457233
18	6	0	-0.621145	-1.916861	3.518359
19	6	0	-0.458016	-0.736208	2.570874
20	6	0	-1.386649	0.295618	2.451352
21	6	0	-1.213227	1.365996	1.538427
22	6	0	-2.124649	2.586673	1.376352
23	6	0	-1.552683	3.229142	0.078033
24	6	0	-0.079383	2.793972	0.129902
25	6	0	2.301925	1.336113	1.948081
26	1	0	2.759609	0.597137	2.627166
27	1	0	3.097706	1.961894	1.510226
28	1	0	1.612232	1.976101	2.527064
29	7	0	0.528129	-0.825971	-0.906080
30	7	0	0.184437	-1.884812	-2.976983
31	1	0	0.563265	-2.695495	-3.480445
32	6	0	-0.883706	-1.124313	-1.078922
33	1	0	-1.357148	-1.359276	-0.109203
34	1	0	-1.426401	-0.247463	-1.507376
35	6	0	1.211266	-1.301367	-2.087752
36	1	0	2.011349	-2.042614	-1.815013
37	1	0	1.739485	-0.466327	-2.601898
38	6	0	-0.926854	-2.288407	-2.088239
39	1	0	-0.702455	-3.227529	-1.526425
40	6	0	-2.227534	-2.491534	-2.884938
41	1	0	-2.086591	-3.374030	-3.538333
42	1	0	-2.349513	-1.626509	-3.564613
43	6	0	-3.500912	-2.674180	-2.021317
44	1	0	-3.227326	-3.123672	-1.045363
45	1	0	-4.184681	-3.399409	-2.502332
46	6	0	-4.257655	-1.352292	-1.793123
47	1	0	-3.540543	-0.579510	-1.469380
48	1	0	-4.653355	-0.999004	-2.766879

49	6	0	-5.417967	-1.439767	-0.785960
50	1	0	-6.143227	-2.192030	-1.153172
51	1	0	-5.042926	-1.833730	0.180823
52	6	0	-6.157614	-0.101108	-0.542037
53	1	0	-6.211888	0.461388	-1.495980
54	1	0	-7.206474	-0.315996	-0.262587
55	6	0	-5.568306	0.810736	0.556836
56	1	0	-5.633408	0.284650	1.530895
57	1	0	-6.218197	1.703705	0.652778
58	6	0	-4.114832	1.269218	0.343072
59	1	0	-3.443435	0.392090	0.376618
60	1	0	-4.013076	1.702990	-0.670742
61	6	0	-3.639310	2.282546	1.398612
62	1	0	-3.899648	1.901405	2.405872
63	1	0	-4.195586	3.233824	1.288492
64	1	0	2.867705	2.940176	-3.217015
65	1	0	3.768776	3.874222	-2.004897
66	1	0	1.751895	4.546155	-0.846684
67	1	0	1.028332	4.370148	-2.469069
68	1	0	0.160348	2.145191	-1.920014
69	1	0	0.483559	3.458366	0.823134
70	1	0	5.031610	1.335833	-1.749235
71	1	0	5.962771	-1.086451	-0.191042
72	1	0	5.302249	-1.446612	-1.792459
73	1	0	4.893138	-2.929493	0.607774
74	1	0	0.716873	-3.703900	3.440612
75	1	0	1.385870	-2.308435	4.320076
76	1	0	-0.921106	-1.588944	4.528082
77	1	0	-1.418884	-2.587273	3.145128
78	1	0	-1.911246	3.272781	2.224357
79	1	0	-2.039391	2.793444	-0.813864
80	1	0	-1.687846	4.322905	0.047886
81	1	0	-2.271630	0.278225	3.092639
82	1	0	2.403958	-3.728538	1.469916
83	1	0	4.016172	-3.155439	-0.888393

Rotational constants (GHZ): 0.1416507 0.0845213 0.0783114

SCF Done: E(RB-VP86) = -2919.85936590 A.U. after 67 cycles