



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Estudio computacional de modificaciones epigenéticas en cadenas de ADN/ARN

Computational study of epigenetic modifications in chains of DNA/ RNA

Autor:

Lucía Peña Machín

Director:

Jorge Echeverría López

Universidad de Zaragoza/ Facultad de Ciencias
Grado en Química
Departamento de Química Inorgánica
Curso 2023/24

Índice

Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción	4
1.1. Química Computacional	4
1.2. Bases ADN/ARN metiladas	4
2. Antecedentes	6
3. Objetivos y planteamientos del trabajo	6
4. Metodología computacional	7
4.1. Optimización geométrica	9
4.2. Natural Bond Orbital	10
4.3. Energy Decomposition Analysis	10
5. Resultados y conclusiones	12
5.1. N6-Metiladenina	12
5.2. Aductos dobles	13
5.2.1. Adenina- Timina	13
5.2.2. N6-Metiladenina- Timina	17
A) Rotámero <i>anti</i> con interacciones tipo Hoogsteen	19
B) Rotámero <i>anti</i> con interacciones tipo Watson Crick	20
C) Rotámero <i>syn</i> con interacciones tipo Hoogsteen	21
D) Rotámero <i>syn</i> con interacciones tipo Watson Crick	22
6. Conclusiones finales	24
7. Bibliografía	26
Anexos	28

Resumen

Las modificaciones epigenéticas son aquellas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos, sino que se dan por modificaciones químicas de estos, tales como la metilación del ADN y la modificación de histonas. Una de las más importantes es la adenina metilada en el nitrógeno de la posición 6, abreviada como m6A.

El aumento del interés por el estudio de la m6A se ve influido por su importancia médica, ya que se ha demostrado su relación con enfermedades como el cáncer, entre otras, afectando a diversos mecanismos del metabolismo del ARN. Además, esta mutación ha brindado más posibilidades para el diagnóstico y tratamiento temprano de cánceres.

El estudio computacional de esta base nitrogenada modificada permite conocer su conformero rotacional más estable y facilita el estudio de su interacción con la base nitrogenada complementaria en el ADN, la timina. La m6A presenta dos posibles interacciones en función de cuál de sus extremos se aproxime la timina, la tipo Watson-Crick y la Hoogsteen. Se puede comparar la estabilidad de estas interacciones entre sí y, también, con las que se dan cuando la adenina no está metilada.

A este estudio se van a aportar los datos obtenidos de la optimización geométrica, análisis NBO y EDA de las moléculas y aductos objeto de estudio. El objetivo es determinar la forma de interacción más estable en cada caso y la naturaleza de sus interacciones, tanto en fase gas como en fase acuosa, el medio celular.

Abstract

Epigenetic modifications do not involve alterations in the nucleotide sequence, but rather occur through chemical modifications of these, such as DNA methylation and histone modification. One of the most important is methylated adenine (m6A).

The increasing interest in the study of m6A is influenced by its medical importance due to its relationship with diseases such as cancer, among others, affecting various mechanisms of RNA metabolism. In addition, this mutation has provided more possibilities for the early diagnosis and treatment of several cancers.

The computational study of this modified base allows us to unveil its most stable rotational conformer and facilitates the study of its interaction with its complementary DNA base, i.e. thymine. m6A presents two possible interactions depending on which of its sides thymine approaches, the Watson Crick type and the Hoogsteen type. The stability of these interactions can be compared with those that occur with non-methylated adenine.

Data obtained from geometric optimization, NBO and EDA analyses of molecules and adducts under study will be carried out in this study. The objective is to determine the most stable form of interaction and the nature of these in each case, both in the gas phase and in the water, i.e. the cellular medium.

1. Introducción

1.1. Química computacional

En el año 1925 el físico austríaco Erwin Schrödinger desarrolló su famosa ecuación capaz de explicar el espectro de los sistemas hidrogenoides, dando origen a la teoría cuántica. Esto dio lugar a la formulación de métodos cuánticos útiles para la aproximación a la solución de dicha ecuación con el objetivo de poder aplicarla a sistemas no monoeléctricos y debido a la complejidad de los cálculos fue necesario el desarrollo de métodos computacionales.

Mientras que la química teórica permite postular modelos que describan los sistemas químicos, la química computacional, mediante desarrollo de algoritmos matemáticos, pretende aportar las técnicas operacionales necesarias para resolver los modelos teóricos y para probar su validez mediante la comparación simultánea con los datos experimentales.¹

Comparando estos métodos con los experimentales, la química computacional permite realizar predicciones con un bajo porcentaje de error, aunque los resultados experimentales siguen siendo necesarios para verificar lo que realmente sucede. Sin embargo, la rama computacional permite entender más en profundidad los procesos químicos desde un punto de vista molecular, facilitando el entendimiento de algunos sucesos químicos.

La química computacional tiene numerosos y variados campos de aplicación. Entre otros, investigación de propiedades de sólidos y polímeros para el desarrollo de nuevos materiales, desarrollo de fármacos mediante estudio de su interacción con las biomoléculas y cálculo de geometrías moleculares o mecanismos de reacción.

Para el desarrollo de estos métodos computacionales existen una amplia variedad de algoritmos, basados en distintos modelos según su campo de aplicación. Para el estudio de moléculas pequeñas se emplean modelos mecanocuánticos, para sistemas un poco más grandes, como es el caso que nos ocupa, aproximaciones tipo la teoría del funcional de densidad y, para sistemas mayores, modelos basados en la mecánica clásica.²

1.2. Bases ADN/ARN metiladas

Según el modelo de la doble hélice postulado por los científicos Francis Crick y James Watson en 1953, la estructura básica del ADN es helicoidal, consta de dos cadenas que se entrecruzan.

El interior de la hélice está ocupado por las bases nitrogenadas, mientras los grupos fosfato ocupan la cara exterior. Las cadenas no son idénticas, sino complementarias, de manera que, si una cadena contiene una base púrica, la otra contiene una pirimidínica. Este apareamiento de las purinas con las pirimidinas es muy exacto y obedece a su capacidad de formar enlaces de hidrógeno.

Las bases nitrogenadas son compuestos orgánicos de forma heterocíclica, ricos en nitrógeno, que gracias a su fuerte carácter aromático son prácticamente insolubles en agua.^{3,4}

Las bases púricas son la adenina (A) y la guanina (G); las pirimidínicas, la citosina (C), timina (T) y uracilo (U).

En el ADN, la adenina se empareja con timina mediante dos enlaces de hidrógeno y la guanina con citosina mediante tres. En el ARN, la timina queda sustituida por el uracilo.

Sin embargo, Karst Hoogsteen descubrió un patrón de enlace de hidrógeno alternativo para el apareamiento de las bases. En él, la base púrica se invierte 180° e interactúa con la pirimidínica (figura 1). Mediante estudios RMN, se ha revelado que los pares de bases Hoogsteen se encuentran en el ADN con una abundancia del 0.3 al 0.5%.⁵

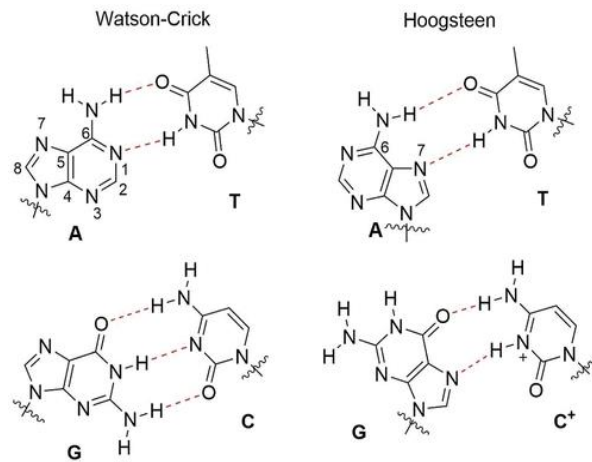


Figura 1: interacciones Watson Crick frente a Hoogsteen⁵

La metilación de los ácidos nucleicos es un posible mecanismo posterior a la replicación o a la transcripción que produce cambios epigenéticos, puede modificar las propiedades físicas del ADN y cambiar algunos parámetros estructurales de la doble hélice sin cambiar la secuencia de bases. Esta metilación se ha observado mayoritariamente en dos de las bases nitrogenadas, adenina y citosina.

La metilación de la adenina en la posición N6 es uno de los marcadores epigenéticos más importantes y comunes, en el genoma humano un 0.051% de adeninas totales están metiladas.⁵ A la adenina metilada en esta posición se le denomina m6A (figura 2). La molécula puede tener dos conformaciones en función de la posición del grupo metilamino, la *anti* y la *syn*. Esta modificación es un proceso dinámico y reversible regulado por metilasas, proteínas de reconocimiento y unión y desmetilasas.⁶

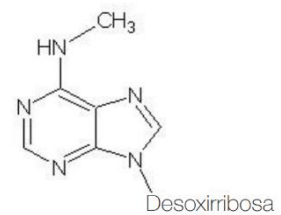


Figura 2:
N6-metiladenina (m6a) *syn*

2. Antecedentes

La modificación m6A fue descrita por primera vez en los años 70, inicialmente en el ARNm de plantas y seguidamente en virus. Sin embargo, debido a la falta de métodos de detección eficientes, el estudio de esta modificación quedó apartado hasta el año 2012, cuando el interés renació gracias al avance de las tecnologías de secuenciación. Desde entonces, su papel participativo en la regulación y procesamiento del RNA se ha convertido en un foco de investigación, especialmente desde que se supo que su acción puede ser revertida.

Esta alteración no se localiza aleatoriamente en el material genético, sino que la modificación se encuentra mucho más frecuentemente, en el mRNA, cerca del codón de parada y en la región 3´URT no traducida, siendo también frecuente, aunque en menor medida, en el codón de inicio.

En bacterias, la m6A fue señalada inicialmente como componente de sus mecanismos de defensa contra fagos y plásmidos. El ADN propio contiene adeninas metiladas mientras que el externo no, por lo que es cortado por las enzimas. La m6A también se asocia a la reparación, replicación, transposición y expresión del ADN bacteriano.

En cuanto a su afección a los humanos, estudios recientes han vinculado la m6A al desarrollo de enfermedades humanas como el cáncer, donde, dependiendo del tipo celular y clase de tumor, esta modificación puede promover o suprimir la tumorigénesis. También se ha relacionado con otras enfermedades como la aterosclerosis, la obesidad o desórdenes neurológicos como la depresión o las adicciones. Se ha demostrado además que las modificaciones dinámicas m6A del ARNm están estrechamente relacionadas con la diferenciación y reprogramación de las células madre.

Se piensa que, en plantas, esta modificación está ligada al silenciamiento y la pérdida de estabilidad del ARNm, regulando procesos como el desarrollo embrionario, el desarrollo de tricomas o las transiciones entre las fases del crecimiento celular, entre otros.

Sin embargo, a pesar de sus múltiples funciones y su presencia en los ácidos nucleicos de humanos y otros organismos, el mecanismo molecular de su función todavía no está claro.^{5,7,8}

En cuanto al emparejamiento de adenina metilada en la posición N6 con la timina, ofrece dos sitios de enlace de hidrógeno (un donante y un aceptor) tanto para la conformación *anti* como para la *syn*. Estos pueden interactuar con la timina según el modelo de Watson Crick o el de Hoogsteen. Asimismo, las energías libres calculadas a partir de datos experimentales para el emparejamiento Hoogsteen entre m6A y timina indican que este es preferido frente al de Watson-Crick.⁹

3. Objetivos y planteamientos del trabajo

El objetivo de este trabajo es estudiar, por medios computacionales, la estabilidad relativa del aducto que forma la timina con la adenina (A-T) y con la m6A (m6A-T), así como las interacciones intermoleculares que poseen.

Para ello se va a analizar la superficie de energía potencial de los confórmeros rotacionales de la molécula m6A, la de los aductos que forman al interactuar con la timina, tanto en fase acuosa como en fase gas, en la que no interactúan con ningún disolvente, y la de los aductos formados con la adenina sin metilar. Así mismo, se va a estudiar la naturaleza y energía de las interacciones que se dan en dichos aductos mediante un análisis de los orbitales moleculares y una descomposición de la energía de interacción.

De esta forma, los aductos objeto de estudio son Adenina- Timina con interacción tipo Hoogsteen, Adenina- Timina tipo Watson Crick, m6A *anti*- Timina tipo Hoogsteen, m6A *anti*- Timina tipo Watson Crick, m6A *syn*- Timina tipo Hoogsteen y m6A *syn*-Timina tipo Watson Crick.

En paralelo a los objetivos mencionados se desarrollan importantes objetivos formativos asociados a la Química Teórica y Computacional. Concretamente, conocimientos relacionados con el manejo del software de cálculo computacional mecano-cuántico Gaussian.

4. Metodología computacional

Los métodos empleados están basados en leyes de la Mecánica Cuántica, la teoría que mejor describe los fenómenos que ocurren a escala molecular y atómica.

Los cálculos teóricos necesarios para determinar las propiedades de las moléculas estudiadas, tales como la energía molecular, la optimización de coordenadas o la cuantificación de la energía de sus interacciones, se realizan empleando Gaussian, un software ampliamente utilizado en el campo de la química teórica.¹⁰

En general, para poder resolver la estructura electrónica de un sistema mecano cuántico hay que recurrir a la ecuación de Schrödinger. Esta ecuación nos permite calcular los estados estacionarios del sistema, así como las energías permitidas de los mismos, siendo el objetivo principal encontrar el estado fundamental.

Para un sistema de núcleos (α, β) y electrones (i, j), en el que las masas son puntuales, sin las interacciones spin – órbita, las funciones de onda y las energías se calculan a partir de la correspondiente ecuación de Schrödinger, la mostrada en la ecuación 1.

$$\hat{H}\psi(q_i, q_\alpha) = E\psi(q_i, q_\alpha) \quad (1)$$

En la ecuación 1, las variables $q_{\alpha, \beta}$ corresponden las coordenadas de los núcleos; $q_{i, j}$, a las de los electrones; ψ es la función de onda; E es la energía total del sistema y \hat{H} corresponde al operador Hamiltoniano, que toma la expresión mostrada en la ecuación 2.

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_{\alpha} \frac{1}{M_{\alpha}} \nabla_{\alpha}^2 - \frac{\hbar^2}{2m} \sum_i \nabla_i^2 + \sum_{\alpha} \sum_{\beta > \alpha} \frac{Z_{\alpha} Z_{\beta} e^2}{r_{\alpha\beta}} - \sum_{\alpha} \sum_i \frac{Z_{\alpha} e^2}{r_{\alpha i}} + \sum_i \sum_{j > i} \frac{e^2}{r_{ij}} \quad (2)$$

El primer término de la ecuación 2 corresponde a la energía cinética de los núcleos y el segundo, a la de los electrones. Los tres últimos corresponden a la energía potencial entre parejas de núcleos, núcleos con electrones y parejas de electrones, en ese orden.

La complejidad de esta ecuación hace que solo pueda resolverse analíticamente para sistemas muy sencillos, que no involucren más de un electrón. Para sistemas mayores, es necesario el uso de aproximaciones precisas que simplifiquen el problema.

Asimismo, la aproximación de Born- Oppenheimer tiene en cuenta que, debido a la gran diferencia de masa entre los electrones y los núcleos, los electrones son mucho más rápidos en sus movimientos que los núcleos. Por tanto, se puede asumir que los núcleos están fijos mientras que los electrones realizan su movimiento. Esto implica que la variación en la configuración nuclear sea despreciable durante el tiempo de un ciclo de movimiento electrónico.

Sin embargo, esta aproximación no resuelve la interacción electrón-electrón. Para abordar este problema se emplea el método de Hartree- Fock, que puede utilizarse tanto para el tratamiento de átomos polielectrónicos como de moléculas.

Este método considera que cada electrón se mueve en el campo promedio generado por el movimiento del resto de electrones. Por contra, no es una aproximación precisa, ya que no tiene en cuenta la interacción instantánea electrón- electrón. Si bien sirve como punto de partida para otros métodos como la Teoría del Funcional de la Densidad Electrónica.

Siguiendo con esta tendencia, la teoría del funcional de la densidad electrónica (DFT) se desarrolló como método variacional alternativo a la ecuación de Schrödinger, debido a sus limitaciones en la obtención de la función de onda y valores de energía asociados de especies poliatómicas.^{11,12,13}

En 1964 Hohenberg y Kohn demostraron que la energía es un funcional de la densidad para cualquier sistema y, además, la densidad correspondiente al estado fundamental del sistema minimiza este funcional de la densidad. En 1998, Walter Kohn fue galardonado con el premio Nobel en Química por su aporte al desarrollo de esta teoría, que actualmente es la más exitosa para el estudio computacional de estructuras electrónicas.¹⁴

En la ecuación de Schrödinger la magnitud básica es la función de onda, mientras que en la DFT es la densidad electrónica. Desde un punto de vista numérico, la función de onda tiene gran complejidad, ya que por cada N partículas que formen parte del sistema, la función tiene 3N variables, su energía potencial, cinética y de interacción. Sin embargo, la densidad electrónica es siempre función de 3 variables(x, y, z), independientemente del número de partículas que compongan el sistema, por lo que trabajar con esta supone una simplicidad matemática.^{15,16}

La DFT considera la densidad electrónica del sistema como portadora de toda la información, pudiéndose determinar las propiedades cuánticas de grandes moléculas con menor complejidad en cuanto a cálculos y, por tanto, menor coste computacional. Así, al aplicar la DFT a los sistemas moleculares, se obtienen las zonas y puntos de las moléculas con mayor probabilidad de reacción.¹³

Gaussian resuelve la ecuación de Schrödinger molecular basándose en la densidad electrónica, siendo la energía un funcional de ésta. A partir de unos parámetros iniciales como el tipo de método cuántico, funciones base, coordenadas iniciales de la molécula,

carga y multiplicidad calcula la función de onda molecular y obtiene las propiedades moleculares.¹⁰

El funcional empleado en los cálculos computacionales cuyos resultados están expuestos en este TFG es wB97xD; un funcional híbrido que incluye una combinación de la teoría de Hartree-Fock y la DFT y que también incorpora correcciones de dispersión, resultando especialmente eficaz para sistemas con interacciones no covalentes. Por tanto, es un funcional adecuado para este trabajo, permitiendo un tratamiento más preciso de las moléculas estudiadas.

Además, Gaussian ofrece una amplia variedad de bases predeterminadas, las cuales se diferencian según la cantidad y el tipo de funciones que incluyen. Las bases asignan un grupo de funciones base a cada átomo dentro de una molécula para estudiar sus orbitales. Normalmente estas funciones base son combinaciones lineales de funciones gaussianas.¹⁷ Las funciones base de cada átomo se combinan en combinaciones lineales para crear orbitales moleculares.

La mayoría de los métodos cuánticos necesitan que se especifique la función base a emplear, que en este caso es Def2TZVP, con la que se obtiene una buena precisión con un coste computacional relativamente.

Para presentar gráficamente estos resultados se emplea GaussView, una interfaz gráfica utilizada con Gaussian.

Con estas herramientas teóricas, se va a optimizar la geometría de las moléculas estudiadas y se va a realizar el estudio orbital de tipo Natural Bond Orbital (NBO). Además, se va a realizar el estudio de descomposición de la energía de interacción (EDA, por sus siglas en inglés) con Q-Chem5, otro software de química cuántica empleado en predicciones precisas de estructuras moleculares.

4.1. Optimización geométrica

La optimización geométrica trata de localizar un mínimo en la superficie de energía potencial propia del sistema que se estudia (figura 3), prediciendo así las estructuras de equilibrio de sistemas moleculares. Para ello, a partir de unas coordenadas iniciales aproximadas del sistema molecular, Gaussian calcula la energía y el gradiente correspondientes a dicha geometría de partida. Si este punto no cumple ciertos criterios de convergencia, procede a buscar una geometría de menor energía. Cada geometría es un punto en la curva de energía potencial y en función de los resultados de cada punto se determina el siguiente movimiento por dicha superficie.

Gaussian considera que una optimización es completa cuando esta ha convergido. Los

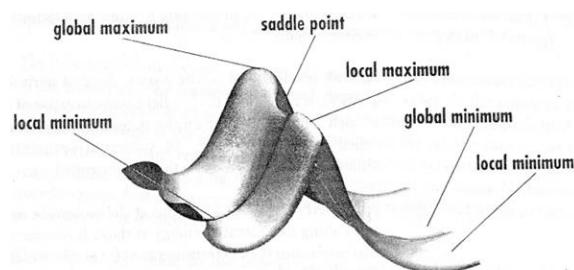


Figura 3: Superficie de energía potencial¹⁹

criterios de convergencia empleados por Gaussian son cuatro. La presencia de cuatro criterios distintos previene una identificación prematura del mínimo.^{18,19}

Un punto en la superficie de energía potencial donde las fuerzas son cero es llamado punto estacionario. Todas las optimizaciones exitosas localizan un punto estacionario, aunque no siempre corresponde al mínimo buscado, ya que tanto el punto de silla como los mínimos locales y global son puntos estacionarios. Es por ello que este procedimiento no encuentra el mínimo global, sino un mínimo local.

Para asegurar que la geometría que nos arroja el programa tras la optimización es un mínimo verdadero se realiza un análisis de frecuencias vibracionales. En él Gaussian calcula las constantes de fuerza y, a partir de ellas, las frecuencias de vibración de la geometría de partida aportada, que es la que se obtiene como resultado de la optimización, ya que esta transformación solo es válida en un punto estacionario.

Si todas las frecuencias son positivas, se trata de un mínimo en la curva de energía potencial. Si se trata de un punto de silla, una de las frecuencias vibratorias será negativa, por lo que esta geometría corresponderá a un estado de transición.

Las frecuencias vibratorias se determinan calculando las segundas derivadas de la energía respecto de las coordenadas cartesianas. Con este procedimiento, se comprueba si la geometría optimizada es realmente un mínimo.^{20,21}

4.2. Natural Bond Orbital (NBO)

Esta es una herramienta útil para el estudio de las interacciones entre orbitales responsables de la formación de enlaces no covalentes.

La interacción entre dos orbitales localizados que contengan un total de dos electrones estabiliza el sistema, tal y como se muestra en la figura 4. De esta forma cuanto mayor sea la interacción entre dos orbitales naturales localizados mayor será su solapamiento.

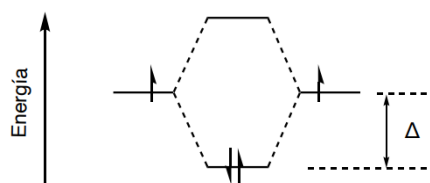


Figura 4: Diagrama de energía de la interacción entre orbitales.

El análisis NBO aporta información sobre el tipo de orbitales dadores y aceptores de densidad electrónica implicados en la interacción entre las bases nitrogenadas estudiadas y cuantifica la energía implicada en dicha interacción.²² Este estudio permite obtener estos datos sobre interacciones tanto inter- como intra-moleculares. El objetivo de este trabajo es cuantificar las inter- moleculares, entre la adenina y la timina, observando la influencia de la metilación de la adenina en estos resultados.

4.3. Energy Decomposition Analysis (EDA)

Para comprender completamente los enlaces formados entre las bases nitrogenadas se realiza un análisis de la descomposición de la energía de interacción. Este es un potente método que cierra la brecha entre la complejidad de la mecánica cuántica y una

interpretación conceptualmente más simple de la naturaleza del enlace químico, permitiendo así una predicción de sus propiedades.

La energía de la interacción intermolecular se subdivide por tanto en la Energía de Pauli, la electrostática, la de dispersión, la de transferencia de carga y la de polarización.

$$\Delta E_{\text{Int}} = \Delta E_{\text{Pauli}} + \Delta E_{\text{Elect}} + \Delta E_{\text{Disp}} + \Delta E_{\text{CT}} + \Delta E_{\text{Pot}}$$

Las tres primeras se pueden agrupar en lo que se denomina Energía Frozen, ya que se obtienen al congelar la función de onda.

El principio de exclusión de Pauli establece que dos fermiones, como lo son los electrones, no pueden existir en el mismo estado cuántico dentro del mismo sistema cuántico, por tanto, dos electrones de un átomo nunca tendrán los cuatro números cuánticos iguales (n , l , m , m_s). Esto es lo que viene significando el término de la Energía de Pauli, lo que conlleva que este sea siempre positivo, ya que son fuerzas de tipo repulsivo.

Por su parte, el término de energía electrostática hace referencia a la energía potencial que resulta de la fuerza de Coulomb, asociada a la distribución de las cargas en la molécula.

El término de dispersión está asociado con las fuerzas de London. La distribución de electrones alrededor de un átomo o molécula sufre fluctuaciones en el tiempo, las cuales crean campos eléctricos instantáneos que son sentidos por otros átomos y moléculas cercanos, que a su vez ajustan la distribución espacial de sus propios electrones. El efecto neto es que las fluctuaciones en las posiciones de los electrones en un átomo inducen una redistribución correspondiente de electrones en otros átomos, de modo que los movimientos de los electrones se correlacionan. Si bien la teoría detallada requiere una explicación mecánico-cuántica, el efecto se describe frecuentemente como la formación de dipolos instantáneos que se atraen entre sí, por lo que este término tendrá siempre contribución negativa.

El término de la energía de transferencia de carga se corresponde con la deslocalización electrónica de un orbital lleno de un fragmento en un orbital vacío del otro fragmento. Por tanto, la reorganización de los orbitales inter-fragmento implica una liberación de energía que estabiliza el sistema, por lo que esta contribución será de tipo atractiva, de signo negativo. Este término se puede asociar con el grado de covalencia de una interacción.

Por último, el término de polarización hace referencia a la reorganización de los orbitales dentro de cada fragmento (intra-fragmento) al formarse la interacción con respecto a los fragmentos aislados. Por ser interacciones atractivas, la contribución de esta energía también posee signo negativo.

5. Resultados y conclusiones.

Los estudios teóricos sobre las moléculas analizadas se han realizado por duplicado, por un lado, sin considerar una fase disolvente, fase gaseosa y por otro considerando la molécula en medio acuoso.

5.1. N6- Metiladenina

La m6A forma dos posibles isómeros rotacionales, el isómero *anti*-m6A y el *syn*-m6A. Las energías, dadas como ΔG° , de las geometrías optimizadas de estos isómeros están separadas por un máximo de energía, el estado de transición (TS). En el diagrama de la figura 5 se representan los saltos de energía entre conformaciones, calculadas a partir de las energías absolutas que Gaussian aporta como resultado al cálculo de las frecuencias vibracionales en base a las geometrías optimizadas.

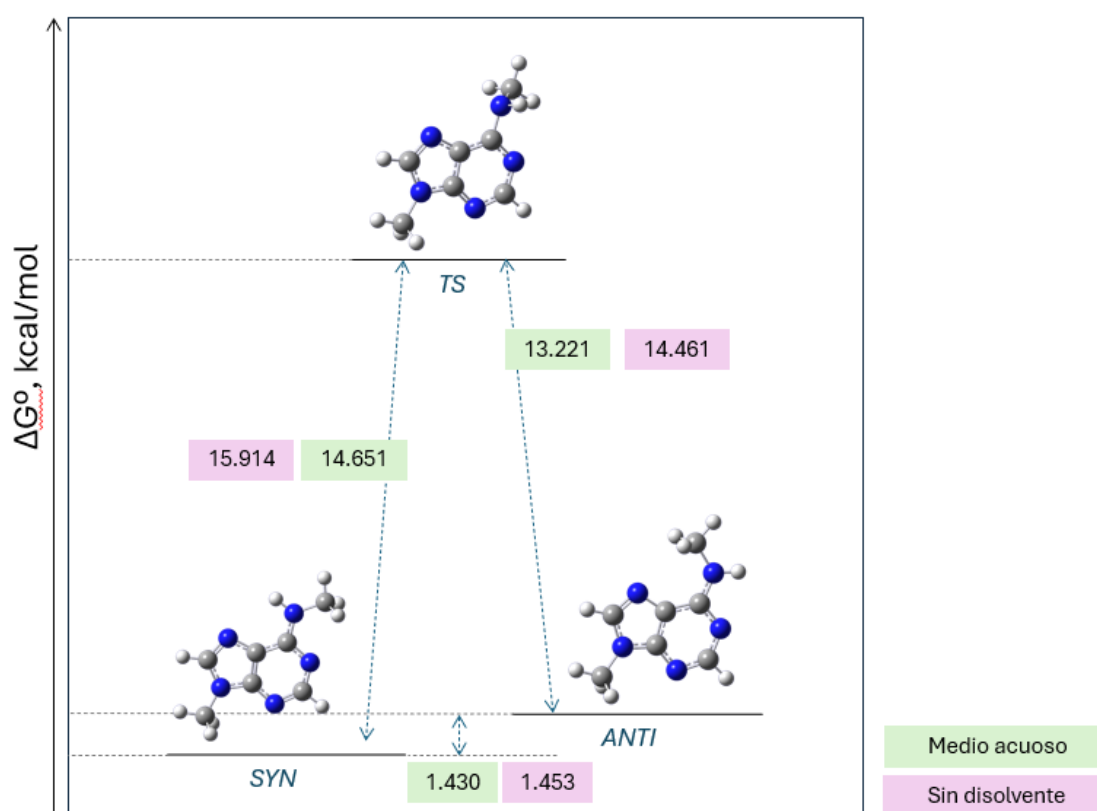


Figura 5: Perfil de energía potencial para interconversión *syn-anti* de la m6A.

A pesar de que ambos conformeros son estables, el *syn* lo es más que el *anti*. La diferencia entre ambos se ve influida por el disolvente, en medio acuoso, el incremento de energía expresada como ΔG° es de 1.43 kcal/mol, mientras que, si no se tiene en cuenta una fase disolvente, es 1.45 kcal/mol.

Como se puede observar, en medio acuoso ambos isómeros son más estables, tienen mayor ΔG° en valor absoluto. Las diferencias de energía por la influencia del disolvente son 114.14 kcal/mol para la conformación *syn*, 114.16 para la *anti* y 115.40 para el estado de transición. Es decir, aproximadamente la misma en todos los casos.

La presencia de un disolvente, en este caso agua, disminuye ligeramente las barreras de energía ya que las moléculas de agua pueden establecer interacciones con la adenina, modificando así su densidad electrónica y, por tanto, su estabilidad interna.

La barrera de energía (TS) que separa ambos isómeros es de 14.65 kcal/mol considerando el medio acuoso y 15.91 kcal/mol en fase gas.

5.2 Aductos dobles: comparación entre Adenina-Timina y m6a-Timina

La estructura tridimensional de los nucleótidos está determinada por los enlaces de hidrógeno formados entre bases nitrogenadas complementarias, que pueden darse según el patrón tipo Watson Crick o tipo Hoogsteen. De las interacciones intermoleculares se cuantifica su energía con el análisis NBO y mediante el estudio EDA se determina su naturaleza.

5.2.1 Adenina-Timina

En primera instancia, se realiza la optimización geométrica del aducto Adenina-Timina con ambos tipos de interacciones para obtener los mínimos de la superficie de energía potencial. De los resultados de dichas optimizaciones se pueden obtener las energías de los aductos expresadas como ΔG° . Los aductos, al igual que sucedía con la m6A, son más estables en medio acuoso que en fase gas. La diferencia por efecto del disolvente es de 12.82 kcal/mol para el que tiene interacciones tipo Watson Crick y 12.25 kcal/mol para el tipo Hoogsteen.

Ambos aductos A-T tienen prácticamente la misma ΔG° absoluta, siendo más estable la A-T con interacciones Hoogsteen. La diferencia entre ambas conformaciones es de 0.11 kcal/mol en medio acuoso y 0.68 kcal/mol en fase gas.

Al realizar el análisis NBO, Gaussian numera los átomos, de tal forma que para el aducto con interacciones Hoogsteen presenta la estructura mostrada en la figura 6.

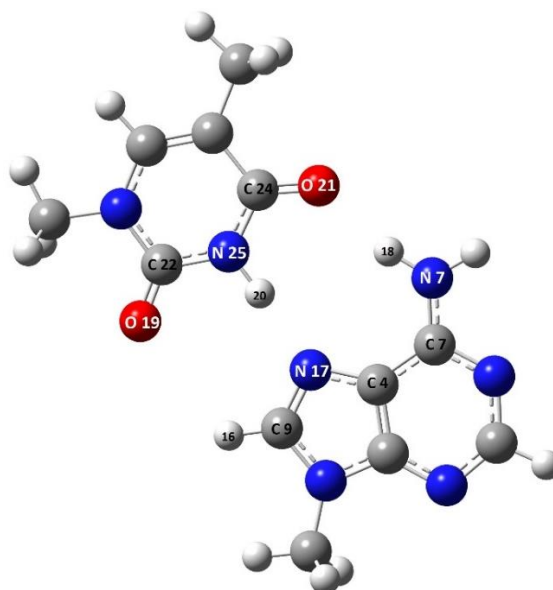


Figura 6: Geometría optimizada sobre la superficie de potencial del aducto A-T con interacciones tipo Hoogsteen.

Aunque la energía de la conformación en disolvente acuoso y en fase gas sea ligeramente distinta, la geometría del aducto, en cuanto a la posición relativa de las moléculas, es prácticamente la misma, indistinguible a simple vista aunque las distancias intermoleculares varíen ligeramente.

Por la proximidad entre carbonilo de la timina (O 21) y el grupo amino de la adenina, se puede esperar un enlace de hidrógeno entre ambos, al igual que entre el grupo N-H del anillo pirimidínico y el N 17 del anillo púrico. Las energías de estas dos interacciones principales, enlaces de hidrógeno, tanto en medio acuoso como en fase gas son las descritas en la tabla 1.

Dador → aceptor	A → T N(17) → H(20)-N(25)	T → A O(21) → H(18)-N(7)	T → A O(21) → H(18)-N(17)
Orbitales	LP _{N(sp²)} → σ* _{NH}	LP _{O(sp)} → σ* _{NH}	LP _{O(p)} → σ* _{NH}
Medio Acuoso	27.97	5.00	7.50
Sin disolvente	33.44	4.47	6.39

Tabla 1: Energías de perturbación de segundo orden asociadas a los procesos de transferencia de carga indicados para el aducto A-T con interacciones tipo Hoogsteen, dadas en kcal/ mol.

Además, el análisis NBO aporta información sobre la naturaleza de los orbitales aceptor y dador implicados en cada interacción. Todos ellos tienen carácter *s*, *sp* o *p*. En la mayoría de los ellos, la contribución de carácter *d* es menor al 0.2% y en todos menor al 1%. La contribución, en %, de cada átomo y tipo de orbital en fase gaseosa y fase acuosa es muy similar, la diferencia no es significativa, menor al 1% por lo general. Por eso, en esta explicación se van a aportar datos promedio, exponiéndolo de forma genérica para ambas fases. Así mismo, se van a exponer estos resultados únicamente sobre las interacciones de mayor energía.

Para el enlace de hidrógeno que se da entre el nitrógeno del anillo pirimidínico y el N-H del púrico, que en este caso corresponde a la interacción N(17) → H(20)-N(25), el carácter de los orbitales dadores y aceptores no varía considerablemente de unos aductos a otros, ni siquiera en aquellos en los que la adenina queda sustituida por la m6A. Por eso, se explica de forma común para todos ellos, con porcentajes promedio representativos.

Así, el orbital dador del nitrógeno de la adenina tiene un carácter *sp*², con un 30-35% de contribución *s* y un 65-70% *p*. Éste cede densidad electrónica desde su par de electrones libres (*lone pair*, LP) al orbital σ* formado entre el hidrógeno y el nitrógeno de la timina. Este orbital σ*_{NH} tiene una contribución del 75% del hidrógeno y el 25% del nitrógeno. El orbital del hidrógeno participante es 99.9% carácter *s* y el orbital del nitrógeno tiene hibridación *sp*², con un 32 % carácter *s* y 68% *p*.

Por su parte, para la interacción O(21) → H(18)-N(7) los orbitales implicados tienen las mismas características para ambos conformeros del aducto A-T.

Se encuentran dos tipos de orbitales dadores del oxígeno de la timina que ceden densidad electrónica al mismo orbital aceptor σ*_{NH} de la adenina. A este orbital aceptor contribuye un 73% el hidrógeno y un 27% el nitrógeno. El orbital participante del hidrógeno tienen un 99.9% de carácter *s*. El del nitrógeno, es un orbital *sp*² con 33% carácter *s* y 66% *p*.

El orbital dador del oxígeno, en la interacción con mayor energía de estabilización es un LP tipo p, orbital con 99.9% carácter p, y en la interacción de menor energía es un LP tipo sp con 60% carácter s y 40 % tipo p.

Además de estas interacciones, hay otras de menor energía. Aquellas en las que la energía de estabilización de la interacción sea mayor de 0.30 kcal/mol se muestran en la tabla 2.

Dador → aceptor	A → T C(9)-N(17) → H(20)-N(25)	T → A N(25)-H(20) → N(17)-C(4)
Orbitales implicados	$\sigma_{CN} \rightarrow \sigma_{NH}^*$	$\sigma_{NH} \rightarrow \sigma_{NC}^*$
Medio Acuoso	0.39	0.45
Sin disolvente	0.55	0.54

Tabla 2: Energías de perturbación de segundo orden asociadas a los procesos de transferencia de carga indicados para el aducto A-T con interacciones tipo Hoogsteen, dadas en kcal/ mol.

De las interacciones con energías menores, también se puede obtener información acerca del carácter de los orbitales implicados. (Ver anexos)

Al realizar un análisis paralelo del aducto A-T en su conformación Watson-Crick, la geometría optimizada es la representada en la figura 7.

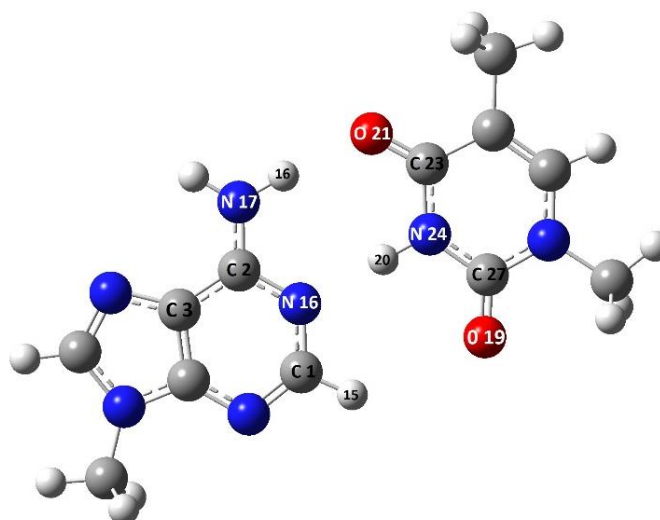


Figura 7: Geometría optimizada sobre la superficie de potencial del aducto A-T con interacciones tipo Watson Crick.

Siguiendo el mismo procedimiento que para la conformación Hoogsteen, las dos interacciones principales en el aducto tipo Watson Crick obtenidas mediante análisis NBO son las representadas en la tabla 3.

Dador → aceptor	A → T N(16) → H(20)-N(24)	T → A O(21) → H(16)-N(17)	T → A O(21) → H(16)-N(17)
Orbitales	$LP_N(sp) \rightarrow \sigma_{NH}^*$	$LP_O(sp) \rightarrow \sigma_{NH}^*$	$LP_O(p) \rightarrow \sigma_{NH}^*$
Medio Acuoso	27.78	4.31	8.68
Sin disolvente	32.46	4.87	8.43

Tabla 3: Energías de perturbación de segundo orden asociadas a los procesos de transferencia de carga indicados para el aducto A-T con interacciones tipo Watson Crick, dadas en kcal/ mol.

Además de estas interacciones, hay otras de menor energía. Considerando de nuevo aquellas en las que la energía de interacción sea mayor de 0.30 kcal/mol, encontramos las tabuladas en las tablas 4 y 5, en fase acuosa y fase gas, respectivamente.

Dador → Aceptor	A → T C(1)-N(16) → H(20)-N(24)
Orbitales implicados	$\sigma_{CN} \rightarrow \sigma_{NH}^*$
Energía	0.30

Tabla 4: Energías de perturbación de segundo orden asociadas a los procesos de transferencia de carga indicados para el aducto A-T en fase acuosa con interacciones tipo Watson Crick, dadas en kcal/ mol.

Dador → Aceptor	A → T C(1)-N(16) → H(20)-N(24)	A → T C(2) -C(3) → H(20)-N(24)	T → A H(20)-N(24) → C(2)-N(16)
Orbitales	$\sigma_{CN} \rightarrow \sigma_{NH}^*$	$\sigma_{CC} \rightarrow \sigma_{NH}^*$	$\sigma_{NH} \rightarrow \sigma_{CN}^*$
Energía	0.40	0.31	0.31

Tabla 5: Energías de perturbación de segundo orden asociadas a los procesos de transferencia de carga indicados para el aducto A-T en fase gas con interacciones tipo Watson Crick, dadas en kcal/ mol.

Este tipo de interacciones de baja energía contribuyen a la estabilización de los aductos por procesos de transferencia de carga entre los orbitales de ambas moléculas, aunque minimamente.

También, cabe destacar que el otro carbonilo de la timina (O 19) tiene interacciones menores a 0.30kcal/mol para ambas conformaciones con y sin disolvente, sirviendo este dato de referencia en la comparación del aducto que forma la timina con la m6A.

Partiendo de estos resultados, puede realizarse una comparación de las energías de interacción de las interacciones principales entre ambas conformaciones, la Hoogsteen y la Watson Crick, tanto en medio acuoso como en fase gas, que quedan representadas en las tablas 6 y 7, respectivamente.

Dador → aceptor	A → T N → H-N	T → A O → H-N	T → A O → H-N
Orbitales	$LP_N(sp) \rightarrow \sigma_{NH}^*$	$LP_O(sp) \rightarrow \sigma_{NH}^*$	$LP_O(p) \rightarrow \sigma_{NH}^*$
Watson Crick	27.78	4.81	8.68
Hoogsteen	27.97	5.00	7.50

Tabla 6: Comparación de las energías de perturbación de segundo orden para el aducto A-T en las conformaciones con interacciones tipo Hoogsteen y Watson Crick, en medio acuoso, dadas en kcal/mol.

Dador → aceptor	A → T N → H-N	T → A O → H-N	T → A O → H-N
Orbitales	$LP_N(sp) \rightarrow \sigma_{NH}^*$	$LP_O(sp) \rightarrow \sigma_{NH}^*$	$LP_O(p) \rightarrow \sigma_{NH}^*$
Watson Crick	32.46	4.87	8.43
Hoogsteen	33.44	4.47	6.39

Tabla 7: Comparación de las energías de perturbación de segundo orden para el aducto A-T en las conformaciones con interacciones tipo Hoogsteen y Watson Crick, en medio gaseoso, dadas en kcal/mol.

Se observa que las diferencias de energía se producen más acusadamente al cambiar la fase en la que se encuentra el aducto que al cambiar su tipo de interacciones.

Para finalizar el estudio de este aducto, se realiza un análisis EDA, en el que los resultados obtenidos para ambos tipos de conformaciones y en ambas fases son los tabulados en la tabla 8.

Aducto A-T	Frozen			Polarización	CT	TOTAL
	Electrostática	Pauli	Dispersión			
Hoogsteen fase gas	-44.28	47.17	-5.77	-5.32	-8.81	-17.73
Watson Crick fase gas	-44.49	48.01	-5.91	-5.55	-9.09	-17.04
Hoogsteen fase acuosa	-42.09	42.89	-5.55	-4.87	-7.94	-17.57
Watson Crick fase acuosa	-42.06	44.16	-5.69	-5.06	-8.22	-16.88

Tabla 8: Energías correspondientes a los resultados del análisis EDA del el aducto A-T para sus conformaciones Hoogsteen y Watson Crick en fase gas y fase acuosa, dadas en kcal/ mol.

El término de transferencia de carga (CT) de este análisis puede relacionarse con la energía de interacción estudiada en el análisis NBO y, al igual que sucedía en este análisis, en el EDA las diferencias de energía entre conformaciones son mínimas.

5.2.2 N6-Metiladenina - Timina

La adenina metilada tiene los conformeros rotacionales *anti* y *syn* y el aducto tiene interacciones Watson Crick y Hoogsteen. Por tanto, resultan cuatro posibles geometrías de este aducto: m6a-T *anti* con interacciones tipo Hoogsteen o con interacciones tipo Watson Crick y lo mismo para el *syn*. Se han optimizado estas posibles conformaciones considerando y sin considerar fase acuosa solvente. De este estudio, como en los casos anteriores, se han obtenido los mínimos de la curva de energía potencial de cada conformación, de los que se puede concluir que, una vez más, los aductos son más estables en fase acuosa que en fase gaseosa. Las diferencias de ΔG° entre fases en kcal/mol son de 13.19 para el aducto m6A-T con la m6A en disposición *anti* e interacciones tipo Hoogsteen, 12.23 para el *anti* tipo Watson Crick, 11.79 para el *syn* tipo Hoogsteen y 14.54 para el *syn* tipo Watson Crick.

Además, se observa que para conformación *anti* el aducto es más estable cuando tiene interacciones según el modelo de Watson Crick, con una ΔG° 3.08 kcal/mol menor respecto a las interacciones tipo Hoogsteen en fase acuosa y 4.18 en fase gas. Sin embargo, cuando la m6a tiene conformación *syn*, las interacciones tipo Hoogsteen con la timina hacen al aducto más estable que las interacciones tipo Watson Crick. En este caso, la diferencia es de 3.44 kcal/mol en fase acuosa y 6.19 kcal/mol en fase gas.

Coincide que para los modelos de interacción menos estables de cada conformero rotacional existen diferencias significativas en sus geometrías optimizadas en fase gas respecto a la acuosa, mientras que para los conformeros con interacciones más estables la geometría optimizada es similar en ambas fases.

Es decir, para la geometría *anti* con interacciones tipo Hoogsteen (figura 8) y para la geometría *syn* con interacciones tipo Watson Crick (figura 9), la geometría optimizada en fase gas se diferencia significativamente de la resultante en fase acuosa.

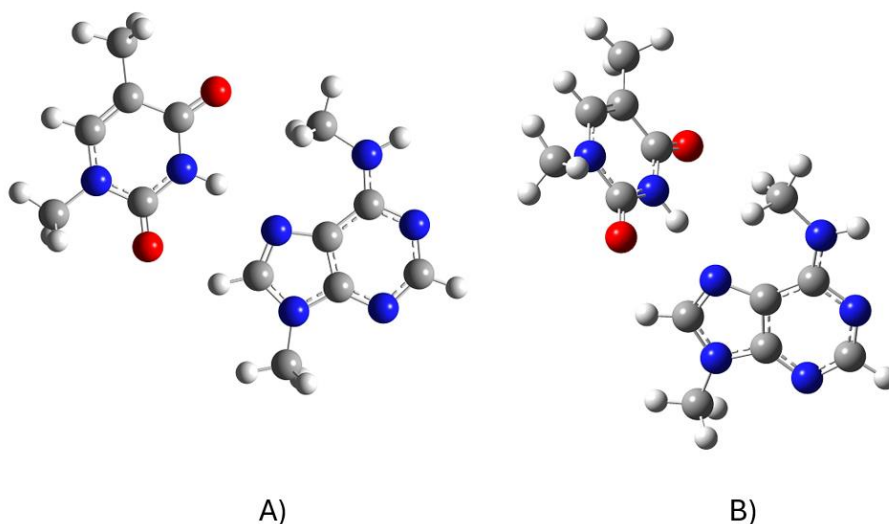


Figura 8: Geometrías optimizadas sobre la superficie de energía potencial del aducto m6A-T con la adenina en conformación *anti* e interacciones tipo Hoogsteen. A) en fase gas, B) en fase acuosa.

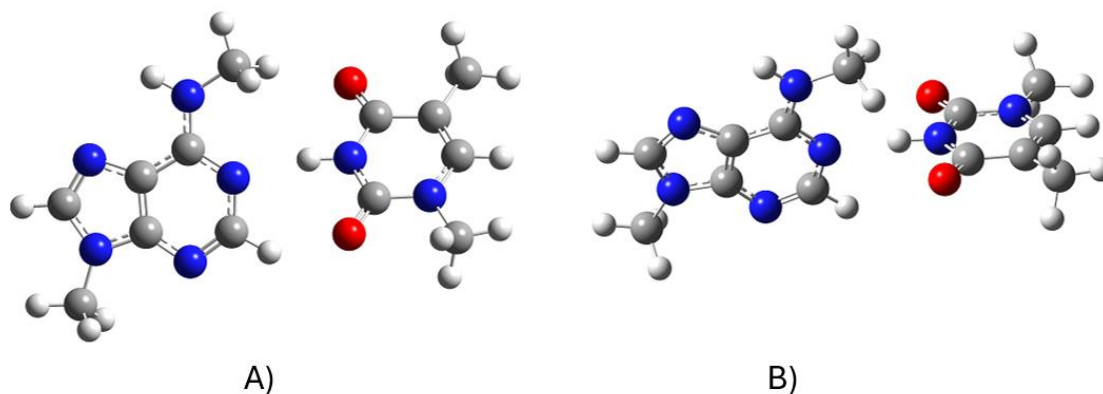


Figura 9: Geometrías optimizadas sobre la superficie de energía potencial del aducto m6A-T con la adenina en conformación *syn* e interacciones tipo Watson Crick. A) en fase gas, B) en fase acuosa.

En la figura 8 se observa que para el aducto *anti* con interacciones tipo Hoogsteen en fase gas la m6A está en el mismo plano que la timina, mientras que en fase acuosa la m6A y la timina se posicionan casi perpendicularmente, con una rotación relativa de 82.37° .

Sin embargo, en la figura 9 puede verse que para el aducto m6A-T *syn* con interacciones Watson Crick, tanto en fase gas como acuosa las moléculas no están en el mismo plano, siendo en fase acuosa la rotación mucho más acusada que en fase gas. En fase gas, el anillo de la timina está rotado 66.8° respecto del de la m6A, mientras en fase acuosa lo está 73.9° .

En el caso del aducto anti con interacciones tipo Watson Crick y el *syn* con interacciones tipo Hoogsteen, los de las interacciones de mayor estabilidad para cada rotámero, en ambas fases las moléculas se sitúan geoméricamente en el mismo plano y son visualmente indiferenciables.

Para las cuatro geometrías optimizadas de la m6A-T se realiza el estudio NBO.

A) Rotámero *anti* con interacciones tipo Hoogsteen

En el caso del rotámero *anti* de la m6A con interacciones tipo Hoogsteen, la geometría resultante es la indicada en la figura 10. Las numeraciones que Gaussian asigna a los átomos en cada aducto son independientes del hecho de que las moléculas se sitúen en el mismo o distinto plano, por lo que para esta explicación se va a adjuntar el aducto en fase gas, en el que ambas moléculas se sitúan en el mismo plano, facilitando visualizar el estudio.

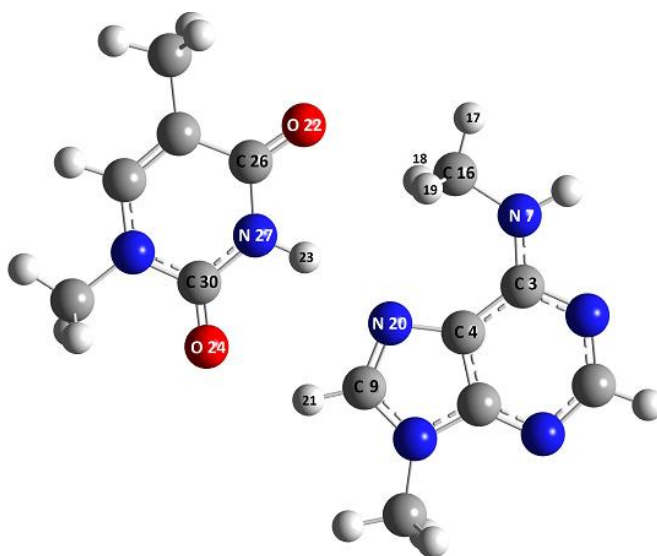


Figura 10: Geometría optimizada sobre la superficie de potencial del aducto m6A-T *anti* con interacciones tipo Hoogsteen.

En este caso, la única interacción que se forma con energía de estabilización suficiente como para considerarla puente de hidrógeno es la que se da entre el N 20 de la m6A y el H(23)-N(27) de la timina.

En este aducto el grupo aceptor de la m6A de la interacción dada con el carbonilo del O 22 de la timina depende del medio, no se dan las mismas interacciones en fase acuosa que en fase gaseosa. Puede deberse a la rotación de las moléculas. El tipo de orbitales dadores del carbonilo implicados en esta interacción también dependen de la fase.

Además, en fase gaseosa se produce una interacción con el O 24 del otro carbonilo de la timina. Esto puede explicarse ya que al estar rotada la m6A respecto a la timina, el O 24 queda más próximo al H(21)-C(9) de lo habitual. Esta interacción tiene dos orbitales dadores para un mismo orbital aceptor σ^*_{CH} , como en las otras interacciones de carbonilos vistas. Esta interacción no se da en fase acuosa.

Por tanto, la única interacción que tiene el aducto en común en ambas fases es el puente de hidrógeno en el que la adenina cede densidad electrónica a la timina y en el que los átomos implicados son N(20) → H(23)-N(27) y los orbitales $LP_N(sp^2) \rightarrow \sigma^*_{NH}$. En medio acuoso la energía de esta interacción vale 22.02 kcal/mol y en fase gas 12.38 kcal/mol.

Respecto a la interacción del carbonilo de la timina formado por el O 22, en fase acuosa el grupo aceptor es H(18)-C(16) y en fase gaseosa es N(7)-C(16). Es decir, en fase acuosa el grupo carbonilo de la timina interacciona con uno de los hidrógenos del metilo introducido en la mutación epigenética que se estudia, mientras que en fase gaseosa interacciona con el orbital formado entre el carbono del metilo y el nitrógeno metilado. Los orbitales aceptores implicados por tanto en estas interacciones son σ^*_{CH} en fase acuosa y σ^*_{NH} en fase gaseosa.

En fase acuosa el carbonilo de la timina interacciona con el orbital p del O (22), 99.7% carácter p, y con el orbital π_{CO} . La energía de estabilización al interaccionar con el primero, el orbital p, es de 0.32 kcal/mol. Al interaccionar con el segundo, el orbital π_{CO} , es de 0.24 kcal/mol. Estas energías de estabilización son muy débiles como para considerar la formación de un enlace de hidrógeno y se debe a que, al estar en distinto plano, las moléculas no se aproximan de la forma óptima, desfavoreciendo esta interacción.

En el orbital aceptor σ^*_{CH} de la adenina en estas interacciones, el carbono contribuye en un 39% en la formación del orbital y el hidrógeno en el otro 61%. El orbital del carbono tiene hibridación tipo sp^3 , 26% tipo s y 74% tipo p, y el del hidrógeno es un orbital con 99.9% carácter s.

En fase gaseosa, esta interacción del carbonilo, que ahora es O (22) → N(7)-C(16) tiene también energías de estabilización bajas. Cuando el orbital dador es $LP_O(p)$, de 99.7% carácter p, la energía de estabilización es de 0.47 kcal/mol y cuando el orbital dador del oxígeno es de tipo sp, con 59% carácter s y 40% carácter p, la interacción tiene una energía de 0.60 kcal/mol.

El orbital aceptor de estas interacciones es de tipo σ^*_{NH} y tiene características muy similares al aceptor de la timina en la formación del puente de hidrógeno con el N 20.

Por último, respecto a la interacción O (24) → H(21)-C(9) que se produce en fase gaseosa, las energías de estabilización son 2.13 kcal/mol cuando el orbital dador del oxígeno es $LP_O(p)$ y 1.91 kcal/mol cuando es $LP_O(sp)$. El orbital aceptor es de tipo σ^*_{CH} . Las características de los orbitales son las mismas que para los anteriores.

B) Rotámero *anti* con interacciones tipo Watson Crick

Siguiendo el mismo procedimiento para la conformación tipo Watson Crick resultan la geometría optimizada de la figura 11 y las interacciones de la tabla 9. Para este conformero las interacciones son similares en ambas fases, ya que el grupo metilo objeto de estudio está orientado hacia la cara contraria de la de interacción con la timina. Tiene las mismas interacciones minoritarias que la A-T, que no involucran a dicho grupo metilo.

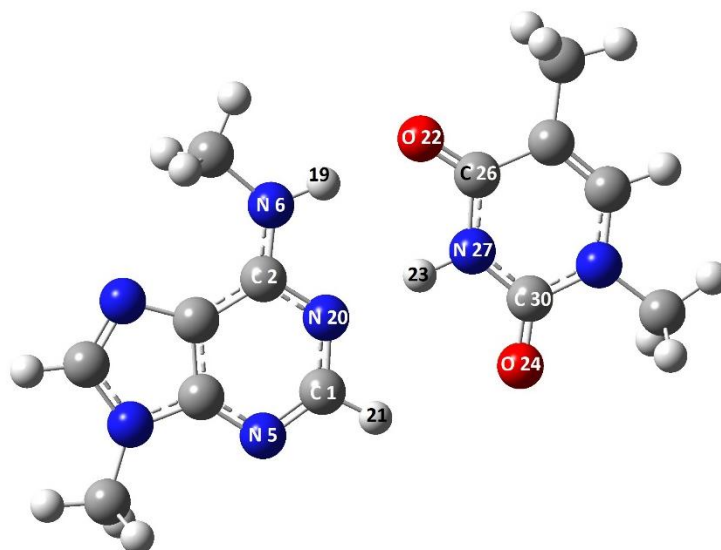


Figura 11: Geometría optimizada sobre la superficie de potencial del aducto m6A-T *anti* con interacciones tipo Watson Crick.

Dador→ aceptor	A→T N(20) → H(23)-N(27)	T→A O(22) → H(19)-N(6)	T→A O(22) → H(19)-N(6)
Orbitales	LP _N (sp ²) → σ* _{NH}	LP _O (sp) → σ* _{NH}	LP _O (p) → σ* _{NH}
Medio Acuoso	28.18	4.35	8.97
Sin disolvente	32.64	4.44	8.90

Tabla 9: Energías de perturbación de segundo orden asociadas a los procesos de transferencia de carga indicados para el aducto m6A-T *anti* con interacciones tipo Watson Crick, dadas en kcal/ mol.

En la interacción N(20) → H(23)-N(27) el nitrógeno de la adenina cede densidad electrónica desde el par libre de electrones disponibles en su orbital sp².

Para la interacción O(22) → H(19)-N(6), los orbitales implicados tiene las mismas características que en el aducto A-T.

Además, ahora en ambas fases hay interacción con el O (24), el otro carbonilo de la timina. En este caso la interacción se da desde su orbital p, 99.7% carácter p, hasta el orbital σ*_{CH} del enlace H(21)-C(1) de la m6A. La interacción es de 0.33 kcal/mol en fase acuosa y 0.34 kcal/mol en fase gas, por lo que esta interacción es débil.

C) Rotámero *syn* con interacciones tipo Hoogsteen.

Debe recordarse que la conformación Hoogsteen es la más estable del rotámero *syn*. Tanto en fase acuosa como en gaseosa las moléculas que forman el aducto se encuentran en el mismo plano y sus geometrías son visualmente iguales, correspondiendo a la de la figura 12.

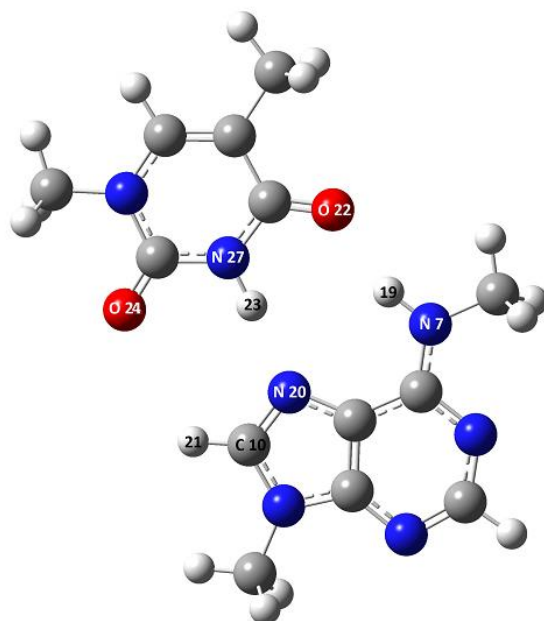


Figura 12: Geometría optimizada sobre la superficie de potencial del aducto m6A-T *syn* con interacciones tipo Hoogsteen.

Al estudiar sus interacciones intermoleculares se encuentran de nuevo dos cuya energía de estabilización es muy superior a las demás, los puentes de hidrógenos tabulados en la tabla 10.

Dador → aceptor	A → T N(20) → H(23)-N(27)	T → A O(22) → H(19)-N(6)	T → A O(22) → H(19)-N(6)
Orbitales	$LP_N (sp^2) \rightarrow \sigma^*_{NH}$	$LP_O (sp) \rightarrow \sigma^*_{NH}$	$LP_O (p) \rightarrow \sigma^*_{NH}$
Medio Acuoso	28.12	4.50	7.54
Sin disolvente	33.59	4.01	6.48

Tabla 10: Energías de perturbación de segundo orden asociadas a los procesos de transferencia de carga indicados para el aducto m6A-T *syn* con interacciones tipo Hoogsteen, dadas en kcal/ mol.

Este aducto tiene otras interacciones minoritas muy similares a las del aducto A-T, pero ninguna involucra el metilo que se está estudiando, ya que este está orientado hacia la cara opuesta de interacción con la timina.

Además, en ambas fases el carbonilo del O 24 tiene interacción, pero depreciable en este estudio, ya que es menor de 0.25 kcal/mol en ambos casos.

D) Rotámero *syn* con interacciones tipo Watson Crick.

Para este rotámero las interacciones según el modelo de Watson Crick no son tan estables como las de Hoogsteen y tanto en fase acuosa como en gaseosa las moléculas se encuentran giradas.

Para el estudio se va a adjuntar la molécula en fase gas (figura 13), en la que la rotación de las moléculas entre si es menor, facilitando visualizar sus interacciones.

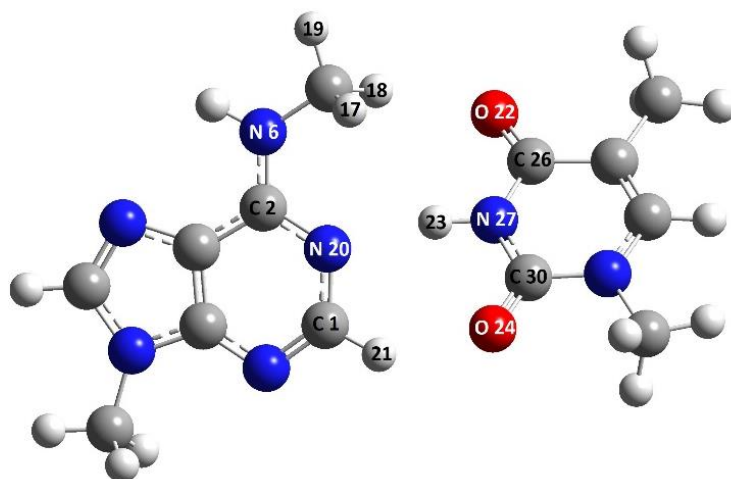


Figura 13: Geometría optimizada sobre la superficie de potencial del aducto m6A-T *syn* con interacciones tipo Watson Crick.

En este caso el metilo que se estudia sí está orientado hacia la cara de interacciones con la timina, por lo que sí va a influir en las interacciones intermoleculares. Para ambas fases la interacción de mayor energía es N(20) \rightarrow H(23)-N(27).

Esta interacción tiene una energía de 22.79 kcal/mol en fase acuosa y 18.82 kcal/mol sin disolvente. El nitrógeno cede densidad electrónica desde su par de electrones libres del orbital sp^2 al orbital aceptor es de tipo σ^*_{NH} , con características normales.

Respecto a la interacción del O 22, se ve debilitada por la rotación mutua de las moléculas en ambas fases. En fase acuosa solamente se produce desde el orbital p del oxígeno, con una energía de interacción de 0.29 kcal/mol; mientras que en fase gas se produce tanto desde el orbital p, cuya energía es 1.66 kcal/mol, como desde el orbital sp , con 60% carácter s y 40% carácter p, con una energía de 0.85 kcal/mol.

El O 24 de la timina no tienen interacción con la m6A en fase acuosa. En fase gaseosa sí, aunque débil, debido a que el ángulo rotación de las moléculas permite la aproximación de los grupos funcionales que interaccionan. La interacción dada es O(24) \rightarrow H(21)-C(1) y su energía de estabilización, 0.51 kcal/mol. El orbital dador del oxígeno, 99.7% p, cede la densidad electrónica de su par de electrones libres hasta el orbital aceptor σ^*_{CH} .

Una vez vistos los resultados del estudio NBO puede estudiarse la naturaleza de estas interacciones mediante el estudio EDA, del que se obtienen los resultados mostrados en la tabla 11.

	m6A-T	Frozen			Polarización	CT	TOTAL
		Electrotática	Pauli	Dispersión			
Fase gas	<i>anti</i> Hoogsteen	-28.98	29.41	-6.00	-2.78	-3.97	-12.32
	<i>anti</i> Watson Crick	-45.21	49.09	-6.26	-5.62	-9.2	-17.25
	<i>syn</i> Hoogsteen	-44.61	46.96	-6.12	-5.39	-8.85	-18.01
	<i>syn</i> Watson Crick	-28.70	32.06	-6.37	-2.97	-5.0	-11.03
Fase acuosa	<i>anti</i> Hoogsteen	-23.75	27.25	-5.99	-2.60	-4.7	-9.81
	<i>anti</i> Watson Crick	-42.80	45.30	-6.0	-5.14	-8.40	-17.09
	<i>syn</i> Hoogsteen	-42.48	43.49	-5.92	-4.9	-7.99	-17.86
	<i>syn</i> Watson Crick	-24.03	27.89	-6.10	-2.7	-4.94	-9.95

Tabla 11: Energías correspondientes a los resultados del análisis EDA del el aducto m6A-T para sus conformaciones en fase gas y fase acuosa, dadas en kcal/ mol.

El término de transferencia de carga (CT), el de la energía electrostática y el de la energía de polarización de los aductos *anti* con configuración Hoogsteen y *syn* con configuración Watson Crick son notablemente menor al resto en valor absoluto, lo cual concuerda con el hecho de que, tal y como se ha explicado hasta ahora, son los modelos de interacción menos estables de esos rotámeros.

El término de la energía de Pauli es mayor en estas conformaciones y, teniendo en cuenta que este término toma signo positivo, también encaja con el hecho de que dichos aductos sean menos estables.

Por tanto, la suma de todos los términos hace que interacciones más energéticas correspondan con los aductos más estables.

6. Conclusiones finales

Gracias a un estudio computacional, se ha podido establecer que el rotámetro *anti* de la m6A-T es ligeramente menos estable que el *syn*. Sin embargo, este rotámetro *anti* es capaz de formar un complejo con la timina, aunque para ello debe superar la barrera energética de rotación del grupo metilamino.

En estos complejos m6A-T se ha visto que, generalmente, hay dos interacciones cuyas energías prevalecen sobre el resto, los dos enlaces de hidrógeno. Tanto en los aductos A-T como en los m6A-T, la interacción más fuerte de estas dos es en la que el nitrógeno de la adenina cede densidad electrónica al N-H de la adenina.

De hecho, cuando el metilo que se está estudiando está orientado hacia la cara por la que la m6A interactúa con la timina, el aducto se desestabiliza, siendo esta interacción

N→N-H la única que se mantiene con la energía suficiente como para formar un enlace de hidrógeno. Esto sucede en la m6A-T *syn* con interacciones Watson Crick y en la *anti* con interacciones Hoogsteen. Cuando se da esta situación, el enlace de hidrógeno que se encontraba en la A-T con el carbonilo, en la m6A-T pasa a ser una interacción débil, pudiendo aparecer también una interacción débil del otro carbonilo. Por tanto, la metilación de la adenina desestabiliza el aducto.

Además, se ha caracterizado, por primera vez, una interacción de tipo sigma-hole entre el metilo de la posición 6 de la adenina y un carbonilo de la timina actuando como dador de densidad electrónica.

7. Bibliografía:

- (1) Ayesha Sagrario, R. G.; Naturalis. *Boletín de la coordinación de física y química*. [Online]. **2018** no.29, artículo 1 (Química computacional). http://www.dcb.unam.mx/Publicaciones/Naturalis/bfyq_29.pdf (accedido el 01/04/2024)
- (2) Cuesta, H. S.; Meneses, O. L. La química computacional como herramienta para entender procesos químicos y bioquímicos a nivel molecular. *InfoANALÍTICA*. [Online]. **2020**, DOI 10.26807. <https://doi.org/10.26807/ia.vi.175> (accedido el 01/04/2024)
- (3) Illana, J.C. Biología molecular y estructura del ADN. *An.R. Soc. Esp. Quím.* **2014**, 110, no 3.
- (4) Gelambi, M. Bases nitrogenadas: qué son, clasificación, funciones. <https://www.lifeder.com/bases-nitrogenadas/> (accedido el 01/04/2024).
- (5) Osifová, Z.; Socha, O.; Mužíková Čechová, L.; Šála, M.; Janeba, Z.; Dračínský, M. Hydrogen-Bonding Interactions of Methylated Adenine Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* [Online]. **2021**. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202100721> (accedido el 03/04/2024)
- (6) Deng, L. J.; Deng, W. Q.; Fan, S. R.; Chen, M. F.; Qi, M.; Lyu, W-Y; Qi Q.; Tiwari, A. K.; Chen, J. X.; Zhang, A-M.; Shen, Z-S. m6A modification: recent advances, anticancer targeted drug discovery and beyond. *Mol. Cancer Res.* [Online]. **2022**. 21, no 52 <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01510-2> (accedido el 03/04/2024)
- (7) Rubio Costa, D. P. Identificación y análisis filogenético de los dominios ALKB de las replicasas de virus de plantas. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, **2021**.
- (8) Murillo, O.A.R.; Rodríguez-Aguilera, J. R. La n6-metiladenina: una potencial marca de regulación epigenética en eucariontes. *REB.* [Online]. **2016**. 35, no 1. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2016/reb161c.pdf> (accedido el 03/04/2024).
- (9) Liu B.; Shi H.; Rangadurai A.; Nussbaumer F.; Chia-Chieh Chu; Andreas Erharter K; Case D.A.; Kreutz C.; Al-Hashimi H.M. A quantitative model predicts how m6A reshapes the kinetic landscape of nucleic acid hybridization and conformational transitions. *Nat. Commun.* **2021**. DOI: 10.1038/s41467-021-25253-8
- (10) Gaussian. *Quimica.es.* <https://www.quimica.es/enciclopedia/GAUSSIAN.html> (accedido el 06/05/2024)
- (11) Woolley, R. G.; Sutcliffe, B. T. Molecular structure and the born—Oppenheimer approximation, *Chem. Phys. Lett.* [Online]. **1997**. 45, páginas 393-398, ISSN 0009-261. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(77\)80298-4](https://doi.org/10.1016/0009-2614(77)80298-4) (accedido el 06/05/2024)
- (12) Jiménez, J. C. S.; López Chávez, E.; García Quiroz, A.; Díaz López, R.; Díaz Góngora, J. A. I.; Vastillo Alvarado, F. L. Uso de la mecánica cuántica para caracterizar estructuras moleculares de fármacos anticancerígenos. *RNAFM.* [Online]. **2022**. <https://www.esfm.ipn.mx/assets/files/esfm/docs/RNAFM/articulos-2022/XXVIIRNAFM049.pdf> (accedido el 10/05/2024)
- (13) Villa Ortega, V. Pseudopotenciales transferibles para elementos de transición en la teoría del funcional de la densidad. Universidad de Valladolid.

- <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/25659/TFG-G2390.pdf?sequence=1> (accedido el 10/05/2024)
- (14) Teoría funcional de la densidad. *Quimica.es*
https://www.quimica.es/enciclopedia/Teor%C3%ADa_del_funcional_de_la_densidad.html (accedido el 10/05/2024)
- (15) Métodos de cálculo. <https://agalano.com/wp-content/uploads/2021/01/P2n-metodos.pdf> (accedido el 11/05/2024)
- (16) Density Funcional (DFT) Methods. *Expanding the limits of computational chemistry*.
<https://gaussian.com/dft/> (accedido el 11/05/2024)
- (17) Campos de Fuerza y Optimización de la Geometría de Sistemas con Muchos Átomos. Colecciones digitales ADLAP.
http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lfa/blanca_r_a/capitulo3.pdf
(accedido el 15/05/2024)
- (18) Optimización geométrica. Universidad de Buenos Aires. **2013**.
http://users.df.uba.ar/gpagola/e3pc2006/practicacomputacional1_v2.pdf
(accedido el 15/05/2024)
- (19) Freq. *Expanding the limits of computational chemistry* <https://gaussian.com/freq/>
(accedido el 15/05/2024)
- (20) Bernhard Schlegel, H. Optimization of equilibrium geometries and transition structure. *WOL*. [Online]. **1982**. <https://doi.org/10.1002/jcc.540030212> (accedido el 15/05/2024)
- (21) Frecuencias vibracionales. I Escuela Internacional de Catálisis. Universidad Autónoma Metropolitana. *famaLab*. [Online].
https://molphys.org/Curso_colombia/adf/Calculo_de_frecuencias.html (accedido el 16/05/2024)
- (22) Sproviero, E. M. Estudio de efectos conformacionales y estructurales en moléculas: desarrollo de métodos basados en interacciones orbitales para analizar sus mecanismos electrónicos. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. [Online]. **2003**.
https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3591_Sproviero.pdf
(accedido el 16/05/2024)

Anexos:

Se adjuntan las coordenadas optimizadas resultantes de los análisis de frecuencias vibracionales de cada sistema y el carácter de los orbitales participantes en las interacciones estudiadas mediante análisis NBO.

m6A syn en fase gas:

C	3.486484	0.279567	0.0029
H	3.652113	0.853246	0.914564
N	2.158099	-0.284994	-0.002458
C	1.80286	-1.606828	-0.001273
H	2.554287	-2.383025	-0.0023
N	0.516535	-1.809528	-0.000487
C	-0.014426	-0.539774	0.00012
C	-1.335773	-0.056511	0.000608
N	-2.391487	-0.886102	0.001482
H	-2.192249	-1.869476	0.000078
N	-1.529831	1.263751	0.000327
C	-0.461882	2.069132	-0.000543
H	-0.684572	3.131332	-0.000791
N	0.819242	1.742809	-0.001021
C	0.983833	0.417708	-0.0008
H	4.213106	-0.528917	-0.051478
H	3.616793	0.940376	-0.85336
C	-3.758709	-0.424579	0.000447
H	-3.97108	0.178619	-0.884136
H	-4.416187	-1.291872	0.004658
H	-3.969348	0.185833	0.880388

m6A syn en fase acuosa:

Symbol	X	Y	Z
C	3.49537	0.274738	0.000159
H	3.647732	0.883585	0.890081
N	2.159312	-0.28089	-0.001389
C	1.808639	-1.599441	-0.006036
H	2.562722	-2.372471	-0.009174
N	0.518523	-1.803807	-0.006291
C	-0.015161	-0.534626	-0.001431
C	-1.339915	-0.055066	0.000841
N	-2.393709	-0.880099	-0.001617
H	-2.203142	-1.865903	-0.005499
N	-1.531192	1.27074	0.005636
C	-0.462782	2.075278	0.008183

H	-0.684712	3.138044	0.011845
N	0.818179	1.748423	0.006423
C	0.986507	0.419981	0.001575
H	4.212415	-0.542248	-0.002865
H	3.647243	0.889756	-0.885593
C	-3.766051	-0.428448	0.000183
H	-3.984561	0.175576	-0.882173
H	-4.413384	-1.301844	-0.002684
H	-3.984226	0.16949	0.886752

m6A anti en fase gas:

Symbol	X	Y	Z
C	-3.371127	-0.298688	-0.008581
H	-3.645819	0.263473	-0.90067
N	-1.951587	-0.558275	0.002282
C	-1.313472	-1.769448	0.013753
H	-1.875083	-2.692407	0.015888
N	-0.017137	-1.685184	0.021017
C	0.231504	-0.325346	0.014102
C	1.402226	0.456874	0.017264
N	2.65355	-0.031823	0.036629
H	3.372798	0.668227	-0.003478
N	1.271697	1.791255	0.00479
C	0.054313	2.326936	-0.005721
H	0.023079	3.411786	-0.014675
N	-1.117406	1.708562	-0.007721
C	-0.964135	0.385973	0.002026
H	-3.902553	-1.248506	-0.002316
H	-3.655851	0.280741	0.869171
C	3.011598	-1.430702	-0.01237
H	2.550356	-1.984742	0.804867
H	4.093619	-1.508276	0.076301
H	2.699484	-1.897544	-0.948927

m6A anti en fase acuosa:

Symbol	X	Y	Z
C	-3.379872	-0.300969	-0.00021
H	-3.661238	0.261729	-0.889133
N	-1.955426	-0.553665	0.000109
C	-1.324326	-1.763999	-0.000096
H	-1.889862	-2.684049	-0.000089

N	-0.024013	-1.682513	0.000053
C	0.22937	-0.323291	-0.000033
C	1.405674	0.453992	-0.000104
N	2.652298	-0.034087	-0.000006
H	3.382334	0.656886	-0.000213
N	1.273935	1.793548	-0.000097
C	0.056829	2.33055	-0.000025
H	0.027072	3.415906	-0.000102
N	-1.115399	1.714136	0.000011
C	-0.967499	0.38663	0.000027
H	-3.903653	-1.253568	0.002105
H	-3.660755	0.265726	0.886306
C	3.01693	-1.433477	0.000015
H	2.634806	-1.945633	0.883768
H	4.102189	-1.497965	0.00054
H	2.635661	-1.945502	-0.884192

m6A TS en fase gas:

Symbol	X	Y	Z
C	3.556598	0.413427	0.060293
H	3.616223	1.12591	0.882542
N	2.284368	-0.268645	0.079233
C	2.043308	-1.61329	0.202615
H	2.863693	-2.310308	0.302454
N	0.788461	-1.943392	0.18728
C	0.129477	-0.739862	0.043198
C	-1.209883	-0.375335	-0.045504
N	-2.240801	-1.34364	0.00255
H	-2.789277	-1.190498	0.839181
N	-1.512554	0.912353	-0.187219
C	-0.533572	1.816687	-0.237946
H	-0.843179	2.850055	-0.350363
N	0.772744	1.597577	-0.16448
C	1.05352	0.312284	-0.025146
H	4.35116	-0.322973	0.163695
H	3.683544	0.951331	-0.878755
C	-3.112439	-1.32533	-1.169789
H	-2.529655	-1.604905	-2.048679
H	-3.891016	-2.075542	-1.034374
H	-3.577681	-0.351185	-1.354623

m6A TS en fase acuosa:

Symbol	X	Y	Z
C	3.564045	0.410207	0.061562
H	3.624582	1.11794	0.886776
N	2.283745	-0.265843	0.080035
C	2.046836	-1.60523	0.204403
H	2.867685	-2.300353	0.305509
N	0.786503	-1.936436	0.188319
C	0.128174	-0.732821	0.042287
C	-1.210024	-0.372677	-0.04741
N	-2.237335	-1.347324	0.00216
H	-2.788733	-1.193282	0.838011
N	-1.516561	0.915182	-0.190485
C	-0.537761	1.820906	-0.241186
H	-0.847639	2.854076	-0.354375
N	0.768533	1.601409	-0.166705
C	1.055971	0.3162	-0.025894
H	4.351947	-0.331259	0.16546
H	3.691741	0.942202	-0.879781
C	-3.114865	-1.331878	-1.16979
H	-2.532492	-1.589531	-2.055431
H	-3.883386	-2.092159	-1.037069
H	-3.59793	-0.364609	-1.34023

A-T, interacciones Hoogsteen, fase gas:

Symbol	X	Y	Z
C	-4.703207	-1.267336	0.000099
N	-3.705784	-2.15149	-0.000018
C	-2.441408	-1.709372	-0.000004
C	-2.238332	-0.316398	0.000099
C	-3.373652	0.47461	0.000211
N	-4.638658	0.056496	0.000198
N	-1.441446	-2.596005	-0.000087
N	-2.920051	1.769538	0.000364
C	-1.559701	1.697281	0.000294
C	-3.744692	2.954895	0.000201
H	-4.381358	2.969669	0.884092
H	-3.100074	3.83148	0.002636
H	-5.700748	-1.694976	0.000037
H	-1.684549	-3.56946	0.000025
H	-4.377931	2.972076	-0.886127
H	-0.929378	2.574988	0.000412

N	-1.110579	0.47306	0.000138
H	-0.463358	-2.325011	0.000257
O	1.822729	2.370052	0.002172
H	0.639968	0.189531	0.000903
O	1.471695	-2.148657	-0.000019
C	2.366408	1.284061	0.001853
C	3.657839	-1.241301	0.000959
C	2.203431	-1.169495	0.000691
N	1.677092	0.101642	0.001163
C	4.336881	-0.083085	0.001694
N	3.74321	1.152756	0.002193
C	4.523771	2.377761	0.002842
C	4.308438	-2.586039	0.000431
H	5.419531	-0.06694	0.001949
H	4.293793	2.973689	0.885218
H	4.295408	2.973692	-0.879965
H	5.580149	2.119051	0.003809
H	4.005183	-3.161322	-0.875864
H	4.004837	-3.162179	0.876043
H	5.394895	-2.495913	0.00069

Interacción	Orbital dador			Orbital aceptor		
N(17) → H(20)-N(25) LP _N (sp ²) → σ* _{NH}	34.53% s	sp ²		75.75% H	99.96% s	
	65.35% p			24.25% N	31.84% s 68.05% p	Sp ²
O(21) → H(18)-N(7) LP _O (p) → σ* _{NH}	99.95% p			72.67% H	99.98% s	
O(21) → H(18)-N(17) LP _O (sp) → σ* _{NH}	60.18% s 39.73% p	sp		27.33% N	33.01% s 66.08% p	Sp ²
C(9)-N(17) → H(20)-N(25) σ _{CN} → σ* _{NH}	41.77% C	35.10% s 64.84% p	Sp ²	75.75% H	99.96% s	
	58.23% N	34.87% s 64.54% p	Sp ²	24.25% N	31.84% s 68.05% p	Sp ²
N(25)-H(20) → N(17)-C(4) σ _{NH} → σ* _{NC}	24.37% H	99.96% s		57.02% C	31.98% s 67.96% p	Sp ²
	75.63% N	31.65% s 68.23% p	Sp ²	42.98% N	30.48% s 69.02% p	Sp ²

Carácter de los orbitales según análisis NBO del aducto A-T, conformación Hoogsteen, en fase gas

A-T, interacciones Hoogsteen, fase acuosa:

Symbol	X	Y	Z
C	-4.709607	-1.293128	0.000225
N	-3.697553	-2.163037	-0.000328
C	-2.437763	-1.699414	-0.000505
C	-2.256728	-0.303664	-0.00013
C	-3.402431	0.473614	0.00038
N	-4.663016	0.030089	0.000552
N	-1.423385	-2.568202	-0.001084
N	-2.969478	1.771633	0.00069
C	-1.61054	1.718174	0.000301
C	-3.804798	2.954098	0.000983
H	-4.435886	2.964977	0.888113
H	-3.165805	3.833221	0.002827
H	-5.700846	-1.735809	0.000214
H	-1.636966	-3.549606	-0.001139
H	-4.433713	2.967108	-0.887674
H	-1.003552	2.611042	0.000452
N	-1.138574	0.499758	-0.00018
H	-0.450764	-2.274015	-0.000973
O	1.864017	2.382653	0.001061
H	0.66829	0.218804	0.000075
O	1.456463	-2.125633	-0.000068
C	2.407522	1.291169	0.001185
C	3.657656	-1.247503	0.001292
C	2.212265	-1.156216	0.000702
N	1.699638	0.118897	0.000648
C	4.352477	-0.095535	0.001923
N	3.774852	1.145085	0.001937
C	4.58186	2.357261	0.002573
C	4.302773	-2.595805	0.001226
H	5.434367	-0.092236	0.002461
H	4.365961	2.952448	0.888229
H	4.367693	2.952286	-0.88362
H	5.630724	2.075328	0.003627
H	4.00377	-3.170308	-0.877437
H	4.003118	-3.170712	0.879402
H	5.388309	-2.505471	0.001647

Interacción	Orbital dador			Orbital aceptor		
N(17) → H(20)-N(25) LP _N (sp ²) → σ* _{NH}	34.85% s	sp ²		75.33% H	99.96% s	
	65.02% p			24.67% N	31.60% s 68.29% p	Sp ²
O(21) → H(18)-N(7) LP _O (p) → σ* _{NH}	99.36% p			72.77% H	99.98% s	
O(21) → H(18)-N(17) LP _O (sp) → σ* _{NH}	60.24% s 38.68% p	sp		27.23% N	32.90% s 66.91% p	Sp ²
C(9)-N(17) → H(20)-N(25) σ _{CN} → σ* _{NH}	41.76% C	35.03% s 64.91% p	Sp ²	75.33% H	99.96% s	
	58.76% N	34.69% s 64.72% p	Sp ²	24.67% N	31.60% s 68.29% p	Sp ²
N(25)-H(20) → N(17)-C(4) σ _{NH} → σ* _{NC}	24.67% H	99.96% s		56.81% C	31.98% s 67.96% p	Sp ²
	75.33% N	31.60% s 68.29% p	Sp ²	43.19% N	30.34% s 69.13% p	Sp ²

Carácter de los orbitales según análisis NBO del aducto A-T, conformación Hoogsteen, en fase acuosa

A-T, interacciones Watson Crick, fase gas:

Symbol	X	Y	Z
C	-1.4297640	0.9542130	-0.0070970
C	-1.4947110	-1.3652110	0.0060610
C	-2.8967080	-1.2579180	0.0057260
C	-3.4171600	0.0250440	-0.0010880
N	-2.7312670	1.1717780	-0.0079220
N	-3.9010100	-2.1990960	0.0123370
N	-4.7745180	-0.1361050	0.0025980
C	-4.9911230	-1.4887520	0.0092470
C	-5.7559780	0.9223410	-0.0152790
H	-5.9944140	-1.8893120	0.0135050
H	-5.7068620	1.4733430	-0.9543600
H	-5.5719690	1.6146570	0.8051480
H	-6.7467830	0.4859230	0.0957820
H	-1.3910450	-3.3810060	0.0176970
H	-0.7799080	1.8236490	-0.0119470
N	-0.7912680	-0.2229650	-0.0008740
N	-0.8528680	-2.5349520	0.0127780
H	0.1642050	-2.5660120	0.0124090
O	1.9823930	2.1109110	-0.0114080
H	1.0074020	-0.1776100	-0.0001420
O	2.0686560	-2.4236030	0.0115100
C	4.1531520	-1.3070040	0.0060240
C	2.6991040	-1.3747550	0.0061950
N	2.0501170	-0.1617360	0.0002680

Interacción	Orbital dador		Orbital aceptor		
	N(16) → H(20)-N(24) LP _N (sp ²) → σ* _{NH}	29.78% s	sp ²	75.74% H	99.96% s
70.11% p		24.26% N		31.81% s	Sp ²
O(21) → H(18)-N(7) LP _O (p) → σ* _{NH}	99.41% p		72.97% H	99.97% s	
O(21) → H(18)-N(17) LP _O (sp) → σ* _{NH}	60.18% s	sp	27.03% N	33.14 %s	Sp ²
	39.74% p				
C(1)-N(16) → H(20)-N(24) σ _{CN} → σ* _{NH}	40.34% C	34.57% s	Sp ²	75.74% H	99.96% s
		65.37% p			
C(2)-C(3) → H(20)-N(24) σ _{CC} → σ* _{NH}	49.20% C2	34.92% s	Sp ²	24.26% N	31.81% s
		65.03% p			
H(20)-N(24) → C(2)-N(16) σ _{NH} → σ* _{CN}	24.26% H	99.96%		57.34% C	32.64% s
					67.32% p
	75.74% N	31.81% s	Sp ²	42.66% N	34.05% s
		68.09% p			

Carácter de los orbitales según análisis NBO del aducto A-T, conformación Watson Crick, en fase gas

A-T, interacciones Watson Crick, fase acuosa:

Symbol	X	Y	Z
C	-1.454913	0.961497	-0.006216
C	-1.512335	-1.356009	0.005338
C	-2.91463	-1.25369	0.004638
C	-3.445049	0.026437	-0.001683
N	-2.757599	1.175705	-0.007346
N	-3.916868	-2.197867	0.009199
N	-4.799541	-0.14	-0.000881
C	-5.01263	-1.4888	0.006043
C	-5.796957	0.908932	-0.005829
H	-6.014961	-1.890262	0.008039
H	-5.687874	1.525643	-0.896553
H	-5.687974	1.53388	0.879149
H	-6.783297	0.451894	-0.003744
H	-1.37727	-3.378203	0.015828
H	-0.810845	1.835296	-0.010572
N	-0.810383	-0.210109	-0.000324
N	-0.859072	-2.51901	0.011235

H	0.158375	-2.534307	0.012183
O	2.003064	2.115281	-0.0146
H	1.034155	-0.16388	-0.000463
O	2.065124	-2.413106	0.013507
C	4.161729	-1.310579	0.007712
C	2.714866	-1.36924	0.007368
N	2.071828	-0.15359	-0.00035
C	4.733896	-0.093064	0.000381
N	4.030933	1.081087	-0.007463
C	2.655634	1.085413	-0.007938
C	4.708174	2.370378	-0.015921
C	4.942612	-2.585194	0.016113
H	5.809616	0.021805	0.00035
H	4.432635	2.945695	0.866236
H	4.432537	2.934059	-0.90552
H	5.780674	2.198944	-0.014898
H	4.704506	-3.193327	-0.858508
H	4.704037	-3.182096	0.898309
H	6.013018	-2.383061	0.015097

Interacción	Orbital dador			Orbital aceptor		
N(16) → H(20)-N(24) LP _N (sp ²) → σ* _{NH}	29.85% s	sp ²		75.31% H	99.96% s	
	70.04% p			24.69% N	31.55% s 68.34% p	Sp ²
O(21) → H(18)-N(7) LP _O (p) → σ* _{NH}	99.31% p			72.87% H	99.97% s	
O(21) → H(18)-N(17) LP _O (sp) → σ* _{NH}	60.25% s 39.67% p	sp		27.13% N	32.90% s 66.92% p	Sp ²
C(1)-N(16) → H(20)-N(24) σ _{CN} → σ* _{NH}	40.47% C	34.77% s 65.18% p	Sp ²	75.31% H	99.96% s	
	59.33% N	36.13% s 63.40% p	Sp ²	24.69% N	31.55% s 68.34% p	Sp ²

Carácter de los orbitales según análisis NBO del aducto A-T, conformación Watson Crick, en fase acuosa

m6A-T, anti, interacciones Hoogsteen, fase gas:

Symbol	X	Y	Z
C	-5.076053	0.746583	0.018878
N	-4.298139	1.823066	0.018298
C	-2.963718	1.675385	0.014011
C	-2.440231	0.365232	0.010329

C	-3.389232	-0.652039	0.011473
N	-4.714487	-0.527804	0.015633
N	-2.232937	2.798323	0.013548
N	-2.680033	-1.820616	0.007524
C	-1.363871	-1.470658	0.004278
C	-3.240812	-3.150625	0.00724
H	-3.862924	-3.296838	-0.875207
H	-3.855054	-3.300697	0.894556
H	-2.426921	-3.872756	0.002051
H	-6.143735	0.942161	0.022356
H	-2.772644	3.645343	0.016867
C	-0.789617	2.858569	0.009405
H	-0.482994	3.901765	0.009328
H	-0.361167	2.377062	0.887573
H	-0.366404	2.378467	-0.872076
N	-1.165421	-0.181513	0.005746
H	-0.567498	-2.20151	0.000634
O	2.147811	2.214809	0.00078
H	0.856987	0.078082	-0.000473
O	1.600736	-2.302074	-0.01002
C	4.099854	0.885605	-0.011074
C	2.65786	1.114374	-0.004582
N	1.879449	-0.038138	-0.004932
C	4.537382	-0.38046	-0.016545
N	3.706359	-1.472837	-0.016381
C	2.333892	-1.332077	-0.010342
C	4.229806	-2.828239	-0.022279
C	5.001703	2.076238	-0.011214
H	5.594663	-0.613169	-0.021493
H	3.885015	-3.365625	-0.904804
H	3.893383	-3.370173	0.860705
H	5.316314	-2.781127	-0.027305
H	4.819476	2.697767	0.866961
H	4.812518	2.702851	-0.884289
H	6.04933	1.774537	-0.016255

Interacción	Orbital dador		Orbital aceptor		
N(20) → H(23)-N(27) LP _N (sp ²) → σ* _{NH}	29.78% s 70.11% p	sp ²	75.74% H	99.96% s	
			24.26% N	31.81% s 68.09% p	Sp ²
O(22) → N(7)-C(16) LP _O (p) → σ* _{NC}	99.41% p		61.83% C 38.17% N	25.40% s 74.11% p	Sp ²
O(22) → N(7)-C(16) LP _O (sp) → σ* _{NC}	59.93% s 39.97% p	sp		35.14% s 64.69% p	
O(24) → H(21)-C(9) LP _O (p) → σ* _{CH}	99.73% p		37.61% C 62.39% H	35.12% s 65.36% p	Sp ²
O(24) → H(21)-C(9) LP _O (sp) → σ* _{CH}	61.40% s 38.50% p			99.92% s	

Carácter de los orbitales según análisis NBO del aducto m6A-T, conformación *anti*, interacciones Hoogsteen, en fase gas.

m6A-T, anti, interacciones Hoogsteen, fase acuosa:

Symbol	X	Y	Z
C	-4.879867	0.90227	-0.33973
N	-3.962717	1.721871	-0.845065
C	-2.659267	1.402783	-0.743511
C	-2.329033	0.196467	-0.091257
C	-3.401014	-0.55309	0.38062
N	-4.69744	-0.251099	0.285601
N	-1.781298	2.260633	-1.274891
N	-2.855331	-1.662266	0.961165
C	-1.508406	-1.54012	0.82072
C	-3.582015	-2.742851	1.593438
H	-4.251736	-3.21261	0.874954
H	-4.163881	-2.361829	2.431075
H	-2.868554	-3.478636	1.955308
H	-5.909543	1.225041	-0.458899
H	-2.186806	3.07273	-1.706964
C	-0.343365	2.10895	-1.284569
H	0.082576	2.963999	-1.803338
H	0.063259	2.079052	-0.272243
H	-0.042871	1.201246	-1.810606
N	-1.143311	-0.451477	0.20148
H	-0.83283	-2.29248	1.199051
O	1.713186	1.387002	1.668206
H	0.733501	-0.233733	0.078093
O	1.743343	-1.77849	-1.573287
C	3.832734	0.703191	0.851877

C	2.382804	0.686582	0.921106
N	1.764834	-0.198873	0.059058
C	4.426756	-0.122047	-0.026945
N	3.746075	-0.972534	-0.857462
C	2.372598	-1.034157	-0.840556
C	4.447024	-1.840421	-1.793098
C	4.589766	1.628478	1.748999
H	5.503488	-0.156281	-0.125949
H	4.149875	-1.611631	-2.815266
H	4.216757	-2.883872	-1.584317
H	5.515532	-1.678533	-1.683725
H	4.374614	1.416541	2.797978
H	4.306099	2.666588	1.565827
H	5.663113	1.530853	1.590025

Interacción	Orbital dador		Orbital aceptor		
	N(20) → H(23)-N(27) LP _N (sp ²) → σ* _{NH}	34.93% s 64.92% p	sp ²	75.16% H	99.96% s
			24.87% N	31.64% s 68.25% p	Sp ²
O(22) → H(18)-C(16) LP _O (p) → σ* _{CH}	99.76% p		39.11% C	26.61% s 74.33% p	Sp ²
C(26)=O(22) → H(18)- C(16) π _{CO} → σ* _{CH}	72.68% O	99.62 p	60.89% H	99.64% s	
	27.32% C	99.82 p			

Carácter de los orbitales según análisis NBO del aducto m6A-T, conformación *anti*, interacciones Hoogsteen, en fase acuosa.

m6A-T, anti, interacciones Watson Crick, fase gas:

Symbol	X	Y	Z
C	1.333554	-1.530176	-0.000112
C	1.595594	0.784145	-0.000144
C	2.989134	0.558665	0.000428
C	3.389751	-0.772571	0.000747
N	2.612857	-1.857862	0.000345
N	1.003611	1.978106	-0.000439
N	4.090907	1.392377	0.001196
N	4.754544	-0.744576	0.002354
C	5.104091	0.579521	0.001988
C	5.624485	-1.896071	-0.003026
H	6.141746	0.880041	0.003175
H	5.479328	-2.477929	-0.912959
H	5.410026	-2.53269	0.854595

H	6.657338	-1.556656	0.047938
C	1.696201	3.246205	-0.000255
H	2.329915	3.359338	-0.881038
H	2.329363	3.359379	0.880911
H	0.945237	4.033592	-0.000523
H	-0.014083	1.983643	-0.000946
N	0.801914	-0.3066	-0.000506
H	0.612071	-2.341599	-0.000268
O	-1.925415	2.044647	-0.00112
H	-0.995453	-0.254579	-0.000661
O	-2.103009	-2.48674	0.000634
C	-4.071788	1.051513	0.000275
C	-2.616522	1.034535	-0.000416
N	-2.038325	-0.21371	-0.000238
C	-4.706758	-0.131641	0.000999
N	-4.066362	-1.342349	0.00112
C	-2.683876	-1.422747	0.000529
C	-4.79809	-2.59717	0.001943
C	-4.772747	2.370833	0.000134
H	-5.788097	-0.188658	0.001533
H	-4.544806	-3.183241	0.884515
H	-4.545222	-3.184124	-0.880157
H	-5.863883	-2.380165	0.002086
H	-4.492241	2.957577	-0.876165
H	-4.491456	2.958184	0.875773
H	-5.854994	2.239157	0.000666

Interacción	Orbital dador		Orbital aceptor		
N(20) → H(23)-N(27) LP _N (sp ²) → σ* _{NH}	29.54% s	sp ²	75.78% H	99.95% s	
	70.36% p		24.22% N	31.85% s 68.05% p	Sp ²
O(22) → H(19)-N(6) LP _O (p) → σ* _{NH}	99.99% p		66.78% N	30.13% s 69.75% p	Sp ²
O(22) → H(19)-N(6) LP _O (sp) → σ* _{NH}	60.17% s 39.75% p	sp		73.22% N	
O(24) → H(21)-C(9) LP _O (p) → σ* _{CH}	99.75% p		39.57% C	30.12% s 69.82% p	Sp ²
			60.43% H	99.94% s	

Carácter de los orbitales según análisis NBO del aducto m6A-T, conformación *anti*, interacciones Watson Crick, en fase gas.

m6A-T, anti, interacciones Watson Crick, fase acuosa:

Symbol	X	Y	Z
C	1.354773	-1.536499	0.002292
C	1.612378	0.775964	0.001265
C	3.006438	0.553379	0.000414
C	3.415452	-0.776226	0.000669
N	2.634752	-1.863101	0.001598
N	1.012795	1.965689	0.001227
N	4.106977	1.389225	-0.000634
N	4.77788	-0.744339	-0.000201
C	5.124884	0.576174	-0.000979
C	5.663596	-1.888648	-0.000436
H	6.162151	0.876577	-0.001772
H	5.492776	-2.495508	-0.888332
H	5.49257	-2.495934	0.887123
H	6.69107	-1.533669	-0.000219
C	1.691265	3.242696	0.000278
H	2.31919	3.362857	-0.883402
H	2.320105	3.363709	0.883194
H	0.933517	4.022882	0.000294
H	-0.005065	1.960946	0.002094
N	0.818617	-0.317072	0.002184
H	0.636506	-2.350934	0.003013
O	-1.920871	2.03564	0.00358
H	-1.020827	-0.263932	0.001394
O	-2.119325	-2.488132	-0.002044
C	-4.078594	1.055842	0.001144
C	-2.630882	1.031616	0.001961
N	-2.058289	-0.218749	0.000812
C	-4.718953	-0.127215	-0.000716
N	-4.084268	-1.339449	-0.001839
C	-2.711482	-1.422327	-0.00106
C	-4.834206	-2.58775	-0.003871
C	-4.785723	2.372762	0.002373
H	-5.799361	-0.180737	-0.001456
H	-4.592221	-3.173254	0.881484
H	-4.591056	-3.171073	-0.890344
H	-5.895211	-2.355361	-0.004281
H	-4.513042	2.961781	-0.875256
H	-4.513809	2.959716	0.88162
H	-5.865961	2.23206	0.001741

Interacción	Orbital dador		Orbital aceptor		
N(20) → H(23)-N(27) LP _N (sp ²) → σ* _{NH}	29.58% s 70.30% p	sp ²	75.35% H	99.95% s	
			24.65% N	31.58% s 68.31% p	Sp ²
O(22) → N(6)-H(19) LP _O (p) → σ* _{NH}	99.27% p		26.82% N 73.18% H	30.05% s 69.83% p	Sp ²
O(22) → N(6)-H(19) LP _O (sp) → σ* _{NH}	60.25% s 39.67% p	sp		99.96% s	
O(24) → H(21)-C(1) LP _O (p) → σ* _{CH}	99.77% p		39.89% C	29.88% s 70.07% p	Sp ²
			60.11% H	99.94% s	

Carácter de los orbitales según análisis NBO del aducto m6A-T, conformación *anti*, interacciones Watson Crick, en fase acuosa.

m6A-T, syn, interacciones Hoogsteen, fase gas:

Symbol	X	Y	Z
C	-4.66758	0.830777	-0.001314
N	-3.715127	1.765537	-0.000816
C	-2.429925	1.386901	-0.000173
C	-2.159007	0.00123	-0.000002
C	-3.252573	-0.842945	-0.00059
N	-4.538632	-0.486732	-0.001242
N	-1.465384	2.308996	0.000291
C	-1.742434	3.725389	0.000013
N	-2.736849	-2.11478	-0.000486
C	-1.382446	-1.977154	0.000287
C	-3.503367	-3.338457	0.000116
H	-4.142783	-3.381226	-0.880853
H	-4.131004	-3.388661	0.889202
H	-2.81739	-4.183069	-0.007982
H	-2.316376	4.017705	0.881495
H	-2.314862	4.017706	-0.882462
H	-0.790275	4.251853	0.000824
H	-5.685247	1.208594	-0.001838
H	-0.494111	2.016256	0.000558
N	-0.99417	-0.731181	0.000532
H	-0.71006	-2.82292	0.000481
O	1.45556	2.011237	0.00073
H	0.741571	-0.365945	0.000535
O	2.034362	-2.484041	-0.000408
C	3.684487	1.215165	-0.000225
C	2.235716	1.069919	0.000295

N	1.773485	-0.225832	0.000224
C	4.421288	0.092791	-0.000746
N	3.89063	-1.171156	-0.000788
C	2.522008	-1.371954	-0.000219
C	4.731991	-2.355298	-0.001403
C	4.266096	2.591179	-0.000192
H	5.50338	0.131362	-0.001185
H	4.532679	-2.961831	-0.884011
H	4.533503	-2.962158	0.881167
H	5.773974	-2.043587	-0.001834
H	3.934365	3.150629	0.876061
H	3.933688	3.150958	-0.875979
H	5.355727	2.556235	-0.000621

Interacción	Orbital dador		Orbital aceptor		
N(20) → H(23)-N(27) LP _N (sp ²) → σ* _{NH}	34.47% s 65.41% p	sp ²	75.78% H	99.95% s	
			24.22% N	31.87% s 68.02% p	Sp ²
O(22) → N(7)-H(19) LP _O (p) → σ* _{NH}	99.54% p		27.10% N	30.24% s 69.64% p	Sp ²
O(22) → N(7)-H(19) LP _O (sp) → σ* _{NH}	60.18% s 39.73% p	sp		72.90% H	

Carácter de los orbitales según análisis NBO del aducto m6A-T, conformación *syn*, interacciones Hoogsteen, en fase gas.

m6A-T, syn, interacciones Hoogsteen, fase acuosa:

Symbol	X	Y	Z
C	-4.681857	0.852058	0.011224
N	-3.716002	1.775024	0.004049
C	-2.43364	1.37698	-0.004571
C	-2.182486	-0.012234	-0.006342
C	-3.285264	-0.845536	0.002676
N	-4.568819	-0.465795	0.011579
N	-1.454924	2.282605	-0.010946
C	-1.696893	3.706649	-0.006664
N	-2.78717	-2.120762	0.001144
C	-1.433563	-1.998759	-0.009275
C	-3.561235	-3.344124	0.008086
H	-4.175626	-3.403741	-0.888911
H	-4.20406	-3.372784	0.886303
H	-2.879141	-4.190029	0.034215
H	-2.248957	4.015538	0.883058

H	-2.265718	4.017508	-0.884958
H	-0.733119	4.210646	-0.01521
H	-5.694734	1.243311	0.018044
H	-0.48845	1.969834	-0.013199
N	-1.025112	-0.756644	-0.013947
H	-0.78101	-2.858779	-0.012679
O	1.432054	1.987805	-0.007373
H	0.766134	-0.393034	-0.012157
O	2.072454	-2.493029	-0.007858
C	3.675849	1.225294	0.005897
C	2.23741	1.05916	-0.00317
N	1.791331	-0.240811	-0.00701
C	4.429351	0.110825	0.009313
N	3.916878	-1.158167	0.004871
C	2.55888	-1.374921	-0.003608
C	4.786202	-2.326522	0.00867
C	4.249729	2.60541	0.01122
H	5.509856	0.163866	0.01605
H	4.610324	-2.92954	-0.880542
H	4.595193	-2.934671	0.891199
H	5.818987	-1.990326	0.018453
H	3.915773	3.162407	0.888588
H	3.925775	3.165039	-0.8682
H	5.338506	2.571738	0.017418

Interacción	Orbital dador		Orbital aceptor		
	N(20) → H(23)-N(27) LP _N (sp ²) → σ* _{NH}	34.78% s 65.10% p	sp ²	75.34% H 24.66% N	99.95% s 31.61% s 68.28% p
O(22) → N(7)-H(19) LP _O (p) → σ* _{NH}	99.36% p		26.91% N	30.26% s 69.02% p	Sp ²
O(22) → N(7)-H(19) LP _O (sp) → σ* _{NH}	60.24% s 39.64% p	sp	73.09% H	99.96% s	

Carácter de los orbitales según análisis NBO del aducto m6A-T, conformación *syn*, interacciones Hoogsteen, en fase acuosa.

m6A-T, *syn*, interacciones Watson Crick, fase gas:

Symbol	X	Y	Z
C	1.253701	-1.122626	-0.052956
C	1.873495	1.045495	0.455975
C	3.197257	0.665658	0.163802
C	3.389334	-0.645664	-0.226287

N	2.450941	-1.589301	-0.348985
N	1.577233	2.284896	0.861448
N	4.387859	1.354042	0.194069
N	4.734355	-0.76497	-0.443627
C	5.2672	0.467032	-0.174192
C	5.423519	-1.958592	-0.872986
H	6.328239	0.645689	-0.270082
H	5.082764	-2.258645	-1.863619
H	5.230967	-2.773556	-0.176235
H	6.492304	-1.755723	-0.905138
H	2.351305	2.918483	0.945703
C	0.247608	2.719616	1.227216
H	-0.152861	2.102201	2.035034
H	-0.437598	2.670519	0.379753
H	0.307372	3.749394	1.573675
N	0.914596	0.120971	0.326187
H	0.426858	-1.823023	-0.104494
O	-2.23396	2.082805	-0.897168
H	-1.012907	0.202224	0.204772
O	-1.780094	-2.016304	1.008382
C	-4.187733	0.769998	-0.676027
C	-2.76341	1.053014	-0.526882
N	-2.027319	0.049872	0.084235
C	-4.645563	-0.407314	-0.22687
N	-3.852939	-1.360306	0.359998
C	-2.493077	-1.165309	0.519934
C	-4.391201	-2.633603	0.805531
C	-5.051282	1.806662	-1.317224
H	-5.692121	-0.673106	-0.307932
H	-4.164234	-2.791365	1.858789
H	-3.954753	-3.454534	0.236983
H	-5.469493	-2.625247	0.662842
H	-4.702976	2.027708	-2.327482
H	-5.009554	2.743482	-0.759024
H	-6.08882	1.475468	-1.368765

Interacción	Orbital dador		Orbital aceptor		
N(20) → H(23)-N(27) LP _N (sp ²) → σ* _{NH}	30.22% s 69.64% p	sp ²	75.06% H	99.96% s	
			24.94% N	31.58% s 68.31% p	Sp ²
O(22) → H(18)-C(16) LP _O (p) → σ* _{CH}	99.75% p		37.62% C	26.50% s 73.45% p	Sp ²
			62.38% H	99.93% s	
O(22) → H(18)-C(16) LP _O (sp) → σ* _{CH}	60.18% s 39.73% p	sp	39.51% C	30.26% s 69.68% p	Sp ²
O(24) → H(21)-C(1) LP _O (p) → σ* _{CH}	99.75% p		60.41% H	99.93% s	

Carácter de los orbitales según análisis NBO del aducto m6A-T, conformación *syn*, interacciones Watson Crick, en fase gas.

m6A-T, syn, interacciones Watson Crick, fase acuosa:

Symbol	X	Y	Z
C	1.346577	-1.020076	-0.768063
C	1.824545	0.853919	0.500927
C	3.186964	0.554261	0.306425
C	3.474417	-0.567219	-0.45079
N	2.585144	-1.395566	-1.016185
N	1.422838	1.911019	1.210654
N	4.342854	1.168225	0.729947
N	4.836679	-0.641231	-0.492141
C	5.292231	0.422288	0.231408
C	5.624425	-1.64921	-1.169429
H	6.350928	0.594445	0.355532
H	5.401863	-1.644446	-2.235256
H	5.404637	-2.634156	-0.760533
H	6.677815	-1.425676	-1.021553
H	2.139862	2.481698	1.621801
C	0.035956	2.241168	1.450821
H	-0.46636	1.45223	2.014921
H	-0.49944	2.391663	0.511576
H	-0.001877	3.160973	2.028487
N	0.921672	0.033686	-0.057444
H	0.558871	-1.638029	-1.188188
O	-2.066455	1.677174	-1.533324
H	-0.970145	0.041598	-0.03401
O	-1.863594	-1.75168	1.422526
C	-4.124087	0.691759	-0.885119
C	-2.680044	0.842273	-0.88244

N	-1.999656	-0.043224	-0.068811
C	-4.654627	-0.268734	-0.10915
N	-3.914835	-1.109064	0.67995
C	-2.543556	-1.017812	0.725333
C	-4.54939	-2.128129	1.503604
C	-4.945263	1.603483	-1.73864
H	-5.723429	-0.430831	-0.066575
H	-4.313109	-1.965217	2.553844
H	-4.201641	-3.118277	1.213534
H	-5.624758	-2.068106	1.362677
H	-4.6681	1.507195	-2.790088
H	-4.786651	2.646654	-1.458576
H	-6.006249	1.377017	-1.639297

Interacción	Orbital dador		Orbital aceptor		
N(20) → H(23)-N(27) LP _N (sp ²) → σ* _{NH}	30.03% s	sp ²	75.21% H	99.96% s	
	69.83% p		24.76% N	31.66% s	68.23% p
O(22) → H(18)-C(16) LP _O (p) → σ* _{CH}	99.76% p		39.04% C	25.52% s	Sp ²
			60.96% H	74.42% p	

Carácter de los orbitales según análisis NBO del aducto m6A-T, conformación *syn*, interacciones Watson Crick, en fase acuosa.