



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Químicas - Programa de Magíster en Ciencias con Mención en  
Química

## **Estudio QM/MM sobre el mecanismo de inhibición de la enzima $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 por Avibactam**



Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención en  
Química

IGNACIO ESTEBAN LIZANA BASTIAS  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2018

Profesor Guía: Eduardo Delgado Ramírez  
Dpto. de Físico-Química, Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad de Concepción

## TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS .....	1
1.2 ENZIMAS BETA-LACTAMASAS .....	1
1.3 INHIBIDORES DE ENZIMAS BETA-LACTAMASAS .....	4
1.4 PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN.....	9
1.5 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	10
1.5.1 Hipótesis.....	10
1.5.2 Objetivos.....	10
<b>CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA.....</b>	<b>11</b>
2.1 CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA ENZIMA SUSTRATO .....	11
2.2 SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR.....	12
2.3 CÁLCULOS QM/MM (QUANTUM MECHANICS/MOLECULAR MECHANICS).....	13
2.3.1 Exploración de la superficie de energía potencial (SEP) .....	14
2.3.2 Corrección de la SEP a nivel DFT. ....	15
<b>CAPÍTULO 3: DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>16</b>
3.1. DINÁMICA MOLECULAR.....	16
3.2. CÁLCULOS QM/MM .....	34
3.2.1. Estudio AM1/CHARMM36 .....	34
3.2.2. Corrección DFT de la SEP.....	36
<b>CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES .....</b>	<b>42</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>43</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ETAPAS DEL CICLO CATALÍTICO DE BETA-LACTAMASAS TIPO SERINA HIDROLASAS.....	3
FIGURA 2. INHIBIDORES DE ENZIMAS BETA-LACTAMASAS CON ANILLO BETA-LACTÁMICO.	4
FIGURA 3. MECANISMO DE INHIBICIÓN DE ENZIMAS BETA-LACTAMASAS POR ÁCIDO CLAVULÁNICO.....	5
FIGURA 4. ESTRUCTURA QUÍMICA DE AVIBACTAM. ....	6
FIGURA 5. MECANISMO DE INHIBICIÓN DE BETA-LACTAMASAS POR AVIBACTAM.....	7
FIGURA 6. MECANISMOS PROPUESTOS PARA LA ACTIVACIÓN DEL RESIDUO SER70 .....	8
FIGURA 7. IMAGEN 3D DEL SISTEMA EN CAJA DE AGUA.....	12
FIGURA 8. ESFERA DE RADIO 30 Å PARA REALIZAR ESTUDIO QM/MM. ....	14
FIGURA 9. COORDENADAS DE REACCIÓN R <sub>1</sub> Y R <sub>2</sub> , CORRESPONDIENTES A LA ACILACIÓN Y TRANSFERENCIA PROTÓNICA.....	15
FIGURA 10. GRÁFICO RMSD DE LA PROTEÍNA.. ....	16
FIGURA 11. GRÁFICO RMSD DE LOS RESIDUOS DEL SITIO ACTIVO. ....	17
FIGURA 12. GRÁFICO RMSF POR RESIDUO DE LA PROTEÍNA. ....	17
FIGURA 13. GRÁFICO DE DISTANCIA ENTRE EL ÁTOMO DE NITRÓGENO DE LA CADENA LATERAL DEL RESIDUO LYS234 Y EL ÁTOMO DE AZUFRE DEL GRUPO SULFATO DE AVIBACTAM.....	18
FIGURA 14. GRÁFICO DE ENERGÍA DE INTERACCIÓN ENTRE LYS234 Y AVIBACTAM.. ...	19
FIGURA 15. IMAGEN 3D SOBRE INTERACCIÓN ENTRE EL RESIDUO LYS234 Y AVIBACTAM, EN SISTEMA A LA FORMA IÓNICA. ....	19
FIGURA 16. GRÁFICO DE DISTANCIA ENTRE EL HIDRÓGENO DEL GRUPO AMIDA DEL RESIDUO ASN104 Y EL OXÍGENO CARBONÍLICO DEL GRUPO AMIDA DEL AVIBACTAM.....	20
FIGURA 17. GRÁFICO DE ENERGÍA DE INTERACCIÓN ENTRE ASN104 Y AVIBACTAM.....	21
FIGURA 18. IMAGEN 3D SOBRE INTERACCIÓN ENTRE EL RESIDUO ASN104 Y AVIBACTAM, EN SISTEMA A LA FORMA IÓNICA. ....	21
FIGURA 19. GRÁFICO DE DISTANCIA ENTRE EL NITRÓGENO DE LA CADENA LATERAL DEL RESIDUO LYS73 Y EL OXÍGENO CARBONÍLICO DEL AVIBACTAM. ....	22
FIGURA 20. GRÁFICO DE ENERGÍA DE INTERACCIÓN ENTRE LYS73 Y AVIBACTAM. ....	23

FIGURA 21. IMAGEN 3D SOBRE INTERACCIÓN ENTRE EL RESIDUO LYS73 Y AVIBACTAM, EN SISTEMA A LA FORMA IÓNICA. ....	23
FIGURA 22. GRÁFICO DE DISTANCIA ENTRE EL NITRÓGENO DE LA CADENA LATERAL DEL RESIDUO LYS73 Y EL CARBONO CARBONÍLICO DEL GRUPO CARBOXILATO DEL RESIDUO GLU166. ....	24
FIGURA 23. GRÁFICO DE ENERGÍA DE INTERACCIÓN ENTRE LYS73 Y GLU166.....	25
FIGURA 24. IMAGEN 3D SOBRE INTERACCIÓN ENTRE EL RESIDUO LYS73 Y GLU166, EN SISTEMA A LA FORMA IÓNICA. ....	25
FIGURA 25. GRÁFICO DE DISTANCIA ENTRE EL NITRÓGENO DE LA CADENA LATERAL DEL RESIDUO LYS73 Y EL OXÍGENO HIDROXÍLICO DEL RESIDUO SER70. ....	26
FIGURA 26. GRÁFICO DE ENERGÍA DE INTERACCIÓN ENTRE LYS73 Y SER70.....	27
FIGURA 27. IMAGEN 3D SOBRE INTERACCIÓN ENTRE EL RESIDUO LYS73 Y SER70, EN SISTEMA A LA FORMA IÓNICA. ....	27
FIGURA 28. GRÁFICO DE DISTANCIA ENTRE EL NITRÓGENO DE LA CADENA LATERAL DEL RESIDUO LYS73 Y EL OXÍGENO HIDROXÍLICO DEL RESIDUO SER130.....	28
FIGURA 29. GRÁFICO DE ENERGÍA DE INTERACCIÓN ENTRE LYS73 Y SER130.....	29
FIGURA 30. IMAGEN 3D SOBRE INTERACCIÓN ENTRE EL RESIDUO LYS73 Y SER130, EN SISTEMA A LA FORMA IÓNICA. ....	29
FIGURA 31. GRÁFICO DE ENTRE EL OXÍGENO HIDROXÍLICO DEL RESIDUO SER70 Y EL CARBONO CARBONÍLICO C <sub>7</sub> DEL AVIBACTAM.....	30
FIGURA 32. GRÁFICO DE DISTANCIA ENTRE EL HIDRÓGENO HIDROXÍLICO DEL RESIDUO SER70 Y EL NITRÓGENO N <sub>6</sub> DEL AVIBACTAM. ....	31
FIGURA 33. GRÁFICO DE ÁNGULO COMPREDIDO ENTRE LOS ÁTOMOS SER70-O-H...N-AVIBACTAM.. ....	32
FIGURA 34. GRÁFICO DE ENERGÍA DE INTERACCIÓN ENTRE SER70 Y AVIBACTAM.....	33
FIGURA 35. IMAGEN 3D SOBRE INTERACCIÓN ENTRE EL RESIDUO SER70 Y AVIBACTAM, EN SISTEMA A LA FORMA IÓNICA. ....	34
FIGURA 36. VISTA 2D DE LA SEP AM1/CHARMM36. ....	35
FIGURA 37. VISTA 3D DE LA SEP AM1/CHARMM36. ....	36
FIGURA 38. VISTA 2D DE LA SEP M06-2X(6-31+G(D,P))/CHARMM36.....	37
FIGURA 39. VISTA 3D DE LA SEP M06-2X(6-31+G(D,P))/CHARMM36.....	38

FIGURA 40. ESTRUCTURA TOMADA DE LA ZONA DEL ESTADO DE TRANSICIÓN EN LA SEP.  
..... 39

FIGURA 41. ESTADO DE TRANSICIÓN OPTIMIZADO A PARTIR DE LA ESTRUCTURA TOMADA  
DESDE LA SEP..... 39



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CARGAS ATÓMICAS NBO SOBRE ÁTOMOS CLAVES EN REACTANTE Y ESTADO DE TRANSICIÓN.....	40
TABLA 2. ORDENES DE ENLACE SOBRE ÁTOMOS CLAVES EN REACTANTE Y ESTADO DE TRANSICIÓN.....	41



## RESUMEN

En la presente tesis se estudió el mecanismo de inhibición de la enzima  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 por Avibactam, mediante simulaciones de dinámica molecular y posteriores cálculos híbridos QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics). Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron con el software NAMD, usando el campo de fuerza CHARMM36 y el modelo de agua TIP3. Las simulaciones se realizaron hasta un tiempo de 40 ns, y la estructura final para el estudio de la reacción tomada a los 30 ns. Para los estudios QM/MM, el sistema se dividió en una región QM y una región MM. El subsistema QM, incluye el inhibidor Avibactam y los residuos Ser70, Lys73, Ser130 y Glu166; mientras que la región MM incluye el resto del sistema.

El mecanismo de reacción se estudió postulando que el único residuo catalítico responsable de la inhibición es el residuo de Ser70, los residuos restantes del sitio activo participan en el correcto posicionamiento del inhibidor y estabilización del estado de transición mediante interacciones de carácter electrostático.

Los resultados de las simulaciones de dinámica molecular sugieren que los residuos Glu166 y Lys73 deben estar en su forma iónica, de lo contrario las interacciones entre el sitio activo y Avibactam se pierden o se debilitan, desfavoreciendo la reacción.

La topología de la superficie de energía potencial sugiere que la reacción ocurre mediante un mecanismo concertado asincrónico, en el cual el ataque nucleofílico del residuo Ser70 sobre el carbono carbonílico del Avibactam es el evento que gatilla la protonación del átomo N6 de Avibactam y la consecuencia apertura del anillo. La barrera de energía de activación calculada es de 16 kcal/mol, en concordancia con el valor experimental de 15 kcal/mol.

## ABSTRACT

In this thesis, the mechanism of inhibition of the CTX-M-15  $\beta$ -lactamase enzyme by Avibactam is addressed by molecular dynamics (MD) and quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) calculations. The MD simulations were performed with the software NAMD, using CHARMM36 force field and TIP3 water model. Simulations of 40 ns were carried out, and the final MD structure was taken at 30 ns as a single representative configuration. For the QM/MM studies, the system was partitioned in a QM and MM subsystems. The QM zone includes the inhibitor Avibactam and Ser70, Lys73, Ser130 and Glu166 residues.

The mechanism of inhibition was studied by postulating that Ser70 is the sole reacting residue, the remaining residues of the active site participate in the right positioning of Avibactam and also in the stabilization of the transition state by means of electrostatic interactions.

The molecular dynamics simulations suggest that Glu166 and Lys73 should be in their ionic form, otherwise the interactions between the active site and the inhibitor are lost or weakened disfavoring in consequence the reaction.

The topology of the PES (potential energy surface) suggest that the reaction occurs via an asynchronous concerted mechanism, in which the nucleophilic attack of Ser70 hydroxilic oxygen on the carbonylic carbon of Avibactam is the event that triggers the protonation of the N<sub>6</sub> atom and the ring opening. The calculated activation barrier is 16 kcal/mol, in agreement with the experimental value of 15 kcal/mol.

## CAPÍTULO 1: INTROUCCIÓN

### 1.1 Antibióticos beta-lactámicos

La era moderna de los antibióticos probablemente comenzó con el descubrimiento de la penicilina por Fleming en el año 1929; aunque las propiedades antibacteriales de ciertas plantas y hongos han sido conocidas desde tiempos antiguos. Un ejemplo de ello es la planta de *Artemisia annua* (ajenjo chino), la cual ha sido usada por la medicina tradicional china por miles de años como un remedio para muchas enfermedades.

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, descubiertos hace aproximadamente 80 años, son la base de terapias para muchas infecciones causadas por bacterias Gram-negativa. Estos antibióticos actúan mediante el anclaje a las proteínas denominadas “penicillin-binding protein” (PBP), las cuales se encuentran en la membrana celular bacteriana, impidiendo la formación de peptidoglicano y con ello produciendo eventualmente la lisis celular. Sin embargo, las bacterias Gram-negativas han desarrollado enzimas de tipo  $\beta$ -lactamasas, que neutralizan el efecto de los antibióticos.

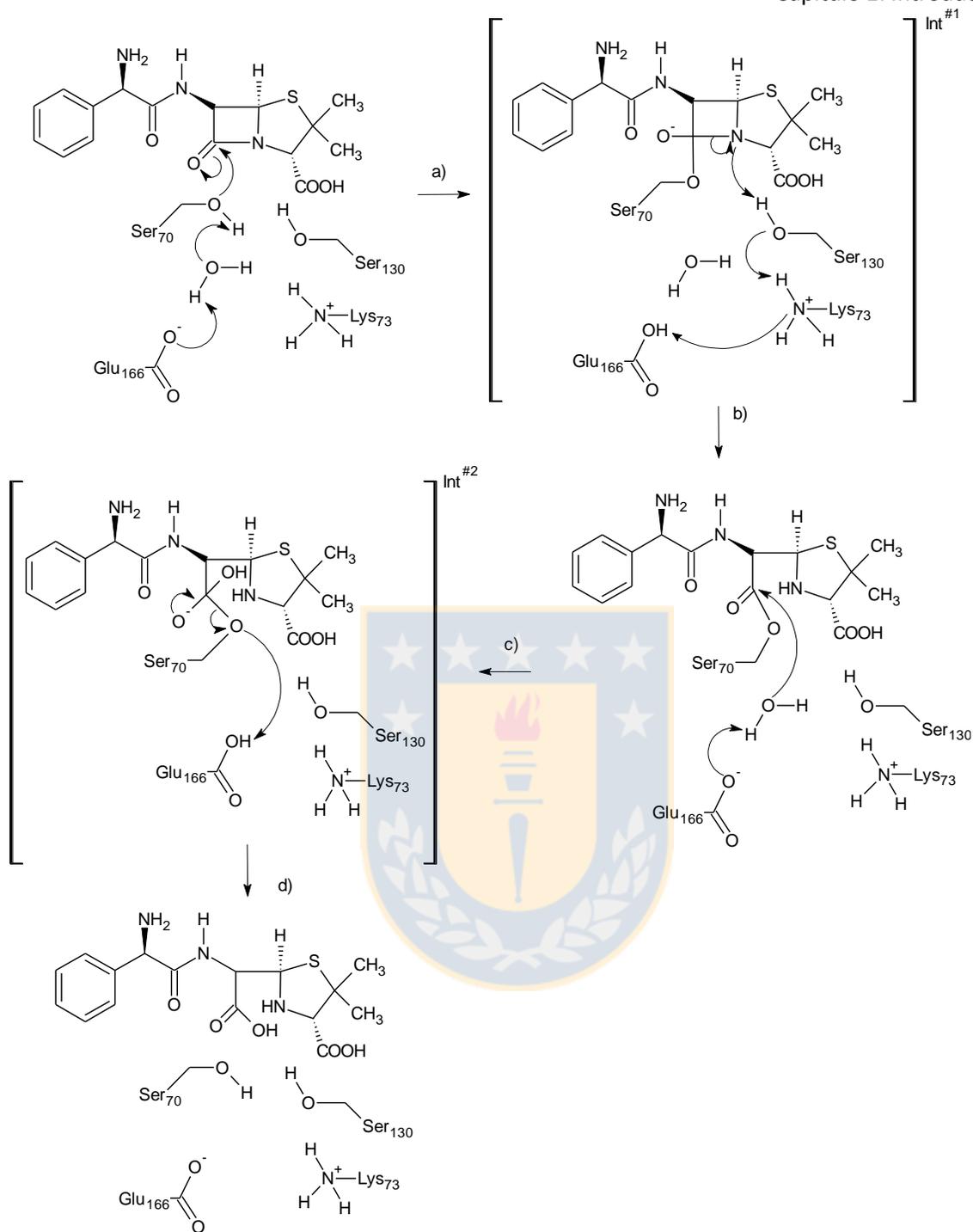
### 1.2 Enzimas beta-lactamasas

Esta clase de enzimas hidroliza el anillo  $\beta$ -lactámico de antibióticos comunes tales como penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenémicos, haciéndolos ineficientes para la muerte bacteriana.

Hay 4 familias de enzimas  $\beta$ -lactamasas, clases A, B, C y D, basadas en la similitud de sus secuencias de ADN. En las enzimas de clase A, C y D, un residuo de serina está directamente involucrado en la reacción hidrolítica, mientras que en las enzimas de clase B se utilizan dos átomos de zinc que coordinan un hidroxilo para producir la hidrólisis. Las enzimas de clase A y C son las más comunes observadas en clínicas. Actualmente, alrededor de 1000 enzimas  $\beta$ -lactamasas han sido documentadas comprendiendo variadas clases estructurales y un amplio rango de sustratos y eficiencia catalítica.

De acuerdo a la literatura, el mecanismo enzimático incluye etapas de acilación y desacilación, en ambas se involucra una transferencia protónica facilitada por una catálisis ácido-base general. El ciclo catalítico consta de 4 etapas, Figura 1:

- a) **Activación del residuo aminoácido Ser70.** La activación comienza con la abstracción del hidrógeno hidroxílico del residuo Ser70 por parte del grupo carboxilato del residuo Glu166 mediado por una molécula de agua y ataque nucleofílico por parte del átomo de oxígeno hidroxílico del residuo Ser70 hacia el carbono carbonílico del antibiótico.
- b) **Formación del complejo acil-enzima.** El residuo Ser130 protona el átomo de nitrógeno del antibiótico, mediante transferencia protónica por parte del hidrógeno hidroxílico.
- c) **Formación del intermediario de desacilación (Int<sup>#2</sup>).** La formación del intermediario (Int<sup>#2</sup>) precede a la etapa de hidrólisis, mediante el ataque nucleofílico por parte del oxígeno de una molécula de agua hacia el carbono carbonílico del antibiótico y abstracción del protón de la molécula de agua por parte del grupo carboxilato del residuo Glu166.
- d) **Hidrólisis del antibiótico y regeneración de la enzima.** El residuo Glu166 protona el átomo de oxígeno del intermediario de desacilación (Int<sup>#2</sup>), mediante transferencia protónica por parte del hidrógeno del grupo carboxílico, produciendo la ruptura del enlace C-O formado en la etapa a).

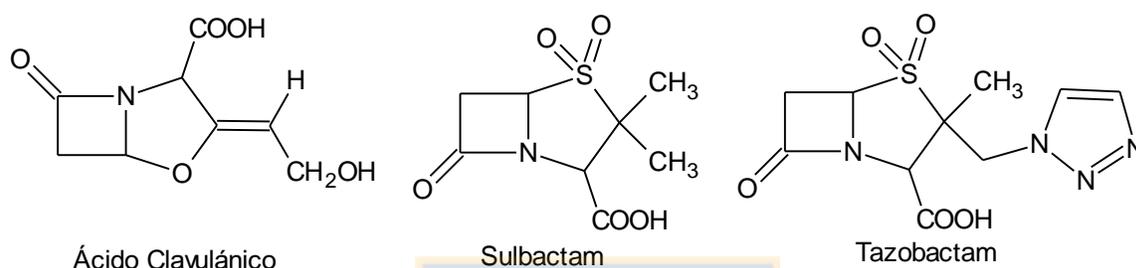


**Figura 1.** Etapas del ciclo catalítico de beta-lactamasas tipo serina hidrolasas: a) Activación del residuo aminoacídico Ser70; b) Formación del complejo acil-enzima; c) Formación del intermediario de desacilación (Int<sup>#2</sup>); d) Hidrólisis del antibiótico y regeneración de la enzima.

Fuente: Elaboración propia.

### 1.3 Inhibidores de enzimas beta-lactamasas

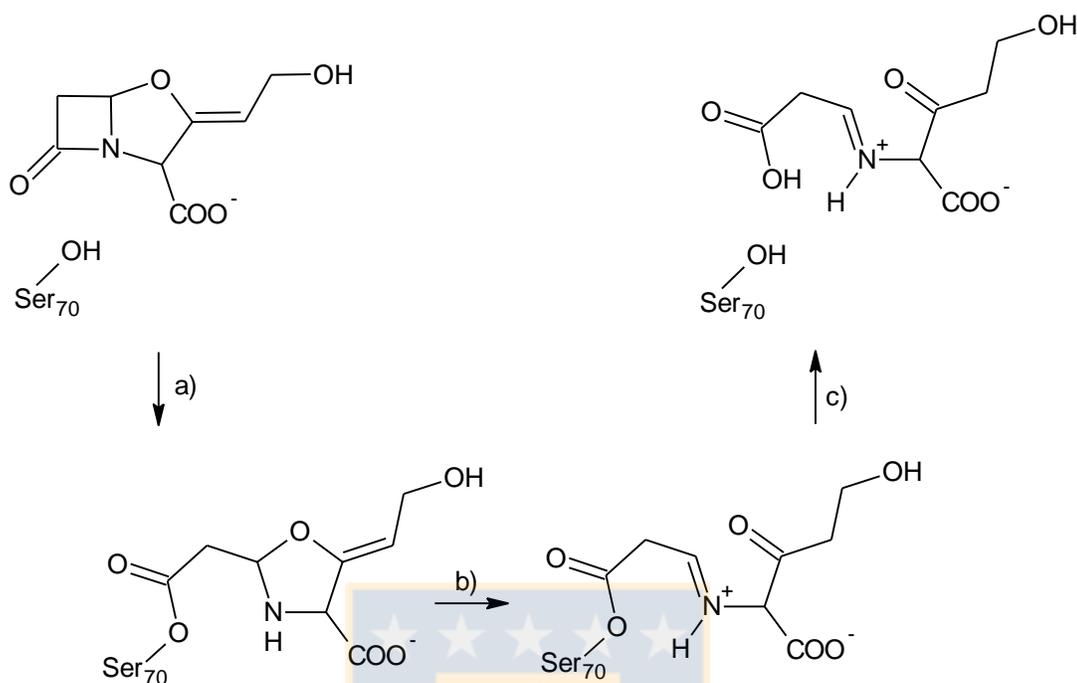
Una estrategia probada para superar este mecanismo de resistencia a los antibióticos es combinar un antibiótico  $\beta$ -lactámico con un inhibidor de la enzima  $\beta$ -lactamasa. Es así como al final de la década de los 70, e inicio de los 80, tres inhibidores  $\beta$ -lactámicos fueron llevados a uso clínico: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, todos ellos contienen un anillo  $\beta$ -lactámico, Figura 2.



**Figura 2.** Inhibidores de enzimas beta-lactamasas con anillo beta-lactámico.

Fuente: Elaboración propia.

Estudios experimentales cinéticos y de espectroscopia de masa, combinados con estudios cristalográficos sugieren que los inhibidores ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam siguen caminos de reacción análogos, comenzando con la formación de un intermediario acil-enzima. Luego de la acilación, la apertura del anillo  $\beta$ -lactámico conduce a la formación de un intermediario de imonio, para finalmente llegar a la desacilación o inactivación irreversible, mediante hidrólisis del inhibidor y regeneración de la enzima  $\beta$ -lactamasa activa, Figura 3.



**Figura 3.** Mecanismo de inhibición de enzimas beta-lactamasas por ácido clavulánico; a) acilación, b) formación de intermediario de imina y c) hidrólisis del ácido clavulánico y regeneración de la enzima.

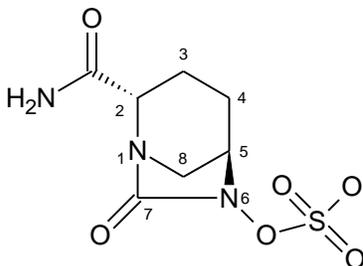
Fuente: Elaboración propia.

El uso clínico de inhibidores  $\beta$ -lactámicos ha disminuido debido a la creciente cantidad de nuevas enzimas contra las cuales estos inhibidores son inefectivos.

A pesar de la extensa investigación por parte de compañías farmacéuticas, no hay nuevos inhibidores  $\beta$ -lactámicos en el mercado en alrededor de 20 años, por lo que ha sido necesario el desarrollo de nuevos inhibidores no  $\beta$ -lactámicos.

Avibactam es un nuevo inhibidor no  $\beta$ -lactámico que inhibe enzimas de clase A, C y algunas de clase D. Avibactam es estructuralmente diferente de los inhibidores señalados previamente, ya que no contiene un anillo  $\beta$ -lactámico, Figura 4. Además, tiene un mecanismo inusual de inhibición, es decir, mientras la etapa de acilación procede de un modo similar al mecanismo de inhibición de enzimas  $\beta$ -

lactamasa por parte de inhibidores  $\beta$ -lactámicos vía apertura del anillo de Avibactam, la reacción es reversible, por lo cual la desacilación resulta en la regeneración del compuesto intacto y de la enzima, Figura 5.

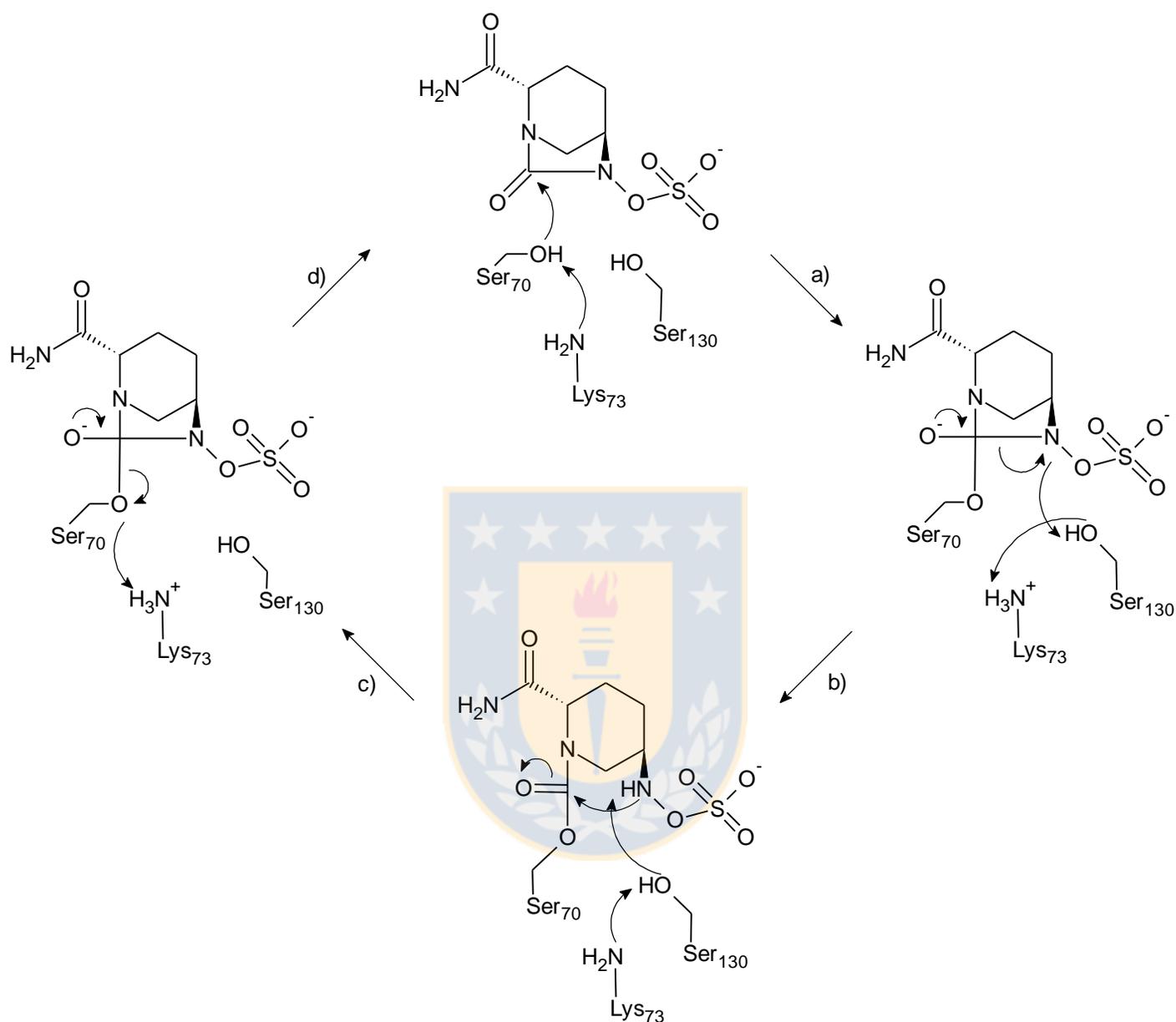


**Figura 4.** Estructura química de Avibactam.

Fuente: Elaboración propia.

Ambos pasos, acilación y desacilación, involucran una transferencia protónica facilitada por una catálisis ácido-base general. El ciclo catalítico consta de 4 etapas.

- a) **Activación del residuo Ser70 y formación del intermediario tetraédrico.** La activación del residuo Ser70 ocurre mediante abstracción del hidrógeno hidroxílico por parte del grupo amina del residuo Lys73 y ataque nucleofílico del oxígeno del residuo Ser70 hacia el carbono carbonílico del Avibactam.
- b) **Formación del complejo acil-enzima.** El átomo de nitrógeno del Avibactam es protonado mediante transferencia protónica por parte del hidrógeno hidroxílico del residuo Ser130, lo cual conduce a la ruptura del enlace C<sub>7</sub>-N<sub>6</sub> del Avibactam.
- c) **Regeneración del intermediario tetraédrico.** El protón enlazado al nitrógeno del Avibactam es abstraído por parte del residuo Ser130 y cierre del anillo, mediante formación del enlace C<sub>7</sub>-N<sub>6</sub> del Avibactam.
- d) **Regeneración del Avibactam y de la enzima.** El átomo de oxígeno del residuo Ser70 es protonado mediante transferencia protónica por parte del hidrógeno del grupo amonio del residuo Lys73, lo cual conduce a la ruptura del enlace O-C<sub>7</sub>.

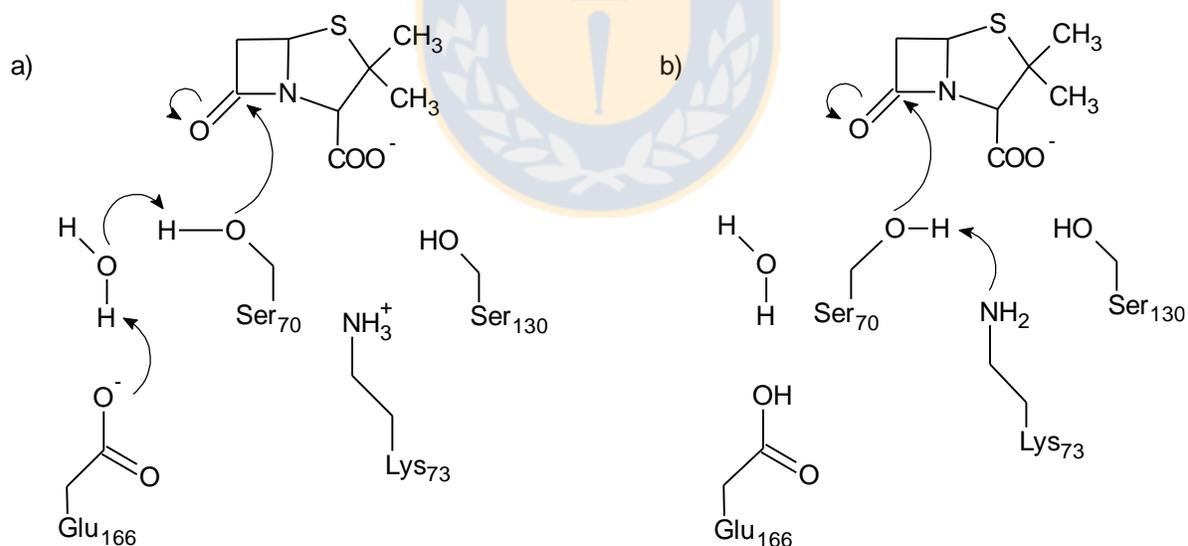


**Figura 5.** Mecanismo de inhibición de beta-lactamasas por Avibactam: a) Activación del residuo Ser70 y formación del intermediario tetraédrico; b) Formación del complejo acil-enzima; c) Regeneración del intermediario tetraédrico; d) Regeneración del Avibactam y de la enzima.

Fuente: Elaboración propia.

Esta diferencia mecánica de los inhibidores no  $\beta$ -lactámicos hace que aumente la efectividad de Avibactam en la protección del antibiótico contra la hidrólisis mediante enzimas  $\beta$ -lactamasas. Recientemente el compuesto Avibactam fue aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), en combinación con ceftazidima, para el tratamiento de infecciones intra-abdominales complicadas e infecciones del tracto urinario.

A pesar de la cantidad de artículos sobre el mecanismo de inhibición de las enzimas  $\beta$ -lactamasas por Avibactam, aun existen algunos aspectos que siguen siendo desconocidos y controversiales. En consecuencia, hay puntos de vista alternativos para el mecanismo de activación del residuo de serina durante la acilación, para el caso de la enzima CTX-M-15, Figura 6. En una perspectiva, el residuo aminoacídico Glu166 activa el residuo Ser70, mediante desprotonación del oxígeno hidroxílico a través de una molécula de agua. La segunda propuesta involucra al residuo Lys73 como la base responsable para la activación del residuo Ser70.



**Figura 6.** Mecanismos propuestos para la activación del residuo Ser70: a) mediada por Glu166 y b) mediada por Lys73.

Fuente: Elaboración propia.

Adicionalmente, el origen del átomo de hidrógeno que protona el átomo de nitrógeno N<sub>6</sub> de Avibactam no ha sido claramente elucidado. Por otro lado, para la subsecuente reciclación de Avibactam, se han propuesto diferentes residuos que juegan el rol de base responsable para la reciclación reversible. El átomo de nitrógeno N<sub>6</sub> debe estar desprotonado para facilitar el ataque intramolecular del carbono C<sub>7</sub> hacia el nitrógeno N<sub>6</sub> produciéndose nuevamente la reciclación del anillo. Ninguno de estos puntos han sido claramente elucidados y permanecen como controversiales. Por lo tanto, un estudio detallado del mecanismo de reacción a nivel molecular debería mejorar la comprensión de la inhibición de las enzimas  $\beta$ -lactamasas por Avibactam, que a su vez podrían ser importantes para el desarrollo de nuevos antibióticos e inhibidores.

#### 1.4 Propuesta de investigación

En esta tesis, se estudia el mecanismo de acilación de la enzima  $\beta$ -lactamasa de clase A, denominada CTX-M-15 por Avibactam mediante el uso de métodos químico computacionales. El estudio incluye simulaciones de dinámica molecular (MD), exploración de la superficie de energía potencial (SEP) QM/MM, la zona QM incluye al inhibidor Avibactam, y los residuos aminoacídicos Ser70, Lys73, Ser130 y Glu166; mientras que la zona MM incluye el resto de la enzima.

El objetivo principal de este estudio es contribuir a comprender a nivel molecular como ocurre la inactivación de la enzima CTX-M-15 por Avibactam, esto es determinar si el mecanismo es concertado o por etapas, sincrónico u asincrónico; así también se evaluará/n la/s correspondiente/s barrera/s de energía de activación. Además, se estudia el rol de los residuos aminoacídicos tanto en la activación de la serina catalítica (Ser70) como en la protonación del átomo N<sub>6</sub> del inhibidor Avibactam. Los puntos críticos observados en la SEP son caracterizados con cálculos de frecuencia e IRC (intrinsic reaction coordinate).

Se espera que estos resultados sean de interés para el desarrollo racional de nuevos antibióticos e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas

## 1.5 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 1.5.1 Hipótesis

En la presente tesis se postulan la siguiente hipótesis:

1. El residuo aminoacídico Ser70 es el único residuo catalítico, responsable tanto del ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico, C<sub>7</sub>, por parte del oxígeno hidroxílico, como de la transferencia protónica hacia el átomo de nitrógeno del Avibactam, N<sub>6</sub>, por parte del hidrógeno hidroxílico.

### 1.5.2 Objetivos

**Objetivo general:** Investigar el mecanismo de inhibición propuesto en la hipótesis de la enzima  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 por Avibactam, mediante un estudio combinado de dinámica molecular y cálculos QM/MM.

**Objetivos específicos:**

1. Dinámica Molecular: Realizar simulaciones de dinámica molecular del complejo enzima-Avibactam, para diferentes estados de protonación de los residuos Glu166 y Lys73, a fin de obtener una estructura representativa del sitio activo, la cual será usada para la exploración de la SEP.
2. Exploración de la SEP: Estudiar el mecanismo propuesto, mediante la exploración de la SEP usando cálculos QM/MM, los cuales permiten incorporar los efectos del ambiente proteico sobre la reacción.
3. Caracterizar los puntos críticos observados en la SEP utilizando un modelo clusterizado del sitio activo.

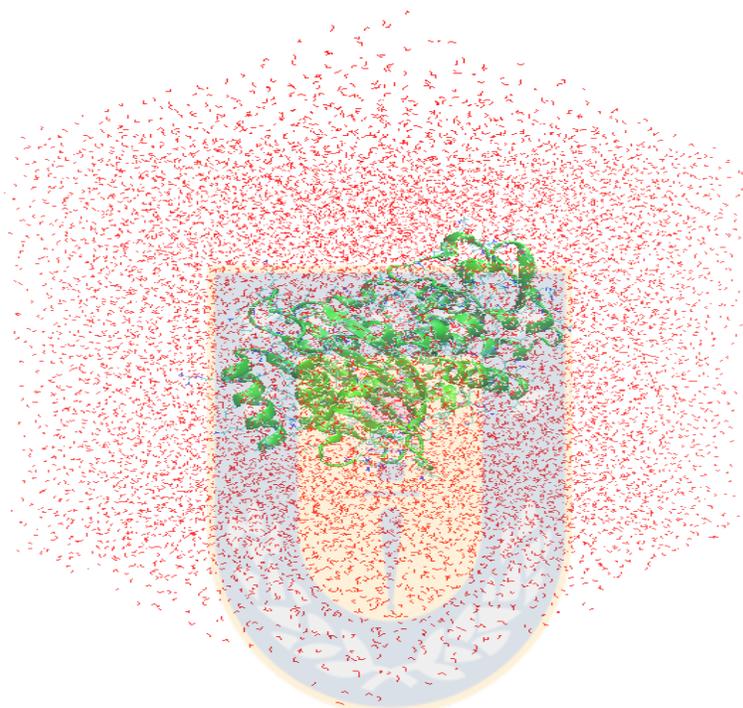
## CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA

### 2.1 Construcción del sistema enzima sustrato

La estructura cristalina de la enzima  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 determinada a 1,1 Å de resolución, con código PDB (Protein Data Bank) 4HBU y que se encuentra cristalizada con el inhibidor Avibactam, se tomó como estructura de partida para todas las simulaciones de dinámica molecular. Esta estructura cristalina está compuesta por un monómero de 261 residuos aminoacídicos y el inhibidor Avibactam.

Los estados de protonación fueron asignados de acuerdo a los valores de pKa obtenidos por el software PROPKA 3.0 a pH 7, el cual permite predecir el pKa de los grupos ionizables que se encuentran en una proteína, usando información basada en la posición y en la naturaleza química de los grupos cercanos a estos sitios ionizables. Se ha demostrado que la mayoría de las predicciones de pKa usando PROPKA tienen una desviación con respecto al valor experimental de  $\pm 1.0$  unidad de pKa. Por lo tanto, a pesar de su carácter empírico, PROPKA permite obtener una estimación razonable de los valores de pKa para los residuos ionizables en una proteína. De acuerdo a los resultados de PROPKA, los residuos aminoacídicos Lys73 y Lys234 deberían estar protonados, mientras que el residuo Glu166 debería estar desprotonado. Sin embargo, dos tipos de simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo con el fin de determinar cuál de los dos sistemas es el que mejor describe las interacciones residuo-residuo y residuo-Avibactam. En un primer caso ambos residuos, Lys73 y Glu166, están sus formas iónicas, es decir, Lys73 como butilamonio y Glu166 como propionato, según su cadena lateral; y en el segundo caso ambos residuos aminoacídicos están en sus formas neutras, es decir, Lys73 como butilamina y Glu166 como ácido propiónico. La carga total del sistema para ambos casos fue de +3, por lo que se neutralizó con 3 iones cloro ( $\text{Cl}^-$ ), cada uno de ellos a 5 Å de distancia de los átomos periféricos de la enzima, usando para esto el visualizador VMD (Visual Molecular Dynamics). La estructura obtenida a partir de esto se centró en el centro geométrico del complejo enzima-sustrato para luego solvatarla con modelo de

agua TIP3, mediante una caja de solvatación con condiciones periódicas de contorno con dimensiones  $80\text{Å} \times 80\text{Å} \times 90\text{Å}$ , de modo que los átomos periféricos de la enzima se encuentren a  $20\text{Å}$  de las aristas de la caja de solvatación, Figura 7. Como resultado, el sistema final se compone de 48438 átomos en total, de los cuales 44466 corresponden a átomos de moléculas de agua y el resto a la proteína más Avibactam.



**Figura 7.** Imagen 3D del sistema en caja de agua.

Fuente: Elaboración propia.

## 2.2 Simulaciones de dinámica molecular

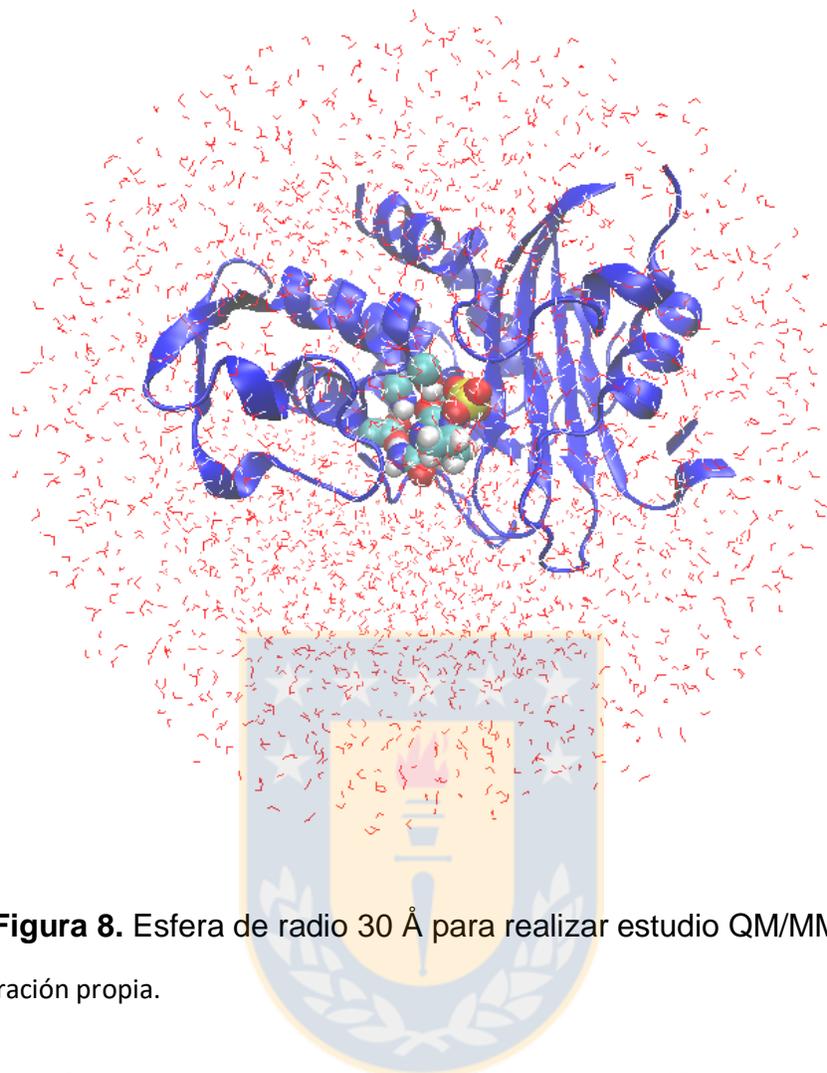
Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo utilizando el software NAMD con campo de fuerza CHARMM36. Los parámetros de CHARMM36 fueron obtenidos a través del software CGenFF (CHARMM General Force Field). Se utilizó el colectivo isobárico-isotérmico (NPT) y condiciones periódicas de contorno. Se mantuvo constante la presión y temperatura utilizando la implementación Nosé-Hoover. Las interacciones electrostáticas fueron calculadas

directamente dentro de un radio de corte de 12 Å, mientras que los efectos electrostáticos de largo alcance, fueron tomados en cuenta por el método PME (Particle Mesh Ewald). Las interacciones de Van der Waals fueron consideradas con el uso de una función “switch”, la cual suaviza el corte abrupto de estas interacciones a 12 Å, de esta forma a partir de 10 Å estas interacciones van disminuyendo gradualmente hasta 12 Å. Se procedió a minimizar el sistema con 400 ps de simulación y paso de integración de 1 fs, para luego equilibrar el sistema con 1000 ps (1ns) de simulación a 300 K con paso de integración de 2 fs. A partir de esto se realizó una dinámica de producción de 40 ns para ambos sistemas (forma iónica y neutra) sin restricciones harmónicas, con paso de integración de 2 fs totalizando 20000 estructuras. Durante las simulaciones, todos los movimientos intramoleculares asociados a los átomos de hidrógeno fueron restringidos usando el algoritmo SHAKE.

El análisis y visualización de las dinámicas (RMSD, RMSF, distancias, ángulos y energías de interacción) fue realizado con el software VMD y NAMD Energy.

### **2.3 Cálculos QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics)**

Para la construcción del modelo QM/MM del sitio activo, se tomó una estructura a 30 ns de la dinámica molecular, para luego construir una esfera de 30 Å, centrada en el carbono carbonílico de Avibactam (centro de reacción), Figura 8. Así, este nuevo sistema que contiene 10972 átomos se ha dividido en dos subsistemas. Por un lado el subsistema QM (Quantum Mechanics) que tiene todos los átomos tratados cuánticamente, Avibactam y las cadenas laterales de los residuos aminoácidos Ser70, Lys73, Ser130 y Glu166. Por otro lado, el subsistema MM (Molecular Mechanics), contiene todos los átomos restantes. Para los átomos ubicados en la frontera QM/MM se aplicó el método de “link atom”, el cual agrega átomos de hidrógeno al carbono fronterizo para completar su valencia.



**Figura 8.** Esfera de radio 30 Å para realizar estudio QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.

### 2.3.1 Exploración de la superficie de energía potencial (SEP)

La parte QM del sistema se describió usando el hamiltoniano semiempírico AM1, mientras que la parte MM fue descrita mediante el campo de fuerza CHARMM36. La SEP fue explorada en términos de dos coordenadas simétricas,  $R_1$  y  $R_2$ . La coordenada  $R_1$ , definida como la distancia entre el oxígeno hidroxílico del residuo aminoacídico Ser70 y el carbono carbonílico de Avibactam, la cual da cuenta de la reacción de acilación; mientras que la coordenada  $R_2$ , definida como la distancia entre el hidrógeno hidroxílico del residuo aminoacídico Ser70 y el nitrógeno amídico de Avibactam, da cuenta de la transferencia protónica, Figura 9. Las coordenadas iniciales para la construcción de la SEP son  $R_1$ : 4.0 y  $R_2$ : 4.0, mientras que los valores finales fueron 1.3 y 0.9, respectivamente. La exploración

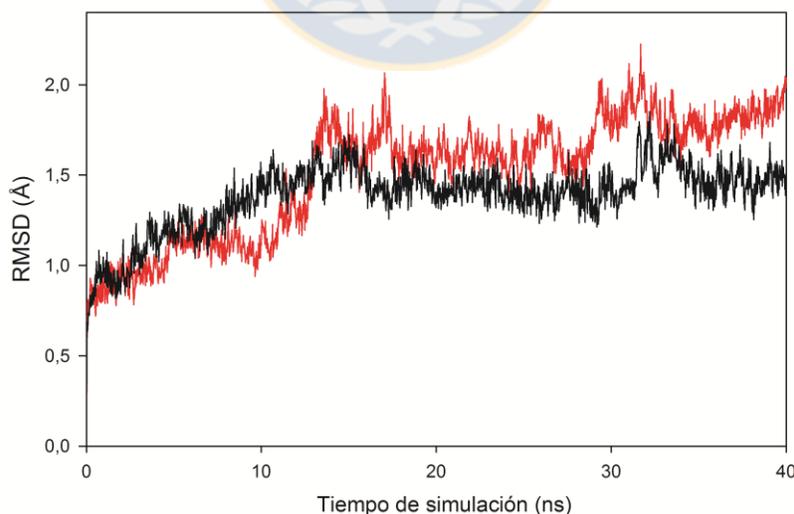


## CAPÍTULO 3: DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 3.1. Dinámica Molecular.

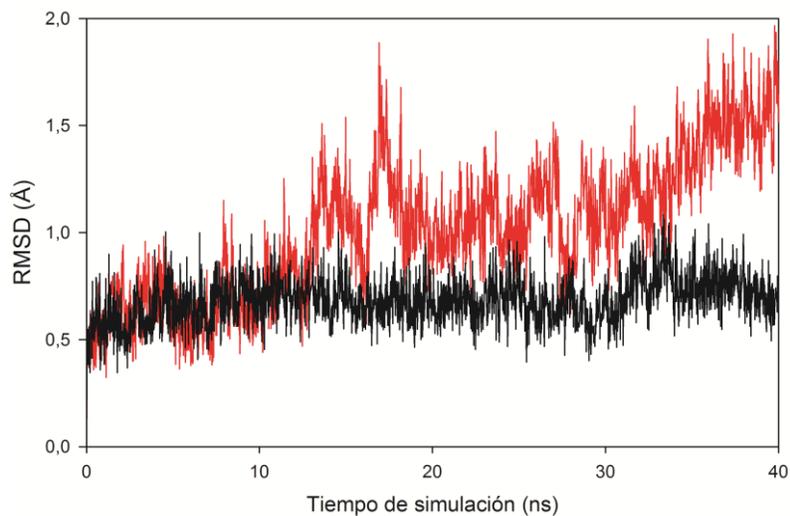
Debido a que los estados de protonación para los residuos Glu166 y Lys73 aún no se encuentran claramente establecidos, dos dinámicas moleculares a 40 ns se realizaron considerando dos formas del complejo enzima-sustrato, denominadas forma iónica y neutra. La primera considera los residuos Glu166 y Lys73 en su forma iónica o cargada, mientras que la segunda forma considera estos residuos en su forma neutra.

El análisis de RMSD (root mean square deviation), tanto para la proteína como para los residuos del sitio activo, muestra que el sistema a la forma iónica tiene un comportamiento más estable a lo largo de la simulación, comparado con lo observado en el sistema a la forma neutra, Figuras 10 y 11. Por otro lado, los resultados del análisis de RMSF (root mean square fluctuation), por residuos de la proteína, también muestran un comportamiento muy estable para la forma iónica comparada con la forma neutra, Figura 12, de acuerdo a lo observado anteriormente en el RMSD.



**Figura 10.** Gráfico RMSD de la proteína. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

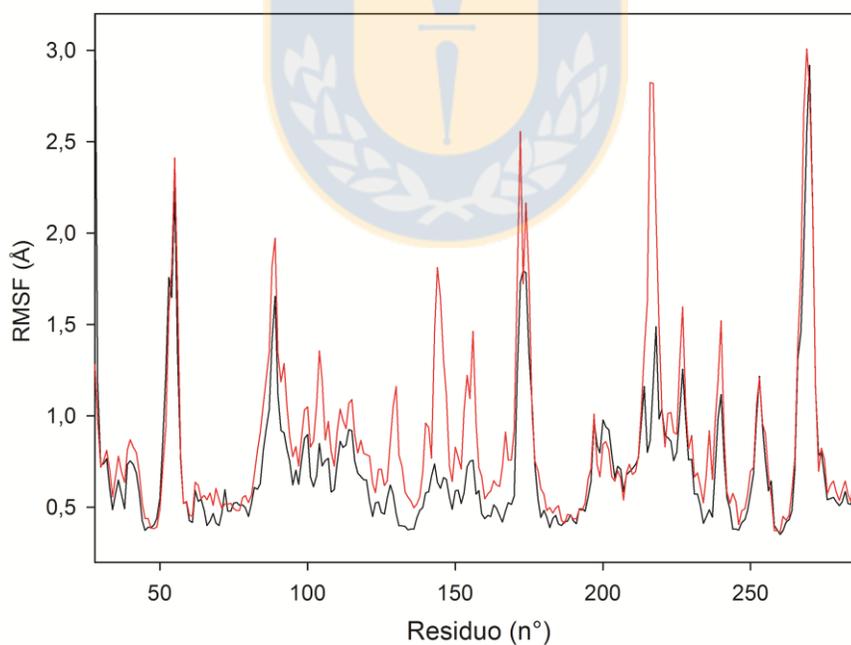
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 11.** Gráfico RMSD de los residuos del sitio activo. Negro: forma iónica;

Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.

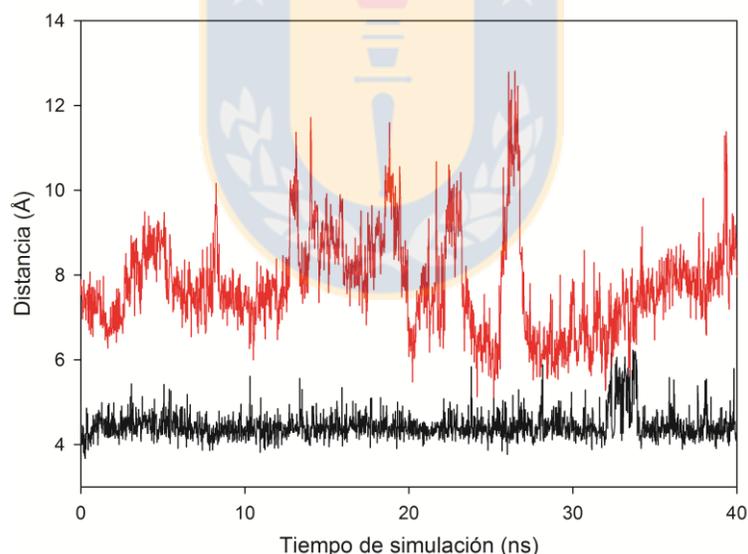


**Figura 12.** Gráfico RMSF por residuo de la proteína. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.

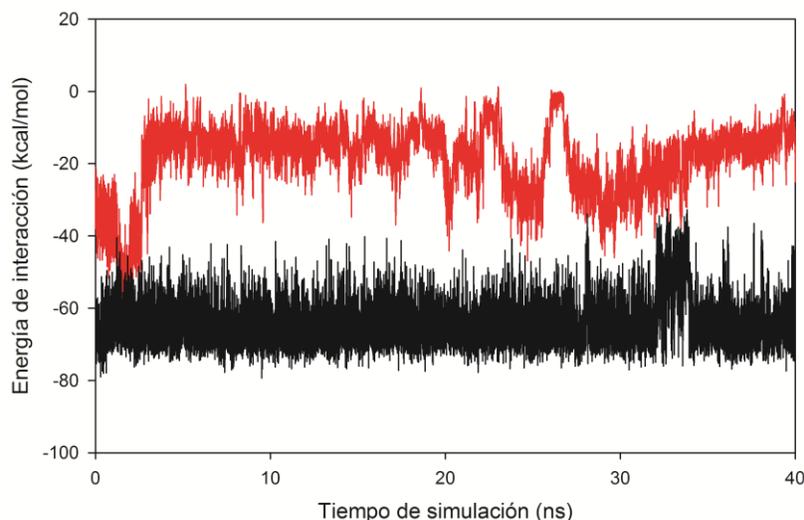
A continuación se describen las interacciones residuo-Avibactam y residuo-residuo más relevantes encontradas en las simulaciones de dinámica molecular.

**Interacción Lys234-Avibactam:** Para evaluar esta interacción se determinó la distancia entre el nitrógeno de la cadena lateral del residuo Lys234 y el átomo de azufre del grupo sulfato del Avibactam, además de la energía de interacción total entre el residuo Lys234 y Avibactam. Para la forma iónica se observó una distancia promedio de 4.44 Å con una desviación estándar (DE) de 0.33 y una importante energía de interacción de -64.35 kcal/mol (DE=6.33). En cambio, para la forma neutra, la distancia promedio fue de 7.76 Å (DE=1.15) y energía de interacción total de -18.57 kcal/mol, Figuras 13 y 14. Por lo tanto, el grupo sulfato ubicado en uno de los extremos del sustrato Avibactam tiene una importante interacción electrostática con el grupo amonio de la cadena lateral del residuo Lys234, Figura 15, fijando un extremo del Avibactam a la enzima.



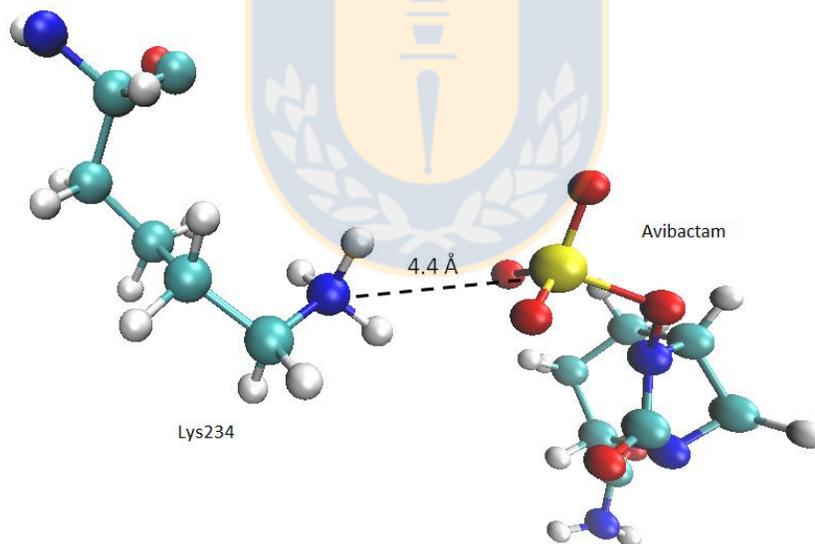
**Figura 13.** Gráfico de distancia entre el átomo de nitrógeno de la cadena lateral del residuo Lys234 y el átomo de azufre del grupo sulfato de Avibactam. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 14.** Gráfico de energía de interacción entre Lys234 y Avibactam. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.

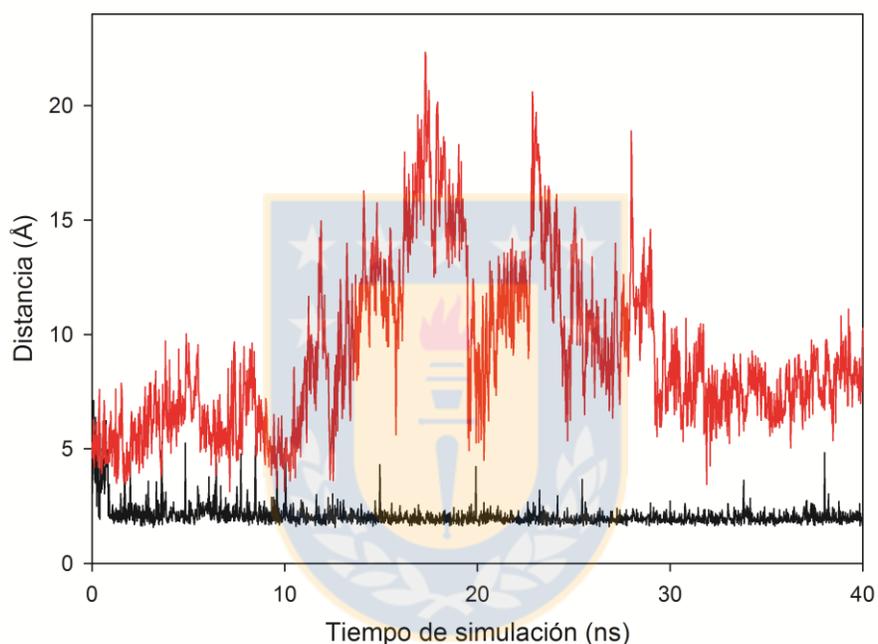


**Figura 15.** Imagen 3D sobre interacción entre el residuo Lys234 y Avibactam, en sistema a la forma iónica.

Fuente: Elaboración propia.

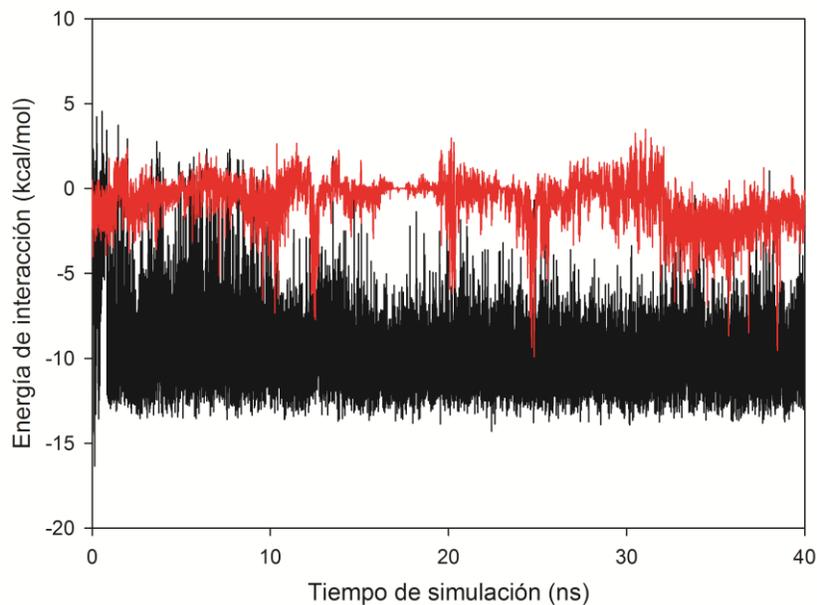
**Interacción Asn104-Avibactam:** Para la forma iónica se observó una distancia promedio de 2.08 Å (DE=0.50) entre el hidrógeno del grupo carboxamida del

residuo Asn104 y el oxígeno carbonílico del grupo amida del Avibactam, mientras que la forma neutra mostró una distancia promedio de 9.1 Å (DE=3.51), Figura 16. Las respectivas energías de interacción para la forma iónica y neutra fueron -9.57 kcal/mol (DE=2.40) y -0.67 kcal/mol (DE=1.23), Figura 17. Esto se debe a que el grupo carboxamida del Avibactam, interactúa con el grupo carboxamida de la cadena lateral del residuo Asn104, mediante enlaces de hidrógeno de tipo O...H-N, anclando el otro extremo del Avibactam a la enzima, Figura 18.



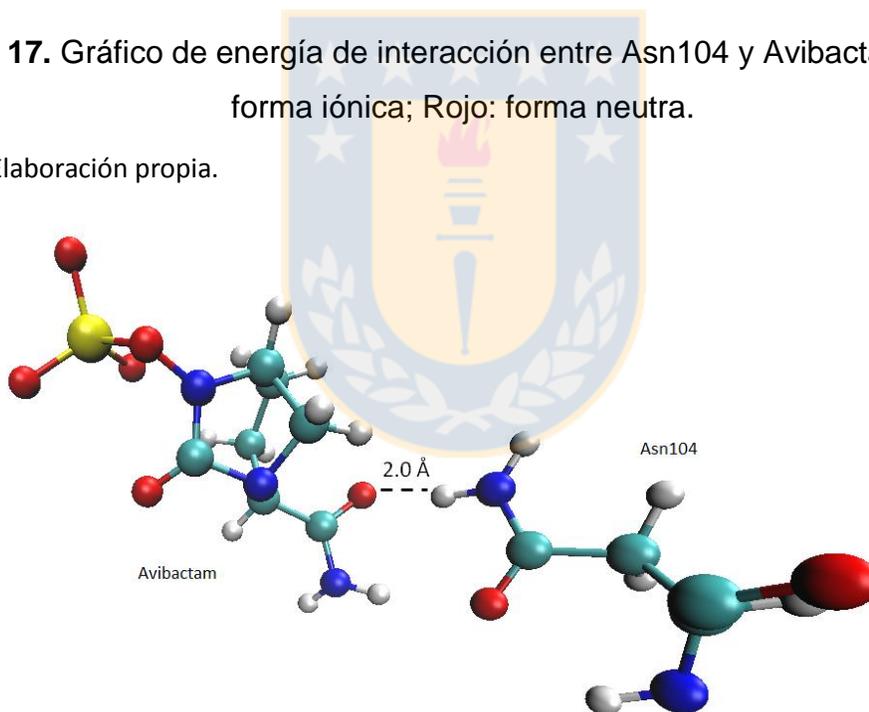
**Figura 16.** Gráfico de distancia entre el hidrógeno del grupo amida del residuo Asn104 y el oxígeno carbonílico del grupo amida del Avibactam. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 17.** Gráfico de energía de interacción entre Asn104 y Avibactam. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.



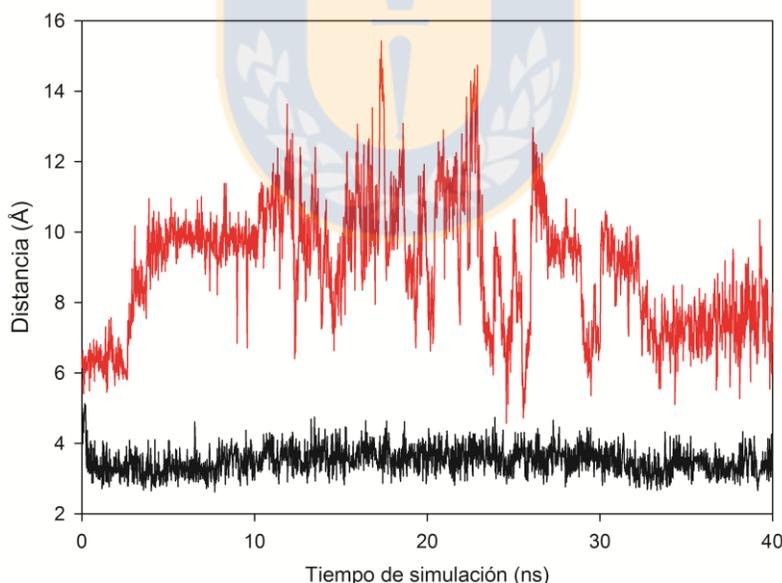
**Figura 18.** Imagen 3D sobre interacción entre el residuo Asn104 y Avibactam, en sistema a la forma iónica.

Fuente: Elaboración propia.

**Interacción Lys73-Avibactam:** Se evaluó la distancia entre el nitrógeno de la cadena lateral del residuo Lys73 y el oxígeno carbonílico del Avibactam, además

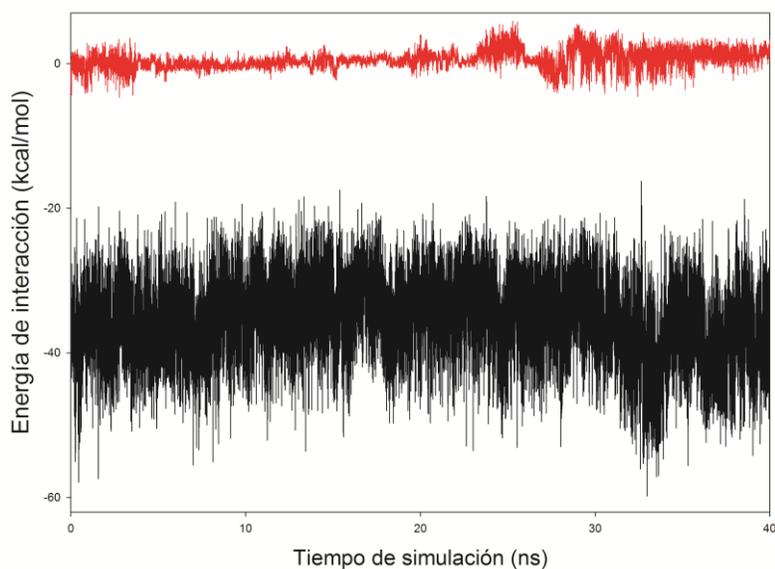
de la energía de interacción total entre el residuo Lys73 y Avibactam. Para la forma iónica, se observó una distancia promedio de 3.50 Å (DE=0.38) y energía de interacción total de -35.4 kcal/mol (DE=5.75), en cambio, para la forma neutra, la distancia promedio fue de 8.97 Å (DE=1.80) y energía total de 0.55 kcal/mol (DE=1.21), Figuras 19 y 20.

Se concluye que el nitrógeno de la cadena lateral del residuo Lys73 interactúa con el oxígeno carbonílico del Avibactam, mediante interacción de tipo electrostática fuerte en el caso de la forma iónica, contrariamente a lo observado para la forma neutra, anclando el Avibactam al sitio activo y localizándolo en una óptima posición para el ataque nucleofílico por parte del oxígeno hidroxílico del residuo Ser70 y el carbono carbonílico C<sub>7</sub> del Avibactam, y al mismo tiempo dejando expuesto el par de electrones del átomo de nitrógeno N<sub>6</sub> para realizar la transferencia protónica desde el hidrógeno hidroxílico del residuo Ser70 hacia el nitrógeno N<sub>6</sub> del Avibactam, Figura 21.



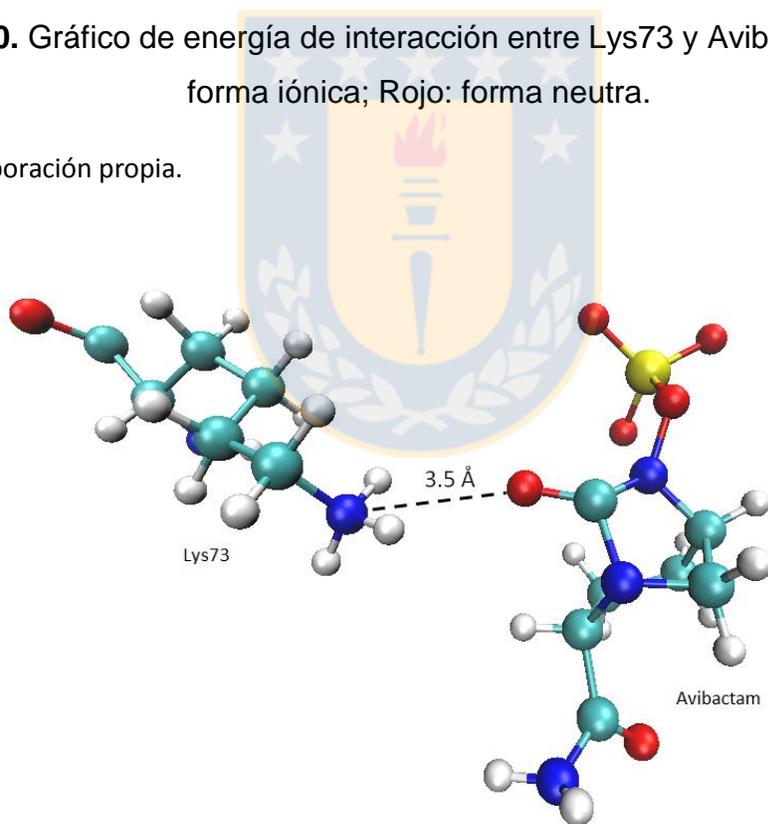
**Figura 19.** Gráfico de distancia entre el nitrógeno de la cadena lateral del residuo Lys73 y el oxígeno carbonílico del Avibactam. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 20.** Gráfico de energía de interacción entre Lys73 y Avibactam. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

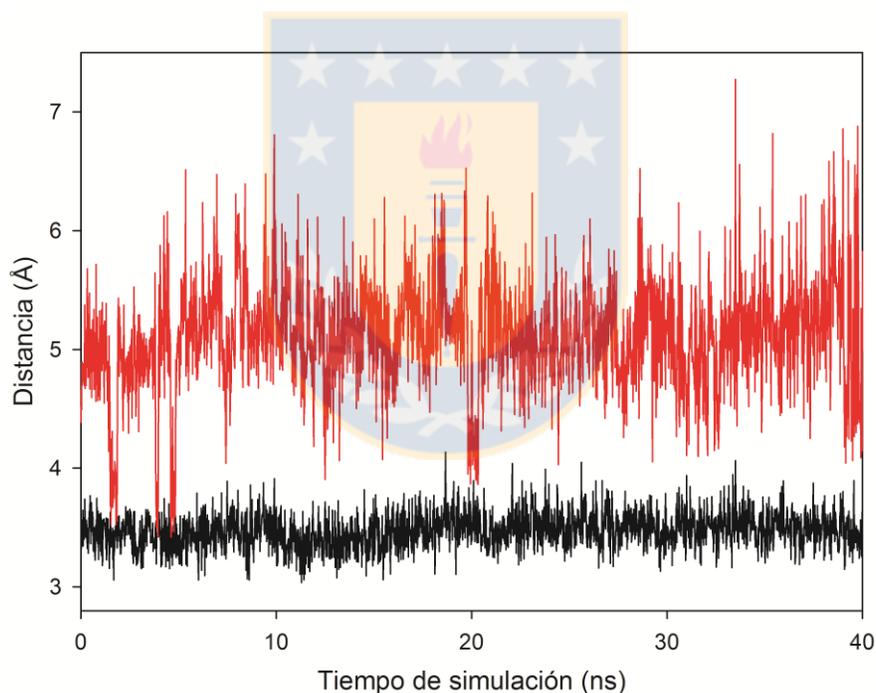
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 21.** Imagen 3D sobre interacción entre el residuo Lys73 y Avibactam, en sistema a la forma iónica.

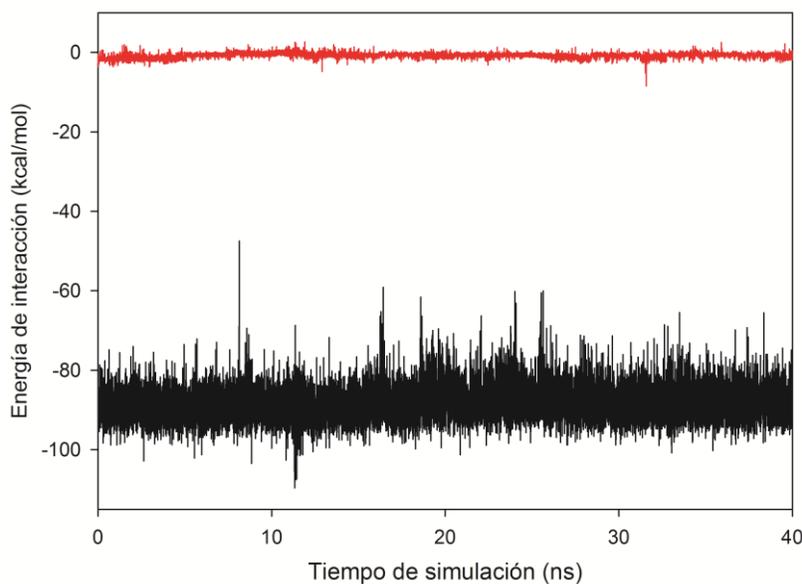
Fuente: Elaboración propia.

**Interacción Lys73-Glu166:** Se estudió la evolución de la distancia entre el nitrógeno de la cadena lateral del residuo Lys73 y el carbono carbonílico del grupo carboxilato del residuo Glu166, además de la energía de interacción total entre ambos residuos. Para la forma iónica, se observó una distancia promedio de 3.47 Å (DE=0.15) y energía de interacción total de -88.48 kcal/mol (DE=4.00), en cambio, para la forma neutra, la distancia promedio fue de 5.10 Å (DE=0.48) y energía de interacción total de -0.82 kcal/mol (DE=0.58), Figuras 22 y 23. Por lo tanto, en la forma iónica, el sistema adquiere una mayor estabilidad, mediante una fuerte interacción electrostática entre el grupo carboxilato de Glu166 y el grupo amonio de Lys73, Figura 24, manteniendo la red de interacciones entre residuos del sitio activo y con ello una posición adecuada para la catálisis.



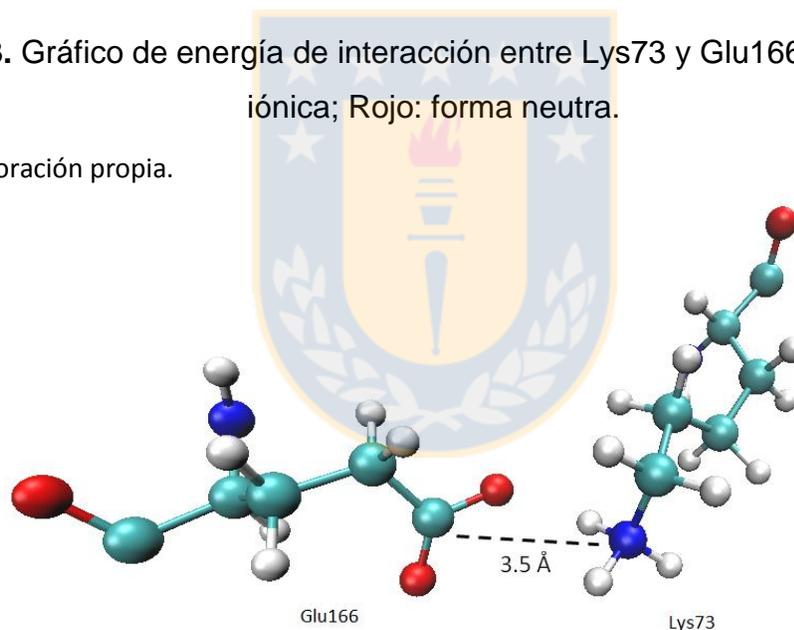
**Figura 22.** Gráfico de distancia entre el nitrógeno de la cadena lateral del residuo Lys73 y el carbono carbonílico del grupo carboxilato del residuo Glu166. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 23.** Gráfico de energía de interacción entre Lys73 y Glu166. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.

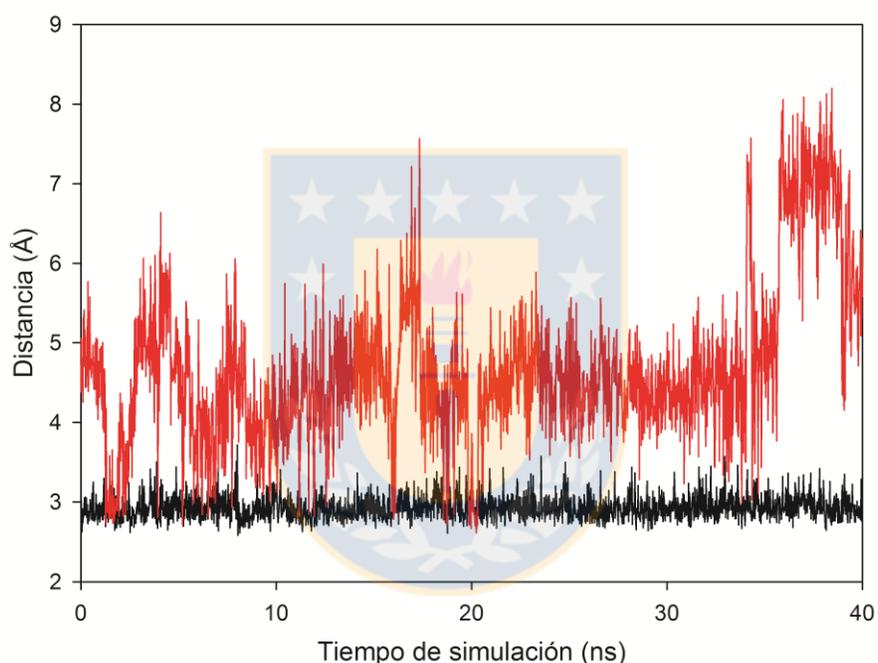


**Figura 24.** Imagen 3D sobre interacción entre el residuo Lys73 y Glu166, en sistema a la forma iónica.

Fuente: Elaboración propia.

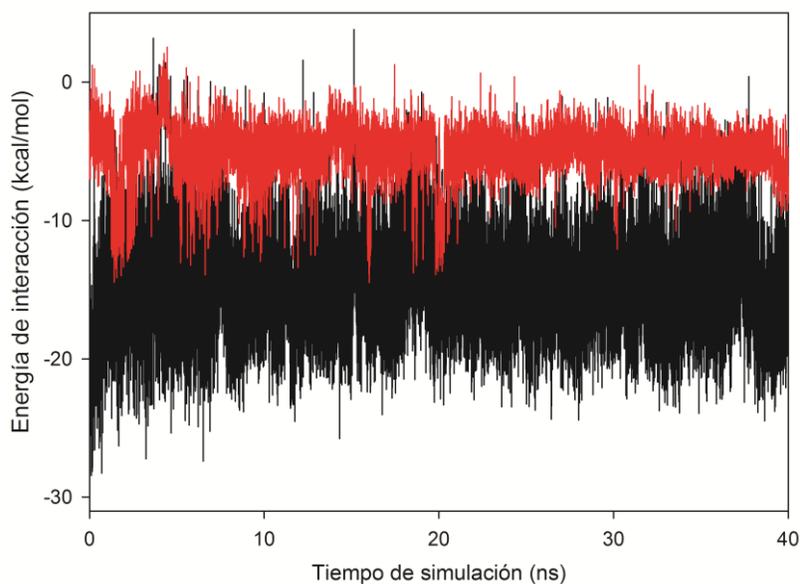
**Interacción Lys73-Ser70:** Se evaluó la distancia entre el nitrógeno de la cadena lateral del residuo Lys73 y el oxígeno hidroxílico del residuo Ser70, además de la

energía de interacción total entre ambos residuos. Para la forma iónica, se observó una distancia promedio estable de 2.93 Å (DE=0.15) y energía de interacción total de -14.66 kcal/mol (DE=3.75), en cambio, para la forma neutra, la distancia promedio fue de 4.68 Å (DE=0.99) y energía de interacción total de -5.02 kcal/mol (DE=1.82), Figuras 25 y 26. Los resultados muestran una importante interacción electrostática entre el residuo Lys73 y el residuo Ser70 para la forma iónica, Figura 27, fijando al residuo Ser70 en una posición óptima para la reacción con Avibactam.



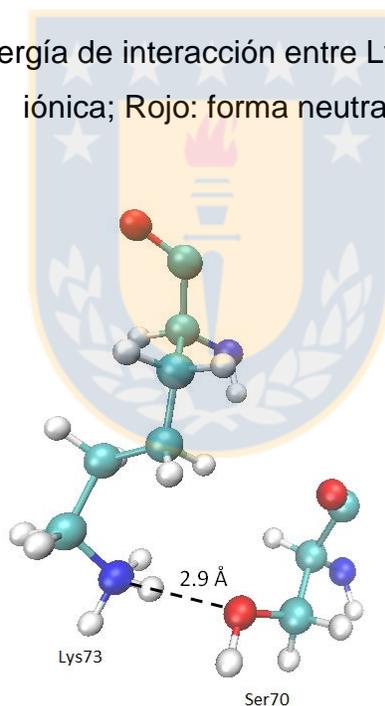
**Figura 25.** Gráfico de distancia entre el nitrógeno de la cadena lateral del residuo Lys73 y el oxígeno hidroxílico del residuo Ser70. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 26.** Gráfico de energía de interacción entre Lys73 y Ser70. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.

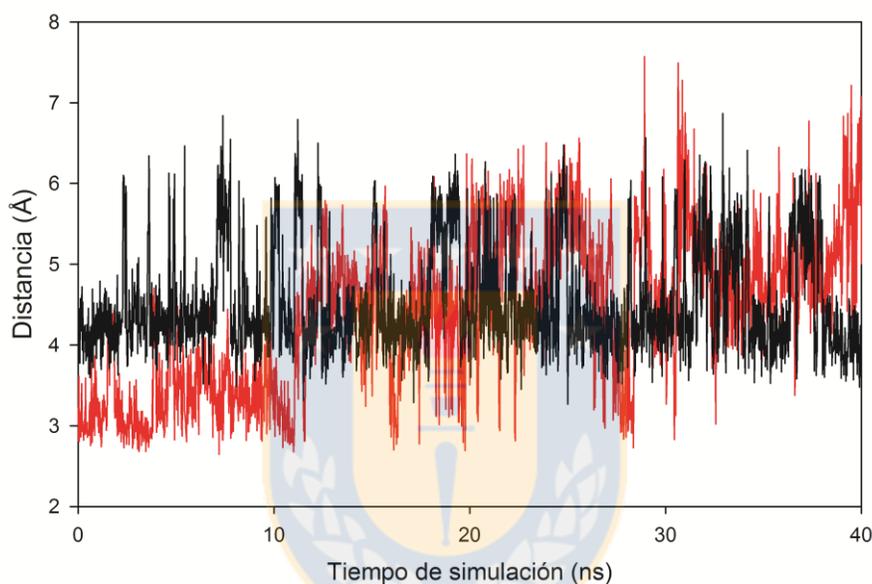


**Figura 27.** Imagen 3D sobre interacción entre el residuo Lys73 y Ser70, en sistema a la forma iónica.

Fuente: Elaboración propia.

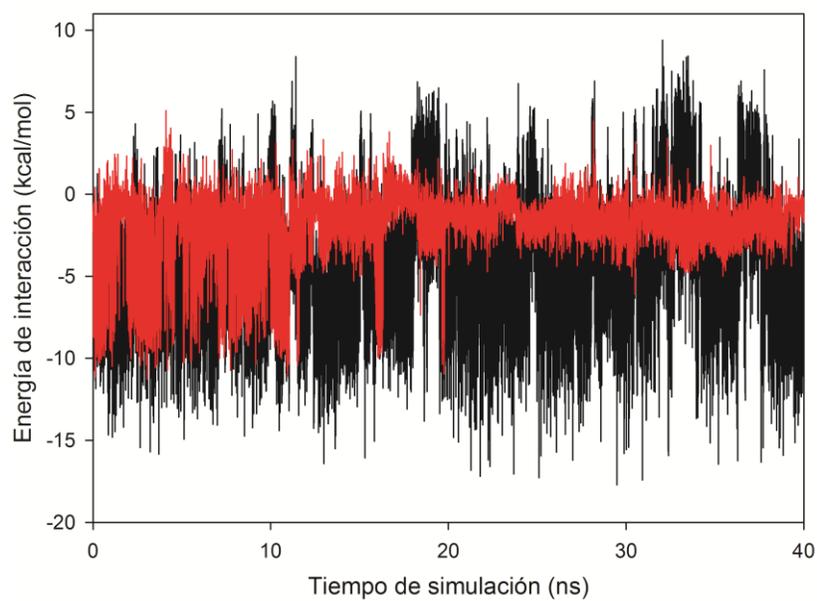
**Interacción Lys73-Ser130:** Se determinó la distancia entre el nitrógeno de la cadena lateral del residuo Lys73 y el oxígeno hidroxílico del residuo Ser130,

además de la energía de interacción total entre ambos residuos. Para la forma iónica, se observó una distancia promedio de 4.52 Å (DE=0.67) y energía de interacción total de -4.49 kcal/mol (DE=3.65), en cambio, para la forma neutra, la distancia promedio fue de 4.39 Å (DE=0.96) y energía de interacción total de -1.97 kcal/mol (DE=2.00), Figuras 28 y 29. Esta interacción electrostática débil pero no menos importante, sirve para dejar en óptima posición al residuo Ser130 para que interaccione con el Avibactam, y con ello facilitar la catálisis, Figura 30.



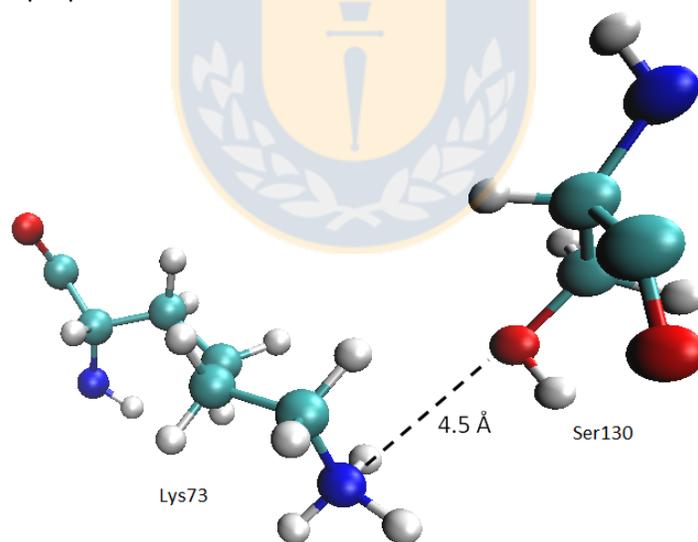
**Figura 28.** Gráfico de distancia entre el nitrógeno de la cadena lateral del residuo Lys73 y el oxígeno hidroxílico del residuo Ser130. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 29.** Gráfico de energía de interacción entre Lys73 y Ser130. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.

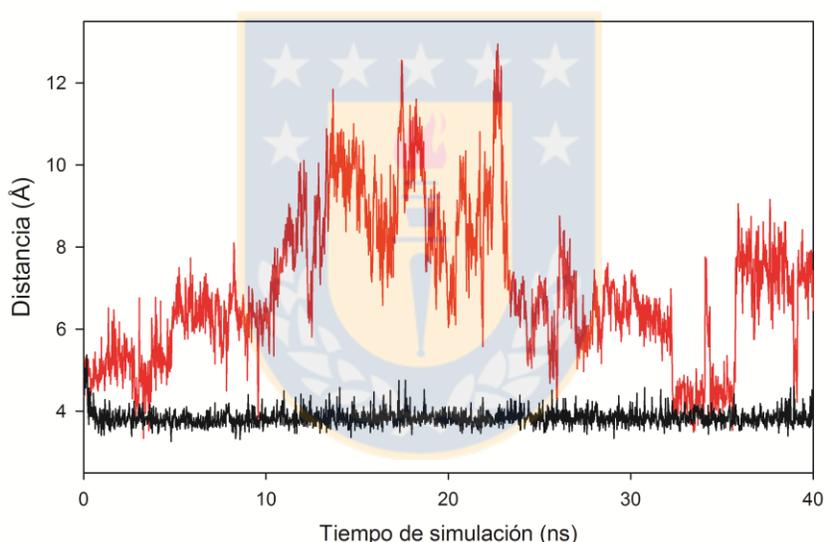


**Figura 30.** Imagen 3D sobre interacción entre el residuo Lys73 y Ser130, en sistema a la forma iónica.

Fuente: Elaboración propia.

**Interacción Ser70-Avibactam:** Debido a que se postula que la reacción de inhibición ocurre mediante el ataque del residuo Ser70 sobre el carbonilo de Avibactam, fue necesario evaluar lo siguiente:

a) Distancia entre el oxígeno hidroxílico del residuo Ser70 y el carbono carbonílico C<sub>7</sub> del Avibactam: Para la forma iónica, se observó un distancia promedio estable de 3.84 Å (DE=0.20), en cambio, para la forma neutra, la distancia promedio fue de 6.98 Å (DE=1.77), Figura 31. Por lo tanto, la forma iónica describe de mejor forma la interacción entre estos grupos, manteniendo una distancia optima para el ataque nucleofílico por parte del oxígeno hidroxílico del residuo Ser70 hacia el carbono carbonílico C<sub>7</sub> del Avibactam.

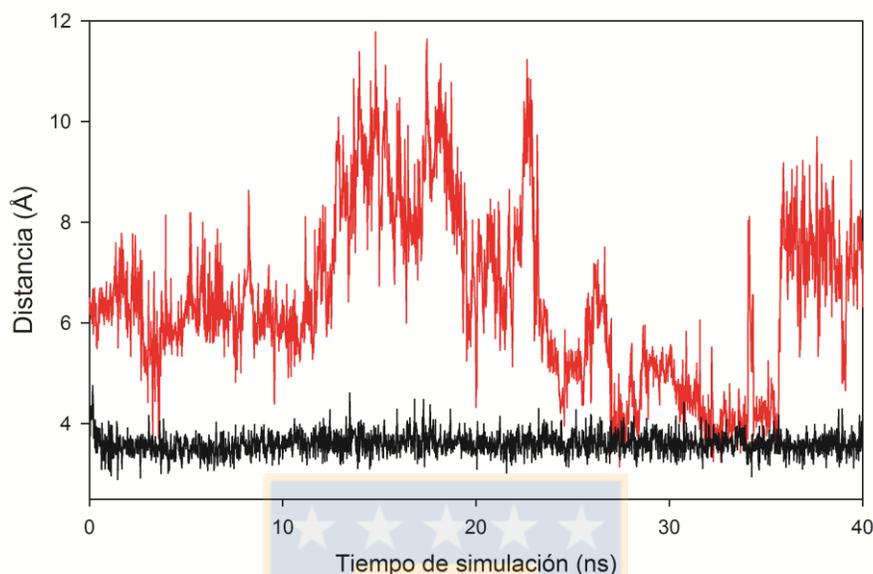


**Figura 31.** Gráfico de entre el oxígeno hidroxílico del residuo Ser70 y el carbono carbonílico C<sub>7</sub> del Avibactam. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.

b) Distancia entre el hidrógeno hidroxílico del residuo Ser70 y el nitrógeno N<sub>6</sub> del Avibactam: Para la forma iónica, se observó una distancia promedio estable de 3.60 Å (DE=0.22), en cambio, para la forma neutra, la distancia promedio fue de 6.45 Å (DE=1.69), Figura 32. De acuerdo a estos resultados la transferencia

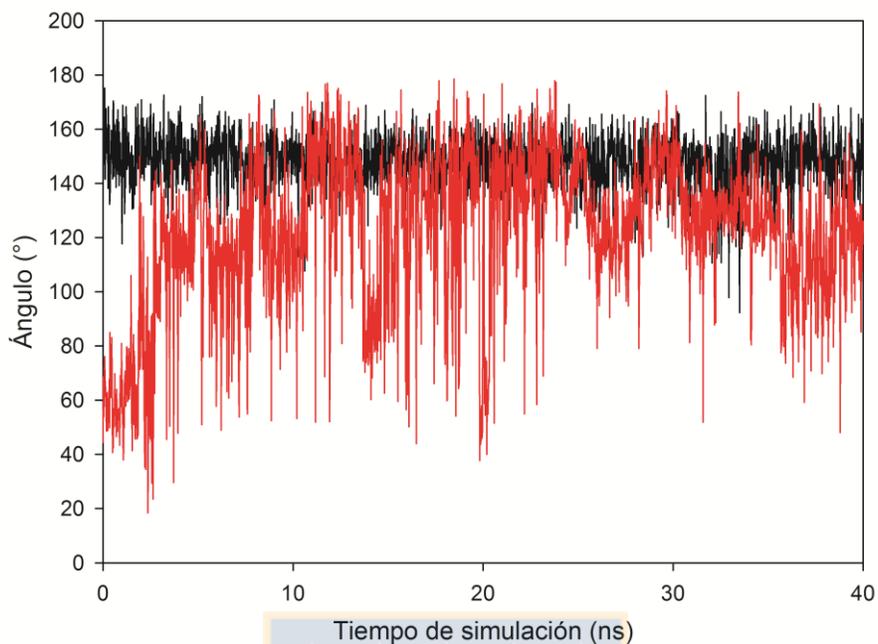
protónica por parte del hidrógeno hidroxílico del residuo Ser70 hacia el nitrógeno N<sub>6</sub> del Avibactam, sólo sería posible mediante la forma iónica.



**Figura 32.** Gráfico de distancia entre el hidrógeno hidroxílico del residuo Ser70 y el nitrógeno N<sub>6</sub> del Avibactam. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.

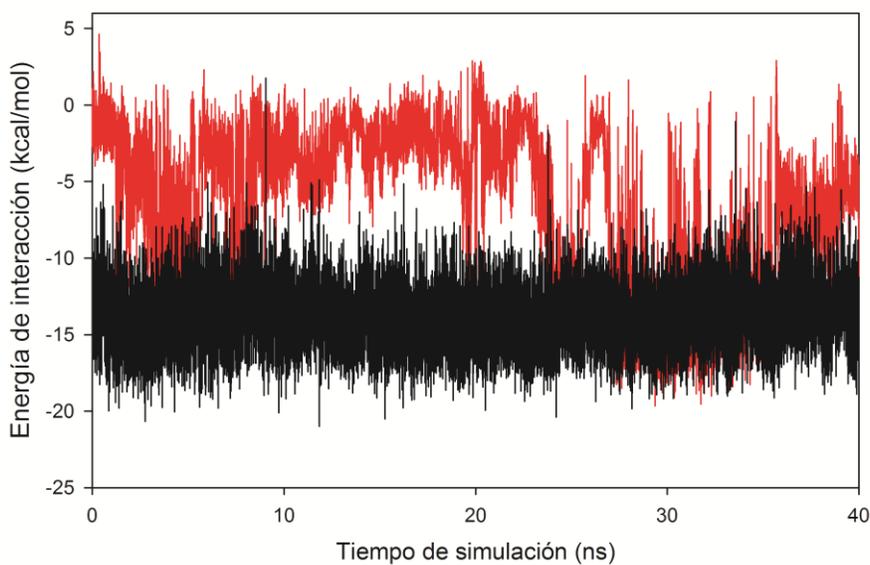
c) Ángulo entre los átomos Ser70-O-H...N-Avibactam: Debido a la importancia del ángulo O-H-N para la transferencia protónica, se monitoreó la evolución de este ángulo durante la simulación para ambas formas. Se observó que este ángulo muestra un comportamiento estable con un valor promedio de 150.89° (DE= 5.92) para la forma iónica, y para la forma neutra 121.55° (DE=29.22), Figura 33. Estos resultados sugieren que la orientación del protón hidroxílico del residuo Ser70 es adecuada para la protonación del nitrógeno N<sub>6</sub> del Avibactam, bajo la forma iónica, a diferencia de lo observado para la forma neutra.



**Figura 33.** Gráfico de ángulo comprendido entre los átomos Ser70-O-H...N-Avibactam. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.

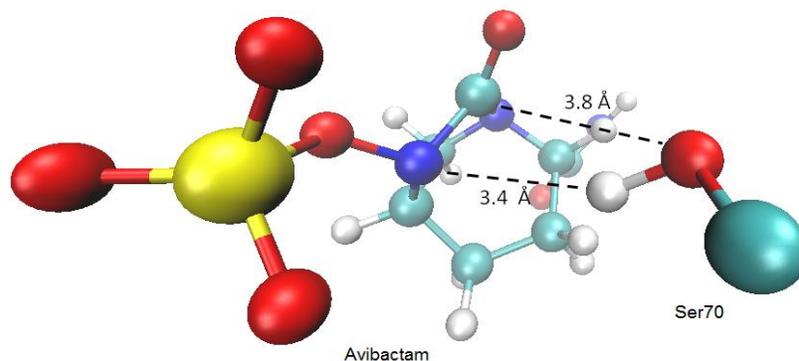
d) Energía de interacción total entre el residuo Ser70 y Avibactam: Las energías de interacción total para la forma iónica y neutra son de -13.82 kcal/mol (DE= 2.05) y -6.51 kcal/mol (DE=5.08), Figura 34, respectivamente. Por lo que el sistema a la forma iónica posee una interacción más fuerte y estable entre el residuo de Ser70 y Avibactam, lo cual es necesario para que ocurra la reacción de acilación.



**Figura 34.** Gráfico de energía de interacción entre Ser70 y Avibactam. Negro: forma iónica; Rojo: forma neutra.

Fuente: Elaboración propia.

A la luz de estos resultados se concluye que sólo bajo la forma iónica es posible tanto la reacción de acilación por parte del oxígeno hidroxílico del residuo Ser70 hacia el carbono carbonílico C<sub>7</sub> del Avibactam, como la transferencia protónica desde el hidrógeno hidroxílico del residuo Ser70 hacia el nitrógeno N<sub>6</sub> del Avibactam, Figura 35.



**Figura 35.** Imagen 3D sobre interacción entre el residuo Ser70 y Avibactam, en sistema a la forma iónica.

Fuente: Elaboración propia.

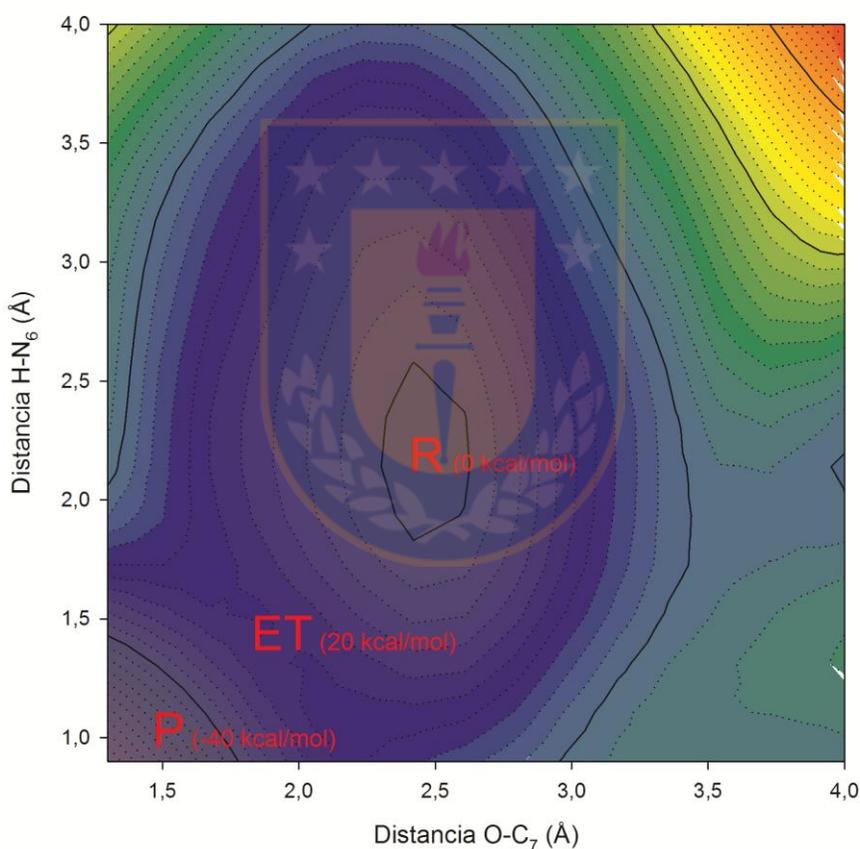
### 3.2. Cálculos QM/MM

Debido a que en las simulaciones de dinámica molecular para la forma neutra, las principales interacciones entre residuos y con Avibactam son débiles e inestables a lo largo de la simulación, se consideró sólo la forma iónica para los posteriores cálculos QM/MM. Esta forma a diferencia de la anterior, describe mejor el sistema en base a sus interacciones.

#### 3.2.1. Estudio AM1/CHARMM36

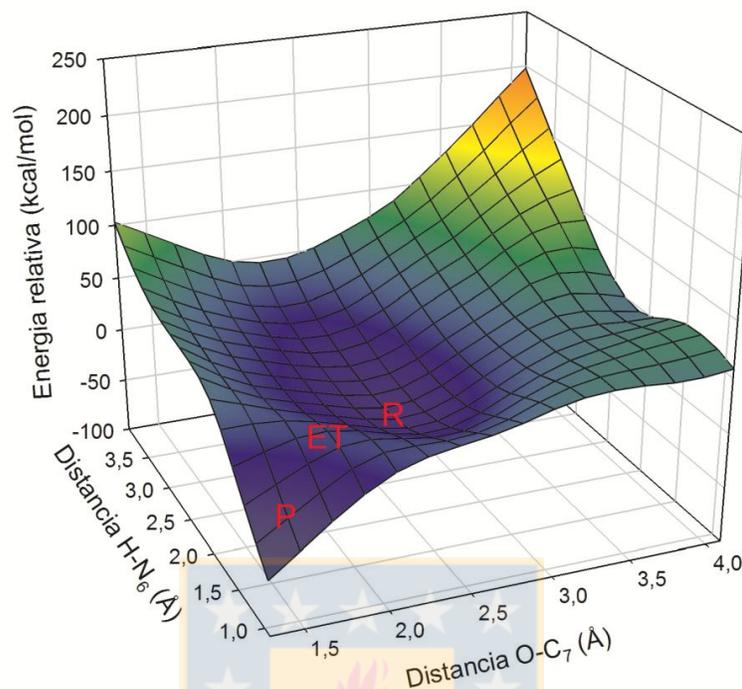
La superficie de energía potencial (SEP) a nivel semiempírico AM1/CHARMM36, fue explorada en términos de las coordenadas de reacción, R1 y R2, definidas previamente, Figuras 36 y 37, respectivamente. La SEP obtenida muestra tres puntos críticos, los cuales corresponden a los reactantes (R), estado de transición (ET) y producto (P). Según la topología de la SEP, se observa que la reacción ocurre mediante un mecanismo concertado sincrónico, es decir, el ataque

nucleofílico por parte del oxígeno hidroxílico del residuo Ser70 sobre el carbono carbonílico C<sub>7</sub> del Avibactam, ocurre en forma simultánea con la transferencia protónica desde el hidrógeno hidroxílico del residuo Ser70 al nitrógeno N<sub>6</sub> del Avibactam, vía un solo estado de transición ubicado en coordenadas R1 Y R2 de 2.0 y 1.5, respectivamente. La barrera de energía de activación es de 20 kcal/mol. El producto ubicado en coordenadas R1 y R2 de 1.5 y 1.0, respectivamente, está 40 kcal/mol más estabilizado que el reactante, por lo cual este proceso corresponde a una reacción exotérmica.



**Figura 36.** Vista 2D de la SEP AM1/CHARMM36.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 37.** Vista 3D de la SEP AM1/CHARMM36.

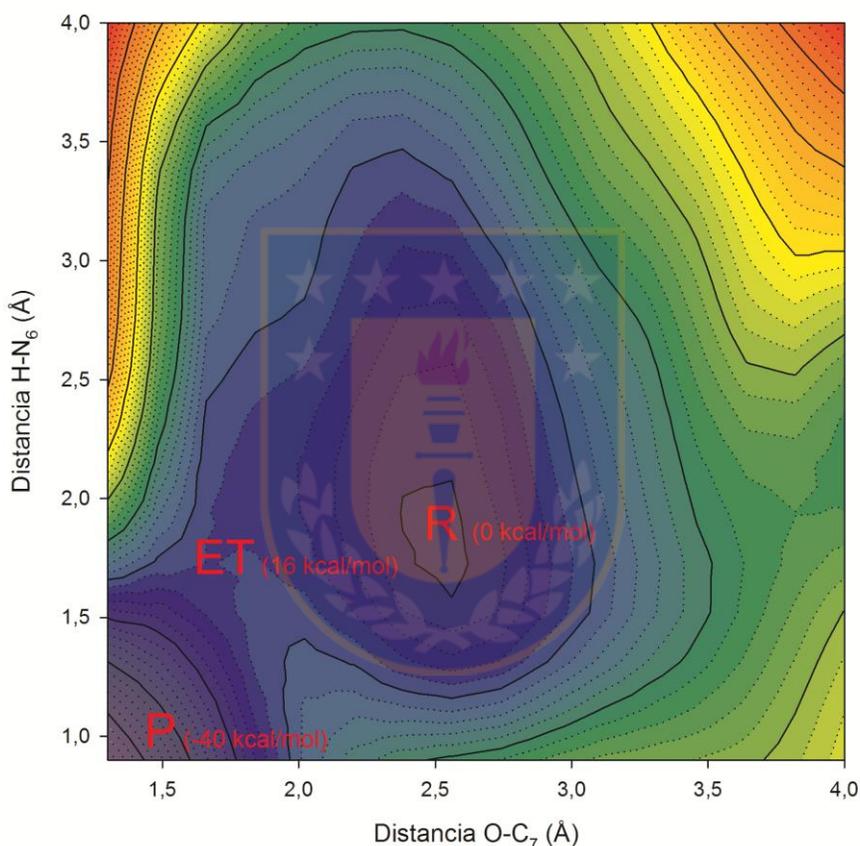
Fuente: Elaboración propia.

### 3.2.2. Corrección DFT de la SEP

Con el objetivo de mejorar la descripción semiempírica de la SEP, esta fue corregida mediante cálculos “single-point”, utilizando el funcional M06-2X a nivel 6-31+G(d,p), para cada estructura optimizada obtenida a partir de los cálculos AM1/MM. Todos estos cálculos fueron realizados utilizando los programas CHARMM y Q-Chem.

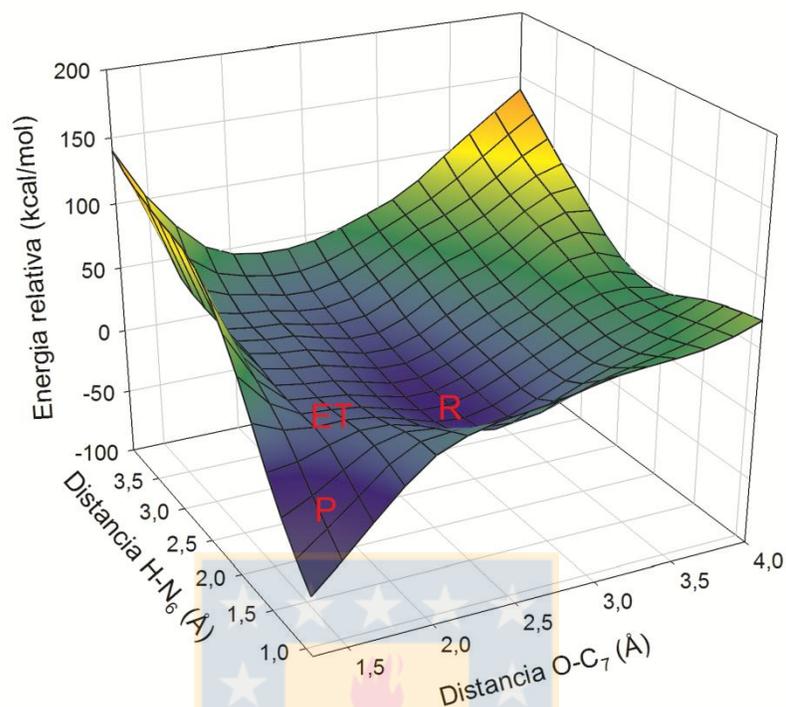
La SEP corregida se muestra en las Figuras 38 y 39. Con respecto a la topología de la SEP, se observa los siguientes cambios respecto a los observado en los cálculos AM1/MM. Los resultados del refinamiento sugieren que el mecanismo es concertado asincrónico, en el cual la coordenada R1, correspondiente a la acilación, precede a la coordenada R2, correspondiente a la transferencia protónica, a medida que la reacción avanza desde la zona de reactantes (R1 y R2

de 2.5 Å y 1.7 Å) hasta alcanzar la zona del estado de transición (R1 y R2 de 1.7 Å y 1.6 Å), respectivamente. La barrera de energía de activación observada es de alrededor de 16 kcal/mol, lo cual está de acuerdo al valor experimental de 15,2 kcal/mol para esta reacción. Los resultados muestran que la reacción es altamente exotérmica, en alrededor de 40 kcal/mol, en el cual el producto está ubicado en coordenadas R1 y R2 de 1.5 Å y 1.0 Å.



**Figura 38.** Vista 2D de la SEP M06-2X(6-31+G(d,p))/CHARMM36.

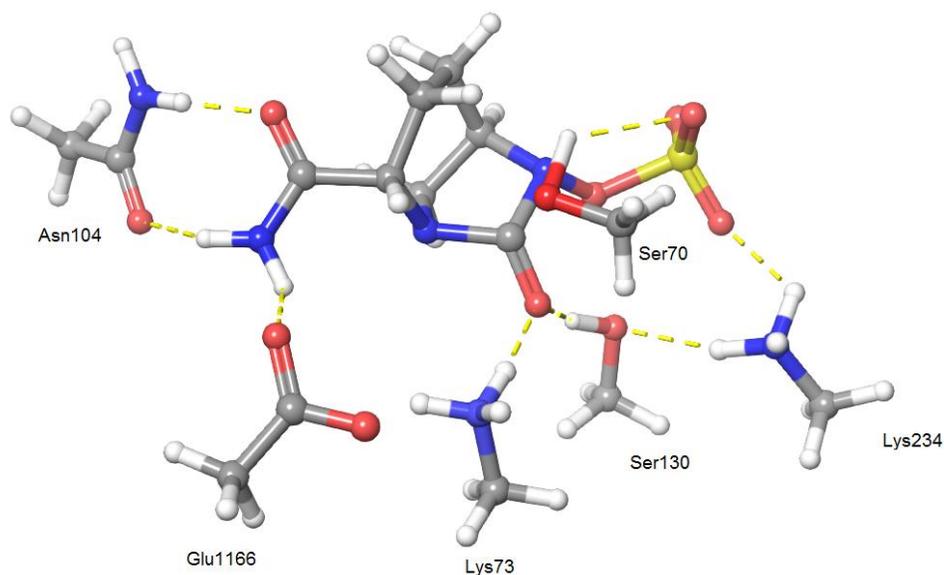
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 39.** Vista 3D de la SEP M06-2X(6-31+G(d,p))/CHARMM36.

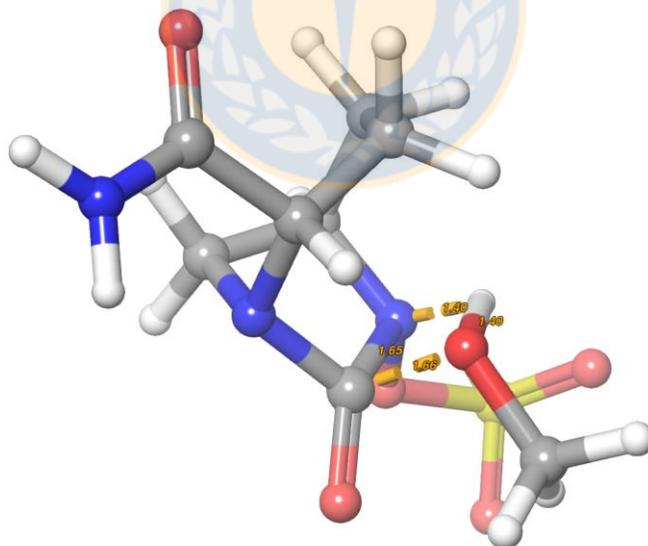
Fuente: Elaboración propia.

Para la caracterización del estado de transición, se tomó una estructura ubicada en el punto silla de la SEP, considerando solamente las especies incluidas en la zona QM, Figura 40. Luego, una búsqueda del estado de transición se llevó a cabo de acuerdo a la metodología implementada en el software Jaguar. Para ahorrar tiempo computacional, se consideró un modelo clusterizado en el cual las serinas fueron reemplazadas por metanol, lisinas por metilamonio, y glutamato por acetato. La búsqueda condujo a un estado de transición, cuya estructura se muestra en la Figura 41. Este estado de transición fue caracterizado con una frecuencia imaginaria de  $1768.5 \text{ cm}^{-1}$  y una intensidad de 1254.1. Cálculos de IRC sobre el estado de transición corroboran que se está en la presencia de un estado de transición auténtico.



**Figura 40.** Estructura tomada de la zona del estado de transición en la SEP.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 41.** Estado de transición optimizado a partir de la estructura tomada desde la SEP.

Fuente: Elaboración propia.

Además, se llevaron a cabo cálculos de cargas NBO (natural bond orbital) sobre átomos claves en la reacción. Se observó un aumento en la carga parcial en el estado de transición sobre los átomos de nitrógeno  $N_6$  y oxígeno  $O_1$ , desde -0.19 a -0.27, y -0.69 a -0.77, respectivamente, Tabla 1. Lo primero indica un aumento en la nucleofilia en el átomo de nitrógeno, debido a la elongación del enlace  $C_7-N_6$ , favoreciendo la abstracción del protón del grupo hidroxílico del residuo Ser70. Lo segundo se debe al ataque nucleofílico por parte del átomo de oxígeno hidroxílico del residuo Ser70 sobre el átomo de carbono  $C_7$  del Avibactam, lo cual produce un aumento sobre la carga del átomo de oxígeno  $O_1$  del Avibactam, en concordancia con lo reportado en literatura, acerca de la existencia de un estado de transición cuasi tetraédrico.

**Tabla 1.** Cargas atómicas NBO sobre átomos claves en reactante y estado de transición.

Átomo	Reactante	Estado de Transición
$N_6$	-0.19	-0.27
$C_7$	0.87	0.88
H	0.55	0.52
O	-0.86	-0.71
$O_1$	-0.69	-0.77

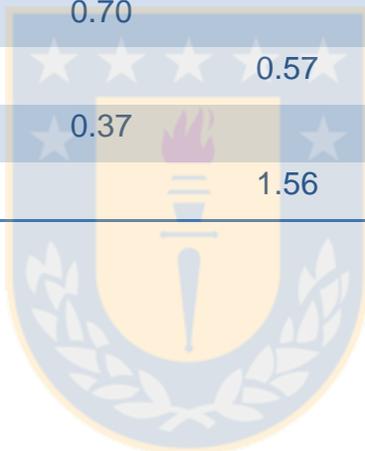
Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, se evaluaron los órdenes de enlace sobre los átomos claves en la reacción, Tabla 2. Se observó una disminución en los órdenes de enlace, sobre las uniones  $N_6-C_7$  y O-H desde 1.14 a 0.70, y desde 0.67 a 0.28, respectivamente, debido a la ruptura de los uniones  $N_6-C_7$  y O-H en progreso. Además, se observó un aumento en los órdenes de enlace, sobre las uniones  $C_7-O$  y  $N_6-H$  desde 0 a 0.37, y desde 0 a 0.57, respectivamente, debido a la formación de las uniones  $C_7-O$  y  $N_6-H$  en desarrollo.

**Tabla 2.** Ordenes de enlace sobre átomos claves en reactante y estado de transición.

	<b>N<sub>6</sub></b>	<b>C<sub>7</sub></b>	<b>O</b>	<b>H</b>
<b>Reactante</b>	N <sub>6</sub>	1.14		0
	C <sub>7</sub>	1.14	0	
	O		0	0.67
	H	0	0.67	
	O <sub>1</sub>	1.62		
<b>Estado de transición</b>	N <sub>6</sub>	0.70		0.39
	C <sub>7</sub>	0.70	0.57	
	O	0.57		0.28
	H	0.37	0.28	
	O <sub>1</sub>	1.56		

Fuente: Elaboración propia.



## CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES

- 1) La dinámica molecular sugiere que los residuos Glu166 y Lys73 deberían estar en su forma iónica, es decir, Glu166 como glutamato y Lys73 como amonio; de otra forma las interacciones entre el sitio activo y Avibactam se debilitan o pierden, por lo que la reacción se ve impedida.
- 2) La inhibición de la enzima  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15, por Avibactam puede ser explicada considerando solamente un residuo reactante, Ser70; los demás residuos del sitio activo tienen un rol diferente, aunque no menos importante. Todos ellos participan en el correcto posicionamiento del Avibactam para el ataque del residuo Ser70 sobre este.
- 3) Estos resultados resaltan la importancia del ambiente proteico, por lo tanto la mutación de cualquiera de estos residuos tendrá consecuencias en el mecanismo de inhibición.
- 4) Los residuos más relevantes involucrados en el anclaje del Avibactam son Asn104, Glu166, Lys73, Ser130 y Lys234, Estos residuos rodean el inhibidor inmovilizándolo, y con ello permiten el ataque del residuo Ser70. Además, estos residuos también participan en la estabilización del estado de transición por medio de interacciones específicas, por ejemplo el grupo amonio del residuo Lys234 con el grupo sulfato del Avibactam.
- 5) Estos resultados sugieren que la reacción sigue un mecanismo concertado asincrónico, en el cual el ataque nucleofílico del oxígeno hidroxílico del residuo Ser70 sobre el carbono carbonílico C<sub>7</sub> del Avibactam es el evento que gatilla tanto la protonación del átomo de nitrógeno N<sub>6</sub> del Avibactam como de la apertura del anillo correspondiente.
- 6) El estado de transición se caracterizó solamente con una frecuencia imaginaria de 1773.7 cm<sup>-1</sup> con una intensidad de 1245.1, correspondiente a la tensión de los enlaces O-C<sub>7</sub>, C<sub>7</sub>-N<sub>6</sub> y O-H. La barrera de energía de activación para esta etapa es 16 kcal/mol, lo cual está acuerdo al valor experimental de 15,2 kcal/mol.

## REFERENCIAS

1. Aminov, R. I. *Front. Microbiol.* 2010, 1.
2. Williamson, R. C., E.; Gutmann L. *Presse Med.* 1986, 15, 2292-2289.
3. Wright, G. D. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005, 57(10), 1451-1470.
4. Hermann, J. C.; Ridder, L.; Mulholland, A. J.; Höltje, H.-D. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125(32), 9590-9591.
5. Meroueh, S. O.; Fisher, J. F.; Schlegel, H. B.; Mobashery, S. J. *Am. Chem. Soc.* 2005, 127(44), 15397-15407.
6. Nichols, D. A.; Hargis, J. C.; Sanishvili, R.; Jaishankar, P.; Defrees, K.; Smith, E. W.; Wang, K. K.; Prati, F.; Renslo, A. R.; Woodcock, H. L.; Chen, Y. J. *Am. Chem. Soc.* 2015, 137(25), 8086-8095.
7. Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010, 23(1), 160-201.
8. Biondi, S.; Long, S.; Panunzio, M.; Qin, W. L. *Curr. Med. Chem.* 2011, 18(27), 4223-4236.
9. Bebrone, C.; Lassaux, P.; Vercheval, L.; Sohier, J.-S.; Jehaes, A.; Sauvage, E.; Galleni, M. *Drugs* 2010, 70(6), 651-679.
10. Nichols, D. A.; Jaishankar, P.; Larson, W.; Smith, E.; Liu, G.; Beyrouthy, R.; Bonnet, R.; Renslo, A. R.; Chen, Y. J. *Med. Chem.* 2012, 55(5), 2163-2172.
11. Ehmman, D. E.; Jahić, H.; Ross, P. L.; Gu, R.-F.; Hu, J.; Kern, G.; Walkup, G. K.; Fisher, S. L. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2012, 109(29), 11663-11668.
12. Drawz, S. M.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A. *Antimicrob. Agents Ch.* 2014, 58(4), 1835-1846.
13. Lahiri, S. D.; Mangani, S.; Durand-Reville, T.; Benvenuti, M.; De Luca, F.; Sanyal, G.; Docquier, J.-D. *Antimicrob. Agents Ch.* 2013, 57(6), 2496-2505.
14. Krishnan, N. P.; Nguyen, N. Q.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A.; van den Akker, F. *Plos One* 2015, 10(9), e0136813.
15. King, D. T.; King, A. M.; Lal, S. M.; Wright, G. D.; Strynadka, N. C. J. *ACS Infect. Dis.* 2015, 1(4), 175-184.
16. Winkler, M. L.; Papp-Wallace, K. M.; Taracila, M. A.; Bonomo, R. A. *Antimicrob. Agents Ch.* 2015, 59(7), 3700-3709.
17. Adamski, C. J.; Cardenas, A. M.; Brown, N. G.; Horton, L. B.; Sankaran, B.; Prasad, B. V. V.; Gilbert, H. F.; Palzkill, T. *Biochem.* 2015, 54(2), 447-457.
18. Pérez-Llarena, F. J.; Cartelle, M.; Mallo, S.; Beceiro, A.; Pérez, A.; Villanueva, R.; Romero, A.; Bonnet, R.; Bou, G. J. *Antimicrob. Chemoth.* 2008, 61(4), 792-797.
19. Wang, X.; Minasov, G.; Shoichet, B. K. *J. Mol. Biol.* 2002, 320(1), 85-95.
20. Gibson, R. M.; Christensen, H.; Waley, S. G. *Biochem. J.* 1990, 272(3), 613.
21. Guillaume, G.; Vanhove, M.; Lamotte-Brasseur, J.; Ledent, P.; Jamin, M.; Joris, B.; Frère, J.-M. *J. Biol. Chem.* 1997, 272(9), 5438-5444.
22. Knox, J. R.; Moews, P. C.; Escobar, W. A.; Fink, A. L. *Protein Eng. Des. Sel.* 1993, 6(1), 11-18.
23. Strynadka, N. C. J.; Adachi, H.; Jensen, S. E.; Johns, K.; Sielecki, A.; Betzel, C.; Sutoh, K.; James, M. N. G. *Nature* 1992, 359, 700.
24. Herzberg, O.; Moulton, J. *Sci.* 1987, 236(4802), 694.

25. Olsson, M. H. M.; Søndergaard, C. R.; Rostkowski, M.; Jensen, J. H. J. *Chem. Theory Comput.* 2011, 7(2), 525-537.
26. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J. Mol. Graphics* 1996, 14(1), 33-38.
27. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* 1983, 79(2), 926-935.
28. Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K. *J. Comput. Chem.* 2005, 26(16), 1781-1802.
29. Best, R. B.; Zhu, X.; Shim, J.; Lopes, P. E. M.; Mittal, J.; Feig, M.; MacKerell, A. D. *J. Chem. Theory Comput.* 2012, 8(9), 3257-3273.
30. Nosé, S. *J. Chem. Phys.* 1984, 81(1), 511-519.
31. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.* 1993, 98(12), 10089-10092.
32. Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. *J. Comput. Phys.* 1977, 23(3), 327-341.
33. Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* 1985, 107(13), 3902-3909.
34. Ben-Israel, A. *Israel J. Math.* 1965, 3(2), 94-98.
35. Shao, Y.; Gan, Z.; Epifanovsky, E.; Gilbert, A. T. B.; Wormit, M.; Kussmann, J.; Lange, A. W.; Behn, A.; Deng, J.; Feng, X.; Ghosh, D.; Goldey, M.; Horn, P. R.; Jacobson, L. D.; Kaliman, I.; Khaliullin, R. Z.; Kuś, T.; Landau, A.; Liu, J.; Proynov, E. I.; Rhee, Y. M.; Richard, R. M.; Rohrdanz, M. A.; Steele, R. P.; Sundstrom, E. J.; Woodcock, H. L.; Zimmerman, P. M.; Zuev, D.; Albrecht, B.; Alguire, E.; Austin, B.; Beran, G. J. O.; Bernard, Y. A.; Berquist, E.; Brandhorst, K.; Bravaya, K. B.; Brown, S. T.; Casanova, D.; Chang, C.-M.; Chen, Y.; Chien, S. H.; Closser, K. D.; Crittenden, D. L.; Diedenhofen, M.; DiStasio, R. A.; Do, H.; Dutoi, A. D.; Edgar, R. G.; Fatehi, S.; Fusti-Molnar, L.; Ghysels, A.; Golubeva-Zadorozhnaya, A.; Gomes, J.; Hanson-Heine, M. W. D.; Harbach, P. H. P.; Hauser, A. W.; Hohenstein, E. G.; Holden, Z. C.; Jagau, T.-C.; Ji, H.; Kaduk, B.; Khistyayev, K.; Kim, J.; Kim, J.; King, R. A.; Klunzinger, P.; Kosenkov, D.; Kowalczyk, T.; Krauter, C. M.; Lao, K. U.; Laurent, A. D.; Lawler, K. V.; Levchenko, S. V.; Lin, C. Y.; Liu, F.; Livshits, E.; Lochan, R. C.; Luenser, A.; Manohar, P.; Manzer, S. F.; Mao, S.-P.; Mardirossian, N.; Marenich, A. V.; Maurer, S. A.; Mayhall, N. J.; Neuscamman, E.; Oana, C. M.; Olivares-Amaya, R.; O'Neill, D. P.; Parkhill, J. A.; Perrine, T. M.; Peverati, R.; Prociuk, A.; Rehn, D. R.; Rosta, E.; Russ, N. J.; Sharada, S. M.; Sharma, S.; Small, D. W.; Sodt, A.; Stein, T.; Stück, D.; Su, Y.-C.; Thom, A. J. W.; Tsuchimochi, T.; Vanovschi, V.; Vogt, L.; Vydrov, O.; Wang, T.; Watson, M. A.; Wenzel, J.; White, A.; Williams, C. F.; Yang, J.; Yeganeh, S.; Yost, S. R.; You, Z.-Q.; Zhang, I. Y.; Zhang, X.; Zhao, Y.; Brooks, B. R.; Chan, G. K. L.; Chipman, D. M.; Cramer, C. J.; Goddard, W. A.; Gordon, M. S.; Hehre, W. J.; Klamt, A.; Schaefer, H. F.; Schmidt, M. W.; Sherrill, C. D.; Truhlar, D. G.; Warshel, A.; Xu, X.; Aspuru-Guzik, A.; Baer, R.; Bell, A. T.; Besley, N. A.; Chai, J.-D.; Dreuw, A.; Dunietz, B. D.; Furlani, T. R.; Gwaltney, S. R.; Hsu, C.-P.; Jung, Y.; Kong, J.; Lambrecht, D. S.; Liang, W.; Ochsenfeld, C.; Rassolov, V. A.;

- Slipchenko, L. V.; Subotnik, J. E.; Van Voorhis, T.; Herbert, J. M.; Krylov, A. I.; Gill, P. M. W.; Head-Gordon, Mol. Phys. 2015, 113(2), 184-215.
36. Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. J. Comput. Chem. 1983, 4(2), 187-217.
37. Walker, M.; Harvey, A. J. A.; Sen, A.; Dessent, C. E. H. J. Phys. Chem. 2013, 117(47), 12590-12600.
38. Bochevarov, A. D.; Harder, E.; Hughes, T. F.; Greenwood, J. R.; Braden, D. A.; Philipp, D. M.; Rinaldo, D.; Halls, M. D.; Zhang, J.; Friesner, R. A. Int. J. Quantum Chem. 2013, 113(18), 2110-2142.
39. Glendening, E. D.; Landis, C. R.; Weinhold, F. Wiley Interdisciplinary Reviews: Comput. Mol. Sci. 2012, 2(1), 1-42.

