

Modelización molecular de β -lactamasas y PBPs

Resumen: Las técnicas de modelización molecular permiten analizar en detalle las reacciones que catalizan sistemas enzimáticos como las β -lactamasas y las PBPs. Mediante simulaciones de dinámica molecular de distintas configuraciones del centro activo seguidas de cálculos energéticos químico-cuánticos, es posible identificar qué residuo del centro activo actúa como catalizador básico, determinando de esta manera el mecanismo de reacción para la primera etapa del proceso catalizado por β -lactamasas y PBPs. A juzgar por los resultados obtenidos, la metodología utilizada en nuestros estudios podría ser muy útil en las etapas iniciales del diseño por ordenador de nuevos fármacos.

Introducción

A mediados de 1941 se anunció ante la comunidad internacional la existencia de "un producto con fulminante actividad bactericida": la penicilina.^[1] Fleming, como descubridor, y Florey y Chain, como artífices de la purificación y estabilización de la sustancia, habían sido los padres del gran avance científico que, sin duda, marcó un antes y un después en el combate contra muchas enfermedades infecciosas. Tanto es así que Sir Alexander Fleming es una figura científica de relevancia universal (véase la Figura 1) y el descubrimiento de la penicilina es un clásico de la historia de la ciencia y de la divulgación científica en general. Sin embargo, la penicilina y sus múltiples derivados no proporcionan el tratamiento definitivo de las patologías de origen bacteriano, ya que la propia selección natural, acelerada en muchos casos por el uso desmedido de antibióticos en múltiples facetas de la actividad humana, favorece siempre la supervivencia de las bacterias resistentes a la acción de los fármacos. Por ello, más de medio siglo después del descubrimiento de la penicilina, el estudio de esta amplia familia de antimicrobianos sigue siendo un área de investigación de gran actividad. Conocer con el máximo detalle posible los procesos asociados al efecto antibiótico y a la resistencia bacteriana permitirá, por un lado, desarrollar nuevos compuestos, y por el otro, utilizar de un modo más racional el arsenal terapéutico disponible.



Figura 1. Monumento homenaje a Fleming en Gijón, inaugurado en 1955. Fue el primero de otros muchos que junto a nombres de calles, centros de enseñanza, etc. contribuyeron a popularizar al descubridor de la penicilina.

Departamento de Química Física y Analítica.
Universidad de Oviedo
C/ Julián Clavería, 8. E-33006 Oviedo, Asturias.
C-e: diaznatalia@uniovi.es



Natalia Díaz Fernández

PBPs: Las dianas de las β -lactamas

Pero ¿qué es la penicilina y cómo actúa? La penicilina es un antibiótico, sustancia de origen natural con actividad microbicida, perteneciente a la familia de las β -lactamas. Por lo tanto, químicamente se caracteriza por la presencia de un grupo amida situado en un ciclo de cuatro centros: el anillo β -lactámico. Precisamente, gran parte de la actividad biológica que

ejercen los antibióticos β -lactámicos, donde se incluye también a las cefalosporinas, los carbapenemes, y las monobactamas de la Figura 2, puede asociarse a la reactividad química característica de este anillo.

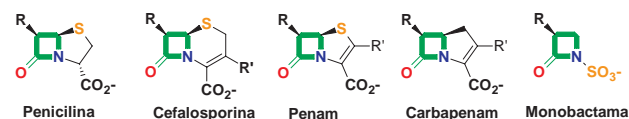


Figura 2. Representación esquemática del esqueleto común presente en las distintas familias de antibióticos β -lactámicos. El anillo β -lactámico aparece resaltado en verde.

El uso generalizado de los compuestos β -lactámicos en el tratamiento de las infecciones bacterianas es el resultado de dos propiedades fundamentales: su amplio espectro de acción bactericida y su baja toxicidad para los pacientes. Esta baja toxicidad se debe a que el proceso bacteriano sobre el que actúan las β -lactamas, la síntesis de la pared celular, no tiene análogo en las células eucariotas (no poseen dicha pared celular). Más concretamente, los antibióticos β -lactámicos bloquean un conjunto de enzimas bacterianas denominadas PBPs (*Penicillin Binding Proteins*), que son las encargadas de catalizar la formación de una estructura macromolecular en forma de malla o red, componente esencial de la pared celular.^[2-4] Esta macro-estructura característica de las bacterias es un peptidoglicano, formado por cadenas polisacáridas que alternan la *N*-acetilglucosamina (NAG) y el ácido *N*-acetilmurámico (NAM), y por fragmentos peptídicos que conectan a las distintas cadenas polisacáridas según se muestra en la Figura 3. Los fragmentos peptídicos del peptidoglicano presentan en su parte terminal la secuencia de aminoácidos D-Ala-D-Ala, que es reconocida de modo selectivo por las enzimas PBPs. De este modo, las enzimas PBPs catalizan la formación de enlaces peptídicos cruzados entre distintos fragmentos del peptidoglicano, proceso que transcurre con la eliminación del grupo D-Ala terminal.

En general, se considera que la actividad antibiótica de las β -lactamas es el resultado de la semejanza estructural existente entre el fragmento D-Ala-D-Ala del peptidoglicano y la

Modelización molecular de β -lactamasas y PBPs

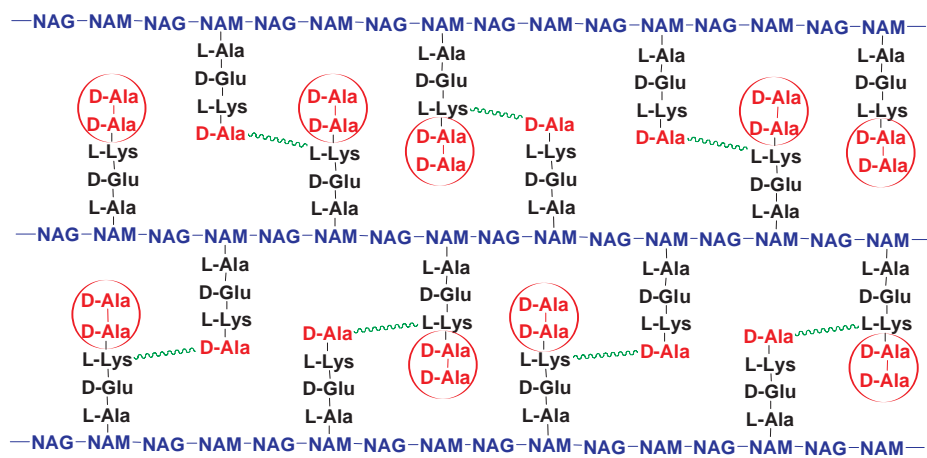


Figura 3. Representación esquemática de la estructura en forma de malla del peptidoglicano. Los enlaces peptídicos cruzados entre distintas cadenas polisacáridas aparecen en verde, mientras que el fragmento -D-Ala-D-Ala reconocido específicamente por las PBP se representa en rojo.

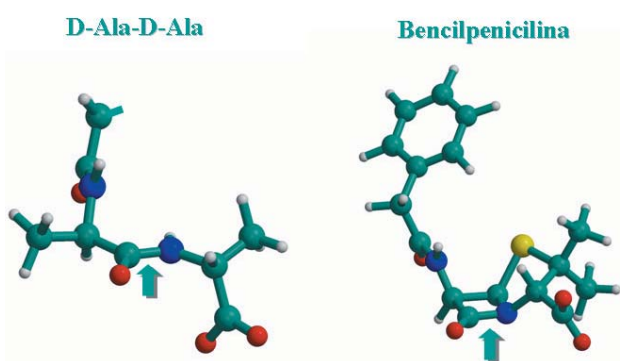


Figura 4. Comparación de la estructura tridimensional del fragmento -D-Ala-D-Ala del peptidoglicano y de la bencilpenicilina. La flecha indica la posición del enlace peptídico de ambos compuestos que es hidrolizado por las PBPs.

zona del anillo β -lactámico presente en los antibióticos, tal y como se muestra en la Figura 4.^[5] De este modo, los compuestos β -lactámicos reaccionan con las enzimas PBPs desplazando a sus substratos naturales.

β -lactamasas: El problema de la resistencia bacteriana

El uso generalizado de antibióticos ha sometido a muchas comunidades microbianas a una fuerte presión selectiva: se eliminan las bacterias sensibles y se favorece, por tanto, la proliferación de las bacterias resistentes. En este sentido, usos y costumbres como la automedicación, el seguimiento incompleto de un tratamiento, así como el abuso de los antibióticos de amplio espectro en agricultura y ganadería, comprometen el futuro uso terapéutico de los compuestos actualmente disponibles.^[6]

En el caso particular de los antibióticos β -lactámicos, se han descubierto tres estrategias evolutivas distintas utilizadas por las bacterias para reducir o eliminar su sensibilidad frente a las β -lactamas.^[7] Por un lado, las bacterias Gram⁺ pueden alterar la permeabilidad de su membrana externa para evitar la llegada de los antibióticos a la pared celular. Otros organismos han modificado sus PBPs de modo que presenten una menor afinidad por las β -lactamas, aunque sin alterar por ello sus funciones durante la síntesis del peptidoglicano. Pero, sin

duda, el mecanismo más importante de resistencia a los antibióticos β -lactámicos es la producción de enzimas hidrolíticas, denominadas β -lactamasas, que degradan de modo selectivo y rápido el enlace amida del anillo β -lactámico.^[6,8-11]

Las β -lactamasas se dividen en dos grupos principales: las enzimas de serina, que se subdividen tradicionalmente en las denominadas clases A, C y D, y las cinc- β -lactamasas que se agrupan en la clase B.^[12] Las enzimas de la clase A son las más abundantes mientras que las β -lactamasas de las clases B y C poseen una gran capacidad hidrolítica frente a un gran número de compuestos β -lactámicos, incluyendo a las cefalosporinas de tercera generación y a los carbapenemes utilizados para el tratamiento de cepas resistentes.^[13,14]

PBPs vs. β -lactamasas: Un origen común y dos funciones distintas

Hoy en día se sabe que las PBPs y las β -lactamasas tienen un origen evolutivo común, desarrollándose las segundas por la presión selectiva que favorece a los organismos resistentes.^[15-17] Gracias a técnicas como la cristalografía de proteínas, se ha comprobado que el dominio catalítico de las PBPs y el único dominio presente en las β -lactamasas de serina presentan el mismo tipo de plegamiento, representado en la Figura 5, y que se caracteriza por la presencia de dos subdominios. El primer subdominio está formado principalmente por hélices α mientras que el segundo es de tipo α/β .^[18]

El centro activo en el que transcurre la reacción catalizada por β -lactamasas y PBPs es una región comprendida entre

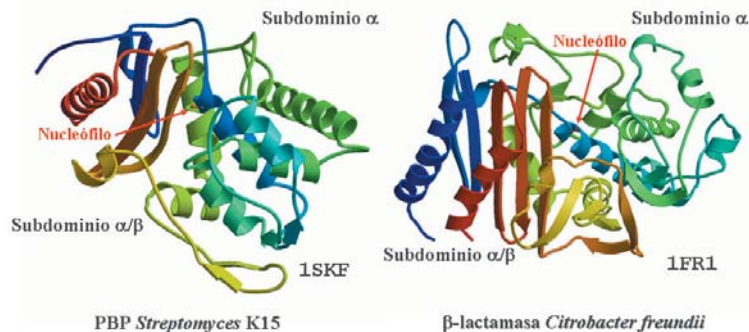


Figura 5. Estructura tridimensional característica de las enzimas PBPs y β -lactamasas de serina.^[19]

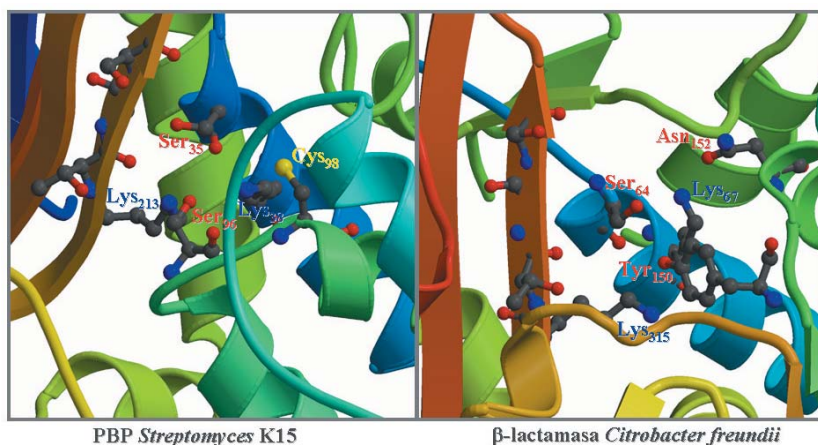


Figura 6. Representación del centro activo de una PBP y una β-lactamasa. Los residuos más relevantes desde un punto de vista catalítico aparecen representados mediante modelos de bolas y varillas.

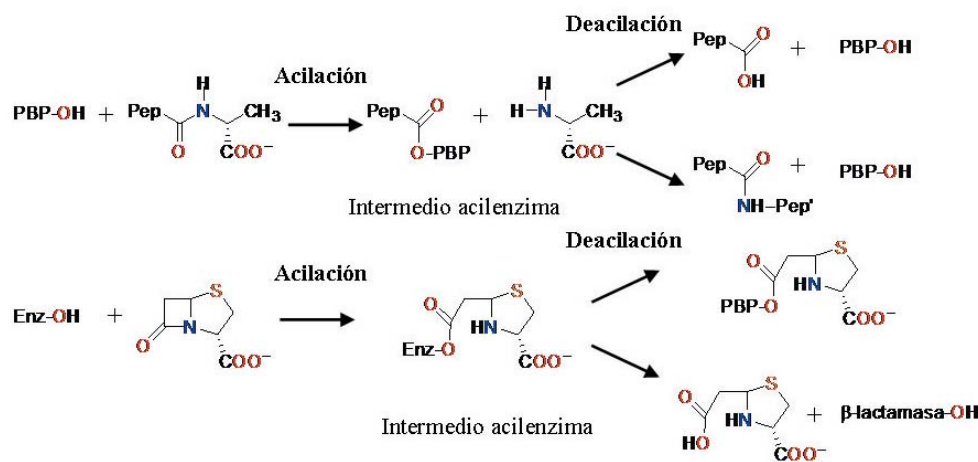


Figura 7. Representación esquemática de los procesos químicos catalizados por las enzimas PBPs y β-lactamasas.

ambos subdominios. Contiene un grupo de residuos *conservados*, es decir, presente en todas las enzimas, y que adoptan una orientación espacial muy similar (véase la Figura 6). Estos residuos conservados se agrupan en tres secuencias: Ser-X-X-Lys, en el que la serina actúa como nucleófilo, Ser(Tyr)-X-Asn(Cys), y Lys(His)-Ser(Thr)-Gly. Cuando alguno de estos residuos conservados es reemplazado por otro aminoácido en los experimentos de mutagénesis, se observa siempre una disminución notable en la eficiencia catalítica de la enzima.^[20] Además, las estructuras tridimensionales disponibles para β-lactamasas y PBPs muestran que estos residuos conservados interactúan unos con otros mediante una red de puentes de hidrógeno.^[18] Sin embargo, la resolución de las estructuras cristalográficas (1–2 Å) es insuficiente para localizar la posición exacta de los átomos de hidrógeno. O sea, se desconoce el estado de ionización a pH fisiológico de los residuos importantes para la catálisis, y por tanto, no es nada fácil identificar qué función desempeña cada uno de los residuos conservados.

Las PBPs y las β-lactamasas catalizan el mismo tipo de proceso químico: el ataque nucleófilo al enlace amida del fragmento D-Ala-D-Ala del peptidoglicano o al anillo β-lactámico de los antibióticos. Los experimentos cinéticos demuestran que este proceso transcurre al menos en dos etapas. En la primera, la etapa de acilación en la Figura 7, se forma un intermedio acil-enzima. A continuación, el intermedio acil-enzima formado entre una enzima PBP y el fragmento D-Ala-D-Ala del peptidoglicano reacciona rápidamente con una molécula de agua o con el grupo amino de otro frag-

mento del peptidoglicano. En cambio, el intermedio acil-enzima formado entre una enzima PBP y un antibiótico β-lactámico es mucho más estable, con lo que el centro activo de la PBP queda bloqueado, lo que a su vez desemboca en la formación de peptidoglicanos defectuosos. Pero si la enzima bacteriana es una β-lactamasa que ataca a un antibiótico β-lactámico, el intermedio acil-enzima resultante tiene una vida media muy corta ya que es hidrolizado rápidamente, produciéndose así la degradación del antibiótico.

En resumen, sabemos qué residuos del centro activo son importantes para la catálisis gracias a los estudios de mutagénesis, las estructuras cristalinas nos muestran su orientación relativa, y los estudios cinéticos identifican las etapas mecánicas de la catálisis. Pero toda esta información no es suficiente para dar una descripción molecular detallada del proceso catalizado por β-lactamasas y PBPs, dado que siguen sin responderse inequívocamente cuestiones tales como: ¿qué residuo actúa como catalizador básico activando a la serina nucleófila?, ¿qué residuo se encarga de ceder un protón al grupo amino saliente?, ¿cuál es la estructura y energía de los estados de transición?, etc. Teniendo en cuenta el papel desempeñado por las PBPs y las β-lactamasas en los procesos de resistencia a las β-lactamas, necesitamos alcanzar un mayor conocimiento de su funcionamiento a nivel molecular. Nuestra aproximación particular a esta problemática emplea las técnicas y métodos de la Modelización Molecular por ordenador para tratar de resolver algunos de los problemas pendientes en el mecanismo de la catálisis desarrollada por ambos tipos de enzimas.

¿Qué es la modelización molecular?

El término modelado o modelización molecular incluye a todas aquellas técnicas computacionales que tienen como finalidad el estudio de la estructura tridimensional de las moléculas y la predicción de propiedades moleculares, ya sea para especies químicas estables o para estados de transición.^[21] Para ello, estas técnicas requieren la utilización de modelos teóricos que describan las interacciones inter- e intra-moleculares. Los mejores modelos teóricos se construyen directamente a partir de la mecánica cuántica (QM) pero, por lo general, estos modelos tienen un coste computacional prohibitivo cuando son aplicados a macromoléculas.^[22] Para estos grandes sistemas siguen empleándose modelos empíricos, más conocidos por el término de mecánica molecular (MM), o bien se acude a modelos híbridos que combinan una descripción QM para una parte especial del sistema con un tratamiento MM para los demás átomos.^[23] Todos los modelos teóricos estiman, con mayor o menor precisión, las variaciones en la energía potencial molecular debidas a cambios geométricos *conformacionales*, pero sólo los métodos QM describen la ruptura o formación de enlaces químicos.

Los modelos de cálculo de la energía potencial molecular pueden combinarse con distintas técnicas de muestreo conformacional, tales como la simple minimización energética, la dinámica molecular o el método de Monte Carlo. Sólo a partir de la combinación de cálculos energéticos y muestreo conformacional es posible predecir las propiedades estructurales y termodinámicas de los sistemas moleculares, y comparar entonces con los datos experimentales. Por supuesto, esta comparación es fundamental para validar la aplicación de un modelo teórico a un determinado tipo de sistemas moleculares. Cuando un modelo ha sido validado satisfactoriamente, puede aplicarse para predecir las propiedades de otros sistemas semejantes para los que, con frecuencia, no se posee ninguna información previa.

Sin duda, un rasgo propio muy valioso de las técnicas de modelización molecular es su gran aplicabilidad, ya que es posible simular el comportamiento de moléculas aisladas, líquidos, polímeros, biomoléculas y sólidos. En el caso particular de las macromoléculas de interés biológico (proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos), las técnicas de dinámica molecular combinadas con modelos MM constituyen la principal herramienta de modelización.^[24] Para incluir el efecto del disolvente se puede incorporar un número elevado de moléculas de agua y aplicar condiciones periódicas para simular una fase condensada, o bien es posible considerar al disolvente como un medio continuo. En la práctica, las dinámicas moleculares son capaces de modelizar el comportamiento de cualquier sistema, incluyendo los no descritos estructuralmente e inabordables por cualquier otra técnica (teórica o experimental). Actualmente, las trayectorias de dinámica molecular alcanzan a simular el comportamiento de biomoléculas durante intervalos de tiempo del orden de los nanosegundos, lo que requiere el uso de sistemas de computación de altas prestaciones. En contrapartida, las posibles aplicaciones de la dinámica molecular son amplísimas. Por ejemplo, se han utilizado simulaciones de dinámica molecular para estudiar y predecir procesos como el plegamiento de las proteínas, investigar la influencia de los efectos dinámicos

sobre la actividad enzimática, analizar la estructura de hidratación de distintas macromoléculas, modelizar los cambios conformacionales y procesos alostéricos, comprender el reconocimiento molecular, simular el transporte de iones y de pequeñas moléculas a través de membranas, etc.^[25-28]

Modelización molecular de PBPs y β -lactamasas: Una aportación metodológica

Los estudios de modelización molecular de PBPs y β -lactamasas se han centrado fundamentalmente en el análisis mecanocuántico de distintos mecanismos de reacción,^[29,30] y en la simulación, mediante dinámica molecular, de varias enzimas y complejos enzima-ligando.^[31-34] Sin embargo, estos estudios previos no han analizado en detalle los diferentes estados de ionización que pueden presentar los residuos que constituyen el centro activo de la enzima. Tan solo algunos cálculos electrostáticos de pKas han proporcionado cierta información sobre el posible estado de protonación de los principales residuos del centro activo de β -lactamasas y PBPs.^[35-37]

La distribución de carga en el centro activo condiciona claramente el mecanismo de la reacción catalizada por β -lactamasas y PBPs. En principio, para distinguir cuál sería el estado de ionización más probable de los residuos clave de estas enzimas podríamos calcular la energía de los distintos estados de protonación, construidos a partir de las estructuras de rayos X, aplicando *directamente* un modelo QM. Sin embargo, dado que las enzimas son sistemas flexibles, es igualmente importante muestrear adecuadamente el espacio conformacional accesible a las cadenas laterales de los aminoácidos. Esto requiere generar trayectorias de dinámica molecular del orden de los nanosegundos, para lo cual es necesario emplear una representación MM para cada uno de los estados a analizar. Posteriormente, la información estructural así generada puede utilizarse para calcular la energía libre de los sistemas enzimáticos mediante un protocolo computacional que hemos denominado QM-PBSA (*Quantum Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area*). Este protocolo QM-PBSA, que es una extensión mecanocuántica de otro método más estándar conocido como MM-PBSA (*Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area*),^[38] aplica la siguiente fórmula híbrida para obtener la energía libre (G) de un conjunto de estructuras (*snapshots*) generadas a la largo de una misma trayectoria de dinámica molecular:

$$G = H_f^0 + E_{disp} + G_{PBSA} - TS_{MM}$$

La expresión [1] combina la entalpía de formación de la enzima (H_f^0), su energía de solvatación (G_{PBSA}) calculada a partir de la ecuación de Poisson-Boltzmann más un término empírico no polar, la energía de dispersión obtenida a partir de parámetros atómicos y de una fórmula aditiva de tipo Lennard-Jones, y la entropía (S_{MM}) calculada a partir de cálculos analíticos de constantes de fuerzas y fórmulas termodinámico-estadísticas. En nuestra implementación particular del protocolo QM-PBSA, la entalpía H_f^0 y la componente electrostática de la energía de solvatación se calculan haciendo uso de un modelo QM semiempírico, generalmente el conocido método PM3,^[22] mientras que la energía de dispersión y el término entrópico siguen calculándose con modelos MM.

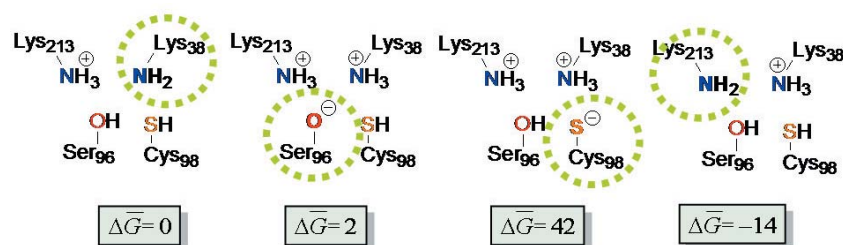


Figura 8. Algunas de las configuraciones del centro activo de la PBP analizadas mediante simulaciones de dinámica molecular y sus correspondientes energías relativas (kcal/mol) obtenidas mediante el protocolo QM-PBSA.

Para ello es necesario utilizar algoritmos especiales, de modo que el coste computacional de los modelos QM aumente linealmente con el tamaño del sistema, y no de forma potencial como ocurre con los algoritmos estándar. En nuestro caso, hemos empleado el algoritmo *Divide and Conquer* implementado en el programa DIVCON.^[39]

Los valores de G obtenidos según la ecuación [1] se promedian para una serie de 50 o más *snapshots* no correlacionados entre sí. De este modo, se obtienen valores promedio para las energías libres de los distintos estados simulados con una incertidumbre estadística de ± 5 kcal/mol que, en general, es suficiente para discriminar entre los distintos estados de protonación del centro activo de las enzimas. Asimismo, hemos calibrado el grado de fiabilidad del protocolo QM-PBSA estudiando otros sistemas modelo de menor tamaño con métodos más sofisticados o comparando entre valores teóricos y experimentales de energías relativas de unión enzima-substrato.^[34]

Utilizando este esquema de cálculo propuesto en nuestro laboratorio –dinámicas moleculares más cálculos QM-PBSA– se ha analizado el comportamiento de dos sistemas particulares: la PBP del *Streptomyces K15* y la β -lactamasa de la clase C del *Citrobacter freundii*.^[40,41] A continuación se presentan los resultados obtenidos y discutimos su utilidad para racionalizar los principales datos experimentales y comprender el papel desempeñado por cada uno de los residuos conservados en el centro activo de ambas enzimas.

PBP del *Streptomyces sp. K15*

Los tres elementos catalíticos identificados en el centro activo de esta enzima presentan la secuencia Ser₃₅-X-X-Lys₃₈, Ser₉₆-X-Cys₉₈, y Lys₂₁₃-Thr₂₁₄-Gly₂₁₅. El grupo alcohol de la cadena lateral de la Ser₃₅ actúa como nucleófilo y, según las estructuras cristalinas disponibles, interacciona con una red de puentes de hidrógeno que lo conecta a los distintos residuos conservados.^[42] La estimación del pK_a de los residuos ionizables señala que tanto la Cys₉₈ (pK_a~7.2) como la Lys₂₁₃ (pK_a~7.4) podrían presentar un estado de ionización adecuado para actuar como catalizadores básicos durante la reacción catalizada por la PBP.^[31] Además, las estructuras cristalinas muestran una distancia Lys₃₈-N ϵ ...S γ -Cys₉₈ bastante corta (2.7 Å), que parece señalar la existencia de una cisteína cargada negativamente interaccionando con una lisina cargada positivamente.^[42] Sin embargo, los experimentos cinéticos de mutagénesis identifican a los residuos Lys₃₈ y Ser₉₆ como aquellos cuya mutación tiene un mayor impacto en la eficiencia catalítica de la PBP.^[43]

Teniendo en cuenta esta serie de resultados previos, se consideraron varias configuraciones del centro activo de la enzima que podrían ser cinéticamente activas, y que se caracteri-

zan porque alguno de los residuos candidatos a catalizador básico se encuentra en su forma desprotonada (véase la Figura 8).^[40] Por un lado, los análisis estructurales de las distintas trayectorias pusieron de manifiesto que la distancia Lys₃₈...Cys₉₈ era demasiado corta en las estructuras cristalinas, incluso cuando ambos residuos se encuentran ionizados. Además, los análisis energéticos mostraron claramente que todas aquellas configuraciones en las que la Cys₉₈ estuviese desprotonada presentaban una energía relativa muy elevada. Por otro lado, se observó que el estado con la Lys₂₁₃ en su forma neutra era el más estable en la forma libre de la enzima, en buen acuerdo con los valores de pK_a calculados. Pero además, las diferencias de energía y los contactos presentes a lo largo de las trayectorias sugieren que la conversión entre los estados con la Lys₃₈ o con la Lys₂₁₃ en su forma neutra podría ser viable durante el mecanismo catalítico de la PBP. De este modo, se plantea la cuestión de si podrían producirse cambios en el estado de ionización del centro activo de la PBP como resultado de la unión de ligandos. Y es que tanto los substratos naturales de las PBPs como los antibióticos β -lactámicos presentan un grupo carboxilato próximo al enlace amida a hidrolizar que, siendo esencial para el reconocimiento molecular enzima-ligando, podría también alterar el balance de interacciones electrostáticas a nivel del centro activo de la enzima.

Los métodos de simulación molecular permiten caracterizar estructural y energéticamente los complejos de Michaelis enzima/ligando, mientras que otras técnicas como la difracción de rayos X requieren utilizar enzimas mutantes no reactivas. En el caso de la PBP, se seleccionó como ligando a la bencilpenicilina, que es capaz de acilar a la enzima en la primera etapa del proceso reactivo. El complejo inicial PBP/penicilina se obtuvo mediante cálculos energéticos de *docking*.^[44] Posteriormente, se llevaron a cabo nuevas simulaciones de dinámica molecular y estimaciones de la energía libre de las distintas configuraciones consideradas para el complejo enzima/ligando. Curiosamente, los resultados energéticos muestran que la unión de la penicilina en el centro activo de la PBP introduce cambios importantes en las energías relativas, de modo que el estado con la Lys₃₈ neutra pasa a ser claramente la configuración más estable. Además, esta configuración presenta una distancia de ataque Ser₃₅-O γ ...C-carbonílico idónea, a la vez que la Lys₃₈ está perfectamente situada para activar al nucleófilo (véase la Figura 9).

Toda la información obtenida de las simulaciones se puede resumir en el esquema de reacción que aparece en la Figura 10. En un primer paso, y asociada a la unión de la penicilina, tiene lugar una transferencia de H desde la Lys₃₈ a la Lys₂₁₃. A continuación, se produce la activación del nucleófilo y el ataque al grupo carbonilo del sustrato para dar un intermedio tetraédrico. En una tercera etapa, el N β -lactámico capta un H,

Modelización molecular de β-lactamasas y PBPs

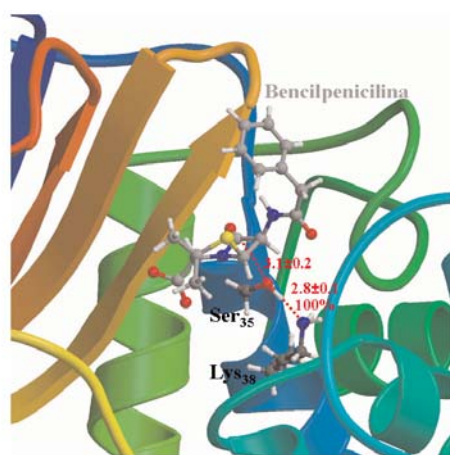


Figura 9. Complejo PBP/bencilpenicilina observado a lo largo de la trayectoria de dinámica molecular en la que la Lys₃₈ es neutra. Los datos correspondientes a las distancias de ataque nucleófilo y de activación de la Ser₃₅ por la Lys₃₈ están expresados en Å.

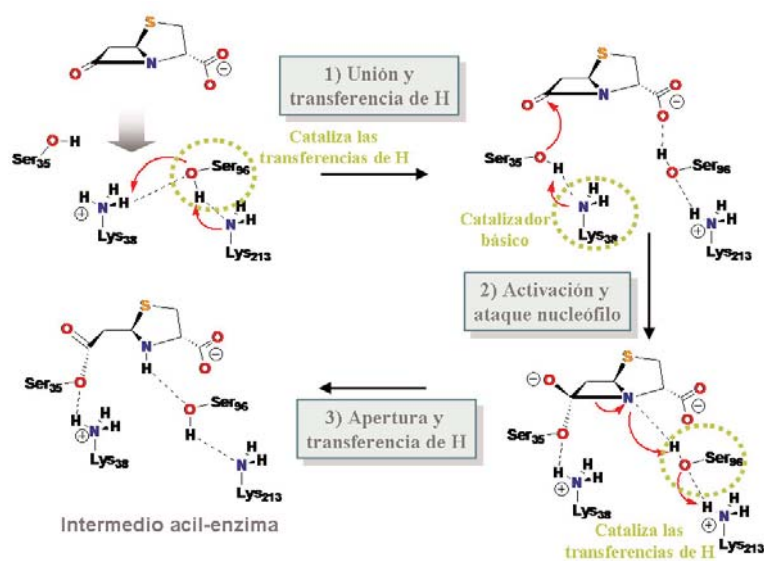


Figura 10. Esquema propuesto para la reacción de acilación de la PBP del *Streptomyces* K15 por la bencilpenicilina

que bien podría ceder la Lys₂₁₃ con catálisis de la Ser₉₆, y se produce la apertura del anillo β-lactámico. Este esquema nos permite identificar a la Lys₃₈ como catalizador básico, pero también otorga un papel crítico a la Ser₉₆ durante las transferencias de H, en buen acuerdo con los resultados previos de mutagénesis. Por último, nos permite entrever el papel mecanístico de la Lys₂₁₃, que por su posición y facilidad para aceptar/donar protones, podría comportarse como catalizador básico durante la etapa final de deacilación del sustrato natural de la PBP (el fragmento -D-Ala-D-Ala del peptidoglicano).

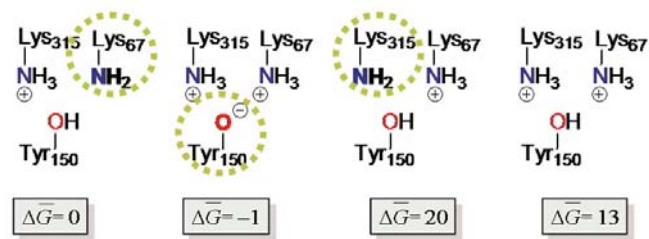


Figura 11. Configuraciones del centro activo analizadas mediante simulaciones de dinámica molecular y energías relativas (kcal/mol) obtenidas mediante el protocolo QM-PBSA.

β-lactamasa de la clase C de *Citrobacter freundii*

Las estructuras cristalinas disponibles para las β-lactamasas de la clase C muestran que la serina nucleófila, Ser₆₄, interacciona con varios residuos del centro activo conservados en este tipo de enzimas: la Lys₆₇, la Tyr₁₅₀, y la Lys₃₁₅.^[45] Los cálculos electrostáticos atribuyen un pK_a elevado a estas dos lisinas, mientras que la Tyr₁₅₀ se caracterizaría por un pK_a claramente desplazado que sería compatible con la presencia de un anión fenolato en el centro activo.^[37] Sin embargo, el pK_a asignado a esta Tyr₁₅₀ mediante RMN de ¹³C está claramente por encima de 11, por lo cual su cadena lateral estaría necesariamente protonada en la forma libre de la enzima.^[46] Por otra parte, los experimentos de mutagénesis son bastante difíciles de interpretar en el caso de las β-lactamasas de la clase C.^[47-51] Las mutaciones de la Lys₆₇ anulan casi completamente la actividad enzimática, aunque la velocidad del proceso de acilación permanece prácticamente inalterada si la Lys₆₇ se sustituye por una Arg. Respecto a la Tyr₁₅₀, los estudios de mutagénesis proporcionan resultados bastante más heterogéneos, observándose disminuciones en la eficiencia catalítica de la enzima que son muy dependientes del mutante en cuestión y del sustrato empleado.^[51]

Al igual que para la PBP, las simulaciones de dinámica molecular y posteriores cálculos energéticos QM-PBSA permitieron analizar la estabilidad relativa de las distintas con-

figuraciones del centro activo de la β-lactamasa.^[41] Los resultados obtenidos indican que la configuración con la Lys₆₇ en su forma neutra o con la Tyr₁₅₀ en su forma aniónica son las más favorables energéticamente en la forma nativa de la enzima. Además, ambos estados están muy próximos en energía, por lo cual podría existir un equilibrio entre ambas configuraciones.

Después de analizar la enzima en su forma libre, se estudió el complejo formado con un antibiótico monobactámico como el aztreonam, para el que existe una estructura cristalina correspondiente al intermedio acil-enzima formado con la β-lactamasa en cuestión.^[45] Los cálculos de energía libre realizados en los distintos complejos indican que la unión del aztreonam estabiliza preferentemente al estado que presenta a las dos lisinas del centro activo en su forma catiónica. Sin embargo, la diferencia energética entre este estado y la configuración con la Lys₆₇ neutra es insuficiente para que este residuo esté cargado a pH 7. Además, los análisis estructurales de la trayectoria con las dos lisinas en su forma catiónica muestran que el anillo β-lactámico del aztreonam adopta una orientación no reactiva, lo que permite descartar a este estado como significativo desde un punto de vista catalítico. Por lo tanto, debe considerarse que la configuración con la Lys₆₇ neutra es la más probable para el complejo β-lactamasa/aztreonam. Más aun, a lo largo de esta trayectoria, la molécula de aztreonam presenta una orientación adecuada para el ataque nucleófilo, tal y como muestra la Figura

12, mientras que la Lys₆₇ está perfectamente situada para actuar a la Ser₆₄ y actuar como catalizador básico durante la etapa de acilación de las β-lactamas de la clase C.

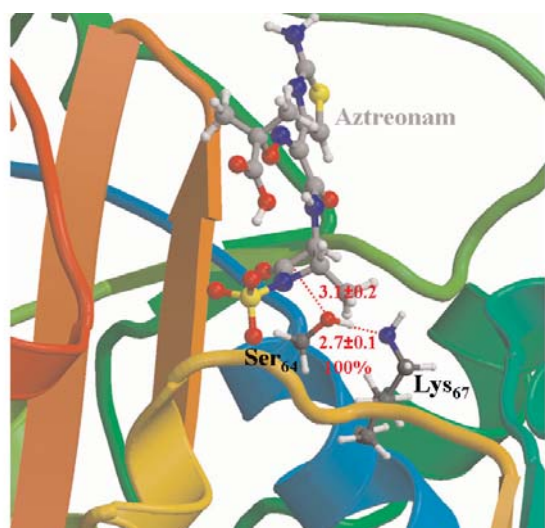


Figura 12. Molécula de aztreonam (modelo de bolas y varillas) unida al centro activo de la β-lactamasa de la clase C del *Citrobacter freundii*. También se representa mediante bolas y varillas la cadena lateral de la Ser₆₄ y de la Lys₆₇. Las distancias están dadas en Å.

El papel de la Lys₆₇ como catalizador básico (véase la Figura 13) es compatible con los resultados que muestran que la actividad enzimática desaparece cuando este residuo se reemplaza por aminoácidos neutros, tales como la glutamina o la treonina. Pero entonces ¿cómo es que la sustitución de la Lys₆₇ por una Arg no modifica prácticamente la velocidad del proceso de acilación? Este hecho debe relacionarse con la presencia de otro residuo que actúe como catalizador básico, y dada la pequeña diferencia energética existente en la enzima nativa entre los estados con la Lys₆₇ y con la Tyr₁₅₀ desprotonadas, el nuevo catalizador básico presente en el mutante Lys₆₇/Arg₆₇ podría ser la Tyr₁₅₀. Así, puede considerarse que la mutación introduce una carga positiva que podría contribuir a estabilizar el estado aniónico de la Tyr₁₅₀. Precisamente, una nueva simulación de dinámica molecular

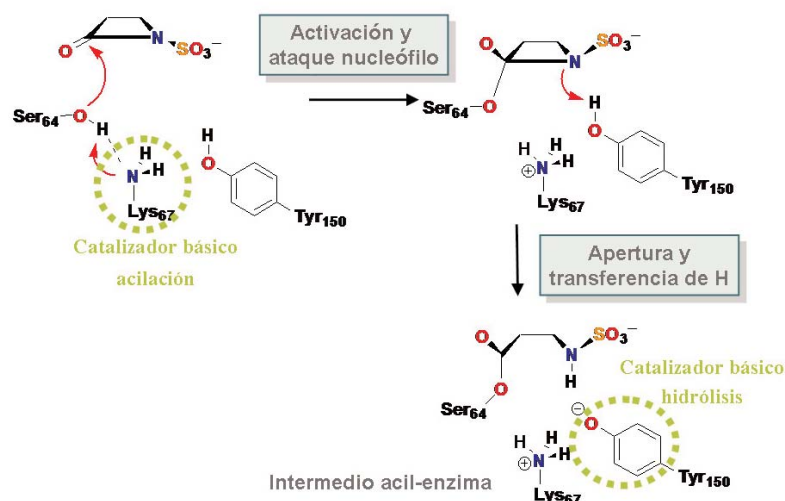


Figura 13. Mecanismo de reacción propuesto para el proceso de acilación entre la β-lactamasa de la clase C del *Citrobacter freundii* y el antibiótico monobactámico aztreonam.

del mutante Lys₆₇/Arg₆₇ en presencia de la Tyr₁₅₀ en su forma aniónica y del antibiótico aztreonam confirma que la orientación de la β-lactama es adecuada para acilar a la Ser₆₄. Además, el nucleófilo interacciona fundamentalmente con el fenolato de la Tyr₁₅₀ que, por lo tanto, actuaría como catalizador básico.

Relevancia de los resultados para el diseño de fármacos

Hoy en día, los constantes avances en las técnicas de biología molecular, bioquímica, determinación estructural y modelización molecular permiten *diseñar* compuestos que se unen específicamente a una proteína diana.^[52] La modelización molecular adquiere cada vez más importancia en la obtención de nuevos fármacos gracias a técnicas computacionales como el cribado *virtual*, que aprovecha las amplias bases de datos estructurales de dianas moleculares y/o de moléculas orgánicas, así como la elevada capacidad de almacenamiento y velocidad de cálculo de los ordenadores actuales.

Las simulaciones aquí presentadas apuntan hacia dos cuestiones fundamentales que podrían condicionar el éxito o fracaso de un proceso de cribado virtual o de diseño iterativo de nuevos ligandos. En primer lugar, nuestros resultados muestran cómo la unión de un ligando a un centro activo puede modificar fácilmente el estado de carga de los residuos ionizables de dicho centro activo. En segundo lugar, hemos observado que la orientación del ligando puede ser dependiente de la distribución de carga en el centro activo. Por consiguiente, los análisis de las estructuras cristalinas mediante dinámica molecular y cálculos QM-PBSA podrían ser de gran relevancia para el diseño racional de fármacos. En efecto, las simulaciones de dinámica molecular caracterizarían la flexibilidad del centro activo de las proteínas diana. A continuación, los cálculos energéticos mediante el protocolo QM-PBSA discriminarían entre distintas configuraciones químicas, como por ejemplo distintos estados de ionización del centro activo de una enzima. Contando con una potencia de cálculo intermedia suministrada por un *cluster* de servidores informáticos estándar, los estudios de dinámica molecular y análisis QM-

PBSA en sistemas de tamaño medio (100–300 aminoácidos) pueden llevarse a cabo en una o dos semanas, lo que no supone un plazo de tiempo excesivo. Por lo tanto, creemos que podría ser interesante enriquecer sistemáticamente la información estructural de partida disponible para una proteína diana mediante simulaciones dinámicas y cálculos QM-PBSA, siempre como un paso previo a la aplicación de nuevas estrategias computacionales para el diseño racional de fármacos.

Agradecimientos

A los profesores Tomás Luis Sordo Gonzalo y Dimas Suárez Rodríguez por su apoyo constante, y al Ministerio de Educación y Ciencia por el programa Ramón y Cajal.

Referencias

- [1] J. Camacho Arias en *La prodigiosa penicilina*. Fleming, NIVOLA libros y ediciones, S.L.: Madrid, **2001**.
- [2] J. M. Frère, M. Nguyen-Distèche, J. Coyette, B. Joris, in *The chemistry of beta-lactams*; Blackie Academic&Professional: London, **1992**, pp 148–197.
- [3] M. C. Avendaño, C. Pedregal, in *Introducción a la Química Farmacéutica*; Iberoamericana Mc Graw-Hill: Madrid, **1993**.
- [4] C. J. Coulson, en *Molecular mechanisms of drug action*; Taylor&Francis: London, **1995**.
- [5] D. J. Tipper, J. L. Strominger, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1965**, *54*, 1133–1141.
- [6] G. D. Wright, *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 127–132.
- [7] J. F. Fisher, S. O. Meroueh, S. Mobashery, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 395–424.
- [8] H. Christensen, M. T. Martin, S. G. Waley, *Biochem. J.* **1990**, *266*, 853–861.
- [9] S. G. Waley, en *The chemistry of beta-lactams*; Blackie Academic & Professional: London, **1992**, pp 199–227.
- [10] J. M. Frère, *Mol. Microbiol.* **1995**, *16*, 385–395.
- [11] S. N. Maiti, O. A. Philips, R. G. Micetich, D. M. Livermore, *Current Medicinal Chemistry* **1998**, *5*, 441–456.
- [12] K. Bush, G. A. Jacoby, A. A. Medeiros, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 1211–1233.
- [13] D. M. Livermore, N. Woodford, *Curr. Opin. Microbiol.* **2000**, *3*, 489–495.
- [14] A. Beceiro, G. Bou, *Reviews in Medical Microbiology* **2004**, *15*, 141–152.
- [15] R. Kirby, *J. Mol. Evol.* **1992**, *34*, 345–350.
- [16] I. Massova, S. Mobashery, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 1–17.
- [17] S. O. Meroueh, G. Minasov, W. Lee, B. K. Shoichet, S. Mobashery, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9612–9618.
- [18] J. A. Kelly, A. P. Kuzin, P. Charlier, E. Fonze, *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 353–358.
- [19] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 235–242.
- [20] A. Matagne, J.-M. Frère, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1246*, 109–27.
- [21] A. R. Leach en *Molecular Modelling. Principles and Applications*; 2nd edition ed.; Prentice Hall, **2001**.
- [22] F. Jensen en *Introduction to computational chemistry*; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, **1999**.
- [23] M. J. Field, *J Comput Chem* **2002**, *23*, 48–58.
- [24] F. Gago, en *Estructura de proteínas*; Gómez-Moreno Cálera, C., Sancho Sanz, J., Eds.; Ariel Ciencia: Barcelona, **2003**, pp 415–434.
- [25] S. A. Adcock, J. A. McCammon, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1589–1615.
- [26] V. Daggett, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1898–1916.
- [27] N. Prabhu, K. Sharp, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1616–1623.
- [28] M. H. M. Olsson, W. W. Parson, A. Warshel, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1737–1756.
- [29] B. F. Gherman, S. D. Goldberg, V. W. Cornish, R. A. Friesner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7652–7654.
- [30] J. C. Hermann, C. Hensen, L. Ridder, A. J. Mulholland, H.-D. Höltje, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4454–4465.
- [31] M. Oliva, O. Dideberg, M. J. Field, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **2003**, *52*, 88–100.
- [32] C. Fenollar-Ferrer, J. Frau, J. Donoso, F. Muñoz, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **2003**, *51*, 442–452.
- [33] N. Díaz, T. L. Sordo, K. M. Merz, Jr., D. Suárez, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 672–684.
- [34] N. Díaz, D. Suárez, K. M. Merz, Jr., T. L. Sordo, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 780–791.
- [35] X. Raquet, V. Lounnas, J. Lamotte-Brasseur, J. M. Frère, R. C. Wade, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 2416–2426.
- [36] J. Lamotte-Brasseur, V. Lounnas, X. Raquet, R. C. Wade, *Protein Science* **1999**, *8*, 404–409.
- [37] J. Lamotte-Brasseur, A. Dubus, R. C. Wade, *Proteins: Struct., Funct. and Genet.* **2000**, *40*, 23–28.
- [38] P. A. Kollman, I. Massova, C. Reyes, B. Kuhn, S. Huo, L. Chong, M. Lee, T. Lee, Y. Duan, W. Wang, O. Donini, P. Cieplak, J. Srinivasan, D. A. Case, T. E. Cheatham, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 889–897.
- [39] S. L. Dixon, K. M. Merz, Jr., *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 879–893.
- [40] N. Díaz, T. L. Sordo, D. Suárez, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3225–3240.
- [41] N. Díaz, D. Suárez, T. L. Sordo, *Biochemistry* **2006**, *45*, 439–451.
- [42] E. Fonze, M. Vermeire, M. Nguyen-Distèche, R. Brasseur, P. Charlier, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21853–21860.
- [43] N. Rhazi, P. Charlier, D. Dehareng, D. Engher, M. Vermeire, J. M. Frère, M. Nguyen-Distèche, E. Fonze, *Biochemistry* **2003**, *42*, 2895–2906.
- [44] D. S. Goodsell, A. J. Olson, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1990**, *8*, 195–202.
- [45] C. Oefner, A. D'Arcy, J. J. Daly, K. Gubernator, R. L. Charnas, I. Heinze, C. Hubschwerlen, F. K. Winkler, *Nature* **1990**, *343*, 284–288.
- [46] Y. Kato-Toma, T. Iwashita, K. Masuda, Y. Oyama, M. Ishiguro, *Biochem. J.* **2003**, *371*, 175–181.
- [47] A. Dubus, S. Normark, M. Kania, M. G. P. Page, *Biochemistry* **1994**, *33*, 8577–8586.
- [48] D. Monnaie, A. Dubus, D. Cooke, J. Marchand-Brynaert, S. Normark, J.-M. Frère, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5193–5201.
- [49] A. Dubus, S. Normark, M. Kania, M. G. P. Page, *Biochemistry* **1995**, *34*, 7757–7764.
- [50] A. Dubus, P. Ledent, J. Lamotte-Brasseur, J.-M. Frère, *Proteins: Struct., Funct. and Genet.* **1996**, *25*, 473–485.
- [51] S. D. Goldberg, W. Iannuccilli, T. Nguyen, J. Ju, V. W. Cornish, *Protein Science* **2003**, *12*, 1633–1645.
- [52] A. Delgado Cirilo, C. Minguillón Llombart, J. Joglar Tarmargo, *Introducción a la Química Terapéutica*; 2a edición, Ediciones Díaz de Santos, S.A.: Madrid, **2003**.