

Biopolímero

S (4831)

Módulo 4. Ficha 4.16

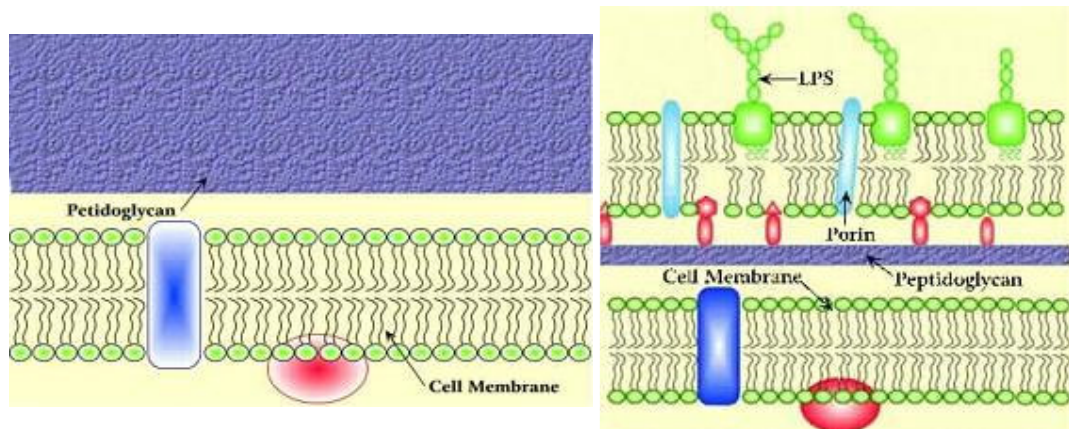


Universitat de les
Illes Balears

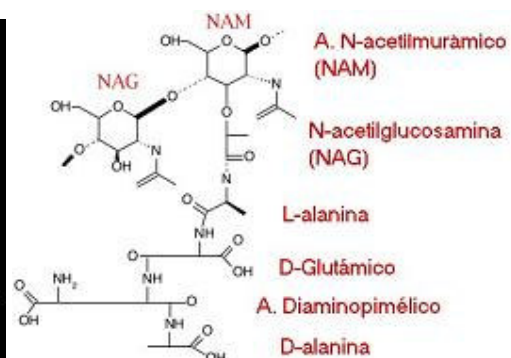
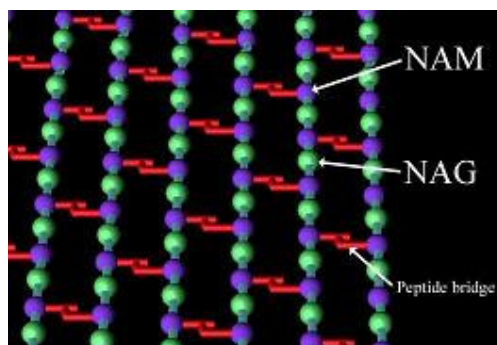
ENZIMAS

4.8. Ejemplos de mecanismo catalítico enzimático: β -lactamasas y proteasas

Las células bacterianas (procariotas) tienen una *pared celular externa* constituida por una red de peptidoglicanos que da forma a la bacteria y la protege del exterior. Dependiendo del tipo de organismo, la pared celular puede estar recubierta de una segunda membrana celular que regula la conexión entre el interior celular y el medio (Gram -) o no (Gram +).



En las bacterias **gram +**, la red de peptidoglicanos que constituyen la pared celular es totalmente externa. En las **gram -**, aún hay una membrana celular más externa, con canales selectivos (porinas) que pueden ser modificados para modular la selectividad a la entrada de nutrientes.



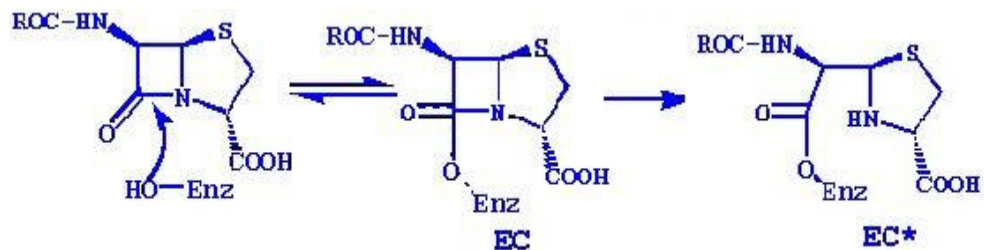
La red de péptidoglicanos está compuesta por largas cadenas de polisacáridos, formadas con unidades de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina, que se entrecruzan mediante la unión a pequeñas unidades peptídicas.

Las bacterias tienen toda una batería de enzimas que ayudan a la formación de la pared bacteriana, entre ellos hay DD-peptidasas (carboxipeptidasas y traspeptidasas) que son los targets de los antibióticos β -lactámicos.

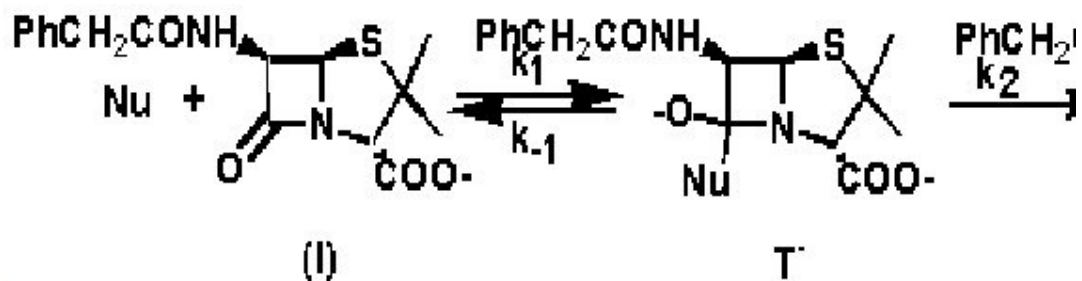


La disposición espacial de los átomos y la distribución electrónica en el residuo D-alanil-D-alanina, izquierda, es idéntica a la de los átomos del anillo β -lactámicos, derecha.

Estos enzimas bacterianos son serin-enzimas y confunden a su sustrato natural, residuos D-alanil-D-alanina, con el anillo β -lactámico, de manera que se unen a él y forman el complejo de Michaelis (EC) que evoluciona hacia la formación de un acil-enzima (EC*) de manera similar a como lo hacen con el sustrato. En el intermedio acil-enzima, el antibiótico rompe su enlace lactámico de forma que el sistema no puede evolucionar y el enzima queda irreversiblemente inhibido.

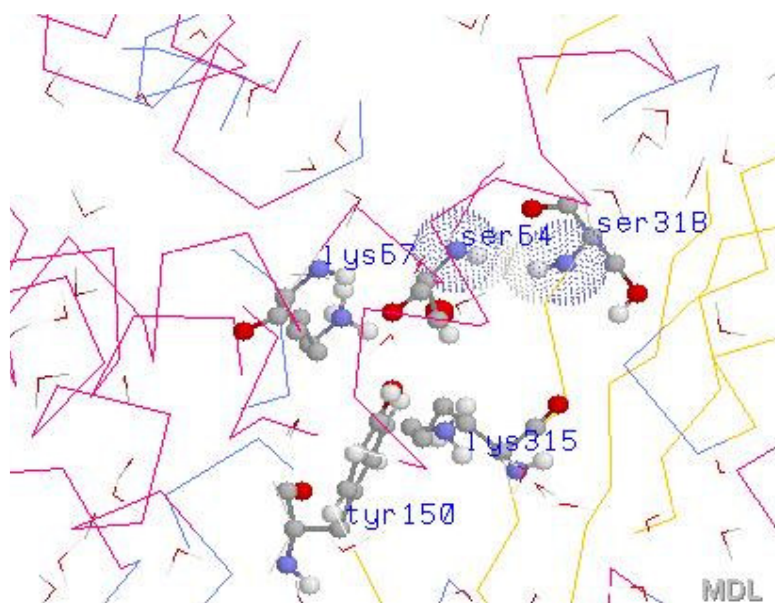


Muchas bacterias han desarrollado estrategias para luchar contra la acción de los antibióticos betalactámicos; la producción de β -lactamasas es una de ellas. Las β -lactamasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del anillo β -lactámico. Muchas de ellas son también serin-enzimas y provienen de las DD-peptidasas por evolución. Respecto a estas, han modificado su estructura de forma que, por un lado han acomodado una molécula de agua en el sitio activo, la cual es utilizada posteriormente para la hidrólisis del acil-enzima y por otro, han modificado el sitio activo para que no pueda unir el péptido del entrecruzamiento y evita así su hidrólisis.



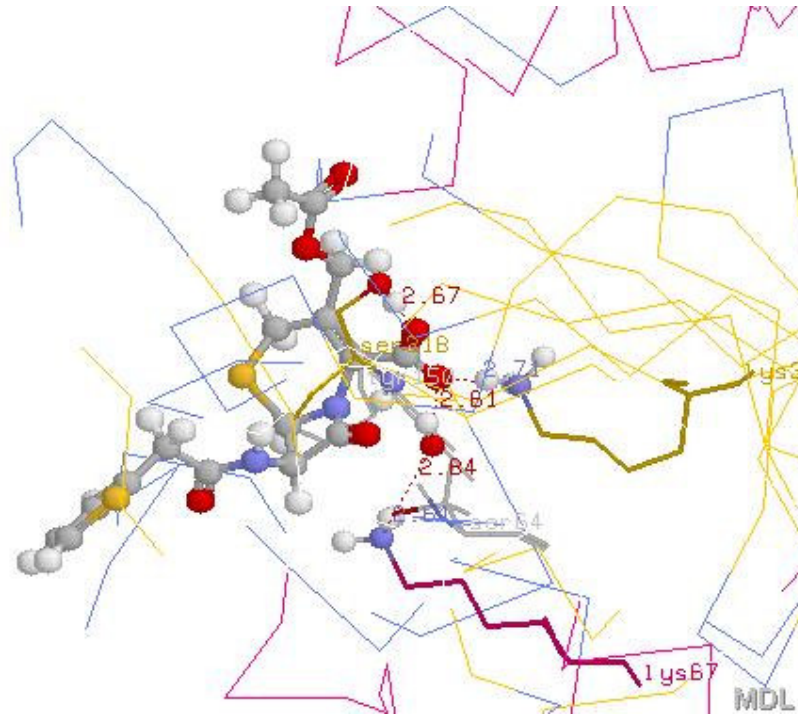
Los estudios cinéticos sobre la hidrólisis básica ($\text{Nu} = \text{OH}^-$) de los antibióticos indican que el paso limitante de la velocidad de reacción es la formación del intermedio tetraédrico T^- . En él, se ha transferido la carga negativa del anión atacante al oxígeno betalactámico.

Las β -lactamasas aceleran la formación del intermedio tetraédrico acomodando el oxianión generado en un entorno con dos fuertes dipolos, N-H, que interaccionan electrostáticamente con él.



dominio α/β dominio α nucleófilo "oxanion hole" centro activo

Modelo interactivo de la estructura terciaria de la *Betalactamasa P99* de ***Enterobacter Cloacae*** (2BLT, E. Lovkosky et al., 1993) y algunos de los aminoácidos esenciales que constituyen el *Centro Activo*. El enzima tiene dos dominios bien diferenciados, uno α/β (push dominio α/β) compuesto por 3 hélices que se alinean paralelas a la hoja beta formada por 5 hebras beta antiparalelas mayores, y otro dominio α (push dominio α). El sitio activo está situado en el espacio entre los dos dominios. El nucleófilo (push nucleófilo), el OH de la ser64 está situado al final de la H2, a 2,97 Å del oxígeno fenólico de la Tyr 150, con el que forma un enlace de hidrógeno dador, lo que corrobora la hipótesis inicial de Oefner de que es esta **tirosina** la que actúa como **catalizador básico en la activación del nucleófilo atacante**. En la H2 también está situada la lys67, cuya importancia a nivel catalítico ha sido demostrado experimentalmente por el grupo de J.M. Frère: su mutación por arginina disminuye la constante de desacilación a la mitad. En las inmediaciones del nucleófilo, también está el grupo epsilon amino de la lys315 que pertenece al dominio α/β y forma parte de una de las strands. Otro de los aspectos que debe tenerse en cuenta es el **sitio electrófilo** (push oxianión hole), es decir el llamado "oxianión hole", que estabiliza el anión formado sobre el oxígeno betalactámico en el ataque del nucleófilo sobre el carbono carbonílico. Este está formado por dos dipolos NH del esqueleto polipeptídico, uno de la propia ser64 y otro de la ser318 de la beta strand del otro dominio. (push centro activo) aspecto del sitio activo, visto desde fuera con la Tyr 150 perteneciendo al omega loop de la parte inferior del sitio activo.

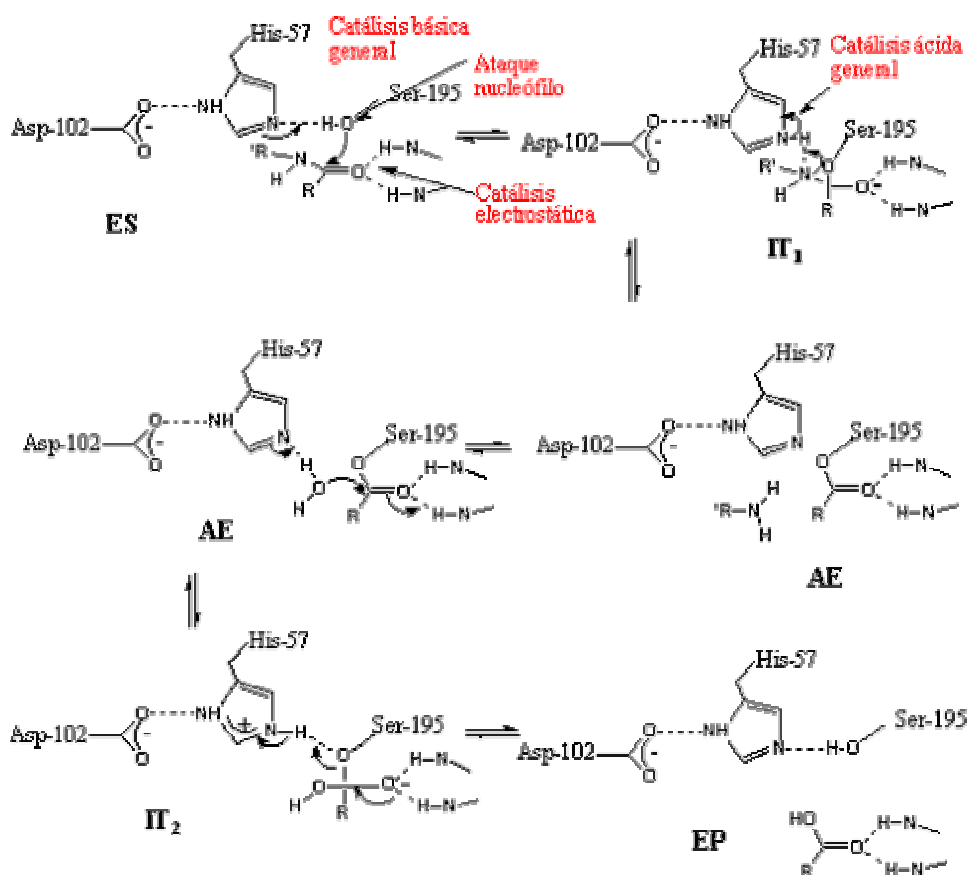


Nucleófilo O1 carboxilato "Oxianion hole" O2 carboxilato

El siguiente modelo interactivo muestra el estado de mínima energía del complejo de Michaelis modelizado por MM (campo de fuerzas AMBER*) entre la P99 y la cefalotina (Fenollar-Ferrer et al. *Proteins: Struct. Funct. Gen.* 51 (2003) 442). (push Nucleófilo) El oxígeno nucleófilo de la ser64 se encuentra a 2.76 Å del carbono betalactámico, perpendicularmente por la cara α del antibiótico. (push O1 carboxilato) Uno de los átomos de oxígeno del carboxilato betalactámico se encuentra a 2,61 Å del fenol de la Tyr150 con quien forma un enlace de hidrógeno. Es decir, la activación del nucleófilo atacante (Ser64) procede mediante la abstracción inicial del H del OH fenólico de la Tyr150 por parte del grupo carboxilato del sustrato, lo cual constituye un ejemplo de como es el propio sustrato el que dispara el mecanismo catalítico. Además, la presencia de Lys67 y Lys315 contribuyen a estabilizar el campo electrostático aniónico local. (push oxianión hole) El oxígeno betalactámico está perfectamente situado en el oxianión hole con los dos dipolos NH de las dos serinas, la 64 y la 318 solvatando el dipolo del enlace carbonílico y estabilizando la carga negativa desarrollada sobre el átomo de oxígeno en el estado de transición hacia la formación del intermedio tetraédrico. (push O1 carboxilato) El otro átomo de oxígeno sólo hace una interacción de enlace de hidrógeno con el hidroxilo de la ser318. El resto de la solvatación de este grupo se consigue con una molécula de agua.

La rotura del enlace CN de la betalactama, implica la cesión de un protón al N saliente. En el proceso, deben estar implicados la Tyr150 y la Lys67. En la segunda etapa del proceso catalítico, una molécula de agua debe ser activada como nucleófilo, posiblemente por la Lys67, para atacar al carbono carbonílico del acil-enzima y comenzar el proceso de desacilación. El sitio electrófilo "oxianión hole" sigue siendo el mismo.

El mecanismo descrito anteriormente es prácticamente universal para todos los enzimas que catalizan la rotura hidrolítica de enlaces amida o ésteres. En la figura inferior se muestra el mecanismo catalítico de la hidrólisis del enlace peptídico en proteínas catalizado por una proteasa, la quimotripsina.



Mecanismo de hidrólisis del enlace peptídico catalizado por quimotripsina. En el complejo enzima-sustrato (ES) el oxígeno carbonílico está anclado por el extremo positivo de los dipolos HN de la cadena polipeptídica. El carbono carbonílico está así anclado en la posición correcta para que se produzca el ataque nucleófilo del hidroxilo de la Ser-195 y la His-57 actúa como catalizador básico general activando el γ -OH del nucleófilo. En el primer intermedio tetrahédrico (IT1) Se desarrolla una carga negativa sobre el oxígeno que es estabilizada por los dipolos de la cadena. La interacción entre el Asp-102 y la His-57 aumenta para estabilizar la carga positiva que se desarrolla en ella. Esta, a su vez, activa el grupo R'NH- como grupo saliente mediante la cesión de un protón. El mecanismo de desacilación ocurre mediante la activación como nucleófilo de la molécula de agua por la His-57, la generación del segundo intermedio tetrahédrico (IT2) cuya rotura regenera la Ser-195 libre y los productos quedan aún anclados en el complejo enzima-productos.(EP).

[Ficha anterior](#)



Módulos