

Nuevos miembros en la vieja familia de proteínas fijadoras de penicilina

Sónia Castanheira y Francisco García-del Portillo



Laboratorio de Patógenos Bacterianos Intracelulares, Centro Nacional de Biotecnología (CNB)-CSIC. 28049 Madrid



EL DESCUBRIMIENTO DE LAS PROTEÍNAS FIJADORAS DE PENICILINA

En 1929, Fleming notificó la capacidad de un hongo *Penicillium* de inhibir el crecimiento de estafilococos, denominando “penicilina” al factor responsable (Fleming, 1929). Posteriormente, se publicó la producción de esta sustancia en cultivos de *Penicillium* (Clutterbuck et al., 1932) y su primera purificación por Florey, Chain y colegas (Abraham et al., 1941), confirmándose su alto poder antibacteriano. Hodgkin describiría pocos años después su estructura como una molécula conteniendo un anillo beta-lactama (Hodgkin, 1949). Estos investigadores recibieron el premio Nobel por los hallazgos: Fleming, Florey y Chain el Nobel de Medicina en 1945 y Hodgkin el de Química en 1964, ésta última por la aplicación de rayos-X para descifrar la estructura de importantes moléculas biológicas.

Una vez conocida la estructura de la penicilina, aumentó el interés por conocer su mecanismo de acción. En 1965, Tipper y Strominger propusieron un mecanismo de acción basado en la analogía estructural de la penicilina con el dipéptido D-alanina-D-alanina, presente en cadenas peptídicas laterales del peptidoglicano (Tipper y Strominger, 1965). Se sabía también que el tratamiento con penicilina resultaba en acumulación de un UDP-derivado del disacárido N-acetil-

rámico (MurNAc)-N-acetil-glucosamina (GlcNAc) con un pentapéptido unido a MurNAc. Ello hacía sospechar que la penicilina podría inhibir una reacción de transpeptidación, implicando la parte terminal del pentapéptido lateral (D-Ala-D-Ala).

A principios de los setenta se describieron actividades enzimáticas de tipo transpeptidasa ó carboxipeptidasa inhibidas por la penicilina y, en algunos casos, efectos morfológicos como filamentación o pérdida de forma bacilar. Además, se acumulaba evidencia de la estabilidad de la inhibición, especulando sobre si el antibiótico se unía de forma covalente (revisado en Blumberg y Strominger, 1974). No obstante, no se conocían la identidad de estas enzimas ni el conjunto de ellas producidas por una bacteria. El trabajo pionero de Spratt y Pardee, publicado en la revista *Nature*, permitió “visualizar” por vez primera de forma simultánea las enzimas que unen antibióticos beta-lactámicos (Spratt y Pardee, 1975). Estos investigadores incubaron una preparación de membranas de *Escherichia coli* con ¹⁴C-bencil-penicilina. En la autoradiografía aparecieron varias proteínas, las “penicillin-binding proteins” (PBPs), a las que después asignaron numeración de menor a mayor en base a peso molecular decreciente. En ese mismo trabajo describen el primer ensayo de competición mediante incubación previa con antibiótico no radioactivo, pudiéndose así determinar la afinidad relativa de cualquier antibiótico “problema”. Estos sencillos experimentos permitieron así asociar la unión del antibiótico a una PBP concreta con un efecto morfológico o una rápida pérdida de viabilidad. Todo ello supuso un gran avance en el desarrollo de nuevos antibióticos.

Los trabajos subsiguientes de Spratt y colegas culminaron en observaciones igualmente relevantes: i) todas las bacterias que

se examinaban mostraban varias PBPs; y, ii) la competición con antibióticos que producían alteraciones morfológicas (filamentación, redondeo) resultaba en *E. coli* en la desaparición en la autoradiografía de una sola PBP (Spratt, 1975; Spratt, 1977). Así, la inhibición de la PBP3 se asoció con la pérdida de la capacidad de división mientras que en el caso de PBP2 se perdía la capacidad de elongar el peptidoglicano, resultando en la formación de células redondeadas (Spratt, 1975; Spratt, 1975). Estas importantes funciones son, de hecho, la base del efecto bacteriolítico de los beta-lactámicos que muestran afinidad por estas PBPs en *E. coli* o por sus homólogos en otros microorganismos (Hutchings et al., 2019).

PBPs EN PATÓGENOS BACTERIANOS INTRACELULARES

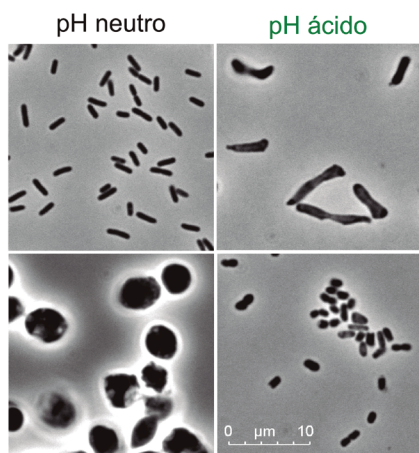
Durante las dos últimas décadas, nuestro laboratorio ha centrado sus estudios en la pared celular de *Salmonella enterica* cuando este patógeno coloniza el interior de la célula eucariota para establecer una infección persistente. Los datos que hemos acumulado muestran alteraciones estructurales del peptidoglicano (PG) que, entre otros efectos, provocan en la célula hospedadora una disminución de la capacidad de señalización mediada por el regulador NF-κB (Ramos-Marquès et al., 2017). Por tanto, este patógeno parece “esculpir” el PG para establecer un estilo de vida intracelular altamente exitoso. Un ejemplo de esta estrategia de interferencia con los sistemas de defensa inmune es una nueva enzima que utiliza la bacteria intracelular que denominamos EcgA, la cual actúa como una DL-endopeptidasa rompiendo el enlace entre D-glutámico y meso-diaminopimélico (D-Glu-*m*Dap) en la cadena lateral peptídica del PG (Rico-Pérez

et al., 2016). Esa configuración D-Glu-*mDap* (también conocida como iE-Dap) es clave en el reconocimiento de fragmentos de PG por el receptor de defensa NOD1 (Caruso *et al.*, 2014). Así, la actividad de EcgA podría disminuir los niveles de ligando a NOD1 en el caso de liberarse fragmentos de PG en el interior de la célula infectada.

Además de EcgA, el análisis del genoma de *S. enterica* nos ha deparado otras sorpresas en referencia a enzimas que metabolizan el PG. La mayor de ellas sin duda han sido genes que codifican nuevas enzimas similares a PBP2 y PBP3, a las que denominamos PBP2_{SAL} y PBP3_{SAL} (Castanheira *et al.*, 2017; Castanheira *et al.*, 2018). Esta aparente “duplicidad” de PBPs en *S. enterica* nos llevó a especular una posible relación con su doble estilo de vida, extracelular e intracelular. Nuestros datos han confirmado que PBP2_{SAL} y PBP3_{SAL} se producen en la fase intracelular y, lo más sorprendente, que “reemplazan” en bacteria intracelular a las

históricamente supuestas esenciales PBP2 y PBP3 (Castanheira *et al.*, 2020). Los ensayos de unión de beta-lactámicos indican que PBP2_{SAL} y PBP3_{SAL} unen antibiótico de forma más efectiva en pH ácido mientras que PBP2 y PBP3 lo hacen en pH neutro. Además, PBP3_{SAL} muestra baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos conocidos (Castanheira *et al.*, 2020). Esta característica de PBP3_{SAL}, unida al intercambio de PBPs que tiene lugar en el ambiente intracelular, nos alerta sobre la dificultad de conseguir una terapia efectiva de la infección intracelular por *Salmonella* utilizando los beta-lactámicos actuales. De hecho, hoy sabemos que el intercambio de PBP3 por PBP3_{SAL} en la bacteria intracelular contribuye a la alta tasa de recaídas asociada a muchos casos de salmonelosis tras la terminación de la terapia antibiótica (Castanheira *et al.*, 2020). Ello nos ha conducido a buscar nuevas moléculas con alta afinidad de unión a PBP3_{SAL}.

Una pregunta que subyace a estas nuevas PBPs es su significado biológico. Ambas, PBP2_{SAL} y PBP3_{SAL}, aparentemente realizan las mismas funciones en la morfogénesis de la bacteria que las que estaban ya descritas para PBP2 y PBP3. Entonces, ¿Por qué las cambia el patógeno en el interior de la célula eucariota y qué regulador(es) se encargan de ello? Estas son sin duda importantes preguntas que pretendemos responder. Los datos que estamos obteniendo nos permiten especular sobre una posible función cruzada de estas nuevas PBPs con determinados factores de virulencia importantes en la vida intracelular. El futuro nos brindará más sorpresas e interrogantes sobre estas nuevas PBPs, ejemplo de enzimas que se explotan en un ciclo infeccioso de forma sublime por patógenos, pero que por ello claramente nos dificultan su control y erradicación.



Cambios morfológicos en mutantes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium con deficiencias en PBPs que controlan elongación y división celular. Nótese como alguno de estos mutantes (fila superior) muestra cambios morfológicos en la condición intracelular (pH ácido), mientras que otros (fila inferior) los muestra en la condición extracelular (pH neutro).

BIBLIOGRAFÍA

Abraham EP, Chain E, Fletcher CM, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA y Florey HW. (1941). Further observations on penicillin. *Lancet* 238:177-189.

Blumberg, PM y Strominger, JL. (1974). Interaction of penicillin with the bacterial cell: penicillin binding proteins and penicillin-sensitive enzymes. *Bacteriol. Rev.* 38: 291-335.

Caruso R, Warner N, Inohara N, y Nunez G. (2014). NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity* 41:898-908.

Castanheira S, Cestero JJ, García-del Portillo F y Pucciarelli MG. (2018). Two distinct penicillin binding proteins promote cell division in different *Salmonella* lifestyles. *Microb. Cell* 5:165-8.

Castanheira S, Cestero JJ, Rico-Pérez G, García P, Cava F, Ayala JA, Pucciarelli, MG y García-del Portillo, F. (2017). A specialized peptidoglycan synthase promotes *Salmonella* cell division inside host cells. *MBio* 8. DOI: 10.1128/mBio.01685-17

Castanheira S, Lopez-Escarpa D, Pucciarelli MG, Cestero JJ, Baquero F y García-Del Portillo F. (2020). An alternative penicillin-binding protein involved in *Salmonella* relapses following ceftriaxone therapy. *EBioMedicine* 55:102771.

Clutterbuck PW, Lovell R y Raistrick H. (1932). Studies in the biochemistry of micro-organisms: The formation from glucose by members of the *Penicillium chrysogenum* series of a pigment, an alkali-soluble protein and penicillin-the antibacterial substance of Fleming. *Biochem J* 26:1907-1918.

Fleming A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 10:226-236.

Hodgkin DC. (1949) The X-ray analysis of the structure of penicillin. *Adv Sci* 6:85-89.

Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* 51:72-80.

Ramos-Marques E, Zambrano S, Tierrez A, Bianchi ME, Agresti A, García-Del Portillo F. (2017) Single-cell analyses reveal an attenuated NF-kappaB response in the *Salmonella*-infected fibroblast. *Virulence* 8:719-740.

Rico-Perez G, Pezza A, Pucciarelli MG, de Pedro MA, Soncini FC, García-del Portillo F. (2016). A novel peptidoglycan D,L-endopeptidase induced by *Salmonella* inside eukaryotic cells contributes to virulence. *Mol Microbiol* 2016;99:546-56.

Spratt BG. (1975). Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:2999-3003.

Spratt BG. (1977) Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* 72:341-52.

Spratt BG, Pardee AB. (1975). Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature* 254:516-7.

Tipper DJ, Strominger JL. (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 54:1133-1141.