

© 2019 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 22: 1-16, 2019.

DOI: [10.22201/fesz.23958723e.2019.0.191](https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.191)

Aspectos estructurales y funcionales de la N-Succinil-L, L-diaminopimelato desuccinilasa, una enzima clave para el crecimiento bacteriano y un blanco para el control antimicrobiano

Ángel Gabriel Díaz-Sánchez*, Manuel Terrazas-López,
Luis Guadalupe Aguirre-Reyes, Naún Lobo-Galo,
Emilio Álvarez-Parrilla y Alejandro Martínez-Martínez

Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas,
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, Chihuahua 32310, México
E-mail: *angel.diaz@uacj.mx

RESUMEN

La N-Succinil-L, L-diaminopimelato desuccinilasa (DapE) es una amidohidrolasa dependiente de iones de zinc, homodimérica estricta, que cataliza la descomposición del N-succinil-L, L-2,6-diaminopimelato (NSDAP), en succinato y diaminopimelato (DAP). Reacción que constituye la única fuente de *meso*-diaminopimelato (*mDAP*) y L-Lys en la mayoría de las bacterias. DapE es esencial para el crecimiento bacteriano y un blanco farmacológico antimicrobiano. El desarrollo de los inhibidores anti-DapE debe tener en cuenta las propiedades dinámicas de la enzima. Se buscan compuestos que interfieran con la formación del agujero del oxianión, en donde participan grupos de ambas subunidades del dímero, que se acomoda en posición catalítica mediante el cambio conformacional de la enzima de un estado abierto a uno cerrado, después de la unión del sustrato; estabilizando a los intermediarios de reacción y produciendo un descenso en la energía de activación. Con base en el análisis cristalográfico y el acoplamiento del sustrato en DapE que se presenta en este trabajo, se discute el papel de la flexibilidad conformacional de la enzima en la hidrólisis del sustrato. Se observa que tanto el grupo carbonilo del sustrato es susceptible al ataque como una molécula de agua ubicada en el sitio activo y se encuentran cercanos a la trayectoria de ataque, en el ángulo de Bürgi-Dunitz.

Palabras Clave: estructura de proteínas, función de proteínas, enzimas, inhibición, dinámica conformacional.

Structural and Functional Features of a N-Succinyl-L, L-diaminopimelate desuccinylase, acritical enzyme for bacterial growth and an antimicrobial target

ABSTRACT

N-Succinyl-L, L-diaminopimelate desuccinylase (DapE) is a strictly dimeric zinc-dependent amidohydrolase, which catalyzes the decomposition of N-succinyl-L, L-2,6-diaminopimelate (NSDAP), into succinate and diaminopimelate (DAP). This reaction constitutes the only source of *meso*-diaminopimelate (*mDAP*) and L-Lys in most bacteria. DapE is essential for bacterial growth and a pharmacological antimicrobial target. The development of anti-DapE inhibitors must take into account the dynamic properties of the enzyme. There is a special interest in compounds that block the formation of the oxyanion hole, where is assembled with groups of both subunits of the dimer and accommodated in its catalytic position by the conformational change of the enzyme from an open to a closed state, upon productive substrate binding. The hole stabilizes reaction intermediaries, thus contributing to the decrease in the activation energy. Based on the crystallographic analysis and the coupling of the substrate into DapE presented in this work, the role of the conformational flexibility of the enzyme in substrate hydrolysis is discussed. It is observed that the susceptible carbonyl group of the substrate and a water molecule located in the active site are near to the trajectory of attack, the Bürgi-Dunitz angle.

Key Words: protein structure, protein function, enzymes, inhibition, conformational dynamics.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento y el combate a las infecciones por bacterias persistentes y multirresistentes a los antibióticos es un problema central (Paphitou, 2013). La búsqueda de nuevos antibióticos, dirigidos contra blancos biomacromoleculares alternativos, constituye una importante estrategia para combatir las infecciones. Las enzimas de las rutas involucradas en la biosíntesis, remodelación y degradación de los componentes de la pared celular bacteriana son un excelente blanco para el desarrollo de nuevos antibióticos (Alcorlo, Martínez-Caballero, Molina & Hermoso, 2017). Uno de los componentes mayoritarios de la pared celular de las bacterias es el peptidoglicano (PG), un polisacárido complejo de mureína (mur, porción de carbohidrato de la estructura) entrecruzado con péptidos no ribosómicos (que es la porción peptídica), (Figura 1). El PG provee a la pared celular del soporte necesario para resistir los cambios en las presiones osmóticas celulares y su metabolismo es importante para el crecimiento, división, morfología y anclaje celular (Dramsí, Magnet, Davison & Arthur, 2008; Vollmer, Blanot & De Pedro, 2008).

En bacterias Gram negativas, uno de los aminoácidos claves en el entrecruzamiento es el mDAP y en Gram positivas es la L-Lys (Figura 1).

Estos aminoácidos son biosintetizados por la ruta mDAP/Lys (Figura 2) y son esenciales para el crecimiento microbiano. El bloqueo de esta ruta es letal (Born & Blanchard, 1999), en especial la interrupción del gen de *dapE* en *Helicobacter pylori* y *Mycobacterium smegmatis*, aún en presencia de L-Lys y mDAP suplementado en el medio de crecimiento (Karita, Etterbeek, Forsyth, Tummuru & Blaser, 1997). Esto pone en relieve la importancia de DapE y otras enzimas de esta ruta (Gillner, Becker & Holz, 2013; Gillner *et al.*, 2009a). En el banco de datos de las proteínas (PDB), existe por lo menos una estructura cristalina de cada una de las enzimas de la ruta, hecho que resalta aún más su importancia y enfoque en el diseño de nuevos antibióticos. Un aspecto sin duda prometedor para esta potencial quimioterapia bacteriana, es que no existen actividades enzimáticas similares en los humanos, lo que disminuiría los efectos secundarios de la inhibición no deseada e inespecífica. Aquí se presentan los

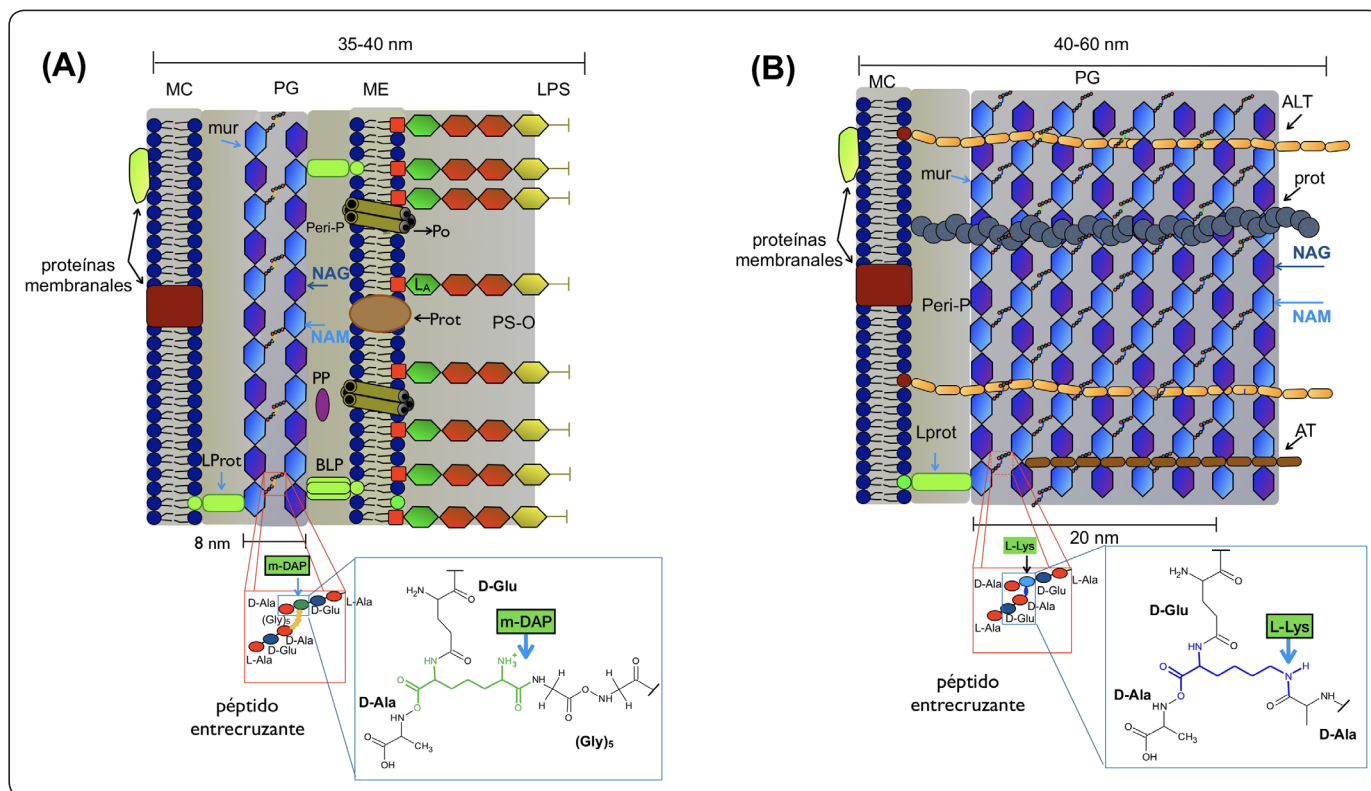


Figura 1. Organización estructural de la pared bacteriana. (A) en Gram negativas y (B) en positivas. Se muestra la constitución del péptido entrecruzante de las cadenas de mureína (mur) de la porción del peptidoglicano (PG). El aminoácido crítico en (A) es el *m*-diaminopimelato (*m*DAP) y en (B) es la L-Lys. LPS: lipopolisacárido, ME: membrana exterior, MC: membrana celular, PS-O: polisacárido O, L_A: lípido A, NAG: N-acetil-glucosamina, NAM: ácido N-acetil murámico, PP: proteína periplásmica, BLP: lipoproteína de Braun, LProt: lipoproteína, Peri-P: periplasma, Po: porina, Prot: proteína, ALT: ácido lipoteicoico, AT: ácido teicoico. Las distancias entre las líneas son las de las estructuras delimitadas en nanómetros. Los esquemas de las estructuras de la porción del PG se realizaron en ChemSketch®, figura modificada de Alcorlo *et al.* (2017).

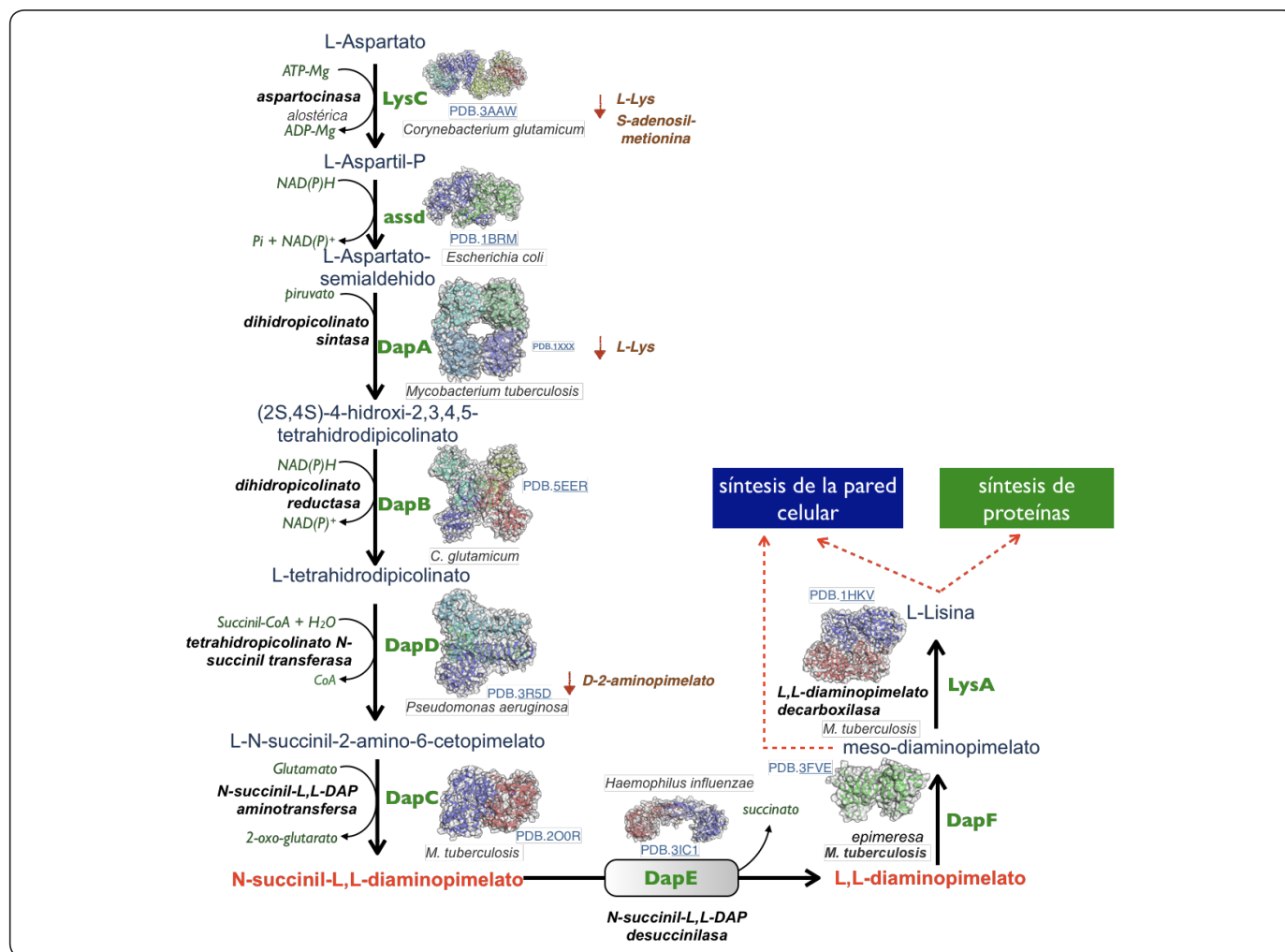


Figura 2. Ruta de la biosíntesis de *meso*-Diaminopimelato/Lisina (mDAP/Lys). Se muestra el nombre de las enzimas a la izquierda y su abreviatura a la derecha. Se despliegan las estructuras tridimensionales globales de las enzimas depositadas en el PDB, junto con su código y la bacteria de la cual provienen. La aspartocinasa (LysC), dihidropicolinato sintasa (DapA) y la dihidropicolinato reductasa (DapB) son enzimas susceptibles a la inhibición por L-Lys, el producto final de la ruta, por lo que se asume presentan retro-inhibición y son enzimas cooperativas, por tanto, deben ser puntos críticos de la regulación del flujo de la ruta; estos pasos de control son resaltados con flechas y letras rojas. Las imágenes de las enzimas se realizaron en Pymol (Schrödinger, 2015). Elaborada por los autores.

aspectos bioquímicos relevantes de la estructura, función e inhibición de la enzima DapE, una enzima presente en prácticamente todas las bacterias a las que se les conoce su genoma y ausente en el genoma humano. En este artículo se realiza con especial énfasis el análisis de la dinámica del ensamble del agujero del oxianión y de los residuos de los aminoácidos involucrados en la unión del sustrato, características que no se han contemplado en otras revisiones (Usha *et al.*, 2012; Gillner *et al.*, 2013).

REACCIÓN CATALIZADA

La enzima DapE cataliza la hidrólisis del NSDAP a succinato y DAP (E.C. 3.5.1.18), (Figura 3 A), (Bienvenue, Gillner, Davis, Bennett & Holz, 2003). La reacción involucra una amidohidrólisis alcalina asistida estrictamente por centros

metálicos y la formación de un agujero del oxianión para estabilizar al intermediario del producto (Nocek *et al.*, 2018). Se ha observado que existe una relación entre la especificidad por el sustrato con el tipo de cofactor unido (Broder & Miller, 2003). La presencia de sus dos centros metálicos (C) con Zn^{2+} (DapE-C₁- Zn^{2+} /C₂- Zn^{2+}) produce una preferencia por el NSDAP y cuando es reemplazado el del C₂ por un cofactor distinto, como por Mn^{2+} , la enzima se convierte en una dipeptidasa (Figura 3 B). También se ha observado un cambio en la capacidad de unión del inhibidor Captopril en función de los iones presentes en los centros metálicos (Uda *et al.*, 2014), un hecho que debe ser considerado en el diseño y selección de inhibidores adecuados para DapE. Cuando se sustituye el ion Zn^{2+} del C₂ por Co^{2+} , la enzima es incluso más activa frente a NSDAP (Cuadro 1), (Lin, Myhrman, Schrag

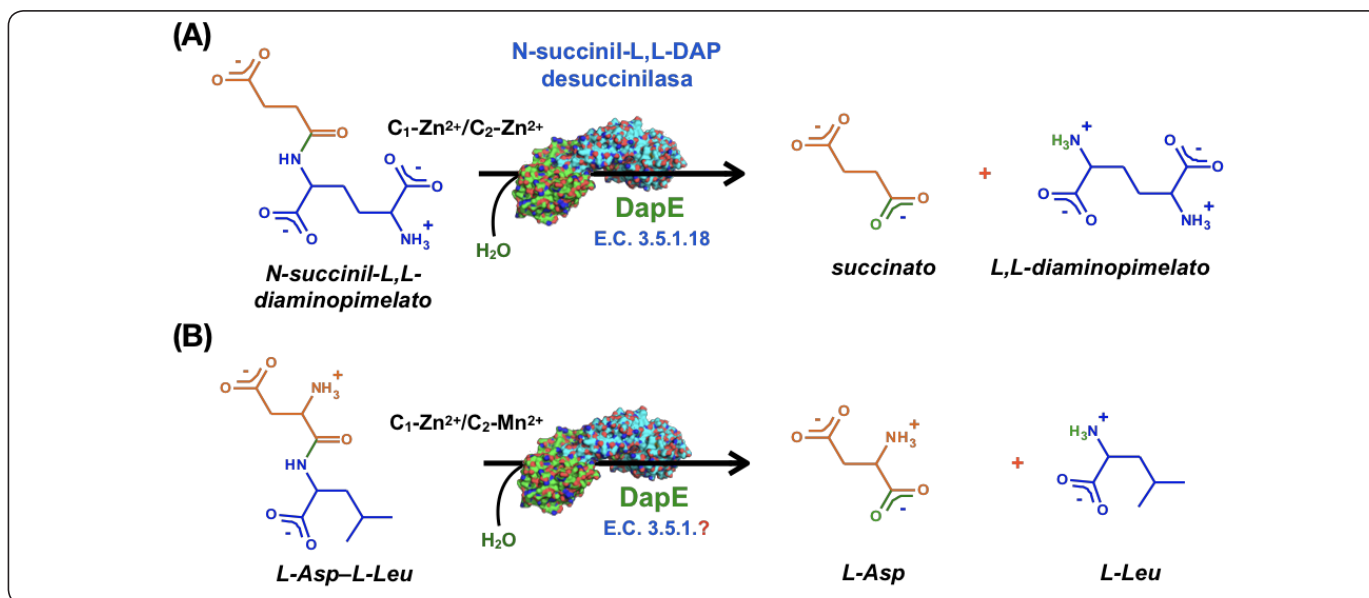


Figura 3. Reacción catalizada por la enzima N-Succinil-L, L-diaminopimelato desuccinilasa (DapE). (A) Con el N-Succinil-L, L-2,6-diaminopimelato (NSDAP), por la enzima que presenta sus centros metálicos ocupados por Zn²⁺ y (B) Con Asp-Leu por la enzima con su centro metálico 1 (C₁) ocupado por Zn²⁺ y el C₂ por Mn²⁺. En A se muestra la clasificación E.C. para la reacción y en B se omite el cuarto número, porque no está anotado para el sustrato L-Asp-L-Leu. NSDAP y Asp-Leu son los sustratos que se usan en cada una de las reacciones descritas. Las imágenes de las estructuras de los compuestos se realizaron en Chem Sketch® y las imágenes de DapE en Pymol (Schrödinger, 2015). Elaborada por los autores.

& Gelb, 1988). También se ha probado con Mg²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Al³⁺ y Fe³⁺, obteniendo formas de la enzima menos activas (Bienvenue *et al.*, 2003; Kindler & Gilvardo, 1960). Hasta la fecha no es claro si existe un recambio de metales en la enzima en condiciones fisiológicas y si éste pudiera producir un efecto sobre la especificidad de la enzima cuando las bacterias enfrentan cambios en las concentraciones de iones metálicos.

Aunque la enzima DapE es de reconocida importancia para el control bacteriano, actualmente sólo se han caracterizado bioquímicamente pocas enzimas representantes de este grupo (Cuadro 1). Esto probablemente se debe a que el sustrato fisiológico no está comercialmente disponible y su síntesis es relativamente costosa y de bajo rendimiento (Lin, Myhrman, Schrag & Gelb, 1988). Por otro lado, el monitoreo de las especies de la reacción son un reto analítico. En la mayoría de los estudios se emplea el ensayo acoplado de la ninhidrina para monitorear el producto: el 2,6-DAP (Kindler & Gilvardo, 1960), sin embargo, existe una reacción positiva con la ninhidrina tanto con el sustrato (por el amino 6 libre, ver Figura 3 A), como con el producto. Aunque se modificó el método a una incubación a tiempos cortos y a temperaturas más bajas, para favorecer sólo la reacción con el DAP, se sigue observando una alta incertidumbre (Lin, Myhrman, Schrag & Gelb, 1988) y sólo parece funcionar a concentraciones bajas del sustrato. También se han desarrollado métodos de detección de la actividad empleando

NSDAP con marca radioactiva (Lin, Myhrman, Schrag & Gelb, 1988), sin embargo, este método es aún más costoso y requiere una variedad de pasos para lograr medir la reacción, por lo que en estudios cinéticos es impráctico. Recientemente se desarrolló un derivado metilado del sustrato NSADP, en donde se bloquea al grupo amino libre logrando medir sin incertidumbre la reacción con ninhidrina (Heath *et al.*, 2018); este derivado se propuso para la identificación de nuevos inhibidores en ensayos de cribado de compuestos, pero su obtención tiene el inconveniente de que su costo es elevado. También se emplea el monitoreo espectroscópico en el UV del enlace amida (Gillner, Armoush, Holz & Becker, 2009b), pero numerosos ligandos e incluso la propia enzima introducen un alto ruido y falsos positivos en la hidrólisis. Una estrategia que se ha buscado para monitorear la reacción y de esta manera tener más información bioquímica de la enzima, es emplear un análogo del sustrato fisiológico que sea este comercialmente disponible y se pueda seguir espectroscópicamente. Se han intentado emplear análogos del sustrato, como algunos derivados de los L-aminoácidos, N-acetilados (Bienvenue *et al.*, 2003) y algunos péptidos (Broder & Miller, 2003), como el α -Leucil-glutamato (α LE), sin embargo, no se observa ninguna reacción con ellos, sólo que se sustituya el C₂-Zn²⁺ por el Mn²⁺, la enzima puede funcionar como una dipeptidasa. El no contar con un método más operativo de síntesis del NSDAP o bien un sustrato análogo comercialmente disponible, así como una técnica analítica para el monitoreo de la reacción, son limitantes

Enzima	Centros metálicos C ₁ /C ₂	Sustrato	pH/°C usado	K _M (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (M ⁻¹ s ⁻¹)	Referencia
HiDapE	Zn ²⁺ /Zn ²⁺	NSDAP	7.5/30	0.73	140	1.92x10 ⁵	(Bienvenue, Gillner, Davis, Bennett & Holz, 2003)
HiDapE	Zn ²⁺ /-	NSDAP	7.5/30	0.73	80	1.09x10 ⁵	(Bienvenue, Gillner, Davis, Bennett & Holz, 2003)
HiDapE	Co ²⁺ /-	NSDAP	7.5/30	0.99	120	1.21x10 ⁵	(Bienvenue, Gillner, Davis, Bennett & Holz, 2003)
HiDapE	Co ²⁺ /Co ²⁺	NSDAP	7.5/30	0.99	150	1.51x10 ⁵	(Bienvenue, Gillner, Davis, Bennett & Holz, 2003)
HiDapE	Zn ²⁺ /Co ²⁺	NSDAP	7.5/30	0.26	75	2.88x10 ⁵	(Bienvenue, Gillner, Davis, Bennett & Holz, 2003)
HiDapE	Zn ²⁺ /Zn ²⁺	DL-NSDAP	7.6/25	3.20	230	7.18x10 ⁴	(Born, Zheng & Blanchard, 1998)
HiDapE	Zn ²⁺ /Zn ²⁺	NSDAP	7.5/25	0.80	114	1.43x10 ⁵	(Nocek <i>et al.</i> , 2014)
EcDapE	¿/Co ²⁺	NSDAP	8.0/37	1.30	ND	ND	(Kindler & Gilvarado, 1960)
EcDapE	Zn ²⁺ /Zn ²⁺	NSDAP	7.0/37	0.40	266	6.67x10 ⁵	(Lin, Myhrman, Schrag & Gelb, 1988)
VcDapE	Zn ²⁺ /Zn ²⁺	NSDAP	7.5/25	1.20	80	6.67x10 ⁴	(Nocek <i>et al.</i> , 2014)

¹El símbolo (-) significa en ausencia aparente del segundo centro metálico; (¿?) significa que no se especifican las condiciones; ND significa no determinado. ²HiDapE es la enzima DapE de *Haemophilus influenzae*. ³EcDapE es la enzima DapE de *Escherichia coli*. ⁴VcDapE es la enzima DapE de *Vibrio cholerae*.

Cuadro 1. Parámetros cinéticos de las enzimas DapE caracterizadas hasta la fecha.

para la producción de la información bioquímica suficiente para el desarrollo apropiado de inhibidores efectivos.

A pesar de lo mencionado, la enzima que más se ha estudiado tanto bioquímica como estructuralmente es la de *Haemophilus influenzae* (HiDapE), (Born, Zheng & Blanchard, 1998; Bienvenue *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2006; Gillner, Armoush, Holz & Becker, 2009b; Nocek *et al.*, 2010; Nocek *et al.*, 2014). La reacción se ha medido en diferentes condiciones de pH, desde 6.0 a 9.0, siendo de 7.5 a 8.0 el óptimo y una temperatura óptima de la reacción es entre 25 y 30 °C (Kindler & Gilvarado, 1960; Davis *et al.*, 2006; Gillner, Armoush, Holz & Becker, 2009b; McGregor, Gillner, Swierczek, Liu & Holz, 2013; Hlaváček *et al.*, 2014; Nocek *et al.*, 2014). También se conocen los parámetros cinéticos de la reacción empleando NSDAP como sustrato, de la enzima de *Escherichia coli* (Kindler & Gilvarado, 1960) y *Vibrio cholera* (Nocek *et al.*, 2014), (Cuadro 1). La reacción de DapE se ha medido con otros sustratos como el enantiómero D, L o con el derivado (2S,6S)-2-amino-6-[(3-carboxipropanoil) amino]-heptanodioato, pero se ha observado que la enzima guarda una estricta preferencia por el enantiómero L, L del NSDAP (Bienvenue, Gillner, Davis, Bennett & Holz, 2003).

Los datos cinéticos de la reacción son escasos (Cuadro 1), aunque se ha propuesto un mecanismo químico, no se

conocen los detalles experimentales del mecanismo cinético, por ejemplo, del paso limitante de la reacción, del mecanismo y forma de disociación de los productos de reacción, tampoco si la hidrólisis del sustrato es bajo un equilibrio rápido o un estado estacionario y qué tan diferentes son estos aspectos entre las enzimas DapE de diferentes bacterias.

ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL

Hasta la fecha se conocen las estructuras tridimensionales de HiDapE (en total 4 cristales), (Nocek *et al.*, 2014, 2018; Nocek *et al.*, 2010), de *Neisseria meningitidis* (5 cristales), (Badger *et al.*, 2005; Starus *et al.*, 2015), de *V.cholerae* (2 cristales), (Nocek *et al.*, 2014), de *Corynebacterium glutamicum* (1 cristal), (Brunger *et al.*, 2012) y de *Legionella pneumophila* (1 cristal, sin publicación asociada, código PDB: 3PFE). También existe una estructura cristalina de una metalopeptidasa dependiente de Mn²⁺ anotada como una probable DapE de *S. aureus* (Girish & Gopal, 2010), sin embargo, no es claro si es de este grupo de enzimas, ya que presenta una identidad aproximada de 25% con respecto a las otras DapE identificadas y parece ser específica por sustratos dipéptidos y no por el NSDAP. Aunque las secuencias de las enzimas DapE presentan relativa baja identidad con respecto a HiDapE (de 20 a 60%), todas las conocidas hasta ahora y caracterizadas bioquímicamente pertenecen a la familia de las peptidasas M20. Éstas son un grupo de metaloenzimas

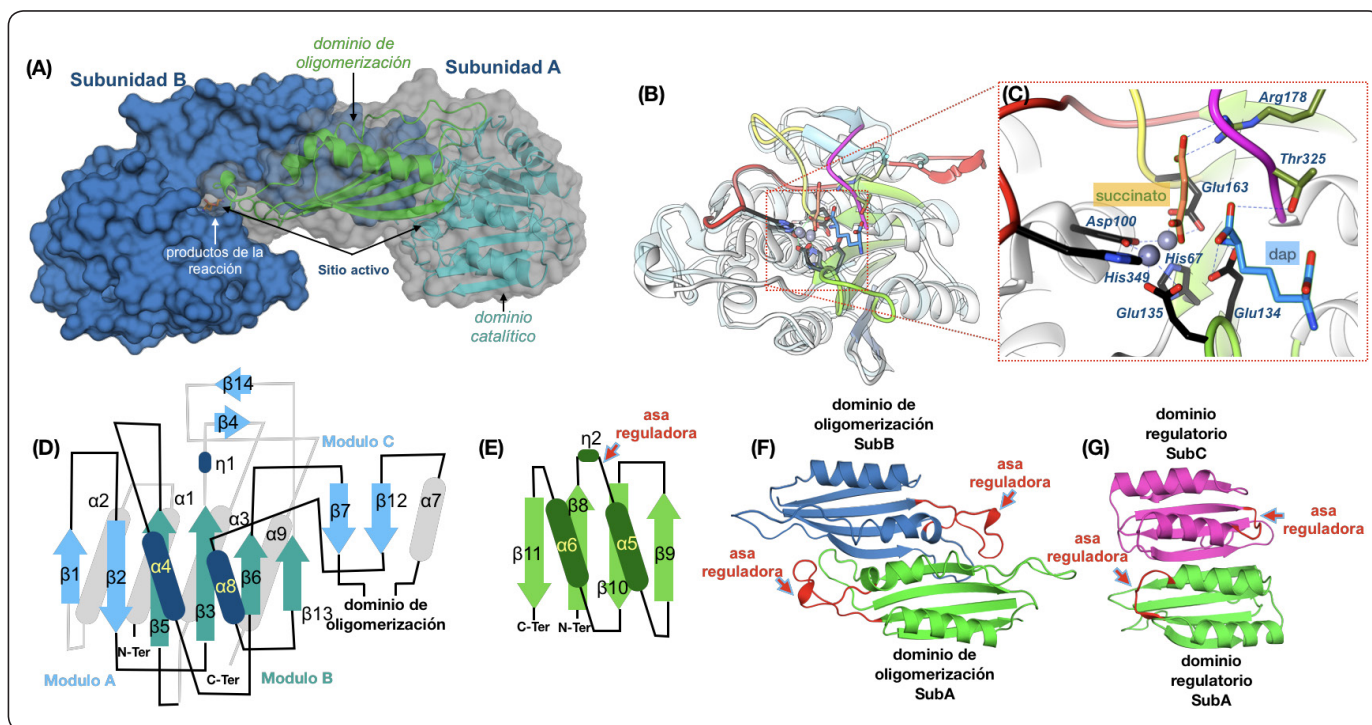


Figura 4. Estructura tridimensional de las enzimas DapE. (A) Estructura cuaternaria mostrando el dímero. Se presenta la subunidad B en superficie sin transparencia, para resaltar el sitio activo y los productos de la reacción presentes en el PDB:5vo3; la subunidad A se muestra en superficie sobre fondo, con transparencia y resaltando los dominios de la estructura en representación de listones. (B) Estructura terciaria del dominio catalítico de la subunidad A de DapE de *H. influenzae* (Hi DapE:PDB:5vo3 cadena A) y sobrepuesto se encuentra el dominio trunco de *V. cholerae* (VcDapEt:PDB:4op4). Se despliega en representación de listones en blanco y se resaltan las hebras- β y las asas catalíticas de HiDapE. La horquilla señalada con una flecha es el punto donde se truncó del dominio catalítico en VcDapEt. (C) Acercamiento de la región del sitio activo de HiDapE, mostrando los centros metálicos como esferas, los residuos que los conforman y los productos de la reacción obtenidos en el cristal de la enzima. Las líneas punteadas representan interacciones polares o de coordinación. (D) Topología global del dominio catalítico de las enzimas DapE. (E) Topología global del dominio de oligomerización mostrando el plegamiento tipo-ferrodoxina. (F) Representación tridimensional de las porciones de los dominios de oligomerización de HiDapE (PDB:5vo3) resaltando la extensión de la hoja- β en el dímero de DapE. (G) Representación tridimensional del dominio regulatorio de la D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PDB:1sc6). En F y G se resalta el plegamiento tipo ferrodoxina de las porciones de las proteínas respectivas y las flechas muestran el asa en el caso de DapE, de la His catalítica y en la reductasa del subsitio de unión alostérico de L-serina. Las imágenes de A, F y G se realizaron en Pymol (Schrödinger, 2015); B y C en USCF-Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). Elaborada por los autores.

homodiméricas (Figura 4 A) formadas por aproximadamente 400 residuos, con una masa molecular de 42,000 Da (Lindner, Lunin, Alary, Hecker, Cygler & Ménard, 2003; Okumura, Tamura & Takao, 2016). Globalmente cada subunidad (cadena A y B, codificadas por el mismo gen) de DapE consta de un dominio catalítico (Figuras 4 B, C y D) y un dominio de oligomerización (Figuras 4 E y F), (Nocek *et al.*, 2014) con plegamiento tipo ferrodoxina. DapE es un dímero obligado, ya que el sitio activo funcional está conformado por residuos de las dos subunidades, por el intercambio de dominios entre el catalítico de una subunidad y el de oligomerización de la otra (Nocek *et al.*, 2018), es decir que en la intercara del dímero se extiende del plegamiento de una subunidad por la interacción de elementos de la estructura secundaria de la otra subunidad, fenómeno conocido como intercambio de dominios. La obtención del dominio catalítico, por interrupción del gen de

dapE de *V. cholerae* (Nocek *et al.*, 2014), produjo una proteína trunca monomérica (VcDapEt), (Figura 4B), que consta de la parte del sitio activo, pero sin actividad catalítica (Nocek *et al.*, 2014). Las comparaciones estructurales entre VcDapEt, el monómero inactivo y otros miembros de la familia M20, junto con el ensamble correcto del agujero del oxianión sugieren que la dimerización es esencial para la actividad enzimática.

Dominio de oligomerización

El análisis de la estructura terciaria del dominio de oligomerización sugiere una similitud topológica con las proteínas tipo ferrodoxina (Nocek *et al.*, 2010), (Figuras 4 E y F). El dominio consta de aproximadamente 110 residuos de aminoácidos (del 180 al 292 en HiDapE) localizados como una inserción entre la hebra- $\beta 7$ y la hélice- $\alpha 7$ del dominio catalítico. Esta región tiene un plegamiento tipo *sándwich*

$\alpha+\beta$, en donde una capa se forma por una hoja de cuatro hebras- β anti-paralelas y dos hélices- α sobre una cara de la hoja- β , formando la segunda capa (Figuras 4 E y F), (Nocek *et al.*, 2010). Los elementos de la estructura secundaria se arreglan en motivos $\beta\alpha\beta$, dando cuenta con el plegamiento tipo ferredoxina (Figura 4 F). A la fecha no se ha atribuido ningún papel funcional redox al dominio de oligomerización. Es posible que este plegamiento proporcione estabilidad y flexibilidad conformacional necesaria a la enzima, pero sólo sea un vestigio funcional del plegamiento tipo ferredoxina. Otra posibilidad es que este dominio sea importante para la regulación de la enzima, concretamente sea un punto de control del cambio conformacional que ésta sufre durante la catálisis. Una observación que apoya esta idea, es que la His194 en DapE se encuentra en el asa equivalente de la enzima 3-fosfo-glicerato deshidrogenasa (SerA), una enzima no relacionada a DapE, pero que posee un dominio tipo ferredoxina topológicamente similar al de DapE, en donde posee residuos críticos para su regulación cooperativa, localizados en el dominio regulador (Bell, Grant & Banaszak, 2004), (Figura 4 G).

Dominio catalítico

El dominio catalítico de DapE se compone de aproximadamente 260 residuos (1-179 y de 293-376, en HiDapE), el núcleo del dominio consta de una hoja- β extendida y torcida, constituida por 8 hebras- β , flanqueada por 7 hélices- α con un plegamiento tipo tiorredoxina sin aparente función redox (Figura 4 D), (Nocek *et al.*, 2010). La hoja- β , se forma a su vez por dos hojas pequeñas de dos hebras cada una, o sea una paralela $\beta 1$ y $\beta 2$ (módulo A) y otra antiparalela $\beta 7$ y $\beta 12$ (módulo C), que flanquean una hoja central de cuatro hebras- β , paralelas $\beta 5$, $\beta 3$, $\beta 6$ y $\beta 13$ (módulo B), (Nocek *et al.*, 2010). El módulo C se encuentra rotado a 180° opuesto respecto a los módulos A y B. Las asas y hélices conectoras de las hebras que se sitúan

por debajo son $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 9$ y $\alpha 7$ y por arriba del plano de la hoja son $\alpha 4$ y $\alpha 8$.

Sitio activo y centros metálicos

El sitio catalítico de DapE está compuesto de residuos estrictamente conservados en una hendidura formada entre el dominio catalítico y el de oligomerización, localizados en cinco asas conectoras de la hoja central (entre las hebras $\beta 3$, $\beta 6$ y $\beta 13$), de la región C-terminal, conteniendo ya sea uno o dos centros metálicos de Zn^{2+} en la superficie y expuestos al solvente (Figura 5), (Born, Zheng & Blanchard, 1998). Aunque la identidad en secuencia de las enzimas DapE es baja (usualmente entre 25 y 35 %), la estructura terciaria es similar a la de otros miembros de la familia M20, sobre todo en la parte de los centros metálicos. Al respecto, la constitución de los centros metálicos de la forma DapE- C_1 - Zn^{2+}/C_2 - Zn^{2+} es prácticamente idéntica a la enzima alanina aminopeptidasa (AAP; EC 3.4.11.2) y la carboxipeptidasa G2 (CPG2; EC 3.4.17.11), con una desviación de la cadena principal de aproximadamente 3.5 Å (Bzymek & Holz, 2004; Rowsell *et al.*, 1997). En estas tres enzimas, la geometría de los centros es consistente con un tetraedro distorsionado, normalmente en un arreglo trigonal bipyramidal (Figura 5), en donde la molécula de agua/ion hidróxido se localiza puenteando a los dos iones de Zn^{2+} en la posición axial del arreglo geométrico. Aunque DapE es más activa cuando presenta sus dos centros metálicos ocupados y estos son muy similares, en cuanto a los residuos de aminoácidos que participan en su ligación (His, Asp y Glu), existen ciertas evidencias de una heterogeneidad reactiva. Es decir, uno de los dos iones se puede remover por diálisis exhaustiva y el otro no. Cuando se purifica la proteína en ausencia de sales de Zinc, la enzima que se obtiene sólo presenta un 60% de su actividad y en la estructura cristalina obtenida, el sitio C_2 parece estar desocupado por Zn^{2+} , en la mitad de los sitios de las moléculas de enzima que componen

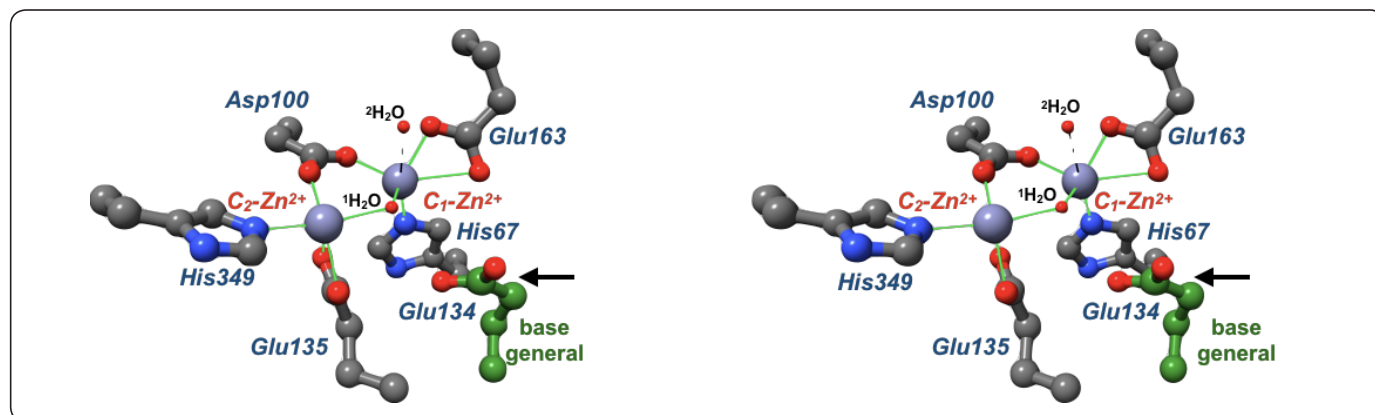


Figura 5. Vista de los centros metálicos y agua hidrolítica en el sitio catalítico de DapE. Se muestran imágenes con vista estereoscópica (ojo-pared) de la arquitectura de los centros metálicos C_1 y C_2 resaltando los residuos de aminoácidos que los coordinan. En C_1 - Zn^{2+} se observa una geometría de una bipirámide de base cuatro distorsionada y el C_2 - Zn^{2+} la de una bipirámide de base tres distorsionada, la molécula de agua/hidróxido se encuentra bifurcada entre los centros a distancia de coordinación. Se resalta con una flecha el residuo de Glu134 que funciona como la base general durante la catálisis. Elaborada por los autores.

el cristal (Nocek *et al.*, 2010) y esto es consistente con los datos de absorción extendida de rayos X de estructura fina (EXAFS), que miden la estequiometría de los metales por molécula de enzima (Cosper, Bienvenue, Shokes, Gilner, Tsukamoto, Scott & Holz, 2003). El papel de cada uno de los centros metálicos no se ha comprendido completamente, es decir: ¿uno de ellos es indispensable para la catálisis y el otro no? o bien ¿uno participa en la catálisis y el otro en la unión y especificidad de los ligandos? Por otro lado, se ha propuesto que el C_2 es parte del agujero del oxianión (Nocek *et al.*, 2018), necesario para la catálisis (Figura 6).

El papel del agujero del oxianión en la catálisis de diversas enzimas es bien conocido (Kamerlin, Chu & Warshel, 2010; Klimacek & Nidetzky, 2010; Muñoz-Clares, González-Segura & Díaz-Sánchez, 2011; "Oxanyon Hole - an overview | Science Direct Topics"; Sim & Goodman, 2010). En el caso de la reacción catalizada por la DapE se genera un intermediario oxianión tetraédrico inestable, que requiere ser estabilizado por dos contra iones (Nocek *et al.*, 2018).

MECANISMO CATALÍTICO

El mecanismo sugerido (Bienvenue, Gillner, Davis, Bennett & Holz, 2003; Davis *et al.*, 2006; Dutta & Mishra, 2016, 2017; Gillner, Armoush, Holz & Becker, 2009b; Nocek *et al.*, 2010), para la reacción catalizada es el de una hidrólisis metálica-ácido/base general que involucra los siguientes pasos (Figura 7): (1) la unión del sustrato a la enzima libre en su conformación abierta; (2) el cambio conformacional de DapE a la forma cerrada propiciando la activación de la molécula de agua hidrolítica por su desprotonación y transferencia del protón al Glu134, el residuo que actúa como base general; (3) seguido del ataque nucleofílico del ion hidróxido sobre el carbonilo del sustrato, produciendo; (4) el colapso electrónico

del intermediario tetraédrico ocasionando la ruptura del enlace amida; (5) la disociación de los productos después de la transferencia de un protón del Glu134 y otro del ácido succínico al amino del producto, y finalmente el cambio de la enzima de la forma cerrada a la forma abierta. A continuación, se describen *brevemente los pasos*:

Paso 1: Unión del sustrato

Los detalles estructurales, que se conocen, de la unión del sustrato son escasos, ya que actualmente no se cuenta con una estructura del complejo enzima-sustrato. De particular interés son los detalles que dan cuenta de la casi estricta especificidad por el NSDAP, mismos que deben ser considerados para el diseño o selección de inhibidores con uso potencial como antibióticos. Lo que se sabe al respecto es deducido a partir de estudios de acoplamiento molecular (Dutta & Mishra, 2016; Nocek *et al.*, 2018). Para investigar los determinantes de la unión del NSDAP, realizamos un modelo del complejo por medio de un acoplamiento molecular empleando como template la estructura abierta y cerrada de HiDapE [para la obtención del modelo se emplearon métodos similares a los que se describen en Díaz-Sánchez *et al.* (2016)]. El NSDAP se une a la enzima en mínimo dos etapas: primero a la forma libre y abierta de la enzima en una de las subunidades, generando el cambio conformacional que lleva a la forma cerrada del dímero, permitiendo que el sustrato se oriente en la posición productiva (Dutta & Mishra, 2017). En esta re-orientación cuatro residuos de la subunidad B (His194, Tyr197, Asn244 y Asn245, de la numeración de HiDapE), se acercan al sitio activo de la subunidad A e interaccionan con los grupos polares del sustrato (Nocek *et al.*, 2018), (Figura 8). Estudios de mutagénesis sitio dirigida de la His194 confirmaron su papel en la catálisis de DapE (Nocek *et al.*, 2018) sin embargo, el papel de los otros tres residuos y de H194 en la unión y/o

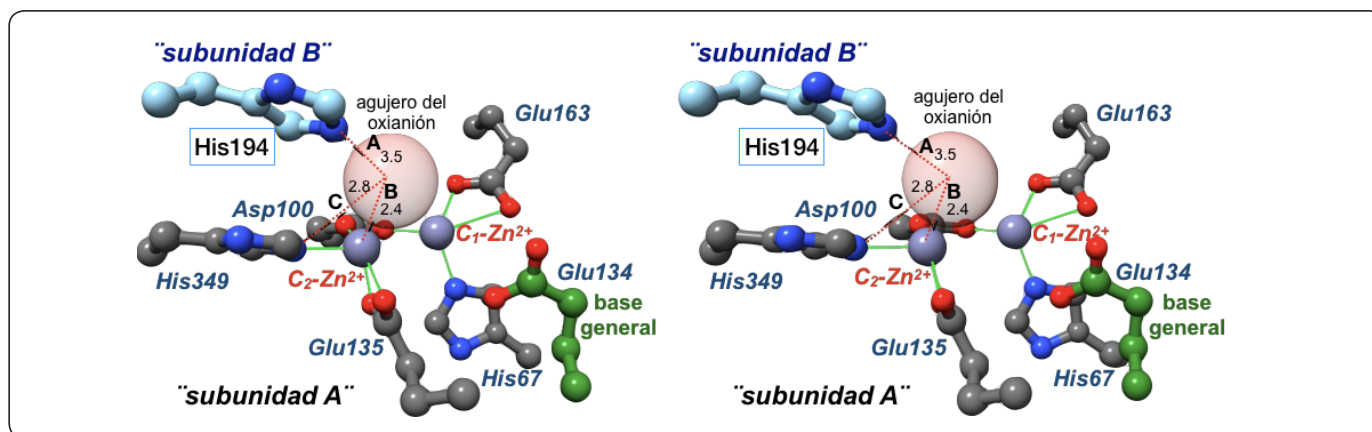


Figura 6. Agujero del oxianión en la enzima DapE. Imágenes estereoscópicas conformadas por el centro metálico C_2 de la subunidad A y el residuo His194 de la subunidad B del dímero (interacción marcada como A---B); se aprecia la posible conformación del agujero por la interacción A---C entre la His349 de la subunidad A y la His194 de la subunidad B. Los números en las líneas punteadas es la distancia en Å entre los átomos correspondientes y las líneas continuas son los enlaces de coordinación de los centros metálicos. Imagen realizada en USC-F-Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) usando las coordenadas del PDB:5vo3. Elaborada por los autores.

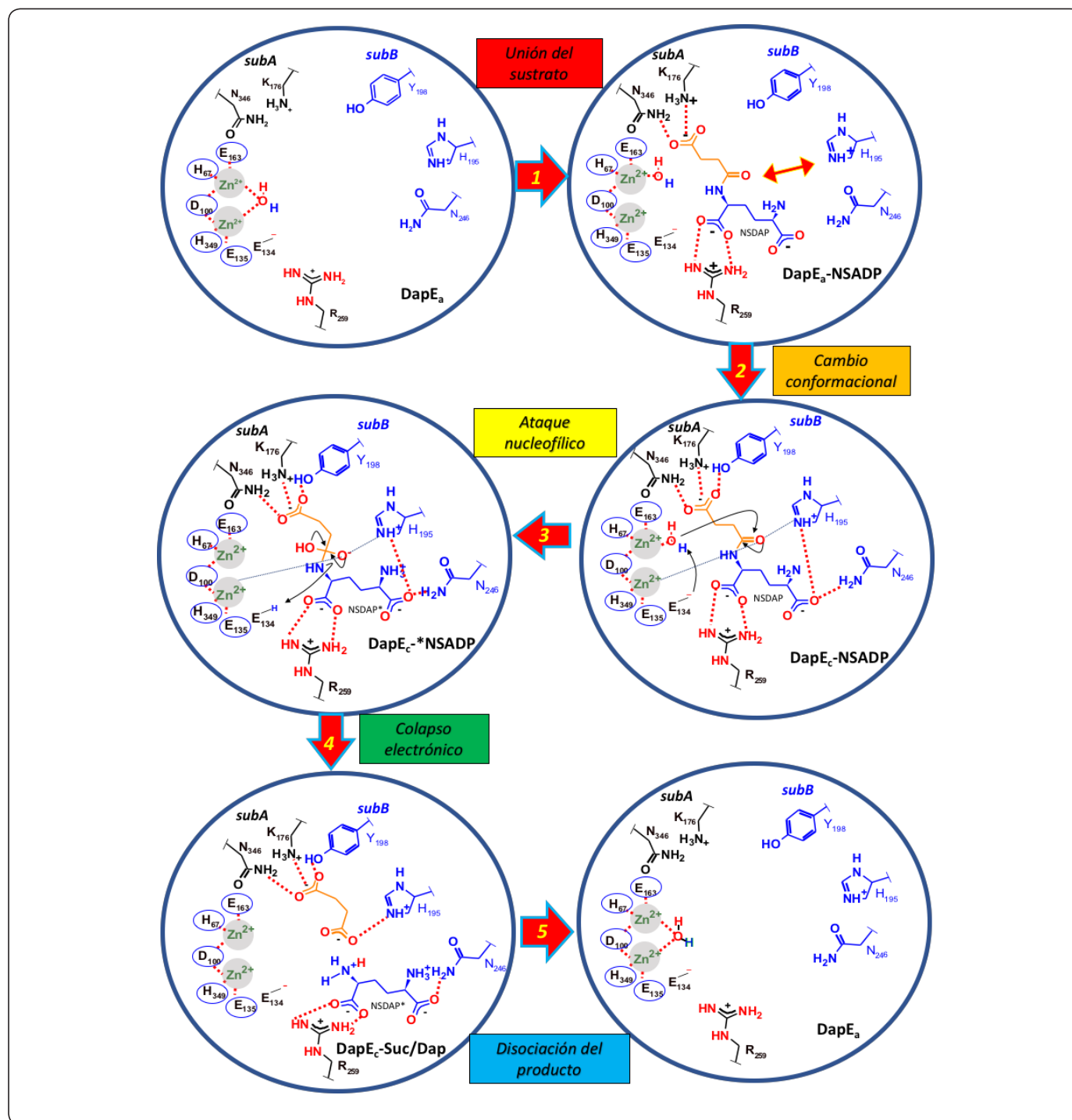


Figura 7. Mecanismo catalítico propuesto para la reacción de la hidrólisis del NSDAP en DapE. (1) La enzima en su forma libre y conformación abierta ($DapE_a$) se encuentra disponible para la unión del sustrato NSDAP. (2) el NSDAP se une en dos pasos, una unión que se asume rápida en la que el sustrato se orienta en el sitio activo y después se produce un cambio conformacional que lleva a la enzima de la forma abierta ($DapE_a-NSADP$), a la cerrada llevando a la formación del complejo central ($DapE_c-NSADP$). (3) se activa la molécula de agua por perturbación de su pK_a por los centros metálicos y captura del protón por medio de la base general; después el ion hidróxido produce el ataque nucleofílico sobre el carbonilo amídico del NSDAP para dar lugar a la formación del intermediario tetraédrico inestable ($*NSADP$); la molécula de agua hidrolítica debe tomar la posición cercana a la trayectoria de Bürgi-Dunitz. (3) los electrones del carbono susceptible al ataque del intermediario tetraédrico colapsan produciendo la ruptura del enlace C-N y la protonación del grupo amino saliente, el cual toma un protón del Glu134 y otro del carboxilo del succínico. (4) se produce la liberación de los productos de reacción regresando a la forma de $DapE_a$. Elaborada por los autores.

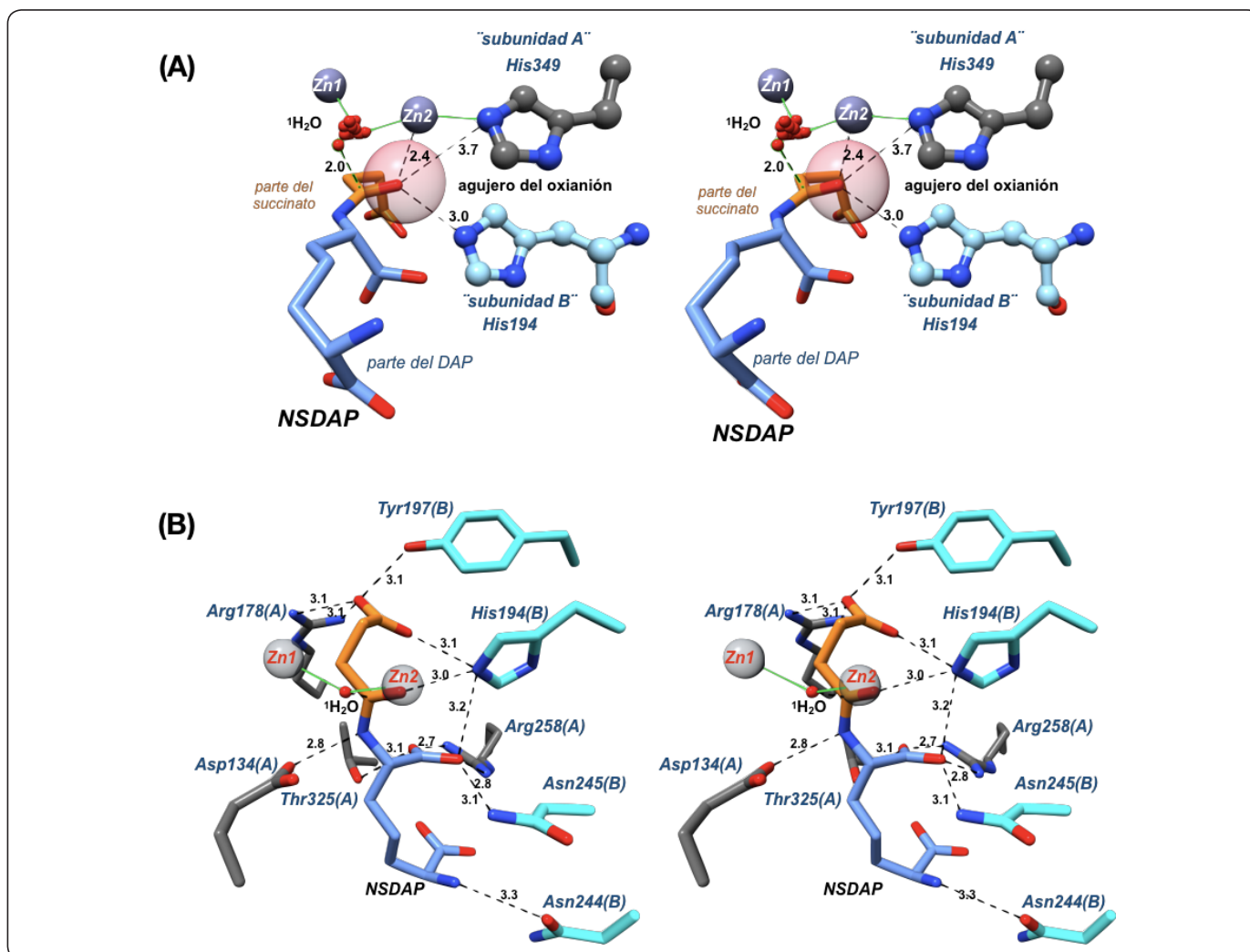


Figura 8. Modelo del complejo DapE-NSDAP. (A) muestra el resultado del acoplamiento del sustrato NSDAP en el sitio activo de la forma cerrada de HiDapE (PDB:5vo3), resalta la unión del carbonilo amídico dentro del agujero del oxianión (esfera con transparencia) y en posición cercana a la trayectoria de ataque nucleofílico de Bürgi-Dunitz, el ángulo de ataque esperado entre un nucleófilo y un electrófilo. Están sobrepuestas las moléculas de agua hidrolíticas, localizadas en los centros metálicos de todas las cadenas de las DapE disponibles en el PDB para sugerir la trayectoria de movimiento que realizará la molécula de agua hidrolítica para mostrar el movimiento potencial y aproximarse a la trayectoria de ataque. El agua marcada tiene una distancia de 2.0 Å y un ángulo aproximado de 100 °, muy cercano a la ideal de 107 °. (B) muestra el complejo en otra orientación para resaltar los residuos de aminoácidos que participan en la unión del NSDAP, en gris los residuos de la subunidad A y en cian los de la subunidad B (indicado entre paréntesis), las líneas punteadas representan las interacciones y los números sobre ellas son las distancias en Å. Imágenes realizadas en UCSF-Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). Elaborada por los autores.

especificidad por el sustrato no se han confirmado hasta la fecha.

Paso 2: Ajuste inducido por el sustrato en la enzima

La dinámica molecular de las enzimas es frecuentemente asociada con su funcionamiento fisiológico. La flexibilidad conformacional de la enzima DapE se ha estudiado por medio de simulaciones computacionales (Dutta & Mishra, 2016, 2017) y se ha confirmado por cristalografía de rayos X (Nocek *et al.*, 2018). Los subsitios metálicos se localizan en la hendidura catalítica y parecen ser relativamente inmóviles

durante la catálisis. El dominio que presenta un desplazamiento grande respecto a la enzima libre es el de oligomerización, en la intercara dimérica de la molécula de DapE, en complejo con el sustrato (Dutta & Mishra, 2016) o con los productos de la reacción (Nocek *et al.*, 2018). En este movimiento, el subsitio del agujero del oxianión es dinámico, ya que se forma por el centro metálico C_2 -Zn²⁺ de una subunidad y por un residuo de His194 de la otra subunidad del dímero (Figura 6), (Nocek *et al.*, 2018); además su correcta posición para estabilizar al intermediario del producto de reacción, depende de que la proteína pase de la forma abierta a la conformación

completamente compacta o cerrada (Figura 9). La forma libre de DapE- C_1 -Zn $^{2+}$ / C_2 -Zn $^{2+}$ adopta una conformación extendida con las dimensiones 50x44x121 Å y el complejo central "DapE- C_1 -Zn $^{2+}$ / C_2 -Zn $^{2+}$ -productos", se observa en una conformación compacta, con las siguientes dimensiones 47x45x111 Å.

En el complejo DapE-NSDAP el ajuste inducido de la forma abierta e inactiva a la cerrada y activa, permite que algunos residuos de la subunidad B se acomoden a una distancia de interacción polar con el sustrato, como ya se mencionó. Con el objetivo de cuantificar los movimientos conformacionales globales de la enzima se tomó el centro de gravedad del dominio catalítico como punto de referencia (Figura 9), (Dutta & Mishra, 2016). Uno de los dominios catalíticos del dímero se desplaza con respecto al otro aproximadamente en un ángulo de 60° y 29 Å, considerando la superficie de los dominios y la His194 se acerca a 10 Å con dirección a los centros metálicos (Nocek *et al.*, 2018). También se observa una torsión de aproximadamente 20° considerando el plano de la hoja β del dominio de oligomerización. La flexibilidad conformacional de DapE sugiere que basta la unión de una

molécula de NSDAP en uno de los sitios activos para que se produzca la catálisis, es decir, que pase de la forma abierta-inactiva a la cerrada-activa; de ser esto cierto, la enzima podría presentar el fenómeno de reactividad en la mitad de los sitios, ya que la entrada del sustrato en la forma cerrada debe ser limitada en una de las subunidades.

Paso 3: Activación de la molécula de agua hidrolítica y ataque nucleofílico

Durante la catálisis realizada por las hidrolasas básicas se requiere frecuentemente un paso de activación por desprotonación de la molécula de agua hidrolítica, ya que el ion hidróxido es la forma nucleofílica y no el agua. Esto a su vez requiere que en el sitio activo de estas enzimas exista una base general que tome el protón y otro grupo que perturbe el pK_a intrínseco del agua de 15.74 a escalas de pH cercanas al fisiológico, para que la concentración de iones hidróxido sea efectiva y se dé el ataque sobre el grupo electrofílico del sustrato. En las enzimas DapE, la base general propuesta y validada por mutagénesis es el Glu134 (Born *et al.*, 1998), quien recibe un puente de hidrógeno del agua puenteada en los centros metálicos. En las enzimas de la familia M20 y en

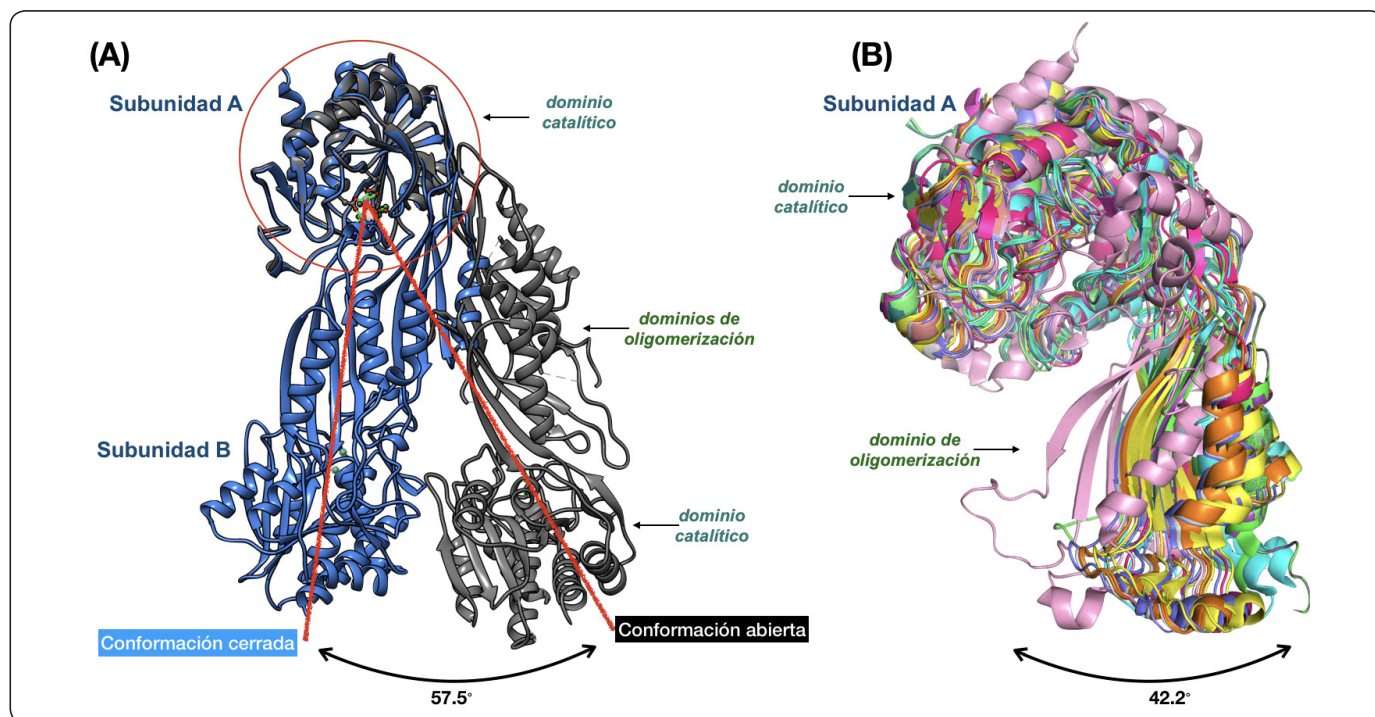


Figura 9. Cambios conformacionales observados en DapE evidenciados por cristalografía de rayos X. (A) conformación abierta (PDB:3ic1) y cerrada (PDB: 5vo3) del dímero de DapE. La figura se obtuvo alineando dos dímeros de HiDapE, tomando como referencia el dominio catalítico de las cadenas A, en donde se aprecian pocos cambios conformacionales entre las dos formas de DapE a diferencia del cambio conformacional mayor visto entre los dominios de oligomerización. Se ve un cierre con un ángulo de 57°. Se marcan con flechas la porción que corresponde al dominio de oligomerización, región en donde se localiza la His194 del hueco del oxianión, con desplazamiento de 25.4 Å. (B) alineamiento estructural entre las subunidades de las DapE disponibles en el PDB sobre la cadena A de HiDapE de las coordenadas 5vo3; los pdbs alineados son: 3ic1-CA, 3ic1-CB, 3isz-CA, 3isz-CB, 4h2k-CA, 4h2k-CB, 5uej-CA, 5uej-CB, 4pqa-CA, 4pqa-CB, 4o23-CA, 4o23-CB, 1vgy-CA, 1vgy-CB, 4onw-CA, 4onw-CB, 4op4-CA, 4op4-CB, 3tx8-CA, 3pfe-CA. Imágenes (A) realizadas en USCF-Chimera (Pettersen *et al.*, 2004); (B) en Pymol (Schrödinger, 2015). Elaborada por los autores.

DapE es claro que son los centros metálicos los que producen el descenso en el pK_a del agua hidrolítica y en realidad el agua puenteada observada en los cristales debe ser un ion hidróxido.

El análisis empleando herramientas de la mecánica cuántica-modelaje molecular (QM-MM), de la reacción entre DapE y NSDAP, junto con datos experimentales, sugieren que el paso limitante de la reacción catalizada es el ataque nucleofílico (Dutta & Mishra, 2017). Se ha propuesto que la molécula de agua puenteada por los centros metálicos es la hidrolítica y que durante la catálisis pierde uno de los enlaces con el C_2-Zn^{2+} y desde la posición del C_1-Zn^{2+} realiza el ataque nucleofílico sobre el carbonilo amida. El análisis de las moléculas de agua residuales en los sitios activos de los cristales de las enzimas DapE disponibles, junto con un estudio de acoplamiento molecular del NSADP en HiDAPE cerrada, muestra la posibilidad de que la molécula de agua se tenga que desplazar a la trayectoria de ataque. De hecho, una de las moléculas observadas en el cristal de HiDapE (PDB:3isz) es la más cercana al ángulo de Bürgi–Dunitz (Figura 9).

Paso 4: Colapso electrónico del intermediario y el papel del agujero del oxianión

Este paso ocurre después del ataque nucleofílico del ion hidróxido unido a los centros metálicos sobre el carbonilo amídico del NSDAP. Esto plantea los siguientes aspectos: (1) la posición de la molécula de agua hidrolítica y el carbonilo reactivo del NSDAP debe ser cercana a la trayectoria de ataque del ángulo de Bürgi–Dunitz (Bürgi, Dunitz & Shefter, 1973), (Figura 7)—esta posición es la que debe tener un nucleófilo que actúa sobre un grupo carbonilo, que es un centro electrofílico trigonal y es de 107° para que se maximice la interacción nucleófilo-electrófilo: entre el HOMO del nucleófilo (orbital molecular ocupado de más alta energía) y el LUMO del electrófilo (orbital molecular ocupado de más baja energía); (2) el cambio del carbonilo de trigonal a tetraédrico produce un pequeño desplazamiento de su oxígeno cuando cambia a oxianión y debe entrar en el agujero para encontrarse con dos interacciones tipo electrostáticas complementarias; (3) es posible que el cambio genere un movimiento de la parte del succinato y el diaminopimelato del NSDAP, por lo que debe existir la plasticidad necesaria en el sitio activo para que se permita el reacomodo; (4) después de la hidrólisis, se reacomoda de nuevo el carbono tetraédrico a trigonal y no sólo debe salir del agujero, sino que debe existir repulsión para permitir la disociación de los productos de reacción de la enzima, esto requiere finalmente, que (5) se produzca un cambio conformacional de la enzima a la forma abierta.

INHIBICIÓN DE LA ENZIMA

El desarrollo de nuevos inhibidores de DapE es reconocido como un punto potencial para el control y combate de infecciones bacterianas (Born & Blanchard, 1999; Gillner *et al.*, 2009a), en

especial las causadas por las denominadas bacterias ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y especies de *Enterobacter*). Para lograr desarrollar inhibidores efectivos contra DapE, se han empleado los detalles conocidos de los aspectos estructurales y funcionales de la enzima, en especial la información cristalográfica que proporciona la complementariedad reactiva de los residuos del sitio activo que participan en la unión del sustrato y por tanto en la unión de inhibidores (Gillner *et al.*, 2013; Uda *et al.*, 2014; Dutta & Mishra, 2017; Nocek *et al.*, 2018). Se han realizado estudios de búsqueda de compuestos que contengan grupos reactivos sobre el Zn; derivado de esto, se han encontrado tioles, ácidos carboxílicos, ácidos bóricos, fosfonatos e hidroximatos (Gillner *et al.*, 2013), (Figura 10). Los derivados de grupos fenilos (Gillner *et al.*, 2009a) y derivados de índoles (Heath *et al.*, 2018) también son agentes potenciales. Dentro de los más sobresalientes resulta el L-captopril, un fármaco que se utiliza para tratar la hipertensión arterial y que inhibe a DapE a concentraciones submicromolares (Starus *et al.*, 2015; Uda & Creus, 2011) así como a otros compuestos relativamente pequeños como el ácido 3-mercaptopbenzoico, el ácido fenil bórico y el ácido 2-tiofenobórico (Gillner *et al.*, 2009a). La estructura cristalina a alta resolución del complejo DapE-captopril de *N. meningitidis* (NmDapE), (Starus *et al.*, 2015), muestra que el grupo tiol se coordina con el C_2-Zn^{2+} , proveyendo un modelo para la búsqueda y selección de inhibidores que pudieran bloquear la función del centro metálico. Cuando el C_2-Zn^{2+} es reemplazado por Mn^{2+} el captopril es incapaz de inhibir la reacción catalizada por DapE (Uda *et al.*, 2014). Este último aspecto es interesante, ya que el C_2 es reconocido como importante para formar el agujero del oxianión y los compuestos que lo bloquean afectarán el paso del colapso electrónico, lo que podría generar la formación de un intermediario sin salida y promover el secuestro de formas productivas de la enzima.

CONCLUSIONES

Es evidente la importancia de encontrar fármacos que inhiban las enzimas que son blancos potenciales para lograr el control antimicrobiano de bacterias patógenas multi-resistentes a los antibióticos. Las enzimas involucradas en la síntesis de los componentes de la pared celular, incluida la de la ruta m-DAP/Lys ofrece estos blancos. DapE es uno de estos blancos y su actividad por un lado es esencial para las bacterias y por otra parte no existen homólogos, ni análogos de la enzima en humanos. Por lo tanto, los inhibidores altamente específicos contra DapE pueden utilizarse como antibióticos con pocos efectos secundarios no deseados. Un aspecto muy relevante en el diseño de inhibidores es considerar el papel del ensamble y desensamble del agujero del oxianión de DapE, ya que parece ser ensamblado sólo cuando se forma el complejo central productivo. Por esta razón son buscados fármacos

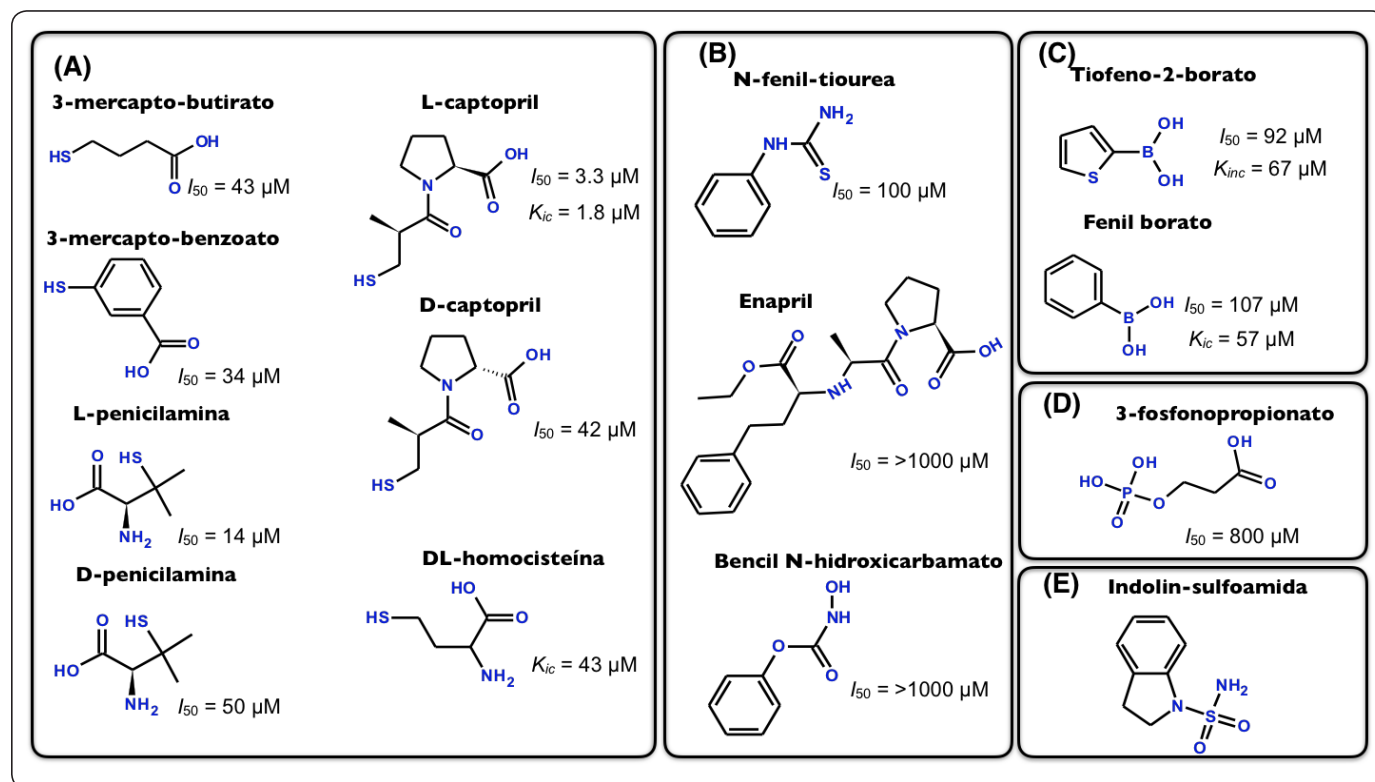


Figura 10. Representación de los inhibidores de DapE. (A) derivados de tioles. (B) derivados de fenil. (C) derivados de boratos. (D) derivados de fosfatos. (E) derivados de indol sulfonamidas. I_{50} es la constante de inhibición aparente, la concentración del inhibidor que produce el 50% de la inhibición y K_{ic} es la constante de inhibición competitiva, la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor. Elaborada por los autores.

que funcionen como bloqueadores del ensamble o bien que eviten el acomodo del oxianión. Aunque se conocen detalles importantes de los aspectos estructurales y funcionales de la enzima DapE, aún faltan por resolver varias interrogantes acerca del mecanismo cinético, como el paso limitante de la reacción, el mecanismo de liberación de los productos y el papel de la flexibilidad conformacional sobre la disociación de éstos últimos, que pueden ser relevantes para el desarrollo y selección de nuevos antibióticos anti-DapE.

La comprensión de los mecanismos moleculares de la biocatálisis es un aspecto central en las ciencias biológicas (Glasner, Gerlt & Babbitt, 2006). Uno de los retos de estas ciencias es lograr predecir las funciones celulares y macromoleculares a partir de las secuencias de los genomas (Van Der Kamp & Mulholland, 2008) y aunque se conocen numerosos casos de predicciones exitosas para algunos genes individuales, son muchos más los fallidos (Soskine & Tawfik, 2010), sin contar con la inhabilidad tecnológica de usar múltiples genes o genomas. Se busca predecir con éxito la asociación de la secuencia de los genes con un desempeño funcional en la afinidad, especificidad, dinámica y en los residuos particulares; pero para ello se requiere obtener un mayor número de datos a partir de estudios exhaustivos de

los mecanismos moleculares que sirvan para alimentar los algoritmos que permitan en un futuro predecir fenotipos funcionales de las proteínas. En este contexto comprender el papel de la dinámica de la intercara de la oligomerización sobre la eficiencia catalítica, requiere de estudios enzimológicos y de mutagénesis de las amidohidrolasas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos los siguientes apoyos: al CONACYT por el financiamiento a través del proyecto de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales: CONACYT-PN-587, otorgado al titular responsable Ángel Gabriel Díaz-Sánchez y del Programa de Becas Nacionales-CONACYT a Manuel Terrazas-López, estudiante del Programa de Maestría en Ciencias Orientación Genómica, a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez por la gestión, operación y financiamiento complementario del proyecto y en lo que corresponde a la parte de apoyo administrativo a Georgina López y Liliana Delgado.

REFERENCIAS

Alcorlo, M., Martínez-Caballero, S., Molina, R. & Hermoso, J. A. (2017). Carbohydrate recognition and lysis by bacterial peptidoglycan hydrolases. *Current Opinion in*

- Structural Biology*, **44** (Figure 1), 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.01.001>.
- Badger, J., Sauder, J. M., Adams, J. M., Antonysamy, S., Bain, K., Bergseid, M. G., Buchanan, S.G., Buchanan, M.D., Batiyenko, Y., Christopher, J.A., Emtage, S., Eroshkina, A., Feil, I., Furlong, E.B., Gajiwala, K.S., Gao, X., He, D., Hendle, J., Huber, A., Hoda, K., Kearins, P., Kissinger, C., Laubert, B., Lewis, H.A., Lin, J., Loomis, K., Lorimer, D., Louie, G., Maletic, M., Marsh, C.D., Miller, I., Molinari, J., Muller-Dieckmann, H.J., Newman, J.M., Noland, B.W., Pagarigan, B., Park, F., Peat, T.S., Post, K.W., Radojicic, S., Ramos, A., Romero, R., Rutter, M.E., Sanderson, W.E., Schwinn, K.D., Tresser, J., Winhoven, J., Wright, T.A., Wu, L., Xu, J. & Harris, T.J.R. (2005). Structural analysis of a set of proteins resulting from a bacterial genomics project. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **60(4)**, 787–796. <https://doi.org/10.1002/prot.20541>.
- Bell, J. K., Grant, G. A. & Banaszak, L. J. (2004). Multiconformational States in Phosphoglycerate Dehydrogenase. *Biochemistry*, **43(12)**, 3450–3458. <https://doi.org/10.1021/bi035462e>.
- Bienvenue, D. L., Gilner, D. M., Davis, R. S., Bennett, B. & Holz, R. C. (2003). Substrate Specificity, Metal Binding Properties, and Spectroscopic Characterization of the DapE-Encoded N -Succinyl- l, l -Diaminopimelic Acid Desuccinylase from *Haemophilus influenzae*. *Biochemistry*, **42(36)**, 10756–10763. <https://doi.org/10.1021/bi034845+>.
- Born, T. L., Zheng, R. & Blanchard, J. S. (1998). Hydrolysis of N -Succinyl- L, L-diaminopimelic Acid by the *Haemophilus influenzae* *dapE*-Encoded Desuccinylase: Metal Activation, Solvent Isotope Effects, and Kinetic Mechanism. *Biochemistry*, **2960(98)**, 10478–10487.
- Born, T. L. & Blanchard, J. S. (1999). Structure/function studies on enzymes in the diaminopimelate pathway of bacterial cell wall biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, **3(5)**, 607–613. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)00016-2).
- Broder, D. H. & Miller, C. G. (2003). DapE can function as an aspartyl peptidase in the presence of Mn²⁺. *Journal of Bacteriology*, **185(16)**, 4748–4754. <https://doi.org/10.1128/JB.185.16.4748-4754.2003>.
- Brunger, A. T., Das, D., Deacon, A. M., Grant, J., Terwilliger, T. C., Read, R. J., Adams, P. D., Levitt, M. & Schröder, G. F. (2012). Application of DEN refinement and automated model building to a difficult case of molecular-replacement phasing: The structure of a putative succinyl-diaminopimelate desuccinylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **68(4)**, 391–403. <https://doi.org/10.1107/S090744491104978X>.
- Burgi, H. B., Dünitz, J. D. & Shefter, E. (1973). Geometrical reaction coordinates. II. Nucleophilic addition to a carbonyl group. *Journal of the American Chemical Society*, **95(15)**, 5065–5067. <https://doi.org/10.1021/ja00796a058>.
- Bzymek, K. P. & Holz, R. C. (2004). The catalytic role of glutamate 151 in the leucine aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, **279(30)**, 31018–31025. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404035200>.
- Cosper, N. J., Bienvenue, D. L., Shokes, J. E., Gilner, D. M., Tsukamoto, T., Scott, R. A. & Holz, R. C. (2003). The *dapE*-Encoded N-Succinyl-L, L-Diaminopimelic Acid Desuccinylase from *Haemophilus influenzae* Is a Dinuclear Metallohydrolase. *Journal of the American Chemical Society*, **125(48)**, 14654–14655. <https://doi.org/10.1021/ja036650v>.
- Davis, R., Bienvenue, D., Swierczek, S. I., Gilner, D. M., Rajagopal, L., Bennett, B. & Holz, R. C. (2006). Kinetic and spectroscopic characterization of the E134A- and E134D-altered *dapE*-Encoded N-succinyl-l, l-diaminopimelic acid desuccinylase from *Haemophilus influenzae*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **11(2)**, 206–216. <https://doi.org/10.1007/s00775-005-0071-8>.
- Díaz-Sánchez, Á., Alvarez-Parrilla, E., Martínez-Martínez, A., Aguirre-Reyes, L., Orozpe-Olvera, J., Ramos-Soto, M., Núñez-Gastélum, J., Alvarado-Tenorio, B. & de la Rosa, L. (2016). Inhibition of Urease by Disulfiram, an FDA-Approved Thiol Reagent Used in Humans. *Molecules* **2016**, **21(12)**, 1628. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21121628>.
- Dramsí, S., Magnet, S., Davison, S. & Arthur, M. (2008). Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews*, **32(2)**, 307–320. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00102.x>.
- Dutta, D. & Mishra, S. (2016). Structural and mechanistic insight into substrate binding from the conformational dynamics in apo and substrate-bound DapE enzyme. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **18(3)**, 1671–1680.
- Dutta, D. & Mishra, S. (2017). Active Site Dynamics in Substrate Hydrolysis Catalyzed by DapE Enzyme and Its Mutants from Hybrid QM/MM-Molecular Dynamics Simulation. *Journal of Physical Chemistry B*, **121(29)**, 7075–7085. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b04431>.
- Gillner, D., Armoush, N., Holz, R. C. & Becker, D. P. (2009a). Inhibitors of bacterial N-succinyl-l, l-diaminopimelic acid desuccinylase (DapE) and demonstration of *in vitro* antimicrobial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **19(22)**, 6350–6352. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.09.077>.
- Gillner, D. M., Bienvenue, D. L., Nocek, B. P., Joachimiak, A., Zachary, V., Bennett, B. & Holz, R. C. (2009b). The *dapE*-encoded N-succinyl-l, l-diaminopimelic acid desuccinylase from *Haemophilus influenzae* contains two active-site histidine residues. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **14(1)**, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0001-8>.

- org/10.1007/s00775-008-0418-z.
- Gillner, D. M., Becker, D. P. & Holz, R. C. (2013). Lysine biosynthesis in bacteria: a metallodesuccinylase as a potential antimicrobial target. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **18(2)**, 155–163. <https://doi.org/10.1007/s00775-012-0965-1>.
- Gillner, D. M., Makowska-Grzyska, M., Joachimiak, A. & Holz, R. C. (2015). Inhibition of the *dapE*-Encoded N-Succinyl-L, L-diaminopimelic Acid Desuccinylase from *Neisseria meningitidis* by L-Captopril. *Biochemistry*, **54(31)**, 4834–4844. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00475>.
- Girish, T. S. & Gopal, B. (2010). Crystal structure of *Staphylococcus aureus* metallopeptidase (Sapep) reveals large domain motions between the manganese-bound and apo-states. *The Journal of Biological Chemistry*, **285(38)**, 29406–29415. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.147579>
- Glasner, M. E., Gerlt, J. A. & Babbitt, P. C. (2006). Evolution of enzyme superfamilies. *Current Opinion in Chemical Biology*, **10(5)**, 492–497. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.08.012>.
- Heath, T. K., Lutz, M. R., Reidl, C. T., Guzman, E. R., Herbert, C. A., Nocek, B. P., Holz, R. C., Olsen, K. W., Ballicora, M. A. & Becker, D. P. (2018). Practical spectrophotometric assay for the *dapE*-encoded N-succinyl-L, L-diaminopimelic acid desuccinylase, a potential antibiotic target. *PLOS ONE*, **13(4)**, e0196010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196010>.
- Hlaváček, J., Vítovcová, M., Sázelová, P., Pícha, J., Vaněk, V., Buděšínský, M., Jiráček, J.,
- Gillner, D. M., Holz, R. C., Mikšík, I. & Kašíčka, V. (2014). Mono-N-acyl-2,6-diaminopimelic acid derivatives: Analysis by electromigration and spectroscopic methods and examination of enzyme inhibitory activity. *Analytical Biochemistry*, **467**, 4–13. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2014.08.032>.
- Kamerlin, S. C. L., Chu, Z. T. & Warshel, A. (2010). On Catalytic Preorganization in Oxyanion Holes: Highlighting the Problems with the Gas-Phase Modeling of Oxyanion Holes and Illustrating the Need for Complete Enzyme Models. *The Journal of Organic Chemistry*, **75(19)**, 6391–6401. <https://doi.org/10.1021/jo100651s>.
- Karita, M., Etterbeek, M. L., Forsyth, M. H., Tummuru, M. K. R. & Blaser, M. J. (1997). Characterization of *Helicobacter pylori* *dapE* and construction of a conditionally lethal *dapE* mutant. *Infection and Immunity*. **(65)10**, 4158–4164. <https://ia.asm.org/content/65/10/4158.long>.
- Kindler, S. H. & Gilvarado, C. (1960). N-succinyl-L-a, E-diaminopimelic Acid Deacylase. *The Journal of Biological Chemistry*, **235(12)**, 3532–3536.
- Klimacek, M. & Nidetzky, B. (2010). The oxyanion hole of *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase: a novel structural motif for electrostatic stabilization in alcohol dehydrogenase active sites. *Biochemical Journal*, **425(2)**, 455–463. <https://doi.org/10.1042/BJ20091441>.
- Lin, Y. K., Myhrman, R., Schrag, M. L. & Gelb, M. H. (1988). Bacterial N-succinyl-L-diaminopimelic acid desuccinylase. Purification, partial characterization, and substrate specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, **263(4)**, 1622–1627. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3276674>.
- Lindner, H. A., Lunin, V. V., Alary, A., Hecker, R., Cygler, M. & Ménard, R. (2003). Essential roles of zinc ligation and enzyme dimerization for catalysis in the aminoacylase-1/M20 family. *The Journal of Biological Chemistry*, **278(45)**, 44496–44504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304233200>.
- McGregor, W. C., Gillner, D. M., Swierczek, S. I., Liu, D. & Holz, R. C. (2013). Identification of a Histidine Metal Ligand in the *argE*-Encoded N-Acetyl-L-Ornithine Deacetylase from *Escherichia coli*. *SpringerPlus*, **2(1)**, 482. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-482>.
- Muñoz-Clares, R. A., González-Segura, L. & Díaz-Sánchez, Á. G. (2011). Crystallographic evidence for active-site dynamics in the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. Implications for the deacylation step of the catalyzed reaction. In *Chemico-Biological Interactions* **191(1-3)**, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.12.024>.
- Nocek, B. P., Gillner, D. M., Fan, Y., Holz, R. C. & Joachimiak, A. (2010). Structural Basis for Catalysis by the Mono- and Dimetalated Forms of the *dapE*-Encoded N-succinyl-L, L-Diaminopimelic Acid Desuccinylase. *Journal of Molecular Biology*, **397(3)**, 617–626. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.062>.
- Nocek, B., Reidl, C., Starus, A., Heath, T., Bienvenue, D., Osipiuk, J., Jedrzejczak, R., Joachimiak, A., Becker, D. P. & Holz, R. C. (2018). Structural Evidence of a Major Conformational Change Triggered by Substrate Binding in DapE Enzymes: Impact on the Catalytic Mechanism. *Biochemistry*, **57(5)**, 574–584. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01151>.
- Nocek, B., Starus, A., Makowska-Grzyska, M., Gutierrez, B., Sanchez, S., Jedrzejczak, R., Mack, J. C., Olsen, K. W., Joachimiak, A. & Holz, R. C. (2014). The Dimerization Domain in DapE Enzymes is Required for Catalysis. *PLoS ONE*, **9(5)**, e93593. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093593>.
- Okumura, N., Tamura, J. & Takao, T. (2016). Evidence for an essential role of intradimer interaction in catalytic function of carnosine dipeptidase II using electrospray-ionization mass spectrometry. *Protein Science*, **25(2)**, 511–522. <https://doi.org/10.1002/pro.2842>.
- Oxyanion Hole - an overview | Science Direct Topics. (n.d.). Retrieved March 28, 2019, from <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/oxyanion-hole>.
- Paphitou, N. I. (2013). Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. *International*

- Journal of Antimicrobial Agents*, **42(1)**, S25–S28. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.04.007>.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera? A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, **25(13)**, 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- Rowse, S., Paupit, R. A., Tucker, A. D., Melton, R. G., Blow, D. M. & Brick, P. (1997). Crystal structure of carboxypeptidase G2, a bacterial enzyme with applications in cancer therapy. *Structure*, **5(3)**, 337–347. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00191-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00191-3).
- Schrödinger, L. (2015). The PyMOL molecular graphics system, version 1.8. <https://www.Pymol.Org/Citing>.
- Sim, L. & Goodman, J. M. (2010). Enzyme Catalysis by Hydrogen Bonds: The Balance between Transition State Binding and Substrate Binding in Oxyanion Holes. *J. Org. Chem.*, **75(6)**, 1831–1840. <https://doi.org/10.1021/jo901503d>.
- Soskine, M. & Tawfik, D. S. (2010). Mutational effects and the evolution of new protein functions. *Nature Reviews Genetics*. **(11)8**, 572–582. <https://doi.org/10.1038/nrg2808>.
- Starus, A., Nocek, B., Bennett, B., Larrabee, J. A., Shaw, D. L., Sae-Lee, W., Russo, M. T.
- Uda, N. R. & Creus, M. (2011). Selectivity of inhibition of N-succinyl-L, L-diaminopimelic acid desuccinylase in bacteria: the product of dape-gene is not the target of L-captopril antimicrobial activity. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, **2011**, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2011/306465>.
- Uda, N. R., Uper, G., Angelici, G., Nicolet, S., Schmidt, T., Schwede, T. & Creus, M. (2014). Zinc-selective inhibition of the promiscuous bacterial amide-hydrolase DapE: implications of metal heterogeneity for evolution and antibiotic drug design. *Metallomics*, **6(1)**, 88–95. <https://doi.org/10.1039/C3MT00125C>.
- Usha, V., Lloyd, A. J., Lovering, A. L. & Besra, G. S. (2012). Structure and function of *Mycobacterium tuberculosis* meso-diaminopimelic acid (DAP) biosynthetic enzymes. *FEMS Microbiology Letters*, **330(1)**, 10–16. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02527.x>.
- Van Der Kamp, M. W. & Mulholland, A. J. (2008). Computational enzymology: Insight into biological catalysts from modelling. *Natural Product Reports*. **25(6)**, 1001–1014. <https://doi.org/10.1039/b600517a>.
- Vollmer, W., Blanot, D. & De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, **32(2)**, 149–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>.