



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Explorando el potencial farmacológico de la FoF₁-ATP sintasa: estudio estructural comparativo de los sitios de unión de inhibidores naturales del sector F₁ de diferentes especies.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

Luis Fernando Cofas Vargas

TUTOR

Dr. Enrique García Hernández
Instituto de Química

COMITÉ TUTOR

Dr. Miguel Antonio Costas Basín
Facultad de Química

Dr. Óscar Flores Herrera
Facultad de Medicina

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Diciembre, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis fue realizada en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique García Hernández. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del Proyecto PAPIIT IN200115, así como del Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACyT), proyectos 235831 y 166472.

Dedicatoria

A mi esposa, Pao:

Por todo el amor, el apoyo que me brinda a cada instante, por su compañía y por ese impulso que me da para seguir siempre adelante.

A mi madre:

Por haberme apoyado e impulsado a alcanzar mis sueños, por su comprensión, cariño y amor.

A mi padre:

Por ser el ejemplo de perseverancia y fortaleza que lo caracterizan y que siempre me ha infundado.

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer al Dr. Enrique García Hernández por su infinita paciencia, amistad y excelente enseñanza. Además, quiero agradecer a mis tutores, Dr. Miguel Antonio Costas Basín y Dr. Oscar Flores Herrera por su apoyo y retroalimentación durante este proceso. Ha sido un privilegio contar con su guía y ayuda.

Gracias a mi familia que siempre estuvo conmigo, sin importar la situación y por infundirme el continuar hacia adelante.

Gracias a mis amigos Homer, Lalo, LP y Poncho por su atención, apoyo y motivación para la realización de este trabajo y también en la vida.

Gracias al M. en C. Ignacio López y Celis por su apoyo, amistad y enseñanzas.

Agradezco al Dr. Raúl C. Alcántara y García por ser mi amigo, mentor y fuente de sabiduría académica y personal. Siempre será recordado por la gran persona y amigo que fue.

Contenido

Resumen.....	1
Abstract	1
Capítulo 1. Introducción.....	2
Resistencia a antibióticos.....	2
F ₀ F ₁ -ATP sintasa	7
Arquitectura básica de F ₀ F ₁	8
Subunidades catalíticas y no catalíticas	11
Mecanismo de unión alternante.....	14
Inhibición de la actividad catalítica de la ATP sintasa	14
Inhibición endógena.....	14
Inhibición exógena	15
Péptidos.....	15
Moléculas pequeñas	17
Aurovertina	17
Polifenoles.....	19
Bedaquilina.....	20
Diseño de fármacos.....	22
Planteamiento del problema	23
Hipótesis.....	25
Objetivo general.....	26
Objetivos particulares	26
Capítulo 2. Metodología.....	27
Selección de grupos taxonómicos.....	27
Selección de subunidades	27
Búsqueda de secuencias	27
Alineamiento de secuencias de grupos taxonómicos por subunidad.....	28
Determinación de identidad de grupos taxonómicos por subunidad	28
Selección de microorganismos.....	28
Determinación de identidad respecto al humano por subunidad.....	28
Comparación con estructuras cristalográficas con la enzima en presencia de inhibidor	29
Capítulo 3. Resultados y Discusión.....	30
Análisis comparativo de las subunidades dinámicas de la ATP sintasa	30

Base de datos de grupos taxonómicos.....	30
Variación de identidad entre grupos taxonómicos de las subunidades dinámicas de la ATP sintasa	36
Conservación intragrupo taxonómico de subunidades dinámicas.	37
Conservación de subunidades dinámicas de grupos taxonómicos con respecto al humano... ..	39
Análisis comparativo de los sitios de unión de inhibidores exógenos de la ATP sintasa	45
Microorganismos causantes de Enfermedades de Declaración Obligatoria	45
Aurovertina B	47
Polifenoles	50
Efraeptina	53
Bedaquilina.....	55
Selección de microorganismos.....	60
Capítulo 4. Conclusiones	70
Referencias.....	71
Apéndice A	78
Lista de códigos UniProt de las secuencias de la subunidad β utilizadas.	78

Índice de Figuras

Figura 1. Número de antibióticos aprobados por intervalos de tiempo.	3
Figura 2. Línea de tiempo del descubrimiento de antibióticos.	3
Figura 3. Blancos farmacológicos antimicrobianos.	4
Figura 4. Representación esquemática de la estructura de las ATP sintasas tipo F, V y A.	10
Figura 5. Modelos tridimensionales de las subunidades α (izquierda) y β (derecha) de la F_1 -ATPasa.12	
Figura 6. Motivos Walker A (verde) y Walker B (azul).	13
Figura 7. Mecanismo de cambio de unión.	14
Figura 8. Sitio de unión a Efraeptina.	16
Figura 9. Estructura química de la aurovertina B.	17
Figura 10. Sitios de unión a aurovertina B.	18
Figura 11. Estructura química de (izquierda a derecha) resveratrol, piceatanol y quercetina.	19
Figura 12. Sitio de unión a polifenoles.	20
Figura 13. Estructura química de la bedaquilina.	21
Figura 14. Sitio de unión a bedaquilina.	22
Figura 15. Esquema de la división taxonómica del dominio Bacteria.	31
Figura 16. Esquema de la división taxonómica del dominio Eukaryota.	35
Figura 17. Porcentaje de identidades intragrupalas de las subunidades dinámicas de la ATP sintasa.	38
Figura 18. Identidad de secuencias de subunidades dinámicas de la ATP sintasa por grupos taxonómicos respecto al humano.	40
Figura 19. Porcentajes de identidad con respecto al humano del bucle DELSEED de la subunidad β	42
Figura 20. Porcentaje de identidad de zonas seleccionadas de la subunidad γ	44
Figura 21. Porcentaje de identidad del sitio de unión a aurovertina a 4 y 8 Å.	48
Figura 22. Sitio de unión a aurovertina.	49
Figura 23. Porcentaje de identidad del sitio de unión a polifenoles a 4 y 8 Å.	51
Figura 24. Sitio de unión a polifenoles.	53
Figura 25. Porcentaje de identidad del sitio de unión a Efraeptina a 4 y 8 Å.	54
Figura 26. Sitio de unión a efraeptina.	55
Figura 27. Porcentaje de identidad a 4 y 8 Å del sitio de unión a bedaquilina.	56
Figura 28. Alineamiento de secuencia de residuos seleccionados en torno a la bedaquilina.	57
Figura 29. Sitio de unión a bedaquilina a 8 Å de distancia.	59
Figura 30. Alineamiento de secuencias del sitio de unión a aurovertina.	60
Figura 31. Estructura de la aurovertina B.	61
Figura 32. Estructura química del resveratrol.	63
Figura 33. Alineamiento de secuencias del sitio de unión a polifenoles.	63
Figura 34. Alineamiento de secuencias del sitio de unión a efraeptina.	65
Figura 35. Estructura química de la bedaquilina.	66
Figura 36. Alineamiento de secuencias del sitio de unión a bedaquilina.	66

Resumen

La F_0F_1 -ATP sintasa es una de las máquinas moleculares más maravillosas e interesantes. Dotada de un sofisticado mecanismo de rotación, esta enzima utiliza la fuerza protón motriz transmembranal generada por la cadena de transporte de electrones para la síntesis endergónica de ATP. La ATP sintasa es una proteína multimérica de compleja organización estructural. Su arquitectura está altamente conservada a lo largo de la evolución. Se ha aislado un número significativo de péptidos naturales y moléculas pequeñas de origen endógeno y exógeno que pueden interactuar e inhibir la actividad de esta enzima. Además, con el uso de tamizajes fenotípicos, se desarrolló una molécula sintética anti-ATP sintasa aprobada para el tratamiento de la tuberculosis multirresistente. La existencia de todos estos inhibidores, tanto naturales como sintéticos, puede considerarse como una clara indicación de la **accesibilidad farmacológica** de la ATP sintasa. Sin embargo, el potencial farmacológico de esta enzima clave para la supervivencia de la mayoría de los organismos aeróbicos no ha sido probado de forma sistemática. En este estudio, realizamos un análisis comparativo del grado de conservación de la ATP sintasa entre grupos taxonómicos que cuenten con especies que sean patógenos de humanos. Los resultados muestran que las diferencias de estructura primaria y estereoquímicas entre la ATP sintasa humana y las de patógenos son mayores a lo reconocido anteriormente, por lo cual es posible sugerir a esta enzima como un blanco farmacológico especie-específico.

Abstract

FOF1-ATP synthase is one of the most marvelous and interesting molecular machines. This enzyme, endowed with a sophisticated rotating mechanism, uses the transmembrane proton-motive force generated by the electron transport chain for the endergonic synthesis of ATP. ATP synthase is a multimeric protein of a complex structural organization. The architecture is highly conserved throughout the evolution. Significantly, several natural peptides and small organic molecules of endogenous and exogenous origin has been isolated, which can interact and inhibit the activity of this enzyme. Furthermore, using phenotypic screenings, a synthetic anti-ATP synthase molecule approved for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) was developed. The existence of all these ATP synthase binders, both natural and synthetic, can be considered as a clear indication of the druggability of this enzyme. However, the pharmacological potential of this vital enzyme for the survival of most aerobic organisms has not been systematically tested. In this study, we performed a comparative analysis of the degree of conservation of ATP synthase between taxonomic groups that have pathogenic species against humans. The results show that the differences in primary and stereochemical structure between human ATP synthase and those of pathogens are greater than previously recognized, so it is possible to suggest this enzyme as a species-specific pharmacological target.

Capítulo 1. Introducción

Resistencia a antibióticos

Las enfermedades infecciosas siempre han acompañado a la humanidad y han evolucionado con ella. Estas enfermedades pueden transmitirse directa o indirectamente de una persona a otra y son causadas por organismos patógenos como las bacterias, virus, parásitos u hongos. Existen nuevas enfermedades infecciosas emergentes y otras antiguas vuelven a aparecer sin que podamos predecir cuándo ocurrirá una nueva epidemia. Además, la resistencia a antibióticos es un peligro latente a nivel global que requiere atención inmediata.

La resistencia a antibióticos es un fenómeno natural. Algunos microorganismos son naturalmente resistentes a ciertos tipos de antibióticos. En general, los microorganismos se pueden volver resistentes de dos formas. La primera es por mutaciones genéticas y la segunda es por la adquisición de resistencia a partir de otros microorganismos mediante transferencia horizontal de genes [1]. Las mutaciones genéticas alteran la acción del antibiótico utilizando alguno de los siguientes mecanismos: modificando la diana biológica (disminuyendo la afinidad por el fármaco), disminuyendo la captación de la molécula, activando mecanismos de eflujo para extrudir el fármaco o realizando cambios globales en vías metabólicas importantes mediante la modulación de redes regulatorias [1]–[12].

La crisis de resistencia a antibióticos se atribuye principalmente su uso excesivo, a las prescripciones inapropiadas por parte del sector salud, así como a su uso extensivo en agricultura y ganadería [13]. Por otro lado, el desarrollo de nuevos antibióticos por parte de la industria farmacéutica ha estado detenido debido a obstáculos económicos y regulatorios. Debido a esto, el 80% de las grandes empresas farmacéuticas han abandonado la investigación en el área de antibióticos. Además, la investigación sobre nuevos fármacos en la academia se ha reducido debido a crisis económicas [13]–[15]. El desarrollo de antibióticos no es considerada una inversión para la industria farmacéutica, debido a que los antibióticos son usados por periodos relativamente cortos y son generalmente curativos, lo que no los hace lucrativos como aquellos fármacos utilizados para tratar condiciones crónicas como diabetes, desórdenes psiquiátricos, asma o reflujo gastroesofágico [13], [14], [16]–[18].

Por otro lado, las compañías que aún persiguen el descubrimiento de nuevos antibióticos tienen el obstáculo de conseguir la aprobación regulatoria. Entre 1983 y 2007, ocurrió una reducción sustancial en el número de nuevos antibióticos aprobados. En la Figura 1 se muestra el número de antibióticos aprobados desde 1980 hasta 2014, en periodos de 5 años. Se observa que de 1980 a 1999, el número de antibióticos aprobados se mantuvo relativamente constante; sin embargo, a partir del año 2000, los fármacos antimicrobianos disponibles han disminuido de forma dramática.

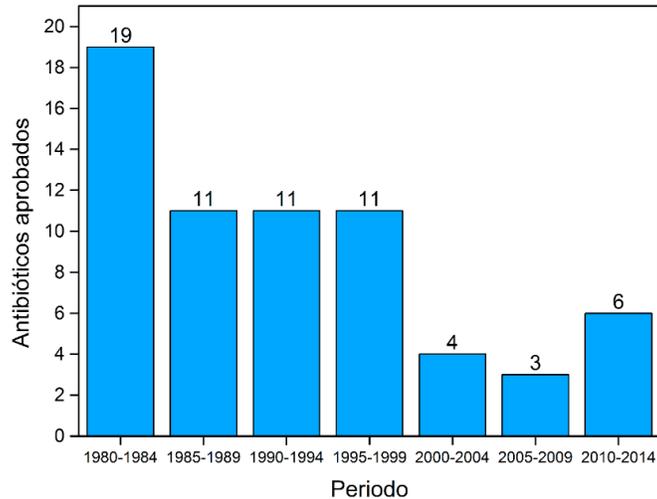


Figura 1. Número de antibióticos aprobados por intervalos de tiempo. Adaptado de [13].

Cuando un nuevo antibiótico es usado, la emergencia de la resistencia es prácticamente inevitable. Sin embargo, debido a que la evolución de los patógenos es incierta, la línea de tiempo para el desarrollo de la resistencia no es predecible [17]. En la Figura 2 se muestra una línea de tiempo de descubrimiento de antibióticos. El descubrimiento de un antibiótico es seguido por la aparición de cepas resistentes a éstos en lapsos menores a 15 años. Por ejemplo, la penicilina se descubrió en 1928 y los microorganismos resistentes se empezaron a encontrar en 1940. A partir de la aplicación clínica de los carbapenémicos (por ejemplo, imipenem, Figura 2), pasaron más de 30 años para el descubrimiento y utilización clínica de nuevos tipos de antibióticos. Los antibióticos más recientes fueron aprobados entre 2010 y 2014 por la FDA, incluyendo a la bedaquilina que es un antibiótico especie-específico. Se ha estimado que, si no se aborda el problema de la resistencia a antibióticos a la brevedad, puede resultar en aproximadamente 10 millones de muertes cada año a nivel mundial en 2050 y un costo de 6.6×10^{13} libras en pérdidas globales [19]–[21].

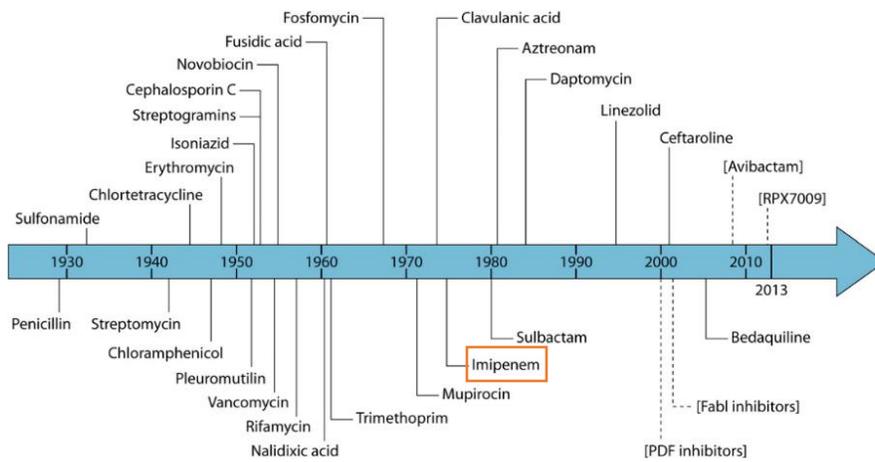


Figura 2. Línea de tiempo del descubrimiento de antibióticos. Tomada de [22]

Esencialmente existen cinco clases de dianas farmacológicas antibacterianas, esquematizadas en la Figura 3. Una de estas dianas es la biosíntesis de la pared celular/peptidoglicano, afectada por glicopéptidos tales como β -lactámicos y vancomicina [5]. La segunda diana es la síntesis de proteínas, con la mayoría de antibióticos actuando sobre el ribosoma [23]. La tercera diana es el bloqueo de la replicación de DNA y la transcripción a RNA, cuyos blancos más comunes son la DNA girasa y la RNA polimerasa. La cuarta diana es la vía biosintética de folato, la cual provee la unidad de carbono necesaria para la síntesis del desoxitimidilato necesario para la síntesis de DNA. Las sulfas y los análogos de folato, usadas en combinación, bloquean dos pasos secuenciales en esa ruta biosintética [24]. La quinta diana es la interrupción de la integridad de la membrana celular, utilizando antibióticos como la daptomicina [9], [25]–[28].

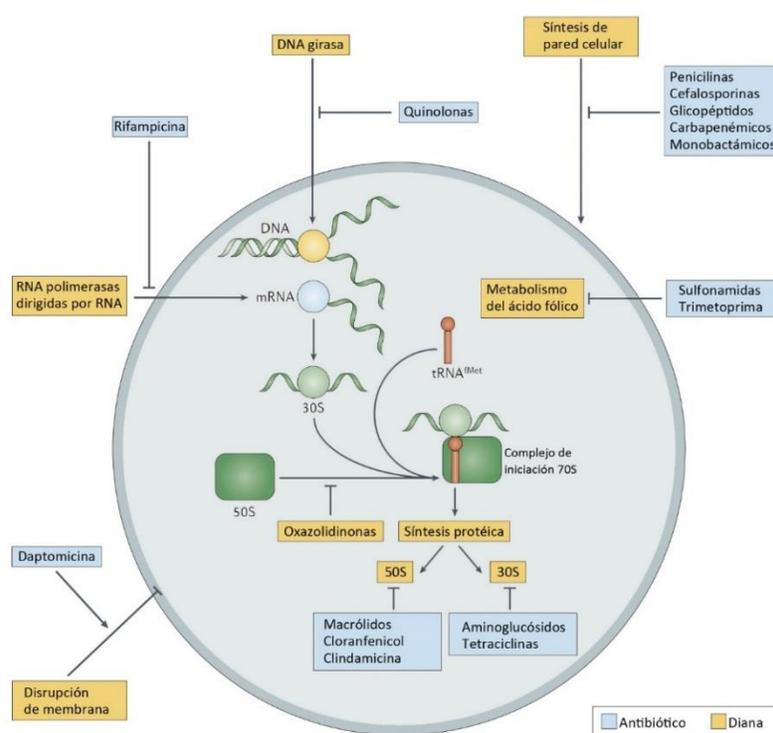


Figura 3. Blancos farmacológicos antimicrobianos. Existen cinco blancos farmacológicos en bacterias: síntesis de pared celular, síntesis de proteínas, bloqueo de la replicación de DNA y transcripción de RNA, rutas metabólicas y interrupción de la membrana plasmática. Tomada de [11].

Inhibición de la síntesis de la pared celular

Los antibióticos β -lactámicos comparten un mecanismo de acción común: la inhibición de la síntesis de la pared de péptidoglicano de la bacteria. Por eso se los considera antibióticos de gran seguridad, ya que las células eucariotas carecen de pared bacteriana. Inhiben la etapa final de la síntesis, es decir, la reacción de entrecruzamiento entre los polímeros de peptidoglicanos. Esta etapa se encuentra catalizada principalmente por dos clases de

enzimas: carboxipeptidasa y transpeptidasa, las cuales están ancladas a la membrana plasmática de la bacteria. A estos tipos de proteínas se las denominan PBP (proteínas ligadoras de penicilinas). Es aquí, donde se fijan los β -lactámicos, inhibiéndolas en forma no competitiva, irreversible.

Todas las bacterias poseen este tipo de proteínas, variando en su número y afinidad de unión por diferentes antibióticos β -lactámicos según cual sea la bacteria; por ejemplo, los *Staphylococcus aureus* tienen cuatro PBP, en tanto que la *E. coli* posee como mínimo siete. En términos generales, las PBP intervienen en: el crecimiento de la bacteria; la conformación de la estructura tridimensional; la reparación de la pared; brinda rigidez; mantiene el gradiente osmótico entre la bacteria y el medio.

Inhibición de la síntesis de proteínas

La síntesis de los ribosomas se realiza en tres etapas: iniciación, elongación, que comprende reconocimiento, transferencia y translocación, y terminación. El ribosoma 70 S, compuesto por dos subunidades, 30 S y 50 S, es la unidad funcional de la síntesis de proteínas en las bacterias, en tanto que los ribosomas de los mamíferos son 80 S y no se dividen en subunidades. Esto explicaría por qué los fármacos antimicrobianos pueden inhibir la síntesis en los ribosomas bacterianos, sin tener efecto sobre los ribosomas de los mamíferos. Los aminoglucósidos se fijan irreversiblemente a la subunidad 30 S de los ribosomas e inhiben la síntesis bacteriana, interfiriendo la fijación del ARNt y distorsionando el codón de ARNm, con lo que hay una lectura equívoca del mensaje genético y una síntesis de proteínas no funcionales. Las tetraciclinas se fijan a los ribosomas de los mamíferos. El cloranfenicol, la clindamicina y la eritromicina se fijan a la subunidad 30 S. El primero inhibe una peptidil-transferasa, la segunda, la iniciación, y los macrólidos, la translocación.

Interferencia en la síntesis y/o metabolismo de los ácidos nucleicos

Rifampicina (ARN-polimerasa ADN-dependiente), quinolonas (ADN-girasas), metronidazol y antivirales. Existen tres posibles mecanismos por los que los antimicrobianos pueden modificar la síntesis de los ácidos nucleicos:

- Interfiriendo la replicación del ADN.
- Impidiendo la transcripción.
- Inhibiendo la síntesis de metabolitos esenciales.

A través del primero, actúan las quinolonas, ya que inhiben la enzima ADN-girasa. Esta enzima corta la doble hélice del ADN cromosómico en fragmentos a los que superenrolla en sentido negativo, para proceder al sellado de los extremos de ADN que fueron cortados. Las quinolonas impiden el cierre de los puntos de rotura. Los fármacos que inhiben la transcripción, como es el caso de la rifampicina y la actinomicina, actúan en la ARN-polimerasa. La rifampicina se fija en la subunidad B de esta enzima e impide su formación y

la del complejo que inicia la transcripción, mientras que la actinomicina D bloquea la progresión de la ARN polimerasa en cualquier fase [29].

Vía biosintética de folato

Las sulfamidas inhiben la incorporación del PABA para la formación del ácido fólico, de aquí su efecto antibacteriano selectivo. Las diaminopirimidinas inhiben la dihidrofólicoreductasa e impiden el paso de ácido fólico a folínico (paso necesario para la síntesis de bases púricas y pirimidínicas). La utilización terapéutica de trimetoprima depende de la afinidad selectiva por la dihidrofólico-reductasa de gérmenes sensibles [29].

Disrupción de la membrana citoplasmática

La membrana celular constituye una barrera de permeabilidad y lleva a cabo funciones de transporte activo. Si la integridad funcional de la membrana se altera, los iones y macromoléculas se escapan y la célula se lesiona y muere. El empleo de agentes que afectan a la membrana celular en la terapéutica antiinfecciosa se debe al hecho de que determinadas membranas de algunas células y hongos se alteran con más facilidad que las de los animales, lo que permite una actividad quimioterapéutica selectiva. Las polimixinas son activas frente a bacterias Gram negativas y actúan como detergentes catiónicos sobre membranas ricas en fosfatidil-etanolamina y los poliénicos, tales como anfotericina B, nistatina, son activos frente a hongos [29].

Mecanismos de resistencia a antibióticos.

Los mecanismos por los que se producen resistencias de los patógenos hacia antibióticos se pueden agrupar en los siguientes:

- *Bloqueo del transporte de antibióticos.*

La internalización de compuestos hidrófilicos se lleva a cabo por canales denominados porinas, que se encuentran en la membrana interna, estos canales están llenos de agua por lo que la penetración de los antibacterianos en este caso dependerá del tamaño de la molécula, hidrofobicidad y carga eléctrica. La membrana celular de las bacterias Gram negativas contiene un alto contenido de lípidos con respecto a las Gram positivas, presenta una membrana externa con un 40% de lipopolisacárido, lo cual le proporciona una barrera efectiva contra la entrada de antibióticos, dependiendo de la composición química de éstos. Un mecanismo de resistencia surge de cambios que se dan en los receptores bacterianos para los antimicrobianos o por alteraciones estructurales en los componentes de envoltura de la célula bacteriana (membrana o pared celular) que influyen en la permeabilidad, así como a la pérdida de la capacidad de transporte activo a través de la membrana celular o la expresión de bombas de eflujo, las cuales se activan en el momento en que el antibiótico se introduce a la célula bacteriana. De esta forma, por ejemplo, se consigue resistencia a la fosfomicina por pérdida del sistema de transporte del glicerol-fosfato [29]–[31].

- *Modificación enzimática del antibiótico.*

Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico, haciendo que éste pierda su funcionalidad. Las β -lactamasas son un ejemplo notable de esta habilidad bacteriana. Son proteínas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia. De igual forma, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificar estos antibióticos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación. Por ejemplo, el cloranfenicol se inactiva por una acetilación catalizada por una cloranfenicol-acetiltransferasa [29]–[31].

- *Expulsión del antibiótico por un mecanismo activo de bombeo.*

Este mecanismo opera tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas. Por ejemplo, la tetraciclina se expulsa de forma activa del interior de bacterias resistentes [29]–[31].

- *Modificación del sitio de acción del antibiótico.*

Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une para interrumpir una función vital. Este mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias Gram positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas unidoras de penicilinas. Por ejemplo, la metilación del ARN 23S en una posición determinada da lugar a resistencia a los macrólidos, que no pueden fijarse en el ribosoma y producir así su efecto inhibitorio [29]–[31].

- *Cambios en la permeabilidad de la membrana externa.*

Las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de agentes farmacológicos al espacio periplásmico [29]–[31].

F₀F₁-ATP sintasa

La F₀F₁-ATP sintasa es un complejo enzimático encargado de proveer a las células aeróbicas la energía necesaria para realizar todos sus procesos vitales mediante la síntesis de ATP. Esta enzima se encuentra muy conservada a lo largo de la evolución. Las enzimas bacterianas son esencialmente las mismas en estructura y función que aquellas de las mitocondrias y los cloroplastos de organismos eucariontes. A pesar de esta conservación, recientemente la F₀F₁-ATP sintasa ha comenzado a figurar como un blanco farmacológico prometedor porque el bloquear su actividad de manera específica podría causar la muerte de un patógeno sin afectar al hospedero.

El ATP es una molécula pequeña usada en las células para la transferencia energética [32]. Está formado por un anillo de adenina, una molécula de ribosa y tres grupos fosfato, denominados α , β y γ a partir del más cercano a la ribosa [33]. Los enlaces fosfodiéster, al hidrolizarse, liberan una cantidad significativa de energía libre (alrededor de 7.3 kcal/mol, en condiciones estándar) [34]. La F_0F_1 -ATP sintasa, también llamada complejo V de la cadena respiratoria, sintetiza ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (P_i) al disipar la fuerza protón motriz (pmf o Δp), o en algunas bacterias fuerza sodio motriz (smf) [35]–[37]. En bacterias, la ATP sintasa puede operar en sentido inverso bajo condiciones anaerobias, e hidrolizar el ATP producido por glucólisis, usando la energía que es liberada para translocar protones fuera del citoplasma bacteriano, y de esta forma generar la fuerza protón motriz para dirigir otras funciones celulares esenciales, tales como la quimiotaxis, y el transporte a través de la membrana [35], [36]. En contraste, las actividades hidrolíticas de ATP de las ATP sintasas en mitocondrias, cloroplastos y ciertas bacterias están inhibidas mediante inhibidores peptídicos inhibitorios. En bacterias y cloroplastos el rol inhibitorio corre a cargo de la subunidad ϵ , la cual está controlada por el gradiente electroquímico y el balance ATP/ADP. En mitocondrias, la inhibición se lleva a cabo por el péptido IF1, cuyo modo de acción se cree que es similar a aquél visto en la subunidad ϵ [36], [38].

Arquitectura básica de F_0F_1

Las F_0F_1 -ATP sintasas varían en complejidad a través de los diferentes reinos, sin embargo, presentan una arquitectura básica similar a la de la ATP sintasa de *Escherichia coli* [34], mostrada en la Figura 4. Dicha arquitectura está conformada por dos motores rotatorios acoplados: un motor químico conocido como F_1 y un motor eléctrico conocido como F_0 [35]. Estos dos sectores principales tienen diferentes estructuras y funciones; el dominio hidrofílico F_1 constituye el centro catalítico de la enzima, mientras que el dominio hidrofóbico embebido en la membrana F_0 comprende la porción traslocadora de iones [34], [35], [39]. En total, la F_0F_1 ATP sintasa de *E. coli* consiste de ocho diferentes subunidades: cinco en el sector F_1 con una estequiometría de $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ y una masa molecular de aproximadamente 382 kDa, y tres subunidades en el sector F_0 con una estequiometría de $a b_2 c_{10\pm 1}$ y una masa molecular de aproximadamente 148 kDa [40]–[42].

La primera estructura cristalina obtenida de la ATP sintasa fue la del sector F_1 de la ATP sintasa mitocondrial de corazón de bovino [43]. Es la ATP sintasa que tiene un alto porcentaje de identidad (aproximadamente 99%) con su ortóloga humana. Esta enzima presenta geometría esferoide, con un eje menor de 80 Å y un eje mayor de 100 Å [44]. Las subunidades α y β están ensambladas de forma alterna formando un hexámero. El hexámero $\alpha_3\beta_3$ contiene en su cavidad central un extremo de la subunidad γ , de estructura helicoidal y asimétrica, compuesta por dos grandes hélices α , las cuales actúan como un eje que acopla a los dos motores. Este acoplamiento es complementado por la subunidad ϵ (en bacterias y cloroplastos) o δ (en mitocondrias) [36], [45]. Las subunidades pequeñas de F_1 ,

δ y ϵ , no son análogas en enzimas de diferentes orígenes: δ y ϵ bacterianas y de cloroplastos corresponden a OSCP (oligomycin sensitivity-conferring protein) y ρ , respectivamente de la ATP sintasa mitocondrial [45]. Las subunidades δ y ϵ asociadas en la enzima mitocondrial están unidas firmemente a un extremo de la estructura cilíndrica hidrofóbica hecha de un anillo de subunidades c en el dominio membranar F_0 . La subunidad ϵ mitocondrial no tiene contraparte en las enzimas de bacterias ni de cloroplastos (Tabla 1) [43].

Tabla 1. Composición de diversas ATP sintasas.

Bacteria [36]	F_0F_1			V_0V_1	A_0A_1
	Mamíferos [36]	Levaduras [46]	Plantas [47]	Varios[48]– [50]	Varios [51], [52]
α	α	α	α	B	B
β	β	β	β	A	A
γ	γ	γ	γ	D	D
ϵ	δ	δ	-	-	-
-	ϵ	ϵ	ϵ	F	F
δ	OSCP	OSCP	δ	-	-
a	a	a	a, IV	a	a
b	b	b	b, I y II	G	G
c	c	c	c, III	c	c
-	8	8	-	-	-
-	d	d	-	-	-
-	e	e	-	-	-
-	f	f	-	-	-
-	g	g	-	-	-
-	-	i	-	-	-
-	-	k	-	-	-
-	F6	h	-	-	-
-	IF1	Inh1p	-	-	-
-	-	Stf1p	-	-	-
-	-	Stf2p	-	-	-
-	-	-	-	E	-
-	-	-	-	-	E
-	-	-	-	d	C
-	-	-	-	e	-

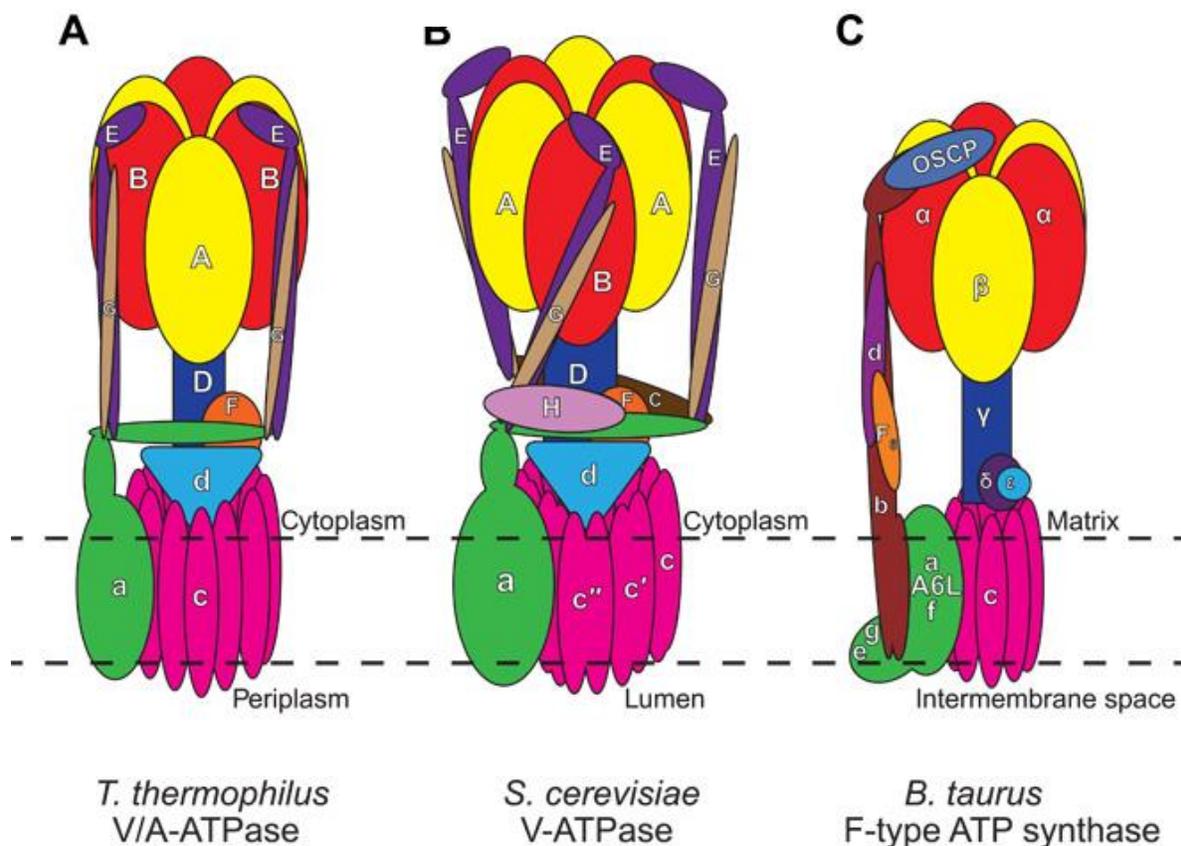


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de las ATP sintasas tipo F, V y A. La enzima está compuesta por el sector F_1 y F_0 . El sector F_1 más simple está conformado por el hexámero $(\alpha\beta)_3$, la subunidad γ , la subunidad ϵ y δ . El sector F_0 está compuesto por el anillo de 10 ± 1 subunidades c , la subunidad a y dos subunidades b . Tomada de [51].

El dominio F_0 contiene subunidades homólogas a las subunidades a , b y c de la enzima de *E. coli*; sin embargo, muestra un grado de complejidad mayor al presentar subunidades adicionales. La subunidad c tiene una masa molecular de 8.3 kDa. Se pliega como una horquilla con dos hélices α transmembranales separadas por un asa polar que está expuesta al citoplasma. La región C-terminal está localizada en el lado periplasmático de la membrana. Un grupo carboxilo conservado a la mitad de la hélice 2 (c-D₆₁ en *E. coli* y c-E en otras especies) juega un rol importante en la translocación de H^+ [41], [53]–[55]. Un análisis de RMN mostró que las secuencias transmembranales de la subunidad c consisten en dos hélices α ligeramente curvadas que cruzan en un ángulo aproximado de 30° y la hélice 2 se interrumpe de c-V₆₀ a c-A₆₂. La estabilización de la horquilla es posible debido a la maximización de las interacciones de van der Waals, al agrupamiento de las cadenas laterales aromáticas en ambos extremos de los segmentos transmembranales y por la alteración e interacción de cadenas laterales cortas y largas a lo largo de la interfaz entre ambas hélices [45].

La *subunidad a* es una proteína extremadamente hidrofóbica con una masa molecular de 30.3 kDa. La estructura de la *subunidad a* aún no ha sido elucidada. Esta subunidad conecta el anillo c al tallo periférico [35], [36]. Los residuos cargados a-R₂₁₀, a-E₂₁₉ y a-H₂₄₅ son esenciales en el acoplamiento de la translocación de iones y la rotación. La *subunidad a* de *E. coli* muestra homología estructural a sus contrapartes en F₀F₁ ATP sintasa de otras especies con una identidad mayor en dos regiones hacia la parte C-terminal, por ejemplo, a-P₁₉₀-L₂₂₀ y a-F₂₄₄-Y₂₆₃. Estas regiones contienen los residuos a-R₂₁₀, a-E₂₁₉ y a-H₂₄₅ [40], [56].

La subunidad b, también llamado tallo secundario, posee una masa molecular de 17.3 kDa y tiene una secuencia primaria anfipática. Una de las funciones de la subunidad b es el anclar la porción F₁ a la porción F₀, previniendo la rotación de F₁[57]. El tallo secundario de la ATP sintasa de *E. coli* es un homodímero de subunidades b que está compuesta de cuatro dominios. El dominio N-terminal sobresale de la membrana e interacciona con las subunidades a y c, mientras que el dominio polar hace contactos con las subunidades α , β y δ [57], [58].

Subunidades catalíticas y no catalíticas

Los sitios de unión para ATP y ADP se encuentran presentes tanto en las subunidades α y β , siendo las subunidades β las únicas capaces de llevar a cabo la catálisis o hidrólisis, siempre y cuando las subunidades se encuentren formando el hexámero α/β [45]. Ambas subunidades presentan un plegamiento casi idéntico (Figura 5). Utilizando la numeración de la estructura cristalográfica de bovino, cada subunidad consiste de un dominio N-terminal con un barril β de seis hojas (α_{19-95} , β_{9-82}), un dominio central $\alpha\beta$ que contiene el sitio de unión a nucleótidos (α_{96-379} , β_{89-363}), y un dominio C-terminal ($\alpha_{380-510}$, $\beta_{364-474}$) de 7 y 6 hélices en las subunidades α y β , respectivamente [59], [60]. En cada subunidad, los dominios barril β y de unión a nucleótidos se encuentran separados, mientras que este último y el C-terminal interactúan en menor medida. El grado de contacto entre las subunidades α y β varían en función de la conformación puntual de cada una de ellas [43]. Las subunidades β presentan tres conformaciones diferentes, las cuales son dependientes del paso del ciclo catalítico en el que cada una de ellas se encuentre. En la estructura cristalográfica original de F₁ bovina [43], las subunidades β_{TP} y β_{DP} están unidas a un nucleótido (AMPPNP y ADP, respectivamente), y se les describe como una conformación cerrada debido a la disposición cercana entre los dominios de unión a nucleótido y el C-terminal. En cambio, la subunidad β_E se encuentra libre de nucleótido y adopta una conformación abierta, con el dominio C-terminal desplazado ~ 25 Å y 30° con respecto al dominio central. Las tres subunidades α presentan una conformación cerrada en relación a su sitio de unión a nucleótido, pero abierta en relación a la disposición del dominio C-terminal [61]. Las subunidades α complementan los sitios catalíticos de las subunidad β , y se nombran de acuerdo con la relación que tienen con la subunidad β , por ejemplo: α_{TP} forma la interface con β_{TP} [43]. Además de aportar un residuo de R fundamental para la

catálisis, se han propuesto roles importantes para las subunidades α , como son el contribuir con el ensamblaje, la estabilización estructural del anillo F_1 y la transmisión de cambios conformacionales [61].

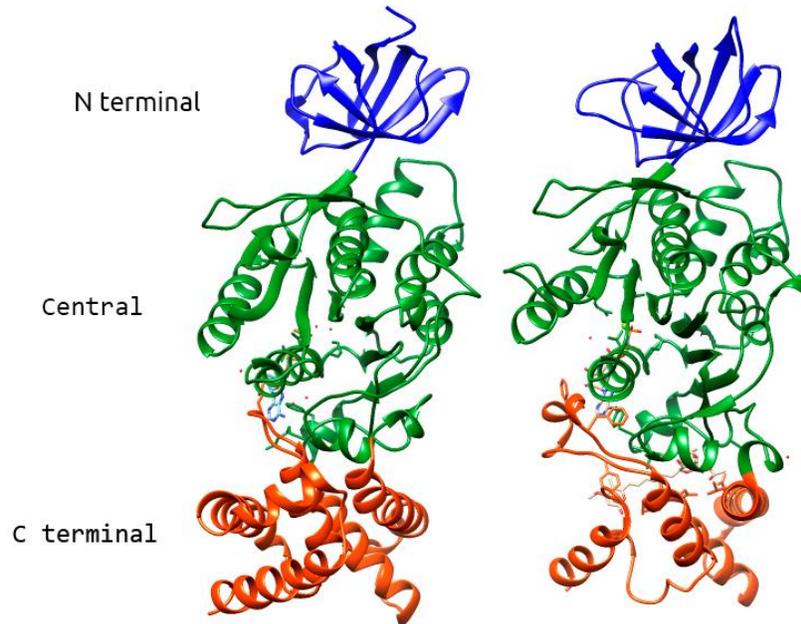


Figura 5. Modelos tridimensionales de las subunidades α (izquierda) y β (derecha) de la F_1 -ATPasa. Se muestran las subunidades α y β con sus regiones estructurales resaltadas. En azul se muestra el extremo amino, en verde se muestra el dominio central o de unión a nucleótido; y en rojo se muestra el dominio carboxilo-terminal. (pdb:1BMF)

La distancia promedio entre los sitios catalíticos y no catalíticos adyacentes es de 27 Å (entre los fosfatos β). Tanto en las subunidades α como β , una cara de la ribosa y la fracción de fosfatos son accesibles al solvente externo mediante un túnel cónico [43]. Se ha reportado que en las proteínas que unen nucleótidos existen dos regiones altamente conservadas conocidas como motivos Walker (Figura 6). La primera de ellas es el motivo Walker A, también conocido como el bucle Walker o bucle P (P-loop). El motivo presenta la secuencia G-X-X-X-GK-T [62], donde X simboliza cualquier residuo. El residuo de lisina, junto con los átomos NH de la cadena principal son cruciales para la unión a nucleótidos [62], [63]. La estructura secundaria del motivo Walker A es un bucle rico en residuos de glicina precedido por una hoja plegada β seguida de una hélice α ; dichos elementos son parte de un dominio α/β con cuatro hebras intercaladas entre dos hélices en cada lado. El segundo es el motivo Walker B, que se encuentra más adelante del motivo Walker A, más cercano al C-terminal. Este motivo tiene la secuencia [RK]-X-X-X-X-G-X-X-X-L-Z-Z-Z-D, en donde Z simboliza un residuo hidrofóbico [62], [63]. El residuo de aspartato coordina al Mg^{2+} , el cual es requerido para la hidrólisis de ATP, y el residuo glutamato se cree

que es el activador de agua para la reacción de hidrólisis. Mutaciones realizadas sobre el residuo de glutamato bloquean la hidrólisis de nucleótido pero no su unión [63].

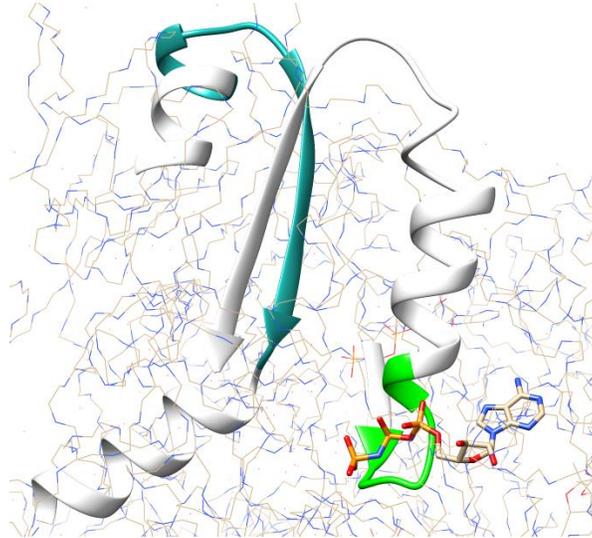


Figura 6. Motivos Walker A (verde) y Walker B (azul). (pdb:1BMF)

Durante el ciclo catalítico, los sitios de unión a nucleótidos cambian sus afinidades de manera sincronizada y alternante. La posición de la subunidad γ determina el sitio catalítico con la mayor afinidad, con afinidad intermedia y baja afinidad. La principal diferencia entre las conformaciones cerradas y abierta se encuentra en el dominio C-terminal. Aquí, el asa DELSEED, una estructura hélice-vuelta-hélice que contiene el motivo conservado DELSEED, se encuentra en posición más próxima al dominio de unión cuando el sitio catalítico contiene al nucleótido y en posición distal cuando el sitio se encuentra vacío. La región de contacto de la subunidad γ con el motivo β -DELSEED está principalmente en la hélice corta que forma una pequeña protrusión de la estructura de superenrollamiento helicoidal, siendo los residuos participantes 91-98 en γ -TF₁, 73-90 en γ -MF₁ y 82-99 en γ -EF₁ [64]. Se han realizado mutaciones puntuales de la secuencia DELSEED y se ha concluido que las cadenas laterales de este motivo no contribuyen de una manera específica a la rotación de la subunidad γ . Se han propuesto varias posibilidades sobre la función del motivo DELSEED, una de ellas menciona que es posible que el torque sea generado en otros sitios de contacto intersubunidades, incluyendo aquellas que no se han resuelto por cristalografía. Otra posibilidad, es que la función del motivo DELSEED sea estérica, actuando como una barra que dinámicamente empuja y mueve la hélice corta de la subunidad γ a través de contacto físico y no entre interacciones entre residuos [64]

Mecanismo de unión alternante

El mecanismo de síntesis de ATP por la ATP sintasa se puede dividir en tres fases: la translocación de protones llevada a cabo por F_0 , el acoplamiento de la disipación del gradiente de protones con la síntesis de ATP, la cual requiere la interacción de F_1 y F_0 , y la catálisis de la formación del enlace fosfoanhídrido de ATP llevado a cabo por F_1 . La evidencia actual confirma la hipótesis de acoplamiento conformacional de la fosforilación oxidativa, la cual apoya el mecanismo de la formación de ATP, propuesto por Boyer. Sin embargo, los cambios conformacionales en la ATP sintasa son generados por la translocación de protones en lugar de la transferencia directa de electrones como fue propuesto en la hipótesis mencionada [65]. F_1 tiene tres protómeros catalíticos interaccionantes, en un estado conformacional diferente cada uno (Figura 7): un estado que une sustratos y productos de manera débil en el cual ocurre la catálisis (β_{DP}), un estado que une sustratos y productos de forma fuerte (β_{TP}), y otro estado que no une ni a sustratos ni productos (β_E). La energía libre liberada por la translocación de protones es utilizada para interconvertir estos tres estados. El enlace fosfoanhídrido de ATP es sintetizado solamente en el estado cerrado β_{DP} y el ATP es liberado solamente en el estado abierto β_E [65]. Se ha determinado que la subunidad γ gira en pasos sucesivos de 120 grados de rotación, los cuales pueden ser a su vez divididos, en subpasos de 80 y 40 grados [66]. En la dirección de hidrólisis, el ATP se une a β_E , consecuentemente convertida en β_{TP} , y después es convertida en β_{DP} , donde el evento catalítico ocurre. En el siguiente paso de transición (β_{TP} a β_E), los productos (ADP + P_i) son liberados [67]–[71].

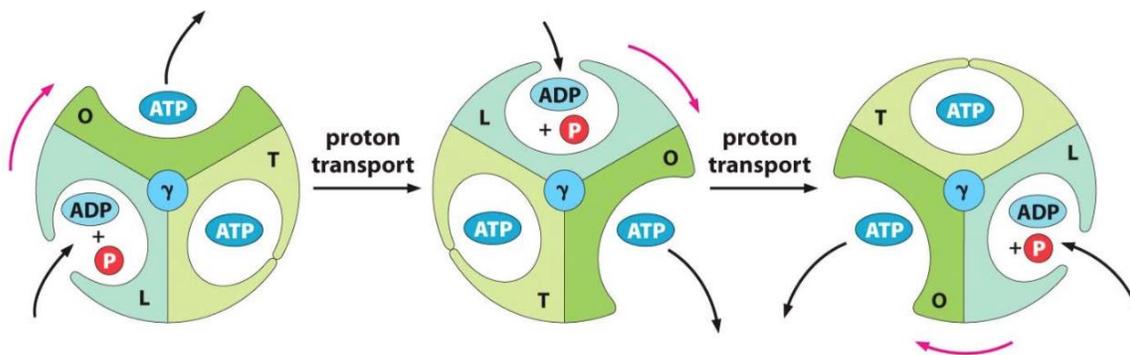


Figura 7. Mecanismo de cambio de unión. El sentido de hidrólisis va de izquierda a derecha. El ciclo inicia con la unión de ADP y fosfato (P) en la conformación L (cerrada). El siguiente paso es el cambio estructural a la conformación T (cerrada) en la cual se sintetiza ATP. Posteriormente, el ATP es liberado en la conformación O (abierta).

Inhibición de la actividad catalítica de la ATP sintasa

Inhibición endógena

Las ATP sintasas poseen mecanismos de inactivación/reactivación de la síntesis de ATP bajo condiciones de baja y alta energía disponible. En las mitocondrias y cloroplastos, cuando Δp es bajo, MgADP (sin Pi) permanece unido a uno de los tres sitios catalíticos de la enzima formando un complejo inactivo. En cloroplastos, se piensa que este estado inhibido por ADP se encuentra estabilizado durante las horas de oscuridad mediante la formación de un puente disulfuro intramolecular en la subunidad γ de la ATP sintasa. Cuando la luz solar regresa, la enzima es reactivada por medio de una reducción regulada por tiorredoxina del puente disulfuro y la disociación dependiente de energía del MgADP [36], [72].

IF₁ es una proteína inhibidora endógena de la ATP sintasa mitocondrial. Está conservada evolutivamente en todas los eucariotas y se ha propuesto que juega un papel crucial en la prevención de la reacción reversa de la ATP sintasa y en el cambio metabólico de oxidación fosforilativa a glucólisis. IF₁ forma un dímero a pH ácido (<6.7) y exhibe efectos inhibitorios, el cual se une a F₁-ATPasa o F₀F₁-ATP sintasa formando un complejo 1:1, requiriendo la hidrólisis de dos moléculas de ATP. En presencia de Δp , la dirección de rotación del rotor se revierte, IF₁ se desprende y prosigue la síntesis de ATP. A pH básico (~8.0), IF₁ forma un tetrámero el cual no puede interaccionar con la ATP sintasa [73].

En bacterias, la subunidad ϵ inhibe la actividad ATPasa en forma dependiente de la concentración de ATP. La subunidad ϵ consiste de una hoja β rígida unida a la subunidad γ y al anillo c, y un dominio C-terminal α -helicoidal, el cual puede unir ATP [74], [75]. Cuando la concentración de ATP es muy baja en la célula bacteriana, el ATP se libera de la subunidad ϵ . El dominio C-terminal con estructura α -helicoidal de la subunidad sufre un cambio conformacional para adoptar una forma extendida, incrustándose en una cavidad formada entre la subunidad γ , una subunidad β y una subunidad α , impidiendo la rotación de F₁ y por tanto la actividad hidrolítica [71]. La afinidad de unión a ATP para *Bacillus PS3* es de 4.3 μ M [75], 2.3 mM para *B. subtilis* [76] y 22 mM para *E. coli* [75]; por lo tanto, la concentración requerida de ATP para inducir el estado no inhibitorio difiere considerablemente entre especies [71].

Inhibición exógena

Péptidos

Existen varios hongos fitopatógenos conocidos por secretar compuestos tóxicos que afectan el crecimiento de la planta hospedera. *Alternaria tenuis* causa clorosis en semillas de algunas plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, aunque no se ha encontrado relación entre sensibilidad a la toxina y cualquier criterio taxonómico [77], [78]. La toxina responsable de esta enfermedad se identificó como tentoxina, la cual causa la inhibición de la F₁-ATP sintasa cloroplástica a concentraciones tan bajas como 0.4 μ M. No obstante, no muestra efecto sobre las enzimas homólogas bacterianas y mitocondriales.

Otros péptidos inhibidores son las efrapeptinas. Éstos son producidos por especies como *Tolyposcladium*, que son hongos de suelo, algunos de los cuales son patógenos de insectos mientras otros existen como saprófitos [79]. A pesar de que se conocen sus propiedades insecticidas y probablemente antifúngicas, se desconoce sobre la producción de estos compuestos *in vitro* y su significancia ecológica [79]. Las efrapeptinas inhiben la fotofosforilación en plantas y bacterias, y la fosforilación oxidativa en mitocondria y en algunas bacterias. Las efraptinas se unen al sector F_1 de bovino con una K_d de aproximadamente 10 nM. La inhibición por el péptido en hidrólisis de ATP en estado estacionario no se ve afectada por la competición con ATP, mientras que la inhibición de la síntesis de ATP en estado estacionario en F_1F_0 -ATP sintasa es competitiva con ADP o fosfato. La tasa de asociación de efrapeptina con F_1 -ATPasa no se ve afectada por altas concentraciones de ADP, pero disminuye en presencia de fosfato [80]. La estructura cristalográfica de F_1 bovina unida a efrapeptina ha sido resuelta con una resolución de 3.1 Å [80]. El péptido interacciona con residuos de las subunidades α_E , α_{TP} , β_E y γ de forma hidrofóbica (Figura 8).

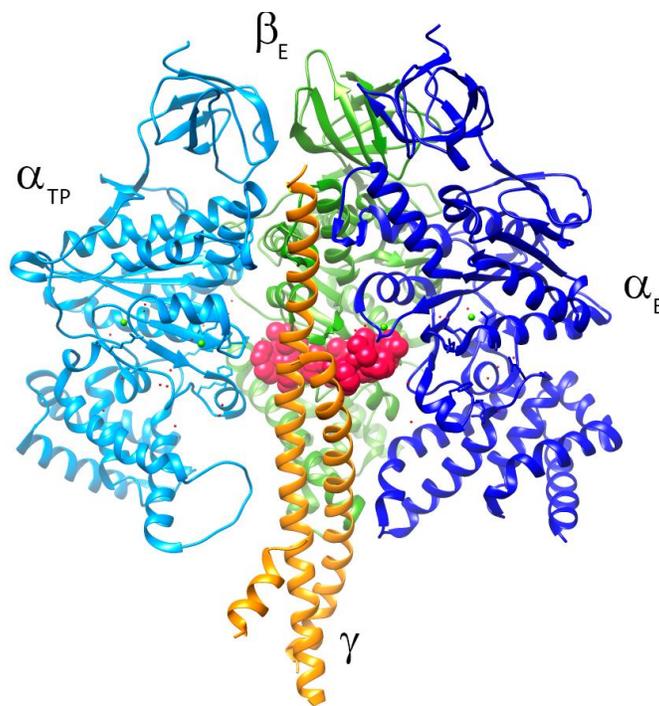


Figura 8. Sitio de unión a Efrapeptina. En color azul claro (izquierda) se representa la subunidad α_E , en color azul fuerte (derecha) se representa a la subunidad α_{TP} , en color verde (superior) se representa la subunidad β_E y en color naranja se representa a la subunidad γ . En color rosa y en representación de esferas (centro) se representa a la efrapeptina. (pdb:1EFR)

Los residuos más importantes para la unión son β_E -F326, β_E -D352, β_E -D356, β_E -D350, β_E -L317, β_E -F155, β_E -L329, β_E -T322, β_E -T354, α_E -Q349, α_E -F351, α_E -G348, α_E -S370, α_E -S372, α_E -A331, α_E -G332, α_E -D333, α_E -S335, α_E -V334, α_E -L369, α_E -I343, α_{TP} -R171, α_{TP} -Y358, α_{TP} -T354, α_{TP} -Q172, γ -F250, γ -Y7 y γ -K14

[80]. Las mutaciones α -G₃₄₈D, α -S₃₇₀F y α -S₃₇₂F debilitan la unión con el inhibidor [81], [82]. El residuo α _{TP}-R₁₇₁ ocupa la segunda posición en el bucle P que ayuda a unir nucleótidos. Se forma un puente de hidrógeno entre el residuo β _E-D₃₁₅ y el ácido aminoisobutírico-12 de la efrapeptina [80].

Moléculas pequeñas

Algunos compuestos pequeños que inhiben a la ATP sintasa son: 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazol (NBD-Cl), azida de sodio (NaN₃), Fluoruro de aluminio (AlFx), Fluoruro de escandio (ScFx), y Fluoruro de berilio (BeFx) [34], [38]. Antibióticos naturales como la aurovertina y polifenoles como el resveratrol, piceatanol, quercetina, morina, epicatequina, son inhibidores adicionales de la ATP sintasa [34]. Se ha puesto mucha atención en los polifenoles debido a su ocurrencia natural, compatibilidad con el sistema humano y disponibilidad. Éstos se encuentran de forma natural, aunque también hay sintéticos y semisintéticos, caracterizados por la presencia de unidades estructurales uni y multifenólicas. Algunos polifenoles son conocidos por bloquear la acción de enzimas y otras sustancias que promueven el crecimiento de células cancerosas [34], [83]–[85].

Aurovertina

Las aurovertinas son una familia de antibióticos aislados del hongo *Calcarisporium arbuscula*, químicamente consisten de un anillo pirona sustituido unido por un espaciador rígido que contiene dobles enlaces conjugados a un anillo variablemente sustituido dioxabicyclo (3,2,1) octano o aglicona.

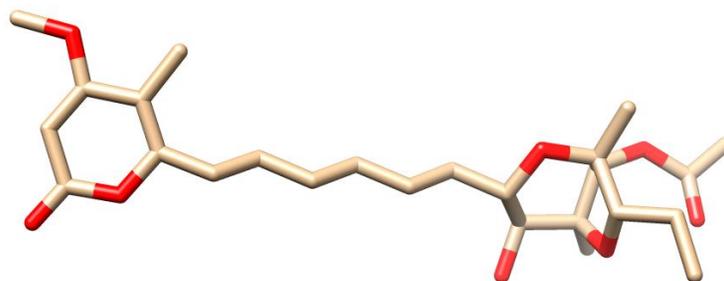


Figura 9. Estructura química de la aurovertina B.

Las aurovertinas pertenecientes a esta familia se identifican con las letras que van de la A a la E. Estos antibióticos bloquean la fosforilación oxidativa en la mitocondria y en varias bacterias. Especies como *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli*, *Paracoccus denitrificans*,

Rhodospirillum rubrum, *Rhodopseudomonas capsulata* y *Rhodopseudomonas sphaeroides* han sido reportadas como sensibles a aurovertina D. Sin embargo, se han aislado mutantes de *E. coli* resistentes a aurovertina, pero aún sensibles a otros inhibidores [81]. Estos antibióticos se unen a las subunidades β de la ATP sintasa, inhibiendo tanto la síntesis como la hidrólisis. El mecanismo de inhibición de esta familia de antibióticos es de tipo acompetitivo, ya que únicamente se unen al complejo enzima-sustrato, lo que resulta en la disminución de la constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$). Las constantes de disociación aparente (K_d) para el complejo aurovertina con el sector F_1 de *E. coli* son de 0.9 μM para aurovertina D y 2.0 μM para aurovertina B [38]. Estos valores son mayores que aquellos reportados para F_1 mitocondrial bovina, los cuales van de 0.03 a 1.4 μM [81]. Otros autores reportan que la aurovertina B inhibe al 50% la actividad de F_1 de *E. coli* a 1 μM y se disocia de la subunidad β aislada con una K_d entre 3-6 μM [82].

La estructura cristalina de la F_1 -ATPasa de bovino inhibida por aurovertina B se encuentra resuelta a 3.1 Å [86]. Este inhibidor se une a las subunidades β_E y β_{TP} , en sitios de unión casi idénticos. Los sitios de unión en estas subunidades se encuentran en una hendidura entre el dominio de unión a nucleótidos y el carboxilo terminal, sin traslape con los sitios de unión a nucleótidos (Figura 10). Tanto en β_E y β_{TP} , la aurovertina se une con su espaciador rígido de enlaces dobles conjugados casi de forma paralela a la interface con las subunidades α adyacentes, pero con una ligera inclinación de tal manera que el anillo pirona proyecta hacia la región interfacial. El anillo pirona está cerca de α_{TP} en la interface α_{TP}/β_{TP} , pero en la interface α_E/β_{TP} las subunidades están muy alejadas, lo cual evita que se forme una interacción equivalente entre α_E y el anillo pirona que se proyecta desde β_E [86].

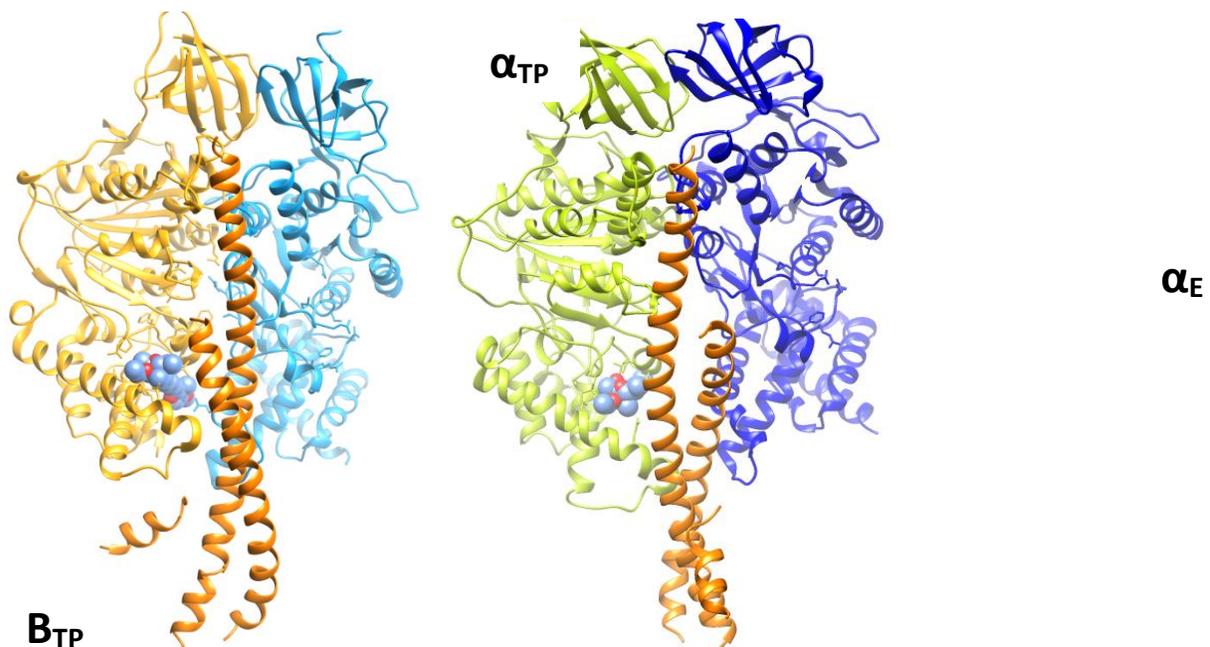


Figura 10. Sitios de unión a aurovertina. El lado izquierdo muestra la subunidad α_{TP} en azul claro, en naranja se muestra la subunidad α_E y en representación de esferas azules y rojas se tiene a la aurovertina. En el lado derecho se muestra la subunidad β_{TP} en azul claro, la subunidad β_E en verde, la subunidad α_E se muestra en naranja y en representación de esferas azules y rojas se tiene a la aurovertina. (pdb:1COW).

Polifenoles

Los polifenoles son una clase estructural de compuestos orgánicos naturales y sintéticos caracterizados por la presencia de múltiples unidades fenólicas. El número y características de estas estructuras fenólicas definen las propiedades físicas, químicas y biológicas de los miembros de esta clase [84]. Las estructuras cristalinas de la F1-ATPasa inhibida por resveratrol, quercetina y piceatanol fueron resueltas a 2.3 Å, 2.4 Å y 2.7 Å, respectivamente [83]. Los tres inhibidores se unen en el mismo sitio, el cual está formado entre las interfaces de las subunidades β_{TP} , α_{DP} y γ (Figura 12).

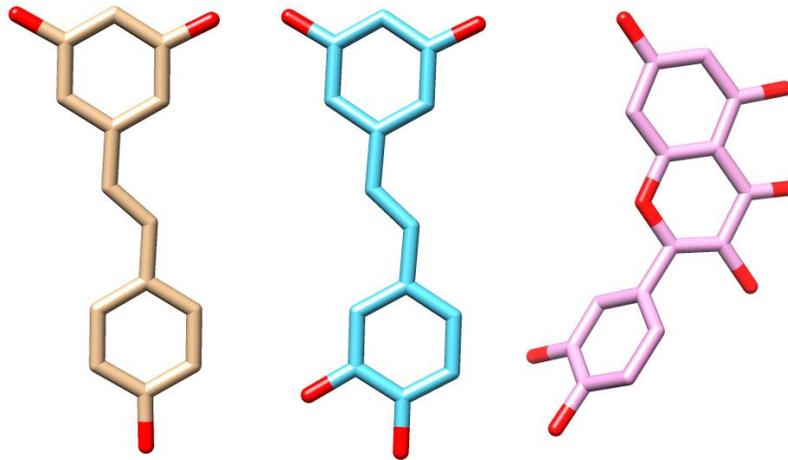


Figura 11. Estructura química de (izquierda a derecha) resveratrol, piceatanol y quercetina.

La potencia inhibitoria de resveratrol para la F_0F_1 -ATP sintasa mitocondrial es 6.4 μM , para piceatanol se tiene una potencia inhibitoria de 6.1 μM y para quercetina de 27 μM [83]. Se ha reportado que los polifenoles se unen en un “pocket” entre la punta hidrofóbica de la región C-terminal de la subunidad γ y el interior hidrofóbico del anillo circundante[80]. El anillo está formado de regiones asa entre las hélices E y F y entre la hélice G y la hebra β 7 en la subunidad β y las asas equivalentes en la subunidad α . No existe un sitio equivalente entre la subunidad γ y β_E o β_{DP} .

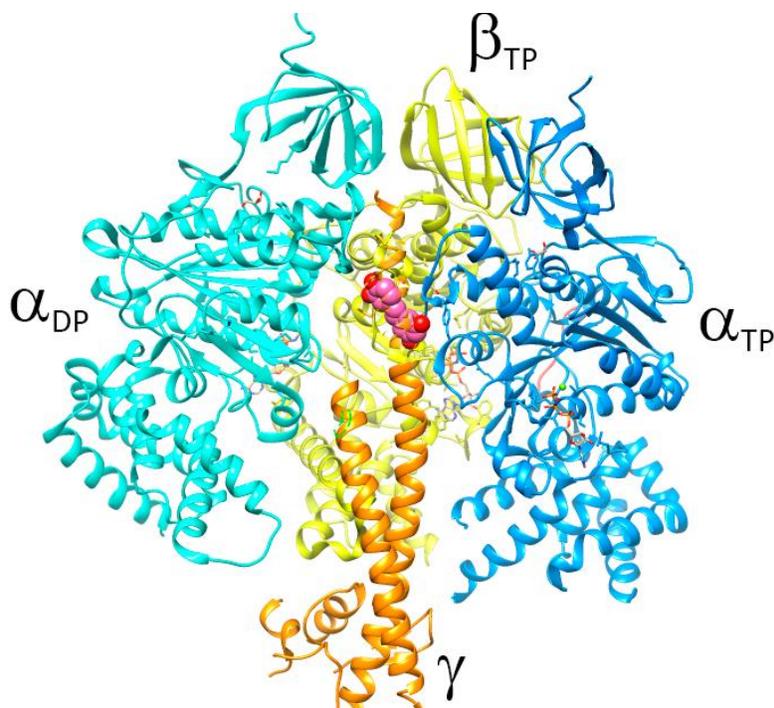


Figura 12. Sitio de unión a polifenoles. La subunidad α_{DP} se representa en turquesa (izquierda), la subunidad α_{TP} se representa en color azul fuerte (derecha), la subunidad β_{TP} se representa con color verde claro (superior), la subunidad γ se representa en naranja. El polifenol se representa en esferas rosas y rojas. (pdb:2JIZ)

El efecto de la unión de resveratrol, quercetina o piceatanol entre la punta de la subunidad δ y la región del interior de la superficie del anillo provisto por la subunidad β_{TP} , es bloquear el soporte y así prevenir la rotación del tallo central. Tanto la hidrólisis como la síntesis de ATP son inhibidas por resveratrol. La quercetina previene la hidrólisis de ATP, pero no la síntesis [80].

Bedaquilina

La bedaquilina (TMC207, Sirturo™) es un miembro de la clase de fármacos anti-tuberculosis diarilquinolina, aprobada por la US FDA, siendo el primer fármaco desarrollado para el tratamiento de TB en más de 40 años [87], [88]. Este fármaco ha mostrado eficacia prometedora contra la TB sensible y resistente a antibióticos, y tiene un potencial notable para disminuir la duración del tratamiento de TB debido al hecho de que es bactericida tanto para bacilos replicantes como no replicantes. Estudios computacionales y biológicos han mostrado que hasta dos moléculas de bedaquilina se unen al anillo rotatorio de subunidades *c* [89], [90]. Este fármaco ha mostrado bioquímicamente que interfiere con el movimiento rotatorio de la *subunidad c* al imitar un residuo básico conservado R_{186} en la *subunidad a* necesario para la transferencia de protones con E_{61} de la *subunidad c*.

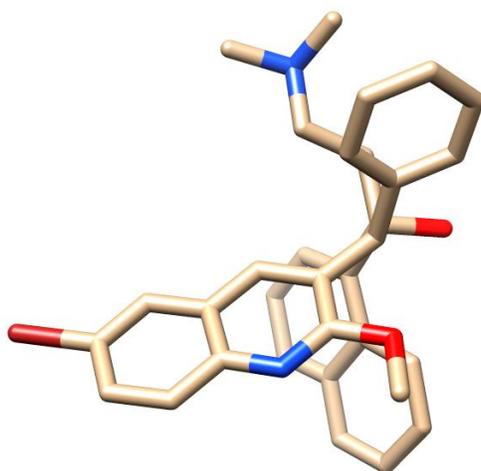


Figura 13. Estructura química de la bedaquilina.

A través de un detallado estudio computacional, de Jonge y colegas [90] reportaron que la subestructura quiral de N,N-dimetilpropanol de bedaquilina exhibe formación de puente de hidrógeno con la cadena lateral carboxilato de E₆₁, y una locación favorable de subestructura de quinolina en la interface de las subunidades a y c que podría llevar a un bloqueo de la rotación del anillo rotatorio, y por ende, interferir con el proceso de cascada de transferencia de protones. Aunque la bedaquilina muestra alta potencia sobre un gran número de especies micobacteriales, no muestra actividad significativa sobre el crecimiento de bacteria patogénicas no micobacteriales. en términos de susceptibilidad a antibacterianos usados actualmente, las micobacterias son muy distintas de otras bacterias Gram-positivas o Gram-negativas. Por otro lado, *in vitro* varias especies micobacteriales son naturalmente resistentes a bedaquilina, por ejemplo *M. novocastrense*, *M. shimoidei* y *M. xenopi* [88]. La habilidad de las diarilquinolinas para erradicar la biopelícula *S. aureus* no sólo sugirió un rol vital de la proteína objetivo en bacterias presentes en biopelículas, sino también muestra el potencial clínico de nuevos inhibidores [91]–[93]. Se ha determinado que la concentración mínima inhibitoria (MIC) va de 0.002-0.06 µg/mL y presenta una MIC₅₀ de 0.03 µg/mL. Además, los valores IC₅₀ se han reportado entre 20 y 25 nM, lo cual es un buen indicador de una unión fuerte [92], [94].

En la estructura cristalina obtenida para el complejo F_o-bedaquilina (4V1H), se observó que la molécula de bedaquilina cubre un área aproximada de 135 Å de la superficie del anillo c (Figura 14). La interacción más importante con el anillo c está formada por el grupo N,N-dimetilanilina, el cual penetra hasta el sitio de unión a iones, en donde forma un puente de H específico con el grupo carboxilo de E₆₅ a una distancia de 2.5 Å [92].

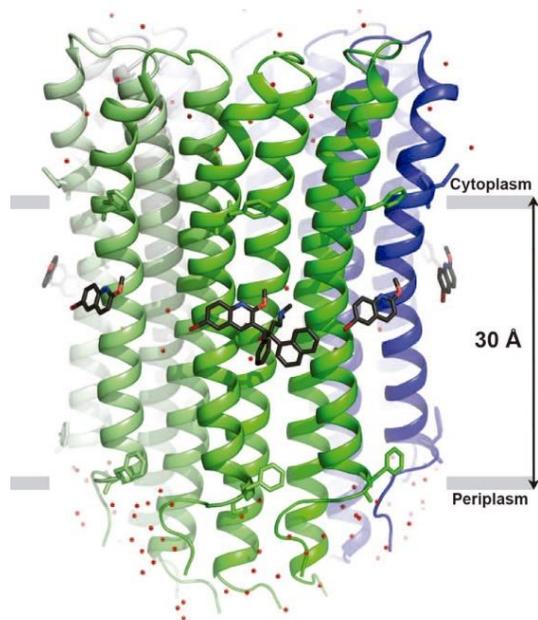


Figura 14. Sitio de unión a bedaquilina. Las subunidades c se muestran en tonos verdes y azules. El inhibidor se muestra en "sticks" negros (centro). Tomada de [92]

La interacción entre E₆₅ y DMA se asemeja a la interacción del glutamato coordinador de iones con la R altamente conservada en la *subunidad a*. Dicha conformación imita un estado de transición en el proceso de traslocación de protones, en el cual una *subunidad c* pasa la interfase rotor-estator, por lo que la bedaquilina atrapa a la enzima en dicho estado, bloqueando la rotación del anillo c [92]. Aunque el agotamiento rápido de ATP ocurre inmediatamente con la exposición a la bedaquilina, la acción antibacteriana se retrasa varios días, aparentemente como resultado de la utilización de fuentes alternativas de energía y rutas metabólicas tales como la glucólisis [88], [95]. Se ha propuesto que el modo de acción bactericida, al menos en el caso de *M. smegmatis*, resulta del colapso del gradiente de pH transmembranal y la disipación de la pmf, lo cual es letal para la micobacteria [96].

Diseño de fármacos

El entendimiento teórico de las interacciones entre proteínas y sus ligandos es de alta importancia en la búsqueda de nuevos fármacos. En el campo del diseño de fármacos basado en la estructura existen tres metas globales. Dadas las estructuras de un inhibidor y su diana, la primera consiste en predecir correctamente el sitio de unión sobre la diana, la orientación del ligando, y la conformación de ambos. La segunda es categorizar los compuestos de acuerdo con sus afinidades de unión experimentales, dadas las estructuras de una macromolécula objetivo y un conjunto de ligandos putativos. La tercera es generar una lista de inhibidores plausibles para su caracterización experimental. Estas tres metas están ligadas: las energías de unión predichas o sus puntuaciones de pseudo-energía de una

serie de compuestos no pueden ser obtenidas sin predecir primero su orientación de unión [97].

La unión de una molécula pequeña a un sitio de unión definido es un balance complejo compuesto de diferentes partes que colectivamente dan lugar a la energía libre de unión. Esta energía tiene componentes entrópicos y entálpicos, además, tiene que existir una ruta cinéticamente accesible por la cual el estado unido pueda ser alcanzado, la cual también tiene componentes entrópicos y entálpicos. El proceso que lleva a una unión exitosa se denomina reconocimiento molecular. El reconocimiento molecular efectivo, en su forma más simple, es esencialmente el emparejamiento de las propiedades superficiales de un ligando con su “pocket” de unión a través de complementariedad de forma y propiedades electrónicas tales como carga e hidrofobicidad [98].

La elección de un blanco farmacológico se realiza principalmente sobre bases biológicas y bioquímicas. La meta al desarrollar un fármaco contra macromoléculas de organismos patógenos es su total inhibición, llevando a la muerte del patógeno sin afectar al hospedero. Los blancos farmacológicos deben ser esenciales: ser parte de un ciclo crucial o llevar una función crítica; tener una función única en el patógeno: no debe existir algún otro sistema que reemplace la función de la macromolécula inhibida; estar presentes sólo en el patógeno y por último deben ser inhibidas por una molécula pequeña [99]. El desarrollo de varias herramientas moleculares y la disponibilidad de recursos computacionales de alto rendimiento hacen posible un análisis computacional detallado, exhaustivo y masivo, así mismo permite ofrecer una ruta para el diseño de modelos más confiables para complejos receptor-ligando, siempre que existan modelos estructurales adecuados del receptor [100]. Las estructuras cristalinas de alta resolución son la fuente más común de información estructural para el desarrollo de fármacos. Una de las ventajas de la cristalografía es que las moléculas de agua ordenadas son visibles y generalmente son útiles en el diseño de fármacos. Típicamente, las estructuras cristalinas determinadas con datos extendiéndose hasta más allá de 2.5 Å son aceptables porque los residuos en el mapa de densidad electrónica son inequívocos. Los factores R y R_{free} reportados para un modelo son medidas de la correlación entre el modelo y los datos experimentales. El valor R_{free} debe estar por debajo de 28% e idealmente menor de 25%, y el factor R debe encontrarse por debajo de 25% para poder usar la estructura en el diseño de fármacos [99].

Planteamiento del problema

La proliferación de microorganismos resistentes es un problema creciente que requiere de acciones correctivas inmediatas. El desarrollo de nuevos antibióticos se ha desacelerado de manera alarmante a causa de factores económicos y políticas restrictivas. Una de las alternativas que se proponen para resolver este problema es el diseñar fármacos que actúen sobre una enzima importante en el metabolismo y cuya modificación tenga un costo

funcional para el patógeno. Una de las enzimas clave del metabolismo es la F_0F_1 -ATP sintasa. A pesar del gran interés que se ha tenido por modular la función de esta enzima, su potencial como blanco farmacológico no ha sido explotado de manera sistemática. El presente trabajo pretende explorar el potencial farmacológico de la F_0F_1 -ATP sintasa utilizando distintas herramientas bioinformáticas. Para ello, se estudiarán sitios de inhibición utilizados por la naturaleza con el fin de encontrar diferencias en las secuencias y/o estructuras de patógenos con respecto al humano. Dichas diferencias puedan ser usadas para el desarrollo de fármacos especie-específicos.

Hipótesis

La ATP sintasa es una proteína fundamental para el funcionamiento celular. Existen sitios accesibles a eventuales fármacos en la ATP sintasa distintos al sitio catalítico, cuya estereoquímica en organismos patógenos muestran diferencias relevantes con respecto a la de humano. Estas zonas son blancos farmacológicos que pueden ser explotados para el desarrollo de moléculas orgánicas capaces de inhibir de forma especie-específica la actividad catalítica de la enzima mediante el bloqueo del mecanismo rotatorio.

Objetivo general

Identificar zonas en la estructura de la ATP sintasa que sirvan como punto de partida para diseñar moléculas que potencialmente puedan ser utilizados para la inhibición farmacológica específica de la enzima de organismos patógenos.

Objetivos particulares

1. Mediante análisis comparativo de grupos taxonómicos que presentan organismos patógenos a humanos, determinar el grado de variabilidad de la secuencia primaria de las subunidades dinámicas de la ATP sintasa.
2. Determinar si existen diferencias estereoquímicas entre los sitios de unión a inhibidores exógenos de la ATP sintasa de diferentes especies con respecto a la de humano.
3. Realizar una selección de los organismos patógenos cuya ATP sintasa presenta mayor diferencia estereoquímica con respecto a la enzima de humano, con el fin de eventualmente caracterizar sus parámetros termodinámicos de unión con nucleótidos de adenosina, así como con inhibidores.

Capítulo 2. Metodología

Selección de grupos taxonómicos

Se realizó una búsqueda sistemática de microorganismos patógenos para humanos, utilizando la subunidad β como referencia, en la base de datos UniProt [101]–[104] (revisada en octubre 2016). Seleccionamos grupos taxonómicos que contuviesen microorganismos patógenos y se seleccionó aquella división que contuviera a todos los microorganismos relacionados. Posteriormente se realizó un árbol filogenético utilizando el programa bioinformático UGENE [105] (Apéndice A) y los grupos resultantes fueron plasmados en un diagrama con la ayuda de la aplicación informática DIA (0.97.2).

Selección de subunidades

Se seleccionaron las subunidades que presentan interacciones dinámicas durante el ciclo catalítico, siendo éstas las subunidades α , β , γ , *a* y *c*. Las interacciones de α , β y γ se observaron en la estructura cristalográfica de la F_1 -ATPasa mitocondrial de corazón de bovino (PDB:1COW) [80], el cual muestra a la subunidad β en tres conformaciones diferentes, las cuales interactúan de forma diferente con las subunidades α y γ . Se sabe que las *subunidades c* interactúan con las *subunidades a* durante el ciclo catalítico al translocar protones.

Búsqueda de secuencias

En la sección de búsqueda de la base de datos UniProt se utilizaron las siguientes palabras claves: name:atp name:synthase name:x name:subunit NOT "5 type" NOT putative NOT predicted NOT uncultured NOT candidatus taxonomy:y. El utilizar el prefijo "name:" se asegura que sólo busquen las entradas que contengan en el encabezado las palabras que lo anteceden. La letra x fue sustituida por alpha, beta, gamma, *a* y *c*. "NOT "5 type"" se utilizó para filtrar los resultados de ATP sintasas tipo V. "NOT putative" eliminó aquellas secuencias que no han sido validadas. "NOT predicted" filtró las entradas que contuviesen secuencias predichas. La letra y se sustituyó con los respectivos grupos taxonómicos en donde detectamos presencia de parásitos humanos. Adicionalmente, se hizo búsqueda para mammalia, con el fin de analizar secuencias de organismos filogenéticamente cercanos a humano.

Alineamiento de secuencias de grupos taxonómicos por subunidad

Después de reunir todas las secuencias, se realizó el alineamiento por subunidad por grupo taxonómico con la ayuda del programa bioinformático ClustalΩ [104], [106], [107], utilizando la configuración predeterminada. Posteriormente, se realizó el alineamiento por subunidad por grupo taxonómico tomando como referencia común la secuencia correspondiente de humano.

Determinación de identidad de grupos taxonómicos por subunidad

Usando ClustalΩ [104], [106], [107], también se calculó la matriz de identidad por cada subunidad por grupo taxonómico. Dicha matriz fue exportada a una hoja de cálculo del programa Excel. Para calcular la identidad por grupo se seleccionaron las celdas con las permutaciones correspondientes utilizando la fórmula "PROMEDIO=". Después se procedió a calcular la desviación estándar siguiendo el mismo procedimiento usando la fórmula "DESVEST=".

Para las identidades que tuvieron como base a la secuencia de humano, se seleccionó la primera columna utilizando la fórmula "PROMEDIO=". La desviación estándar fue calculada utilizando el procedimiento anterior con la fórmula "DESVEST=". Los gráficos fueron realizados con el programa Origin [108].

Selección de microorganismos

Con el fin de realizar una comparación puntual de la estereoquímica de los sitios de unión de inhibidores de la ATP sintasa de humano y de patógenos relevantes, se utilizó la lista de Enfermedades de Declaración Obligatoria, creada por la Organización Mundial de la Salud [109]. De esta lista se extrajeron la mayor cantidad de organismos posibles, excluyendo virus y priones.

Determinación de identidad respecto al humano por subunidad

Después de recolectar las secuencias de los organismos seleccionados, se realizaron los alineamientos y la matriz de identidad usando ClustalΩ [104], [106], [107], de manera similar a lo realizado con los grupos taxonómicos.

Comparación con estructuras cristalográficas con la enzima en presencia de inhibidor

Se seleccionaron estructuras cristalinas de F₁-ATPasa de bovino cocrystalizadas con el inhibidor aurovertina B (PDB:1COW); con resveratrol, quercetina y piceatanol (PDB: 2JJ2, 2JJ1, respectivamente), con efrapeptina (PDB:1EFR) y el anillo c cocrystalizado con bedaquilina (PDB:4V1H). Utilizando el programa de visualización interactiva y análisis molecular estructural UCSF Chimera [110], [111] se cargó el archivo .pdb correspondiente. Después, se seleccionó el inhibidor mediante la secuencia de comandos *Select>Residue>Inhibitor*. Luego, usando los comandos *Select>Zone...><8.0 angstroms from currently selected atoms*, se seleccionaron los residuos hasta 8 Å de distancia del inhibidor. Después se utilizaron los comandos *Select>Invert (all models)* y *Actions>Atoms/bonds>Hide* y *Actions>Ribbon>Hide*, con el fin de ocultar todos aquellos residuos que se encontrasen después de 8 Å de distancia y así mejorar la visualización.

A partir de dicha selección, se identificaron los residuos base para realizar nuevos alineamientos con las secuencias a 4 y 8 Å utilizando los microorganismos seleccionados de la lista de Enfermedades de Declaración Obligatoria [109]: Para el caso de la aurovertina, se identificaron que los residuos con numeración basada en el cristal 1COW de la subunidad β_{TP}: 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 385, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 427, 453, 454, 455, 456, 457, 458 se encontraban hasta 4 Å del inhibidor. Posteriormente, se eligieron esos mismos residuos en el alineamiento previo con las secuencias de patógenos, los gaps fueron eliminados para crear una nueva secuencia, la cual fue alineada.

Manualmente se calculó la identidad de cada residuo, tomando como base la secuencia de humano. La identidad se obtuvo asignando un valor de 1 a aquellos residuos que no se conservan y 0 a los conservados. Se utilizó la fórmula $I = \frac{n-x}{n} * 100$, donde I es el porcentaje de identidad, n es el número de secuencias analizadas, x es el número de residuos no conservados en una posición específica del alineamiento. Se creó una escala de colores de naranja a morado, cuyos valores varían de 0 a 100%.

En UCSF Chimera, nuevamente se seleccionó el inhibidor utilizando el comando descrito anteriormente para cambiar su estilo de representación con el comando *Actions>Atoms/Bonds>ball and stick*. Con el comando *Select>Zone...><4.0 angstroms from currently selected atoms* se seleccionaron los residuos que se encontrasen hasta 4 Å de distancia del inhibidor. Se deseleccionó el inhibidor para ejecutar los pasos siguientes. Se usó el comando *Actions>Surface>Show* y se utilizó una transparencia de 70% con el comando *Actions>Surface>transparency>70%*. Cada superficie de los residuos seleccionados fue coloreada de acuerdo con la escala de identidad creada. Posteriormente, con el comando *Select>Zone...>>4.0 angstroms from currently selected atoms* se seleccionaron los residuos que se encuentran de 4 a 8 Å de distancia del inhibidor. Tales

residuos fueron coloreados de acuerdo con su porcentaje de identidad. Los residuos que se encontraron hasta 4 Å de distancia se les agregó superficie para su fácil identificación. Luego, seleccionando el inhibidor y utilizando el comando *Tools>Structure Analysis>FindHBond* se buscaron los puentes de hidrógeno probables, marcando las casillas *Only find H-bonds with at least one end selected* y desmarcando las casillas *Include intramolecule H-bonds* e *Include intra-residue H-bonds*. Se agregaron las etiquetas con el comando *Actions>Label>residue>custom...* y eligiendo las opciones *1-letter code* y *number*. Todo el procedimiento se repitió con cada uno de los inhibidores.

Capítulo 3. Resultados y Discusión

Análisis comparativo de las subunidades dinámicas de la ATP sintasa

En este estudio buscamos explorar el potencial de la ATP sintasa como un blanco farmacológico especie específico. Uno de los requisitos básicos para el desarrollo de fármacos que distingan de manera eficaz entre el hospedero y el patógeno al cual se pretende atacar, es hacer uso de un blanco molecular que sea único al invasor, o bien que se trate de una molécula ortóloga con diferencias estereoquímicas significativas. Además, se requiere que el blanco sea crucial metabólicamente, de manera que su inhibición o perturbación funcional comprometa la supervivencia del patógeno. Sin duda, la segunda característica la cumple la ATP sintasa en el caso de un vasto número de patógenos aeróbicos humanos. No obstante, la posibilidad de que esta enzima pueda ser explotada para el desarrollo de fármacos especie específicos ha sido escasamente explorada. Para este fin, en un primer paso realizamos un análisis comparativo de las secuencias de humano con respecto a grupos taxonómicos que presenten especies patógenas. De las diferentes subunidades que componen a la ATP sintasa, restringimos el análisis a aquellas subunidades que presentan interfaces dinámicas a lo largo del ciclo catalítico, bajo la premisa de que la perturbación de la propagación de los cambios conformacionales de estas subunidades puede conducir al bloqueo del mecanismo rotatorio.

Base de datos de grupos taxonómicos

En un primer paso se realizó una búsqueda exhaustiva en la base de datos UniProt [101], [102] de secuencias de la subunidad β de especies relacionadas con patógenos de humano, con el fin de realizar agrupamientos taxonómicos. Dado que existe una gran variación en cuanto al número de secuencias disponibles en los diferentes grupos taxonómicos, se decidió descender en los casos poco representados hasta el nivel en donde quedarán agrupados al menos tres géneros diferentes cuyas subunidades β hayan sido secuenciadas. Una vez eliminadas las redundancias de secuencias para cada grupo, se llegó a la agrupación

taxonómica para patógenos del dominio bacteria y eukaryota, respectivamente, esquematizada en las Figuras 12 y 13.

Dominio Bacteria

Dentro del dominio bacteria (Figura 15), se encontraron los filos Proteobacteria y Spirochaetes, así como el supergrupo Terrabacteria. Todos los miembros del filo Proteobacteria tienen como característica ser Gram negativos. Dentro de este se encuentran las clases Alpha, Gamma y Epsilonbacterias.

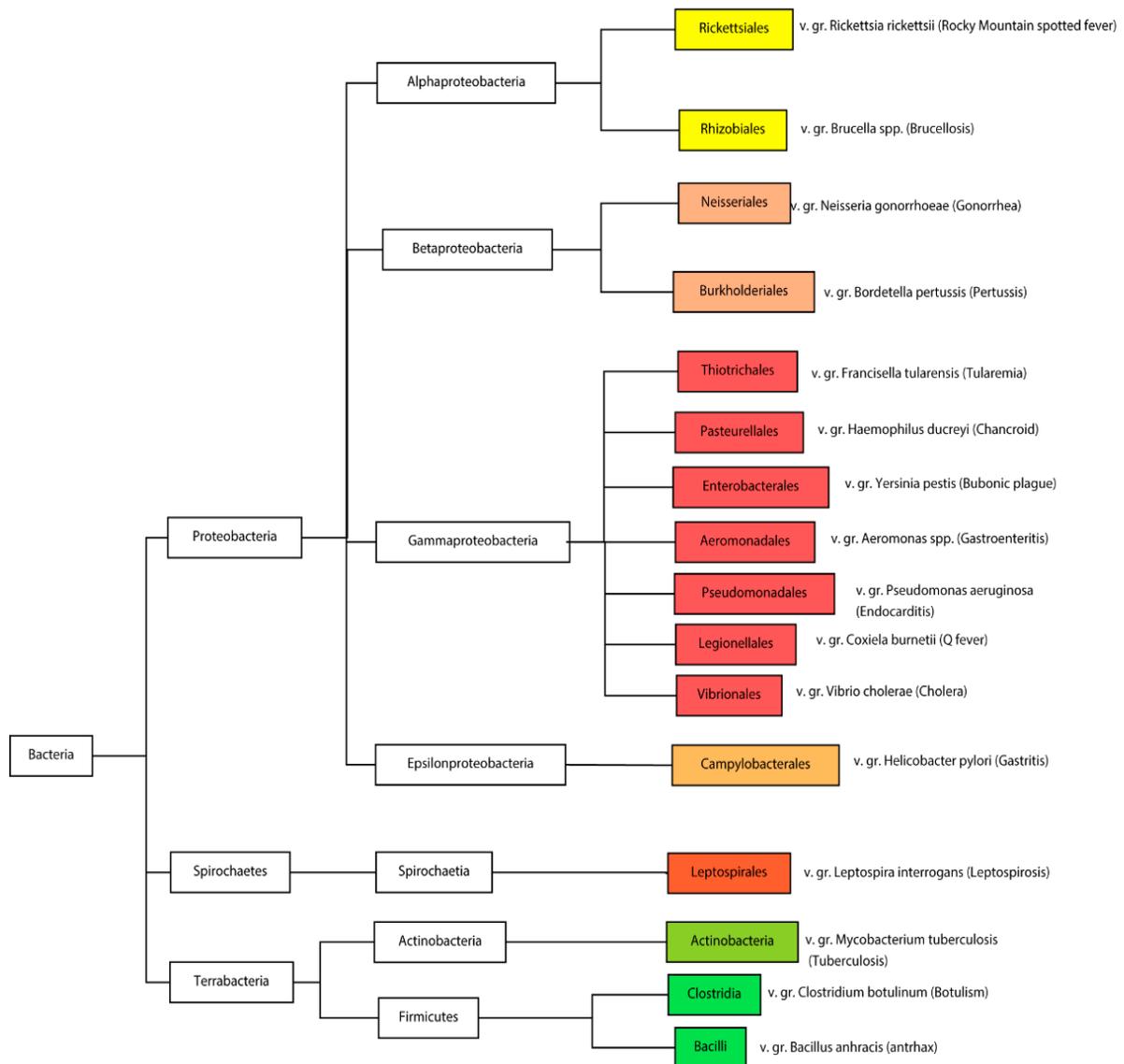


Figura 15. Esquema de la división taxonómica del dominio Bacteria. La división va en orden descendente: dominio-filo-clase-orden. Delante de cada orden se lista un ejemplo representativo de los patógenos que conforman dicha división.

Alphaproteobacteria

La clase Alphaproteobacteria contiene integrantes muy diversos, que poseen pocos aspectos comunes entre sí. Los integrantes parasitarios pueden ser Gram variables. Uno de los órdenes de esta clase es Rickettsiales, con notables patógenos del género *Rickettsia*. Microorganismos patógenos de este género son *Rickettsia rickettsii*, causante de fiebre de las Montañas Rocosas, *R. conorii*, causante de fiebre botonosa y *R. prowazekii*, causante de tifus exantemático epidémico. Otro de los órdenes de Alphaproteobacteria es Rhizobiales, cuyos miembros son fenotípicamente heterogéneos y son Gram-negativos, y contiene organismos patógenos como *Brucella melitensis*, causante de Brucelosis.

Betaproteobacteria

La clase Betaproteobacteria es un grupo de metabolismo variado. Está formado por varios grupos de bacterias aerobias o facultativas que a menudo son muy versátiles en sus capacidades de degradación. Ejemplos de especies patógenas dentro de este grupo son las pertenecientes al orden Neisseriales como *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis*, causantes de gonorrea y meningitis, respectivamente; los microorganismos patógenos pertenecientes al orden Burkholderiales son *Burkholderia mallei*, agente causal del muermo, y *B. cepacia*, causante frecuentemente de neumonía en pacientes con enfermedades debilitantes pulmonares como la fibrosis quística o inmunocomprometidos.

Gammaproteobacteria

La clase con mayor número de secuencias reportadas fue Gammaproteobacteria [112]. Esta clase se dividió en siete órdenes. El orden Thiotrichales es morfológica, metabólica y ecológicamente diverso, incluye parásitos intracelulares obligados, como *Francisella tularensis*, causante de tularemia [113]. El orden Pseudomonadales, la cual presenta patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, causante de neumonía, choque séptico, infecciones del tracto urinario y gastrointestinal. El siguiente orden es Aeromonadales. Algunas de sus especies son patógenos primarios u oportunistas de humanos y animales de sangre fría y de sangre caliente, siendo *Aeromonas hydrophila* un organismo representativo, el cual es causante de gastroenteritis; en personas con el sistema inmune comprometido puede llegar a causar mionecrosis y dermatitis. Otro orden es Enterobacteriales, que son bacterias que forman parte de la microbiota del intestino y de otros órganos humanos y de animales; algunas de estas especies pueden ser patógenas, por ejemplo: *Salmonella enterica*, causante de salmonelosis, *Escherichia coli*, causante de gastroenteritis, infecciones de tracto urinario, meningitis neonatal, colitis hemorrágica y enfermedad de Chron, *Yersinia pestis*, causante de plaga bubónica, *Klebsiella pneumoniae* causante de neumonía, infecciones del tracto urinario, septicemia, meningitis, diarrea e infecciones de tejidos blandos. El orden sucesivo es Legionelales, que incluye patógenos como *Coxiella burnetii* y *Legionella pneumophila*, causantes de fiebre Q y legionelosis, respectivamente. Otro orden es Pasteurellales, la mayoría de sus miembros viven como

comensales sobre las superficies mucosas de aves y mamíferos, especialmente en el tracto respiratorio superior. Dos de sus miembros patógenos mejor conocidos son *Haemophilus influenzae* y *H. ducreyi*. El primero causa bacteriemia, neumonía, epiglotitis y meningitis bacteriana aguda, mientras el segundo miembro es el causante de chancros. El último orden es Vibrionales. Estos microorganismos habitan agua dulce y salada, con varias especies patogénicas, incluyendo a *Vibrio cholerae*, causante de cólera, *V. parahemolyticus*, causante de gastroenteritis y *V. vulnificus*, causante de sepsis [112].

Epsilonproteobacteria

La clase Epsilonproteobacteria contiene el orden Campylobacterales, cuyos miembros suelen habitar el tracto digestivo de seres humanos y animales, actúan como simbioses o patógenos. Dos microorganismos patógenos característicos de este grupo son *Helicobacter pylori*, causante de gastritis, úlceras y que se ha asociado a cáncer gástrico; y *Campylobacter hyointestinalis*, causante de gastroenteritis y diarrea [113].

Spirochaetes

El segundo filo de bacteria identificado fue Spirochaetes, el cual está conformado por bacterias Gram negativas con filamentos axiales. Son organismos quimioheterótrofos, la mayoría anaerobios. El orden Leptospirales contiene a *Leptospira interrogans*, causante de leptospirosis y *Borrelia burgdorferi*, causante de la enfermedad de Lyme [114].

Terrabacteria

En el supergrupo Terrabacteria se identificaron dos filos con organismos patógenos: Actinobacteria y Firmicutes. Generalmente los miembros de ambos filos son Gram positivos, con algunas excepciones. Los miembros de Actinobacteria son de gran importancia económica, ya que los bosques y la agricultura dependen de su contribución a los sistemas edafológicos. Sin embargo, también existen microorganismos patogénicos, principalmente en el orden Actinobacteria, que cuenta con microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis*, causante de tuberculosis, *Corynebacterium diphtheriae*, causante de difteria, *Nocardia brasiliensis*, causante de nocardiosis, y *Rhodococcus equi*, causante de neumonía en pacientes inmunocomprometidos [115]. Respecto a Firmicutes, todos sus miembros poseen una pared celular rígida y contienen ácido murámico en ésta, mientras que algunos contienen ácido teicoico. Son aerobios facultativos o anaerobios estrictos, incluso termófilos y/o halófilos. Este filo presenta dos órdenes de gran importancia, Clostridia y Bacilli. Los integrantes patógenos de Clostridia incluyen a *Clostridium botulinum*, causante de botulismo, mientras el orden Bacilli incluye a *Staphylococcus aureus*, causante de

infecciones dérmicas, infecciones respiratorias como sinusitis e intoxicación alimentaria [116].

Dominio Eukaryota

En el dominio Eukaryota se encuentran los filos Euglenozoa y Alveolata, así como los supergrupos Amoebozoa y Opisthokonta (Figura 16).

Amoebozoa

La mayoría de los microorganismos componentes del supergrupo Amoebozoa son unicelulares. Habitan el suelo y ambientes acuáticos. Son heterótrofos, alimentándose por fagocitosis de bacterias, protozoos o materia orgánica muerta. Algunos se encuentran en simbiosis con otros organismos, mientras que otros son patógenos. Aquí se descendió a la clase Dyciosteliida, contenida en el infrafilum Mycetozoa, en donde se encuentran patógenos como *Ballamuthia mandrillaris*, que es una ameba de vida libre conocida por causar encefalitis granulomatosa amebiana. Especies del género *Acanthamoeba*, por ejemplo, *A. castellani*, pueden causar encefalitis y queratitis amébrica [117].

Euglenozoa

El filo Euglenozoa contiene organismos flagelados que incluyen importantes parásitos, algunos de los cuales infectan humanos. La clase Kinetoplastida contiene el orden Trypanosomatidae. Un miembro de dicho orden es *Leishmania mexicana*, cuyas especies miembros son responsables de producir leishmaniasis. Estos parásitos utilizan los flebótomos como vectores [118]. Otra especie es *Trypanosoma cruzi*, causante del mal de Chagas.

Alveolata

Los miembros del grupo Alveolata comprenden organismos fotosintéticos, heterótrofos de vida libre o parásitos, que se caracterizan por la presencia de alvéolos corticales, de los cuales existen tres filos principales: Ciliophora, Apicomplexa y Dinoflagellata. El análisis fue realizado solamente en el filo Apicomplexa, dada la escasez de secuencias reportadas para los otros dos filos. Entre los microorganismos apicomplejos pertenecientes a la clase Aconoidasida se encuentran los *Plasmodium*, causantes de enfermedades muy graves en humanos. Al igual que con el género *Leishmania*, el género *Plasmodium* utiliza un mosquito como vector, ejemplos de estos parásitos son *P. falciparum* y *P. vivax*, causantes de malaria. *P. malariae* y *P. ovale* causan una variante de malaria menos agresiva [119], [120]. Además,

el orden Conoidasida contiene el género *Cryptosporidium*, que tiene miembros que provocan enfermedades gastrointestinales e infecciones en el tracto respiratorio.

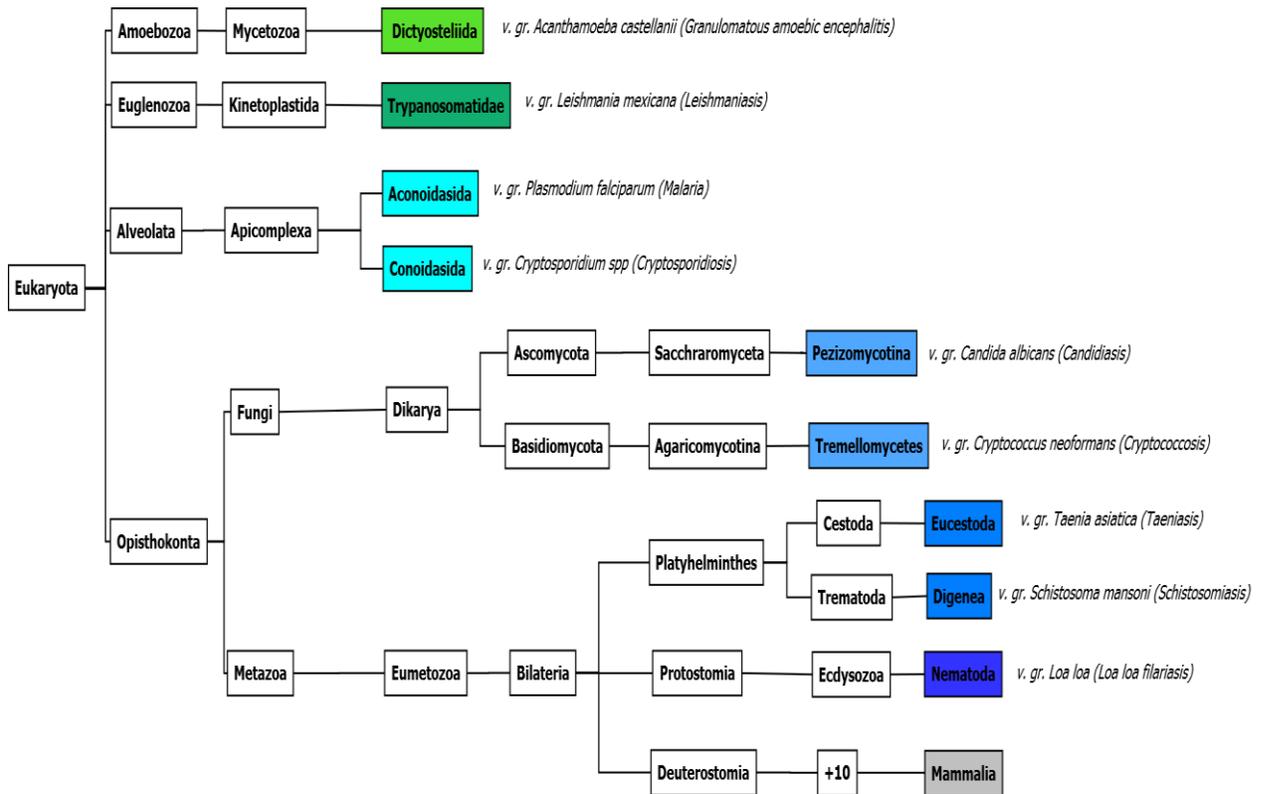


Figura 16. Esquema de la división taxonómica del dominio Eukaryota. La división va en orden descendente hasta llegar a subclase. Delante de cada orden se lista un ejemplo representativo de los patógenos que conforman dicha división.

Opisthokonta

Dentro del supergrupo Opisthokonta, se localiza el reino Fungi, subreino Dikarya. Este subreino contiene las divisiones Ascomycota y Basidiomycota [121]. La división Ascomycota comprende la subdivisión Pezizomycotina. Esta subdivisión tiene gran relevancia para los humanos como fuente de antibióticos [122], así como aplicaciones industriales, agrícolas y alimenticias [123], aunque también presenta patógenos de plantas y animales [124], [125]. La candidiasis es una infección causada por diversas especies del género *Candida*, especialmente *C. albicans* [126]. La aspergilosis es el nombre dado a una amplia variedad de enfermedades causadas por infecciones fúngicas del género *Aspergillus*. La mayoría de los casos ocurren en personas con tuberculosis o enfermedad de obstrucción pulmonar crónica y con personas inmunocomprometidas. La división Basidiomycota contiene a la subdivisión Agaricomycotina, la cual a su vez contiene a la clase Tremellomycetes, que presenta microorganismos patógenos como *Cryptococcus neoformans*, que causa criptococosis.

Platyhelminthes

Los Platyhelminthes, pertenecientes al reino Metazoa, subreino Eumetozoa, clado bilateria, son un filo de animales invertebrados no segmentados. Para realizar los análisis, se utilizaron las subclases Eucestoda y Digenea, pertenecientes a las clases Cestoda y Trematoda. Los tremátodos y céstodos son de gran importancia médica y económica ya que cuentan con especies parasitarias muy difundidas. Estos parásitos requieren varios huéspedes, unos para el estado larvario y otros para el estado adulto [127]. Un ejemplo de estos patógenos pertenecientes a la subclase Eucestoda es *Taenia solium*, causante de cisticercosis. Un ejemplo de parásito de la subclase Digenea es *Schistosoma mansoni*, causante de esquistosomiasis.

Nematoda

El filo Nematoda, perteneciente al clado Bilateria, Protostomia, superfilo Ecdysozoa, presenta vermes pseudocelomados esencialmente acuáticos, aunque también se pueden encontrar en ambientes terrestres. Existen especies de vida libre, así como parásitos de plantas [128] y animales, incluido el ser humano [129]. La especie *Trichinella spiralis* infecta ratas, cerdos y humanos, siendo responsable de la enfermedad triquinosis, la cual ocasiona diarrea, dolor muscular y articular [130]. La especie *Wuchereria bancrofti* causa filariasis linfática, también conocida como elefantiasis, que ocasiona un agrandamiento progresivo de extremidades o genitales, acompañado de aspereza, arruga, fisuras de la piel y el tejido subcutáneo. La especie *Ascaris lumbricoides* provoca ascariasis, que puede causar dolor abdominal agudo y obstrucción intestinal, lo que puede ocasionar malabsorción y anorexia [129].

Variación de identidad entre grupos taxonómicos de las subunidades dinámicas de la ATP sintasa

Durante la síntesis o hidrólisis de ATP, las subunidades α , β , γ , a y c sufren cíclicamente diferentes cambios estructurales de extensión variable. Las subunidades β experimentan los cambios más marcados, debido a que esta subunidad transita por tres conformaciones en la que el dominio carboxilo terminal presenta desplazamientos mayores a 20 Å. Cada conformación establece contactos diferentes con las subunidades α y γ adyacentes. Por otro lado, las subunidades a y c en el sector F_0 presentan cambios conformacionales internos más discretos que acompañan la rotación del anillo c ocasionada por el paso de protones a través de dichas subunidades. Tal rotación impulsa a la subunidad γ , cuya interacción con la subunidad β causa los cambios conformacionales mencionados. Estas interacciones son dinámicas, se forman y rompen dependiendo de la posición en la que se encuentre el ciclo catalítico. Por tanto, en principio sería posible bloquear en algún punto

del ciclo rotatorio los cambios conformacionales a través de la interacción con moléculas tipo fármaco, provocando así la inhibición de la enzima. De hecho, los inhibidores endógenos, como IF1 y la subunidad ϵ , así como exógenos como aurovertina, polifenoles y efrapentina, se unen a cavidades formadas transitoriamente en puntos específicos del ciclo rotatorio.

Con el fin de realizar un análisis comparativo del grado de conservación de subunidades dinámicas de la ATP sintasa ortólogas de los grupos taxonómicos presentados en las Figuras 15 y 16, para cada subunidad se efectuó una búsqueda en la base de datos UniProt [101], [102] utilizando las palabras claves *name:atp name:synthase name:x name:subunit taxonomy:z* (siendo *x* y *z* el nombre de la subunidad y el grupo taxonómico, respectivamente). Se omitieron los resultados de secuencias putativas, predichas, ATPasas tipo V, así como las secuencias duplicadas de un mismo organismo. El número mínimo de secuencias utilizadas para cada grupo fue de 3, con el fin de poder calcular la desviación estándar. Se efectuaron dos alineamientos, uno de ellos para evaluar la identidad intragrupal, y otro tomando como referencia a la subunidad respectiva de humano para conocer las diferencias con respecto a ésta. Los alineamientos fueron realizados utilizando el programa bioinformático Clustal Ω [104], [106], [107].

Conservación intragrupo taxonómico de subunidades dinámicas.

Se ha encontrado que la estructura primaria de la subunidad β está altamente conservada a través de la evolución, por lo que ha sido tomado como un marcador macromolecular para deducir relaciones filogenéticas [62], [131]. Cuando se analizó la subunidad β completa (Figura 17), se observó que presentó, en general, una alta conservación dentro de cada grupo taxonómico, con un promedio de identidad global de $83\pm 8\%$. Además del grupo de referencia Mammalia, que presentó la mayor identidad interna promedio ($95\pm 4\%$), los grupos taxonómicos que mayor conservación presentaron fueron Pasteurellales ($94\pm 2\%$), Trypanosomatidae ($93\pm 2\%$), y Digenea ($92\pm 2\%$). En cambio, los grupos taxonómicos con menor identidad fueron Actinobacteria ($72\pm 7\%$), Rickettsiales ($72\pm 4\%$) y Dyctiosteliida ($64\pm 8\%$), consistente con una menor variación para organismos multicelulares que para unicelulares.

La subunidad α también se encuentra altamente conservada dentro de los grupos taxonómicos estudiados, con un valor ligeramente menor que aquel encontrado para la subunidad β (identidad promedio de $80\pm 11\%$). Para esta subunidad, no se encontraron secuencias reportadas para el grupo taxonómico Trypanosomatidae. Los grupos taxonómicos que presentaron la mayor identidad fueron Digenea ($95\pm 1\%$), Eucestoda ($94\pm 2\%$) y Pasteurellales ($89\pm 3\%$), mientras que los grupos con menor identidad fueron Aconoidasida ($64\pm 11\%$), Rickettsiales ($62\pm 4\%$) y Dyctiosteliida ($53\pm 7\%$). La subunidad α de los grupos Digenea y Eucestoda resultaron con una conservación ligeramente mayor

respecto a la de su subunidad β correspondiente. Cabe recalcar que el grupo taxonómico Dyclosteliida tuvo la menor conservación en ambas subunidades. Nuevamente, el grupo de referencia Mammalia presentó el mayor grado de conservación ($96\pm 4\%$).

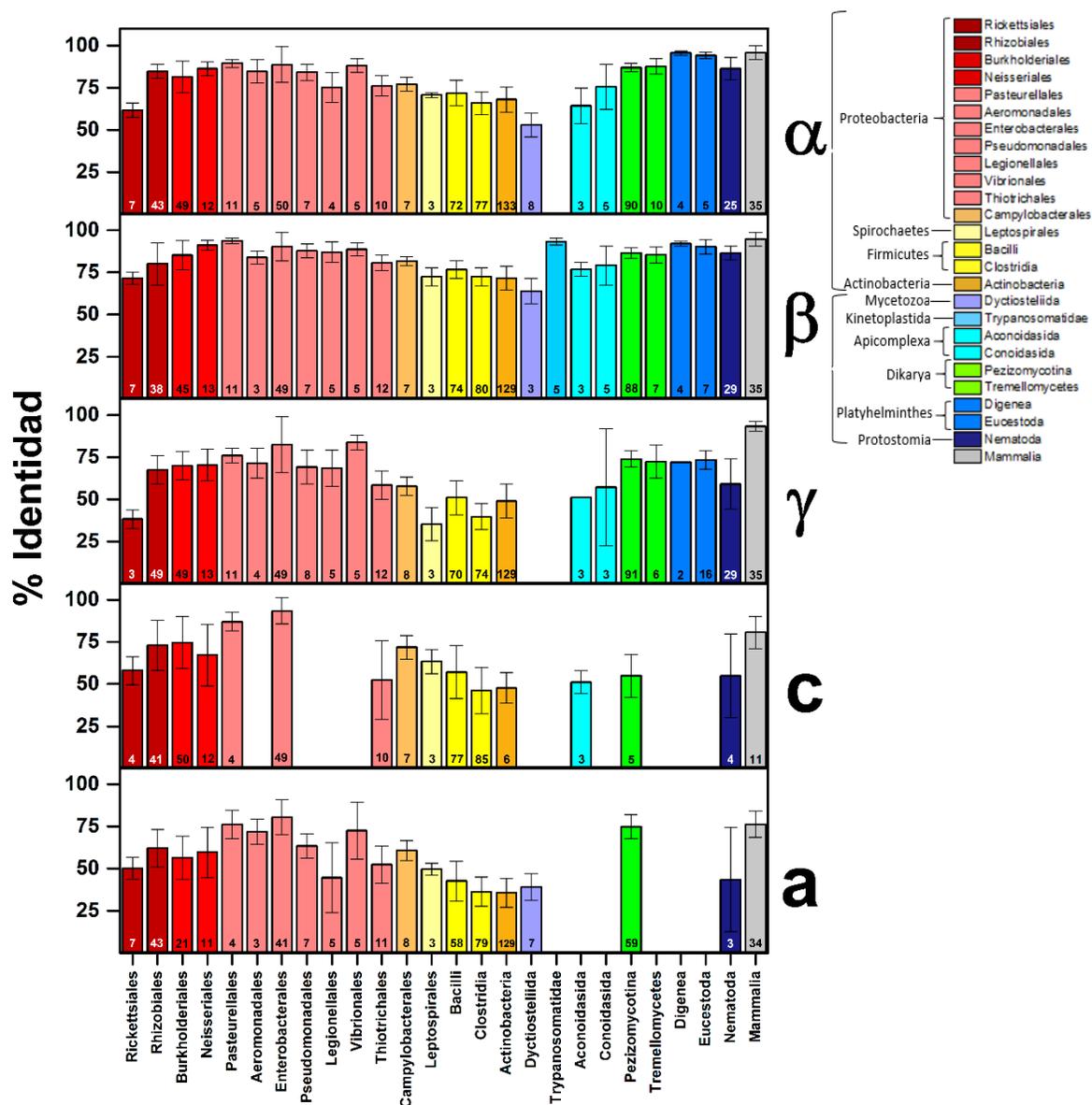


Figura 17. Porcentaje de identidades intragrupal de las subunidades dinámicas de la ATP sintasa. El color de las barras va de acuerdo con la clasificación taxonómica. Los números dentro de las barras corresponden a las secuencias utilizadas en cada grupo.

La identidad promedio intragrupal de la subunidad γ fue de $64\pm 15\%$, lo cual indica que el grado de conservación de esta subunidad es significativamente menor a la que presentan las subunidades α y β . Para esta subunidad no se encontraron secuencias reportadas en el

grupo taxonómico Trypanosomatidae, mientras que para Dyctiosteliida, Aconoidasida y Digenea sólo se detectaron dos secuencias, por lo cual fueron omitidas en este análisis. Los grupos taxonómicos que presentaron la mayor identidad fueron Vibrionales (84±4%), Enterobacteriales (82±17%) y Pasteurellales (76±4%). Los grupos que presentaron la menor identidad fueron Clostridia (40±8%), Rickettsiales (38±6%) y Leptospirales (35±10%). Aquí, el grupo de referencia presentó una conservación de 93±3%.

La *subunidad c* presentó variación de identidad similar entre grupos en comparación con la subunidad γ , con un promedio de identidad de 65±14%. En este caso, el número de secuencias reportadas es menor que el de las otras tres subunidades, no encontrándose ninguna secuencia para los grupos Aeromonadales, Legionellales, Dictyosteliida, Trypanosomatidae, Conoidasida, Tremellomycetes, Digenea y Eucestoda. Para los grupos Vibrionales y Pseudomonadales solamente se encontraron dos secuencias, por lo cual dichos grupos fueron excluidos de este análisis. El mayor porcentaje de identidad lo presentaron los grupos Enterobacteriales (93±8%), Pasteurellales (87±6%) y Campylobacteriales (72±7%). Los grupos taxonómicos con menor identidad fueron Aconoidasida (51±7), Actinobacteria (48±9) y Clostridia (46±14). El grupo de referencia Mammalia presentó una identidad de 81±9%.

La *subunidad a* fue la que presentó la menor identidad dentro de cada grupo (57±15%). Los grupos taxonómicos en los cuales no se obtuvieron secuencias fueron Trypanosomatidae, Aconoidasida, Conocidasida, Tremellomycetes, Digenea y Eucestoda. Los grupos taxonómicos con mayor identidad fueron Enterobacteriales (81±10%), Pasteurellales (76±9%) y Pezizomycotina (75±7%). Los grupos con menor identidad fueron Dyctiosteliida (39±8%), Clostridia (36±9%) y Actinobacteria (36±9%). El grupo de referencia Mammalia tuvo una identidad de 76±8%.

Conservación de subunidades dinámicas de grupos taxonómicos con respecto al humano

Posteriormente, se realizó un análisis de identidad para cada subunidad estudiada tomando como referencia a la secuencia respectiva de humano (Figura 18). Se observó que el promedio global de la identidad de la subunidad β de los diferentes grupos taxonómicos con respecto a la de humano fue de 72±7%, que es un valor menor al observado anteriormente para las variaciones intragrupal de esta subunidad. Como es de esperar, los grupos taxonómicos que presentaron mayor identidad respecto al humano fueron Nematoda (81±2%), Eucestoda (81±1%) y Digenea (81±1%). Los grupos que presentaron menor identidad fueron Vibrionales (68±2%), Trypanosomatidae (64±1%) y Actinobacteria (62±2%). El grupo Trypanosomatidae presentó una de las identidades más bajas respecto al humano, aunque su identidad fue alta de forma intragrupal. El grupo Pasteurellales presentó la identidad más alta al hacerse la comparación intragrupal, pero al realizarse utilizando la secuencia de humano como referencia, presentó un porcentaje de identidad

de 70 ± 1 . El grupo Actinobacteria presentó porcentajes de identidad bajos en ambos análisis. El grupo de referencia presentó una identidad de $96 \pm 3\%$.

Adicionalmente, se realizó el análisis de la conservación del sitio de unión a nucleótidos de la subunidad β , tomando como referencia a los residuos de humano. El porcentaje de identidad está mostrado en la Figura 18 en la sección de subunidad β , representado por barras color blanco. Dicho sitio mostró estar muy conservado con respecto al sitio de humano, con una identidad promedio de $98 \pm 3\%$. Esto recalca la importancia de buscar sitios de unión distintos a aquellos específicos para la unión de nucleótidos.

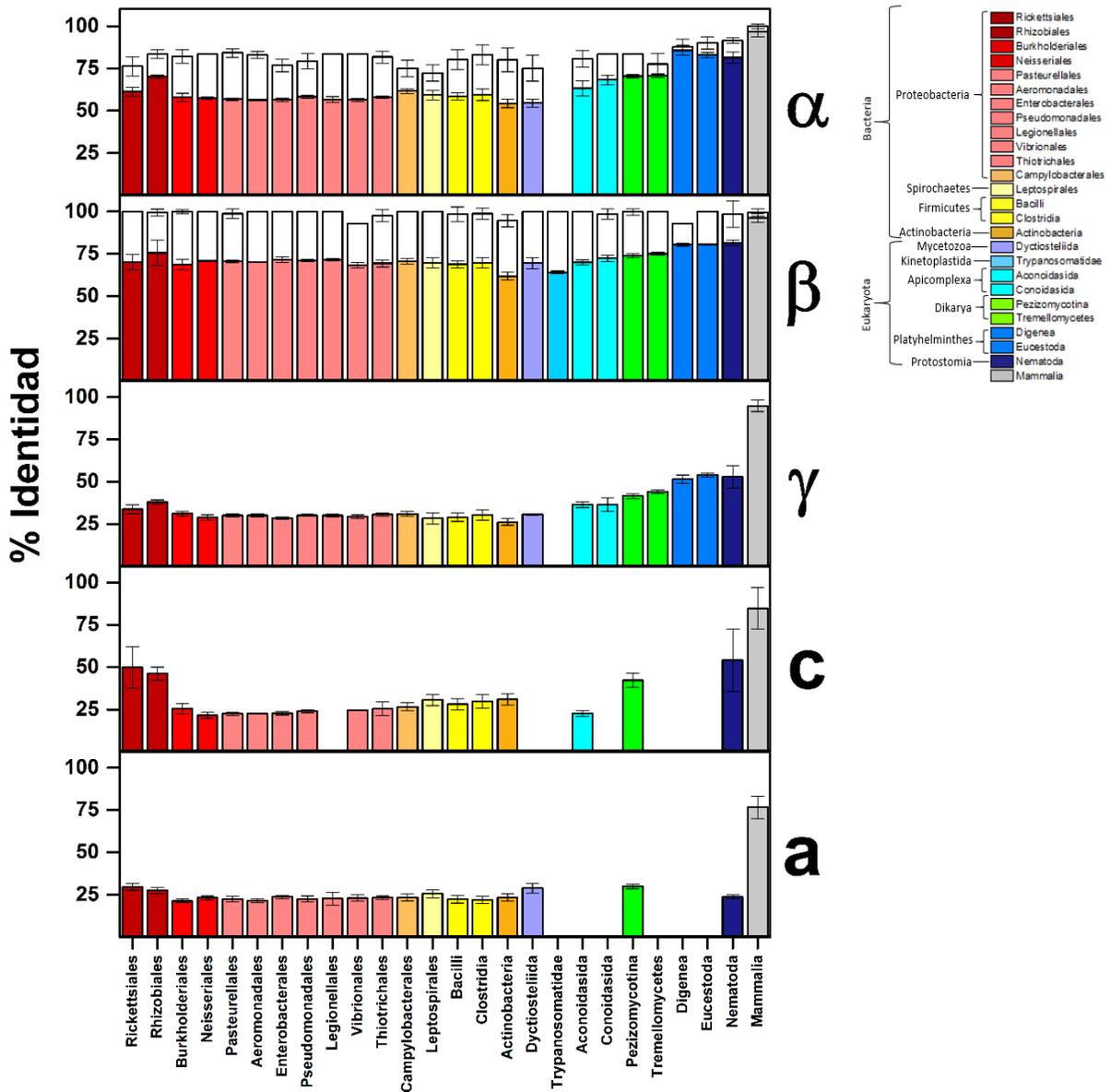


Figura 18. Identidad de secuencias de subunidades dinámicas de la ATP sintasa por grupos taxonómicos respecto al humano. El color de las barras va de acuerdo con la clasificación taxonómica. Las barras blancas en las subunidades α y β corresponden al promedio de identidad de su respectivo sitio de unión al nucleótido con respecto al de humano.

Para la subunidad α , se encontró que la identidad promedio respecto al humano fue de $64\pm 11\%$. Este valor es menor en comparación con el obtenido para las subunidades α y β de forma intragrupal y de la subunidad β con respecto al humano. Los grupos taxonómicos que presentaron mayor identidad fueron Digenea ($86\pm 3\%$), Eucestoda ($83\pm 1\%$) y Nematoda ($81\pm 3\%$). Los grupos con menor identidad fueron Aeromonadales ($56\pm 0\%$), Dyctiosteliida ($54\pm 2\%$) y Actinobacteria (54 ± 3). Los grupos Digenea y Eucestoda presentaron las identidades más altas en ambos análisis. El grupo Mammalia tuvo una identidad promedio de $97\pm 3\%$. Al comparar el sitio de unión a nucleótidos de la subunidad α tomando como referencia al sitio de unión a nucleótidos de la subunidad α de humano (Figura 18, barras blancas), se encontró que la identidad global promedio de dicho sitio fue de $82\pm 6\%$. Es interesante recalcar que, aunque las subunidades α y β unen nucleótidos, la subunidad α presenta menos residuos conservados para hacerlo en comparación con la subunidad β ($99\pm 2\%$).

Para la subunidad γ , el promedio general de esta subunidad con respecto a la de humano fue de $37\pm 14\%$, que es casi la mitad del valor obtenido para la identidad intragrupal. En comparación con las subunidades α y β , se observó que esta subunidad presentó mucho mayor variabilidad. Los grupos taxonómicos con mayor identidad en la subunidad γ fueron Eucestoda ($54\pm 1\%$), Nematoda ($53\pm 7\%$), y Digenea ($44\pm 1\%$). Los grupos taxonómicos con menor identidad fueron Enterobacterales ($28\pm 1\%$), Leptospirales ($28\pm 3\%$) y Actinobacteria ($26\pm 2\%$). El grupo Mammalia tuvo una identidad de $95\pm 3\%$.

Para la subunidad c , se encontró que el promedio de identidad respecto al humano fue de $33\pm 16\%$, ligeramente menor que el observado para la subunidad γ . En general, los porcentajes de identidad de la subunidad c respecto al humano son mucho menores que los calculados para el análisis intragrupal. Los grupos taxonómicos con mayor identidad fueron Nematoda ($54\pm 18\%$), Rickettsiales ($50\pm 12\%$) y Pezizomycotina ($42\pm 4\%$). Los grupos taxonómicos con menor identidad fueron Enterobacterales ($23\pm 1\%$), Aconoidasida ($23\pm 2\%$) y Pasteurellales ($22\pm 1\%$). El grupo de referencia presentó una identidad de $85\pm 12\%$.

Finalmente, la identidad de la subunidad a respecto al humano fue menor a la obtenida anteriormente de forma intragrupal, siendo el valor promedio de $27\pm 12\%$. Los porcentajes de identidad más altos fueron para los grupos taxonómicos Pezizomycotina ($30\pm 1\%$), Rickettsiales ($29\pm 2\%$), Dyctiosteliida ($29\pm 3\%$). Los grupos con menor identidad fueron Clostridia ($22\pm 2\%$), Aeromonadales ($21\pm 1\%$) y Burkholderia (21 ± 1). El grupo Mammalia tuvo una identidad de $76\pm 7\%$.

De entre las cinco subunidades de características dinámicas, la subunidad β presentó el mayor grado de conservación de secuencia primaria entre los distintos grupos taxonómicos aquí analizados. Esta subunidad contiene la mayor parte de los residuos que conforman los sitios catalíticos de la enzima, lo cual podría ser una de las causas de su alta conservación, ya que algún cambio podría afectar desde la unión hasta la catálisis [132]. Se observó que los residuos que componen dicha maquinaria catalítica se encuentran aún más conservados que la secuencia global. Debido a que el sitio catalítico está tan conservado, y a su vez se

encuentra presente en otras enzimas que hidrolizan ATP [62], el diseño de un fármaco que se una a tal sitio de un microorganismo patógeno carecería totalmente de especificidad. Por otro lado, una zona de la subunidad β de particular interés es el bucle DELSEED. El bucle DELSEED es un motivo hélice-vuelta-hélice localizado en el dominio C-terminal cuya función propuesta es el acoplamiento entre la catálisis y la rotación [133]. Se calculó que el promedio global de identidad del bucle DELSEED con respecto al humano fue de $87\pm 5\%$ (Figura 19). Dicho valor de identidad es mayor que el calculado anteriormente para la subunidad β completa. No obstante, es de hacer notar que estudios mutacionales han mostrado que reemplazos en la secuencia DELSEED no afectan de manera importante la actividad ATPasa del sector F_1 [64], [134].

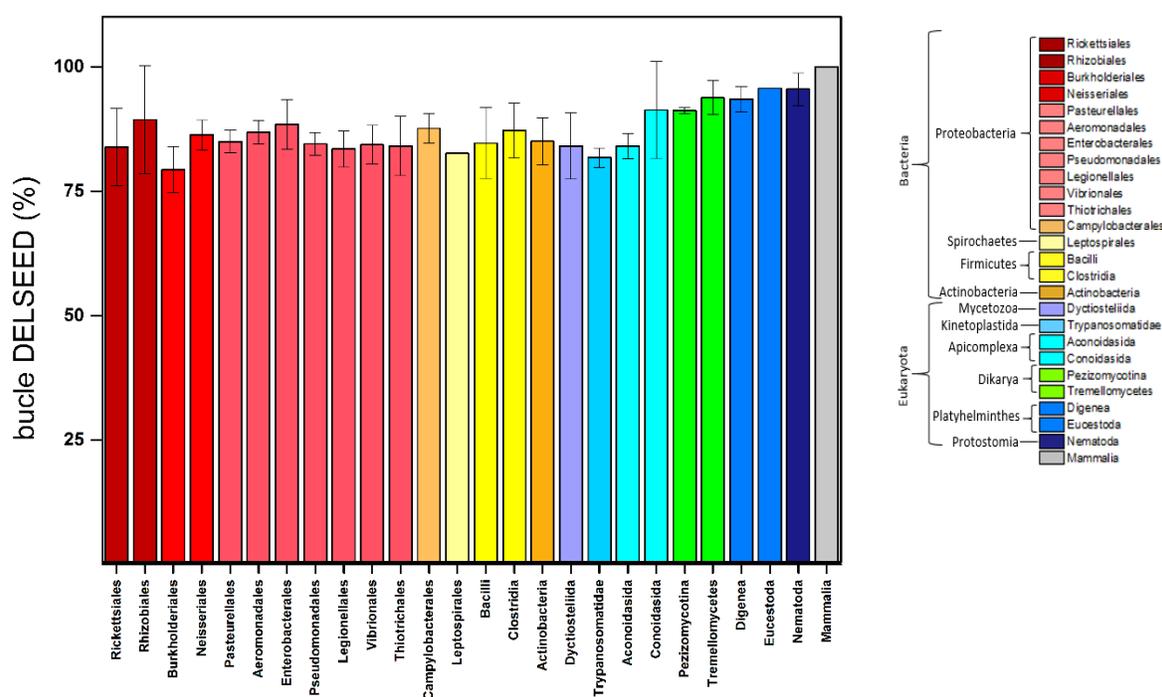


Figura 19. Porcentajes de identidad del bucle DELSEED de la subunidad β con respecto al humano.

A partir del análisis de la identidad intragrupal, se observó que la subunidad α está ligeramente menos conservada que la subunidad β . Una posible explicación para la menor conservación de dicha subunidad podría ser que la presión evolutiva a la que se ha sometido es menor. En general, ambas subunidades de origen filogenético común [135] presentan una arquitectura casi idéntica, comparten mecanismos de unión a nucleótidos así como energías de interacción proteína-ligando [43], [136]. Hasta el momento, no se conoce claramente el papel funcional que tiene la unión a nucleótidos a las subunidades α en el ciclo catalítico, aunque se han propuesto varias explicaciones. Se ha reportado que la unión de nucleótidos a los sitios no catalíticos de MF_1 y TF_1 promueve la disociación de $MgADP$

inhibitorio de un sitio catalítico y estimula la catálisis en estado estacionario en niveles óptimos [137]–[139]. Otros estudios de mutaciones aleatorias en EF₁ ayudaron a identificar una región de transmisión de señal en la subunidad α que parece amplificar un cambio conformacional en el dedo de R inducido por el estado de transición, permitiendo una comunicación de largo alcance con otra subunidad β [139], [140]. Esta información se complementa con estudios de dinámica molecular que mostraron que la subunidad α al unirse a nucleótidos presenta un incremento en las fluctuaciones estructurales, particularmente en el dominio C-terminal, lo cual permite que éste tenga conformaciones cercanas a aquellas de β_{TP} [61].

Recientemente se ha encontrado que la subunidad α de *M. tuberculosis* posee una extensión única de 36 residuos al final del C-terminal (514-549, numeración de *M. tuberculosis*), la cual no está presente en subunidades α de otras especies. Se ha propuesto que la función de dicho fragmento es la supresión de la función de hidrólisis en la enzima micobacteriana [141]. Esto sugiere que a pesar de que la subunidad α se encuentra muy conservada, aún se pueden encontrar zonas que sean únicas para cierta especie las cuales podrían ser explotadas para inhibir a la ATP sintasa.

La subunidad γ presentó menor conservación en comparación con las subunidades anteriores. Esta menor conservación concuerda con estudios mutacionales que indican que esta subunidad no requiere formar contactos específicos con las subunidades catalíticas, sino que solamente se necesita que existan residuos que por efectos estéricos propulsen y generen cambios conformacionales en las subunidades catalíticas [64], [133]. Por tanto, sólo se requeriría conservar la estructura tridimensional y contar con los aminoácidos correctos en la hélice corta que contacten el motivo β -DELSEED. El que se haya encontrado una menor identidad en esta subunidad podría ser una ventaja al momento de buscar sitios de inhibición especie-específicos.

Se ha reportado que los residuos altamente conservados se encuentran localizados en las regiones superior y central de la subunidad γ , las cuales tienen contacto con las subunidades α y β [142]. Para las subunidades α y β se ha reportado que los residuos que miran hacia la subunidad γ están altamente conservados, y dichas zonas se encuentran flanqueadas por residuos poco conservados [142]. Se analizaron las identidades de las zonas de la subunidad γ que contactan a las regiones altamente conservadas en las subunidades α y β (Figura 20). La primera zona analizada es la que contacta al bucle DELSEED de la subunidad β , a la cual denominamos leva, compuesta por los residuos 98-115 (numeración basada en humano) [64]. La identidad de esta zona por grupo taxonómico con respecto al humano se muestra en el recuadro superior de la Figura 20. El porcentaje de identidad global de la leva es de 39%, valor prácticamente idéntico al de la subunidad completa (37%). Se ha observado que la zona de la leva no presenta interacciones residuo específicas de tipo electrostático, lo que sugiere que la generación de torque no necesita de algún residuo esencial [143]. Por otro lado, la mutación γ_{G101A} demostró que este residuo es esencial para formar la estructura de la subunidad γ requerida para la interacción estable con el anillo α/β [64]. La

otra zona analizada fue la que comprende los residuos 253-298, a la cual denominamos zona embebida, que corresponde a la región C-terminal de la subunidad γ . Esta zona presenta una identidad de 62% (recuadro inferior de la Figura 20), el cual es un valor mayor en comparación a la secuencia completa.

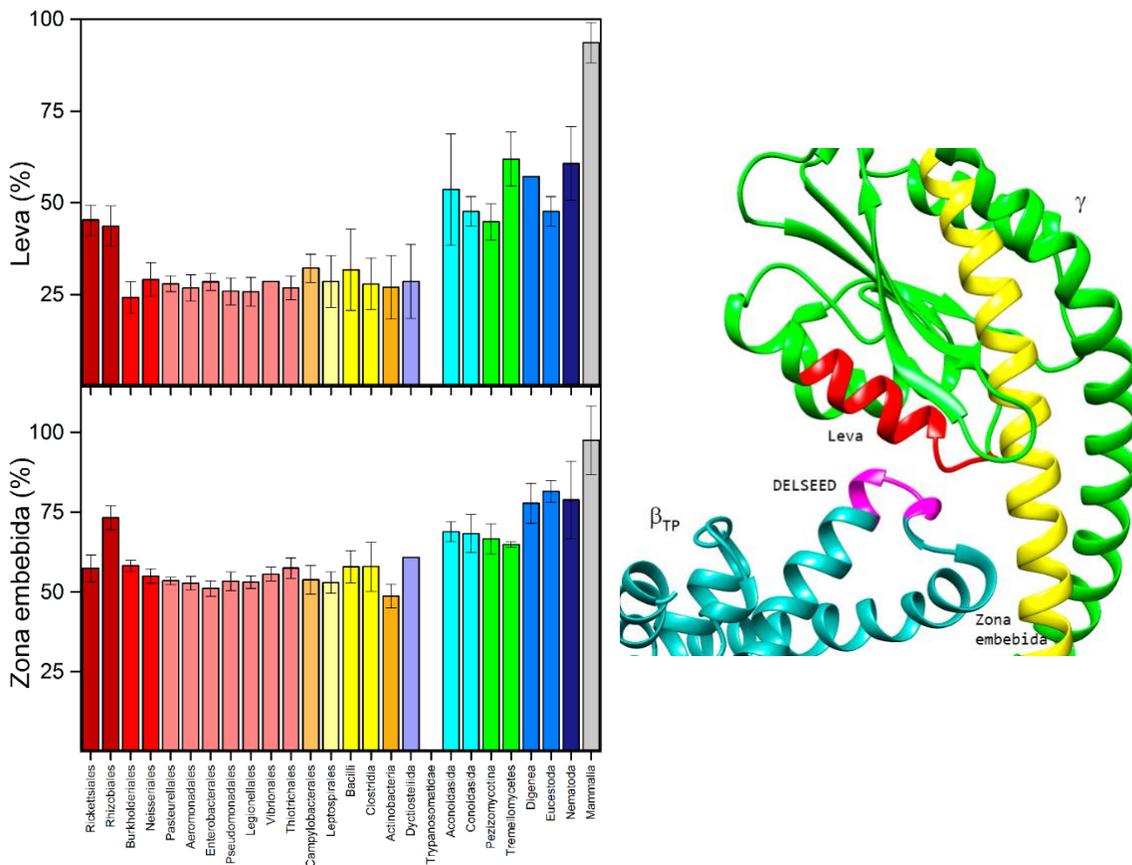


Figura 20. Porcentaje de identidad de zonas seleccionadas de la subunidad γ . La zona denominada leva (color rojo, recuadro derecho) comprende los residuos 89-115 y la zona embebida (color amarillo, recuadro derecho) comprende los residuos 253-298, ambas respecto con la numeración del humano.

La *subunidad c* presentó identidades similares a las obtenidas en la subunidad γ . Para diferentes especies se sabe que la estequiometría del anillo c varía entre 9 y 15 subunidades, dependiendo de los requerimientos energéticos de la especie. El tamaño del anillo c determina la cantidad de protones traslocados por rotación completa del sector F_0 [54], [55], [144]–[149]. En eucariotes, la hélice interna de cada *subunidad c* aloja el motivo altamente conservado constituido por cuatro residuos de glicina (GXGXGXG, donde X es cualquier residuo), el cual confiere un fuerte empaquetamiento transmembranal hélice α , sin espacio para cadenas laterales. Algunos microorganismos termófilos en ambientes alcalinos, presentan este motivo reemplazado por (AXAXAXA). Esta sustitución de residuos aumenta tanto la estequiometría del anillo c y su tamaño debido al estiramiento de la secuencia de residuos de la hélice N-terminal [149], [150]. Los porcentajes de identidad para

esta subunidad sugieren que tolera muchos cambios en su estructura primaria, pero mantiene estructura y función. Sólo los residuos que están involucrados en la traslocación de protones son los más conservados [36], [53], [54], [147], [148]. Se ha reportado que la *subunidad c* contiene siete residuos altamente conservados y tres de ellos (R_{41} , Q/N_{42} y P_{43} en la secuencia de *E. coli*) están situados frente a F_1 en el bucle interhelical [142].

Anteriormente se ha reportado que existe poca conservación en los residuos que conforman a la *subunidad a* en organismos de varios grupos taxonómicos; sin embargo, existen dos zonas sobre dos hélices terminales de dicha subunidad con alta similitud en la polaridad de la cadena lateral de los residuos [55]. Además, existen residuos altamente conservados, por ejemplo, R_{210} [35], [41], [53], [148], [151], [152]. Estos residuos tienen una cadena lateral polar o pequeña y se encuentran localizados entre la carga del estator y la frontera con la membrana periplásmica. Lo anterior implicaría un mecanismo conservado de carga y descarga para el sitio de unión a iones en el anillo *c* a través de la *subunidad a* [55], [148]. No obstante, dados los resultados de identidad, se puede decir que hay una gran variación de residuos que conforman esta proteína.

Análisis comparativo de los sitios de unión de inhibidores exógenos de la ATP sintasa

En un segundo paso se realizó un análisis comparativo de los sitios de unión a inhibidores exógenos de la ATP sintasa, con el fin de encontrar diferencias estereoquímicas que sirvan como andamio para el desarrollo de fármacos especie-específico. Para ello, se seleccionaron inhibidores cuyas estructuras cristalinas se encontraron resueltas a nivel atómico. Dichas estructuras pertenecen a la F_1 -ATPasa de mitocondria de corazón de bovino. Debido a la similitud que existe entre las secuencias y estructura de la F_1 -ATPasa entre bovino y humano, se puede decir que son equivalentes. A partir de dichas estructuras, se extrajeron los residuos que se encontrasen formando el sitio de unión al inhibidor. Por otro lado, se seleccionaron secuencias de organismos patógenos de tipo no viral que, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, constituyen un problema de salud pública en cuanto a enfermedades infecciosas se refiere.

Microorganismos causantes de Enfermedades de Declaración Obligatoria

Cada país tiene su propia lista de enfermedades con alta incidencia, sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en 1969 las Regulaciones de Salud Internacionales, en las cuales se especificaba que las enfermedades deben ser reportadas a las organizaciones para ayudar a su vigilancia internacional. Esta regulación estaba limitada a reportar cólera, fiebre amarilla y peste. La revisión de las regulaciones de salud

internacionales de 2005 amplió la lista, definiendo criterios para asistir en la decisión de si un evento es notificable a la OMS. Las enfermedades de declaración obligatoria (EDO) son aquellas enfermedades transmisibles que los médicos están obligados a notificar al centro de salud pública correspondiente, por ser de especial importancia para la comunidad, ya que permite conocer, monitorear y predecir epidemias. De esta lista se seleccionaron 43 organismos patógenos distintos a virus (Tabla 2).

Tabla 2. Lista de patógenos de alto impacto a nivel mundial.

	Especie	Enfermedad	Mortalidad	Incidencia
Nematoda	<i>O. volvulus</i>	Oncocercosis	-	18 millones de personas infectadas, principalmente en África [143] [144]
	<i>T. britovi</i> <i>T. spiralis</i>	Triquinosis	0.0004%	10,000 infecciones por año [148]
Digenea	<i>S. mansoni</i>	Esquistosomiasis	0.13%	160 millones de personas infectadas [146]
	<i>S. haematobium</i>			
Pezizomycotina	<i>C. albicans</i>	Candidiasis	0.0004%	8 por 100,000 habitantes por año
	<i>A. niger</i>	Aspergilosis pulmonar invasiva	>90%	0.4 por cada 100,000 por año
Trypanosomatidae	<i>T. cruzi</i>	Enfermedad de Chagas	<5%	Entre 6 y 7 millones de personas infectadas en el mundo [151]
	<i>L. donovani</i> <i>L. mexicana</i>	Leishmaniasis	<4.8%	Cada año se producen entre 900,000 y 1.3 millones de nuevos casos y entre 20,000 y 30,000 defunciones [153]
Aconoidiasida	<i>P. falciparum</i>	Malaria	0.20%	En 2010 se produjeron 219 millones de casos de paludismo [155]
Rhizobiales	<i>B. melitensis</i>	Brucelosis	1-3%	
Rickettsiales	<i>R. conorii</i>	Fiebre botonosa mediterránea	1-3%	De 0.7 a 20 por 100,000[159]
	<i>R. rickettsii</i>	Fiebre de las Montañas Rocosas	3.00%	6 casos por 1,000,000 en 2010[161]
Legionellales	<i>L. pneumophila</i>	Legionelosis	5-30%	De 10 a 15 casos por 1,000,000 de habitantes [163]
Legionellales	<i>C. burnetii</i>	Fiebre Q	1-2%	176 casos en 2014 en USA [164]
Pasteurellales	<i>H. ducreyi</i>	Chancro blando		11 casos en USA en 2015[165]
Pasteurellales	<i>H. influenzae</i>	Bacteriemia/Meningitis	15.00%	400 millones de personas en 26 países [167]
Enterobacteriales	<i>Y. pestis</i>	Peste bubónica		Entre 1,000 y 2,000 casos cada año son reportados a nivel mundial [168]
Enterobacteriales	<i>S. dysenteriae</i>	Shigelosis	0.05-0.4%	500,000 casos cada año en USA [171]
Enterobacteriales	<i>S. flexneri</i>	Diarrea	6-10%	Diarrea mata 2,195 niños cada día.
Enterobacteriales	<i>E. coli</i>	Diarrea	6-10%	Diarrea mata 2,195 niños cada día.
Enterobacteriales	<i>S. sonnei</i>	Shigelosis	5-15%	4.82 por 100,000 por año en USA
Enterobacteriales	<i>S. typhi</i>	Fiebre tifoidea	1.06%	21 millones de casos y 222,000 muertes al año mundialmente [173]
Vibrionales	<i>V. cholerae</i>	Cólera	0.76%	172,454 casos y 1304 muertes a nivel mundial en el 2015[175]
Thiotrichales	<i>F. tularensis</i>	Tularemia	Hasta 24%	Alrededor de 300 casos en USA en el 2015[177]
Neisseriales	<i>N. meningitidis</i>	Meningitis	50%	4,000 personas por año en USA
Neisseriales	<i>N. gonorrhoeae</i>	Gonococia	<1000 mueres por año	118 casos por cada 100,000 habitantes en 2015[180]
Burkholderiales	<i>B. pertussis</i>	Tos ferina	1% en bebés	32,971 casos en USA en 2014[182]
Burkholderiales	<i>B. anthracis</i>	Carbunco	25-60%	
Clostridia	<i>C. botulinum</i>	Botulismo	5-10%	963 casos anuales causados por comida [190]
	<i>C. perfringens</i>	Gangrena gaseosa/Enteritis necrosante	25-100%	1,860 casos por 100,000 anuales
Bacilli	<i>S. aureus</i>	Neumonía	920,000 muertes en 2015	920,136 niños muertos en 2015[185]
		Faringitis		
Bacilli	<i>S. pyogenes</i>	estreptocócica/fascitis necrotizante	30-70%	616 millones de casos por año de faringitis [187]
Bacilli	<i>S. pneumoniae</i>	Neumonía/Sinusitis/peritonitis	10-20%	110 casos anuales en USA
Bacilli	<i>L. monocytogenes</i>	Listeriosis	>40%	1,600 casos anuales en USA [193]
Campylobacteriales	<i>C. jejuni</i>	Diarrea		
Campylobacteriales	<i>H. pylori</i>	Úlceras/Gastritis	26% (úlceras, USA)	4.5 millones de personas por año en USA
Actinobacteria	<i>C. diphtheriae</i>	Difteria	5-10%	7,321 casos reportados a nivel mundial en 2014
Actinobacteria	<i>M. leprae</i>	Leprosia		192,246 casos en 2011 a nivel mundial
Actinobacteria	<i>M. tuberculosis</i>	Tuberculosis	17.30%	10.4 millones de personas infectadas a nivel mundial en el 2015. 1.8 millones de muertes.
Leptospirales	<i>L. interrogans</i>	Leptospirosis	5-30%	100 a 200 casos anuales en USA [200]
Chlamydiales	<i>C. trachomatis</i>	Tracoma/Ceguera/Neumonía		89 millones de nuevos casos estimados en el mundo cada año [201]

Utilizando la lista de patógenos de alto impacto a nivel mundial, se estudiaron las interacciones presentes en los complejos proteína-inhibidor para los cuales se contaba con estructuras cristalinas resueltas.

Aurovertina B

Se eligió la aurovertina unida a la subunidad β_{TP} ya que, además de formar el mayor número de contactos con la proteína, experimentalmente presenta una constante de afinidad mayor ($K_d \approx 1 \mu\text{M}$ para β_{TP} y 4-6 μM para β_E) [86], [153]. Con el fin de seleccionar los residuos que forman contacto directo con el inhibidor, se identificaron aquellos que se encontrasen hasta 4 Å de distancia de la aurovertina. A este grupo de residuos se le denominó SAur-4. Adicionalmente, se realizó una segunda selección incluyendo a los residuos circundantes hasta 8 Å de distancia del inhibidor (grupo SAur-8). Luego, se realizaron los alineamientos con las secuencias de SAur-4 y SAur-8, y se calcularon los porcentajes de identidad con respecto al humano, utilizando el programa bioinformático Clustal Ω . Los resultados correspondientes para cada patógeno se muestran en la Figura 21. Para SAur-4 (Figura 21, recuadro superior), se obtuvo que el porcentaje de identidad promedio fue de 75%. Los microorganismos con mayor identidad pertenecen a los grupos taxonómicos Pezizomycotina, Tremellomycetes, Aconoidasida, Nematoda, Eucestoda, Digenea, Clostridia, así como todas las clases del filo Proteobacteria. Por otro lado, *T. cruzi*, perteneciente al grupo Trypanosomatidae, presentó una identidad cercana a 30%. *S. aureus* y *S. pyogenes*, pertenecientes al orden Bacilli, presentaron un porcentaje de identidad cercano a 50%. Para SAur-8 (Figura 21, parte inferior), el promedio de porcentaje de identidad fue de 77%, indicando que el grado de conservación de los alrededores del sitio es similar al de la conservación del sitio en sí. En la Figura 21 se puede observar que la tendencia de identidad se mantiene con respecto a SAur-4. No obstante, dos miembros del grupo Trypanosomatidae, *T. cruzi* y *L. mexicana*, presentan identidades superiores (aprox. 60%) a las observadas con SAur-4. Dentro de la selección a 8 Å, destaca *L. monocytogenes* como el microorganismo que presentó la identidad más baja (aprox. 50%).

Las interacciones entre aurovertina B y residuos en el dominio de unión a nucleótidos de β_E y β_{TP} son principalmente de carácter hidrofóbico. En ambas subunidades, el átomo C₈ de la aurovertina hace una interacción van der Waals con β -L₃₄₂, los átomos C₁₁ y C₁₂ interactúan con la cadena lateral de β -I₃₄₄, el átomo C₂₁ forma un contacto hidrofóbico con C₈ y C γ de β -P₃₅₀, y el átomo C₂₄ está cerca de la cadena lateral de β -L₃₅₁. Existen también dos puentes de hidrógeno potenciales al dominio C-terminal de la subunidad β entre N ϵ de β -Q₄₁₁ y O₂₅ de aurovertina B, y entre N ϵ de β -R₄₁₂ y O₁₉. Además, el anillo pirona hace una interacción stacking con el anillo aromático de β -Y₄₅₈. El átomo O₁₇ de la aurovertina B unida a β_{TP} hace contacto van der Waals con O₂₂ de α_{TP} -Q₃₉₉. Esta interacción no se encuentra en el sitio de unión a aurovertina B de β_E .

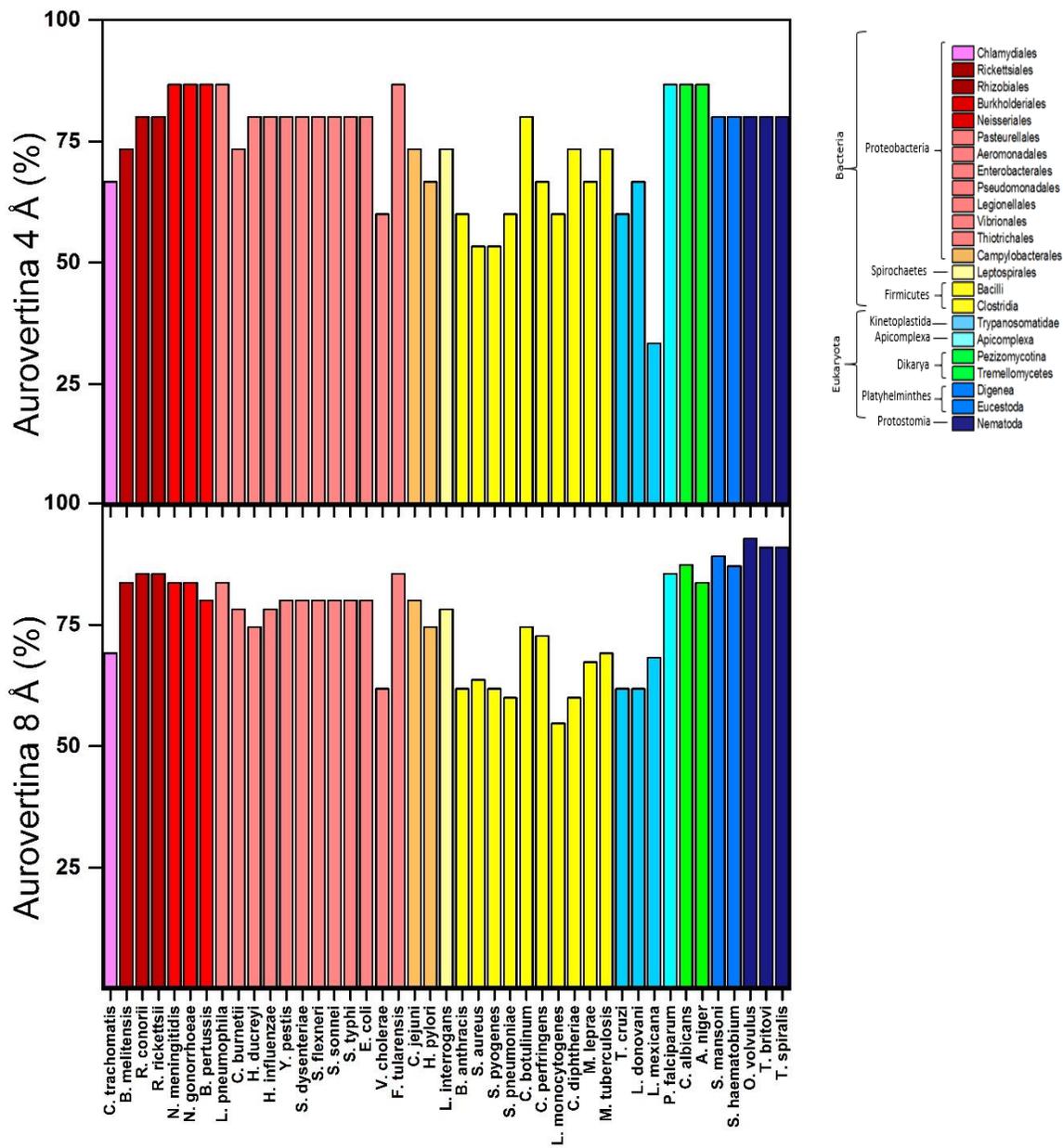


Figura 21. Porcentaje de identidad del sitio de unión a aurovertina a 4 y 8 Å con respecto al de humano. El color de las barras va de acuerdo con la clasificación taxonómica.

En la Figura 22 se muestra una representación esquemática del sitio de unión a aurovertina, en donde se resalta la identidad por posición de residuo de los patógenos en relación con humano. La escala de identidad va de 0% (tonalidades rojas) a 100% (tonalidades azules). Los residuos que se encuentran hasta 4 Å de distancia se muestran en superficie coloreada y en “sticks”. Los puentes de hidrógeno se muestran con líneas moradas. Los residuos que se encuentran entre 4 y 8 Å de distancia se muestran en “sticks” coloreados. Para simplificar la lectura del gráfico, los residuos con identidad mayor a 80% fueron omitidos en la región

de 4 a 8 Å. Se observa que la mayoría del sitio de unión a aurovertina se encuentra conservado. A 4 Å de distancia, uno de los residuos con mayor identidad es P₃₅₀ (100%) el cual, de acuerdo con la estructura cristalográfica, interacciona con el C₂₁ de la aurovertina de manera hidrofóbica. El residuo E₄₅₄ presenta una identidad de 100%, pero no parece tener interacción directa con el inhibidor. La mayor variación a 4 Å fue observada para el residuo A₃₃₈, que presentó una identidad cercana a 20%. Este residuo está a distancia de enlace hidrofóbico (4.6 Å) con el C₂ de la aurovertina. Q₄₅₅ es otro residuo que podría interactuar de manera hidrofóbica con C₁₈ de la aurovertina, el cual presenta una identidad de 50%. Hasta 8 Å de distancia, se encontró que los residuos con mayor variación fueron H₄₂₇ y D₃₈₀, con 4 y 7 % de identidad, respectivamente.

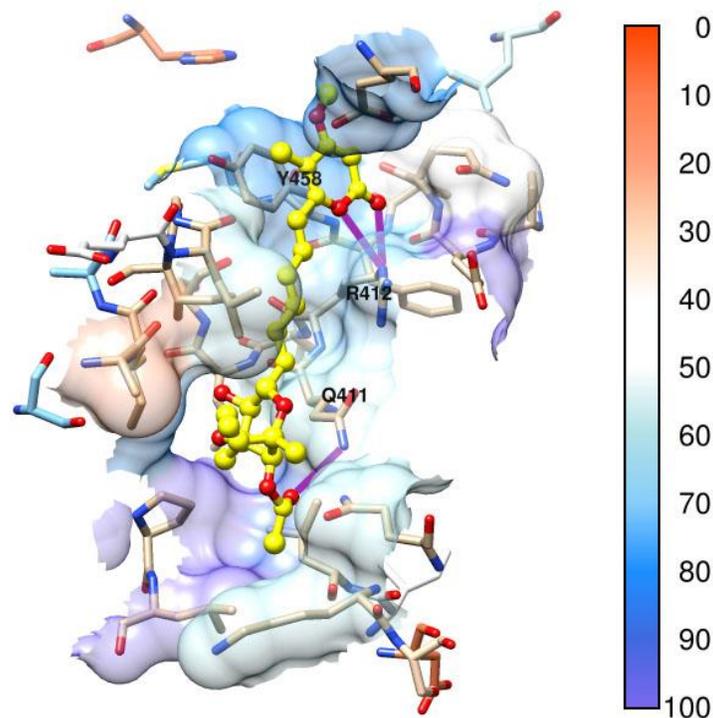


Figura 22. Sitio de unión a aurovertina. Los residuos que se encuentran hasta 4 Å de distancia se muestran representados por “sticks” y superficies. Los residuos que se encuentran de 4 a 8 Å se representan con “sticks”. El color de las superficies y “sticks” representa el porcentaje de identidad por residuo de patógenos con respecto al humano. El código de colores de variación de identidad se muestra al lado derecho. Ver detalles en el texto (pdb:1cow)

Uno de los residuos importantes para la unión a la aurovertina es β R₄₁₂, que al ser mutado por C, H o W causa una reducción en la afinidad por el inhibidor [80]. Entre los microorganismos que naturalmente son insensibles a la aurovertina se incluyen a *Bacillus firmus* y *Bacillus PS3*, en los cuales β R₄₁₂ ha sido reemplazada por F [80]. Este es un claro ejemplo de que el tipo y la orientación de los aminoácidos pueden afectar drásticamente la unión de los inhibidores a las proteínas, incluso entre proteínas homólogas. De acuerdo con nuestro análisis, en *O. volvulus*, *C. jejuni*, *H. pylori*, *C. perfringens* y *L. interrogans*, esta R se

encuentra reemplazada por K, en *B. anthracis*, *S. aureus*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* se haya reemplazada por F, mientras que en *L. monocytogenes* y *C. trachomatis*, se encuentra mutada por N y Q, respectivamente; en *Mycoplasma gallisepticum* este residuo ha sido sustituida por N [80]. No obstante, no se cuenta hasta el momento con datos experimentales que permitan evaluar el impacto de estos cambios sobre la afinidad al antibiótico.

Otro residuo importante para el reconocimiento de la aurovertina B es β -Y₄₅₈, debido a que forma con su anillo aromático un apilamiento con el anillo pirona. En *Bacillus PS3* y *Mycoplasma gallisepticum*, β Y₄₅₈ se ha reemplazado por R y F, respectivamente[80]. Posiblemente la mutación observada en *Bacillus PS3* contribuya a la insensibilidad que este microorganismo presenta hacia el antibiótico. β -Y₄₅₈ se encontró reemplazado por F en *S. mansoni*, *S. haematobium*, *M. leprae* y *M. tuberculosis*; por R en *B. anthracis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* y *C. trachomatis*; por M en *V. cholerae*; por N en *C. diphtheriae* y por L en *C. botulinum*, *C. perfringens* y *L. monocytogenes*. Se desconoce si la falta de un anillo aromático en esa posición afecte la unión al antibiótico. Posiblemente se pueda dar la unión con aquellos microorganismos que presenten F en esa posición, ya que el apilamiento sería posible. Podría darse una interacción más débil si existieran residuos pequeños e hidrofóbicos en esa posición, como por ejemplo L, ya que no habría impedimento estérico.

El residuo β -Q₄₁₁ forma un puente de hidrógeno con la aurovertina. Este residuo se encuentra relativamente conservado en las especies analizadas, siendo los cambios encontrados los siguientes: para *T. britovi*, *T. spiralis*, *B. melitensis*, *H. ducreyi*, *H. influenzae*, *V. cholerae*, *C. jejuni*, *H. pylori*, *C. diphtheriae*, *M. leprae*, *M. tuberculosis* y *L. interrogans*, cambió a E; para *T. cruzi* y *L. mexicana*, el reemplazo ocurrió a T, y *L. monocytogenes* tuvo el cambio de este residuo a R.

Polifenoles

La metodología aplicada con el inhibidor anterior fue utilizada para los polifenoles. Se seleccionaron los residuos que se encontrasen a 4 Å de distancia y se extrajeron para formar una sola secuencia (SPol-4). Adicionalmente, se aplicó la misma estrategia para los residuos circundantes hasta 8 Å de distancia del inhibidor (SPol-8).

Los residuos involucrados en la unión son γ -K₂₆₀, γ -I₂₆₃, β TP-V₂₇₉ y β TP-A₂₇₈. Al interactuar con polifenoles, la cadena lateral de γ -K₂₆₀ se mueve a una posición en la cual interactúa con γ -E₂₆₄. Las cadenas laterales α TP-E₂₉₂, α TP-G₂₉₀ y α DP-G₂₉₂ parecen contribuir con interacciones no polares adicionales. Se ha reportado que las enzimas de rata y humano poseen los mismos residuos, y la primera también es inhibida por polifenoles, por lo cual se ha asumido que son afectadas de la misma forma que bovino [80].

Para ayudar a acomodar el resveratrol, la cadena lateral de γ -K₂₆₀ se mueve a una posición en la cavidad del soporte entre la subunidad δ y la subunidad β_{TP} en la estructura de referencia, a una posición donde su cadena lateral interactúa con δ -E₂₆₄. Las regiones de cadena lateral de γ -A₂₅₆, γ -T₂₅₉, γ -E₂₆₄, α_{TP} -E₂₉₂, α_{TP} -G₂₉₀ y α_{DP} -E₂₉₂, todas dentro de 4 Å del resveratrol, parecen contribuir con interacciones no polares adicionales. Existen dos puentes de H entre los grupos amido de la cadena principal de β_{TP} -V₂₇₉ y α_{TP} -E₂₉₂, y los electrones pi del grupo funcional m-dihidroxifenil de resveratrol y su 4'-hidroxil, respectivamente. Una red de puentes de H entre los hidroxilos 3', 4' y 5' del resveratrol y los residuos α_{TP} -R₂₉₁, β_{TP} -S₂₇₇, β_{TP} -G₂₈₀ y γ -T₂₅₉ está mediada por moléculas de agua ordenadas. Quercetina y piceatanol se unen de manera similar a resveratrol. El subcomplejo $\alpha_3\beta_3\delta$ de Bacillus PS3 no se inhibe en presencia de resveratrol ni piceatanol [83]. Los resultados correspondientes para cada agente infeccioso se muestran en la Figura 23.

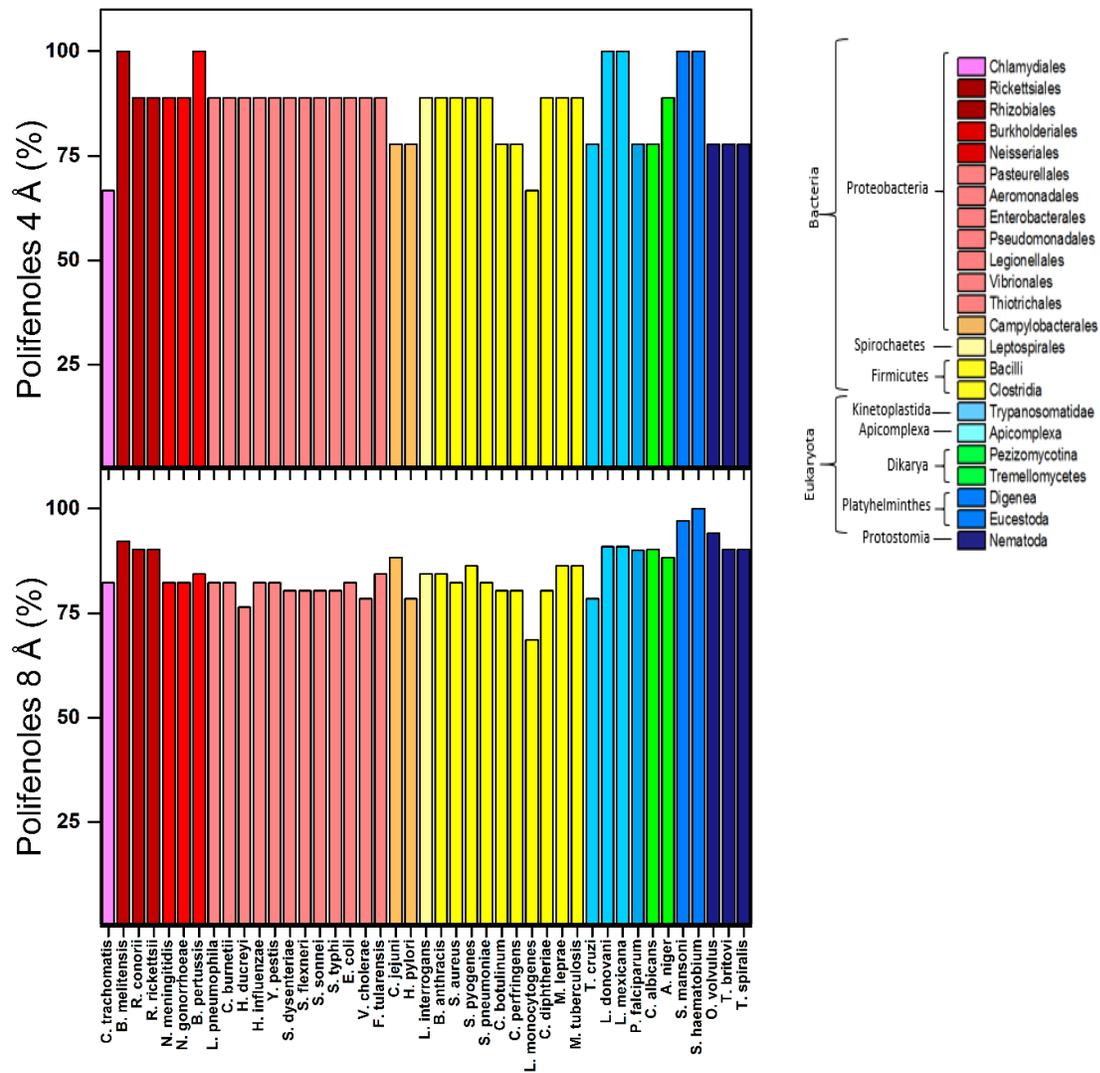


Figura 23. Porcentaje de identidad del sitio de unión a polifenoles a 4 y 8 Å con respecto al humano.

Para SPol4 (recuadro superior), se obtuvo que el porcentaje de identidad promedio fue de 87%. Se observó que *B. melitensis*, *B. pertussis*, *L. donnovani*, *L. mexicana*, *S. mansoni* y *S. haematobium* tuvieron identidades cercanas al 100% con respecto al humano. También se observó que la mayoría de los organismos patógenos presentaron una identidad igual o superior a 75%. Los organismos que presentaron la menor identidad (aprox. 65%) fueron *C. trachomatis* y *L. monocytogenes*. Para SPol-8, el promedio de porcentaje de identidad fue de 85%. Los patógenos con identidad cercana a 100% fueron *S. mansoni* y *S. haematobium*. Los organismos con una identidad cercana a 90% fueron los integrantes del grupo alphaproteobacteria, los miembros del grupo Nematoda, así como *C. jejuni*, *P. falciparum*, *L. donovani*, *L. mexicana*, *C. albicans* y *A. niger*. El resto de los organismos estudiados, salvo *L. monocytogenes*, presentaron identidades cercanas a 80%. *L. monocytogenes* fue el microorganismo que presentó la menor identidad en SPol-8 (aprox. 70%). El resto de los organismos presentaron identidades entre 75 y 85%. En comparación con SAur-4 y SAur-8, SPol-4 y SPol-8 se encuentran más conservados. Se observó que *L. monocytogenes* presentó la menor identidad en las secuencias SAur-8 y SPol-8. Con respecto a los residuos de SPol-8 (Figura 23, recuadro inferior), se encontró que la identidad se incrementó en la mayoría de los casos, con excepción de *T. cruzi* y *L. monocytogenes*, cuya identidad se conservó.

En la Figura 24 se muestra una representación esquemática del sitio de unión a polifenoles, en donde se resalta la identidad por posición de residuo de los patógenos en relación a humano. Se observa que la mayoría de los residuos que conforman el sitio de unión están altamente conservados. A 4 Å de distancia, uno de los residuos más conservados es γ -T₂₅₉ con 98% de identidad, el cual interacciona con el C₆ del polifenol de forma hidrofóbica. Otros residuos altamente conservados son β -A₂₇₈ y β -V₂₇₉ con identidades de 98%. β -A₂₇₈ interacciona con el C₁₁, mientras β -V₂₇₉ interacciona con C₉₋₁₀ del polifenol de manera hidrofóbica. El residuo γ -K₂₆₀ presenta la menor identidad (7%). De acuerdo con la estructura cristalográfica, este residuo interacciona de manera hidrofóbica con los C₉₋₁₁ del polifenol. El residuo γ -A₂₅₆ presenta una identidad de 79% e interactúa con C₃ y C₆ del polifenol. Hasta 8 Å de distancia se encontró que los residuos con mayor variación fueron γ -T₂₅₃ (17%), γ -I₂₅₇ (12%), γ -I₂₆₃ (26%) y γ -S₂₆₇ (29%).

Se observó que los residuos β _{TP}-A₂₇₈ y β _{TP}-V₂₇₉ presentaron alta conservación (Figura 24), siendo *L. monocytogenes* la especie que presentó cambios T y G, respectivamente. El residuo γ -K₂₆₀ se encuentra conservado en *B. melitensis* y *B. pertussis*; existe una delección en *S. mansoni*; se encuentra mutado por N en *C. albicans*, *C. burnetti*, *H. influenzae*, y *C. trachomatis*; existe el cambio por A en *T. cruzi*, por R en *T. britovi*, *T. spiralis*, y *H. ducreyi*; por T en *R. conorii*, *R. rickettsii*, *C. jejuni*, *H. pylori*, *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*; el resto de organismos contienen Q en esta posición. El residuo γ -I₂₆₃ se encuentra muy poco conservado (26% de identidad), siendo los cambios a V, A, N, T y S; el nematodo *O. volvulus* presentó delección en esa posición. Para el residuo γ -E₂₆₄ se calculó una identidad de 88%, siendo el cambio a D en *T. britovi*, *T. spiralis*, *C. albicans* y *C. trachomatis*. Para los residuos que se localizan en la subunidad α (TP y DP), se halló una conservación del 100%.

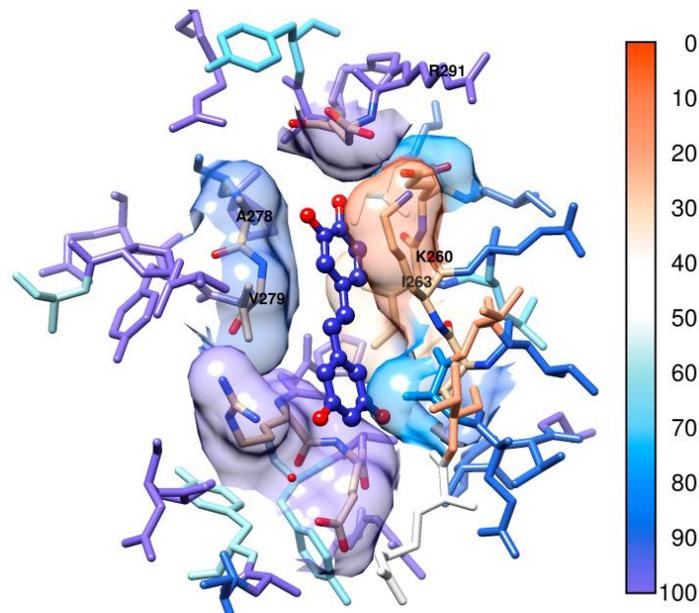


Figura 24. Sitio de unión a polifenoles. Los residuos que se encuentran hasta 4 Å de distancia se muestran representados por “sticks” y superficies. Los residuos que se encuentran de 4 a 8 Å se representan con “sticks”. El color de las superficies y “sticks” representa el porcentaje de identidad por residuo de patógenos con respecto al humano. El código de colores de variación de identidad se muestra al lado derecho. (pdb:2jj1)

Efraeptina

Nuevamente, se utilizó la metodología aplicada en los inhibidores anteriores y se obtuvieron las secuencias SEfr-4 y SEfr-8 (Figura 25, recuadro superior e inferior, respectivamente), así como los respectivos promedios de identidad. Para SEfr-4 se obtuvo un porcentaje de identidad promedio global de 74% con respecto al humano. El patógeno que presentó la mayor identidad (95%) fue *S. haematobium*, seguido por *S. mansoni*, *O. volvulus*, *T. britovi*, *T. spiralis* y *C. jejuni*, con aprox. 90% de identidad. Además, cerca de la mitad de los grupos presentaron identidades iguales o mayores a 75%, mientras que el resto presentó identidades cercanas a 60%. El organismo que presentó la menor identidad fue *L. monocytogenes* (~50%). Para SEfr-8, la identidad global promedio fue de 82%. *S. haematobium*, *O. volvulus*, *T. britovi* y *T. spiralis* presentaron el mayor porcentaje de identidad respecto al humano (aprox. 100%). El grupo taxonómico Firmicutes presenta las identidades más heterogéneas, y dentro de este grupo, *L. monocytogenes* presentó la menor identidad (aprox 56%). SEfr-4 presenta una conservación similar a la observada con SAur-4 (74 vs 75%, respectivamente), y menos conservado que SPol-4 (87%). Al comparar SEfr-8 con SAur-8 observamos que el primero se encuentra más conservado (82 vs 77%), mientras que presenta el mismo grado de conservación que SPol-8 (87%).

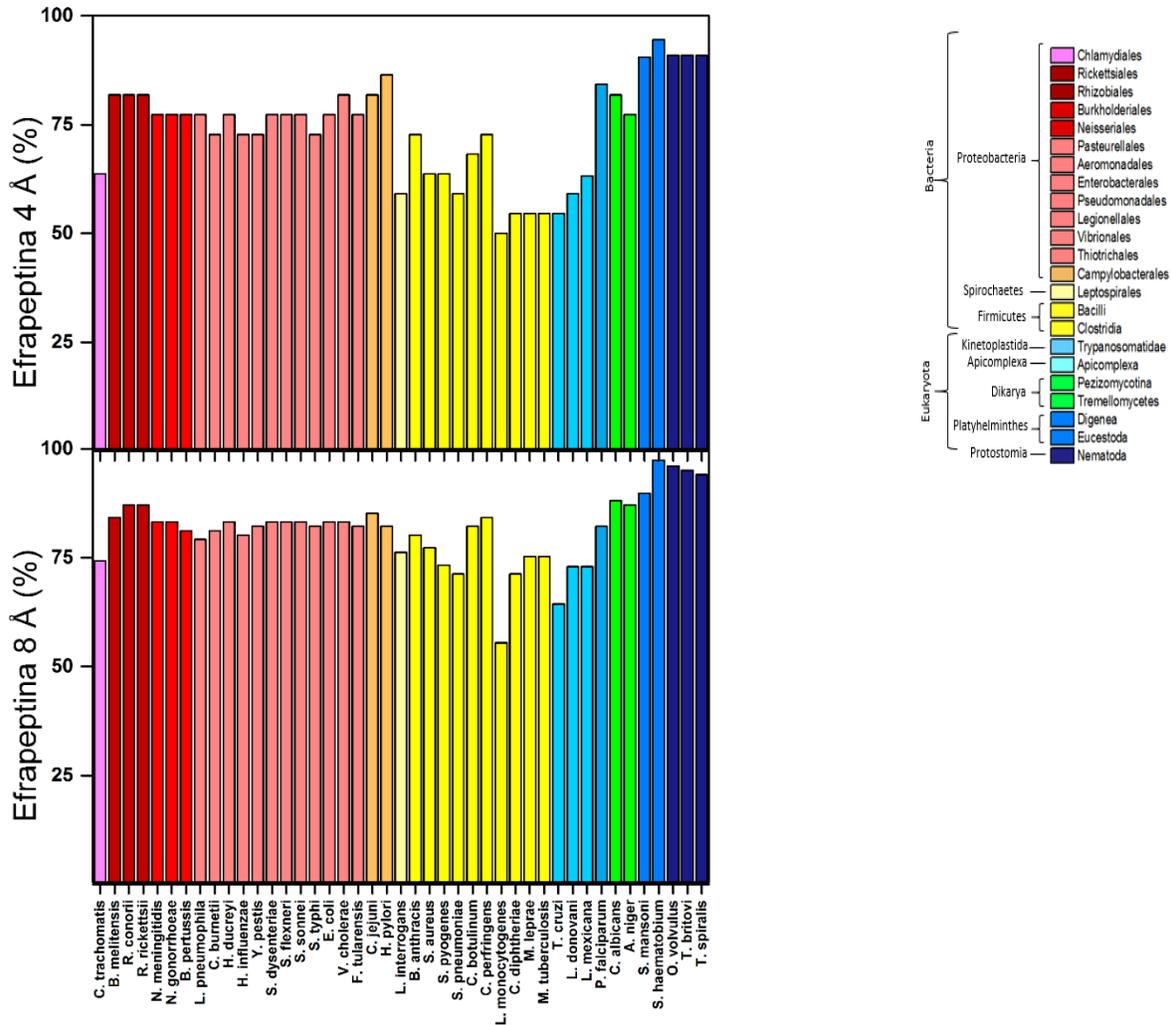


Figura 25. Porcentaje de identidad del sitio de unión a Efraeptina a 4 y 8 Å con respecto al humano.

En la Figura 26 se muestra una representación esquemática del sitio de unión a efraeptina, en donde se resalta la identidad por posición de residuo de los patógenos en relación con el humano. En el gráfico observamos que la mayoría del sitio de unión a efraeptina se encuentra conservado, especialmente en los residuos de las subunidades α_E y β_E , aunque en menor proporción al sitio de unión a polifenoles. A 4 Å, los residuos con menor identidad son $\gamma-T_7$ (2%), $\gamma-F_{250}$ (10%), α_E-L_{369} (40%) y $\alpha_{TP}-Y_{358}$ (22%). Como se mencionó anteriormente, dichos residuos interactúan directamente con el inhibidor. Algunos de los residuos más conservados son α_E-Q_{349} , β_E-F_{155} y β_E-F_{326} con 100% de identidad. A 8 Å de distancia, los residuos con menor identidad fueron $\gamma-L_{10}$ (21%), $\gamma-K_{11}$ (33%), $\gamma-D_{244}$ (24%), $\gamma-T_{247}$ (24%), $\gamma-T_{249}$ (5%), α_E-E_{355} (31%), α_E-V_{367} (44%), $\alpha_{TP}-E_{355}$ (31%) y β_E-I_{310} (29%).

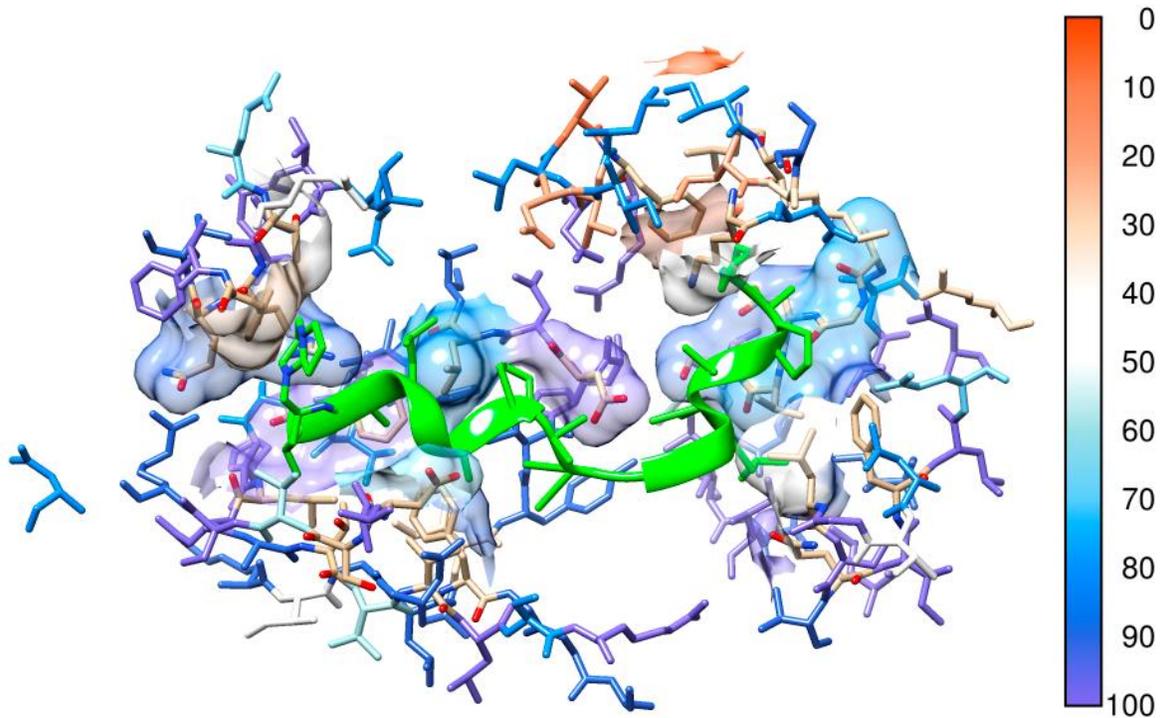


Figura 26. Sitio de unión a efrapeptina. Los residuos que se encuentran hasta 4 Å de distancia se muestran representados por “sticks” y superficies. Los residuos que se encuentran de 4 a 8 Å se representan con “sticks”. El color de las superficies y “sticks” representa el porcentaje de identidad por residuo. La escala de color se muestra al lado derecho.(pdb:1efr)

Bedaquilina

Nuevamente se siguió el mismo procedimiento que en los inhibidores anteriores para obtener las secuencias de los sitios de unión del fármaco antituberculosis bedaquilina (Figura 27). Para SBDQ-4, se encontró que la identidad global promedio fue de 44%. Los organismos que presentaron la mayor identidad (aprox. 75%) fueron *B. melitensis*, *L. pneumophila*, *C. jejuni*, *H. pylori*, *B. anthracis*, *C. botulinum* y *L. monocytogenes*. Aproximadamente el 50% de los patógenos presentaron identidades cercanas a 25%. El resto de los patógenos estudiados presentaron identidades muy cercanas a 50%. Para SBDQ-8, la identidad global promedio fue de 28%. Aquí, los organismos que presentaron la mayor identidad fueron *C. perfringens* con 54% de identidad, seguido de *L. interrogans* y *B. melitensis* con 46%. 18 de los 32 microorganismos analizados presentaron identidades iguales o menores a 25%, y dentro de estos 18, seis presentaron identidades menores al 16%. En comparación con los inhibidores anteriores, SBDQ-4 presentó la menor identidad. Al comparar SBDQ-8 con el resto de los inhibidores se observó que también presentó la menor identidad.

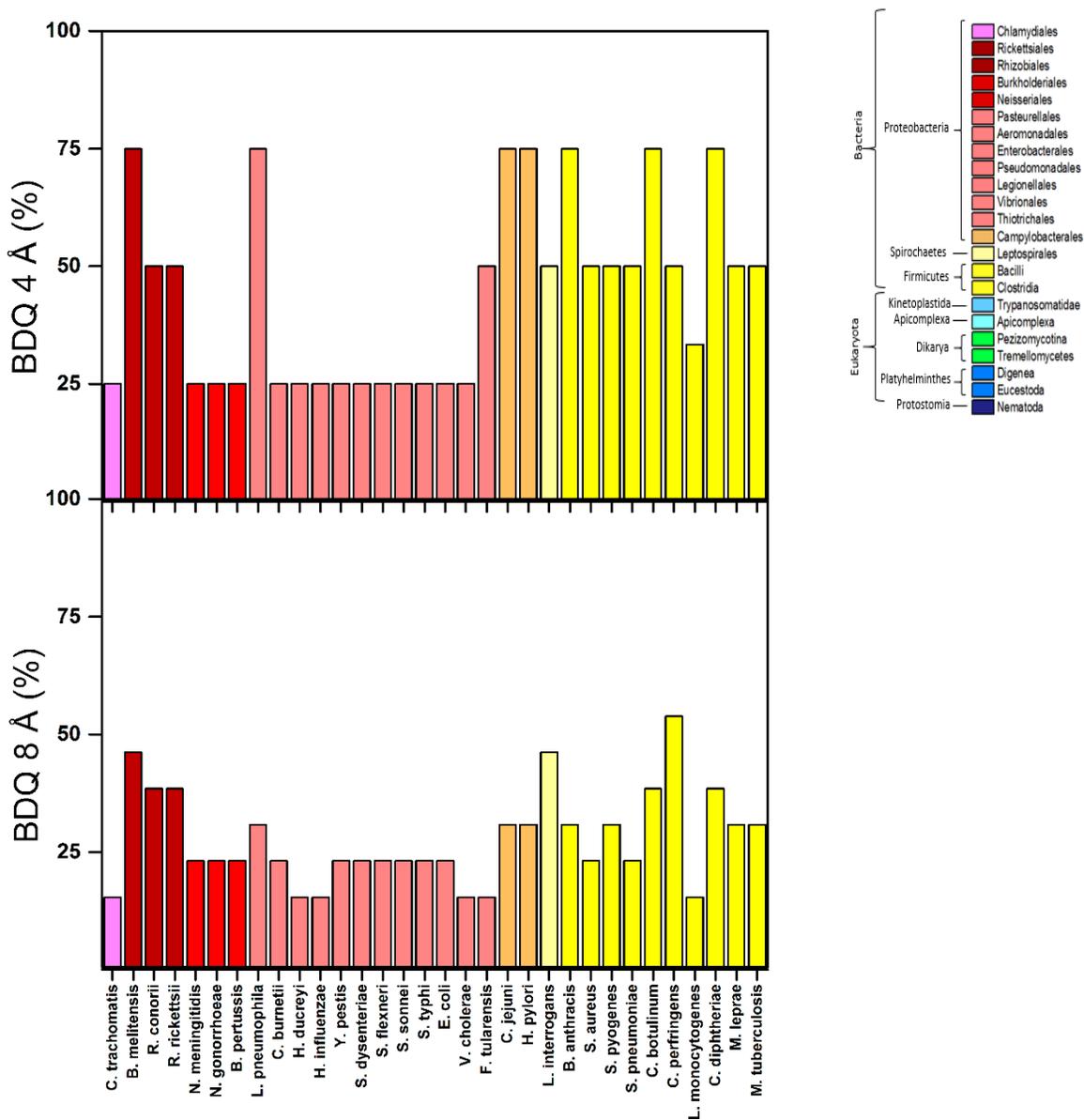


Figura 27. Porcentaje de identidad a 4 y 8 Å del sitio de unión a bedaquilina con respecto al humano.

El fármaco forma varias interacciones de van der Waals con diez residuos de dos subunidades c adyacentes: los residuos G₆₂, L₆₃, E₆₅, A₆₆, A₆₇, Y₆₈, F₆₉ y L₇₂ de una subunidad, y A₆₆ e I₇₀ de la otra subunidad. Además, el grupo hidroxilo de uno de los centros quirales de la bedaquilina forma un puente de H con una molécula de agua, que a su vez interacciona con los grupos carbonilo y carboxilo de E₆₅. Se ha propuesto que cuando el inhibidor se aproxima al anillo c, F₆₉ cambia su conformación para evitar choques estéricos y provee una plataforma hidrofóbica para bedaquilina. Así mismo, el inhibidor puede cambiar su propia conformación, por lo tanto, promueve la formación de numerosas interacciones

moleculares específicas, las cuales incluyen la formación de interacciones electrostáticas entre E₆₅ y el grupo funcional dimetilacetamida (DMA) [92].

La subunidad *c* de *M. tuberculosis* está compuesta por 81 residuos, mientras que la de humano por 136. La identidad global entre ambas secuencias es de 33%. En la Figura 28 se muestra un alineamiento de secuencias de los residuos involucrados en el reconocimiento y en la unión a bedaquilina entre *M. tuberculosis* y humano. En este caso, la numeración corresponde a la secuencia de *M. phlei*. La subunidad *c* de *M. phlei* comparte una alta identidad de secuencia (84%) con su homólogo de *M. tuberculosis*, particularmente en la región transmembranal, en donde se ha propuesto que se une el inhibidor [150], para la cual la estructura cristalográfica ha sido resuelta. El mapeo de las mutaciones en *M. tuberculosis* resistentes a BDQ arrojó que la pérdida de afinidad es causada por una interferencia estructural directa (E₆₁D, L₅₉V, I₆₆M en *M. tuberculosis*) o indirecta (D₂₈A/G, A₆₃P) [89], [154]–[156]. Por ejemplo, la resistencia causada por mutaciones en D₂₈ a residuos alifáticos pequeños puede ser atribuida al reordenamiento de su red de enlaces de hidrógeno. Esta red involucra a un puente de hidrógeno fuerte, el cual estabiliza la conformación de E₆₅. Un segundo enlace está formado con la molécula de agua estructural, la cual coordina al oxígeno del carbonilo de L₆₃. En las mutantes D₂₈ a A/V/G, estos dos enlaces de hidrógeno no pueden formarse, lo cual desestabiliza a los residuos E₆₅, L₆₃ y a la molécula de agua, alterando negativamente la transferencia de protones por parte del anillo *c* [157]–[159]. Ambos efectos contribuyen indirectamente a la formación de resistencia en mutantes D₃₂. La alta conservación de este residuo carboxilato, particularmente en micobacteria, proporciona especificidad de la BDQ hacia esta familia de bacterias [92].

	36	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
<i>M. tuberculosis</i>	G	G	L	V	E	A	A	Y	F	I	N	L	A	F	M	A	F	V
<i>H. sapiens</i>	F	A	L	S	E	A	M	G	L	L	M	V	A	F	L	I	F	A

Figura 28. Alineamiento de la región de unión de bedaquilina entre *M. tuberculosis* y *H. sapiens*. La numeración va de acuerdo con *M. phlei*. La numeración de *M. tuberculosis* se obtiene al restar 4 unidades al residuo correspondiente. Los aminoácidos que causan resistencia a BDQ al ser mutados se muestran en color rojo. Los números de los residuos involucrados en la coordinación del inhibidor, basándose en la estructura cristalográfica, están resaltados en color amarillo. En azul se muestran los números de los residuos que se encuentran hasta 4 Å de distancia del inhibidor. Los residuos en negro corresponden a aquéllos que se encuentran entre 4 y 8 Å.

Se puede observar que el residuo A₆₇, uno de los residuos críticos que causa resistencia, se encuentra mutado en humano por M. El cambio de un residuo pequeño a una más voluminoso evitaría que el inhibidor pueda unirse. Otros residuos, como Y₆₈ y F₆₉ se encuentran mutados en humano por G y L, respectivamente. A pesar de que estos residuos no interactúan de forma directa con la bedaquilina, ayudan a formar el “pocket” de unión. En humano, el cambio en dichos residuos impactaría dramáticamente en la topología del “pocket”, y, por lo tanto, la afinidad por el inhibidor sería menor. Estas sutiles diferencias explican el por qué el inhibidor se une de manera selectiva a la ATP sintasa micobacteriana sin afectar a la de humano [92], [96].

En la Figura 29 se muestra una representación esquemática del sitio de unión a bedaquilina, en donde se resalta la identidad por posición de residuo de los patógenos en relación con el humano. En el gráfico observamos que el sitio de unión a bedaquilina es el que presenta la menor identidad entre los inhibidores estudiados. Se ha propuesto que los residuos importantes para la selectividad del inhibidor hacia *M. tuberculosis* son A₆₆ e I₇₀. En humanos, los residuos correspondientes son M y L, respectivamente, lo que al parecer genera impedimento estérico que impide la interacción con el inhibidor [160]. Cambios similares en otros patógenos se cree que son también los responsables de la pérdida de la inhibición enzimática. Por tanto, la bedaquilina representa un ejemplo claro de interacción especie-específica, que discrimina algunas especies patogénicas con respecto al humano. Al comparar la secuencia de *M. tuberculosis* con el resto de los patógenos estudiados, se observó que uno de los residuos más conservados a 4 Å es A₆₆ (85%), el cual, según la estructura cristalográfica, interacciona con el C₃₆ de BDQ. El residuo E₆₅ presenta una identidad de 56%, el cual interacciona mediante puente de hidrógeno con el grupo amino secundario de la BDQ, así como de manera hidrofóbica con C₂₄ y C₃₇. A 8 Å de distancia, el residuo L₆₃ presenta la identidad más alta (71%), seguido por L₇₂ (44%). La identidad del residuo G₆₂ fue del 9%, presentando las mutaciones A y L. El residuo L₆₃ tuvo una identidad del 71%, y presentó cambios por V, M y F. Para E₆₅ los cambios fueron por D, principalmente, y por V, con una identidad de 56%. El residuo A₆₆ tuvo identidad del 85%, presentando mutaciones por S y G. Para A₆₇ se encontró el 9 % de identidad, con los cambios de residuo por L, F, I, V, Q, A y T. El residuo Y₆₈ tuvo cambios por A, P, V, F M, y Y, con una identidad del 12%. La identidad para el residuo F₆₉ fue de 26% y presentó cambios por I, A, M y F. Para I₇₀, los cambios reconocidos fueron L, Y e I, con una identidad del 15%. Para el residuo L₇₂ se observaron los cambios por F, V e I, y éste presentó una identidad de 44%.

El cambio de E por D en la posición 65 posiblemente conserve la interacción con la molécula de agua previamente descrita, pero el puente de hidrógeno que podría formarse con el grupo amino de la bedaquilina sería menos fuerte. Sin embargo, la mutación por V imposibilitaría la formación de los puentes de hidrógeno. Dicha mutación se encontró en *L. monocytogenes*. Aunque la identidad del residuo G₆₂ fue baja, los cambios fueron por residuos hidrofóbicos, por lo cual la interacción podría ocurrir.

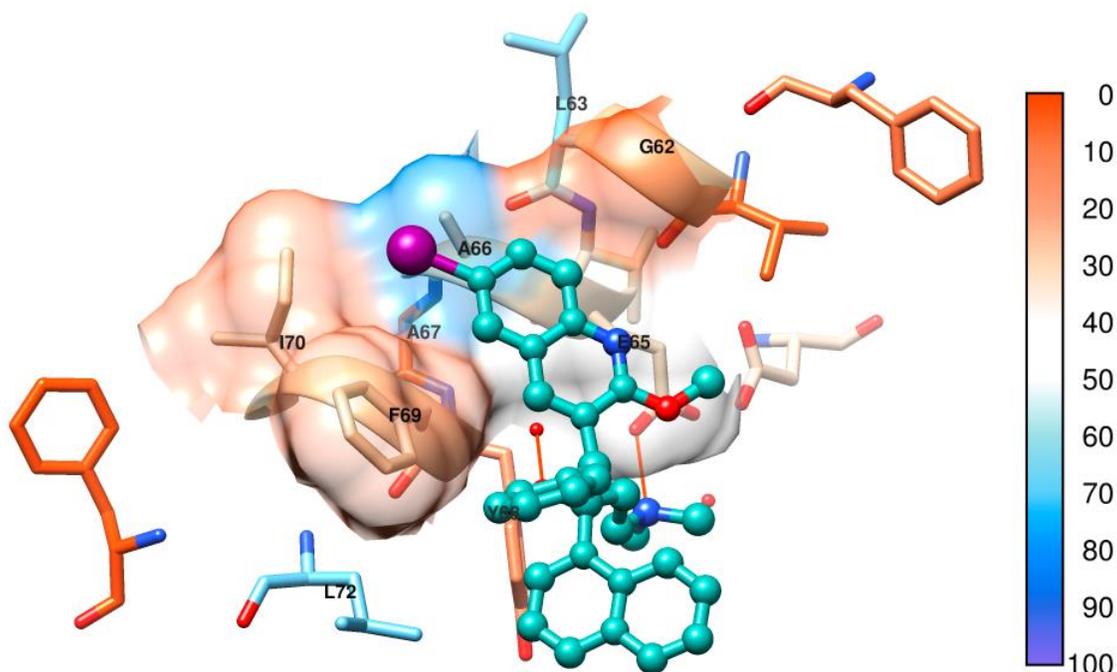


Figura 29. Sitio de unión a bedaquilina a 8 Å de distancia. La escala de identidad va de 0% (tonalidades rojas) a 100% (tonalidades azules). Los residuos que se encuentran hasta 4 Å de distancia se muestran en superficie coloreada y en “sticks”. Los puentes de hidrógeno se muestran con líneas rojas. Las moléculas de agua se representan como esferas rojas. Los residuos que se encuentran entre 4 y 8 Å de distancia se muestran en stick coloreados. Los residuos que se encuentran hasta 4 Å de distancia se muestran representados por “sticks” y superficies. Los residuos que se encuentran de 4 a 8 Å se representan con “sticks”. El color de las superficies y “sticks” representa el porcentaje de identidad por residuo. La escala de color se muestra al lado derecho. La numeración va de acuerdo con la secuencia de *M. phlei*.

Los cambios por residuos nucleofílicos o aromáticos en L₆₃ podrían causar impedimentos estéricos, por lo cual la unión del inhibidor podría no ocurrir o la afinidad podría disminuir considerablemente. Los cambios por otros residuos hidrofóbicos observados en A₆₆ podrían no afectar la unión al inhibidor, sin embargo, el cambio por residuos más voluminosos podría evitar la unión al causar impedimento estérico. El caso anterior ocurre también con el residuo A₆₇. El cambio por F de Y₆₈ permitiría la unión de BDQ; los cambios por residuos hidrofóbicos y polares podrían no influir en la unión, ya que el inhibidor no tiene interacciones de apilamiento con los residuos aromáticos. Para F₆₉, los cambios observados podrían no tener un impacto importante, ya que no existen interacciones específicas para dicho residuo. La mutación por residuos aromáticos en I₇₀ podría evitar la unión a BDQ por motivos estéricos, ya que se encuentra muy cerca del átomo de bromo del inhibidor. Los cambios en el residuo L₇₂ podrían no influir de manera importante en la unión al inhibidor, esto se basa en el hecho que este residuo se encuentra en la periferia del sitio de unión.

Selección de microorganismos

A lo largo de la evolución, la naturaleza ha descubierto sitios alternos al sitio de unión a nucleótidos de la FoF₁-ATP sintasa, cuya interacción con moléculas orgánicas pequeñas y oligopéptidos inhibe el mecanismo rotatorio de la enzima. Dado que la topología de algunos de estos sitios se ha determinado, en este estudio se realizó la comparación del grado de identidad de dichos sitios de patógenos con respecto al humano. Uno de los propósitos de nuestro estudio fue que, a partir de dicho análisis, nos fuera posible seleccionar patógenos que presenten la menor identidad respecto al humano, con la finalidad de que, en un estudio venidero, se exploten tales diferencias para el diseño de fármacos especie-específicos.

Después del análisis comparativo entre especies de los sitios de unión de aurovertina, polifenoles, efrapeptina y el fármaco bedaquilina, se encontró que los patógenos *T. cruzi*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. diphtheriae*, *C. trachomatis* y *M. tuberculosis* muestran la menor identidad con respecto al humano. Las Figuras 30, 33, 31 y 36 muestran los alineamientos para los sitios de unión a inhibidores de estos seis microorganismos con respecto al humano. En azul se muestran los residuos que se encuentran hasta 4 Å de distancia. Los residuos resaltados en amarillo son aquellos relevantes en la unión al inhibidor. En verde se resaltan los residuos implicados en la formación del sitio de unión, que son diferentes a los encontrados a humano. La numeración va de acuerdo con la secuencia de humano, con excepción de la bedaquilina, en la cual se ocupa la numeración de *M. phlei*.

En la Figura 30 se muestra el alineamiento del sitio de unión a aurovertina de los patógenos más divergentes respecto al humano.

	143	336	338	339	340	341	342	352	375	376	377	380	382	383	385	409	411	412	427	458	459	473
<i>H. sapiens</i>	L	S	A	I	A	E	L	D	Q	K	I	D	K	S	Q	K	Q	R	H	Y	M	L
<i>T. cruzi</i>	I	D	A	V	A	E	S	E	V	Q	M	K	K	E	Q	K	T	K	M	Y	M	M
<i>S. aureus</i>	L	E	K	L	T	E	M	A	Q	S	T	K	R	E	Q	R	Q	F	Q	R	L	M
<i>L. monocytogenes</i>	I	E	S	I	A	A	L	Q	K	F	I	R	M	E	Q	K	R	N	T	L	F	-
<i>M. tuberculosis</i>	L	S	A	V	F	S	K	A	I	R	I	R	K	D	Q	R	E	R	Q	F	L	L
<i>C. trachomatis</i>	L	S	S	I	T	E	L	A	Q	E	I	Q	S	D	Q	K	Q	Q	N	R	Y	M
<i>C. diphtheriae</i>	L	D	A	I	A	S	K	T	I	N	I	K	K	E	Q	R	E	R	I	N	G	M

H_{sc} H_{sc} 

Figura 30. Alineamiento de secuencias del sitio de unión a aurovertina. Los residuos que se encuentran hasta 4 Å de distancia se muestran con numeración en color azul. Los residuos importantes para la unión al inhibidor se encuentran remarcados con numeración resaltada en amarillo. Las mutaciones respecto al humano se encuentran remarcadas en verde. El símbolo  significa interacción de tipo apilamiento. El símbolo H_{sc} significa la presencia de un puente de hidrógeno entre el inhibidor y la cadena lateral del residuo.

Se puede observar que el patógeno que más cambios presenta respecto al humano es *S. aureus*, seguido por *L. monocytogenes*. El resto de los patógenos tuvieron el mismo número de cambios, aunque no siempre en las mismas posiciones. En la Figura 31 se muestra la estructura química de la aurovertina. El residuo $\beta_{TP-A338}$, que interactúa de forma hidrofóbica con la aurovertina, se encuentra conservado en *T. cruzi*, *M. tuberculosis* y *C. diphtheriae*. En *S. aureus*, el residuo se encuentra mutado por K. Este cambio de un residuo hidrofóbico pequeño a uno más grande y cargado podría tener implicaciones estéricas, además de brindar un grupo amino, el cual puede formar puentes de hidrógeno con moléculas farmacológicas. El residuo $\beta_{TP-I339}$ presenta mutaciones conservativas en estos seis patógenos.

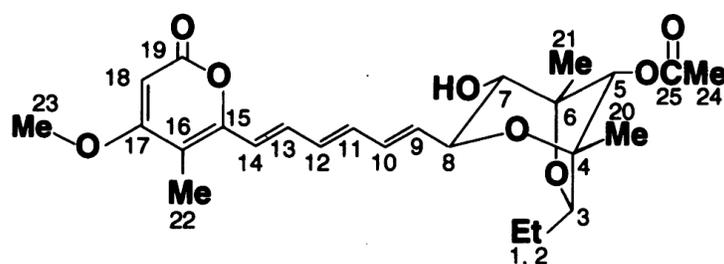


Figura 31. Estructura de la aurovertina B. Los átomos de carbono se encuentran numerados. La numeración de los átomos de oxígeno sigue a la del átomo de carbono al cual se encuentran unidos. Cuando un oxígeno está unido a dos carbonos, el número menor es usado. Tomado de [80].

El residuo $\beta_{TP-L342}$ tiene interacción tipo van der Waals con el átomo C₈ de la aurovertina. En esta posición, *T. cruzi* presenta una S. El cambio de un residuo no polar a uno polar resulta interesante, ya que, además de crear una pequeña oquedad por ser un grupo más pequeño, aporta un grupo hidroxilo el cual podría servir como anclaje para formar un puente de hidrógeno nuevo, permitiendo por tanto generar un cambio importante en el modo de unión a una potencial molécula farmacológica. *S. aureus* presentó en esa posición una M. Aquí, se conserva el carácter hidrofóbico, sin embargo, el tamaño cambia, lo cual puede causar impedimento estérico para la unión de aurovertina. En *M. tuberculosis* y en *C. diphtheriae* se tiene una K, es decir, un residuo cargado que además cambia la topología del sitio. *L. monocytogenes* retiene el residuo observado en humano. El residuo $\beta_{TP-Q411}$ forma un puente de hidrógeno con el O₂₅ de la aurovertina. En *T. cruzi*, este residuo cambia por T, cambio que ocasionaría la pérdida del puente de hidrógeno por acortamiento de la cadena lateral. En *L. monocytogenes*, el residuo que se encuentra en esa posición es R, la cual tendría la posibilidad de formar el puente de hidrógeno con el O₂₅, además de aportar un grupo guanidinio que podría ser explotado para la formación de puentes de hidrógeno adicionales con moléculas farmacológicas. En *M. tuberculosis* y *C. diphtheriae* se encuentra un E. En este caso se invierte la carga, lo que imposibilita la formación del puente de hidrógeno con el O₂₅ (carbonilo) de la aurovertina. No obstante, podría resultar un punto

farmacofórico para aceptar la donación de un hidrógeno por parte de un nuevo inhibidor. El residuo $\beta_{TP-K382}$ se encuentra conservado en *T. cruzi*, *M. tuberculosis* y *C. diphtheriae*. Este residuo se encuentra mutado por R en *S. aureus*. Debido a que no hay interacción con puentes de hidrógeno entre este residuo y la aurovertina, el cambio podría no afectar las interacciones hidrofóbicas. En *L. monocytogenes*, en esta posición se encuentra una M. El mismo efecto sugerido para la R aplica para este residuo. En *C. trachomatis* se encuentra una S en esta posición, la cual contribuye con un grupo hidroxilo capaz de donar puentes de hidrógeno. El residuo $\beta_{TP-R412}$ forma dos puentes de hidrógeno con los átomos aceptores de puentes de hidrógeno O₁₅ y O₁₉ de la aurovertina. En *T. cruzi*, una lisina se encuentra en esa posición, la cual podría formar un puente de hidrógeno con O₁₅. *S. aureus* presenta F en esa posición. El cambio de un residuo cargado a uno aromático hidrofóbico imposibilitaría la formación del puente de hidrógeno, sin embargo, aportaría un ambiente para apilamiento hidrofóbico. En *L. monocytogenes* existe una N. Al ser de cadena más corta que la R, este residuo tampoco sería capaz de formar puente de hidrógeno con la aurovertina, a no ser que el sitio permita un reposicionamiento del residuo. *C. trachomatis* presenta Q en dicha posición. Este residuo, a pesar de también presentar un grupo donador de puente de hidrógeno, quizá por su longitud tampoco alcance a formar el puente de hidrógeno con la aurovertina. *M. tuberculosis* y *C. diphtheriae* presentan el mismo residuo que en humano. Finalmente, el otro residuo importante para la interacción con aurovertina es $\beta_{TP-Y458}$, el cual interactúa a través de un apilamiento con el anillo aromático del antibiótico. En *S. aureus* y *C. trachomatis*, en esa posición se encuentra una R. El cambio por un residuo cargado hace que se pierda la interacción tipo apilamiento con la aurovertina. Además, el grupo guanidinio otorga un nuevo punto para formación de puentes de hidrógeno. *L. monocytogenes* presenta una leucina en esa posición. Este cambio también evita la interacción tipo apilamiento y cambia la topología del sitio de unión a aurovertina. En *C. diphtheriae* se encuentra una N, la cual también pierde la interacción tipo apilamiento, por otro lado, brinda un grupo amida capaz de formar puentes de hidrógeno. En *M. tuberculosis* se tiene una F. Este residuo es capaz de interactuar con la aurovertina mediante apilamiento. *T. cruzi* presenta conservación del residuo con respecto al humano.

En la Figura 32 se muestra la estructura química del resveratrol. En la Figura 33 se muestra el alineamiento del sitio de unión a polifenoles de los seis patógenos que presentaron menor identidad con respecto al humano. Cabe recalcar que dicho sitio de unión fue el que presentó el menor grado de variación con respecto al humano. Aquí, el patógeno que más cambios presentó fue *L. monocytogenes*. Como se comentó anteriormente, las interacciones entre los polifenoles y la enzima son mayoritariamente de tipo hidrofóbico.

El residuo $\beta_{TP-S277}$ se encuentra conservado en cuatro de los seis patógenos, siendo los cambios por alanina en *T. cruzi* y por isoleucina en *L. monocytogenes*. Ambos cambios son por residuos hidrofóbicos pequeños, lo que causaría que se perdieran algunas interacciones entre el inhibidor y la enzima. El residuo $\beta_{TP-A278}$ se encuentra conservado en los patógenos seleccionados, con excepción de *L. monocytogenes*, que presenta una treonina en esa

posición. Este cambio introduce un grupo alcohol, el cual puede actuar como donador o receptor de puente de hidrógeno.

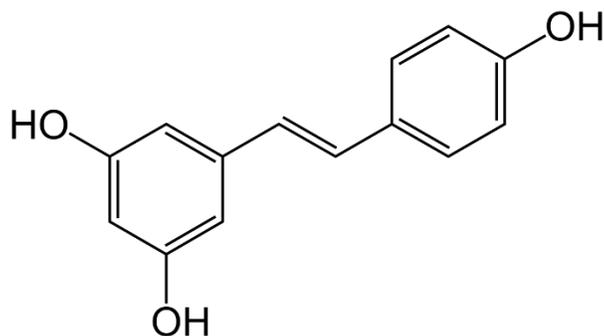


Figura 32. Estructura química del resveratrol.

	277	278	279	321	252	253	256	257	260	261	263	267	268	
<i>H. sapiens</i>	S	A	V	A	-	R	T	A	V	K	E	I	S	G
<i>T. cruzi</i>	A	A	V	A	S	K	T	S	G	A	A	I	S	A
<i>S. aureus</i>	S	A	V	A	M	R	A	A	E	Q	Q	T	G	G
<i>L. monocytogenes</i>	I	T	G	S	M	R	A	A	A	Q	E	T	G	G
<i>M. tuberculosis</i>	S	A	V	A	A	R	E	A	Q	Q	E	S	G	G
<i>C. trachomatis</i>	S	A	V	A	A	Q	A	S	S	N	E	I	G	G
<i>C. diphtheriae</i>	S	A	V	A	M	Q	A	A	Q	Q	E	T	G	G

Figura 33. Alineamiento de secuencias del sitio de unión a polifenoles. Los residuos que se encuentran hasta 4 Å de distancia se muestran con numeración en color azul. Los residuos importantes para la unión al inhibidor se encuentran remarcados con numeración resaltada en amarillo. Las mutaciones respecto al humano se encuentran remarcadas en verde.

El residuo β_{TP} -V₂₇₉ también se encuentra conservado. *L. monocytogenes* presenta una glicina en esa posición. Es posible que se pierda la interacción hidrofóbica en ese punto debido a que la glicina no presenta cadena lateral. El residuo γ -A₂₅₆ se encuentra conservado, salvo en *T. cruzi* y *C. trachomatis*; ambos presentan S en dicha posición, lo que ocasionaría un efecto similar al descrito para treonina. El residuo γ -K₂₆₀ se encuentra reemplazado por alanina en *T. cruzi*. A pesar de que la interacción del inhibidor con lisina no es electrostática, el cambio por un residuo no polar de menor longitud ocasiona la disminución de interacciones hidrofóbicas, así como la pérdida del grupo amino y los potenciales puentes de hidrógeno que podría aportar. En *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. diphtheriae* y *M. tuberculosis*, se encuentra una Q en esa posición. Aunque la Q presenta una cadena más corta que la R, podrían conservarse algunas de las interacciones hidrofóbicas, además de aportar un grupo amida que puede ser utilizado para formar puentes de hidrógeno. En *C. trachomatis*, este residuo se encuentra sustituido por una N. Este residuo tendría prácticamente los mismos efectos que el descrito anteriormente. El

residuo γ -I₂₆₃ se encuentra conservado en *T. cruzi* y *C. trachomatis*. En *S. aureus*, *C. diphtheriae* y en *L. monocytogenes*, el residuo se encuentra cambiado por treonina, mientras que en *M. tuberculosis* se encuentra una S. Los cambios a residuos cargados o polares podrían disminuir la interacción con el ligando, posiblemente al no poder acomodarlo de manera óptima para que logre interactuar con el resto de los residuos del sitio de unión.

En la Figura 34 se muestra el alineamiento del sitio de unión a efraptina de los patógenos seleccionados con respecto al humano. En esta figura observamos que el patógeno que presentó más cambios fue *L. monocytogenes*, seguido de *C. diphtheriae*, *T. cruzi*, *C. trachomatis* y *M. tuberculosis* tuvieron el mismo número de cambios, y *S. aureus* fue el patógeno que presentó el menor número de cambios. Las interacciones entre la efraptina y la enzima son mayoritariamente hidrofóbicas, además de un solo puente de hidrógeno que es evidente en la estructura cristalográfica del complejo de F₁ con el inhibidor. El residuo α _E-A₃₃₁ se encuentra conservado en *S. aureus*, *M. tuberculosis*, *C. diphtheriae* y *C. trachomatis*. Este residuo se encuentra sustituido por S en *T. cruzi* y en *L. monocytogenes*. Este cambio introduce un grupo alcohol, el cual puede actuar como donador o receptor de puente de hidrógeno. El residuo α _E-G₃₃₂ se encuentra conservado en *S. aureus*. En *T. cruzi*, *M. tuberculosis*, *C. diphtheriae* y *C. trachomatis*, el residuo se encuentra sustituido por N, incorporando un grupo amida, el cual puede formar puentes de hidrógeno con moléculas farmacológicas. En *L. monocytogenes*, el residuo se encuentra mutado por aspartato, el cual integra un grupo carboxilo. El residuo α _E-S₃₃₅ presenta mutaciones conservativas, salvo en *C. diphtheriae*, las cuales no tendrían un impacto importante en el reconocimiento del péptido o alguna otra molécula. En *C. diphtheriae*, este residuo se encuentra sustituido por aspartato, el cual aporta un grupo carboxilo que puede formar puentes de hidrógeno con alguna molécula farmacológica de forma especie-específica. El residuo α _E-L₃₆₉ se encuentra conservado en *T. cruzi*. En *L. monocytogenes*, *C. diphtheriae* y *M. tuberculosis* se encuentra reemplazado por valina, y en *C. trachomatis* por isoleucina, lo cual no tendría algún efecto importante. En *S. aureus*, se encuentra una Q en dicha posición. Los mismos efectos descritos para la N aplican para este residuo. El residuo α _{TP}-T₃₅₄ se encuentra conservado en *T. cruzi* y *M. tuberculosis*. En los demás organismos se encuentra una S en dicha posición. El residuo α _{TP}-Y₃₅₈ se encuentra mutado por N en *L. monocytogenes*, *M. tuberculosis*, *C. diphtheriae* y *C. trachomatis*. En *T. cruzi*, se encuentra una treonina en esa posición. Debido a que la treonina tiene una longitud menor a la tirosina, se pierden contactos hidrofóbicos con el péptido inhibidor. El cambio por F en *S. aureus* implica un cambio por la pérdida del grupo hidroxilo. El residuo β _E-T₃₁₇ se encuentra conservado en *C. trachomatis* y presenta mutaciones conservativas en *T. cruzi* y en *L. monocytogenes*. *S. aureus*, *C. diphtheriae* y *M. tuberculosis* presentan tirosina en la misma posición. La inserción de un grupo fenol deriva en la posibilidad de utilizar dicho grupo para generar puentes de hidrógeno y/o apilamiento hidrofóbico con un posible inhibidor selectivo. El residuo β _E-P₃₂₂ se encuentra conservado salvo en *L. monocytogenes*, patógeno que presenta alanina en esa posición. Aunque la prolina no interactúa directamente con el péptido, es sabido que posee preferencias para adoptar valores en los ángulos phi y psi particulares, por lo que el cambio por alanina podría

En la Figura 35 se muestra la estructura química de la bedaquilina. En la Figura 36 se muestra el alineamiento para el sitio de unión de bedaquilina. Este sitio es en el que más cambios se observaron entre patógenos y humano. Notamos que el patógeno que más cambios presenta con respecto al humano es *C. trachomatis*, seguido por *S. aureus* y *C. diphtheriae*. *L. monocytogenes* y *M. tuberculosis* tuvieron el mismo número de cambios en distintas posiciones. *T. cruzi* no pudo ser analizado ya que no se cuenta con la secuencia de la subunidad c. Debido a que este inhibidor no afecta a la enzima de humano, se analizan los residuos que podrían servir como puntos para el diseño de fármacos especie-específicos, tomando como base aquellos residuos importantes en la enzima micobacteriana.

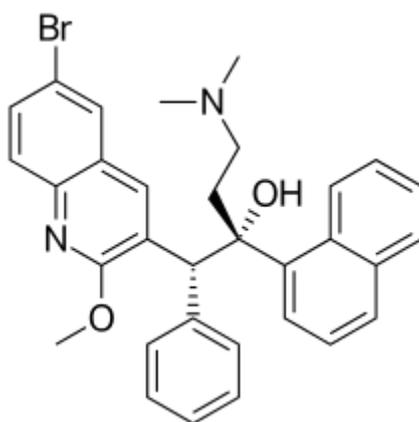


Figura 35. Estructura química de la bedaquilina

	32	58	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	74
<i>H. sapiens</i>	I	I	F	A	L	S	E	A	M	G	L	F	C	L	V
<i>S. aureus</i>	N	F	V	G	L	V	E	A	L	P	I	I	G	V	I
<i>L. monocytogenes</i>	Q	F	L	L	M	I	V	A	L	M	L	F	A	L	I
<i>M. tuberculosis</i>	D	F	V	G	L	V	E	A	A	Y	F	I	N	L	F
<i>C. trachomatis</i>	D	L	I	G	L	I	E	S	I	P	I	I	A	I	I
<i>C. diphtheriae</i>	I	F	I	A	F	V	E	A	L	A	G	L	L	A	I

Figura 36. Alineamiento de secuencias del sitio de unión a bedaquilina. Los residuos que se encuentran hasta 4 Å de distancia se muestran con numeración en color azul. Los residuos importantes para la unión al inhibidor se encuentran remarcados con numeración resaltada en amarillo. Las mutaciones respecto al humano se encuentran remarcadas en verde.

Los residuos c-F₆₁, c-A₆₂, c-S₆₄, c-M₆₇ y c-L₇₂ presentan mutaciones conservativas en los seis patógenos que presentan menor identidad. El residuo c-E₆₅ está conservado en todos estos patógenos, salvo *L. monocytogenes*, el cual presenta una valina en esa posición. El residuo c-A₆₆ también se encuentra conservado, salvo en *C. trachomatis*, que presenta S en esa

posición. El residuo c-G₆₈ está mutado por prolina en *S. aureus* y *C. trachomatis*, por M en *L. monocytogenes*, por tirosina en *M. tuberculosis* y por alanina en *C. diphtheriae*. El residuo c-L₆₉ presenta mutaciones conservativas, salvo en *M. tuberculosis*, que presenta F en esta posición. El residuo c-F₇₀ se encuentra conservado en *L. monocytogenes*, mientras que el resto de patógenos presentan mutaciones conservativas por residuos pequeños e hidrofóbicos. El residuo c-C₇₁ se encuentra mutado por residuos hidrofóbicos pequeños, con excepción de *M. tuberculosis*, patógeno que presenta N en dicha posición.

Después de analizar diferentes sitios de unión explotados por la naturaleza para inhibir a la ATP sintasa, encontramos que existen diferencias en las secuencias de enzimas patogénicas con respecto al humano que potencialmente pueden ser usadas para diseñar fármacos especie-específicos. Los seis patógenos con mayor divergencia presentan residuos que cambian significativamente la estereoquímica del sitio. Haciendo un balance global, *L. monocytogenes* fue el patógeno que más cambios presentó con respecto al humano en los cuatro sitios analizados, con un total de 17 mutaciones no conservativas sumadas en los cuatro sitios, cambios que en principio cambiarían el modo de unión, y por lo tanto serían potencialmente explotables. *C. trachomatis* fue el segundo en divergencia (14 mutaciones no conservativas), seguido por *M. tuberculosis* (12 mutaciones no conservativas), *C. diphtheriae* y *T. cruzi* (11 mutaciones no conservativas cada uno) y finalmente *S. aureus* (10 mutaciones no conservativas). Por tanto, este análisis conduciría a la conclusión de que *L. monocytogenes* es la especie que más cambios muestra con respecto al humano, siendo por tanto el patógeno que, según este criterio, más factibilidad habría para generar una molécula tipo fármaco inhibitoria de la ATP sintasa especie-específico. Sin embargo, existen otros factores que deben tomarse en cuenta al momento de seleccionar los patógenos que serán caracterizados bioquímica y biofísicamente, incluyendo variables como el impacto poblacional, importancia médica, grado de éxito de los tratamientos disponibles y resistencia a antibióticos.

L. monocytogenes es una bacteria que se desarrolla intracelularmente y es causante de listeriosis. Es uno de los patógenos causantes de infecciones alimentarias más violentos, con una tasa de mortalidad entre 20 y 30%. *L. monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, entre 0.4 y 0.5 micrones de ancho por 0.5 a 1.2 micrones de largo, anaerobio facultativo, capaz de proliferar en un amplio rango de temperaturas (1 a 45 °C) y elevada concentración de sal. La enfermedad humana generada por *L. monocytogenes* generalmente afecta a personas embarazadas o inmunodeprimidas. Evidencias recientes sugieren que un número sustancial de casos de listeriosis humana se pueden atribuir a la transmisión por los alimentos de este bacilo. Brotes de *Listeria* se han asociado a fuentes tales como leche contaminada, quesos blandos, verduras y carne. A diferencia de muchos patógenos transmitidos por los alimentos que causan primeramente una enfermedad gastrointestinal, *L. monocytogenes* causa síndromes invasivos como meningitis, sepsis y abortos [161]–[163]. A pesar de que es el microorganismo que presentó más cambios en los sitios de unión a inhibidores, durante el desarrollo del presente trabajo se encontró que este patógeno cuenta con otro operón que sintetiza una ATP sintasa diferente a la ocupada en nuestro análisis, la cual tiene una identidad mayor respecto al humano (70%), cuyos residuos

correspondientes a los sitios de inhibidores muestran una alta identidad a los de humano. Aún se desconoce el grado de expresión de las dos enzimas, por lo cual descartamos a este patógeno como candidato.

C. trachomatis es el patógeno de transmisión sexual más común en humanos, con 89 millones de nuevos casos estimados en el mundo cada año. Se declaran alrededor de un millón de casos anuales en USA. *C. trachomatis* es una bacteria Gram-negativa, con forma ovoide y no móvil. Además, es un parásito obligado que infecta sólo a humanos; causa tracoma y ceguera, infecciones óculogenitales y neumonías. El tratamiento depende del sitio de infección, edad y si existe otra infección, aunque generalmente se trata con azitromicina, eritromicina y doxiciclina, con un porcentaje de éxito cercano a 98% [114], [164], [165]. Debido a que este microorganismo puede erradicarse del sistema con ayuda del tratamiento actual, descartamos utilizarlo para su posterior estudio.

T. cruzi es un protista de la clase Zoomastigophorea, familia Trypanosomatidea, caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria, cuyo genoma se encuentra ordenado en una compleja y compacta región (dentro de la propia mitocondria, y cerca de la base del flagelo), denominado cinetoplasto. Es un parásito intracelular con un ciclo de vida que involucra vertebrados e invertebrados. Es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis). Esta enfermedad se produce en los trópicos y regiones subtropicales de América continental. El parásito emplea a la chinche triatoma (del beso) como vector. Cuando la chinche triatoma ingiere sangre, los parásitos se eliminan por las heces del insecto. Algunos tripanosomas penetran en el torrente sanguíneo a través de la picadura e invaden el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos y el sistema nervioso central, donde se multiplican y destruyen las células parasitadas. En algunas partes de América Latina, un alto porcentaje de enfermedades cardíacas son debidas a células cardíacas parasitadas. En la actualidad no se dispone de algún medicamento para el tratamiento efectivo de la enfermedad de Chagas, aunque el nifurtimox y el benznidazol han mostrado cierta utilidad. Las vacunas no son útiles porque el parásito es capaz de modificar su revestimiento proteico y evadir la respuesta inmunitaria [166]–[169]. A pesar de que este patógeno tiene una alta importancia médica, la sobreexpresión de proteínas eucariontes resulta muy difícil, por lo que descartamos en primera instancia utilizar a este patógeno para su posterior estudio. No obstante, queda abierta la posibilidad de estudiar la enzima purificada directamente del Trypanosoma.

M. tuberculosis es una bacteria aerobio obligada causante de tuberculosis. Esta bacteria cuenta con una cubierta cerosa en su superficie celular primaria debido a la presencia de ácido micólico. La cubierta referida causa que las células sean impenetrables a la tinción de Gram. *M. tuberculosis* requiere de mucho oxígeno e infecta primariamente el tracto respiratorio de mamíferos. La tuberculosis genera hasta 30% de mortalidad. El tratamiento típico contra tuberculosis se realiza administrando isoniazida junto con fosfato de piridoxal, rifampicina, pirazinamida y etambutol. Un problema que se está extendiendo en los últimos años es la aparición de cepas resistentes a antibióticos. Actualmente el tratamiento contra estas bacterias resistentes se basa en la administración de bedaquilina en conjunto con

otros fármacos [154], [155], [170]–[174]. No obstante, el tratamiento con este fármaco de nueva generación es muy costoso (~30,000 USD). Por ende, este microorganismo es un buen candidato para diseñar fármacos contra su ATP sintasa.

C. diphtheriae es una bacteria patogénica aeróbica, no móvil, no encapsulada, Gram positiva, causante de difteria en humanos, lo cual resulta de la producción de la toxina diftérica en conjunto con la infección de un bacteriófago, el cual provee el gen para producir dicha toxina. Es una enfermedad históricamente mortal, especialmente para niños, cuya tasa de mortalidad antes del desarrollo de la vacuna y de la antitoxina se encontraba cerca de 80%. En la actualidad, esta enfermedad es manejable. El Centro de Control de Enfermedades recomienda utilizar metronidazol, eritromicina y penicilina G procaína. Actualmente la tasa de mortalidad se encuentra entre 5 y 10% [175]–[178]. Al igual que *M. tuberculosis*, este microorganismo también es un buen candidato para el diseño de fármacos especie-específicos.

El género *Staphylococcus* está compuesto por bacterias Gram positivas. Este género incluye al menos 40 especies. De estas, nueve tienen dos subespecies, una tiene tres subespecies, y una tiene cuatro subespecies. La mayoría de estos microorganismos son inoos y residen normalmente sobre la piel y membranas mucosas de humanos y otros organismos. Su distribución es global y son componentes de la flora microbiana del suelo [179]. Un miembro representativo de este género es *S. aureus*. Este microorganismo generalmente se encuentra en el tracto respiratorio y sobre la piel. Aunque no siempre es patogénico, es una causa común de infecciones de la piel como abscesos, infecciones respiratorias como sinusitis, e intoxicación alimentaria. Las cepas patogénicas generalmente promueven infecciones al producir factores de virulencia tales como toxinas y la expresión de proteínas sobre la superficie celular que se adhieren e inactivan a los anticuerpos. La aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos, tales como metilina, es un problema mundial en medicina clínica [91], [179]–[181]. Este último microorganismo es de especial interés por su resistencia y mecanismos de resistencia a fármacos, por lo que es un excelente candidato para el diseño de fármacos especie-específicos.

Perspectivas

A partir del análisis de esta información, concluimos que los organismos con mejor perspectiva para ser estudiados en el laboratorio, debido a su impacto e importancia, son *C. diphtheriae*, *S. aureus* y *M. tuberculosis*. Se propone que dicho estudio contemple la expresión de las subunidades dinámicas aisladas, así como los sectores F_1 y F_0 de cada patógeno. Para ello se diseñarán y se producirán plásmidos que permitan la expresión heteróloga en sistemas bacterianos. Una vez obtenidas las proteínas recombinantes puras, se procederá a su caracterización bioquímica y biofísica, por ejemplo: determinar los parámetros termodinámicos de la unión a nucleótidos y a inhibidores mediante métodos

calorimétricos y espectrofotométricos. También se pretende resolver la estructura tridimensional mediante cristalografía de rayos X o utilizando modelado molecular. El siguiente paso será el diseño de fármacos que se unan de manera específica e inhiban la actividad de las ATP sintasas de los patógenos considerados.

Capítulo 4. Conclusiones

Del análisis de las interacciones entre complejos enzima-inhibidor, utilizando las estructuras cristalinas disponibles, se pueden encontrar diferencias en las secuencias de los sitios de unión a inhibidores de organismos patógenos. Estas diferencias podrían ser usadas como punto de anclaje para el diseño de fármacos especie-específicos.

Realizando un análisis más fino, es posible conocer la conservación de cada uno de los residuos que componen dicho sitio de unión, lo que permite una mejor selección de enzimas de patógenos candidatos para el desarrollo de fármacos especie-específico.

En este trabajo encontramos que las F_0F_1 -ATP sintasas de *S. aureus*, *C. diphtheriae* y *M. tuberculosis* son las que presentan mayor diferencia respecto a la enzima de humano y por ello son las mejores candidatas para su estudio en el laboratorio e *in silico*.

Aunque las enzimas se encuentren altamente conservadas, se pueden encontrar puntos farmacofóricos que sean únicos para determinadas especies.

Dicha metodología puede aplicarse a otras enzimas diana a pesar de que se encuentren conservadas en diversos organismos.

Referencias

- [1] “General Background: About Antibiotic Resistance.” [Online]. Available: http://emerald.tufts.edu/med/apua/about_issue/about_antibioticres.shtml. [Accessed: 07-Sep-2017].
- [2] J. M. Munita and C. A. Arias, “Mechanisms of Antibiotic Resistance,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 4, no. 2, Apr. 2016.
- [3] “Antimicrobial resistance,” 2016. .
- [4] D. N. Wilson, “Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 12, no. 1, pp. 35–48, Dec. 2013.
- [5] E. P. Abraham and E. Chain, “An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940.,” *Rev. Infect. Dis.*, vol. 10, no. 4, pp. 677–8.
- [6] V. M. D’Costa *et al.*, “Antibiotic resistance is ancient,” *Nature*, vol. 477, no. 7365, pp. 457–461, Aug. 2011.
- [7] J.-M. Pagès, C. E. James, and M. Winterhalter, “The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 12, pp. 893–903, Dec. 2008.
- [8] S. R. Connell, D. M. Tracz, K. H. Nierhaus, and D. E. Taylor, “Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 47, no. 12, pp. 3675–81, Dec. 2003.
- [9] C. A. Arias *et al.*, “Genetic Basis for In Vivo Daptomycin Resistance in Enterococci,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 365, no. 10, pp. 892–900, Sep. 2011.
- [10] C. T. Walsh and T. A. Wencewicz, “Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective,” *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 67, no. 1, pp. 7–22, Jan. 2014.
- [11] K. Lewis, “Platforms for antibiotic discovery,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 12, no. 5, pp. 371–387, Apr. 2013.
- [12] E. D. Brown and G. D. Wright, “Antibacterial drug discovery in the resistance era,” *Nature*, vol. 529, no. 7586, pp. 336–343, Jan. 2016.
- [13] C. L. Ventola, “The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats,” *P T*, vol. 40, no. 4, pp. 277–83, Apr. 2015.
- [14] J. G. Bartlett, D. N. Gilbert, and B. Spellberg, “Seven Ways to Preserve the Miracle of Antibiotics,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 56, no. 10, pp. 1445–1450, May 2013.
- [15] L. J. Piddock, “The crisis of no new antibiotics—what is the way forward?,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 12, no. 3, pp. 249–253, Mar. 2012.
- [16] Z. Golkar, O. Bagasra, and D. G. Pace, “Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis,” *J. Infect. Dev. Ctries.*, vol. 8, no. 2, pp. 129–36, Feb. 2014.
- [17] I. M. Gould and A. M. Bal, “New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance,” *Virulence*, vol. 4, no. 2, pp. 185–191, Feb. 2013.
- [18] G. D. Wright, “Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery¹,” *Can. J. Microbiol.*, vol. 60, no. 3, pp. 147–154, Mar. 2014.
- [19] J. O’Neill, “Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations,” 2016.
- [20] M. E. A. De Kraker, A. J. Stewardson, and S. Harbarth, “Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050?,” 2016.
- [21] “Health matters: antimicrobial resistance - GOV.UK.” [Online]. Available: <https://www.gov.uk/government/publications/health-matters-antimicrobial-resistance/health-matters-antimicrobial-resistance>. [Accessed: 07-Sep-2017].
- [22] M. J. Pucci and K. Bush, “Investigational antimicrobial agents of 2013,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 26, no. 4, pp. 792–821, Oct. 2013.
- [23] D. N. Wilson, “The A–Z of bacterial translation inhibitors,” *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 44, no. 6, pp. 393–433, Dec. 2009.
- [24] E. M. (Eric M. Scholar and W. B. Pratt, *The antimicrobial drugs*. Oxford University Press, 2000.
- [25] C. Walsh, *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*. American Society of Microbiology, 2003.
- [26] L. Robbel and M. A. Marahiel, “Daptomycin, a Bacterial Lipopeptide Synthesized by a Nonribosomal Machinery,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 36, pp. 27501–27508, Sep. 2010.
- [27] R. H. Baltz, “Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 144–151, Apr. 2009.
- [28] A. Coates, Y. Hu, R. Bax, and C. Page, “The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 1, no. 11, pp. 895–910, Nov. 2002.
- [29] F. Paredes and J. J. Roca, *Offarm*. Doyma.
- [30] D. Tafur and V. Villegas, “Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas,” *Infectio*, vol. 12, no. 3, pp. 217–226, 2008.
- [31] H. Pérez and A. Robles, “Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana,” *Rev. Med. (Puebla)*, vol. 4, no. 4, pp. 186–191, 2013.
- [32] J. R. Knowles, “Enzyme-Catalyzed Phosphoryl Transfer Reactions,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 49, no. 1, pp. 877–919, Jun. 1980.
- [33] S. Budavari, Ed., *The Merck Index*, 13th ed. 2001.
- [34] Z. Ahmad, F. Okafor, S. Azim, and T. F. Laughlin, “ATP synthase: a molecular therapeutic drug target for antimicrobial and antitumor peptides,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, no. 15, pp. 1956–73, 2013.
- [35] S. Nesci, F. Trombetti, V. Ventrella, and A. Pagliarani, “Opposite Rotation Directions in the Synthesis and Hydrolysis of ATP by the ATP Synthase: Hints from a Subunit Asymmetry,” *J.*

- Membr. Biol.*, vol. 248, no. 2, pp. 163–169, Apr. 2015.
- [36] J. E. Walker, “The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown,” *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1817, p. S1, 2012.
- [37] T. M. Devlin, *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, Seventh. United States of America: John Wiley & Sons, Inc, 2006.
- [38] S. Hong and P. L. Pedersen, “ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 72, no. 4, p. 590–641, Table of Contents, 2008.
- [39] W. Junge and N. Nelson, “ATP Synthase,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 84, no. 1, pp. 631–657, 2015.
- [40] R. J. Devenish, M. Prescott, and A. J. W. Rodgers, “The Structure and Function of Mitochondrial F1F0-ATP Synthases,” in *International Review of Cell and Molecular Biology*, vol. 267, no. 50, 2008, pp. 1–58.
- [41] D. Stock, A. G. Leslie, and J. E. Walker, “Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase,” *Science*, vol. 286, no. 5445, pp. 1700–5, 1999.
- [42] B. Ballhausen, K. Altendorf, and G. Deckers-Hebestreit, “Constant c10 ring stoichiometry in the Escherichia coli ATP synthase analyzed by cross-linking,” *J. Bacteriol.*, vol. 191, no. 7, pp. 2400–4, Apr. 2009.
- [43] J. P. Abrahams, A. G. Leslie, R. Lutter, and J. E. Walker, “Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria,” *Nature*, vol. 370, no. 6491, pp. 621–628, 1994.
- [44] D. M. Rees, A. G. W. Leslie, and J. E. Walker, “The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 51, pp. 21597–601, Dec. 2009.
- [45] P. D. Boyer, “The ATP synthase—a splendid molecular machine,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 66, pp. 717–49, 1997.
- [46] T. Xu, V. Pagadala, and D. Mueller, “Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase,” *Microb. Cell*, vol. 2, no. 4, pp. 105–125, Apr. 2015.
- [47] R. E. Mccarty, Y. Evron, and E. A. Johnson, “The Chloroplast ATP Synthase: A Rotary Enzyme?,” *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 51, no. 1, pp. 83–109, Jun. 2000.
- [48] K. J. Dietz *et al.*, “Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level,” *J. Exp. Bot.*, vol. 52, no. 363, pp. 1969–1980, Oct. 2001.
- [49] L. K. Lee, A. G. Stewart, M. Donohoe, R. A. Bernal, and D. Stock, “The structure of the peripheral stalk of Thermus thermophilus H⁺-ATPase/synthase,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 17, no. 3, pp. 373–8, Mar. 2010.
- [50] M. E. Finbow and M. A. Harrison, “The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes,” *Biochem. J.*, vol. 324, pp. 697–712, 1997.
- [51] M. T. Mazhab-Jafari and J. L. Rubinstein, “Cryo-EM studies of the structure and dynamics of vacuolar-type ATPases,” *Sci. Adv.*, vol. 2, no. 7, pp. e1600725–e1600725, Jul. 2016.
- [52] V. Marshansky, J. L. Rubinstein, and G. Grüber, “Eukaryotic V-ATPase: Novel structural findings and functional insights,” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, vol. 1837, no. 6. Elsevier, pp. 857–879, 01-Jun-2014.
- [53] W. Kühlbrandt and K. M. Davies, “Rotary ATPases: A New Twist to an Ancient Machine,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 41, no. 1, pp. 106–116, Jan. 2016.
- [54] R. H. Fillingame, C. M. Angevine, and O. Y. Dmitriev, “Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase,” *FEBS Lett.*, vol. 555, no. 1, pp. 29–34, 2003.
- [55] C. von Ballmoos, G. M. Cook, and P. Dimroth, “Unique Rotary ATP Synthase and Its Biological Diversity,” *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 37, no. 1, pp. 43–64, Jun. 2008.
- [56] K. Altendorf, W. Stalz, J. Greie, and G. Deckers-Hebestreit, “Structure and function of the F(o) complex of the ATP synthase from Escherichia coli,” *J. Exp. Biol.*, vol. 203, no. Pt 1, pp. 19–28, Jan. 2000.
- [57] P. A. Del Rizzo, Y. Bi, S. D. Dunn, and B. H. Shilton, “The ‘Second Stalk’ of Escherichia coli ATP Synthase: Structure of the Isolated Dimerization Domain † · ‡,” *Biochemistry*, vol. 41, no. 21, pp. 6875–6884, May 2002.
- [58] M. Revington, S. D. Dunn, and G. S. Shaw, “Folding and stability of the b subunit of the F₁F₀ ATP synthase,” *Protein Sci.*, vol. 11, no. 5, pp. 1227–1238, May 2002.
- [59] R. I. Menz, J. E. Walker, and A. G. W. Leslie, “Structure of bovine mitochondrial F1-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: Implications for the mechanism of rotary catalysis,” *Cell*, vol. 106, no. 3, pp. 331–341, 2001.
- [60] G. Groth and E. Pohl, “The structure of the chloroplast F1-ATPase at 3.2 Å resolution,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 2, pp. 1345–52, Jan. 2001.
- [61] O. Hahn-Herrera, G. Salcedo, X. Barril, and E. García-Hernández, “Inherent conformational flexibility of F1-ATPase α -subunit,” *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1857, no. 9, pp. 1392–1402, 2016.
- [62] J. E. Walker, M. Saraste, M. J. Runswick, and N. J. Gay, “Distantly related sequences in the α - and δ -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold,” *EMBO J.*, vol. 1, no. 8, pp. 945–951, 1982.
- [63] P. I. Hanson and S. W. Whiteheart, “AAA+ proteins: have engine, will work,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, no. 7, pp. 519–529, Jul. 2005.
- [64] K. Y. Hara, H. Noji, D. Bald, R. Yasuda, K. J. Kinoshita, and M. Yoshida, “The role of the DELSEED motif of the beta subunit in rotation of F1-ATPase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 19, pp.

- 14260–14263, May 2000.
- [65] P. D. Boyer, “The binding change mechanism for ATP synthase - Some probabilities and possibilities,” *BBA - Bioenergetics*, vol. 1140, no. 3, pp. 215–250, 1993.
- [66] T. Masaike, F. Koyama-Horibe, K. Oiwa, M. Yoshida, and T. Nishizaka, “Cooperative three-step motions in catalytic subunits of F(1)-ATPase correlate with 80 degrees and 40 degrees substep rotations,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 15, no. 12, pp. 1326–1333, 2008.
- [67] R. Shimo-kon, E. Muneyuki, H. Sakai, K. Adachi, and M. Yoshida, “Chemo-Mechanical Coupling in F 1 -ATPase Revealed by Catalytic Site Occupancy during Catalysis,” *Biophysj*, vol. 98, no. 7, pp. 1227–1236, 2010.
- [68] D. M. Rees, M. G. Montgomery, A. G. W. Leslie, and J. E. Walker, “Structural evidence of a new catalytic intermediate in the pathway of ATP hydrolysis by F1-ATPase from bovine heart mitochondria,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 28, pp. 11139–43, 2012.
- [69] C. Schmidt, M. Zhou, H. Marriott, N. Morgner, A. Politis, and C. V Robinson, “Comparative cross-linking and mass spectrometry of an intact F-type ATPase suggest a role for phosphorylation,” *Nat. Commun.*, vol. 4, no. May, p. 1985, 2013.
- [70] N. Watanabe, “Fluorescence single-molecule imaging of actin turnover and regulatory mechanisms,” *Methods Enzymol.*, vol. 505, pp. 219–232, 2012.
- [71] A. Krahl, “Linking structural features from mitochondrial and bacterial F-type ATP synthases to their distinct mechanisms of ATPase inhibition,” *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 119, no. 1, pp. 94–102, 2015.
- [72] D. Bald, H. Noji, M. Yoshida, Y. Hirono-Hara, and T. Hisabori, “Redox Regulation of the Rotation of F1-ATP Synthase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 43, pp. 39505–39507, 2001.
- [73] J. Nakamura, M. Fujikawa, and M. Yoshida, “IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice,” *Biosci. Rep.*, vol. 33, no. 5, pp. 10–12, 2013.
- [74] Y. Kato-Yamada and M. Yoshida, “Isolated epsilon subunit of thermophilic F1-ATPase binds ATP,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 38, pp. 36013–36016, 2003.
- [75] H. Yagi *et al.*, “Structures of the thermophilic F1-ATPase subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F1,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 27, pp. 11233–11238, 2007.
- [76] Y. Kato-yamada, “Isolated e subunit of Bacillus subtilis F 1 -ATPase binds ATP,” *Structure*, vol. 579, pp. 6875–6878, 2005.
- [77] A. R. Lax, H. S. Shepherd, and J. V Edwards, “Tentoxin, a Chlorosis-Inducing Toxin from Alternaria as a Potential Herbicide,” *Weed Technol.*, vol. 2, no. 4, pp. 540–544, 1988.
- [78] C. J. Arntzen, “Inhibition of photophosphorylation by tentoxin, a cyclic tetrapeptide,” *BBA - Bioenerg.*, vol. 283, no. 3, pp. 539–542, 1972.
- [79] a. R. Bandani, B. P. S. Khambay, J. L. Faull, R. Newton, M. Deadman, and T. M. Butt, “Production of efrapeptins by Tolypocladium species and evaluation of their insecticidal and antimicrobial properties,” *Mycol. Res.*, vol. 104, no. 5, pp. 537–544, 2000.
- [80] J. P. Abrahams, S. K. Buchanan, M. J. Van Raaij, I. M. Fearnley, A. G. W. Leslie, and J. E. Walker, “The structure of bovine F1-ATPase complexed with the peptide antibiotic efrapeptin,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 18, pp. 9420–9424, 1996.
- [81] M. Satre, M. Bof, and P. V. Vignais, “Interaction of Escherichia coli adenosine triphosphatase with aurovertin and citreoviridin: Inhibition and fluorescence studies,” *J. Bacteriol.*, vol. 142, no. 3, pp. 768–776, 1980.
- [82] R. S.-F. Lee, J. Pagan, M. Satre, P. V Vignais, and A. E. Senior, “Identification of a mutation in Escherichia coli F 1 -ATPase β -subunit conferring resistance to aurovertin,” *FEBS Lett.*, vol. 253, no. 1–2, pp. 269–272, Aug. 1989.
- [83] J. R. Gledhill, M. G. Montgomery, A. G. W. Leslie, and J. E. Walker, “Mechanism of inhibition of bovine F 1 -ATPase by resveratrol and related polyphenols,” 2007.
- [84] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, and L. Pouységu, “Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 50, no. 3, pp. 586–621, Jan. 2011.
- [85] J. R. Gledhill and J. E. Walker, “Inhibition sites in F 1 -ATPase from bovine heart mitochondria,” *Biochem. J*, vol. 386, pp. 591–598, 2005.
- [86] M. J. van Raaij, J. P. Abrahams, A. G. W. Leslie, and J. E. Walker, “The structure of bovine F1-ATPase complexed with the antibiotic inhibitor aurovertin B,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 14, pp. 6913–6917, 1996.
- [87] M. Lakshmanan and A. S. Xavier, “Bedaquiline - The first ATP synthase inhibitor against multi drug resistant tuberculosis,” *J. Young Pharm.*, vol. 5, no. 4, pp. 112–5, 2013.
- [88] M. C. Cholo, M. T. Mothiba, B. Fourie, and R. Anderson, “Mechanisms of action and therapeutic efficacies of the lipophilic antimycobacterial agents clofazimine and bedaquiline,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 72, no. 2, pp. 338–353, Feb. 2017.
- [89] A. C. Haagsma *et al.*, “Probing the interaction of the diarylquinoline TMC207 with its target mycobacterial ATP synthase,” *PLoS One*, vol. 6, no. 8, pp. 1–7, Aug. 2011.
- [90] M. R. De Jonge, L. H. M. Koymans, J. E. G. Guillemont, A. Koul, and K. Andries, “A computational model of the inhibition of Mycobacterium tuberculosis ATPase by a new drug candidate R207910,” *Proteins Struct. Funct. Genet.*, vol. 67, no. 4, pp. 971–980, 2007.
- [91] W. Balemans *et al.*, “Novel antibiotics targeting

- respiratory ATP synthesis in gram-positive pathogenic bacteria,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 8, pp. 4131–4139, 2012.
- [92] L. Preiss *et al.*, “Structure of the mycobacterial ATP synthase Fo rotor ring in complex with the anti-TB drug bedaquiline,” *Sci. Adv.*, vol. 1, no. 4, pp. e1500106–e1500106, 2015.
- [93] D. Bald, C. Vilellas, P. Lu, and A. Koul, “Targeting Energy Metabolism in Mycobacterium tuberculosis, a New Paradigm in Antimycobacterial Drug Discovery,” *MBio*, vol. 8, no. 2, pp. e00272–17, Apr. 2017.
- [94] “No Title.” [Online]. Available: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB08903>.
- [95] A. Koul *et al.*, “Delayed bactericidal response of Mycobacterium tuberculosis to bedaquiline involves remodelling of bacterial metabolism,” *Nat. Commun.*, vol. 5, Feb. 2014.
- [96] K. Hards *et al.*, “Bactericidal mode of action of bedaquiline,” *J. Antimicrob. Chemother.*, Mar. 2015.
- [97] P. Bamborough and F. E. Cohen, “Modeling protein-ligand complexes,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 6, no. 2, pp. 236–241, 1996.
- [98] M. M. Hann, A. R. Leach, and G. Harper, “Molecular Complexity and Its Impact on the Probability of Finding Leads for Drug Discovery,” *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, vol. 41, no. 3, pp. 856–864, 2001.
- [99] A. C. Anderson and B. Laboratories, “The process of structure-based drug design,” *Chem. {&} Biol.*, vol. 10, no. 9, pp. 787–797, Sep. 2003.
- [100] T. P. Lybrand, “Ligand-protein docking and rational drug design,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 5, no. 2, pp. 224–228, Apr. 1995.
- [101] E. V Wasmuth and C. D. Lima, “UniProt: the universal protein knowledgebase,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. November 2016, pp. 1–12, 2016.
- [102] S. Pundir, M. Magrane, M. J. Martin, and C. O’Donovan, “Searching and navigating UniProt databases,” *Curr. Protoc. Bioinforma.*, vol. 2015, no. 1.27, p. 1.27.1-1.27.10, 2015.
- [103] UniProt, “The Universal Protein Resource (UniProt),” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. Database, pp. D193–D197, Jan. 2007.
- [104] M. Goujon *et al.*, “A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. SUPPL. 2, pp. 695–699, 2010.
- [105] K. Okonechnikov, O. Golosova, and M. Fursov, “Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit,” *Bioinformatics*, vol. 28, no. 8, pp. 1166–1167, Apr. 2012.
- [106] F. Sievers *et al.*, “Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, no. 1, p. 539, 2011.
- [107] H. McWilliam *et al.*, “Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. Web Server issue, pp. W597–W600, Jul. 2013.
- [108] “Origin (OriginLab, Northampton, MA).”
- [109] “2016 Nationally Notifiable Conditions.” [Online]. Available: <https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/notifiable/2016/>. [Accessed: 01-Feb-2017].
- [110] E. F. Pettersen *et al.*, “UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis,” *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, 2004.
- [111] E. C. Meng, E. F. Pettersen, G. S. Couch, C. C. Huang, and T. E. Ferrin, “Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera,” *BMC Bioinformatics*, vol. 7, p. 339, 2006.
- [112] G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. R. Staley, *Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*, 2nd ed., vol. 2. New York, NY.: Springer-Verlag, 2005.
- [113] D. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, and G. M. Garrity, *Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria (Part C)*, 2nd ed., vol. 2. New York, NY.: Springer-Verlag, 2005.
- [114] N. R. Krieg *et al.*, Eds., *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology: Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*, 2nd ed. New York, NY.: Springer-Verlag, 2010.
- [115] W. Whitman *et al.*, Eds., *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology Volume 5: The Actinobacteria*, 2nd ed. New York, NY.: Springer-Verlag, 2012.
- [116] P. Vos *et al.*, Eds., *Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*, 2nd ed. New York, NY.: Springer-Verlag, 2009.
- [117] F. L. Schuster and G. S. Visvesvara, “Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals,” *Int. J. Parasitol.*, vol. 34, no. 9, pp. 1001–1027, Aug. 2004.
- [118] V. Rougeron, T. de Meeûs, S. K. Ouraga, M. Hide, and A. L. Bañuls, “‘Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)’ in Leishmania after two decades of laboratory and field analyses,” *PLoS Pathog.*, vol. 6, no. 8, pp. 7–8, Aug. 2010.
- [119] G. G. van Dooren and B. Striepen, “The Algal Past and Parasite Present of the Apicoplast,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 67, no. 1, pp. 271–289, 2013.
- [120] D. A. Morrison, “Evolution of the Apicomplexa: where are we now?,” *Trends Parasitol.*, vol. 25, no. 8, pp. 375–382, Aug. 2009.
- [121] J. Sugiyama, K. Hosaka, and S.-O. Suh, “Early diverging Ascomycota: phylogenetic divergence and related evolutionary enigmas,” *Mycologia*, vol. 98, no. 6, pp. 996–1005, 2006.
- [122] V. I. Bilal, *Antibiotic-producing microscopic fungi*. Amsterdam, Elsevier Publishing Co., 1963.
- [123] J. L. Adrio and A. L. Demain, “Fungal biotechnology,” *Int. Microbiol.*, vol. 6, no. 3, pp. 191–199, Sep. 2003.

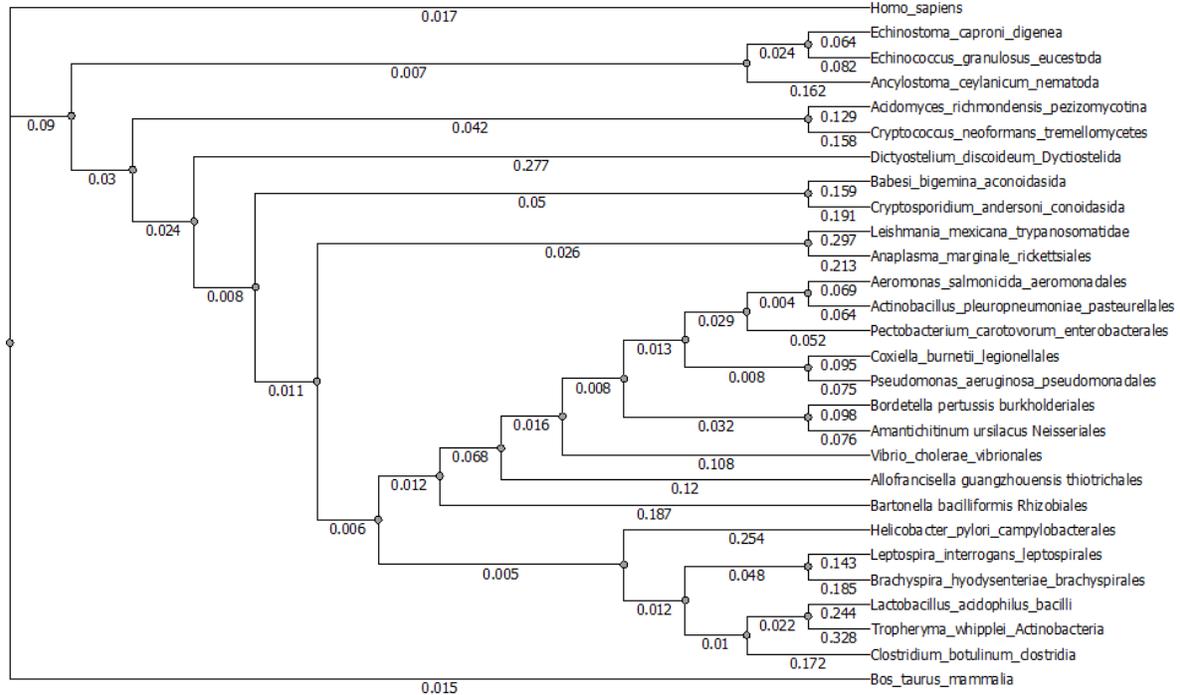
- [124] J. Heitman, "Microbial pathogens in the fungal kingdom," *Fungal Biol. Rev.*, vol. 25, no. 1, pp. 48–60, 2011.
- [125] R. Dean *et al.*, "The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology," *Mol. Plant Pathol.*, vol. 13, no. 4, pp. 414–430, May 2012.
- [126] M. A. Pfaller and D. J. Diekema, "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 20, no. 1, pp. 133–63, Jan. 2007.
- [127] K. Rohde, Rohde, and Klaus, "Platyhelminthes (Flatworms)," in *Encyclopedia of Life Sciences*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- [128] S. V. Zinov'eva, N. I. Vasyukova, and O. L. Ozeretskovskaya, "Biochemical aspects of plant interactions with phytoparasitic nematodes: A review," *Appl. Biochem. Microbiol.*, vol. 40, no. 2, pp. 111–119, Mar. 2004.
- [129] Levine N D, "Nematode parasites of domestic animals and of man.," *Nematode parasites Domest. Anim. man.*, no. 2nd edition, p. 600, 1968.
- [130] S. Brooker, "Estimating the global distribution and disease burden of intestinal nematode infections: Adding up the numbers - A review," *Int. J. Parasitol.*, vol. 40, no. 10, pp. 1137–1144, 2010.
- [131] R. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer, "Beta-subunit of ATP-synthase: a useful marker for studying the phylogenetic relationship of eubacteria," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 134, no. 10, pp. 2815–2821, 1988.
- [132] D. Parsonage, M. K. Al-Shawi, and A. E. Senior, "Directed Mutations of the Strongly Conserved Lysine 155 in the Catalytic Nucleotide-binding Domain of @-Subunit of F1-ATPase from *Escherichia coli*," *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 10, pp. 4740–4744, 1988.
- [133] N. Mnatsakanyan, A. M. Krishnakumar, T. Suzuki, and J. Weber, "The Role of the betaDELSEED-loop of ATP Synthase," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 17, pp. 11336–11345, Apr. 2009.
- [134] M. Tanigawara *et al.*, "Role of the DELSEED Loop in Torque Transmission of F1-ATPase," *Biophys. J.*, vol. 103, pp. 970–978, 2012.
- [135] J. P. Gogarten and L. Taiz, "Evolution of proton pumping ATPases: Rooting the tree of life," *Photosynth. Res.*, vol. 33, no. 2, pp. 137–146, Aug. 1992.
- [136] G. Salcedo, P. Cano-Sánchez, M. T. De Gómez-Puyou, A. Velázquez-Campoy, and E. García-Hernández, "Isolated noncatalytic and catalytic subunits of F1-ATPase exhibit similar, albeit not identical, energetic strategies for recognizing adenosine nucleotides," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1837, no. 1, pp. 44–50, 2014.
- [137] Y. M. Milgrom and R. L. Cross, "Nucleotide Binding Sites on Beef Heart Mitochondrial F1-ATPase," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 5, pp. 23179–23185, 1993.
- [138] J. M. Jault and W. S. Allison, "Slow binding of ATP to noncatalytic nucleotide binding sites which accelerates catalysis is responsible for apparent negative cooperativity exhibited by the bovine mitochondrial F1-ATPase," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 3, pp. 1558–66, Jan. 1993.
- [139] T. Amano *et al.*, "α3β3γ complex of F1-ATPase from thermophilic *Bacillus PS3* can maintain steady-state ATP hydrolysis activity depending on the number of non-catalytic sites," *Biochem. J.*, vol. 343, no. 1, pp. 135–138, Oct. 1999.
- [140] J. Weber and A. E. Senior, "Catalytic mechanism of F1-ATPase," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1319, no. 1, pp. 19–58, Mar. 1997.
- [141] P. Raguathan *et al.*, "The uniqueness of subunit α of mycobacterial F-ATP synthases: An evolutionary variant for niche adaptation," *J. Biol. Chem.*, p. jbc.M117.784959, 2017.
- [142] S. Hong and P. L. Pedersen, "ATP synthases: insights into their motor functions from sequence and structural analyses," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 35, no. 2, pp. 95–120, Apr. 2003.
- [143] S. Mukherjee, A. Warshel, H. Noji, and D. Thirumalai, "Dissecting the role of the γ-subunit in the rotary- chemical coupling and torque generation of F1-ATPase," *PNAS*, vol. 112, no. 9, pp. 2746–2751, 2015.
- [144] S. Nesci, V. Ventrella, F. Trombetti, M. Pirini, and A. Pagliarani, "Thiol oxidation of mitochondrial FO-c subunits: A way to switch off antimicrobial drug targets of the mitochondrial ATP synthase," *Med. Hypotheses*, vol. 83, no. 2, pp. 160–165, 2014.
- [145] G. M. Cook *et al.*, "Purification and biochemical characterization of the F1FO-ATP synthase from thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TA2.A1.," *J. Bacteriol.*, vol. 185, no. 15, pp. 4442–9, Aug. 2003.
- [146] M. E. Girvin and V. K. Rastogi, "Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase," *Nature*, vol. 402, no. 6759, pp. 263–268, Nov. 1999.
- [147] W. Jiang, J. Hermolin, R. H. Fillingame, and P. D. Boyer, "The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10."
- [148] C. von Ballmoos, A. Wiedenmann, and P. Dimroth, "Essentials for ATP synthesis by F1FO ATP synthases," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 78, pp. 649–672, 2009.
- [149] S. Nesci, F. Trombetti, V. Ventrella, and A. Pagliarani, "The c-Ring of the F1FO-ATP Synthase: Facts and Perspectives," *J. Membr. Biol.*, vol. 249, no. 1–2, pp. 11–21, Apr. 2016.
- [150] L. Preiss *et al.*, "The c-ring stoichiometry of ATP synthase is adapted to cell physiological requirements of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 19, pp. 7874–7879, May 2013.
- [151] S. B. Vik and R. R. Ishmukhametov, "Structure and Function of Subunit a of the ATP Synthase of *Escherichia coli*," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 37, no. 6, pp. 445–449, Dec. 2005.
- [152] O. Y. Dmitriev, K. Altendorf, and R. H. Fillingame, "Reconstitution of the F0 Complex of *Escherichia coli* ATP Synthase from Isolated Subunits. Varying the Number of Essential Carboxylates by Co-

- Incorporation of Wild-Type and Mutant Subunit c after Purification in Organic Solvent,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 233, no. 2, pp. 478–483, Oct. 1995.
- [153] J. Lunardi, G. Klein, and P. V. Vignais, “Interaction between aurovertin and adenine nucleotide binding sites on mitochondrial F1-ATPase and the isolated ?? subunit,” *J. Biol. Chem.*, vol. 261, no. 12, pp. 5350–5354, 1986.
- [154] K. Andries *et al.*, “A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of Mycobacterium tuberculosis,” *Science (80-.)*, vol. 307, no. 5707, pp. 223–227, Jan. 2005.
- [155] E. Segala, W. Sougakoff, A. Nevejans-Chauffour, V. Jarlier, and S. Petrella, “New Mutations in the Mycobacterial ATP Synthase: New Insights into the Binding of the Diarylquinoline TMC207 to the ATP Synthase C-Ring Structure,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 5, pp. 2326–2334, May 2012.
- [156] S. Petrella, E. Cambau, A. Chauffour, K. Andries, V. Jarlier, and W. Sougakoff, “Genetic Basis for Natural and Acquired Resistance to the Diarylquinoline R207910 in Mycobacteria,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 50, no. 8, pp. 2853–2856, Aug. 2006.
- [157] L. Preiss *et al.*, “The c-ring ion binding site of the ATP synthase from *B. acillus pseudofirmus* OF4 is adapted to alkaliphilic lifestyle,” *Mol. Microbiol.*, vol. 92, no. 5, pp. 973–984, Jun. 2014.
- [158] L. Preiss, O. Yildiz, D. B. Hicks, T. A. Krulwich, and T. Meier, “A new type of proton coordination in an F(1)F(o)-ATP synthase rotor ring,” *PLoS Biol.*, vol. 8, no. 8, p. e1000443, Aug. 2010.
- [159] J. Michel, J. Tirado-Rives, and W. L. Jorgensen, “Energetics of Displacing Water Molecules from Protein Binding Sites: Consequences for Ligand Optimization,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 42, pp. 15403–15411, Oct. 2009.
- [160] A. C. Haagsma *et al.*, “Selectivity of TMC207 towards Mycobacterial ATP synthase compared with that towards the eukaryotic homologue,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 3, pp. 1290–1292, 2009.
- [161] “Listeria Monocytogenes.” [Online]. Available: https://www.hopkinsguides.com/hopkins/view/Johns_Hopkins_ABX_Guide/540318/all/Listeria_Monocytogenes. [Accessed: 11-May-2017].
- [162] V. Ramaswamy *et al.*, “Listeria--review of epidemiology and pathogenesis,” *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, vol. 40, no. 1, pp. 4–13, Feb. 2007.
- [163] J. M. Farber and P. I. Peterkin, “Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen,” *Microbiol. Rev.*, vol. 55, no. 3, pp. 476–511, Sep. 1991.
- [164] M. Malhotra, S. Sood, A. Mukherjee, S. Muralidhar, and M. Bala, “Genital Chlamydia trachomatis: an update,” *Indian J. Med. Res.*, vol. 138, no. 3, pp. 303–16, Sep. 2013.
- [165] “Detailed STD Facts - Chlamydia.” [Online]. Available: [https://www.cdc.gov/std/chlamydia/stdfact-](https://www.cdc.gov/std/chlamydia/stdfact-chlamydia-detailed.htm)
- chlamydia-detailed.htm. [Accessed: 13-Sep-2017].
- [166] C. Bern *et al.*, “Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States,” *JAMA*, vol. 298, no. 18, p. 2171, Nov. 2007.
- [167] Y. Jackson, E. Alirrol, L. Getaz, H. Wolff, C. Combescure, and F. Chappuis, “Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 51, no. 10, pp. e69–e75, Nov. 2010.
- [168] “Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Clinical Presentation: History, Physical, Causes.” [Online]. Available: <http://emedicine.medscape.com/article/214581-clinical>. [Accessed: 11-May-2017].
- [169] R. Lozano *et al.*, “Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010,” *Lancet*, vol. 380, no. 9859, pp. 2095–2128, Dec. 2012.
- [170] S. Singh *et al.*, “Novel, potent, orally bioavailable and selective mycobacterial ATP synthase inhibitors that demonstrated activity against both replicating and non-replicating *M. tuberculosis*,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 23, no. 4, pp. 742–752, 2015.
- [171] P. Lu, H. Lill, and D. Bald, “ATP synthase in mycobacteria: Special features and implications for a function as drug target,” *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1837, no. 7, pp. 1208–1218, 2014.
- [172] A. Rattan, “Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis: Molecular Perspectives,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 4, no. 2, pp. 195–209, Jun. 1998.
- [173] A. Martínez, S. Torello, and R. Kolter, “Sliding motility in mycobacteria,” *J. Bacteriol.*, vol. 181, no. 23, pp. 7331–8, Dec. 1999.
- [174] R. V Patel, S. Riyaz, and S. W. Park, “Bedaquiline : A New Hope to Treat Multi - Drug Resistant Tuberculosis,” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 14, pp. 1866–1874, 2014.
- [175] “WHO | Diphtheria,” *WHO*, 2015. [Online]. Available: <http://www.who.int/immunization/diseases/diphtheria/en/>. [Accessed: 11-May-2017].
- [176] “Diphtheria | Clinical Features | CDC.” [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/diphtheria/clinicians.html>. [Accessed: 11-May-2017].
- [177] J. R. Murphy, *Corynebacterium Diphtheriae*. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- [178] A. M. Cerdeno-Tarraga *et al.*, “The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 22, pp. 6516–6523, Nov. 2003.
- [179] L. G. Harris, S. J. Foster, and R. G. Richards, “An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review,” *Eur. Cell. Mater.*, vol. 4, pp. 39–60, Dec. 2002.
- [180] J. Kluytmans, A. van Belkum, and H. Verbrugh, “Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*:

- epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 10, no. 3, pp. 505–20, Jul. 1997.
- [181] S. Y. C. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, and V. G. Fowler, "Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 28, no. 3, pp. 603–61, Jul. 2015.

Apéndice A

Árbol filogenético



Apéndice B

Lista de códigos UniProt de las secuencias de la subunidad β utilizadas.

Bacteria

Proteobacteria

Alphaproteobacteria

Rickettsiales

Q5PAN2 Anaplasma marginale
 Q3YS09 Ehrlichia canis
 F7XU35 Midichloria mitochondrii
 Q2GD08 Neorickettsia sennetsu
 A5CDA5 Orientia tsutsugamushi
 B0BV86 Rickettsia rickettsii
 B3CN17 Wolbachia pipientis

Rhizobiales

A1UR49 Bartonella bacilliformis
 Q89X74 Bradyrhizobium diazoefficiens
 A8HS10 Azorhizobium caulinodans
 A7HT52 Parvibaculum lavamentivorans
 B3PQ68 Rhizobium etli
 Q8UC76 Agrobacterium fabrum

Q8YJ35 Brucella melitensis
 Q07UZ5 Rhodopseudomonas palustris
 Q1QQS8 Nitrobacter hamburgensis
 C3M9S1 Sinorhizobium fredii
 B6JD09 Oligotropha carboxidovorans
 A7IH31 Xanthobacter autotrophicus
 A6WXX1 Ochrobactrum anthropi
 A0A037UXK2 Rhodomicrobium udaipurense
 A0A0T7G3Y3 Neorhizobium galegae
 A0A0P0ZAK5 Fulvimarina pelagi
 A0A0S3PRR8 Variibacter gotjwalensis
 I4YMJ4 Microvirga lotononidis
 A0A0P6VPZ5 Prosthecomicrobium hirschii
 V4RTH4 Lutibaculum baratangense
 A0A175RTL8 Aureimonas ureilytica
 A0A0K6HE26 Chelatococcus sambhunathii
 W8I641 Ensifer adhaerens
 A0A109BM57 Hyphomicrobium sulfonivorans
 A0A1S1P256 Methylobacterium extorquens
 A0A011TFN0 Aquamicrobium defluvii
 A0A1C1YZZ5 Hoeflea olei
 A0A0F5FFN2 Devosia chinhatensis
 K8P4K0 Afipia broomeae

B2IC15 *Beijerinckia indica*
A0A1M7ZRD0 *Pseudoxanthobacter soli*
A0A1H5Z8S9 *Bosea lathyri*
A0A1I4RN45 *Pleomorphomonas diazotrophica*
A0A1I3XMK2 *Mesorhizobium albiziae*
A0A0H5BP83 *Blastochloris viridis*
A0A081MLQ7 *Pseudorhizobium pelagicum*
A0A1M5CI06 *Kaistia soli*

Betaproteobacteria

Neisseriales

Burkholderiales

Q7VU44 *Bordetella pertussis*
Q1LHL0 *Cupriavidus metallidurans*
A1TJ41 *Acidovorax citrulli*
A2SC70 *Methylobium petroleiphilum*
Q21ZA6 *Rhodoferrax ferrireducens*
Q0BJL5 *Burkholderia ambifaria*
A9BPU7 *Delftia acidovorans*
A4GAG9 *Herminiimonas arsenicoxydans*
A1WF58 *Verminephrobacter eiseniae*
A1VIV2 *Polaromonas naphthalenivorans*
A0A0L8AVQ1 *Limnohabitans planktonicus*
A0A0A1FMB9 *Collimonas arenae*
D6CMX0 *Thiomonas arsenitoxydans*
A0A192A2T1 *Ralstonia insidiosa*
A0A1J0D939 *Polynucleobacter asymbioticus*
I3U901 *Advenella kashmirensis*
ROEMF5 *Herbaspirillum frisingense*
K1JL8 *Sutterella wadsworthensis*
A0A127JS11 *Ramlibacter tataouinensis*
A0A059KK95 *Sphaerotilus natans*
H0FDU8 *Achromobacter arsenitoxydans*
A0A0B5F4C3 *Pandoraea apista*
I7J12 *Taylorella asinigenitalis*
A0A0S2JT77 *Alcaligenes faecalis*
A0A0U1PZR4 *Lampromedia cohaerens*
A0A1M5TG12 *Candidimonas bauzanensis*
A0A0F5K309 *Paraburkholderia andropogonis*
A0A1A6DXX6 *Tepidimonas fonticaldi*
C3X5Y9 *Oxalobacter formigenes*
A0A1K2HQP0 *Chitinimonas taiwanensis*
R5E7Q8 *Parasutterella excrementihominis*
A0A077DCE9 *Basilea psittacipulmonis*
B1Y3S7 *Leptothrix cholodnii*
A0A1E7TVA0 *Variovorax boronicumulans*
A0A1B2CZJ3 *Comamonas aquatica*
A0A0K8P090 *Ideonella sakaiensis*
A0A1L1PXJ4 *Hydrogenophaga intermedia*
A0A171KRU5 *Kerstesia gyiorum*
A0A095Z945 *Oligella urethralis*
A0A069PRW7 *Caballeronia glathei*
W8X5T3 *Castellaniella defragrans*
E7RZD8 *Lautropia mirabilis*
W0VD63 *Janthinobacterium agaricidamnosum*
F4GG27 *Alicyclophilus denitrificans*
F3LUL1 *Rubrivivax benzoatilyticus*

Gammaproteobacteria

Thiotrichales

A0A0A8E3T3 *Allofrancisella guangzhouensis*
A0A0N7FNNO *Beggiatoa leptomitiformis*
S5TIW6 *Cycloclasticus zancles*
A7NEH4 *Francisella tularensis*
A0A067A1C9 *Hydrogenovibrio marinus*
F5SYV4 *Methylophaga aminisulfidorans*
A0A095BR57 *Piscirickettsia salmonis*

A0A1N6H801 *Sulfurivirga caldicuralii*
W0DXS3 *Thioalkalimicrobium aerophilum*
Q31DM0 *Thiomicrospira crunogena*
A0A090AIM2 *Thioploca ingraca*
A0A1T4Y019 *Thiothrix eikelboomii*

Pasteurellales

B0BRX2 *Actinobacillus pleuropneumoniae*
A0A142G0F7 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
A0A0F5EZ12 *Avibacterium paragallinarum*
W0R2C5 *Bibersteinia trehalosi*
A0A0A3BDA2 *Chelonobacter oris*
A0A0A2Z280 *Gallibacterium anatis*
Q7VPP0 *Haemophilus ducreyi*
B0UWG5 *Histophilus somni*
Q65Q07 *Mannheimia succiniciproducens*
A0A0J5P2A7 *Muribacter muris*
Q9CKW1 *Pasteurella multocida*

Enterobacteriales

C6DJH2 *Pectobacterium carotovorum*
Q8D3J3 *Wigglesworthia glossinidia brevipalpis*
Q2NQ86 *Sodalis glossinidius*
A8ACN6 *Citrobacter koseri*
B2VCA4 *Erwinia tasmaniensis*
B5XZM4 *Klebsiella pneumoniae*
Q6CYJ5 *Pectobacterium atrosepticum*
A1JTC6 *Yersinia enterocolitica*
Q1C095 *Yersinia pestis*
B5QUS4 *Salmonella enteritidis*
Q494C3 *Blochmannia pennsylvanicus*
B8D8H3 *Buchnera aphidicola*
P0ABB6 *Escherichia coli*
Q329S1 *Shigella dysenteriae*
B4FOE7 *Proteus mirabilis*
A7MMW9 *Cronobacter sakazakii*
A0A1C4E160 *Kosakonia oryzendophytica*
D2TY67 *Arsenophonus nasoniae*
A0A182BZF2 *Blattabacterium cuenoti*
A0A0G3QES0 *Kluyvera intermedia*
A0A0B6X2M6 *Xenorhabdus bovienii*
A0A0L0GMD2 *Trabulsiella odontotermis*
A0A085FZNO *Buttiauxella agrestis*
A0A1A9F5S7 *Lelliottia amnigena*
A0A0H3FPC3 *Enterobacter aerogenes*
H2IZ09 *Rahnella aquatilis*
A0A095TRS2 *Tatumella morbiroseei*
A0A0K0HUTO *Hafnia alvei*
G9Z1N3 *Yokenella regensburgei*
C4K903 *Hamiltonella defensa*
A0A198FWD3 *Cosenzaea myxofaciens*
W0L8U8 *Chania multitudinisentens*
A0A0G3CIX5 *Pragia fontium*
A0A0A3ZIA5 *Dickeya chrysanthemi*
R8AS85 *Plesiomonas shigelloides*
A0A0H2QFB0 *Moellerella wisconsensis*
A0A085H954 *Leclercia adecarboxylata*
B6XK32 *Providencia alcalifaciens*
A0A1I9ZLF6 *Raoultella ornithinolytica*

Aeromonadales

A4STP3 *Aeromonas salmonicida*
E8LLM6 *Succinatimonas hippei*
C4LDW0 *Tolumonas auensis*

Legionellales

A9KBF7 *Coxiella burnetii*
A0A0WORQI8 *Fluoribacter bozemanai*
A5III3 *Legionella pneumophila*
A8PQF6 *Rickettsiella grylli*
A0A098GIT0 *Tatlockia micdadei*

Vibrionales

Q6LKZ6 *Photobacterium profundum*
Q9KNH5 *Vibrio cholerae*
B6EHG4 *Aliivibrio salmonicida*
A0A1E5CFH5 *Enterovibrio calviensis*
A0A128FEG9 *Grimontia celer*

Epsilonproteobacteria

Campylobacterales

Q30QQ1 *Sulfurimonas denitrificans*
A8EV70 *Arcobacter butzleri*
B5Z8D0 *Helicobacter pylori*
P42470 *Wolinella succinogenes*
A8FJR2 *Campylobacter jejuni*
E6X0C8 *Nitratifactor salsuginis*
E4U119 *Sulfuricurvum kujjense*

Spirochaetes

Spirochaetia

Leptospirales

C0QX45 *Brachyspira hyodysenteriae*
H2CK32 *Leptonema illini*
Q72SX9 *Leptospira interrogans*
F5YRJ2 *Treponema primitia*
I4B738 *Turneriella parva*

Terrabacteria

Actinobacteria

Actinobacteria

A1A3C5 *Bifidobacterium adolescentis*
A6W7G9 *Kineococcus radiotolerans*
Q83HY0 *Tropheryma whipplei*
A0LSL6 *Acidothermus cellulolyticus*
A5CQ60 *Clavibacter michiganensis*
A5U209 *Mycobacterium tuberculosis*
A1R7V3 *Paenarthrobacter aurescens*
C1A1X8 *Rhodococcus erythropolis*
Q1AVH9 *Rubrobacter xylanophilus*
Q0RDB4 *Frankia alni*
B8HAY9 *Pseudarthrobacter chlorophenolicus*
A9WNC8 *Renibacterium salmoninarum*
A8M2J3 *Salinispora arenicola*
Q6NH59 *Corynebacterium diphtheriae*
Q5Z0Y1 *Nocardia farcinica*
Q6A8C7 *Propionibacterium acnes*
Q47M82 *Thermobifida fusca*
A0A1H1YIQ0 *Actinopolymorpha singaporensis*
A0A1H1XZH5 *Marmoricola scoriae*
A0A173LUZ9 *Aurantimicrobium minutum*
A0A0U5BMG5 *Microcella alkaliphila*
A0A1K1R7G3 *Amycolatopsis australiensis*
A0A1G7AYQ4 *Auraticoccus monumenti*
A0A1H0LFW4 *Phycoccus dokdonensis*

A0A1H5VWQ6 *Actinomadura echinospora*
A0A0B2ANG6 *Sinomonas humi*
C6WHJ4 *Actinosynnema mirum*
A0A0U3KHG7 *Aeromicrobium erythreum*
A0A0B2B184 *Mumia flava*
A0A1D8BU09 *Actinoalloteichus hymeniacidonis*
A0A1B0Z1Y8 *Dermabacter vaginalis*
E6S6F1 *Intrasporangium calvum*
A0A173YSV1 *Collinsella aerofaciens*
A0A134BL62 *Varibaculum cambriense*
A0A0U3HSC6 *Kocuria flava*
A0A1C7C4R4 *Curtobacterium citreum*
H8GAU7 *Saccharomonospora azurea*
D5UW79 *Tsakamurella paurometabola*
D6EBG6 *Gordonibacter pamelaeeae*
A0A0R2PSE2 *Microbacteriaceae bacterium*
U1SKJ8 *Alloscardovia omnicolens*
A0A163QC62 *Oerskovia enterophila*
A0A133XWB4 *Atopobium deltae*
F4F812 *Verrucosipora maris*
A0A031IUL8 *Micrococcus luteus*
A0A172RZD6 *Denitrobacterium detoxificans*
C7MDS2 *Brachyabacterium faecium*
A0A0W1KL48 *Trueperella bernardiae*
W6JT13 *Tetrasphaera australiensis*
A0A099HFS3 *Rothia dentocariosa*
A0A1H1V4C6 *Friedmanniella luteola*
A0A1H1S8I9 *Agrococcus carbonis*
A0A1K0FQC1 *Couchioplanes caeruleus*
I7LBT4 *Turicella otitidis*
A0A0K9EQT3 *Actinobaculum suis*
H5UMS0 *Mobilicoccus pelagius*
C7Q755 *Catenulispora acidiphila*
A0A0M8ZPC5 *Asanoa ferruginea*
A0A0D8FYN2 *Ferrimicrobium acidiphilum*
A0A0K1JLB9 *Luteipulveratus mongoliensis*
A0A060JES0 *Rhodoluna laticola*
A0A1H6BD13 *Nonomurea solani*
M5AJ05 *Ilumatobacter coccineus*
R9L921 *Enterorhabdus caecimuris*
A0A1C0AMW8 *Tessaracoccus lapidicaptus*
A0A0A8B2D5 *Coriobacteriaceae bacterium*
A0A1G9XU75 *Allokutzneria albata*
D2Q3D9 *Kribbella flavida*
A0A1B2HK58 *Lentzea guizhouensis*
D6ZDB8 *Segniliparus rotundus*
A0A068NKF3 *Actinotignum schaalii*
A0A0C5BFK4 *Rathayibacter toxicus*
D6Y729 *Thermobispora bispora*
C8XID5 *Nakamurella multipartita*
A0A098Y2I4 *Modestobacter caceresii*
C7NJD7 *Kytococcus sedentariu*
C5C1U8 *Beutenbergia cavernae*
A0A0M3UGD7 *Arthrobacter alpinus*
D3PU79 *Stackebrandtia nassauensis*
A0A0D8HHB5 *Acidithrix ferrooxidans*
A0A0A0JTP0 *Knoellia aerolata*
U5ENE5 *Nocardia asteroides*
F6ENM6 *Hoyosella subflava*
D1BCV4 *Sanguibacter keddieii*
L7KQF4 *Gordonia aichiensis*
A0A1A9GRU1 *Nocardioides dokdonensis*
D2SER3 *Geodermatophilus obscurus*
J0LN03 *Scardovia wiggisiae*
K6WEQ0 *Kineosphaera limosa*
E1VV29 *Glutamibacter arilaitensis*
D7BMH3 *Arcanobacterium haemolyticum*

Firmicutes

Clostridia

A6TK65 Alkaliphilus metalliredigens
 B2UZK0 Clostridium botulinum
 Q180W5 Peptoclostridium difficile
 B5Y831 Coprothermobacter proteolyticus
 B9MS68 Caldicellulosiruptor bescii
 A9KK92 Lachnoclostridium phytofermentans
 Q67TB7 Symbiobacterium thermophilum
 B8FZ34 Desulfibacterium hafniense
 QOAUD3 Syntrophomonas wolfei
 Q3A946 Carboxydotherrmus hydrogenoformans
 B0THN2 Heliobacterium modesticaldum
 Q2RFX9 Moorella thermoacetica
 A0A173V341 Faecalibacterium prausnitzii
 G5GIB4 Johnsonella ignava
 D4J722 Coprococcus catus
 B0AD40 Intestinibacter bartlettii
 A0A017RZJ9 Fervidicella metallireducens
 D3R2J7 Mageeibacillus indolicus
 H1HRC1 Stomatobaculum longum
 D1PM33 Subdoligranulum variabile
 A0A0J0U6M9 Paeniclostridium sordellii
 A0A1T4VRB7 Eubacterium uniforme
 F0T2A6 Syntrophobotulus glycolicus
 D7ATT7 Thermoanaerobacter mathranii
 A0A1M5R6E2 Tepidibacter thalassicus
 A0A1H5RL63 Caloramator fervidus
 A0A1T5A907 Acetoanaerobium noterae
 A0A1D3TTA7 Anaerobium acetethylicum
 A0A1T4MLH5 Garciella nitratreducens
 A0A1M6MBC7 Anaerobranca californiensis
 A0A1D8GGM7 Geosporobacter ferrireducens
 C4Z9T1 Agathobacter rectalis
 A0A140L6U0 Thermotalea metallivorans
 A0A174NGW3 Hungatella hathewayi
 B2A3G2 Natranaerobius thermophilus
 C8VZ88 Desulfotomaculum acetoxidans
 C6LAJ2 Marvinbryantia formatexigens
 A0A101HT00 Pelotomaculum thermopropionicum
 B1CAM5 Anaerofustis stercorihominis
 F3ZY78 Mahella australiensis
 B6FPL8 Tyzzerella nexilis
 A0A1M7IZT9 Anaerospobacter mobilis
 A0A0M6WE50 Roseburia faecis
 A0A0D8J178 Ruthenibacterium lactatiformans
 A0A174LBV8 Fusicatenibacter saccharivorans
 A0A140LBN9 Fervidicola ferrireducens
 E6UDM0 Ruminococcus albus
 D9QTY1 Acetohalobium arabaticum
 A0A1M6J0X5 Hespellia stercorisuis
 E4QA59 Caldicellulosiruptor hydrothermalis
 C4GD33 Shuttleworthia satelles
 A0A1T5JY15 Maledivibacter halophilus
 A0A1I3S932 Terrisporobacter glycolicus
 A0A1T4KZU3 Selenihalanaerobacter shriftii
 A0A1T4V1P0 Butyricicoccus pullicaecorum
 T4NL50 Clostridioides difficile
 B0MFM5 Anaerostipes caccae
 D6GTR0 Filifactor alocis
 L0KAM7 Halobacteroides halobius
 A0A0V8QGT2 Acetivibrio ethanolgignens
 T4VVA1 Paraclostridium bifermentans
 D5XDH3 Thermincola potens
 D7CJR8 Syntrophothermus lipocalidus
 A0A0B7MLX9 Syntrophaceticus schinkii
 A0A173S3X2 Blautia hydrogenotrophica
 R5L981 Butyrivibrio crossotus
 A0A1C0A677 Orenia metallireducens
 A0A1M5NTI7 Thermosyntropha lipolytica
 A0A1M5S9P0 Asaccharospora irregularis
 A0A1G6J2U5 Halanaerobium congolense
 A0A1M5VTG7 Sporobacter termitidis
 B7R975 Caldanaerobacter subterraneus

A0A133ZUQ4 Lachnoanaerobaculum saburreum
 E6SLM7 Thermoerobacter marianensis
 B8CZ10 Halothermothrix orenii
 A0A1C7FPC4 Flavonifractor plautii
 A0A1M6FM32 Parasporobacterium paucivorans
 G8TZ19 Sulfoabacillus acidophilus
 A0A1T4WL48 Gemmiger formicilis
 A0A101FGJ8 Thermacetogenium phaeum
Bacilli
 Q5FKY0 Lactobacillus acidophilus
 B5E670 Streptococcus pneumoniae
 Q724W4 Listeria monocytogenes
 Q03V29 Leuconostoc mesenteroides
 B9E8E6 Macrocooccus caseolyticus
 Q5KUJ3 Geobacillus kaustophilus
 Q81JZ5 Bacillus anthracis
 Q8EM83 Oceanobacillus iheyensis
 C0Z776 Brevibacillus brevis
 Q02XA5 Lactococcus lactis
 Q2YUK1 Staphylococcus aureus
 A0A0A5G2G0 Pontibacillus marinus
 A0A0U1QKJ8 Sporolactobacillus inulinus
 A0A1R1DJ44 Paenibacillus amylolyticus
 A0A1H6T1D6 Sharpea azabuensis
 A0A075LP17 Terribacillus aidingensis
 A0A1G9U0F3 Sediminibacillus halophilus
 A0A1Q8Q9Z5 Domibacillus antri
 F5LA72 Caldalkalibacillus thermarum
 A0A1S8KQ71 Dolosigranulum pigrum
 A0A0U4F8I0 Lentibacillus amyloliquefaciens
 A0A163FD44 Bhargavaea cecembensis
 A0A1N7JMG6 Kroppenstedtia eburnea
 A0A1S6PH3 Jeotgalibaca dankookensis
 K0IZ96 Amphibacillus xylanus
 A0A1U7PJ26 Edaphobacillus lindanitolerans
 K0AEH3 Exiguobacterium antarcticum
 K1L693 Solibacillus isronensis
 K1LHZ2 Facllamia hominis
 A0A1E5G1J5 Desulfuribacillus alkaliarsenatis
 A0A160F579 Anoxybacillus amylolyticus
 A0A1I6P2L7 Marininema halotolerans
 A0A1S2MB46 Anaerobacillus alkalidiazotrophicus
 D5WX60 Kyrpidia tusciae
 F3YBW5 Melissococcus plutonius
 W4VIC3 Gracilibacillus boracitolerans
 A0A0M0LKF5 Viridibacillus arvi
 A0A0N0HED2 Thermoactinomyces vulgaris
 A0A1B1Z9J9 Fictibacillus arsenicus
 A0A1T4R3B4 Pilibacter termitis
 A0A0M0G8N7 Sporosarcina globispora
 A0A133ZK43 Gemella asaccharolytica
 A0A101XPN2 Acidibacillus ferrooxidans
 L0EKS9 Thermobacillus composti
 B7DS39 Alicyclobacillus acidocaldarius
 A0A1C7DF49 Planococcus antarcticus
 S4DJ80 Enterococcus faecalis
 A0A1Q2D4J2 Vagococcus penaei
 A0A1C0YDK8 Caryophanon latum
 A0A150M3Q8 Parageobacillus caldoxylosilyticus
 A0A1M7IB89 Salinicoccus alkaliphilus
 A0A1D2YVW2 Vulcanibacillus modesticaldus
 A0A1M4XUE0 Seinonella peptonophila
 A0A161ZQT9 Aeribacillus pallidus
 A0A1I3X8C1 Halobacillus dabanensis
 A0A143HGP2 Rummelilbacillus stabekisii
 A0A1M5LW41 Ornithinibacillus halophilus
 A0A1N6HRW5 Carnobacterium alterfunditum
 A0A1N7IW41 Salimicrobium flavidum
 K8Z9T3 Cattellicoccus marimammalium
 C8NDM8 Granulicatella adiacens
 W1Q274 Abiotrophia defectiva

A0A0A3ITC2 Lysinibacillus boronitolerans
A0A150M5H0 Caldibacillus debilis
A0A143ZCC2 Trichococcus collinsii
A0A1B3J4Z1 Tetragenococcus halophilus
A0A1H1WKT7 Paenibacillaceae bacterium
A0A1C4B111 Weissella bombi
A0A0K8MF56 Fructobacillus ficulneus
W7CBB6 Brochothrix thermosphacta
A0A1A5VCF3 Pediococcus acidilactici
A0A074LU02 Tumebacillus flagellatus
A0A1T4M361 Globicatella sulfidifaciens
A0A132N9W8 Hydrogenibacillus schlegelii

Eukaryota

Amoebozoa

Mycetozoa

Dictyosteliida

L8GXZ0 Acanthamoeba castellanii
Q55CS9 Dictyostelium discoideum
D3B434 Polysphondylium pallidum

Euglenozoa

Kinetoplastida

Trypanosomatidae

S9UWU8S9UWU8 Angomonas deanei
E9AXJ6E9AXJ6 Leishmania mexicana
A0A0M9G078A0A0M9G078 Leptomonas pyrrochoris
S9U293S9U293 Strigomonas culicis
Q4DTX7Q4DTX7 Trypanosoma cruzi

Alveolata

Apicomplexa

Aconoidasida

A0A061D5A0 Babesia bigemina
A0A024X5T9 Plasmodium falciparum
J4C2L1 Theileria orientalis

Conoidasida

F0VGD5 Neospora caninum
Q309Z7 Toxoplasma gondii
A0A1J4MP23 Cryptosporidium andersoni
U6LSG2 Eimeria brunetti
A0A074T317 Hammondia hammondi

Opisthokonta

Fungi

Dikarya

Ascomycota

Saccharomyceta

Pezizomycotina

P23704 Neurospora crassa
A0A150VFX4 Acidomyces richmondensis
A0A166YGU4 Isaria fumosorosea
G2RIB1 Thielavia terrestris
A0A0G2FTH8 Phaeomoniella chlamydospora
S0EH71 Gibberella fujikuroi
M2UHL4 Cochliobolus heterostrophus

R8BY11 Togninia minima
K2R9P7 Macrophomina phaseolina
M7SLE7 Eutypa lata
C8VN64 Emericella nidulans
A0A1B8GRH9 Pseudogymnoascus verrucosus
A0A1J9Q4F7 Emergomyces pasteuriana
A0A0G2HR03 Diaporthe ampelina
A0A0D2ESS0 Cladophialophora bantiana
G9NP88 Hypocrea atroviridis
A0A0A1TNQ1 Torrubiella hemipterigena
A0A0F7ZX90 Hirsutella minnesotensis
S3CPN6 Glarea lozoyensis
A0A084GBL9 Scedosporium apiospermum
G4NAE0 Magnaporthe oryzae
R0IUP7 Setosphaeria turcica
G2QQD7 Myceliophthora thermophila
M1W5Q8 Claviceps purpurea
A0A168C6E6 Ascosphaera apis
A0A0C2F7L4 Sporothrix brasiliensis
A0A0D1YD55 Verruconis gallopava
A0A0B1P0X1 Uncinula necator
A0A0G2HTW0 Emmonsia crescens
A0A0B8MXH6 Talaromyces cellulolyticus
W2S769 Cyphellophora europaea
A0A0D2CSE5 Phialophora americana
A0A0W7VAT8 Trichoderma gamsii
J3K7T4 Coccidioides immitis
R7YIA0 Coniosporium apollinis
A0A178ZD97 Fonsecaea erecta
N4US99 Fusarium oxysporum
E4ZGX8 Leptosphaeria maculans
A0A1J7JL7 Coniochaeta ligniaria
A0A072PHA7 Exophiala aquamarina
U1G958 Endocarpon pusillum
A0A1D2J3L8 Paracoccidioides brasiliensis
A0A179HMR1 Purpureocillium lilacinum
J3PCN4 Gaeumannomyces graminis
A0A0B7JU29_BIOOC Bionectria ochroleuca
A0A136JHJ7 Microdochium bolleyi
N1Q0H6 Dothistroma septosporum
W6ZG49 Bipolaris oryzae
A0A074VJW1 Aureobasidium melanogenum
Q2GP49 Chaetomium globosum
A7ER40 Sclerotinia sclerotiorum
A0A177AJU8 Pseudogymnoascus destructans
M7UJF1 Botryotinia fuckeliana
M2MHR7 Baudoinia compniacensis
W9ZGR6 Capronia coronata
A0A090CP65 Podospora anserina
J4UHU6 Beauveria bassiana
A0A084RBZ5 Stachybotrys chartarum
A0A162ZVX0 Didymella rabiei
A0A194V7V8 Valsa mali
T5BW33 Blastomyces dermatitidis
A0A1E1LF85 Rhynchospodium agropyri
V5G0Z6 Byssoschlamys spectabilis
A0A0B4IA11 Metarhizium guizhouense
A0A086T4D9 Acremonium chrysogenum
C0P0C5 Ajellomyces capsulatus
A0A151GAW1 Drechmeria coniospora
A0A100IK75 Aspergillus niger
A0A177DF81 Alternaria alternata
A0A178F349 Trichophyton rubrum
A0A0M9VTL9 Escovopsis weberi
A0A0D2HED3 Rhinocladiella mackenziei
A0A0L0NFC8 Tolypocladium ophioglossoides
C9SE48 Verticillium alfalfae
F7VZ17 Sordaria macrospora
A0A1B5KXR4 Ustilaginoides virens
F9X4X0 Zymoseptoria tritici
A0A0C3DAR4 Oidiodendron maius
G1X660 Arthrotrichomyces oligospora

A0A1J9RVL3 *Diplodia corticola*
C4JMQ1 *Uncinocarpus reesii*
M3C5G4 *Sphaerulina musiva*
G3JPS3 *Cordyceps militaris*
A0A132B9C9 *Phialocephala scopiformis*
A0A0P7BW60 *Neonectria ditissima*
A0A167TX11 *Penicillium chrysogenum*
C7YZA1 *Nectria haematococca*
E3RX14 *Pyrenophora teres*

Basidiomycota

Agaricomycotina

Tremellomycetes

A0A0A8E3T3 *Allofrancisella guangzhouensis*
A0A0N7FNN0 *Beggiatoa leptomitiformis*
S5TIW6 *Cycloclasticus zancles*
A7NEH4 *Francisella tularensis*
A0A067A1C9 *Hydrogenovibrio marinus*
F5SYV4 *Methylophaga aminisulfidivorans*
A0A095BR57 *Piscirickettsia salmonis*
A0A1N6H801 *Sulfurivirga caldicurarii*
W0DXS3 *Thioalkalimicrobium aerophilum*
Q31DM0 *Thiomicrospira crunogena*
A0A090AIM2 *Thioploca ingrica*
A0A1T4Y019 *Thiothrix eikelboomii*

Metazoa

Eumetazoa

Bilateria

Platyhelminthes

Cestoda

Eucestoda

U6IVP5 *Echinococcus granulosus*
A0A0R3WR60 *Hydatigena taeniaeformis*
A0A0R3SDA2 *Hymenolepis diminuta*
A0A0R3UJB3 *Mesocestoides corti*
A0A0X3PMB1 *Schistocephalus solidus*
A0A0F6MV76 *Spirometra erinaceieuropaei*
A0A0R3VYB8 *Taenia asiatica*

Trematoda

Digenea

A0A183AYZ7 *Echinostoma caproni*
A0A075A8R4 *Opisthorchis viverrini*
C1LL12 *Schistosoma japonicum*
A0A183WAU9 *Trichobilharzia regenti*

Protostomia

Ecdysozoa

Nematoda

A0A0D6M082 *Ancylostoma ceylanicum*
A0A0K0D9Q4 *Angiostrongylus cantonensis*

A0A0M3K219 *Anisakis simplex*
A0A0K0I271 *Brugia malayi*
A0A1I7SU53 *Bursaphelenchus xylophilus*
P46561 *Caenorhabditis elegans*
A0A0D8Y850 *Dictyocaulus viviparus*
A0A0N4UL41 *Dracunculus medinensis*
A0A0R3RPD5 *Elaeophora elaphi*
A0A0N4UW61 *Enterobius vermicularis*
A0A183BW50 *Globodera pallida*
A0A183DXK0 *Gongylonema pulchrum*
A0A0N4WW22 *Haemonchus placei*
A0A1I7VK73 *Loa loa*
A0A1I8BST6 *Meloidogyne hapla*
W2T9A3 *Necator americanus*
A0A0N4YLW8 *Nippostrongylus brasiliensis*
A0A182E2Y3 *Onchocerca ochengi*
A0A0N4ZG97 *Parastrongyloides trichosuri*
H3FQP8 *Pristionchus pacificus*
A0A183KE5 *Soboliphyme baturini*
A0A1I8AWQ6 *Steinernema glaseri*
A0A0N5BVU6 *Strongyloides papillosus*
A0A0N5ALT3 *Syphacia muris*
A0A0N5D098 *Thelazia callipaeda*
A0A183UEM8 *Toxocara canis*
A0A1I8EH89 *Wuchereria bancrofti*
A0A0N5DTW7 *Trichuris muris*
A0A0V1DFZ8 *Trichinella britovi*

Mammalia

P00829 *Bos taurus*
F7E965 *Callithrix jacchus*
T0NJQ1 *Camelus ferus*
F1PDB4 *Canis lupus*
H0VZD9 *Cavia porcellus*
A0A0D9QYB1 *Chlorocebus sabaeus*
G3HRN0 *Cricetulus griseus*
K9IL16 *Desmodus rotundus*
F6U187 *Equus caballus*
M3WG78 *Felis catus*
A0A091CXN4 *Fukomys damarensis*
G3R7H4 *Gorilla gorilla gorilla*
G5BB67 *Heterocephalus glaber*
P06576 *Homo sapiens*
I3MLV3 *Ictidomys tridecemlineatus*
G3TSV8 *Loxodonta africana*
F7F3I6 *Macaca mulatta*
E3WI46 *Mesocricetus auratus*
H9H7I8 *Monodelphis domestica*
P56480 *Mus musculus*
M3XQZ3 *Mustela putorius furo*
S7PSD9 *Myotis brandtii*
A0A1A6H0A3 *Neotoma lepida*
G1S6Q0 *Nomascus leucogenys*
F6SN95 *Ornithorhynchus anatinus*
G1U6C7 *Oryctolagus cuniculus*
H0WMZ4 *Otolemur garnettii*
W5PEP7 *Ovis aries*
H2Q695 *Pan troglodytes*
H2NHR0 *Pongo abelii*
L5KVR4 *Pteropus alecto*
P10719 *Rattus norvegicus*
G3VIJ8 *Sarcophilus harrisii*
F1SLA0 *Sus scrofa*
L8Y6L4 *Tupaia chinensis*