



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Transportadores de eflujo bacterianos relacionados con
la resistencia a múltiples antibióticos**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Armando Alberto Ambrosio Huerta



Ciudad Universitaria, CDMX

Año 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Prof. Raúl Garza Velasco
VOCAL:	Prof. Rodrigo Aguayo Ortiz
SECRETARIO:	Prof. Israel González Méndez
1er. SUPLENTE:	Prof. Tanya Plett Torres
2° SUPLENTE:	Prof. Francisco Javier Díaz García

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 111, Conjunto E, Departamento de Farmacia
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz

SUSTENTANTE:

Armando Alberto Ambrosio Huerta

Para mis padres y mi hermano, por apoyarme y acompañarme siempre.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por mi formación académica.

A mis padres y a mi hermano, por todo su apoyo.

A Andrés, por ser un gran amigo y por ayudarme a llegar hasta aquí.

A mi tutor, el Doctor Rodrigo Aguayo Ortiz, por aceptarme en su grupo de investigación y por guiarme y apoyarme en la elaboración de este trabajo.

A los miembros del jurado, por su apoyo y contribución al enriquecimiento de mi trabajo.

A mis amigos: Nathael, Patricia, David, Daniel, Arturo y Hanny, por ofrecerme su amistad durante tantos años.

A mis compañeros y amigos del CAD111, por todos los buenos momentos que hemos pasado dentro y fuera del laboratorio.

A los profesores que fomentaron en mí el interés por la investigación.

A Ana, por motivarme y acompañarme durante el término de esta etapa.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	i
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS (BACTERIAS)	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. CAPÍTULO I. Transportadores de la familia RND	4
II.1. Principal modelo de estudio: el sistema tricomponente AcrAB-ToIC	5
II.2. Recopilación de estructuras.....	7
II.3. Estructura de AcrB y transportadores RND homólogos	13
II.4. Sitios de unión de sustratos.....	14
II.5. Principales sustratos	19
II.6. Mecanismo de eflujo	23
III. CAPÍTULO II. Transportadores de la familia ABC	26
III.1. Principales modelos de estudio: LmrA y MacAB-ToIC.....	27
III.2. Recopilación de estructuras.....	30
III.3. Estructura de los transportadores ABC	35
III.4. Sitios de unión de sustratos.....	38
III.5. Sustratos, moduladores e inhibidores	41
III.6. Mecanismo de eflujo	44
III.7. Modulación de la actividad de eflujo	48
IV. CAPÍTULO III. Transportadores de la MFS	49
IV.1. Principales modelos de estudio: LmrP y MdfA.....	51
IV.2. Recopilación de estructuras	52
IV.3. Estructura de los transportadores MFS	54
IV.4. Sitios de unión de sustratos	55
IV.5. Principales sustratos	57
IV.6. Mecanismo de eflujo.....	60
V. CAPÍTULO IV. Sistemas de las familias SMR, MATE, AbgT y PACE	63
V.1. Transportadores de eflujo de la familia SMR	64
V.1.1. Recopilación de estructuras	65
V.1.2. Sitios de unión de sustratos y mecanismo de eflujo	66
V.2. Transportadores de eflujo de la familia MATE.....	68
V.2.1. Recopilación de estructuras	69
V.2.2. Sitios de unión de sustratos y mecanismo de eflujo	71
V.3. Transportadores de eflujo de la familia AbgT.....	73
V.3.1. Recopilación de estructuras	73
V.3.2. Sitios de unión de sustratos	74
V.4. Transportadores de eflujo de la familia PACE	76
Conclusiones.....	78
Referencias.....	80

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABC	ATP-binding cassette
AbgT	Aminobenzoyl-glutamate Transporter
AcrB	Acriflavine resistance B protein
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DHA	drug:H ⁺ antiporter
FarAB	Fatty acid resistance AB proteins
HME	Heavy Metal Efflux
HAE	Hydrophobe and Amphiphile Efflux
LmrA	Lactococcal multidrug-resistant protein ATP
LPS	Lipopolisacárido
MacAB	Macrolide-specific ABC-type efflux carrier
MATE	Multidrug and Toxic Compound Extrusion
MDR	Multidrug Resistant/Resistance
MFS	Major Facilitator Superfamily
OMS	Organización Mundial de la Salud
PACE	Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux
PMI	Proteína de membrana interna
PFM	Proteína de fusión membranal
PME	Proteína de membrana externa
PDB	Protein Data Bank
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
RND	Resistance-Nodulation-cell Division
SMR	Small Multidrug Resistance
wt	wild-type

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS (BACTERIAS)

<i>A. thermocellus</i>	<i>Acetivibrio thermocellus</i>
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
<i>A. borkumensis</i>	<i>Alcanivorax borkumensis</i>
<i>A. herbarius</i>	<i>Alicyclobacillus herbarius</i>
<i>A. aeolicus</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>B. abortus</i>	<i>Brucella abortus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. pseudomallei</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. diphtheriae</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
<i>C. metallidurans</i>	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>F. tularensis</i>	<i>Francisella tularensis</i>
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>H. halodurans</i>	<i>Halalkalibacterium halodurans</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>N. aromaticivorans</i>	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>R. ornithinolytica</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
<i>R. capsulatus</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. capitis</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>
<i>S. maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>T. africanus</i>	<i>Thermosipho africanus</i>
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>V. parahemolyticus</i>	<i>Vibrio parahemolyticus</i>

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a antibióticos se ha convertido en una de las principales amenazas a la salud pública en el siglo XXI. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos causan estancias hospitalarias más prolongadas, una disminución en los índices de supervivencia en pacientes y conllevan un mayor costo económico en su diagnóstico y tratamiento en comparación con las infecciones causadas por bacterias susceptibles.¹

El uso indiscriminado de antibióticos ha contribuido al desarrollo de este tipo de resistencia en bacterias, ya que han adquirido la capacidad de sobrevivir a la exposición a diversos tipos de antibióticos e incluso combinaciones de estos. El número reportado de cepas de bacterias patógenas resistentes a múltiples antibióticos ha aumentado de manera considerable en los últimos años. Con base en esto, se ha estimado que para el año 2050 las infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos podrían ser la causa de alrededor de 10 millones de muertes en el mundo cada año.^{2,3,4}

Los mecanismos por los que las bacterias presentan resistencia a antibióticos se pueden clasificar en 4 categorías principales: la disminución de la entrada del antibiótico a la célula, la modificación del sitio de unión del antibiótico, la inactivación enzimática y la expulsión al exterior celular mediante sistemas de eflujo.⁵ En este trabajo monográfico de actualización, se abordará de manera exclusiva la resistencia a antibióticos mediada por transportadores de eflujo bacterianos.

Los transportadores de eflujo participan en diferentes funciones fisiológicas, tales como la colonización o infección en organismos superiores, la expulsión de metales pesados y moléculas de señalización, la formación de biopelículas y la translocación de ácidos grasos. Se cree que el eflujo de antibióticos es una función secundaria que surgió como

consecuencia de las relaciones competitivas entre bacterias en la naturaleza y que se ha visto favorecida por la presión selectiva debido al uso clínico de antibióticos.^{6,7}

Estos transportadores participan en la expulsión de una gran variedad de compuestos. La mayoría de los transportadores relacionados con la resistencia a antibióticos posee un amplio perfil de reconocimiento de sustratos. Debido a esto, el estudio de este tipo de transportadores es de gran interés en la actualidad, puesto que al ser comúnmente expresados por patógenos disminuyen la eficacia de los medicamentos indicados para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias.^{8,9}

En las últimas décadas, se ha determinado la estructura de un gran número de transportadores de eflujo de diferentes familias mediante distintas metodologías (cristalografía de rayos X, microscopía electrónica o resonancia magnética nuclear), permitiendo obtener una gran cantidad de información estructural y funcional sobre ellas, principalmente en relación con su mecanismo de transporte y las causas del reconocimiento multiespecífico de sustratos.⁶

Estas estructuras se encuentran depositadas en el *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* (RCSB PDB), la base de datos global de estructuras tridimensionales de macromoléculas biológicas (proteínas, ADN y ARN) determinadas experimentalmente a nivel atómico en formato PDB, al que corresponde un código único de identificación de cuatro caracteres (código PDB).¹⁰

En este trabajo, se llevó a cabo una recopilación sistemática de estructuras e información de transportadores bacterianos relacionados al eflujo de múltiples antibióticos que han sido reportados en el RCSB PDB y pertenecen a las familias RND (*Resistance-Nodulation-cell Division*), ABC (*ATP-binding cassette*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) y AbgT (*Aminobenzoyl-glutamate Transporter*), que pueden apreciarse en la **Figura 1.1**.

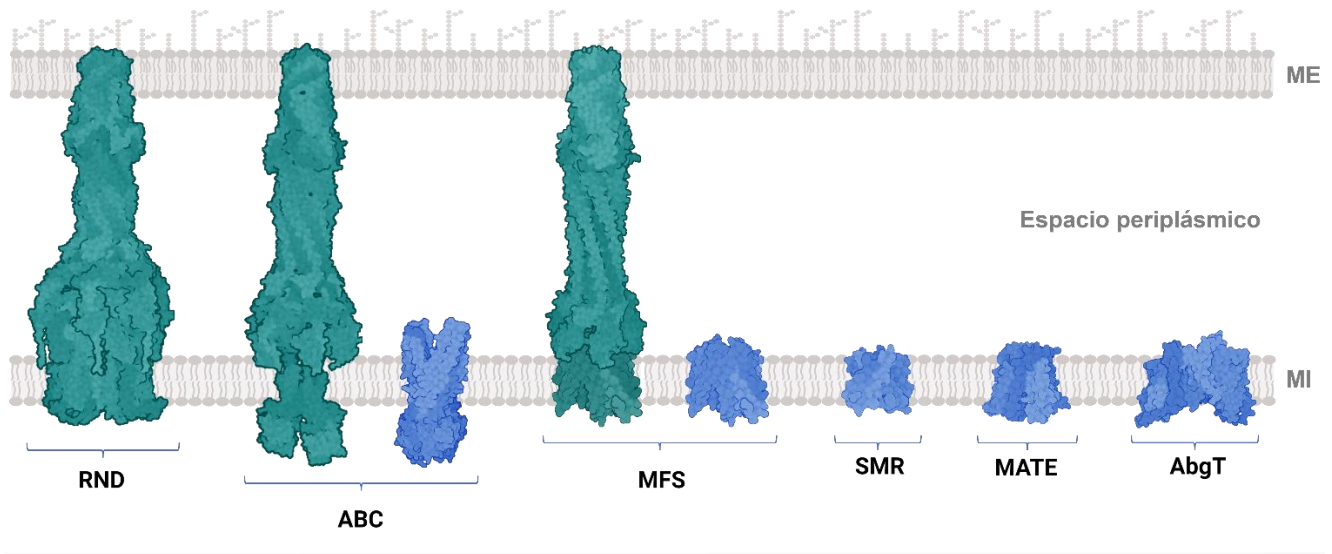


Figura 1.1. Estructuras representativas de los transportadores de las familias RND (PDB: 6TA6), ABC (PDB: 5NIK, 2HYD), MFS (PDB: 6OOM, 4TK0, 1YC9), SMR (PDB: 7MH6), MATE (PDB: 3MKT) y AbgT (PDB: 4R0C). Los transportadores RND se encuentran como sistemas de tres componentes que conectan a la membrana interna (MI) con la membrana externa (ME); los transportadores ABC y MFS pueden encontrarse como sistemas de uno o tres componentes; los transportadores SMR, MATE y AbgT se encuentran de manera exclusiva como transportadores de un solo componente. Figura elaborada en [BioRender.com](https://www.biorender.com).

II. CAPÍTULO I. Transportadores de la familia RND

Los transportadores de la familia RND (*Resistance-Nodulation-cell Division*, por sus siglas en inglés) son los principales sistemas asociados al eflujo activo de antibióticos en bacterias Gram-negativas.¹¹ Sin embargo, su origen precede al uso clínico de antibióticos, por lo que su función biológica se ha relacionado con la fisiología celular bacteriana básica, particularmente con la expulsión o eflujo de sustancias tóxicas. Se ha demostrado también el papel de esta familia de transportadores en la infección y colonización celular, ya que la reducción de la expresión o la inactivación de sus componentes se ha asociado a una menor virulencia en bacterias Gram-negativas.¹²

Generalmente, estos transportadores se presentan como parte de complejos funcionales de tres componentes (**Figura 2.1**): 1) la proteína de la familia RND o proteína de membrana interna (PMI), que participa en el reconocimiento de sustratos y la generación de la fuerza protón motriz requerida para el proceso de eflujo; 2) una proteína de fusión membranal (PFM), que abarca la mayoría del espacio periplásmico; y 3) una proteína (o canal) de membrana externa que conduce a los sustratos al exterior celular. La presencia de estos tres componentes es esencial para el fenotipo MDR (*Multidrug Resistance*, resistencia a múltiples antibióticos) en bacterias.^{11,12,13} Algunos complejos formados por proteínas de esta familia son altamente conservados entre especies bacterianas; sin embargo, el número y los subgrupos de complejos de eflujo expresados puede variar entre especies en función de su adaptación evolutiva (**Tabla 2.1**).¹²

Los transportadores de la familia RND pueden dividirse a su vez en 2 principales subfamilias conocidas como HME (*Heavy Metal Efflux*, de eflujo de metales pesados) y HAE (*Hydrophobe and Amphiphile Efflux*, de eflujo de compuestos hidrofóbicos y anfifílicos). La primera subfamilia está conformada por transportadores de eflujo de cationes de metales

pesados como cobalto, zinc, cadmio, plata y cobre, mientras que la segunda familia se compone de transportadores que participan en el eflujo de diversos sustratos orgánicos, incluyendo múltiples antibióticos; estos transportadores se encuentran en bacterias Gram-negativas con un perfil de resistencia a antibióticos de importancia clínica.¹¹ Debido a lo anterior y a la baja homología de los transportadores/complejos de eflujo de estas dos subfamilias (19%)¹¹, la información recopilada en este capítulo corresponderá a los transportadores de la subfamilia HAE, a menos que se especifique lo contrario.

II.1. Principal modelo de estudio: el sistema tricomponente AcrAB-ToIC

El principal modelo de investigación de los transportadores de la familia RND es la proteína AcrB (*Acriflavine resistance B protein*, proteína B de resistencia a acriflavina), presente en *E. coli* y otras enterobacterias, puesto que ha sido ampliamente estudiada al considerarse la proteína con el perfil más amplio de reconocimiento de sustratos y, por lo tanto, la proteína con mayor relevancia clínica de esta familia.¹⁴ Se encuentra como parte del complejo AcrAB-ToIC, compuesto por los 3 componentes proteicos mencionados previamente: 1) AcrB (proteína de membrana interna); 2) ToIC (proteína de membrana externa tipo porina); y 3) AcrA (proteína de fusión membranar), que conecta a AcrB y ToIC y permite la transmisión de cambios conformacionales entre estos dos componentes durante el proceso de eflujo.¹⁵

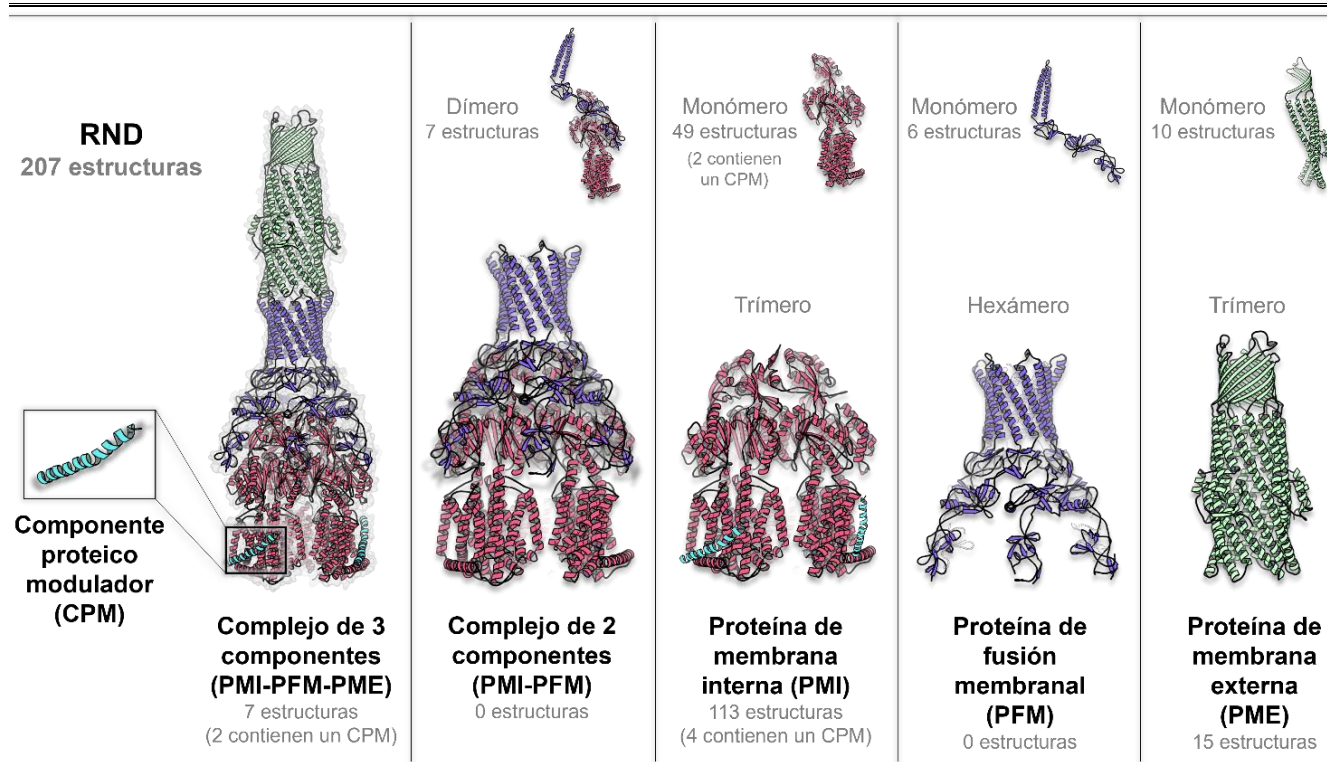


Figura 2.1. Estructuras representativas de los complejos de los transportadores RND y sus componentes proteicos individuales. Se indica el número de estructuras reportadas para cada complejo/componente en la base de datos del RCSB PDB. Figura elabora con PyMOL, utilizando la estructura con código PDB 5O66, que corresponde al complejo de 3 componentes AcrAB-TolC de *E. coli* unido a un componente proteico modulador.

En el transportador AcrB expresado por *E. coli*, es posible encontrar a un componente proteico modulador conocido como AcrZ, que es una proteína altamente conservada que interactúa con el dominio transmembranal de AcrB. La interacción entre AcrZ y el transportador AcrB ha sido corroborada recientemente mediante espectrometría de masas y, aunque no se ha establecido la influencia concreta de AcrZ sobre AcrB, diversos estudios sugieren que causa alteraciones conformacionales en sus sitios de unión a sustratos y los canales que conducen a estos, mejorando así la capacidad del complejo AcrAB-TolC para reconocer y expulsar ciertos compuestos, tales como tetraciclina, puromicina y cloranfenicol.^{15,16,17,18,19} Se ha confirmado la estequiometría de los protómeros de los componentes de éste y otros complejos de la familia RND, los cuales también participan en el eflujo de antibióticos y otros sustratos: 3 AcrB, 6 AcrA y 3 TolC (**Figura 2.1**).¹⁵

II.2. Recopilación de estructuras

En los últimos años han tenido lugar grandes avances en la determinación de estructuras de alta resolución de las proteínas de la familia RND y sus respectivos complejos, permitiendo una mejor comprensión de la interacción y ensamblaje de sus componentes y las causas de su poliespecificidad de sustratos.¹² Adicionalmente, es posible obtener información sobre las interacciones proteína-ligando y los cambios conformacionales que se presentan durante el proceso de eflujo, así como las características de los sitios de unión de los transportadores.

Como resultado de una búsqueda exhaustiva en la base de datos del RCSB PDB, se encontró un total de 207 estructuras de complejos y componentes de los transportadores de eflujo de la familia RND (**Figura 2.1** y **Tabla 2.1**). De estas, 7 corresponden al complejo funcional de tres componentes PMI-PFM-PME y 7 al complejo dimérico PMI-PFM. En cuanto a los componentes individuales de los transportadores, se identificó (en su forma funcional) que 113 estructuras corresponden a proteínas de membrana interna y 15 a proteínas de membrana externa. Por otro lado, en cuanto a estructuras monoméricas de los componentes de los transportadores RND, 49 estructuras pertenecen a proteínas de membrana interna, 6 a proteínas de fusión membranal y 10 a proteínas de membrana externa.

Entre las estructuras reportadas, se encontraron algunas que pertenecen a un mismo sistema de transporte. Estas corresponden a complejos con diferentes sustratos o inhibidores o a distintas conformaciones del transportador en función de la etapa del proceso de eflujo en que se encuentre (**Tabla 2.1**). De igual manera, cabe destacar que múltiples de estos sistemas pueden encontrarse en diferentes bacterias, presentando un perfil similar de eflujo de sustratos.

Tabla 2.1. Estructuras correspondientes a los componentes y complejos de los transportadores de la familia RND, reportadas en el RCSB PDB.

Complejos tricompuestos: proteína de membrana interna, proteína de fusión membranal y proteína de membrana externa						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID ligando
5NG5	AcrABZ-TolC	Transportador de múltiples antibióticos	6.50	<i>E. coli</i>	Wang <i>et al</i> ²⁰	5QF
5O66	AcrABZ-TolC	Transportador AcrABZ-TolC asimétrico	5.90	<i>E. coli</i>	Du <i>et al</i> ²⁰	-
5V5S	AcrAB-TolC	Transportador de múltiples antibióticos	6.50	<i>E. coli</i>	wang <i>et al</i> ²⁰	-
6IOK	MexAB-OprM	Transportador MexAB-OprM (0°)	3.64	<i>P. aeruginosa</i>	Tsutsumi <i>et al</i> ²¹	-
6IOL	MexAB-OprM	Transportador MexAB-OprM (60°)	3.76	<i>P. aeruginosa</i>	Tsutsumi <i>et al</i> ²¹	-
6TA5	MexAB-OprM	Complejo de MexAB-OprM	3.20	<i>P. aeruginosa</i>	Glavier <i>et al</i> ²²	-
6TA6	MexAB-OprM	Complejo de MexAB-OprM	3.20	<i>P. aeruginosa</i>	Glavier <i>et al</i> ²²	-
Complejos de dos componentes (un monómero de cada uno): proteína de membrana interna y proteína de fusión membranal						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID ligando
3NE5	CusBA	Complejo de eflujo de metales pesados	2.90	<i>E. coli</i>	Su <i>et al</i> ²³	-
3T51	CusBA	Complejo en estado de extrusión	3.90	<i>E. coli</i>	Su <i>et al</i> ²⁴	CU
3T53	CusBA	Complejo en estado de extrusión	3.37	<i>E. coli</i>	Su <i>et al</i> ²⁴	CU
3T56	CusBA	Complejo previo a la extrusión	3.42	<i>E. coli</i>	Su <i>et al</i> ²⁴	CU
4DNR	CusBA	Complejo de eflujo de metales pesados	3.68	<i>E. coli</i>	Su <i>et al</i> ^{NP}	CU
4DNT	CusBA	Complejo de eflujo de metales pesados	3.10	<i>E. coli</i>	Su <i>et al</i> ²⁴	-
4DOP	CusBA	Complejo de eflujo de metales pesados	4.20	<i>E. coli</i>	Su <i>et al</i> ²⁴	-
Estructuras de proteínas de membrana interna en forma trimérica (funcional)						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID ligando
2DHH	AcrB	Mecanismo rotatorio de AcrB	2.80	<i>E. coli</i>	Murakami <i>et al</i> ²⁵	-
2DR6	AcrB	Mecanismo rotatorio de AcrB	3.30	<i>E. coli</i>	Murakami <i>et al</i> ²⁵	DM2
2DRD	AcrB	Mecanismo rotatorio de AcrB	3.10	<i>E. coli</i>	Murakami <i>et al</i> ²⁵	MIY
2GIF	AcrB	Trímero asimétrico de AcrB	2.90	<i>E. coli</i>	Seeger <i>et al</i> ²⁶	-
2HQC	AcrB	Traslación de H ⁺ en mutante D407A	3.56	<i>E. coli</i> K-12	Su <i>et al</i> ²⁷	-
2HQD	AcrB	Traslación de H ⁺ en mutante D408A	3.65	<i>E. coli</i> K-12	Su <i>et al</i> ²⁷	-
2HQF	AcrB	Traslación de H ⁺ en mutante K940A	3.38	<i>E. coli</i> K-12	Su <i>et al</i> ²⁷	-
2HQG	AcrB	Traslación de H ⁺ en mutante T978A	3.38	<i>E. coli</i> K-12	Su <i>et al</i> ²⁷	-
2HRT	AcrB	Trímero asimétrico de AcrB	3.00	<i>E. coli</i>	Seeger <i>et al</i> ²⁶	-
2I6W	AcrB	Transportador de eflujo múltiple AcrB	3.10	<i>E. coli</i> BL21	Das <i>et al</i> ²⁸	-
2J8S	AcrB	Transportador de múltiples antibióticos	2.54	<i>E. coli</i>	Sennhauser <i>et al</i> ²⁹	-
2RDD	AcrBZ	Complejo AcrB-hélice transmembranal	3.50	<i>E. coli</i>	Tornroth <i>et al</i> ³⁰	AIC
2V50	MexB	Exportador de múltiples antibióticos	3.00	<i>P. aeruginosa</i>	Sennhauser <i>et al</i> ³¹	LMT
3AOA	AcrB	Sitio proximal de unión a sustratos	3.35	<i>E. coli</i> K-12	Nakashima <i>et al</i> ³²	-
3AOB	AcrB	Sitio proximal de unión a sustratos	3.35	<i>E. coli</i> K-12	Nakashima <i>et al</i> ³²	RFP
3AOC	AcrB	Sitio proximal de unión a sustratos	3.34	<i>E. coli</i> K-12	Nakashima <i>et al</i> ³²	ERY
3AOD	AcrB	Sitio proximal de unión a sustratos	3.30	<i>E. coli</i> K-12	Nakashima <i>et al</i> ³²	MIY
3NOC	AcrB	AcrB cristalizado utilizando DARPin	2.70	<i>E. coli</i>	Monroe <i>et al</i> ³³	-
3NOG	AcrB	AcrB cristalizado utilizando DARPin	3.34	<i>E. coli</i>	Monroe <i>et al</i> ³³	-
3W9H	AcrB	Inhibición de exportadores (AcrB)	3.05	<i>E. coli</i> K-12	Nakashima <i>et al</i> ³⁴	P9D
3W9I	MexB	Inhibición de exportadores (MexB)	2.71	<i>P. aeruginosa</i>	Nakashima <i>et al</i> ³⁴	-
3W9J	MexB	Inhibición de exportadores (MexB)	3.15	<i>P. aeruginosa</i>	Nakashima <i>et al</i> ³⁴	P9D
4DX5	AcrB	Sitios de unión (acceso y profundo)	1.90	<i>E. coli</i> K-12	Eicher <i>et al</i> ³⁵	MIY

Tabla 2.1. Continuación.

Estructuras de proteínas de membrana interna en forma trimérica (funcional)						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID ligando
4DX6	AcrB	Sitios de unión (acceso y profundo)	2.90	<i>E. coli</i> K-12	Eicher <i>et al</i> ⁶⁵	-
4DX7	AcrB	Sitios de unión (acceso y profundo)	2.25	<i>E. coli</i> K-12	Eicher <i>et al</i> ⁶⁵	DM2
4K0E	ZneA	Bomba de eflujo de metales, forma II	3.71	<i>C. metallidurans</i>	Pak <i>et al</i> ⁶⁶	ZN
4K0J	ZneA	Bomba de eflujo de metales, forma I	3.00	<i>C. metallidurans</i>	Pak <i>et al</i> ⁶⁶	ZN
4U8V	AcrB	Transporte de sustratos en AcrB	2.30	<i>E. coli</i>	Eicher <i>et al</i> ⁶⁷	MIY
4U8Y	AcrB	Transporte de sustratos en AcrB	2.10	<i>E. coli</i>	Eicher <i>et al</i> ⁶⁷	MIY
4U95	AcrB	Transporte de sustratos en AcrB	2.00	<i>E. coli</i>	Eicher <i>et al</i> ⁶⁷	MIY
4U96	AcrB	Transporte de sustratos en AcrB	2.20	<i>E. coli</i>	Eicher <i>et al</i> ⁶⁷	-
4ZIT	AcrB	AcrB en el grupo P21	3.30	<i>E. coli</i>	Ababou <i>et al</i> ⁶⁸	-
4ZIV	AcrB	Mutante triple de AcrB	3.16	<i>E. coli</i>	Ababou <i>et al</i> ⁶⁸	-
4ZIW	AcrB	Mutante de delección AcrB	3.40	<i>E. coli</i>	Ababou <i>et al</i> ⁶⁸	-
4ZJL	AcrB	Transportador unido a un antibiótico	3.47	<i>E. coli</i>	Ababou <i>et al</i> ⁶⁸	ERY
4ZJO	AcrB	Mutante triple unida a un antibiótico	3.60	<i>E. coli</i>	Ababou <i>et al</i> ⁶⁸	ERY
4ZJQ	AcrB	Mutante de delección unida a ERY	3.59	<i>E. coli</i>	Ababou <i>et al</i> ⁶⁸	ERY
5EN5	AcrB	Estructura Apo del transportador	2.30	<i>E. coli</i>	Sjuts <i>et al</i> ⁶⁹	-
5ENO	AcrB	Transportador unido a MBX2319	2.20	<i>E. coli</i>	Sjuts <i>et al</i> ⁶⁹	5QG
5ENP	AcrB	Transportador unido a MBX2931	1.90	<i>E. coli</i>	Sjuts <i>et al</i> ⁶⁹	5QF
5ENQ	AcrB	Transportador unido a MBX3132	1.80	<i>E. coli</i>	Sjuts <i>et al</i> ⁶⁹	5QE
5ENR	AcrB	Transportador unido a MBX3135	2.30	<i>E. coli</i>	Sjuts <i>et al</i> ⁶⁹	MBX
5ENS	AcrB	Transportador unido a rodamina	2.80	<i>E. coli</i>	Sjuts <i>et al</i> ⁶⁹	RHQ
5ENT	AcrB	Transportador unido a minociclina	2.50	<i>E. coli</i>	Sjuts <i>et al</i> ⁶⁹	MIY
5JMN	AcrB	AcrB en complejo con ácido fusídico	2.50	<i>E. coli</i> K-12	Oswald <i>et al</i> ⁴⁰	FUA
5LQ3	CmeB	Estructuras y dinámica de CmeB	3.55	<i>C. jejuni</i>	Su <i>et al</i> ⁴¹	-
5NC5	AcrBZ	AcrBZ en complejo con puromicina	3.20	<i>E. coli</i>	Wang <i>et al</i> ²⁰	PUY
5T00	CmeB	Proteína de membrana CmeB	3.15	<i>C. jejuni</i>	Su <i>et al</i> ⁴¹	-
5YIL	AcrB	Transportador de múltiples antibióticos	3.00	<i>E. coli</i>	Zwama <i>et al</i> ⁴²	-
6BAJ	AcrB	AcrB en una bicapa lipídica	3.20	<i>E. coli</i>	Qiu <i>et al</i> ⁴³	-
6CSX	AcrB	AcrB D407A en una bicapa lipídica	3.00	<i>E. coli</i> K-12	Qiu <i>et al</i> ⁴³	-
6IIA	MexB	MexB en complejo con LMNG	2.91	<i>P. aeruginosa</i>	Sakurai <i>et al</i> ⁴⁴	AV0
6OWS	AdeB	Transportador de eflujo múltiple AdeB	2.98	<i>A. baumannii</i>	Su <i>et al</i> ⁴⁵	-
6Q4N	AcrB	AcrB V340A unido a ácido fusídico	2.80	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁴⁶	FUA
6Q4O	AcrB	AcrB I27A unido a ácido fusídico	2.80	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁴⁶	FUA
6Q4P	AcrB	AcrB N298A unido a ácido fusídico	2.80	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁴⁶	FUA
6SGR	AcrBZ	Estructura de AcrBZ de <i>E. coli</i>	3.17	<i>E. coli</i>	Du <i>et al</i> ⁴⁷	-
6SGS	AcrBZ	Estructura de AcrBZ de <i>E. coli</i>	3.20	<i>E. coli</i>	Du <i>et al</i> ⁴⁷	-
6SGT	AcrB	Estructura de AcrB de <i>E. coli</i>	3.46	<i>E. coli</i>	Du <i>et al</i> ⁴⁷	-
6SGU	AcrB	Estructura de AcrB de <i>E. coli</i>	3.27	<i>E. coli</i>	Du <i>et al</i> ⁴⁷	-
6T7S	MexB	Estructura de MexB	4.50	<i>P. aeruginosa</i>	Glavier <i>et al</i> ²²	-
6VEJ	TriABC	Transportador TriABC	4.50	<i>P. aeruginosa</i>	Fabre <i>et al</i> ⁴⁸	-
6VKS	MtrD	Mecanismo de reconocimiento (MtrD)	3.02	<i>N. gonorrhoeae</i>	Lyu <i>et al</i> ⁴⁹	AIX
6VKT	MtrD	Mecanismo de reconocimiento (MtrD)	2.72	<i>N. gonorrhoeae</i>	Lyu <i>et al</i> ⁴⁹	ERY
6Z12	AcrB	AcrB solubilizada en un copolímero	4.60	<i>S. enterica</i>	Johnson <i>et al</i> ⁶⁰	-
6ZO5	AcrB	TM1/TM2 de AcrB-G619P_G621P	2.50	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁵¹	FUA

Tabla 2.1. Continuación.

Estructuras de proteínas de membrana interna en forma trimérica (funcional)						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID ligando
6ZO6	AcrB	AcrB-G619P: sitio profundo de unión	2.35	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁶¹	MIY
6ZO7	AcrB	AcrB-G619P: sitio de acceso L y T	2.85	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁶¹	3YI
6ZO8	AcrB	AcrB-G621P: sitio profundo de unión	2.50	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁶¹	MIY
6ZO9	AcrB	AcrB-G621P: sitio de acceso T	2.70	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁶¹	RBT
6ZOA	AcrB	AcrB: inducción del protómero T	3.05	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁶¹	-
6ZOB	AcrB	AcrB: sitio de acceso (protómero L)	2.80	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁶¹	3YI
6ZOC	AcrB	Unión simultánea en AcrB-G616P L y T	2.89	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁶¹	ERY
6ZOD	AcrB	Sitio profundo (TM7/TM8-TM1/TM2)	2.85	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁶¹	FUA
6ZOF	AcrB	Sustrato en TM7/TM8 (protómero T)	3.30	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁶¹	FUA
6ZOG	AcrB	AcrB-I38F_I671T: sitio profundo	2.75	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁶¹	MIY
6ZOH	AcrB	Unión en AcrB-G619P_G621P L y T	2.80	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁶¹	3YI
7B5P	AcrB	Proteína AcrB en un polímero anfifílico	3.20	<i>E. coli</i>	Higgins <i>et al</i> ⁶²	-
7B8P	AcrB	AdeB en el estado OOO	3.54	<i>A. baumannii</i>	Ornik-Cha <i>et al</i> ⁶³	-
7B8Q	AcrB	AdeB en estado LOO	3.84	<i>A. baumannii</i>	Ornik-Cha <i>et al</i> ⁶³	-
7B8R	AcrB	AcrB unido a doxiciclina	2.10	<i>A. baumannii</i>	Ornik-Cha <i>et al</i> ⁶³	DXT
7B8S	AcrB	AcrB unido a ácido fusídico	2.30	<i>A. baumannii</i>	Ornik-Cha <i>et al</i> ⁶³	FUA
7B8T	AcrB	AcrB unido a levofloxacina	2.70	<i>A. baumannii</i>	Ornik-Cha <i>et al</i> ⁶³	LFX
7CZ9	OqxB	Transportador de eflujo OqxB	1.85	<i>K. pneumoniae</i>	Bharatham <i>et al</i> ⁶⁴	-
7KF5	CusA	Transportador de metales pesados	3.20	<i>E. coli</i>	Moseng <i>et al</i> ⁶⁵	-
7KF6	CusA	Transportador de metales pesados	3.40	<i>E. coli</i>	Moseng <i>et al</i> ⁶⁵	CU1
7KF7	CusA	Transportador de metales pesados	2.80	<i>E. coli</i>	Moseng <i>et al</i> ⁶⁵	CU1
7KF8	CusA	Transportador de metales pesados	3.00	<i>E. coli</i>	Moseng <i>et al</i> ⁶⁵	CU1
7KGD	AdeB	Estructuras AdeB-I	3.64	<i>A. baumannii</i>	Morgan <i>et al</i> ⁶⁵	-
7KGE	AdeB	Estructuras AdeB-II	3.21	<i>A. baumannii</i>	Morgan <i>et al</i> ⁶⁵	-
7KGF	AdeB	Estructuras AdeB-III	3.42	<i>A. baumannii</i>	Morgan <i>et al</i> ⁶⁵	-
7KGG	AdeB	Estructura AdeB-ET-I	2.97	<i>A. baumannii</i>	Morgan <i>et al</i> ⁶⁵	ET
7KGH	AdeB	Estructura AdeB-ET-II	3.79	<i>A. baumannii</i>	Morgan <i>et al</i> ⁶⁵	ET
7KGI	AdeB	Estructura AdeB-ET-III	3.34	<i>A. baumannii</i>	Morgan <i>et al</i> ⁶⁵	ET
7M4P	AdeJ	Transportador AdeJ con eravaciclina	2.86	<i>A. baumannii</i>	Zhang <i>et al</i> ⁶⁶	YQM
7M4Q	AdeJ	Transportador AdeJ	2.87	<i>A. baumannii</i>	Zhang <i>et al</i> ⁶⁶	-
7O3L	AcrB	Proteína doble mutante AcrB	3.53	<i>E. coli</i>	Ababou <i>et al</i> ^{NP}	-
7O3M	AcrB	Proteína mutante AcrB - 1	3.55	<i>E. coli</i>	Ababou <i>et al</i> ^{NP}	-
7O3N	AcrB	Proteína mutante AcrB - 2	3.56	<i>E. coli</i>	Ababou <i>et al</i> ^{NP}	-
7OUK	AcrB	BDM88855 unido a AcrB	2.60	<i>E. coli</i>	Ple <i>et al</i> ⁶⁷	1K8
7OUL	AcrB	BDM88832 unido a AcrB-R971A	2.80	<i>E. coli</i>	Ple <i>et al</i> ⁶⁷	1KE
7OUM	AcrB	BDM88855 unido a AcrB-R971A	2.45	<i>E. coli</i>	Ple <i>et al</i> ⁶⁷	1K8
7RR6	AcrB	Proteína de eflujo múltiple AcrB	3.10	<i>E. coli</i> K-12	Trinh <i>et al</i> ^{NP}	-
7RR7	AcrB	Proteína de eflujo múltiple AcrB	3.05	<i>E. coli</i> K-12	Trinh <i>et al</i> ^{NP}	-
7RR8	AcrB	Proteína de eflujo múltiple AcrB	3.51	<i>E. coli</i> K-12	Trinh <i>et al</i> ^{NP}	-
7RY3	AdeJ	Transportador AdeJ unido a TP-6076	2.91	<i>A. baumannii</i>	Morgan <i>et al</i> ⁶⁸	80P
8DEU	MtrD	MtrD con el complejo peptídico CASP	2.95	<i>N. gonorrhoeae</i>	Lyu <i>et al</i> ⁶⁹	-
8DEV	MtrD	MtrD con el complejo de colistina	3.08	<i>N. gonorrhoeae</i>	Lyu <i>et al</i> ⁶⁹	-
8DEW	MtrD	MtrD con el complejo de LL-37	2.89	<i>N. gonorrhoeae</i>	Lyu <i>et al</i> ⁶⁹	-

Tabla 2.1. Continuación.

Estructuras de proteínas de membrana interna en forma trimérica (funcional)						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID ligando
8F3E	AcrD	Transportador trimérico AcrD	3.09	<i>E. coli</i>	Zhang <i>et al</i> ⁶⁰	-
8F4R	AcrD	Transportador AcrD con gentamicina	3.06	<i>E. coli</i>	Zhang <i>et al</i> ⁶⁰	LLL
8FFK	AcrB	Transportador de múltiples antibióticos	2.82	<i>K. pneumoniae</i>	Zhang <i>et al</i> ⁶¹	-
8FFS	AcrB	Transportador de múltiples antibióticos	2.96	<i>K. pneumoniae</i>	Zhang <i>et al</i> ⁶¹	ERY
Estructuras de proteínas de membrana interna en forma monomérica/dimérica						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID ligando
1IWG	AcrB	Transportador múltiple AcrB	3.50	<i>E. coli</i>	Murakami <i>et al</i> ⁶²	-
1OY6	AcrB	Capacidad de unión múltiple de AcrB	3.68	<i>E. coli</i>	Yu <i>et al</i> ⁶³	-
1OY8	AcrB	Capacidad de unión múltiple de AcrB	3.63	<i>E. coli</i>	Yu <i>et al</i> ⁶³	RHQ
1OY9	AcrB	Capacidad de unión múltiple de AcrB	3.80	<i>E. coli</i>	Yu <i>et al</i> ⁶³	ET
1OYD	AcrB	Capacidad de unión múltiple de AcrB	3.80	<i>E. coli</i>	Yu <i>et al</i> ⁶³	DEQ
1OYE	AcrB	Capacidad de unión múltiple de AcrB	3.48	<i>E. coli</i>	Yu <i>et al</i> ⁶³	CPF
1T9T	AcrB	Sitio de unión periplásmico de AcrB	3.23	<i>E. coli</i>	Yu <i>et al</i> ⁶³	-
1T9U	AcrB	Sitio de unión periplásmico de AcrB	3.11	<i>E. coli</i>	Yu <i>et al</i> ⁶⁴	CPF
1T9V	AcrB	Sitio de unión periplásmico de AcrB	3.80	<i>E. coli</i>	Yu <i>et al</i> ⁶⁴	RHQ
1T9W	AcrB	Sitio de unión periplásmico de AcrB	3.23	<i>E. coli</i>	Yu <i>et al</i> ⁶⁴	NFN
1T9X	AcrB	Sitio de unión periplásmico de AcrB	3.08	<i>E. coli</i>	Yu <i>et al</i> ⁶⁴	ET
1T9Y	AcrB	Sitio de unión periplásmico de AcrB	3.64	<i>E. coli</i>	Yu <i>et al</i> ⁶⁴	-
2W1B	AcrB	AcrB en complejo con ácido biliar	3.85	<i>E. coli</i> K-12	Drew <i>et al</i> ⁶⁵	DXC
3D9B	AcrB	Estructura simétrica de AcrB	3.42	<i>E. coli</i> BL21	Veesler <i>et al</i> ⁶⁶	NI
3K07	CusA	Estructura cristalográfica de CusA	3.52	<i>E. coli</i>	Long <i>et al</i> ⁶⁷	-
3K0I	CusA	Complejo CusA-Cu (I)	4.12	<i>E. coli</i> K-12	Long <i>et al</i> ^{NP}	CU1
3KSO	CusA	Transportador de metales pesados	4.37	<i>E. coli</i>	Long <i>et al</i> ⁶⁷	-
3KSS	CusA	Transportador de metales pesados	3.88	<i>E. coli</i>	Long <i>et al</i> ⁶⁷	-
4C48	AcrBZ	Estructura del complejo AcrBZ	3.30	<i>E. coli</i> K-12	Du <i>et al</i> ⁶⁸	NI
4CDI	AcrBZ	Estructura del complejo AcrBZ	3.70	<i>E. coli</i>	Du <i>et al</i> ⁶⁸	-
4K7Q	AcrB	AcrB en complejo con linezolid	3.50	<i>E. coli</i> K-12	Hung <i>et al</i> ⁶⁹	ZLD
4MT1	MtrE	Transportador de membrana interna	3.54	<i>N. gonorrhoeae</i>	Lei <i>et al</i> ⁷⁰	-
4R86	AcrD	Transportador de aminoglucósidos	3.00	<i>S. typhimurium</i>	Kim <i>et al</i> ^{NP}	-
4ZLJ	AcrB	Estructura de AcrB	3.26	<i>E. coli</i> K-12	Ababou <i>et al</i> ^{NP}	-
4ZLL	AcrB	Estructura de AcrB (mutante triple)	3.36	<i>E. coli</i> K-12	Ababou <i>et al</i> ^{NP}	-
4ZLN	AcrB	Estructura de AcrB (mutante, delección)	3.56	<i>E. coli</i> K-12	Ababou <i>et al</i> ^{NP}	-
5KHN	HpnN	Transportador de hopanoides	3.44	<i>B. multivorans</i>	Kumar <i>et al</i> ⁷¹	-
5KHS	HpnN	Transportador de hopanoides	3.76	<i>B. multivorans</i>	Kumar <i>et al</i> ⁷¹	-
6AJF	MmpL3	Transportador de ácidos micólicos	2.70	<i>M. smegmatis</i>	Zhang <i>et al</i> ⁷²	-
6AJG	MmpL3	Transportador unido a SQ109	2.60	<i>M. smegmatis</i>	Zhang <i>et al</i> ⁷²	3RX
6AJH	MmpL3	Transportador unido a AU1235	2.86	<i>M. smegmatis</i>	Zhang <i>et al</i> ⁷²	9ZF
6AJI	MmpL3	Transportador unido a Rimonabant	2.90	<i>M. smegmatis</i>	Zhang <i>et al</i> ⁷²	AY6
6AJJ	MmpL3	Transportador unido a ICA38	2.79	<i>M. smegmatis</i>	Zhang <i>et al</i> ⁷²	J9E
6NZI	AcrB	Proteína AcrB en presencia de Cd	4.44	<i>E. coli</i>	Smith <i>et al</i> ^{NP}	CD
6OR2	MmpL3	Transportador de lípidos MmpL3	2.59	<i>M. smegmatis</i>	Su <i>et al</i> ⁷³	LMT
6WU0	HpnN	Transportador de hopanoides	3.59	<i>B. pseudomallei</i>	Su <i>et al</i> ⁷⁴	-
6ZOE	AcrB	Protómero T simétrico de AcrB-F563A	2.85	<i>E. coli</i> K-12	Tam <i>et al</i> ⁶¹	-

Tabla 2.1. Continuación.

Estructuras de proteínas de membrana interna en forma monomérica/dimérica						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID ligando
7C2M	MmpL3	Transportador unido a NITD-349	3.10	<i>M. smegmatis</i>	Yang <i>et al</i> ⁷⁵	FFU
7C2N	MmpL3	Transportador unido a SPIRO	2.82	<i>M. smegmatis</i>	Yang <i>et al</i> ⁷⁵	FG0
7K7M	MmpL3	Proteína de membrana de MmpL3	3.33	<i>M. smegmatis</i>	Su <i>et al</i> ⁷⁶	-
7K8A	MmpL3	Transportador de monomicolato de trehalosa	3.65	<i>M. smegmatis</i>	Su <i>et al</i> ⁷⁶	-
7K8B	MmpL3	Transportador de monomicolato de trehalosa	2.94	<i>M. smegmatis</i>	Su <i>et al</i> ⁷⁶	-
7K8C	MmpL3	Transportador de monomicolato de trehalosa	4.27	<i>M. smegmatis</i>	Su <i>et al</i> ⁷⁶	-
7K8D	MmpL3	Transportador de monomicolato de trehalosa	4.33	<i>M. smegmatis</i>	Su <i>et al</i> ⁷⁶	-
7N6B	MmpL3	MmpL3 en estado TMM (unión)	2.66	<i>M. smegmatis</i>	Su <i>et al</i> ⁷⁶	-
7NVH	MmpL3	Transportador de ácidos micólicos	3.00	<i>M. tuberculosis</i>	Adams <i>et al</i> ⁷⁷	-
7WNX	MmpL3	MmpL3 en complejo con ST004	3.36	<i>M. smegmatis</i>	Zhang <i>et al</i> ^{NP}	112
8F4N	AcrD	Transportador dimérico AcrD	2.95	<i>E. coli</i>	Zhang <i>et al</i> ⁶⁰	-
8F56	AcrD	AcrD (dímero) tratado con gentamicina	2.98	<i>E. coli</i>	Zhang <i>et al</i> ⁶⁰	-
Estructuras de proteínas de fusión membranal en forma monomérica/dimérica						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID ligando
2F1M	AcrA	Flexibilidad conformacional de AcrA	2.71	<i>E. coli</i>	Mikolosko <i>et al</i> ⁷⁸	-
3H94	CusB	Proteína de fusión membranal CusB	3.84	<i>E. coli</i> K-12	Su <i>et al</i> ⁷⁹	AG
3OOC	CusB	Proteína de fusión membranal CusB	3.40	<i>E. coli</i> K-12	Su <i>et al</i> ⁷⁹	-
3OPO	CusB	Proteína de fusión membranal CusB	3.85	<i>E. coli</i> K-12	Su <i>et al</i> ⁷⁹	AG
3OW7	CusB	Proteína de fusión membranal CusB	3.78	<i>E. coli</i> K-12	Su <i>et al</i> ⁷⁹	CU1
4DK1	MacA-MexA	Proteína quimérica MacA-MexA	3.50	<i>P. aeruginosa</i>	Xu <i>et al</i> ⁶⁰	-
Estructuras de proteínas de membrana externa en forma trimérica (funcional)						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID ligando
1EK9	TolC	Proteína de membrana externa TolC	2.10	<i>E. coli</i>	Koronakis <i>et al</i> ⁸¹	-
1TQQ	TolC	Complejo TolC-hexaaminocobalto	2.75	<i>E. coli</i>	Higgins <i>et al</i> ⁸²	NCO
2VDD	TolC	Estado abierto de la proteína TolC	3.30	<i>E. coli</i> K-12	Bavro <i>et al</i> ⁸³	-
2VDE	TolC	Estado abierto de la proteína TolC	3.20	<i>E. coli</i> K-12	Bavro <i>et al</i> ⁸³	-
2WMZ	TolC	Estructura de TolC (mutante RS)	2.90	<i>E. coli</i> K-12	Pei <i>et al</i> ⁸⁴	-
2XMN	TolC	Movimiento de las hélices de TolC	2.85	<i>E. coli</i> K-12	Pei <i>et al</i> ⁸⁴	-
3D5K	OprM	Canal OprM de <i>P. aeruginosa</i>	2.40	<i>P. aeruginosa</i>	Phan <i>et al</i> ⁸⁵	-
4MT4	CmeC	Canal de membrana externa CmeC	2.37	<i>C. jejuni</i>	Su <i>et al</i> ⁸⁶	-
4Y1K	OprM	Factor de membrana externa OprM	3.80	<i>P. aeruginosa</i>	Monlezun <i>et al</i> ⁸⁷	-
5AZP	OprN	Proteína de membrana OprN	1.69	<i>P. aeruginosa</i>	Yonehara <i>et al</i> ⁸⁸	-
5AZS	OprJ	Proteína de membrana OprN	3.10	<i>P. aeruginosa</i>	Yonehara <i>et al</i> ⁸⁸	-
5IUJ	OprN	Canal de membrana externa	2.29	<i>P. aeruginosa</i>	Ntsogo <i>et al</i> ⁸⁹	-
5NSW	OprN	Cavidades del componente OprN	2.50	<i>P. aeruginosa</i>	Ntsogo <i>et al</i> ⁸⁹	XE
6WXH	TolC	TolC con un fragmento de colicina E1	3.09	<i>E. coli</i> K-12	Budiardjo <i>et al</i> ⁹⁰	-
6WXI	TolC	TolC con un fragmento de colicina E2	2.84	<i>E. coli</i> K-12	Budiardjo <i>et al</i> ⁹⁰	-
Estructuras de proteínas de membrana externa en forma monomérica						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID ligando
1WP1	OprM	Proteína de membrana externa	2.56	<i>P. aeruginosa</i>	Akama <i>et al</i> ⁹¹	-

Tabla 2.1. Continuación.

Estructuras de proteínas de membrana externa en forma monomérica						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID ligando
1YC9	VceC	Proteína de membrana externa VceC	1.80	<i>V. cholerae</i>	Federici <i>et al</i> ^{β2}	-
3PIK	CusC	Proteína de membrana externa CusC	2.30	<i>E. coli</i>	Kulathila <i>et al</i> ^{β3}	-
4K34	CusC	Plegamiento y formación de CusC	2.69	<i>E. coli</i> K-12	Lei <i>et al</i> ^{β4}	-
4K7K	CusC	Plegamiento y formación de CusC	2.53	<i>E. coli</i> K-12	Lei <i>et al</i> ^{β4}	-
4K7R	CusC	Plegamiento y formación de CusC	2.09	<i>E. coli</i> K-12	Lei <i>et al</i> ^{β4}	-
4MT0	MtrE	Canal de membrana externa MtrE	3.29	<i>N. gonorrhoeae</i>	Lei <i>et al</i> ^{β0}	-
5AZO	OprN	Proteína de membrana OprN	2.70	<i>P. aeruginosa</i>	Yonehara <i>et al</i> ^{β8}	-
6ZRE	OprM	Parte del transportador MexAB-OprM	2.80	<i>P. aeruginosa</i>	Ntsogo <i>et al</i> ^{NP}	-
7AKZ	OprM	Parte del transportador MexAB-OprM	3.20	<i>P. aeruginosa</i>	Ntsogo <i>et al</i> ^{NP}	-

Notas: **1.** La descripción asociada a la estructura proporciona información sobre la identidad, características, ligandos o conformaciones de los transportadores. **2.** Los componentes de CusBAC pertenecen a la subfamilia de exportadores de metales pesados (HME). **3.** Las referencias “NP” corresponden a artículos no publicados.

II.3. Estructura de AcrB y transportadores RND homólogos

La primera estructura reportada de AcrB fue obtenida mediante datos de difracción de rayos X de cristales de un monómero en la conformación de entrada, lo que permitió generar el homotrímero de AcrB por simetría cristalográfica. Cada monómero de las proteínas RND (de membrana interna) contiene un dominio transmembranal conformado por 12 hélices. Como se puede observar en la **Figura 2.2**, AcrB contiene un dominio periplásmico que a su vez se divide en el “dominio de poro”, cuyos subdominios conforman 2 sitios de unión de sustratos, y en el “dominio de docking de TolC”, que interactúa con la proteína de fusión membranal (AcrA). El dominio de docking de TolC de cada monómero posee un *loop* que lo conecta con el monómero vecino, estabilizando así al homotrímero de AcrB.^{13,19}

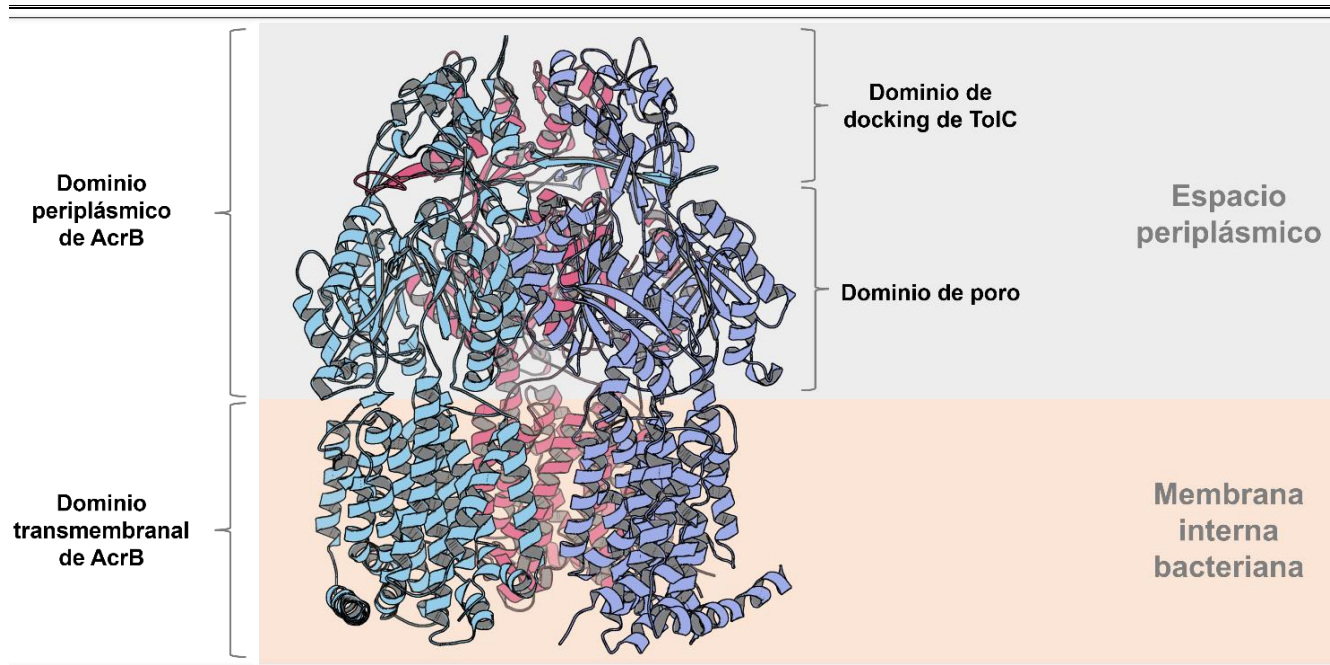


Figura 2.2. Estructura del transportador AcrB: dominios transmembranal y periplásmico (código PDB: 2DHH). Figura elabora con PyMOL.

Se había planteado que la especificidad de sustratos de los transportadores RND estaba determinada por las características estructurales de su dominio periplásmico. Esta hipótesis fue confirmada mediante un experimento que involucró el diseño de proteínas quiméricas: al reemplazar el dominio periplásmico de la proteína AcrD (responsable del eflujo de aminoglucósidos) por el de AcrB, se observó el perfil de eflujo característico de esta última. Se obtuvieron resultados similares al reemplazar el dominio periplásmico de AcrB por el de AcrD, generando una proteína quimérica capaz de expulsar aminoglucósidos.¹³

II.4. Sitios de unión de sustratos

Los transportadores de la familia RND contienen sitios poliespecíficos de unión a sustratos que permiten el reconocimiento y la expulsión de diversos compuestos, principalmente desde el exterior de la membrana interna y el espacio periplásmico hacia el exterior de la célula, incluyendo múltiples antibióticos de uso clínico. Debido a lo anterior, los

transportadores de esta familia y su sobreexpresión por diferentes mutaciones (detectadas en aislamientos clínicos), se han asociado a bacterias con fenotipo MDR.^{12,15}

Los sitios de unión de sustratos de AcrB y otras proteínas RND han sido identificados en estructuras unidas a diferentes ligandos (**Figura 2.3**). En dichas estructuras, se determinó que los sitios de unión son hendiduras compuestas por residuos hidrofóbicos y polares, que establecen múltiples interacciones de van der Waals y de apilamiento π (π -stacking) con los sustratos, además de puentes de hidrógeno. Una posible explicación para el amplio perfil de reconocimiento de sustratos por AcrB (y el resto de los transportadores de esta familia) es que diferentes sustratos interactúan con combinaciones distintas de residuos de aminoácidos. Esta propuesta ha sido apoyada por resultados obtenidos en estudios de acoplamiento molecular y simulación de dinámica molecular.¹⁵

Se ha descrito la presencia de dos principales sitios de unión de sustratos en el dominio de poro de AcrB, denominados sitio de unión proximal o de acceso y sitio de unión distal o profundo (**Figura 2.3, A y B**), que se encuentran separados por un *switch loop* (**Figura 2.3 C**) compuesto principalmente por residuos de glicina. Se ha propuesto que los antibióticos de mayor masa molecular (como eritromicina y rifampicina) se unen inicialmente al sitio de unión proximal y son translocados al sitio de unión distal por el movimiento del *switch loop* generado por la rotación de los 3 monómeros de AcrB durante la translocación de protones; por su parte, los antibióticos de menor masa (como minociclina y doxorubicina) pueden unirse directamente al sitio de unión distal. Lo anterior evidencia la importancia del *switch loop* en la traslocación y el eflujo de sustratos de mayor tamaño.^{12,18,19}

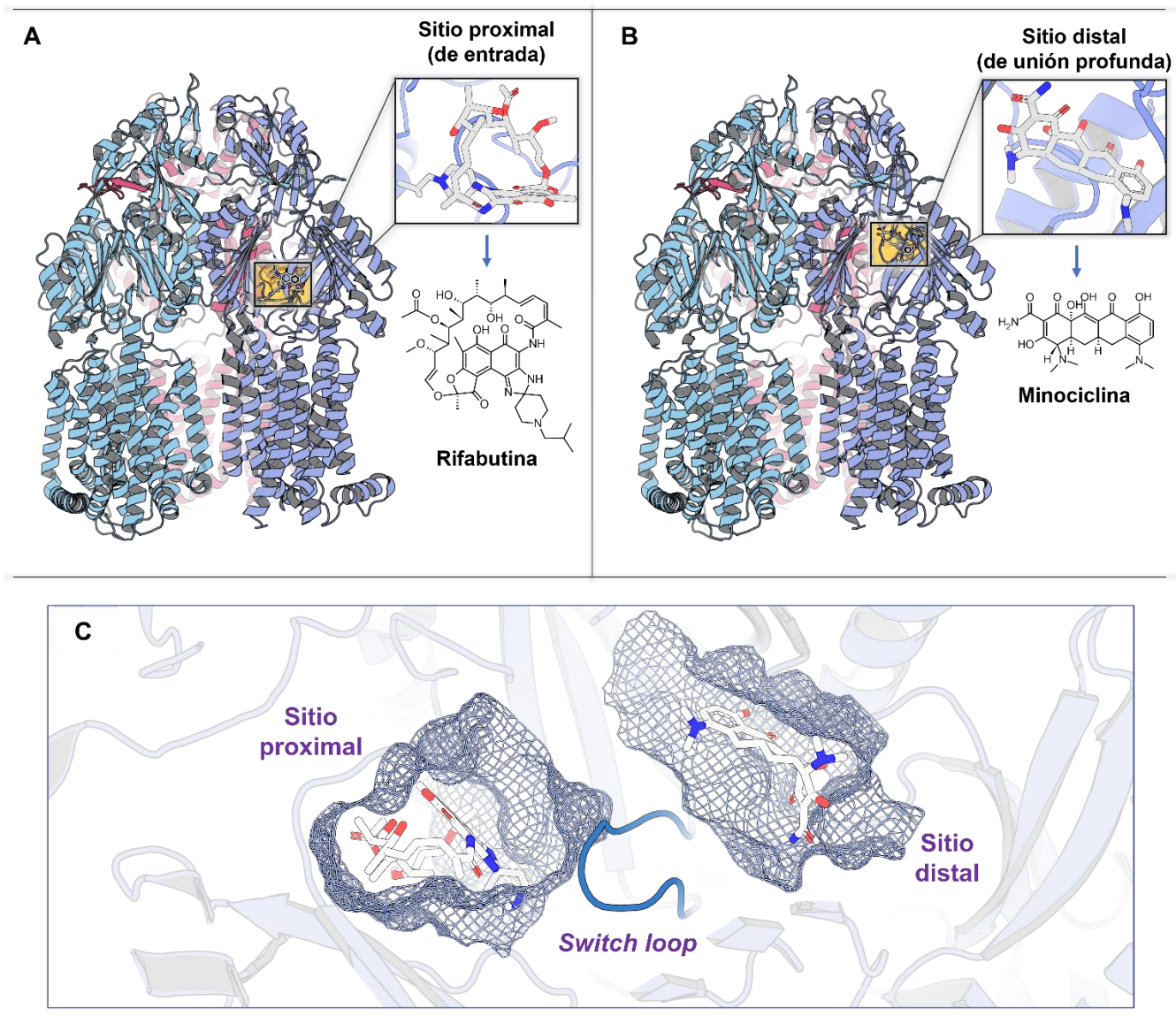


Figura 2.3. Diferentes sustratos (antibióticos) ubicados en los 2 principales sitios de unión de AcrB reportados. **A:** se identifica a una molécula de rifabutina en el sitio proximal o de entrada (código PDB: 6ZO9). **B:** se identifica a una molécula de minociclina en el sitio de unión distal o de unión profunda (código PDB: 6ZO8). **C:** se identifica a ambos sitios de unión separados por el switch loop (en color azul marino), cuyo movimiento permite la traslocación de sustratos del sitio de unión proximal al sitio de unión distal. Figura elaborada con PyMOL.

En el año 2016, se reportó un sitio de unión adicional para moléculas lipofílicas con grupos carboxilo, el cual fue identificado en una cavidad del dominio transmembranal de AcrB (**Figura 2.4**). Se ha postulado que los antibióticos que interactúan con este sitio de unión son translocados al sitio de unión distal debido al movimiento de hélices generado por

el mecanismo rotacional asociado a la translocación de protones al interior celular. Debido a lo anterior, es posible que los sitios de unión de sustratos de los transportadores RND sean específicos para moléculas con propiedades o características definidas.¹²

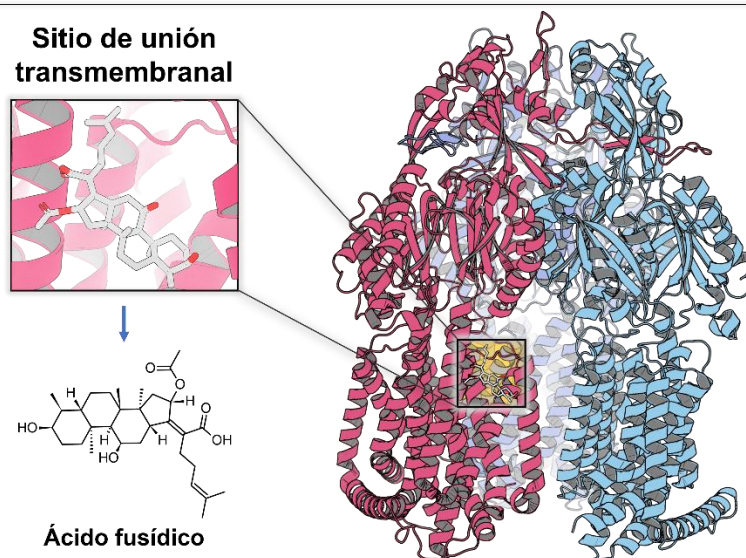


Figura 2.4. Sitio de unión localizado en el dominio transmembranal de AcrB, en el que se encuentra unida una molécula de ácido fusídico (código PDB: 5JMN). Figura elaborada con PyMOL.

Los transportadores RND poseen 3 canales de entrada de sustratos a sus respectivos sitios de unión (**Figura 2.5**). El canal 1 está abierto hacia la superficie exterior de la membrana interna, mientras que el canal 2 se encuentra abierto hacia el periplasma; ambos canales conducen a la entrada del sitio de unión proximal. El canal 3 está abierto hacia la cavidad central de la proteína de membrana interna y conduce directamente al sitio de unión distal. Se ha registrado que el canal 3 favorece la entrada de moléculas con propiedades planares, aromáticas y catiónicas. La presencia de diferentes canales y sitios de unión en la proteína AcrB se relaciona con su amplio perfil de reconocimiento de sustratos.¹²

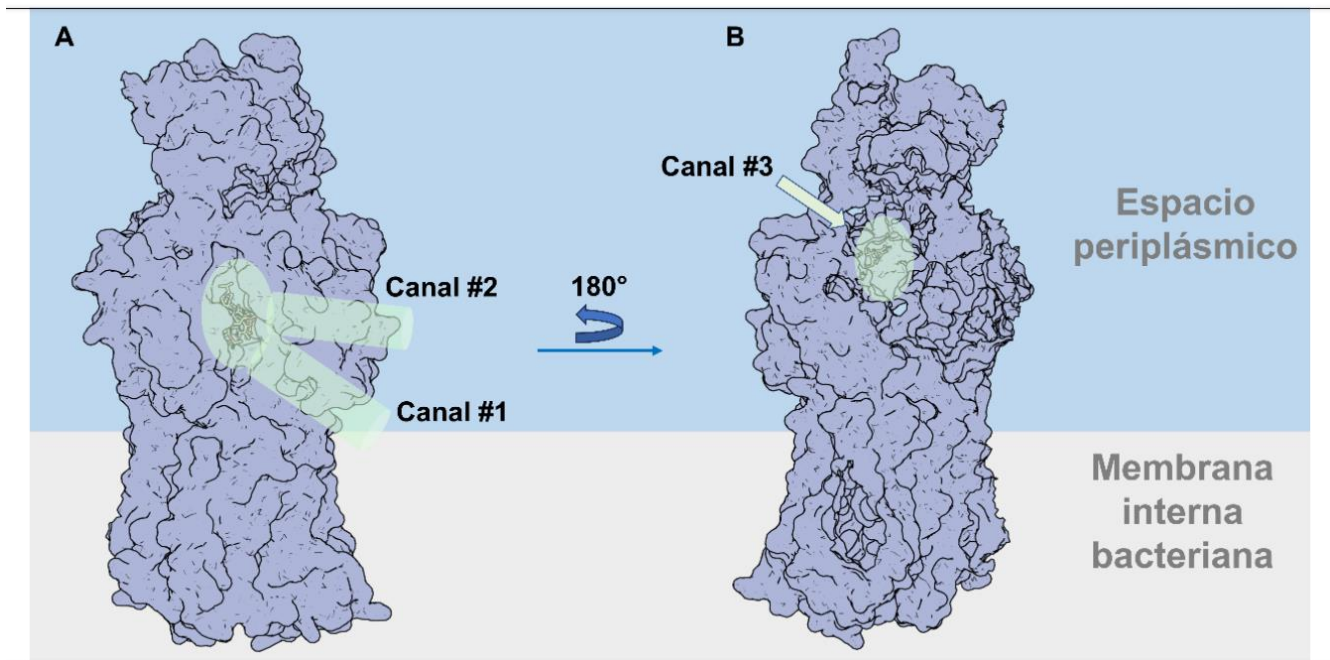


Figura 2.5. Canales de entrada a los sitios de unión proximal (A) y distal (B) identificados en protómeros de AcrB (códigos PDB: 6ZO9 y 6ZO8). El canal 3 se observa desde la cavidad central de la forma trimérica de AcrB. Figura elaborada con PyMOL.

Se han reportado estructuras de transportadores RND acoplados a diferentes inhibidores, lo que ha facilitado la elucidación de su mecanismo de acción y las interacciones de unión que se presentan. Lo anterior ha permitido determinar que los inhibidores de los transportadores de eflujo de la familia RND se unen a un único sitio altamente hidrofóbico cercano al sitio de unión distal, conocido como “trampa hidrofóbica”.¹⁵ Esta es una hendidura estrecha con residuos hidrofóbicos que fue identificada cuando se reportaron las primeras estructuras de AcrB y MexB en complejo con un inhibidor de transportadores de eflujo (D13-9001) en el año 2013. El sitio de unión de dicho inhibidor fue similar en AcrB y en MexB, con algunas diferencias en su unión en el canal de translocación de sustratos.^{15,95}

Se confirmó la importancia de esta trampa hidrofóbica cuando se reportaron las estructuras de una proteína quimérica compuesta por los dominios periplásmicos de AcrB unida a algunos inhibidores tipo piranopiridinas. En estas estructuras, se observó la unión de las piranopiridinas a la trampa hidrofóbica, estableciéndose múltiples interacciones

hidrofóbicas. Se sugiere que el posible mecanismo de inhibición de las moléculas que se unen a la trampa hidrofóbica es el bloqueo del sitio de unión de sustratos, ya que tiene lugar el traslape de ambos sitios de unión y los inhibidores se unen a la trampa hidrofóbica con mayor afinidad que los sustratos de eflujo (**Figura 2.6**).¹⁵

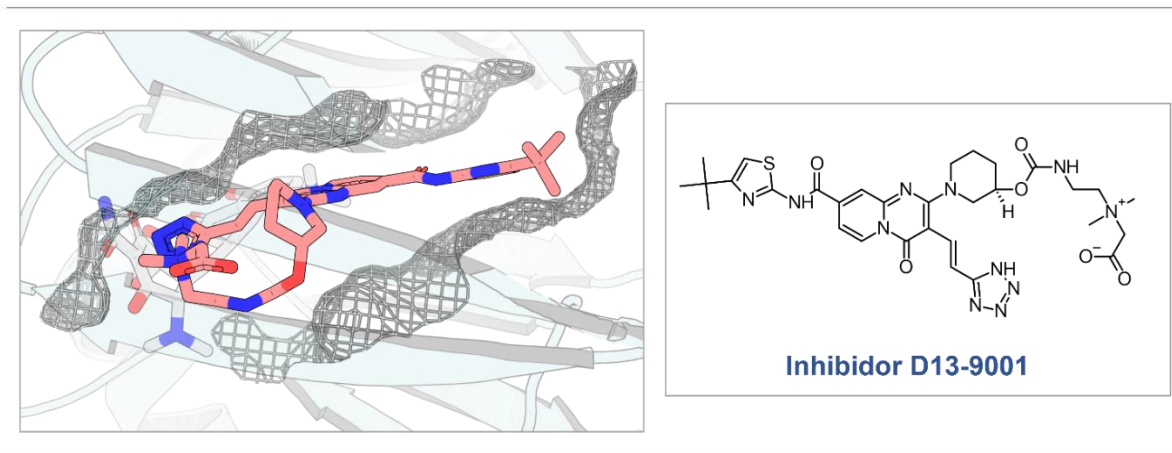


Figura 2.6. Se observa al inhibidor D13-9001 localizado en la “trampa hidrofóbica” de AcrB. Es posible apreciar el traslape del sitio de unión del inhibidor (código PDB: 3W9H) con el sitio de unión distal en el que se uniría un sustrato de eflujo, en este caso minociclina (código PDB: 6ZO8). Figura elaborada con PyMOL.

II.5. Principales sustratos

Entre los sustratos de los transportadores de la familia RND, es posible encontrar moléculas aromáticas o alifáticas, voluminosas o pequeñas y aniónicas, catiónicas o neutras. Algunos ejemplos de estos sustratos son colorantes, sales biliares, solventes orgánicos y diferentes clases de antibióticos.^{13,96} En las estructuras recopiladas en este trabajo, es posible identificar múltiples sustratos en los sitios de unión de los transportadores RND, tal como se muestra en la **Tabla 2.2** y en la **Figura 2.7**. Se encontró un total de 15 sustratos pertenecientes a diferentes clases de antibióticos, tales como aminoglucósidos, betalactámicos, fluoroquinolonas, macrólidos, oxazolidinonas, rifamicinas y tetraciclinas. Se encontraron además sustratos como ácidos biliares, colorantes y agentes surfactantes; sin embargo, estos carecen de interés farmacológico.

Tabla 2.2. Principales sustratos de interés farmacológico (antibióticos) identificados en las estructuras de los transportadores RND depositadas en el RCSB PDB

ID Ligando	Nombre	Descripción ^{97,98,99,100}	Grupo al que pertenece
MIY	Minociclina	Antibiótico semisintético activo contra bacterias Gram-positivas y negativas. Útil para tratar infecciones cutáneas	Tetraciclinas
DXT	Doxiciclina	Antibiótico semisintético de amplio espectro. Medicamento de elección contra infecciones por <i>Chlamydomphilas</i> spp	Tetraciclinas
YQM	Eravaciclina	Antibiótico sintético de amplio espectro utilizado en el tratamiento de infecciones por bacterias multirresistentes	Tetraciclinas
80P	TP-6076*	Antibiótico sintético experimental de amplio espectro, desarrollado por TetraPhase Pharmaceuticals ¹⁰¹	Tetraciclinas
ERY	Eritromicina	Antibiótico de amplio espectro útil en el tratamiento de infecciones cutáneas y de vías respiratorias altas	Macrólidos
RBT	Rifabutina	Antibiótico semisintético de amplio espectro, utilizado en el tratamiento de infecciones causadas por micobacterias	Rifamicinas
3YI	3-formil rifamicina SV	Antibiótico derivado de la rifamicina. Efectivo en el tratamiento de infecciones causadas por micobacterias	Rifamicinas
RFP	Rifampicina	Antibiótico semisintético de amplio espectro efectivo contra estafilococos y bacterias Gram-negativas	Rifamicinas
LLL	Gentamicina C1A	Antibiótico utilizado para tratar infecciones respiratorias, urinarias y sistémicas por bacterias Gram-negativas	Aminoglucósidos
PUY	Puromicina	Antibiótico con actividad antibacteriana, antiparasitaria y antineoplásica. Comúnmente utilizado en cultivos celulares	Aminonucleósidos
LFX	Levofloxacina	Antibiótico de amplio espectro útil en el tratamiento de infecciones de vías respiratorias y urinarias	Fluoroquinolonas
CPF	Ciprofloxacino	Antibiótico de amplio espectro útil en el tratamiento de infecciones urinarias y de vías respiratorias	Fluoroquinolonas
AIC	Ampicilina	Antibiótico semisintético de amplio espectro utilizado en el tratamiento de infecciones de vías respiratorias y urinarias	Betalactámicos
NFN	Nafcilina	Antibiótico semisintético de espectro reducido utilizado para tratar infecciones causadas por bacterias Gram-positivas	Betalactámicos
ZLD	Linezolid	Antibiótico sintético útil en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram-positivas aerobias	Oxazolidinonas
FUA	Ácido fusídico	Antibiótico bacteriostático con actividad contra bacterias Gram-positivas y en menor medida, contra Gram-negativas	Fusidanos

*Compuesto en fase II de ensayos clínicos.

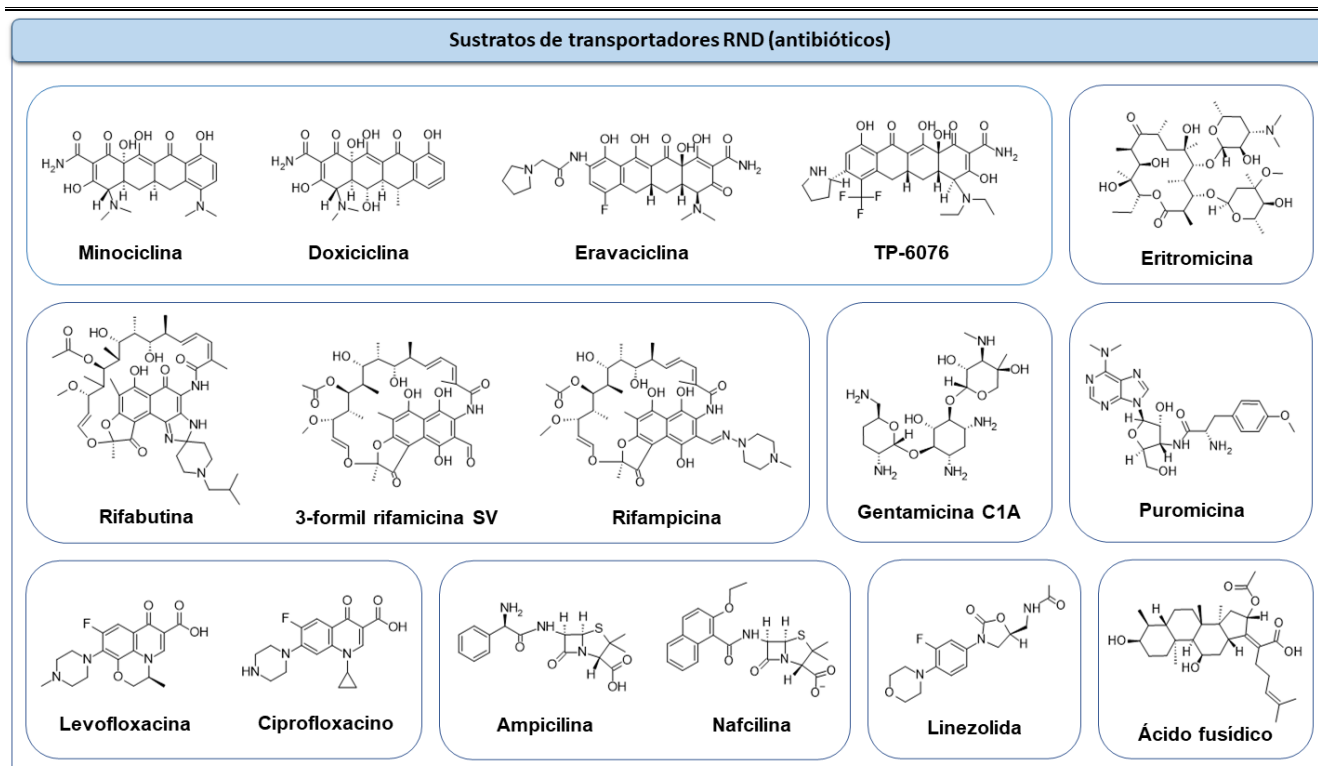


Figura 2.7. Estructuras de los principales sustratos de interés farmacológico (antibióticos) identificados en los sitios de unión de las estructuras de los transportadores de la familia RND. Las moléculas que pertenecen a la misma clasificación de antibióticos se encuentran agrupadas en: tetraciclinas, macrólidos, rifamicinas, aminoglucósidos, aminonucleósidos, fluoroquinolonas, betalactámicos, oxazolidinonas y fusidanos.

De igual manera, se identificó un total de 13 compuestos con actividad inhibitoria sobre los transportadores RND (**Figura 2.8**), los cuales poseen distintas características estructurales y, por lo tanto, diferentes mecanismos de inhibición (**Tabla 2.3**). Estos compuestos se encuentran actualmente en diferentes fases de investigación.

Tabla 2.3. Principales compuestos con actividad inhibitoria sobre los transportadores RND identificados en las estructuras reportadas en el RCSB PDB)

ID Ligando	Nombre	Descripción	Grupo al que pertenece
5QG	MBX2319 ¹⁰²	Inhibidor de transportadores de eflujo derivado de piranopiridinas: aumenta la potencia de varios antibióticos contra enterobacterias	Bloqueadores del sitio de unión de sustratos
5QF	MBX2931 ¹⁰²	Inhibidor de transportadores de eflujo derivado de piranopiridinas: presenta mayor potencia que MBX2319	Bloqueadores del sitio de unión de sustratos
5QE	MBX3132 ¹⁰²	Inhibidor de transportadores de eflujo derivado de piranopiridinas: presenta mayor potencia que MBX2319	Bloqueadores del sitio de unión de sustratos
MBX	MBX3135 ¹⁰²	Inhibidor de transportadores de eflujo derivado de piranopiridinas: presenta mayor potencia que MBX2319	Bloqueadores del sitio de unión de sustratos
P9D	D13-9001 ¹⁰³	Inhibidor de los transportadores de eflujo AcrB y MexB derivado de piridopirimidinas	Bloqueadores del sitio de unión de sustratos
3RX	SQ109 ¹⁰⁴	Inhibidor del transportador MmpL3 en micobacterias: candidato a fármaco contra tuberculosis	Disruptores del mecanismo de traslocación de protones
9ZF	AU1235 ¹⁰⁴	Inhibidor del transportador MmpL3 en micobacterias: candidato a fármaco contra tuberculosis	Disruptores del mecanismo de traslocación de protones
AY6	Rimonabant ¹⁰⁴	Inhibidor del transportador MmpL3 en micobacterias derivado de piperidinas: compuesto identificado mediante cribado virtual	Disruptores del mecanismo de traslocación de protones
J9E	ICA38 ¹⁰⁴	Inhibidor del transportador MmpL3 en micobacterias derivado de indolcarboxamidas: elevada potencia, baja biodisponibilidad	Disruptores del mecanismo de traslocación de protones
FFU	NITD-349 ¹⁰⁵	Inhibidor del transportador MmpL3 en micobacterias derivado de indolcarboxamidas: candidato a fármaco contra tuberculosis	Disruptores del mecanismo de traslocación de protones
FG0	SPIRO ¹⁰⁵	Inhibidor del transportador MmpL3 en micobacterias derivado de espiropiperidinas: candidato a fármaco contra tuberculosis	Disruptores del mecanismo de traslocación de protones
1KE	BDM88832 ¹⁰⁶	Potencial inhibidor del transportador AcrAB-ToIC derivado de piridilpiperazinas	Disruptores del mecanismo de traslocación de protones
1K8	BDM88855 ¹⁰⁶	Potencial inhibidor del transportador AcrAB-ToIC derivado de piridilpiperazinas	Disruptores del mecanismo de traslocación de protones

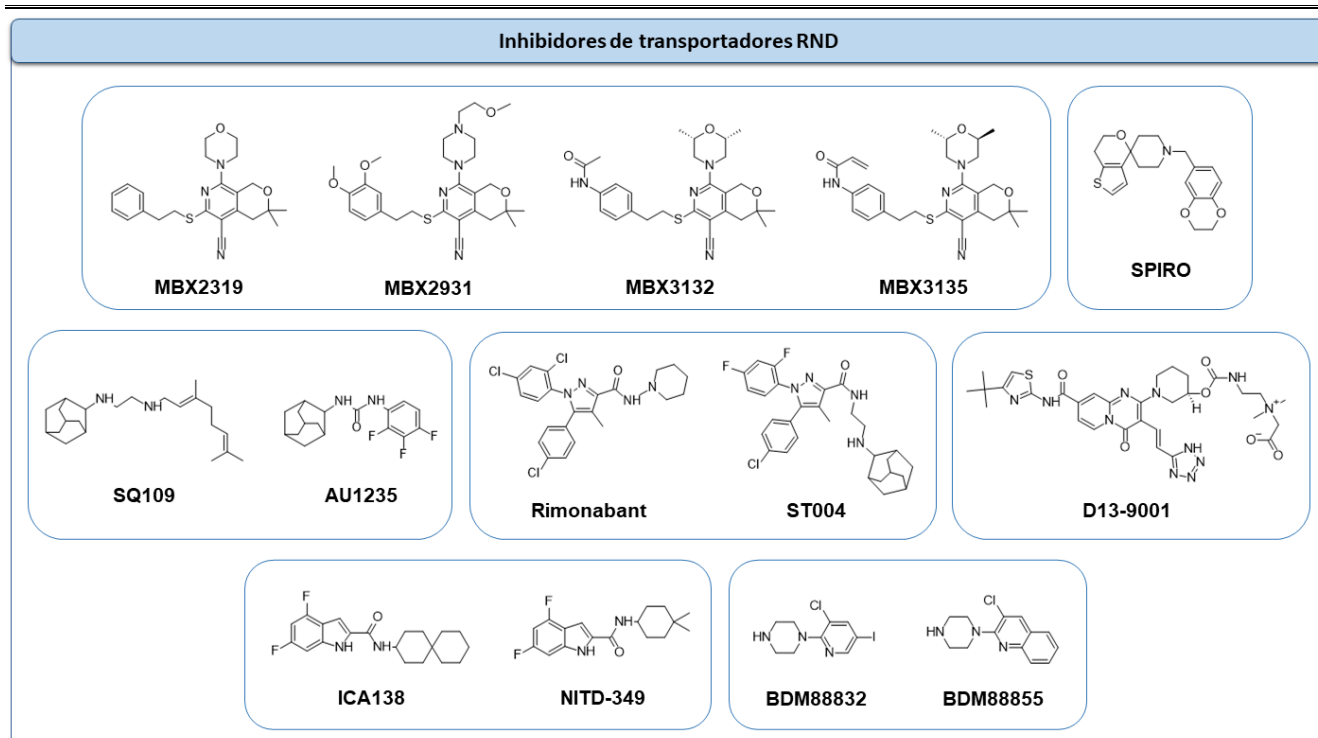


Figura 2.8. Estructuras de los principales compuestos con actividad inhibitoria sobre transportadores RND, identificados en las estructuras reportadas de dichos transportadores. Las moléculas que presentan similitudes estructurales y un mecanismo inhibitorio similar se encuentran agrupadas.

II.6. Mecanismo de eflujo

Se planteó para AcrB un modelo de transporte de sustratos basado en un mecanismo rotativo, en el que los 3 protómeros que conforman a la proteína AcrB pueden adquirir 3 conformaciones distintas, conocidas como conformaciones de entrada, unión y eflujo. En ausencia de sustrato (forma Apo), los 3 protómeros de AcrB adquieren la conformación de entrada. Por otra parte, cuando un sustrato se encuentra presente, los protómeros de la proteína AcrB sufren cambios conformacionales para formar un trímero asimétrico activado, en el cual cada uno de los 3 protómeros adquiere de manera sucesiva cada una de las 3 conformaciones diferentes en función de cada etapa del proceso de eflujo (**Figura 2.9**).¹⁵

La primera interacción del sustrato con AcrB ocurre a través del protómero en la conformación de entrada, en el sitio de unión periplásmico de acceso. Posteriormente, ocurre la transición de la conformación de entrada a la conformación de unión en el monómero y se forma un túnel que proporciona una vía de acceso para los sustratos hacia el sitio hidrofóbico, donde ocurre la unión de los sustratos de AcrB, que estabiliza la conformación de unión.^{13,15}

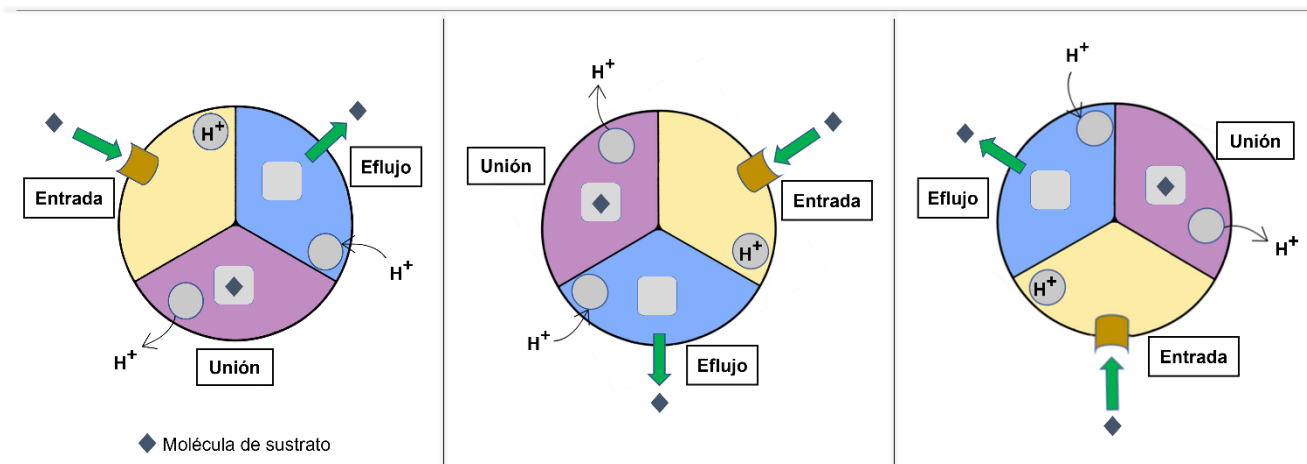


Figura 2.9. Representación de las transiciones que tienen lugar en cada uno de los 3 protómeros de AcrB durante el proceso de eflujo, donde cada protómero adquiere de manera sucesiva las conformaciones de entrada, unión y eflujo. Se observa que el cambio de la conformación de eflujo a la conformación inicial de entrada (y la expulsión del sustrato) requiere de la unión de un protón a su respectivo sitio de traslocación (en la porción periplásmica de AcrB). De igual manera, el cambio de la conformación de unión a la conformación de eflujo requiere de la traslocación de un protón hacia el citoplasma.

Finalmente, el transporte de protones a través del dominio transmembranal causa la transición a la conformación de eflujo, en la que el sitio de unión se cierra y tiene lugar la expulsión del sustrato del sitio hidrofóbico hacia un nuevo túnel o canal que conduce al sustrato al dominio de *docking* de TolC (presente en AcrB), permitiendo el eflujo del sustrato a través de la proteína AcrA y posteriormente TolC en estado abierto (**Figura 2.10**).^{13,15}

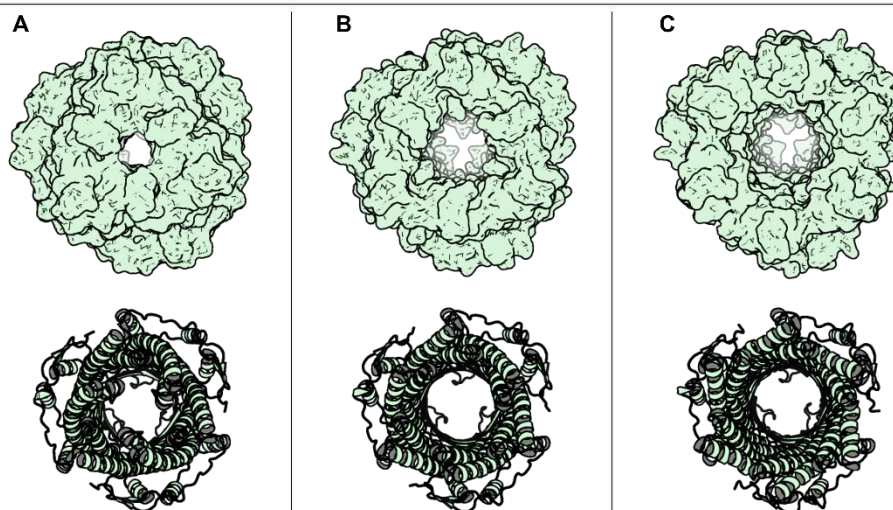


Figura 2.10. Apertura de la proteína de membrana externa (TolC) debido a la transmisión de los cambios conformacionales en el complejo de 3 componentes. En la parte superior se observa la superficie de la proteína, mientras que en la parte inferior se observa su estructura helicoidal. **A.** Estado inicial del canal. **B.** Estado intermedio de apertura. **C.** Estado final de apertura (estado de expulsión de sustratos). Figura elabora con PyMOL a partir de una animación creada con las estructuras cerrada (código PDB: 5V5S) y abierta (código PDB: 5NG5) del transportador AcrAB-TolC, utilizando el software Chimera 1.16.

El transportador AcrB utiliza la fuerza protón motriz para llevar a cabo el eflujo de sustratos (del interior al exterior celular). La porción transmembranal de AcrB alberga 4 residuos cargados que son esenciales para el proceso de eflujo: Asp407, Asp408, Lys940 y Arg971. Diferentes estudios estructurales y de mutagénesis han sugerido que la traslocación de protones es un proceso mediado por estos 4 residuos: en las conformaciones de entrada y de unión Lys940 se encuentra entre Asp407 y Asp408. No obstante, en la conformación de eflujo, este residuo es reorientado hacia Thr978. Lo anterior llevó a la hipótesis de que dichos cambios conformacionales son causados por los eventos de protonación y deprotonación de Asp407, Asp408, Lys940 y Arg971, que a su vez causan los cambios conformacionales de AcrA y TolC hacia una conformación abierta para permitir el eflujo de sustratos.^{13,107}

III. CAPÍTULO II. Transportadores de la familia ABC

Los tipo ABC (*ATP-binding cassette*) constituyen una de las más grandes familias de proteínas transportadoras. Si bien las proteínas importadoras de esta familia solo se encuentran en organismos procariotas, cabe señalar que los transportadores de eflujo están presentes tanto en organismos procariotas como en los eucariotas.⁹⁶ Las proteínas importadoras participan en la toma de nutrientes del exterior celular (ej. carbohidratos, aminoácidos, lípidos, péptidos y vitaminas), mientras que las proteínas exportadoras participan en el eflujo de diferentes sustratos (ej. toxinas y antibióticos).^{96,108}

Se ha postulado que los exportadores de la familia ABC no cumplen solo con la función de eflujo de antibióticos en bacterias, sino que tienen un papel fisiológico fundamental en la comunicación intercelular, el mantenimiento de la homeostasis y la detoxificación. No obstante, debido a diferentes factores ambientales, la presión selectiva y la transferencia horizontal de genes, las funciones básicas de estos transportadores se modificaron, propiciando el origen de los transportadores ABC como exportadores de antibióticos.¹⁰⁸

La primera evidencia experimental de la relación de los transportadores ABC con la resistencia a antibióticos se obtuvo al estudiar a un sistema de eflujo responsable de la resistencia a eritromicina y a otros compuestos del grupo de los macrólidos; este sistema fue nombrado MacAB (*macrolide-specific ABC-type efflux carrier*, transportador ABC de eflujo específico para macrólidos). Posteriormente, se comprobó que la proteína de membrana externa TolC era necesaria para la actividad de eflujo de MacAB.¹⁰⁹

Se ha establecido una relación directa entre la resistencia a múltiples antibióticos y la sobreexpresión de diversos transportadores de eflujo de la familia ABC, tanto en células cancerígenas de mamíferos como en células bacterianas, representando así una disminución

de la efectividad de compuestos quimioterapéuticos y antibióticos y, por lo tanto, una amenaza a la salud humana.^{96,110} A lo largo de este capítulo, al hablar de transportadores ABC nos referiremos de manera exclusiva a aquellos transportadores bacterianos que participan en el eflujo de diversas moléculas.

El primer transportador ABC asociado a la resistencia a múltiples antibióticos fue el transportador LmrA (*Lactococcal multidrug-resistant protein ATP*, proteína de resistencia a múltiples antibióticos dependiente de ATP de *Lactococcus*), una proteína homóloga a la glicoproteína P humana (34% de identidad) que se encuentra presente en *L. lactis*.¹¹¹ Se demostró su papel en la resistencia a antibióticos al ser sobre expresado en una cepa hipersensible a antibióticos de *E. coli*, que desarrolló resistencia contra aminoglucósidos, lincosamidas, macrólidos, quinolonas, estreptograminas, tetraciclinas y cloranfenicol.¹¹¹

Se ha identificado que cuando el transportador LmrA es expresado en líneas celulares eucariotas es capaz de conferir resistencia a múltiples agentes anticancerígenos, como daunomicina, doxorubicina, vinblastina y vincristina.^{108,112} Debido a su homología y perfil similar de eflujo de sustratos, la glicoproteína P y el transportador LmrA son un ejemplo de transportadores ABC altamente conservados entre humanos y organismos procariotas.¹⁰⁸

III.1. Principales modelos de estudio: LmrA y MacAB-ToIC

Tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas es posible encontrar transportadores ABC de eflujo de un solo componente, los cuales se localizan en la membrana citoplasmática y en la membrana interna, respectivamente. Estos transportadores llevan a cabo la traslocación de sustratos al exterior del citoplasma y son proteínas con una función homóloga a las proteínas de membrana interna de los transportadores RND, descritos en el capítulo anterior. Existen diferentes modelos utilizados para el estudio

estructural y mecanístico de los transportadores ABC “monocomponentes”, siendo los principales LmrA (de *L. lactis*) y Sav1866 (de *S. aureus*).^{96,113,114}

En bacterias Gram-negativas, algunos transportadores ABC pueden encontrarse formando parte de complejos de eflujo de tres componentes, cuya estructura es similar a la de los transportadores de la familia RND, conformados por una proteína de membrana interna (PMI) asociada a una proteína de fusión membranal (PFM), que abarca la mayor parte del espacio periplásmico y está conectada a una proteína de membrana externa (PME) que conduce a los sustratos al exterior celular.

El sistema de eflujo de tres componentes más representativo de la familia ABC en bacterias es el sistema MacAB-TolC, que participa en el eflujo de macrólidos, toxinas peptídicas, factores de virulencia, sideróforos, lipopolisacáridos y protoporfirinas.^{115,116,117,118} Este sistema se encuentra presente en *E. coli*, *N. gonorrhoeae*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *Y. pestis* y *A. baumannii*; está conformado por la proteína de membrana interna MacB, la proteína de fusión membranal MacA y la proteína de membrana externa TolC.^{96,115,119} En cuanto a los protómeros de cada componente de éste sistema de eflujo, se ha identificado una estequiometría de: 2 MacB, 6 MacA y 3 TolC (**Figura 3.1**).¹²⁰ Se ha propuesto la misma proporción estequiométrica para otros sistemas ABC de tres componentes.

Mientras que las proteínas de fusión membranal y las proteínas de membrana externa de los transportadores ABC son considerados homólogos de los componentes de los transportadores RND, las proteínas de membrana interna de ambas familias no están relacionadas estructuralmente, ya que las proteínas RND son entidades homotriméricas, mientras que las proteínas ABC han sido identificadas como homodímeros (**Figura 3.1**).¹¹⁹

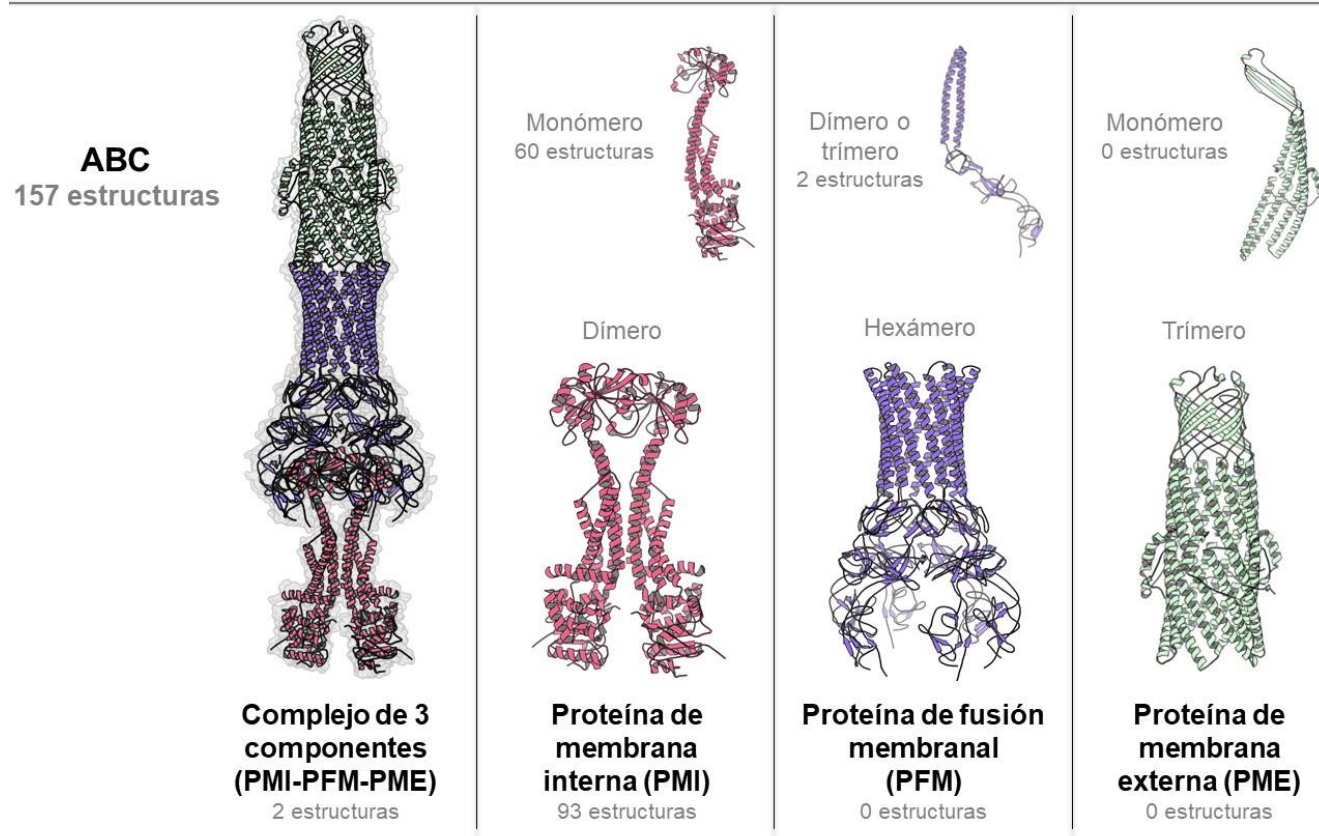


Figura 3.1. Estructuras representativas de los complejos de los transportadores de la familia ABC y sus componentes proteicos individuales. Se indica el número y estequiometría de las estructuras reportadas para cada complejo/componente en la base de datos del RCSB PDB. Figura elabora con PyMOL, utilizando la estructura con código PDB 5NIK que corresponde al complejo MacAB-TolC de *E. coli*.

En el contexto de la resistencia a antibióticos, el sistema MacAB-TolC ha sido asociado a la resistencia a macrólidos, aminogucósidos y polimixinas en *E. coli*, *S. maltophilia*, *N. gonorrhoeae*, y *A. baumannii*. El tamaño de este sistema ensamblado es similar al de AcrAB-TolC, perteneciente a la familia RND. Se ha descrito que la sobreexpresión de los sistemas tricomponentes MacAB-TolC y VarDEF (un sistema homólogo presente en *V. cholerae*) puede causar un incremento de hasta 8 veces en la concentración mínima inhibitoria de antibióticos del grupo de los macrólidos, tales como la espiramicina.^{121,122,123}

III.2. Recopilación de estructuras

Tras una búsqueda exhaustiva en la base de datos del RCSB PDB, se encontró un total de 157 estructuras que corresponden a los complejos y componentes de los transportadores de eflujo de la familia ABC (**Figura 3.1** y **Tabla 3.1**). De las estructuras encontradas, solamente 2 corresponden a complejos funcionales de tres componentes PMI-PFM-PME y 2 corresponden a fragmentos del complejo dimérico PMI-PFM. Con respecto a los componentes funcionales individuales, se encontró un total de 93 estructuras, que corresponden a las proteínas de membrana interna en su forma dimérica. Se encontraron también 60 estructuras monoméricas de proteínas de membrana interna y 2 estructuras de proteínas de fusión membranal en su forma dimérica y trimérica.

En el año 2017, fueron reportadas las 2 estructuras mencionadas de los sistemas de eflujo de 3 componentes de MacAB-TolC, obtenidas mediante microscopía electrónica. Esto ha permitido obtener información sobre el ensamblaje de sus componentes y el posible mecanismo de transporte del complejo ensamblado.¹²⁰ La mayoría de las estructuras encontradas fueron reportadas en los últimos 5 años (2018-2023) y corresponden a transportadores que presentan una gran diversidad de funciones, tales como el eflujo multiespecífico de antibióticos y el transporte de metales pesados, toxinas peptídicas, ácidos teicoicos, hemolisina, lípidos, péptidos antimicrobianos, lipopolisacáridos, oligosacáridos, protoporfirina y lipoproteínas (**Tabla 3.1**).

Entre las estructuras reportadas, se puede observar que en distintos organismos bacterianos es posible encontrar a un mismo sistema de transporte. De igual manera, algunas estructuras corresponden a complejos de un mismo transportador con diferentes sustratos, inhibidores o moduladores, así como a diferentes conformaciones del transportador y/o diferentes etapas del proceso de eflujo de sustratos (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1. Estructuras correspondientes a los componentes y complejos de los transportadores de la familia ABC, reportadas en el RCSB PDB.

Complejos tricompuestos: proteína de membrana interna, proteína de fusión membranal y proteína de membrana externa						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID Ligando
5NIK	MacAB-TolC	Transportador de múltiples antibióticos	3.30	<i>E. coli</i> K-12	Fitzpatrick et al ¹²⁰	-
5NIL	MacAB-TolC	Transportador de múltiples antibióticos	5.30	<i>E. coli</i> K-12	Fitzpatrick et al ¹²⁰	-
Estructuras de proteínas de membrana interna en forma dimérica (funcional)						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID Ligando
2HYD	Sav1866	Transportador de múltiples antibióticos	3.00	<i>S. aureus</i>	Dawson et al ¹¹³	-
2ONJ	Sav1866	Transportador de múltiples antibióticos	3.40	<i>S. aureus</i>	Dawson et al ¹¹⁴	-
3B5W	MsbA	Transportador de lípido A	5.30	<i>E. coli</i>	Ward et al ¹²⁴	-
3B5X	MsbA	Transportador de lípido A	5.50	<i>V. cholerae</i>	Ward et al ¹²⁴	-
3B5Y	MsbA	Transportador de lípido A	4.50	<i>S. enterica</i>	Ward et al ¹²⁴	ANP
3B5Z	MsbA	Transportador de lípido A	4.20	<i>S. enterica</i>	Ward et al ¹²⁴	VO4
3B60	MsbA	Transportador de lípido A	3.70	<i>S. enterica</i>	Ward et al ¹²⁴	ANP
3FTJ	MacB	Exportador de macrólidos	2.00	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Xu et al ¹²⁵	-
3VX4	ComA	Dominio de unión a nucleótidos	2.69	<i>S. mutans</i>	Ishii et al ¹²⁶	-
4BBP	ZnuA	Transportador de zinc	2.15	<i>S. enterica</i>	Alaleona et al ¹²⁷	YU7
4MRN	NaAtm1	Transportador en forma apo	2.50	<i>N. aromaticivorans</i>	Lee et al ¹²⁸	-
4MRP	NaAtm1	Transportador en complejo con GSH	2.50	<i>N. aromaticivorans</i>	Lee et al ¹²⁸	GSH
4MRR	NaAtm1	Complejo con selenometionina	2.97	<i>N. aromaticivorans</i>	Lee et al ¹²⁸	MSE
4MRS	NaAtm1	Transportador en complejo con GSSG	2.35	<i>N. aromaticivorans</i>	Lee et al ¹²⁸	GDS
4MRV	NaAtm1	Transportador en complejo con GS-Hg	2.50	<i>N. aromaticivorans</i>	Lee et al ¹²⁸	HGD
4PL0	McjD	Exportador de microcina J25	2.70	<i>E. coli</i>	Choudhury et al ¹²⁹	ANP
5EG1	McjD	Exportador de microcina J25	3.42	<i>E. coli</i>	Choudhury et al ¹³⁰	ANP
5GKO	MacB	Exportador de macrólidos	3.39	<i>A. baumannii</i>	Murakami et al ¹¹⁹	-
5LIL	MacB	Exportador de macrólidos	3.35	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Crow et al ¹³¹	-
5LJ7	MacB	Exportador de macrólidos	3.25	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Crow et al ¹³¹	-
5MKK	TmrAB	Transportador de múltiples antibióticos	2.70	<i>T. thermophilus</i>	Noell et al ¹³¹	-
5NBD	PgIK	Exportador de oligosacáridos	3.90	<i>C. jejuni</i>	Perez et al ¹³²	-
5OFR	McjD	Exportador de microcina J25	3.40	<i>E. coli</i>	Beis et al ¹³³	-
5TTP	MsbA	Transportador de lípido A	4.80	<i>E. coli</i> O157:H7	Mi et al ¹³⁴	-
5TV4	MsbA	Transportador de lípido A	4.20	<i>E. coli</i> O157:H7	Mi et al ¹³⁴	-
5WS4	MacB	Exportador de macrólidos	3.40	<i>A. baumannii</i>	Murakami et al ¹¹⁹	AT4
5X5Y	LptB2FG	Exportador de LPS	3.47	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Luo et al ¹³⁵	-
5XU1	Spr0694	Transportador de antibióticos y péptidos antimicrobianos	3.30	<i>S. pneumoniae</i>	Yang et al ¹³⁶	-
6BPL	MsbA	Complejo con LPS e inhibidor G907	2.91	<i>E. coli</i> CFT073	Ho et al ¹³⁷	AU7
6BPP	MsbA	Complejo con LPS e inhibidor G092	2.92	<i>E. coli</i> CFT073	Ho et al ¹³⁷	E1M
6PAM	NaAtm1	Exportador de metales pesados	3.70	<i>N. aromaticivorans</i>	Fan et al ¹³⁸	-
6PAN	NaAtm1	Exportador de metales pesados	3.40	<i>N. aromaticivorans</i>	Fan et al ¹³⁸	-
6PAO	NaAtm1	Exportador de metales pesados	3.65	<i>N. aromaticivorans</i>	Fan et al ¹³⁸	-
6PAQ	NaAtm1	Exportador de metales pesados	3.30	<i>N. aromaticivorans</i>	Fan et al ¹³⁸	-

Tabla 3.1. Continuación

Estructuras de proteínas de membrana interna en forma dimérica (funcional)						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID Ligando
6PAR	NaAtm1	Exportador de metales pesados	3.35	<i>N. aromaticivorans</i>	Fan <i>et al</i> ¹³⁸	ANP
6R72	BmrA	Conformación abierta hacia afuera	3.95	<i>B. subtilis</i>	Chaptal <i>et al</i> ¹³⁹	-
6R81	BmrA	Transportador de múltiples antibióticos	3.90	<i>B. subtilis</i>	Wiseman <i>et al</i> ¹³⁹	-
6RAF	TmrAB	Transportador de múltiples antibióticos	3.80	<i>T. thermophilus</i>	Thomas <i>et al</i> ¹⁴⁰	-
6RAG	TmrAB	Transportador de múltiples antibióticos	4.20	<i>T. thermophilus</i>	Thomas <i>et al</i> ¹⁴⁰	-
6RAH	TmrAB	Transportador de múltiples antibióticos	2.80	<i>T. thermophilus</i>	Thomas <i>et al</i> ¹⁴⁰	-
6RAI	TmrAB	Transportador de múltiples antibióticos	2.90	<i>T. thermophilus</i>	Thomas <i>et al</i> ¹⁴⁰	-
6RAJ	TmrAB	Transportador de múltiples antibióticos	3.50	<i>T. thermophilus</i>	Thomas <i>et al</i> ¹⁴⁰	AOV
6RAK	TmrAB	Transportador de múltiples antibióticos	3.30	<i>T. thermophilus</i>	Thomas <i>et al</i> ¹⁴⁰	AOV
6RAL	TmrAB	Transportador de múltiples antibióticos	3.50	<i>T. thermophilus</i>	Thomas <i>et al</i> ¹⁴⁰	-
6RAM	TmrAB	Transportador de múltiples antibióticos	3.80	<i>T. thermophilus</i>	Thomas <i>et al</i> ¹⁴⁰	-
6RAN	TmrAB	Transportador de múltiples antibióticos	4.20	<i>T. thermophilus</i>	Thomas <i>et al</i> ¹⁴⁰	-
6UZ2	MsbA	Transportador MsbA, conformación 1	4.20	<i>E. coli</i>	Angiulli <i>et al</i> ¹⁴¹	-
6UZL	MsbA	Transportador MsbA, conformación 2	4.40	<i>E. coli</i>	Angiulli <i>et al</i> ¹⁴¹	-
6VQT	NaAtm1	Exportador de metales pesados	3.03	<i>N. aromaticivorans</i>	Fan <i>et al</i> ¹³⁸	VO4
6VQU	NaAtm1	Exportador de metales pesados	3.88	<i>N. aromaticivorans</i>	Fan <i>et al</i> ¹³⁸	-
6XJH	PmtCD	Exportador de toxinas peptídicas	3.60	<i>S. aureus</i>	Zeytuni <i>et al</i> ¹⁴²	-
6XJI	PmtCD	Exportador de toxinas peptídicas	4.00	<i>S. aureus</i>	Zeytuni <i>et al</i> ¹⁴²	-
7ARH	LoIC	Subunidad del transportador LoICDE	3.30	<i>E. coli</i> K-12	Tang <i>et al</i> ¹⁴³	Z41
7ARI	LoIC	Subunidad del transportador LoICDE	3.40	<i>E. coli</i> K-12	Tang <i>et al</i> ¹⁴³	-
7ARJ	LoID	Complejo con lipoproteína y AMP-PNP	3.20	<i>E. coli</i> K-12	Tang <i>et al</i> ¹⁴³	ANP
7ARK	LoIC	Complejo con AMP-PNP (estado cerrado)	4.10	<i>E. coli</i> K-12	Tang <i>et al</i> ¹⁴³	ANP
7ARL	LoIC	Complejo con lipoproteína y ADP	3.20	<i>E. coli</i> K-12	Tang <i>et al</i> ¹⁴³	Z41
7ARM	LoIE	Proteína transmembranal de LoICDE	3.60	<i>E. coli</i> K-12	Tang <i>et al</i> ¹⁴³	Z41
7BCW	MsbA	MsbA en complejo con ADP y vanadato	3.50	<i>E. coli</i> K-12	Traore <i>et al</i> ¹⁴⁴	VO4
7BG4	BmrA	Transportador de múltiples antibióticos	4.20	<i>B. subtilis</i>	Wiseman <i>et al</i> ¹³⁹	RHQ
7CGE	MlaE	Subunidad del transportador MlaFEDB	2.90	<i>E. coli</i> K-12	Chi <i>et al</i> ¹⁴⁵	PGW
7CGN	MlaE	Subunidad del transportador MlaFEDB	4.30	<i>E. coli</i> K-12	Chi <i>et al</i> ¹⁴⁵	-
7M33	BmrCD	Transportador de múltiples antibióticos	3.55	<i>B. subtilis</i>	Thaker <i>et al</i> ¹⁴⁶	HT1
7MDX	LoIC	Subunidad del transportador LoICDE	3.80	<i>E. coli</i>	Sharma <i>et al</i> ¹⁴⁷	-
7MDY	LoIC	Subunidad del transportador LoICDE	3.50	<i>E. coli</i>	Sharma <i>et al</i> ¹⁴⁷	AOV
7MET	MsbA	Transportador en complejo con TBT1	3.97	<i>A. baumannii</i>	Thelot <i>et al</i> ¹⁴⁸	Z5G
7MEW	MsbA	Transportador en complejo con G247	3.90	<i>E. coli</i>	Thelot <i>et al</i> ¹⁴⁸	Z5Y
7OW8	BmrA	Transportador de múltiples antibióticos	3.50	<i>B. subtilis</i>	Gobet <i>et al</i> ¹³⁹	-
7PH2	MsbA	MsbA reconstituido en nano discos	3.70	<i>E. coli</i> K-12	Janulien <i>et al</i> ¹⁴⁹	EIW
7PH3	MsbA	Transportador unido a AMP-PNP	2.80	<i>E. coli</i> K-12	Parey <i>et al</i> ¹⁴⁹	-
7PH4	MsbA	Transportador unido a AMP-PNP	2.80	<i>E. coli</i> K-12	Parey <i>et al</i> ¹⁴⁹	-
7PH7	MsbA	MsbA reconstituido en nano discos	4.10	<i>E. coli</i>	Parey <i>et al</i> ¹⁴⁹	EIW
7RIT	MsbA	Transportador MsbA en forma apo	5.20	<i>A. baumannii</i>	Thelot <i>et al</i> ¹⁴⁸	-
7SEL	MsbA	Complejo con LPS e inhibidor G7090	2.98	<i>E. coli</i>	Payandeh <i>et al</i> ¹⁵⁰	95X
7T54	PCAT1	Conformación abierta hacia afuera	4.50	<i>A. thermocellus</i>	Kieuvongngam <i>et al</i> ¹⁵¹	-

Tabla 3.1. Continuación

Estructuras de proteínas de membrana interna en forma dimérica (funcional)						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID Ligando
7T55	PCAT1	Conformación abierta hacia adentro	4.10	<i>A. thermocellus</i>	Kieuvongngam et al ¹⁵¹	-
7T56	PCAT1	Conformación abierta hacia adentro	3.70	<i>A. thermocellus</i>	Kieuvongngam et al ¹⁵¹	-
7T57	PCAT1	Conformación abierta hacia adentro	3.70	<i>A. thermocellus</i>	Kieuvongngam et al ¹⁵¹	-
7W7A	HrtBA	Transportador con protoporfirina IX	3.20	<i>C. diphtheriae</i>	Hisano et al ¹⁵²	MNR
7W7B	HrtBA	Transportador con protoporfirina IX	3.00	<i>C. diphtheriae</i>	Hisano et al ¹⁵²	MNR
7W7D	HrtBA	Transportador en complejo con hemo	3.40	<i>C. diphtheriae</i>	Hisano et al ¹⁵²	HEM
7ZNU	Cgt	Cgt en micelas de un detergente	4.00	<i>B. abortus</i>	Jaroslav et al ¹⁵³	VO4
7ZO8	Cgt	Cgt en estado Apo en nano discos	3.60	<i>B. abortus</i>	Jaroslav et al ¹⁵³	PLC
7ZO9	Cgt	Cgt en unión con vanadato	3.50	<i>B. abortus</i>	Jaroslav et al ¹⁵³	VO4
7ZOA	Cgt	Cgt en presencia de un CBG (sustrato)	4.00	<i>B. abortus</i>	Jaroslav et al ¹⁵³	-
8DKU	WzmWzt	Transportador de antígeno O	3.20	<i>A. aeolicus</i> VF5	Spellmon et al ¹⁵⁴	-
8DL0	WzmWzt	Transportador de antígeno O	4.10	<i>A. aeolicus</i> VF5	Spellmon et al ¹⁵⁴	-
8DMM	MsbA	MsbA en complejo con KDL	3.47	<i>E. coli</i>	Liu et al ¹⁵⁵	AOV
8DMO	MsbA	MsbA: estado abierto hacia el interior	3.90	<i>E. coli</i>	Liu et al ¹⁵⁵	-
8DN8	WzmWzt	Transportador de antígeno O	3.70	<i>A. aeolicus</i> VF5	Spellmon et al ¹⁵⁴	U90
8DNC	WzmWzt	Transportador de antígeno O	3.30	<i>A. aeolicus</i> VF5	Spellmon et al ¹⁵⁴	-
8DNE	WzmWzt	Transportador de antígeno O	3.50	<i>A. aeolicus</i> VF5	Spellmon et al ¹⁵⁴	-
8DOU	WzmWzt	Transportador de antígeno O	3.54	<i>A. aeolicus</i> VF5	Spellmon et al ¹⁵⁴	-
Estructuras de proteínas de membrana interna en forma monomérica						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID Ligando
1MT0	HylB	Dominio de unión a nucleótidos	2.60	<i>E. coli</i>	Schmitt et al ¹⁵⁶	-
1MV5	LmrA	Dominio de unión a nucleótidos	3.10	<i>L. lactis</i>	Yuan et al ^{NP}	-
1XEF	HylB	Transportador de α-hemolisina	2.50	<i>E. coli</i>	Zaitseva et al ¹⁵⁷	-
2FGJ	HylB	Transportador de α-hemolisina	2.60	<i>E. coli</i>	Zaitseva et al ¹⁵⁸	-
2FGK	HylB	Transportador de α-hemolisina	2.70	<i>E. coli</i>	Zaitseva et al ¹⁵⁸	-
2PCJ	LoID	Transportador de lipoproteínas	1.70	<i>A. aeolicus</i>	Jeyakanthan et al ^{NP}	-
2PCL	LoID	Transportador de lipoproteínas	1.70	<i>A. aeolicus</i>	Jeyakanthan et al ^{NP}	-
3B5J	HylB	Transportador de α-hemolisina	2.00	<i>E. coli</i>	Oswald et al ¹⁵⁹	12D
4P31	LptB	Exportador de LPS unido a ADP	2.05	<i>E. coli</i> K-12	Sherman et al ¹⁶⁰	-
4P32	LptB	Exportador de LPS unido a ADP	1.55	<i>E. coli</i> K-12	Sherman et al ¹⁶⁰	-
4P33	LptB	Exportador de LPS unido a ATP	1.65	<i>E. coli</i> K-12	Sherman et al ¹⁶⁰	-
4QC2	LptB	Exportador de LPS unido a ATP	2.22	<i>E. coli</i> DH1	Wang et al ¹⁶¹	-
5C59	MacB	Exportador de macrólidos	3.00	<i>E. coli</i> 536	Ha et al ^{NP}	-
5DGX	MsbA	Transportador de lípido A	1.73	<i>F. tularensis</i>	Halavaty et al ^{NP}	-
5EUM	MsbA	Transportador de lípido A	1.80	<i>H. influenzae</i>	Minasov et al ^{NP}	-
5F9Q	YknZ	Exportador de macrólidos	2.04	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Xu et al ¹⁶²	-
5HNP	Wzt	Subunidad de unión de sacáridos	2.20	<i>R. ornithinolytica</i>	Mallette et al ¹⁶³	-
5IDV	MsbA	Dominio de unión a nucleótidos	1.45	<i>A. baumannii</i> AB5075	Mayclin et al ^{NP}	-
5L75	LptB	Exportador de LPS	3.70	<i>K. pneumoniae</i> IS22	Dong et al ¹⁶⁴	PT
5LJ6	MacB	Exportador de macrólidos	3.90	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Crow et al ¹³¹	-

Tabla 3.1. Continuación

Estructuras de proteínas de membrana interna en forma monomérica						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID Ligando
5LJ8	MacB	Exportador de macrólidos	1.95	<i>E. coli</i> K-12	Crow <i>et al</i> ¹³¹	-
5LJ9	MacB	Exportador de macrólidos	2.30	<i>E. coli</i> K-12	Crow <i>et al</i> ¹³¹	-
5LJA	MacB	Exportador de macrólidos	2.40	<i>E. coli</i> K-12	Crow <i>et al</i> ¹³¹	-
5NAA	LoIC	Exportador de lipoproteínas	1.88	<i>E. coli</i> K-12	Kaplan <i>et al</i> ¹³¹	-
5OFP	McjD	Exportador de microcina J25	4.71	<i>E. coli</i>	Beis <i>et al</i> ¹³³	-
5X41	CbiO	Transportador acoplado a cobalto	3.47	<i>R. capsulatus</i>	Bao <i>et al</i> ¹⁶⁵	-
5YK2	Rv3197	Estructura unida a eritromicina	2.81	<i>M. tuberculosis</i>	Zhang <i>et al</i> ¹⁶⁶	-
6AMX	WzmWzt	Transportador de antígeno O	2.05	<i>A. aeolicus</i>	Zimmer <i>et al</i> ¹⁶⁷	PE5
6AN5	WzmWzt	Transportador de antígeno O	3.51	<i>A. aeolicus</i>	Zimmer <i>et al</i> ¹⁶⁷	-
6B89	LptB	LptB con novobiocina	2.00	<i>E. coli</i> K-12	May <i>et al</i> ¹⁶⁸	NOV
6B8B	LptB	LptB con derivado de novobiocina	1.95	<i>E. coli</i> K-12	Mandler <i>et al</i> ¹⁶⁸	CZJ
6BL6	MsbA	Transportador de lípido A	2.80	<i>S. enterica</i>	Padayatti <i>et al</i> ¹⁶⁹	-
6JBH	TarH	Transportador de ácidos teicoicos	3.94	<i>A. herbarius</i>	Chen <i>et al</i> ¹⁷⁰	-
6M96	WzmWzt	Conformación de unión a ATP	2.05	<i>A. aeolicus</i>	Caffalett <i>et al</i> ¹⁷¹	PEE
6MBN	LptB	Dominio de unión a nucleótidos	1.96	<i>E. coli</i> K-12	Owens <i>et al</i> ¹⁷²	-
6MGF	LptB	Dominio de unión a nucleótidos	2.98	<i>E. coli</i> K-12	Mandler <i>et al</i> ^{NP}	CZJ
6MHU	LptF	Estructura libre de nucleótidos	4.00	<i>E. coli</i> K-12	Orlando <i>et al</i> ¹⁷³	JSG
6MHZ	LptB	Estructura en complejo con vanadato	4.10	<i>E. coli</i> K-12	Orlando <i>et al</i> ¹⁷³	AOV
6MI7	LptG	Estructura libre de nucleótidos	4.20	<i>E. coli</i> K-12	Orlando <i>et al</i> ¹⁷³	PGT
6MI8	LptB	Estructura en complejo con vanadato	4.30	<i>E. coli</i> K-12	Orlando <i>et al</i> ¹⁷³	AOV
6O14	Wzt	Dominio de unión a carbohidratos	2.65	<i>A. aeolicus</i> VF5	Bi <i>et al</i> ¹⁷⁴	-
6O30	MsbA	Transportador de Lípido A	4.47	<i>S. enterica</i>	Padayatti <i>et al</i> ¹⁶⁹	-
6OIH	WzmWzt	Transportador de antígeno O	3.85	<i>A. aeolicus</i>	Bi <i>et al</i> ¹⁶⁷	LDA
6S8G	LptB	LptB en complejo con AMP y PNP	3.50	<i>S. flexneri</i>	Tang <i>et al</i> ¹⁷⁵	LMD
6S8H	LptB	Exportador de LPS	3.70	<i>S. flexneri</i>	Tang <i>et al</i> ¹⁷⁵	JSG
7DD0	TagH	Exportador de ácidos teicoicos	2.70	<i>B. subtilis</i>	Ko <i>et al</i> ¹⁷⁶	-
7F02	CcmABCD	Transportador en estado cerrado	3.24	<i>E. coli</i> BL21	Li <i>et al</i> ¹⁷⁷	3PE
7F03	CcmABCD	Transportador cerrado unido a AMP	3.29	<i>E. coli</i> BL21	Li <i>et al</i> ¹⁷⁷	3PE
7F04	CcmABCD	Complejo con hemo y 2 ATPs	2.86	<i>E. coli</i> BL21	Li <i>et al</i> ¹⁷⁷	HEM
7NDF	MsbA	Dominio de unión a nucleótidos	2.10	<i>V. pacos</i>	Meier <i>et al</i> ¹⁴⁹	-
7SGR	HlyB	Sistema de secreción de hemolisina	2.90	<i>E. coli</i> CFT073	Zhao <i>et al</i> ¹⁷⁸	6OU
7TCG	BceB	Conformación sin nucleótidos	3.80	<i>B. subtilis</i>	George <i>et al</i> ¹⁷⁹	100
7TCH	BceB	Conformación de unión a ATP	3.70	<i>B. subtilis</i>	George <i>et al</i> ¹⁷⁹	100
7VFJ	CcmABCD	Transportador (apo) en estado abierto	3.98	<i>E. coli</i> BL21	Zhu <i>et al</i> ¹⁷⁷	-
7VFP	CcmABCD	Transportador estado semi abierto	4.03	<i>E. coli</i> BL21	Li <i>et al</i> ¹⁷⁷	HEM
7W78	HrtBA	Exportador en complejo con AMP-PNP	2.88	<i>C. diphtheriae</i>	Hisano <i>et al</i> ¹⁵²	ANP
7W79	HrtBA	Exportador en complejo con AMP-PNP	3.10	<i>C. diphtheriae</i>	Hisano <i>et al</i> ¹⁵²	-
7W7C	HrtBA	Forma apo del exportador de grupo hemo	2.80	<i>C. diphtheriae</i>	Rahman <i>et al</i> ¹⁵²	-
8DCK	HlyB	Sistema de secreción de hemolisina	3.40	<i>E. coli</i> CFT073	Zhao <i>et al</i> ¹⁷⁸	-
8DHY	MsbA	MsbA-GFP en complejo con cobre (II)	2.15	<i>E. coli</i>	Schrecke <i>et al</i> ¹⁵⁵	CU

Tabla 3.1. Continuación

Estructuras de proteínas de fusión membranal en forma monomérica/dimérica						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID Ligando
3FPP	MacA	Fragmento de exportador de macrólidos	2.99	<i>E. coli</i>	Yum <i>et al</i> ¹⁸⁰	-
5XU0	Spr0693	Proteína de fusión de membrana	2.95	<i>S. pneumoniae</i>	Yang <i>et al</i> ¹³⁶	-

Notas: 1. La descripción asociada a la estructura proporciona información adicional sobre la identidad, características, ligandos, conformaciones o estados de eflujo los transportadores reportados. 2. Las referencias con “NP” corresponden a artículos no publicados.

El principal objetivo del estudio de los transportadores ABC es lograr una mayor comprensión de las causas de su multiespecificidad de sustratos en el ambiente clínico, en relación con la resistencia a antibióticos y la supervivencia y virulencia bacterianas, además de llevar a cabo el diseño racional de moléculas con actividad inhibitoria del proceso de eflujo en bacterias y posiblemente en células cancerígenas resistentes por dicho mecanismo.

III.3. Estructura de los transportadores ABC

Tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas, la unidad mínima funcional de los transportadores ABC consiste en una estructura dimérica; cada monómero contiene un dominio transmembranal y un dominio de unión a nucleótidos. Ambos dominios transmembranales atraviesan la membrana citoplasmática (en bacterias Gram-positivas) o la membrana interna (en bacterias Gram-negativas); mientras que ambos dominios de unión a nucleótidos se encuentran en la región citosólica y participan en la hidrólisis de ATP para generar la energía requerida durante la translocación de sustratos (**Figura 3.2**).⁹⁶

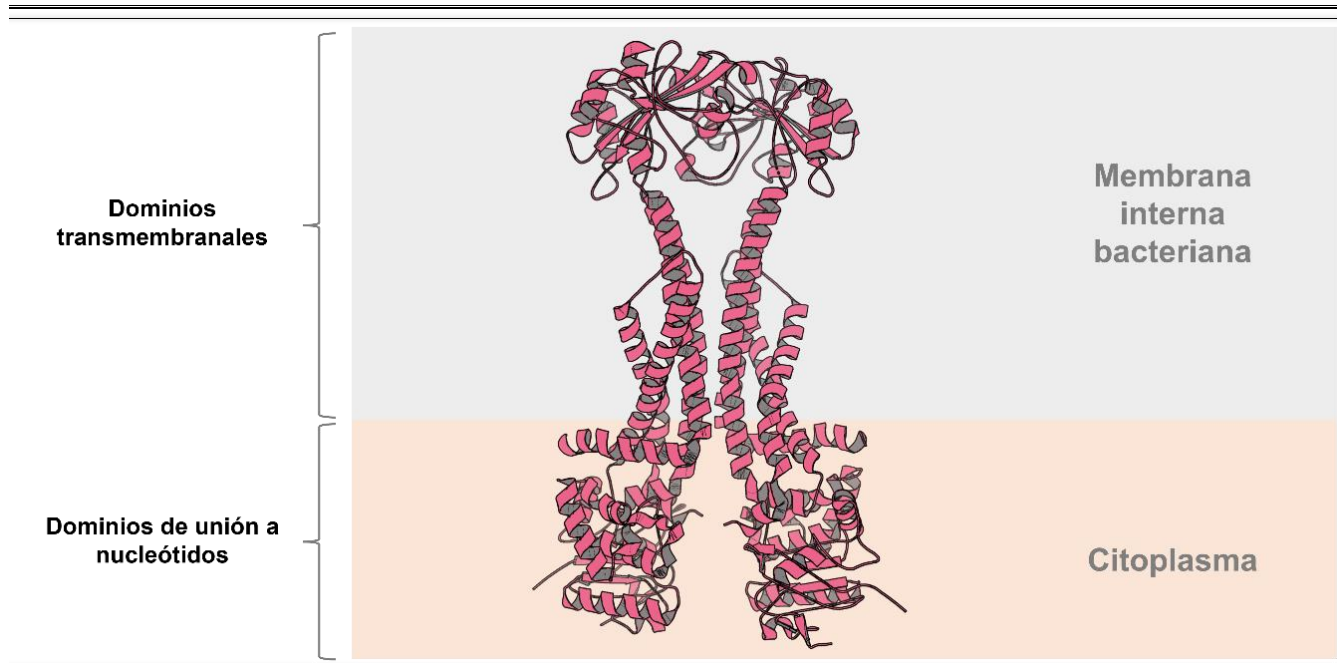


Figura 3.2. Dominios transmembranales y dominios de unión a nucleótidos o citoplasmáticos del transportador MacB (código PDB: 5NIK). Figura elabora con PyMOL.

Los dominios transmembranales de diferentes transportadores ABC poseen baja homología entre sí, por lo que muestran una mayor diversidad estructural que los dominios de unión a nucleótidos, considerados como dominios altamente conservados. Generalmente, cada dominio transmembranal está conformado por seis hélices transmembranales, con un total de doce hélices en su forma funcional dimérica; sin embargo, existen algunas excepciones, como el transportador MacB, en el que cada dominio transmembranal está conformado por 4 hélices.^{136,181}

Los transportadores ABC relacionados con la resistencia a múltiples antibióticos mejor caracterizados, en bacterias Gram-positivas, son LmrA (de *L. lactis*, mencionado previamente en este capítulo) y Sav1866 (de *S. aureus*).¹⁸² Debido a la ausencia de membrana externa en bacterias Gram-positivas, sus transportadores constan solo de un componente transmembranal, análogo a las “proteínas de membrana interna” de los complejos tricomponentes presentes en bacterias Gram-negativas.¹⁸³

No obstante, en el año 2018 se reportó la estructura del transportador Spr0693-0695 de *S. pneumoniae* (**Tabla 3.1**); este posee una estructura similar al complejo MacAB y participa en la resistencia a antibióticos y péptidos antimicrobianos.¹³⁶ Aunque se han reportado múltiples estructuras de sistemas de eflujo de tres componentes en bacterias Gram-negativas, nada se había reportado acerca de estructuras análogas en bacterias Gram-positivas. Debido a ello, se requiere de más información estructural y de investigaciones sobre transportadores de eflujo bacterianos para determinar el papel fisiológico, la estructura y el mecanismo de transporte de complejos multicomponentes en bacterias Gram-positivas.

Sin embargo, ante la ausencia de una proteína de membrana externa (tipo Tol-C) en bacterias Gram-positivas, se ha sugerido que los análogos de las proteínas de fusión membranal, como Spr0693, cumplen adicionalmente con la función de las proteínas de membrana externa de las bacterias Gram-negativas, ya que su longitud es similar a la del “espacio periplásmico” entre la membrana citoplasmática y la capa de peptidoglicano, formando así un canal continuo que permite la expulsión de sustratos al exterior celular.¹²³

Como se mencionó previamente, en términos generales los sistemas de tres componentes son exclusivos de bacterias Gram-negativas. El sistema MacAB-TolC es el principal ejemplo de este tipo de sistemas dada su relevancia en bacterias no solo por conferir resistencia mediante el eflujo de antibióticos del grupo de los macrólidos, sino también por participar en el transporte de lipopolisacáridos, factores de virulencia peptídicos y lipopéptidos de membrana externa.⁸

Múltiples ensayos de actividad catalítica sugieren que MacA (la proteína de fusión membranal de MacAB-TolC) funciona no solo como un componente que conecta a MacB y TolC, sino como una proteína que aumenta la eficiencia de hidrólisis de ATP del sistema, en comparación con la actividad catalítica de la proteína de membrana interna (MacB) como un

componente individual. No obstante, la causa de dicho fenómeno es desconocida. Asimismo, se ha reportado que la interacción de TolC con el sistema MacAB es esencial en la resistencia a macrólidos. La asociación con MacA estabiliza a TolC en una conformación abierta, formando así un canal continuo a lo largo de ambos componentes.^{115,122,123}

En las estructuras reportadas de MacA como parte del sistema MacAB-TolC, se ha identificado a ésta como una estructura hexamérica con organización y dominios similares a los observados en las proteínas de fusión membranal AcrA y MexA en sistemas de tres componentes de la familia RND. Sin embargo, las interacciones entre las proteínas de fusión membranal y las proteínas de membrana interna son distintas en sistemas de las diferentes familias de transportadores mencionadas en este trabajo, puesto que difieren los dominios estructurales participantes.¹²³

III.4. Sitios de unión de sustratos

Los sitios de unión de los transportadores ABC son cavidades amplias y flexibles compuestas principalmente por residuos aromáticos e hidrofóbicos, además de residuos polares y con carga, en menor proporción. Estas cavidades, al igual que en los transportadores RND, contienen múltiples combinaciones de aminoácidos que permiten la unión de una amplia variedad de sustratos. El transportadores ABC mejor estudiado en términos de reconocimiento de sustratos es la glicoproteína P de mamíferos; la información disponible sobre la unión de sustratos en transportadores ABC bacterianos relacionados con la resistencia a múltiples antibióticos es aún escasa.⁹⁶

Los sitios de unión de transportadores ABC de diferentes organismos tienen en común un mismo sistema de residuos aromáticos asociado al reconocimiento de sustratos. Este ha sido identificado en los transportadores de múltiples antibióticos DrrAB (de *Streptomyces*

peuceitius), LmrA (de *L. lactis*) y la glicoproteína P en mamíferos.^{96,184} En contraste con lo anterior, el transportador Sav1866 (de *S. aureus*), contiene una cavidad de unión a sustratos que es hidrofílica y está compuesta principalmente por residuos polares y cargados; por tal motivo, se ha propuesto que la unión de sustratos en este transportador ocurre mediante un mecanismo diferente al de las cavidades de carácter hidrofóbico.^{96,113,114,185}

Las estructuras reportadas de transportadores ABC en complejo con sustratos son escasas. Sin embargo, se ha reportado una estructura de BmrA asociada a rodamina 6G en su sitio de unión (una cavidad hidrofóbica), estabilizada principalmente por interacciones de van der Waals y, en menor proporción, por puentes de hidrógeno con residuos polares.¹³⁹ De manera análoga, en la glicoproteína P humana, se había identificado la presencia de estos residuos, que también participaban en la unión de sustratos. Esto fue reportado en una estructura de esta proteína en complejo con una molécula de paclitaxel (taxol), localizada en la cavidad central de la glicoproteína P (**Figura 3.3 A**).¹⁸⁶

En el año 2021, se reportó la estructura de BmrCD (de *B. subtilis*), en complejo con Hoechst-33342 (sustrato de transportadores ABC), localizado en una cavidad distinta (pero cercana) a la cavidad de unión de las moléculas de rodamina 6G. La localización de los sitios de unión en transportadores ABC bacterianos es similar a la de los sitios reportados en la glicoproteína P humana, identificados como sitio R (de unión a rodamina) y sitio H (de unión a hoechst). Con base en lo anterior, hasta el momento han sido identificados 2 sitios de unión de sustratos en transportadores ABC bacterianos (**Figura 3.3 B**).^{146,187,188}

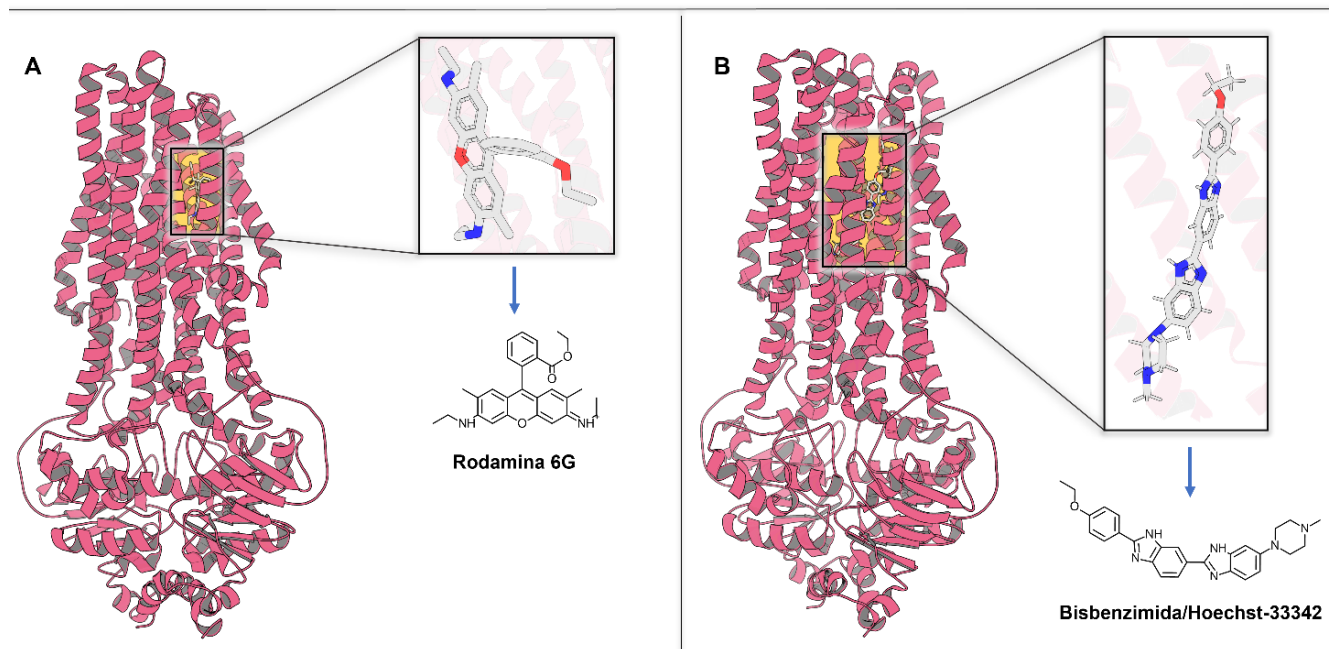


Figura 3.3. Localización de los 2 sitios de unión identificados en los transportadores ABC bacterianos. **A:** se puede observar a una molécula de rodamina en el sitio de unión R (código PDB: 7BG4). **B:** se identifica a una molécula de hoechst en el sitio de unión H (código PDB: 7M33). Figura elaborada con PyMOL.

Se ha sugerido que la “flexibilidad” de reconocimiento de sustratos en los sitios de unión de transportadores ABC es distinta en diferentes organismos, principalmente como resultado de la presencia de una mayor cantidad de residuos de prolina y glicina en las hélices transmembranales. Como ejemplo de lo anterior, se ha identificado una mayor flexibilidad en transportadores ABC de mamíferos (como la glicoproteína P) con respecto a los transportadores ABC bacterianos. Esta mayor flexibilidad resultaría en un perfil de unión de sustratos más amplio en formas y tamaños.^{139,184}

Sin embargo, aún existen múltiples interrogantes sobre la relación entre las características estructurales de diversos sustratos y su eflujo mediante transportadores ABC bacterianos, así como las interacciones proteína-ligando que tienen lugar durante este proceso. Aún no existe una respuesta concreta sobre las causas del eflujo multiespecífico de sustratos por transportadores ABC en el contexto de la resistencia a antibióticos.¹³⁹

En relación con los sistemas de eflujo de tres componentes, poco se sabe acerca del reconocimiento de sustratos por parte de proteínas de membrana interna de los sistemas de eflujo de la familia ABC. Diversos estudios de mutagénesis de una región hidrofóbica en el interior del dominio periplásmico de MacB, demostraron una menor resistencia ante sustratos como eritromicina, bacitracina y colistina, por lo que se ha sugerido que esta región podría fungir como un dominio de unión a sustratos.^{123,131}

III.5. Sustratos, moduladores e inhibidores

Los transportadores ABC llevan a cabo diversas funciones en los organismos procariotas. Participan en el eflujo de sustratos bacterianos, incluyendo componentes de la pared celular bacteriana (como ácidos teicoicos), factores de virulencia (sideróforos y hemolisinas), péptidos antimicrobianos y diferentes polisacáridos capsulares. Estos últimos participan en la adherencia y en la formación de biopelículas, proporcionando una barrera física contra agentes potencialmente tóxicos, por lo que, al dificultar la difusión de antibióticos hacia el interior celular, representan un mecanismo de resistencia adicional.^{108,189,190}

Múltiples transportadores de esta familia se han identificado en bacterias productoras de antibióticos y bacteriocinas que, aunque no tienen un efecto directo sobre la virulencia y colonización en mamíferos, desempeñan un papel crítico en la competencia entre diferentes cepas y especies bacterianas en diferentes nichos ecológicos.¹⁸¹

Entre los principales sustratos reportados de los transportadores ABC bacterianos, se encuentran antibióticos como norfloxacin, doxiciclina, vancomicina, polimixina B, ciprofloxacina, tetraciclina, novobiocina, azitromicina, eritromicina, cloranfenicol, linezolid, trimetoprim, imipenem, metilina, oxacilina y penicilina.^{108,191} No obstante, aún no se han reportado estructuras de transportadores ABC en complejo con antibióticos, solo con otros

sustratos, inhibidores o moduladores (**Tabla 3.2 y Figura 3.4**). La información experimental de transportadores en complejo con antibióticos contribuiría al estudio de las interacciones proteína-ligando que tienen lugar durante el eflujo de este tipo de sustratos, permitiendo una mayor comprensión de las causas del eflujo de múltiples antibióticos.

Tabla 3.2. Principales compuestos de interés identificados en las estructuras de los transportadores ABC depositadas en el RCSB PDB

Sustratos de eflujo			
ID Ligando	Nombre	Descripción ^{97,146}	grupo al que pertenece
RHQ	Rodamina 6G	Colorante fluorescente utilizado en investigación (DB)	Rodaminas (colorantes)
HT1	Hoechst-33342	Colorante fluorescente sintético utilizado para el marcaje de DNA.	Compuesto utilizado en ensayos de actividad de eflujo, derivado de bis-benzimida
Potenciadores de la actividad de eflujo			
ID Ligando	Nombre	Descripción ^{97,168}	grupo al que pertenece
NOV	Novobiocina	Antibiótico útil para el tratamiento de infecciones causadas por estafilococos y otros organismos susceptibles	Modulador de la actividad de eflujo derivado de Cumarinas
CZJ	Adamantil-novobiocina	Compuesto derivado de la novobiocina, con menor actividad antibacteriana y mayor efecto modulador del transportador LptB	Modulador de la actividad de eflujo derivado de la novobiocina
Inhibidores/bloqueadores del proceso de eflujo			
ID Ligando	Nombre	Descripción	grupo al que pertenece
95X	Compuesto 3a ¹⁵⁰	Compuesto derivado del naftilo, con actividad inhibitoria sobre el transportador MsbA presente en bacterias Gram-negativas	Bloqueadores del estado de unión a sustratos/Disruptores de la actividad de ATPasa
AU7	G907 ¹³⁷	Compuesto derivado de quinolinas, con actividad inhibitoria sobre el transportador MsbA presente en bacterias Gram-negativas	Bloqueadores del estado de unión a sustratos/Disruptores de la actividad de ATPasa
E1M	G092 ¹³⁷	Compuesto derivado de quinolinas, con actividad inhibitoria sobre el transportador MsbA presente en bacterias Gram-negativas	Bloqueadores del estado de unión a sustratos/Disruptores de la actividad de ATPasa
Z5Y	G247 ¹⁴⁸	Compuesto derivado del naftaleno, con actividad inhibitoria sobre el transportador MsbA presente en bacterias Gram-negativas	Bloqueadores del estado de unión a sustratos/Disruptores de la actividad de ATPasa
YU7	RDS51 ¹²⁷	Compuesto derivado del pirrolil hidroxamato, con actividad inhibitoria sobre el transportador de zinc ZnuA del complejo ZnuABC, de <i>S. enterica</i>	Bloqueadores del estado de unión a sustratos/Disruptores de la actividad de ATPasa
Z5G	TBT1 ¹⁴⁸	Compuesto derivado del tetrahidrobenzotiofeno, con actividad inhibitoria sobre el transportador MsbA presente en bacterias Gram-negativas	Bloqueadores del estado de unión a sustratos

A diferencia de lo observado en el capítulo I en los transportadores de la familia RND, las estructuras disponibles de los transportadores ABC no proporcionan información con respecto a las interacciones con diferentes antibióticos. Lo anterior puede deberse a que los transportadores ABC bacterianos participan en una gran diversidad de procesos fisiológicos más allá del transporte de antibióticos, por lo que la investigación en esta familia de transportadores ha tenido como objetivo principal lograr una mayor comprensión de su participación en diferentes procesos patogénicos.¹⁹²

Por otro lado, se han encontrado diferentes moduladores del eflujo en transportadores ABC bacterianos. Todos los compuestos reportados como inhibidores de este proceso interfieren con los cambios conformacionales propios de estas proteínas, manteniéndolas en un estado de unión al sustrato, orientadas hacia el interior de la membrana interna. Adicionalmente, un segundo mecanismo de inhibición de estos compuestos consiste en disminuir la actividad de ATPasa de los transportadores ABC. (**Tabla 3.2 y Figura 3.4**).


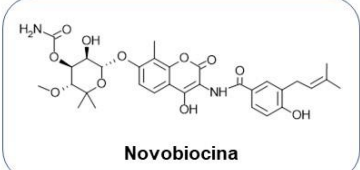
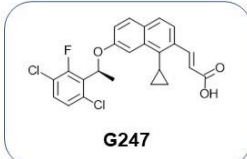
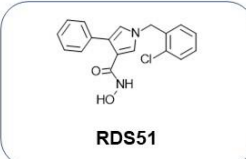

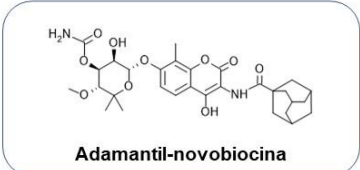
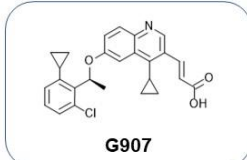
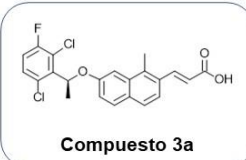
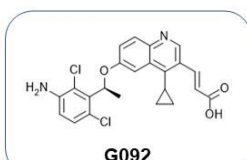
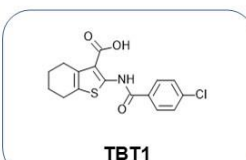
Sustratos de transportadores ABC	Moduladores de transportadores ABC	Inhibidores de transportadores ABC	
 <p>Bisbenzimidazole/Hoechst-33342</p>	 <p>Novobiocin</p>	 <p>G247</p>	 <p>RDS51</p>
 <p>Rhodamina 6G</p>	 <p>Adamantyl-novobiocin</p>	 <p>G907</p>	 <p>Compuesto 3a</p>
		 <p>G092</p>	 <p>TBT1</p>

Figura 3.4. Estructuras de los principales sustratos, moduladores e inhibidores identificados en las estructuras de los transportadores de eflujo bacterianos de la familia ABC reportadas en el RCSB PDB.

III.6. Mecanismo de eflujo

La principal característica de los transportadores ABC consiste en el empleo de la hidrólisis de ATP como fuente de energía para el eflujo de una gran variedad de sustratos. La unión e hidrólisis de ATP genera cambios conformacionales en el transportador, que permiten que los ciclos de unión y expulsión de sustratos puedan llevarse a cabo.¹⁹³ El proceso de eflujo involucra la transmisión de cambios conformacionales de los dominios de unión a nucleótidos hacia los dominios transmembranales.¹⁸¹

El mecanismo de eflujo de los transportadores ABC en bacterias Gram-positivas ha sido estudiado utilizando como modelo al transportador LmrA. Se ha sugerido que este tipo de transportadores presenta dos conformaciones de unión a sustratos que aparecen de manera sucesiva. La primera, consiste en un estado de alta afinidad por el sustrato, donde el transportador se encuentra “abierto hacia el interior” del citoplasma, permitiendo la entrada del sustrato a su sitio de unión. La segunda conformación corresponde a un estado de baja afinidad por el sustrato, y se presenta cuando el transportador se encuentra “abierto hacia el exterior” del citoplasma, permitiendo que el sustrato sea liberado hacia el exterior celular **(Figura 3.5)**.^{139,182,194}

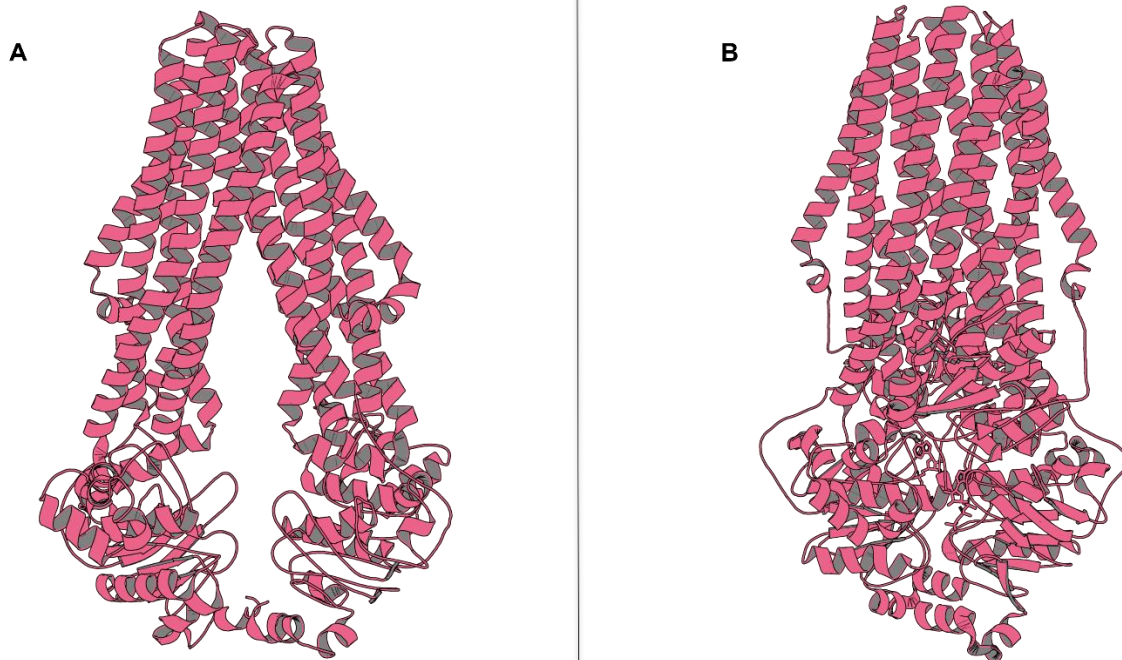


Figura 3.5. Conformaciones representativas de los transportadores ABC monocomponentes durante el eflujo de sustratos. **A.** Conformación abierta hacia el interior. **B.** Conformación abierta hacia el exterior. Figura elaborada con PyMOL a partir de dos estructuras en diferentes conformaciones de apertura (códigos PDB: 6UZ2 y 7T54).

Los cambios conformacionales que propician el cambio sucesivo entre los estados abierto hacia el interior y abierto hacia el exterior, son causados por la unión e hidrólisis de ATP en los dominios de unión a nucleótidos en cada monómero del transportador.^{182,194} La unión de 2 moléculas de ATP induce la dimerización de ambos dominios para generar una conformación estable y catalíticamente funcional en la que puede llevarse a cabo la hidrólisis de ATP.^{96,139,181} Se han reportado estructuras de transportadores ABC en forma holo (con ATP o ADP) y apo, lo que ha permitido observar diferentes conformaciones del proceso de eflujo y apoya el planteamiento previo con respecto a los cambios conformacionales del transportador asociados a la unión e hidrólisis de ATP.¹⁴⁰

En la conformación abierta hacia el interior, los dominios de unión a nucleótidos se encuentran separados. La unión de ATP promueve la dimerización de los dominios de unión

a nucleótidos, lo que genera la transición de los dominios transmembranales a la conformación abierta hacia afuera. Durante esta transición el sustrato se encuentra “atrapado” de manera transitoria en su sitio de unión. Una vez que se llega a la conformación abierta hacia afuera, el sitio de unión posee una menor afinidad por el sustrato, favoreciendo su liberación hacia el exterior celular. La hidrólisis de ATP tras la liberación del sustrato devuelve al transportador a la conformación abierta hacia el interior celular.^{139,194}

Se ha propuesto que este modelo de eflujo implica una estequiometría de una molécula de sustrato transportada por cada molécula de ATP hidrolizado.^{182,194} Se ha sugerido que este mecanismo de eflujo de sustratos es aplicable para la mayoría de los transportadores bacterianos de la familia ABC.¹⁸² La información estructural disponible del transportador Sav1866 (que confiere resistencia a diferentes antibióticos y colorantes) permitió llegar a la conclusión de que la estructura inicialmente simétrica de los transportadores puede volverse asimétrica durante el proceso de transporte, debido a la hidrólisis de una sola molécula de ATP por cada molécula de sustrato expulsada. Esta relación estequiométrica concuerda con la del modelo mecanístico propuesto para LmrA y un mecanismo de eflujo similar ha sido propuesto para transportadores ABC de mamíferos.^{136,182}

Además de aquellos transportadores a los que corresponde el mecanismo descrito en los párrafos anteriores, en bacterias Gram-negativas es posible encontrar miembros de la familia ABC que forman parte de sistemas de eflujo de tres componentes. Debido a su composición y a su arreglo estructural, se ha sugerido un mecanismo de eflujo distinto para estos sistemas, que difiere en algunos aspectos del mencionado anteriormente.

MacAB-TolC es el principal sistema de eflujo de tres componentes utilizado como modelo de estudio para elucidar el mecanismo de transporte de sustratos. Se ha descrito que el transportador MacB no lleva a cabo la unión de sustratos desde la membrana interna, sino desde el espacio periplásmico. Debido a esta diferencia, se ha propuesto que la proteína

MacB permanece en una conformación “abierto hacia fuera” durante todo el proceso de eflujo, en el que ocurre la unión simultánea del sustrato y de ATP, seguida de un cambio conformacional del sitio de unión (causado por la hidrólisis de ATP) que disminuye su afinidad por el sustrato y provoca su expulsión hacia el canal MacA-ToIC.^{123,8}

Al comparar estructuras en los estados libre y de unión a ATP de MacB, es posible observar cambios conformacionales en las hélices transmembranales y en los dominios periplásmicos. Al igual que en el mecanismo descrito para los transportadores ABC de un solo componente, la unión de ATP induce la dimerización de los dominios de unión a nucleótidos, por lo que los dominios transmembranales y sus porciones periplásmicas adquieren una conformación más compacta, eliminando así la cavidad de unión de sustratos que se encontraba entre ellos. **(Figura 3.6).**^{120,123,131}

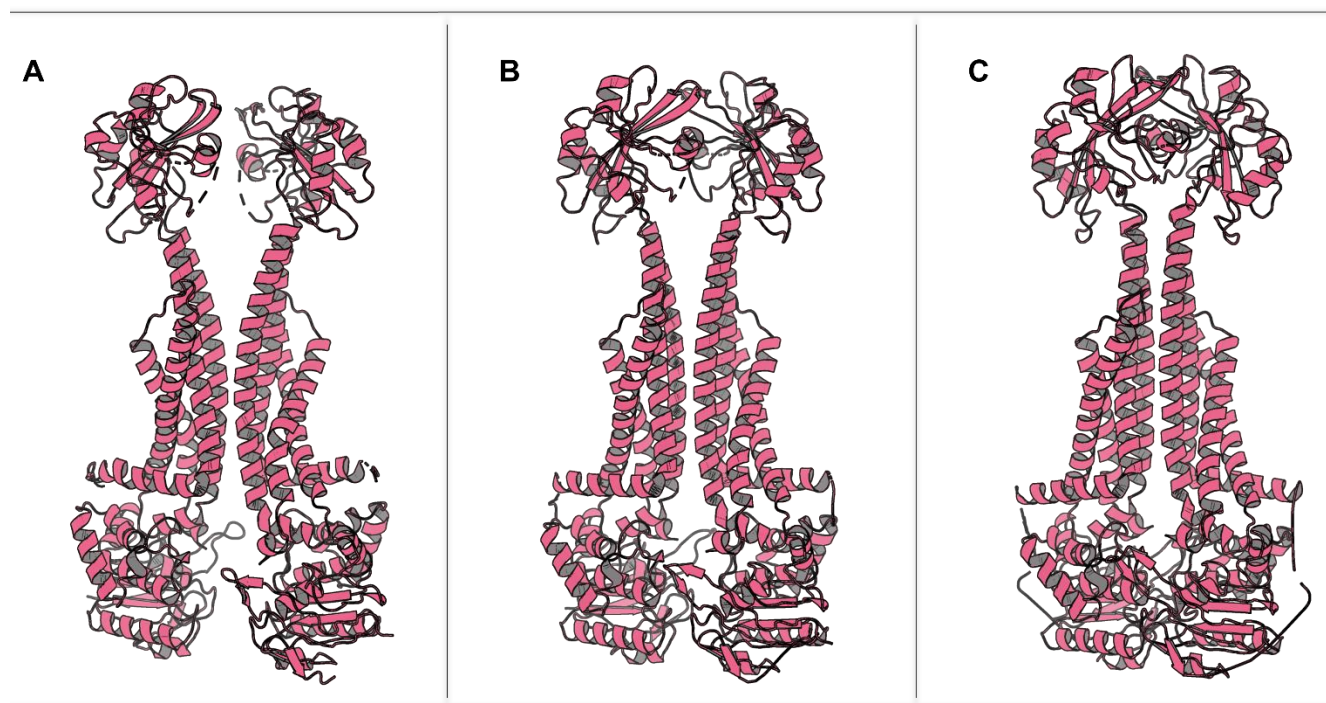


Figura 3.6. Dimerización de los dominios de unión a nucleótidos (parte inferior) de los transportadores ABC. **A.** Estado inicial del transportador. **B.** Comienza el acercamiento de los dominios de unión a nucleótidos debido a la unión de ATP. **C.** Dominios de unión a nucleótidos dimerizados. Figura elabora con PyMOL a partir de una animación creada con estructuras de MacB que contienen los dominios de unión a nucleótidos separados (código PDB: 5NIL) y dimerizados (código PDB: 5LIL), utilizando el software Chimera 1.16.

La consecuente disminución de volumen en la cavidad de sustratos propicia la expulsión del sustrato hacia el canal formado por MacA y TolC, para su posterior eflujo al exterior celular. Finalmente, la hidrólisis de ATP devuelve al transportador a su estado inicial. Hasta el momento no se ha reportado estructura alguna de un sistema de eflujo de tres componentes en el estado de unión a sustratos. Esto representaría un recurso útil para determinar con mayor detalle el mecanismo de eflujo en estos transportadores.^{120,123,131}

III.7. Modulación de la actividad de eflujo

Se ha reportado que la novobiocina (un antibiótico inhibidor de la DNA girasa) favorece la unión e hidrólisis de ATP en LptB₂FG, transportador relacionado con el eflujo de lipopolisacárido (LPS). Debido a ello, se propuso que la novobiocina favorecía la traslocación de LPS. El sitio de unión de la novobiocina (como modulador de la actividad de eflujo) se encuentra entre los dominios de unión a nucleótidos (LptB₂) y transmembranales (LptFG).¹⁶⁸

Este efecto fue comprobado en cepas mutantes de *E. coli* con un sistema deficiente de transporte de LPS, dando lugar a una membrana externa permeable ante diferentes compuestos, incluyendo antibióticos (como la novobiocina) que no tendrían actividad antibacteriana sobre cepas wt (*wild-type*) debido a su falta de permeabilidad. Como consecuencia del aumento de la actividad de eflujo de LPS, la impermeabilidad de la membrana externa ante diversos antibióticos es restaurada, aumentando así la CMI.¹⁶⁸

La comprensión de los mecanismos de modulación de los transportadores ABC de eflujo puede ser útil para entender la relación funcional entre la hidrólisis de ATP y el eflujo de sustratos, así como para el diseño de compuestos con un efecto negativo (en lugar de positivo), sobre la actividad de los transportadores asociados de eflujo relacionados con diversos procesos vitales y la resistencia a múltiples antibióticos.¹⁶⁸

IV. CAPÍTULO III. Transportadores de la MFS

Los transportadores pertenecientes a la MFS (*Major Facilitator Superfamily*) representan un grupo de proteínas que participan en la traslocación de una gran variedad de sustratos de bajo peso molecular con diferentes características estructurales a través de la membrana citoplasmática. Aunque su principal función en bacterias es el importe de carbohidratos del exterior celular, múltiples transportadores de esta familia han evolucionado hasta adquirir la capacidad de reconocer y expulsar diversos sustratos desde el citoplasma, siendo de particular interés aquellos transportadores relacionados con el eflujo de múltiples antibióticos en bacterias patógenas.^{9,195}

Las proteínas de esta familia participan en el transporte activo de sustratos dependiente de la fuerza protón motriz consecuencia de un gradiente iónico a través de una membrana. Existe una gran cantidad de subfamilias que participan en el transporte (importación o exportación) de una gran variedad de sustratos, entre los que se encuentran carbohidratos, iones orgánicos e inorgánicos, metabolitos, aminoácidos, péptidos, nucleósidos y antibióticos. A lo largo de este capítulo, se abordará de manera exclusiva los principales aspectos de los transportadores de esta familia asociados al eflujo de antibióticos.^{9,196,6}

Los principales transportadores de eflujo de importancia clínica en bacterias Gram-positivas pertenecen a esta familia. En particular, se ha identificado que los transportadores de las subfamilias DHA1-3 (*drug:H⁺ antiporter* 1-3) están relacionados con el eflujo de antibióticos mediante el antiporte de protones.⁶ La proteína TetB (exportador de tetraciclinas de la subfamilia DHA1), fue el primer transportador MFS asociado a la resistencia a antibióticos, mientras que QacA, propia de estafilococos y miembro de la subfamilia DHA2, fue el primer transportador de múltiples antibióticos identificado.⁶

Tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, los transportadores comúnmente asociados a la resistencia a múltiples antibióticos son proteínas de un solo componente. No obstante, en bacterias Gram-negativas pueden encontrarse sistemas eflujo de tres componentes, los cuales tienen una organización estructural similar a los complejos de las familias RND y ABC, descritos en capítulos anteriores.¹⁹⁵ La estequiometría de este y otros sistemas tricomponentes consiste en un monómero de la proteína de membrana interna (PMI), un hexámero de la proteína de fusión membranal (PFM) y un trímero de la proteína de membrana externa (PME), tal como se observa en la **Figura 4.1**.¹⁹⁷

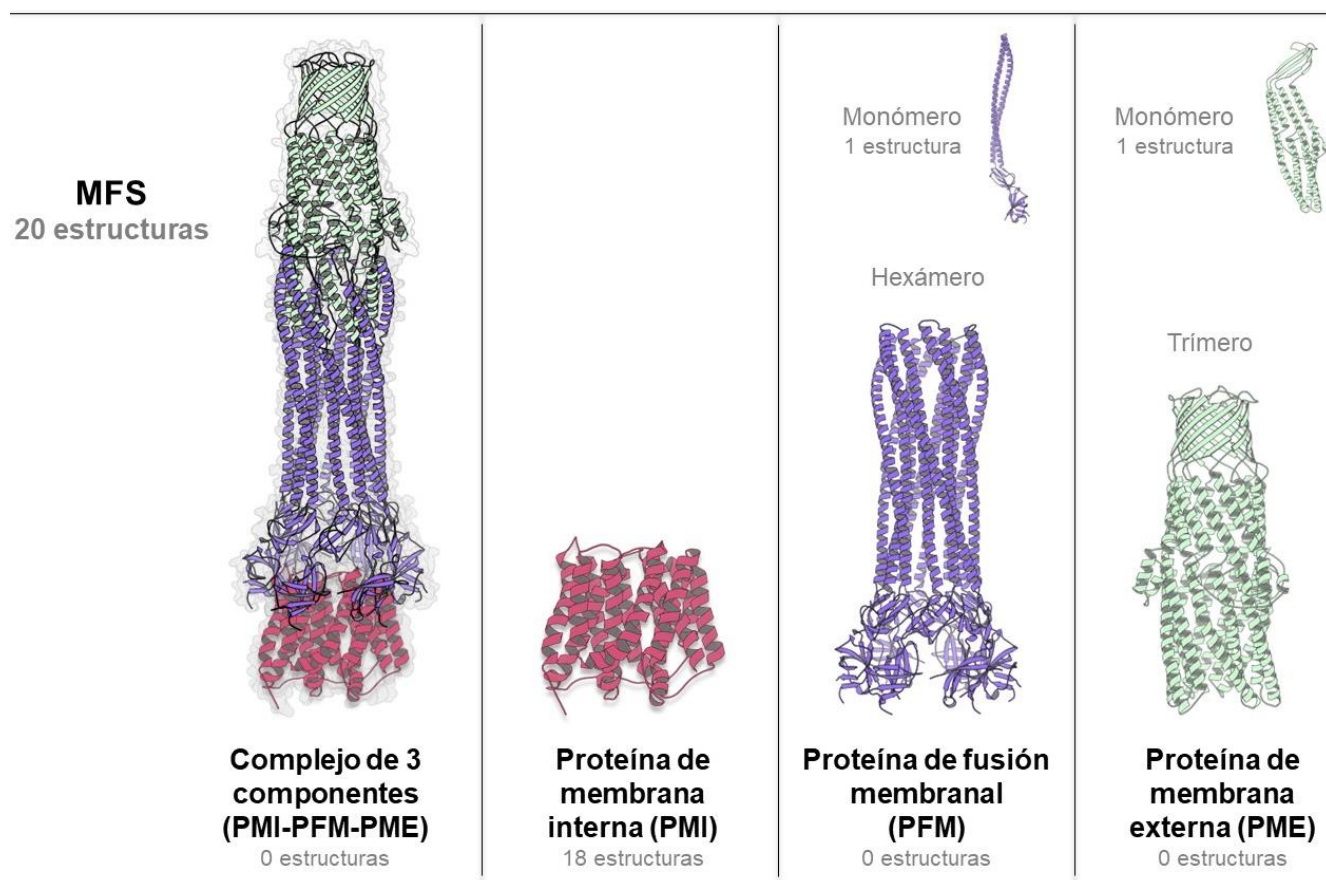


Figura 4.1. Estructuras representativas de los componentes de los transportadores de la familia MFS y la posible estructura representativa de los complejos de tres componentes generada por homología. Se indica el número de estructuras reportadas para cada complejo/componente en la base de datos del RCSB PDB. Figura elabora con PyMOL, utilizando las estructuras con código PDB 2GFP (PMI), 4TKO (PFM) y 1YC9 (PME), que corresponde a las proteínas EmrD, EmrA y VceC, respectivamente.

IV.1. Principales modelos de estudio: LmrP y MdfA

Los principales modelos de estudio de los transportadores MFS son LmrP (de *L. lactis*) y MdfA (de *E. coli*), en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente. El estudio de ambas proteínas ha proporcionado valiosa información sobre diversos aspectos de los transportadores de esta familia: el estudio de la proteína LmrP ha permitido obtener información sobre los aspectos energéticos del proceso de eflujo, mientras que el estudio de MdfA ha permitido una mejor comprensión del reconocimiento de sustratos por los transportadores MFS, gracias a la elucidación de las estructuras de este transportador en presencia y ausencia de sustratos.^{196,198,199,182}

Por otra parte, el principal modelo de estudio de los sistemas tricomponentes de esta familia es el sistema EmrAB-TolC de *E. coli*, que confiere resistencia a carbonilcianuro-*m*-clorofenilhidrazona y ácido nalidíxico. En este sistema, la proteína EmrB es el transportador MFS, mientras que EmrA es la proteína de fusión membranal.⁶ Al igual que en los sistemas tricomponentes de las familias RND y ABC, el eflujo de sustratos ocurre a través de una proteína de membrana externa; gracias a la continuidad del túnel formado por la PMI, la PFM y la PME es posible la expulsión de sustratos del citoplasma al exterior celular.^{195,200}

A pesar del éxito en la caracterización de los sistemas de tres componentes de las familias RND y ABC, la información de este tipo de sistemas en los transportadores MFS es escasa en la actualidad, incluyendo aquella correspondiente al sistema EmrAB-TolC, puesto que no ha sido determinada su estructura como sistema multicomponente y por lo tanto no ha sido posible llevar a cabo análisis estructurales y funcionales de este complejo y su mecanismo de reconocimiento y eflujo de sustratos, que podría tener diferencias significativas con los sistemas de otras familias debido a la diversidad estructural de los componentes de membrana interna.¹⁹⁷

IV.2. Recopilación de estructuras

Se ha determinado la estructura de solo unos pocos miembros de esta familia de transportadores asociados a la resistencia a múltiples antibióticos. Como resultado de una búsqueda exhaustiva en la base de datos del RCSB PDB, se encontró un total de 20 estructuras que corresponden a diferentes complejos y componentes de los transportadores MFS (**Figura 4.1** y **Tabla 4.1**). De estas estructuras, 18 corresponden a proteínas de membrana interna o citoplasmática en su forma monomérica (funcional), mientras que las dos estructuras restantes corresponden a la forma monomérica de EmrA (proteína de fusión membranal) y VceC (proteína de membrana externa).

La proteína EmrD de *E. coli* fue el primer transportador de múltiples antibióticos de esta familia en ser cristalizado (en el año 2006), como una primera aproximación para determinar la causa de la multiespecificidad de sustratos y los cambios conformacionales que se presentan durante el eflujo de compuestos hidrofóbicos.^{9,201} Desde entonces, se han reportado diferentes estructuras de los transportadores MdfA, LmrP, NorA y NorC. Del total de estructuras encontradas, 14 fueron reportadas en los últimos 5 años (2018-2023), y gracias a ellas ha sido posible identificar las interacciones que se establecen entre los sitios de unión de los transportadores MFS y sus respectivos sustratos.

Tabla 4.1. Estructuras correspondientes a los componentes y complejos de los transportadores de la familia RND, reportadas en el RCSB PDB

Estructuras de proteínas de membrana interna						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID Ligando
2GFP	EmrD	Transportador de múltiples antibióticos	3.50	<i>E. coli</i>	Yin <i>et al</i> ²⁰¹	-
4ZOW	MdfA	Transportador de múltiples antibióticos	2.45	<i>E. coli</i> K-12	Heng <i>et al</i> ²⁰²	CLM
4ZP0	MdfA	Transportador de múltiples antibióticos	2.00	<i>E. coli</i> K-12	Heng <i>et al</i> ²⁰²	DXC
4ZP2	MdfA	Transportador de múltiples antibióticos	2.20	<i>E. coli</i> K-12	Heng <i>et al</i> ²⁰²	LDA
6EUQ	MdfA	Transportador de múltiples antibióticos	2.20	<i>E. coli</i> K-12	Zomot <i>et al</i> ²⁰³	DXC
6GV1	MdfA	MdfA en conformación abierta hacia afuera	3.40	<i>E. coli</i> K-12	Nagarathinam <i>et al</i> ²⁰⁴	-
6OOM	MdfA	Transportador de múltiples antibióticos	2.20	<i>E. coli</i>	Wu <i>et al</i> ²⁰⁵	LDA
6OOP	MdfA	Transportador de múltiples antibióticos	2.80	<i>E. coli</i>	Wu <i>et al</i> ²⁰⁵	KHJ
6OOQ	MdfA	Transportador de múltiples antibióticos	3.00	<i>E. coli</i>	Wu <i>et al</i> ²⁰⁵	DXC
6T1Z	LmrP	LmrP en conformación abierta hacia afuera	2.90	<i>L. lactis</i>	Debruycker <i>et al</i> ²⁰⁶	HT1
6VRZ	MdfA	Transportador de múltiples antibióticos	2.00	<i>E. coli</i>	Wu <i>et al</i> ²⁰⁷	CLM
6VS0	MdfA	Transportador de múltiples antibióticos	2.10	<i>E. coli</i>	Wu <i>et al</i> ²⁰⁷	CLM
6VS1	MdfA	Transportador de múltiples antibióticos	3.00	<i>E. coli</i>	Wu <i>et al</i> ²⁰⁷	DXC
6VS2	MdfA	Transportador de múltiples antibióticos	3.00	<i>E. coli</i>	Wu <i>et al</i> ²⁰⁷	LDA
7D5P	NorC	NorC: conformación abierta hacia afuera	3.65	<i>S. aureus</i>	Kumar <i>et al</i> ²⁰⁸	-
7D5Q	NorC	NorC K398A: conformación abierta hacia afuera	3.60	<i>S. aureus</i>	Kumar <i>et al</i> ²⁰⁸	-
7LO7	NorA	Transportador de resistencia a quinolonas	3.74	<i>S. aureus</i>	Brawley <i>et al</i> ²⁰⁹	-
7LO8	NorA	Transportador de resistencia a quinolonas	3.16	<i>S. aureus</i>	Brawley <i>et al</i> ²⁰⁹	-
Estructuras de proteínas de fusión membranal en forma monomérica						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID Ligando
4TKO	EmrA	Proteína de fusión membranal de EmrAB-TolC	2.85	<i>A. aeolicus</i> VF5	Hinchliffe <i>et al</i> ²¹⁰	-
Estructuras de proteínas de membrana externa en forma monomérica						
Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID Ligando
1YC9	VceC	Proteína de membrana externa de VceABC	1.80	<i>V. cholerae</i>	Federici <i>et al</i> ²²	-

Nota: La descripción asociada a la estructura proporciona información sobre la identidad, características, ligandos o conformaciones de los transportadores.

IV.3. Estructura de los transportadores MFS

La unidad mínima funcional de los transportadores MFS es una estructura monomérica conformada por 12 hélices transmembranales. No obstante, se han reportado transportadores conformados por 14 hélices. Una de las principales características de las proteínas de membrana interna de esta familia es que no poseen dominios periplásmicos, a diferencia de las proteínas de membrana interna de las familias RND y ABC.^{9,195,6}

Se ha descrito que 8 de los 12 segmentos transmembranales que integran a un transportador MFS (o proteína de membrana interna) se encuentran formando una cavidad interna o de unión de sustratos, compuesta principalmente por residuos de carácter hidrofóbico, por lo que los transportadores MFS estarían involucrados principalmente en el transporte de moléculas con carácter lipofílico. Se ha reportado que los residuos hidrofóbicos de la cavidad de unión de sustratos se encuentran altamente conservados entre las proteínas de esta familia y por lo tanto estarían involucrados en la especificidad de sustratos.^{195,201}

Las 12 hélices transmembranales de un transportador MFS pueden clasificarse en dos grupos: las hélices 1-6 y las hélices 7-12. En EmrD (y se ha sugerido que en el resto de los transportadores MFS de 12 hélices), es posible identificar 1 loop entre las hélices 4 y 5 y 1 loop entre las hélices 10 y 11. Estos dos loops sobresalen hacia el interior de la membrana interna y se ha propuesto que el loop presente entre las hélices 10 y 11 está involucrado en el transporte de moléculas hidrofóbicas hacia el exterior de la membrana interna. La hélice número 4 de EmrD contiene diferentes aminoácidos cargados que podrían estar relacionados con la selectividad por determinados sustratos.^{9,201}

Con respecto a los sistemas de eflujo de tres componentes de esta familia, la entrada de sustratos a su sitio de unión desde el periplasma parece poco probable debido a la ausencia de una porción periplásmica de acceso, por lo que se concluye que estos sistemas

transportan de manera exclusiva sustratos desde el citoplasma al exterior celular.⁶ Debido a la menor longitud de las proteínas de membrana interna, las proteínas de fusión membranal se han adaptado para tener una longitud tal que permita unir y estabilizar a las proteínas de membrana interna y externa para formar un túnel continuo. Esto se ve reflejado en una mayor longitud con respecto a las proteínas de fusión membranal de las familias RND y ABC.

Aunque las proteínas de membrana interna y las proteínas de fusión membranal de sistemas de eflujo de distintas familias poseen diferencias significativas, las proteínas de membrana externa poseen una elevada homología estructural. Un claro ejemplo de lo anterior es la proteína TolC, que puede formar parte de sistemas tricomponentes de las familias RND, ABC y MFS de manera indistinta, ya que solo representa un canal útil para la salida de sustratos de la célula. Al igual que en los sistemas de tres componentes de las tres familias mencionadas, las proteínas de membrana interna determinan la especificidad de sustratos y son el componente proteico involucrado en el proceso de acoplamiento energético para el proceso de eflujo.⁶

IV.4. Sitios de unión de sustratos

Gracias a las estructuras cristalográficas disponibles y a diversos ensayos bioquímicos, se ha propuesto la existencia de múltiples sitios de unión (sobrelapados o completamente diferentes) en las cavidades de unión a sustratos de los transportadores MFS, tal como se ha descrito en capítulos anteriores para las cavidades de unión de los transportadores de las familias ABC y RND. Se ha encontrado que ciertos transportadores MFS de múltiples antibióticos (MdfA y LmrP) pueden unir de manera simultánea a diferentes sustratos debido al tamaño y flexibilidad de sus cavidades de unión.^{6,211}

El principal modelo utilizado para el estudio de los sitios de unión de los transportadores MFS de múltiples antibióticos ha sido MdfA, en donde se identificó una cavidad de unión de sustratos altamente flexible característica de las proteínas de esta familia (**Figura 4.2**). Los residuos que conforman dichas cavidades (y determinan la especificidad de sustratos) son principalmente aromáticos e hidrofóbicos, aunque también se han identificado residuos polares y residuos cargados en menor proporción. Una cavidad altamente flexible de unión de sustratos, compuesta principalmente por residuos aromáticos y voluminosos ha sido identificada también en EmrD.^{9,96}

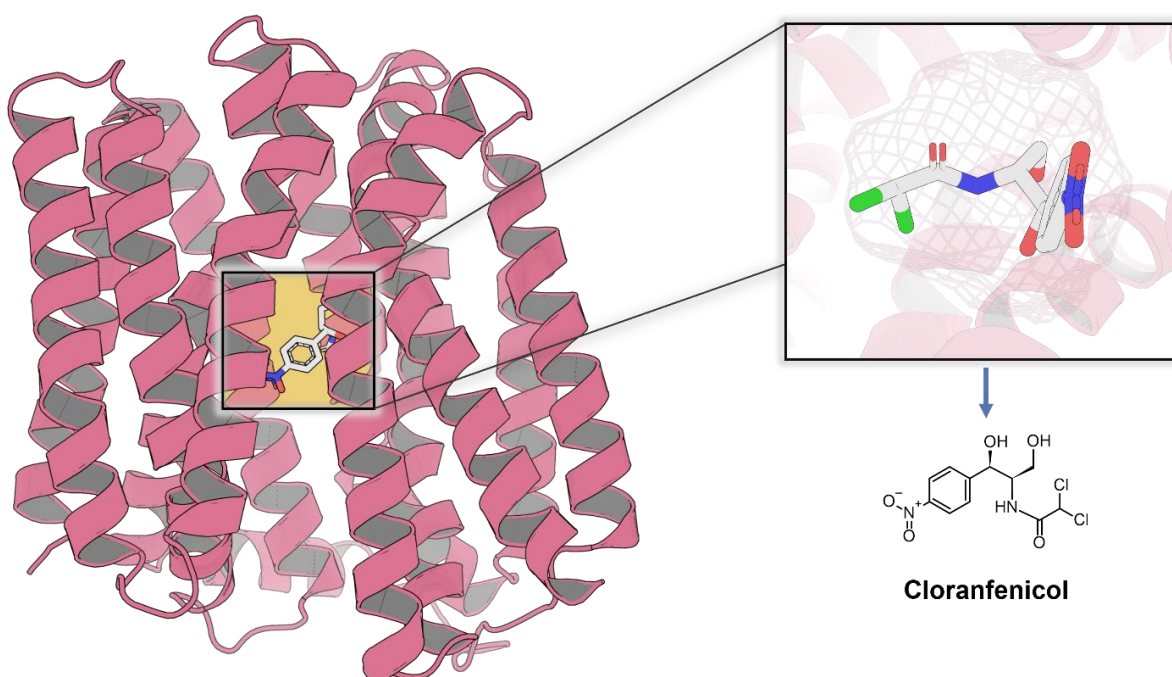


Figura 4.2. Sitio de unión de sustratos en la cavidad de unión de MdfA, en la que se encuentra unida una molécula de cloranfenicol (código PDB: 4ZOW). Figura elaborada con PyMOL.

En relación con lo anterior, múltiples sustratos de estos transportadores son de carácter hidrofóbico y forman interacciones con residuos que poseen las características mencionadas en el párrafo anterior. Se ha descrito también la importancia de interacciones de puente de hidrógeno en el reconocimiento de sustratos neutros o aniónicos, así como

interacciones ión-ión en el caso de sustratos zwitteriónicos o catiónicos en transportadores capaces de expulsar este tipo de compuestos.⁶

Los transportadores QacA y QacB participan en el eflujo de compuestos antimicrobianos catiónicos. QacB confiere menores niveles de resistencia a compuestos di catiónicos; esto puede deberse a un residuo ácido adicional en la cavidad de unión de sustratos de QacA, que participa en interacciones ion-ion con sustratos di catiónicos.²¹² Se ha reportado que MdfA puede transportar sustratos di catiónicos con grupos cargados separados por un *linker* (región de unión) largo; estos serían expulsados en 2 ciclos de translocación.^{6,211} Este tipo de eflujo podría también ser la causa de la resistencia a compuestos di catiónicos por QacB (en menor medida que la conferida por QacA).

El transportador LmrP ha sido utilizado también como modelo de estudio de los sitios de unión de sustratos. Al igual que para MdfA, se ha sugerido que contiene una sola cavidad con múltiples regiones de interacción con sustratos estructuralmente diversos.¹⁸² Aunque es actualmente aceptado que los transportadores MFS poseen una sola cavidad de unión, no se ha descartado la posibilidad de que contengan diferentes cavidades de unión, tal como se ha reportado para los transportadores que pertenecen a las familias RND y ABC.⁹

IV.5. Principales sustratos

Existe una gran diversidad de compuestos que son sustratos de los transportadores MFS. Se ha reportado que algunos transportadores de importancia clínica tienen cierta especificidad por algunos sustratos, como TetB, TetK y TetP, asociados al eflujo de tetraciclinas. Los sustratos de estos transportadores son moléculas hidrofóbicas o anfipáticas y moléculas con carga positiva. Como ejemplos de los principales sustratos de eflujo se encuentran agentes antisépticos (cloruro de benzalconio y clorhexidina), colorantes (bromuro

de etidio y acriflavina), moléculas catiónicas (diamidinas, biguanidinas y compuestos de amonio cuaternario) y antibióticos del grupo de las tetraciclinas y fluoroquinolonas.^{6,182,213}

Los transportadores MFS han sido relacionados también con la virulencia bacteriana, ya que podrían estar involucrados en la colonización de mamíferos al proporcionar resistencia ante diversos compuestos producidos por el huésped como respuesta ante la presencia de agentes patógenos: el transportador FarAB (*Fatty acid resistance AB proteins*, proteínas AB de resistencia a ácidos grasos) proporciona resistencia a *N. gonorrhoeae* contra ácidos grasos de cadena larga, mientras que el transportador MdrT, de *L. monocytogenes*, participa en el eflujo de ácido cólico, permitiendo la supervivencia de esta bacteria en presencia de sales biliares.¹⁹⁵

Al igual que los transportadores de las familias RND y ABC, los transportadores MFS están involucrados en la formación de biopelículas. Se ha detectado una producción deficiente de biopelículas en bacterias tras la exposición a inhibidores de transportadores de eflujo de esta familia, así como en cepas mutantes que no poseen los genes que codifican para los respectivos transportadores involucrados en este proceso. Se ha identificado también una mayor expresión de estos genes en bacterias durante la formación de biopelículas, en comparación con bacterias en forma planctónica.^{195,214}

En relación con lo anterior, se requiere de transportadores para el eflujo de polisacáridos necesarios para la síntesis de biopelículas, tales como D-glucosa, arabinosa y ácido colánico, que son exportados por GluP (de *H. pylori*) y EmrD y TetA (de *E. coli*), respectivamente. Los componentes mencionados son importantes para la síntesis de exopolisacáridos, la agregación celular y la síntesis de polisacáridos capsulares. De igual manera, se ha identificado la importancia de los transportadores Pmt, AbaF y AbaQ en la virulencia de *A. baumannii*, agente patógeno resistente a múltiples antibióticos y cuya relevancia clínica está asociada a la formación de biopelículas.¹⁹⁵

Aunque hay una gran diversidad de sustratos reportados, las estructuras de transportadores MFS en estado de unión a ligandos son escasas, incluyendo aquellas en estado de unión a compuestos antimicrobianos, puesto que el único antibiótico de uso clínico identificado en un sitio de unión es el cloranfenicol (Tabla 4.2, Figura 4.3).^{202,207} Adicionalmente, se ha sugerido que el perfil de reconocimiento de los transportadores MFS podría no limitarse a los sustratos reportados hasta ahora.⁶

Tabla 4.2. Principales sustratos de interés farmacológico (antibióticos) identificados en las estructuras de los transportadores MFS depositadas en el RCSB Protein Data Bank.

ID Ligando	Nombre	Descripción ⁹⁷	Grupo al que pertenece
CLM	Cloranfenicol	Antibiótico de amplio espectro utilizado en el tratamiento de salmonelosis, rickettsiosis e infecciones por bacterias Gram-negativas causantes de meningitis y bacteriemia	Anfenicoles
DXC	Ácido desoxicólico ²⁰⁷	Sal biliar que puede participar como un detergente disruptor de membranas celulares e inhibir el desarrollo bacteriano	Ácidos biliares
HT1	Hoechst-33342 ²⁰⁶	Colorante fluorescente sintético utilizado para el marcaje de DNA y utilizado en ensayos de actividad de eflujo	Derivados de bis-benzimida

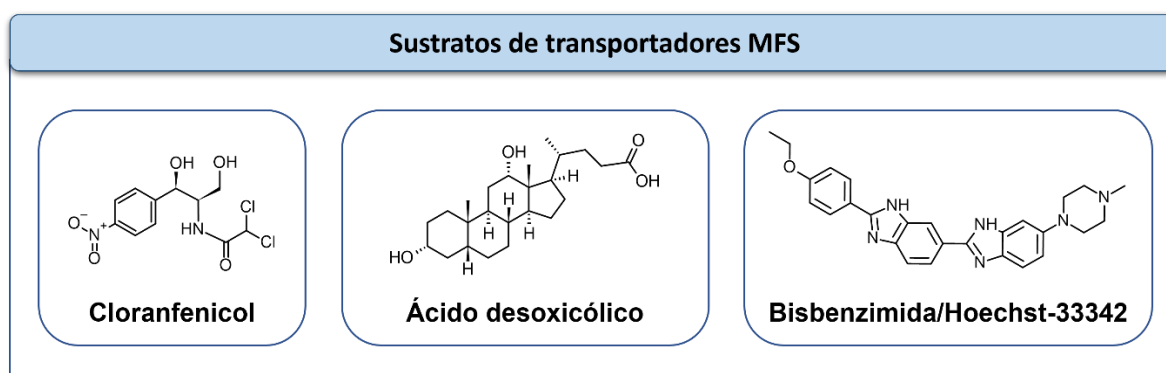


Figura 4.3. Estructuras de los sustratos identificados en los sitios de unión de las estructuras de los transportadores de la familia MFS. Se puede apreciar al cloranfenicol como el único antibiótico presente en las estructuras reportadas.

II.6. Mecanismo de eflujo

Con base en la evidencia estructural disponible, se ha propuesto un mecanismo de transporte de dos pasos para los transportadores MFS de eflujo, en el que tiene lugar la reorientación de las hélices que conforman la cavidad de unión de sustratos para permitir su apertura de manera alternante hacia ambos lados de la membrana. Este mecanismo de apertura hacia el interior o hacia el exterior de la membrana es similar al descrito para los transportadores de un solo componente de la familia ABC.^{195,6}

Se ha descrito para MdfA y LmrP que la cavidad de unión se encuentra inicialmente abierta hacia el interior de la membrana, donde el sustrato ingresa desde el citoplasma a su sitio de unión, provocando la traslocación del protón de un residuo ácido específico desde el lado periplásmico de MdfA hacia el citoplasma. (**Figura 4.4 A**). A su vez, la interacción del sustrato con la cavidad de unión genera una serie de cambios conformacionales que provoca la reorientación de las hélices del transportador a una conformación abierta hacia el exterior de la membrana.

A continuación, el sustrato es liberado hacia el lado externo de la membrana y el residuo ácido ionizado toma un protón del periplasma. La protonación del residuo en cuestión genera una serie de cambios conformacionales que devuelven al transportador a su conformación inicial abierta hacia el citoplasma (**Figura 4.4 C**).^{9,182,211,215}

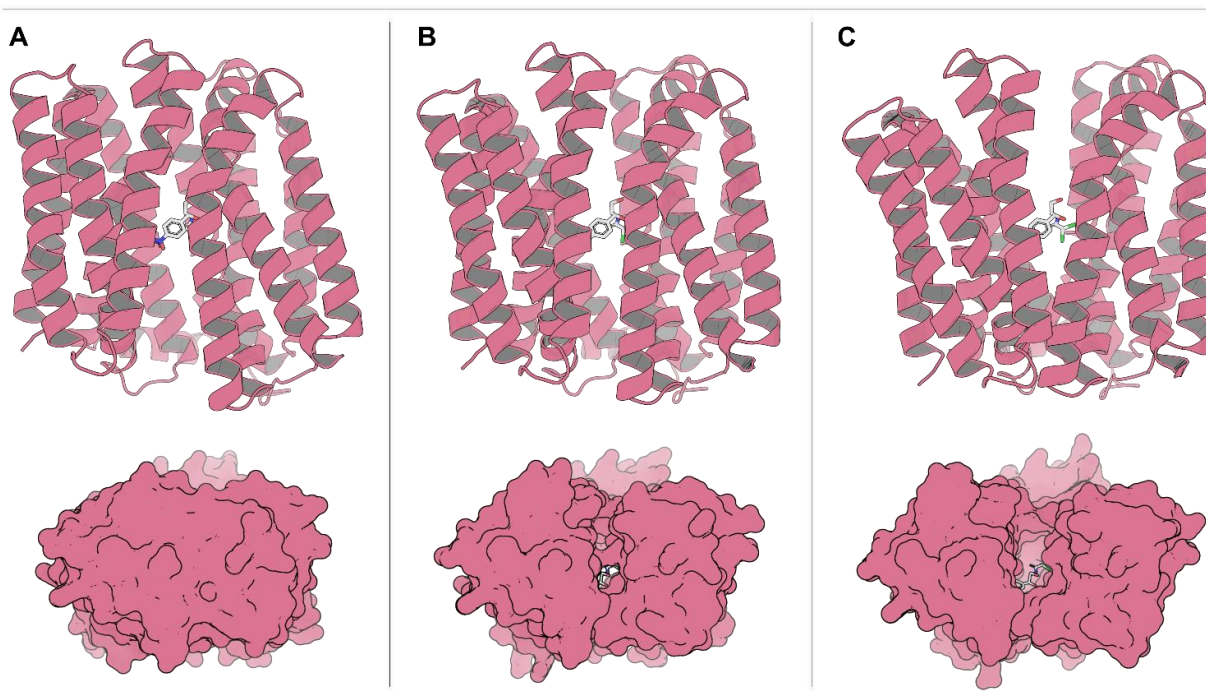


Figura 4.4. Conformaciones reportadas de MdfA durante el proceso de eflujo de un sustrato (cloranfenicol). En la imagen superior se aprecia la vista lateral del transportador, mientras que en la imagen inferior se observa al transportador desde el exterior de la membrana. **A.** Conformación “abierta” hacia el interior de la membrana tras la entrada del sustrato a la cavidad de unión. **B.** Estado intermedio “ocluido” por la reorientación de las hélices de MdfA hacia una conformación “abierta” hacia el exterior. Desde el exterior de la membrana es posible apreciar la “apertura” parcial del transportador. **C.** Conformación “abierta” hacia el exterior de la membrana. Se puede observar la “apertura” total del transportador hacia el exterior de la membrana, momentos antes de la salida del sustrato. Figura elabora con PyMOL a partir de una animación creada con las estructuras abierta hacia el interior (código PDB: 4ZOW) y abierta hacia el exterior (código PDB: 6GV1) del transportador MdfA, utilizando el software Chimera 1.16.

Además de las conformaciones abierta hacia el interior y abierta hacia el exterior de la membrana, se ha propuesto la existencia de un estado intermedio “ocluido” de la cavidad de unión (**Figura 4.4 B**). La capacidad de los transportadores MFS para adquirir ambas conformaciones de manera alternante, adaptándose al acomodo de diversos sustratos en un estado ocluido en su sitio de unión sin comprometer el gradiente iónico a través de la membrana (evitando el paso del resto de solutos), destaca su flexibilidad estructural.^{9,195}

Además de mostrar diferentes perfiles de reconocimiento de sustratos, el mecanismo generador de energía para el eflujo de sustratos puede mostrar diferencias en los

transportadores MFS; Aunque la fuerza protón motriz es la fuente de energía principal, algunas proteínas pueden llevar a cabo el eflujo de sustratos mediante el antiporte de cationes como sodio o potasio en lugar del antiporte de protones. Adicionalmente, se puede requerir la traslocación de 1, 2 o 3 protones por cada molécula de sustrato transportada, en función de sus características estructurales.⁶

Es necesaria una investigación detallada del mecanismo de eflujo de los transportadores MFS para una mejor comprensión los cambios conformacionales que se presentan durante el proceso de eflujo y de las regiones estructurales involucradas en la transmisión de dichos cambios tras la protonación y desprotonación de los residuos ácidos clave de cada transportador. Se requiere también de más información experimental para una mejor comprensión del reconocimiento y eflujo de múltiples antibióticos por los transportadores de esta familia.

Con respecto a los sistemas de eflujo multicomponentes, aún no se tiene la información suficiente sobre para determinar si estos sistemas pueden “capturar” sustratos desde el periplasma, como se ha propuesto y es generalmente aceptado para los transportadores de tres componentes de las familias RND y ABC, o si por otro lado (y con mayor probabilidad), la captura de sustratos en estos sistemas ocurre de igual manera que en los transportadores MFS de un solo componente, donde la entrada de sustratos se encuentra en la región citoplasmática/de la membrana interna.^{6,200}

V. CAPÍTULO IV. Sistemas de las familias SMR, MATE, AbgT y PACE.

Los transportadores RND, ABC y MFS han sido objeto de una amplia investigación debido a la importancia clínica que tiene su sobreexpresión en los principales agentes bacterianos causantes de infecciones nosocomiales. Por otro lado, aunque se ha demostrado su participación en el eflujo de antibióticos, la información relacionada con este fenómeno es escasa para las familias SMR (*Small Multidrug Resistance*), MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*), AbgT (*Aminobenzoyl-glutamate Transporter*) y PACE (*Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux*). Es por ello que en este capítulo se abordará de manera general la información más importante sobre el resto de las familias de transportadores asociados al eflujo de antibióticos como un mecanismo de resistencia en bacterias.

Debido al reducido número de estructuras reportadas para los transportadores de las familias de este capítulo, poco se conoce acerca de sus detalles estructurales y funcionales y las causas concretas del reconocimiento multiespecífico de antibióticos. En la actualidad, no ha sido reportada estructura alguna de un miembro de la familia PACE, descrita por primera vez en el año 2013, no obstante, las estructuras de los transportadores SMR, MATE y AbgT ya han sido identificadas (**Figura 5.1**).

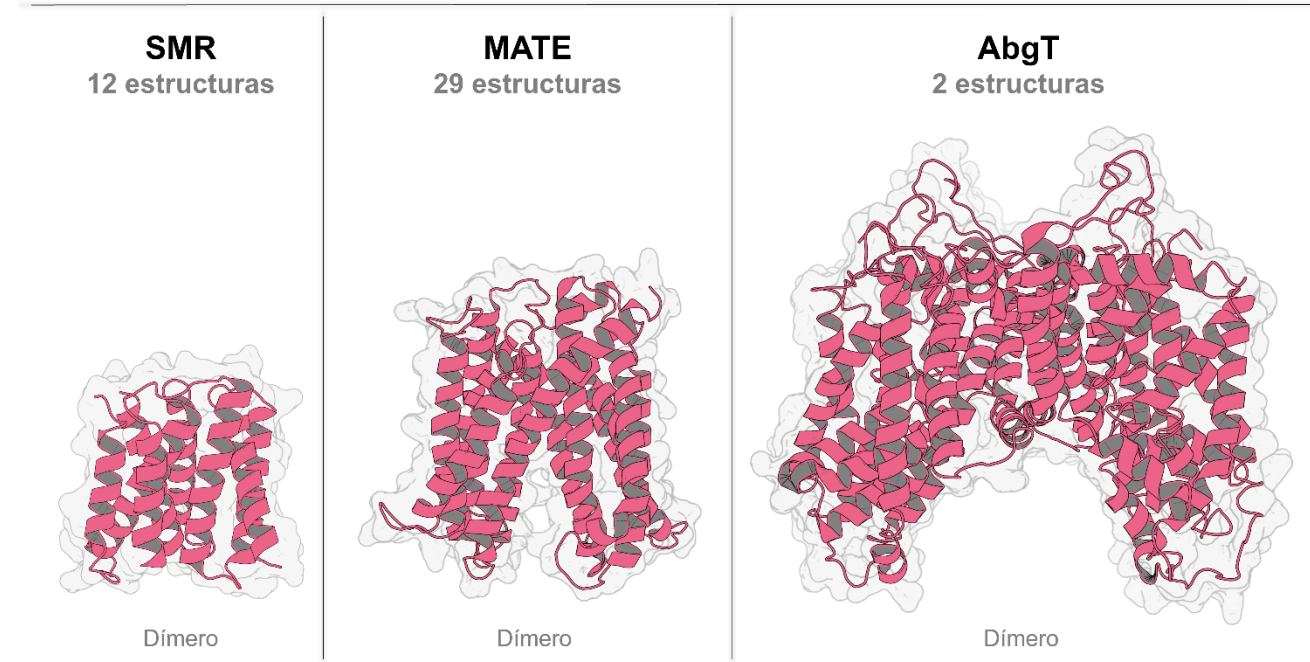


Figura 5.1. Estructuras representativas de los transportadores de las familias SMR, MATE y AbgT en su forma funcional (dimérica). Se indica el número de estructuras reportadas para cada familia en la base de datos del RCSB PDB. Figura elabora con PyMOL, utilizando (de izquierda a derecha) las estructuras con los códigos PDB: 7MH6, 3MKT y 4R1I. Dichos códigos corresponden a las proteínas EmrE (de *E. coli*), NorM (de *V. cholerae*) y MtrF (de *N. gonorrhoeae*), respectivamente.

V.1. Transportadores de eflujo de la familia SMR

Las proteínas de la familia SMR se encuentran entre los transportadores de membrana de menor tamaño en la naturaleza, por lo que poseen un tamaño considerablemente menor al del resto de los transportadores mencionados en este trabajo. Reciben su nombre debido a su amplio perfil de reconocimiento de sustratos. Existen 4 subtipos de transportadores SMR: transportadores de guanidinio, transportadores de poliaminas, flipasas de glicolípidos y transportadores de compuestos de amonio cuaternario. Los miembros de este último subtipo de transportadores están involucrados en el eflujo de compuestos catiónicos, hidrofóbicos y poliaromáticos.^{6,216,217}

Las características mencionadas en esta sección corresponden a aquellos transportadores de compuestos de amonio cuaternario, ya que el eflujo de este tipo de

compuestos ha sido identificado en transportadores de múltiples antibióticos. Aunque la participación de diferentes proteínas de este subtipo de transportadores en la resistencia a múltiples antibióticos se ha documentado ampliamente, particularmente ante compuestos de carácter catiónico, el modelo de estudio por excelencia es EmrE de *E. coli*, debido a que es la única proteína cuya estructura ha sido reportada hasta este momento.^{6,216,217,218}

La información estructural disponible de EmrE indica que los transportadores SMR deben encontrarse como homodímeros o heterodímeros para poder llevar a cabo el eflujo de sustratos, por lo que la unidad funcional de estos transportadores consta de 8 hélices transmembranales (2 arreglos antiparalelos de 4 hélices) que forman una cavidad central de unión de sustratos. Entre los sustratos más relevantes de los transportadores SMR, se han reportado colorantes, detergentes, compuestos de amonio cuaternario y antibióticos del grupo de los aminoglucósidos, macrólidos, cefalosporinas y tetraciclinas.^{6,216,219,220}

V.1.1. Recopilación de estructuras

Aunque el tamaño de los transportadores SMR es ideal para llevar a cabo diferentes estudios bioquímicos, representó durante muchos años un obstáculo para la obtención de estructuras de alta resolución de esta familia de proteínas. Se ha reportado hasta el momento un total de 12 estructuras de transportadores de compuestos de amonio cuaternario en la base de datos del RCSB PDB, siendo todas ellas del transportador EmrE (**Tabla 5.1**). Gracias a la información estructural obtenida de esta proteína, ha sido posible estudiar la topología, los sitios de unión y el mecanismo de reconocimiento y eflujo de sustratos.^{217,221}

Tabla 5.1. Estructuras correspondientes a los transportadores de la familia SMR, reportadas en el RCSB PDB

Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID de ligando
2I68	EmrE	Estructura del transportador EmrE	7.50	<i>E. coli</i>	Fleishman <i>et al</i> ²²²	-
3B5D	EmrE	Estructura de EmrE en complejo con TPP	3.80	<i>E. coli</i> K-12	Chen <i>et al</i> ²²³	P4P
3B61	EmrE	Forma apo del transportador EmrE	4.50	<i>E. coli</i> K-12	Chen <i>et al</i> ²²³	-
3B62	EmrE	Estructura de EmrE en complejo con TPP	4.40	<i>E. coli</i> K-12	Chen <i>et al</i> ²²³	P4P
7JK8	EmrE	Complejo a pH 5.8	-	<i>E. coli</i>	Shcherbakov <i>et al</i> ²²¹	VCJ
7MGX	EmrE	Mutante en complejo con metilviológeno	3.13	<i>E. coli</i>	Kermani <i>et al</i> ²²⁴	KHJ
7MH6	EmrE	Mutante D3 en pH bajo (estado protonado)	2.85	<i>E. coli</i> K-12	Kermani <i>et al</i> ²²⁴	-
7SFQ	EmrE	Mutante S64V en complejo a pH 8.0	-	<i>E. coli</i>	Shcherbakov <i>et al</i> ²²⁵	VCJ
7SSU	EmrE	Complejo con metiltrifenilfosfonio	3.22	<i>E. coli</i> K-12	Kermani <i>et al</i> ²²⁴	B5J
7SV9	EmrE	Mutante D3 en complejo con TPP	3.36	<i>E. coli</i> K-12	Kermani <i>et al</i> ²²⁴	P4P
7SVX	EmrE	Mutante D3 en complejo con harmano	3.90	<i>E. coli</i> K-12	Kermani <i>et al</i> ²²⁴	CN9
7T00	EmrE	Complejo con benciltrimetilamonio	3.91	<i>E. coli</i> K-12	Kermani <i>et al</i> ²²⁴	E00

Las estructuras de EmrE reportadas en unión con diferentes sustratos de eflujo (ej. TPP: tetrafenilfosfonio) han contribuido a la caracterización de la cavidad de unión de sustratos de este transportador.²²¹ No obstante, hasta el momento, no se ha reportado la estructura de ningún miembro de la familia de transportadores SMR en complejo con antibióticos de uso clínico, por lo que no ha sido posible determinar las interacciones específicas que este tipo de sustratos presentan con las cavidades de unión de los miembros de esta familia. Lo anterior ayudaría a una mejor comprensión del fenómeno de reconocimiento multiespecífico de antibióticos por los transportadores SMR.

V.1.2. Sitios de unión de sustratos y mecanismo de eflujo

A pesar de que su tamaño limita la diversidad de sustratos que pueden reconocer, los transportadores SMR pueden tener perfiles de reconocimiento de sustratos relativamente amplios gracias a la flexibilidad de sus cavidades de unión, una cualidad importante para todos los transportadores de múltiples antibióticos. La cavidad de unión de sustratos de

EmrE se encuentra en la interfaz del dímero funcional y está conformada principalmente por residuos aromáticos e hidrofóbicos. Se ha demostrado que EmrE sufre cambios conformacionales dependientes de las características estructurales del sustrato unido durante el proceso de eflujo. Lo anterior se relaciona directamente con la flexibilidad de su cavidad de unión y la capacidad de unión multiespecífica que esta posee.⁶

Adicionalmente, se ha propuesto que la unión de sustratos en EmrE es un proceso dinámico en el que estos pueden establecer múltiples interacciones débiles de manera simultánea en las cavidades de unión de sustratos, lo que hace posible la unión estable de sustratos con diferentes características estructurales. A pesar de que se ha demostrado el impacto de los transportadores SMR en la resistencia ante múltiples antibióticos, no se ha establecido una relación concreta entre las características estructurales de los antibióticos reportados como sustratos y las cavidades de unión de esta familia de transportadores.^{6,226}

Aunque no se conocen los detalles del mecanismo por el que los transportadores SMR llevan a cabo el eflujo de sustratos, se han reportado algunas generalidades de este proceso. Los transportadores SMR utilizan la fuerza protón motriz para expulsar sustratos. Diferentes estudios han destacado la importancia de un residuo de glutamato (E14) altamente conservado entre los transportadores SMR; se ha propuesto que este residuo posee un papel clave en el reconocimiento de sustratos y durante el proceso de eflujo de estos. Asimismo, se ha sugerido que dicho residuo está relacionado con el acoplamiento y traslocación de protones hacia el interior de la membrana, evento que tiene como consecuencia la expulsión de sustratos al exterior celular.^{6,226,227}

V.2. Transportadores de eflujo de la familia MATE

Los transportadores MATE fueron identificados por primera vez durante la caracterización de transportadores eflujo relacionados con la resistencia a antibióticos. Aunque fueron inicialmente clasificados como miembros de la MFS debido a su similitud estructural, se determinó que no poseían una elevada homología secuencial, por lo que fueron clasificados como una nueva familia de proteínas de transporte. A su vez, los transportadores MATE bacterianos pueden clasificarse en dos grupos: los transportadores tipo NorM y los transportadores tipo DinF, que poseen diferencias estructurales y funcionales. En esta sección, se mencionarán las principales características que son generales para todos los transportadores MATE, a menos que se especifique lo contrario.^{228,229}

La información estructural disponible ha revelado que todos los miembros de esta familia están conformados por 12 hélices transmembranales, las cuales se encuentran organizadas en dos dominios, cada uno de 6 hélices. Esta familia de transportadores utiliza el gradiente de protones o de sodio a través de la membrana como fuente de energía para llevar a cabo el eflujo de una gran variedad de compuestos (principalmente de carácter hidrofóbico y catiónico) al exterior celular o al periplasma (en bacterias Gram-negativas). Entre los principales sustratos de los transportadores MATE, se encuentran colorantes catiónicos y antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos.^{6,228,230,231}

El transportador de múltiples antibióticos NorM (de *V. parahemolyticus*) fue el primer transportador de esta familia en ser identificado, por lo que fue además el primer modelo de estudio utilizado. Posteriormente, se identificaron transportadores como NorM-VC (de *V. cholerae*) y PfMATE (de *P. furiosus*) que han sido útiles para la caracterización estructural y funcional de los miembros de esta familia. Pese a ser un transportador expresado por una arqueobacteria, PfMATE posee una elevada homología estructural con los transportadores

bacterianos, especialmente en secuencias altamente conservadas relacionadas con la función de reconocimiento y eflujo de sustratos.^{6,230,231}

Como un ejemplo de la capacidad y el potencial riesgo a la salud que representa el eflujo de múltiples antibióticos por transportadores MATE, desde el año 2009 se tiene registro del papel de transportadores como AbeM (de *A. baumannii*), NorM (de *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *V. parahemolyticus*) y YdhE (de *E. coli*) en un incremento importante de la concentración mínima inhibitoria de antibióticos como ampicilina, ciprofloxacino, norfloxacina, ofloxacino, gentamicina, triclosán, novobiocina, clorhexidina, eritromicina, kanamicina, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprim y estreptomina.^{230,232,233,234,235}

V.2.1. Recopilación de estructuras

Como resultado de una búsqueda exhaustiva en la base de datos del RCSB PDB, se encontró un total de 29 estructuras correspondientes a transportadores de eflujo bacterianos pertenecientes a la familia MATE. Entre ellas, se encuentran estructuras en conformaciones distintas y en complejo con diferentes sustratos (**Tabla 5.2**). Los 3 principales sustratos identificados en los sitios de unión de las estructuras fueron etidio, rodamina y verapamilo.

Tabla 5.2. Estructuras correspondientes a los transportadores de la familia MATE, reportadas en el RCSB PDB

Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID de ligando
3MKT	NorM	Transportador en complejo con un catión	3.65	<i>V. cholerae</i>	He <i>et al</i> ²³⁶	-
3MKU	NorM	Transportador en complejo con un catión	4.20	<i>V. cholerae</i>	He <i>et al</i> ²³⁶	RB
4HUK	NorM-NG	Transportador en complejo con TPP	3.59	<i>N. gonorrhoeae</i>	Lu <i>et al</i> ²³⁷	P4P
4HUL	NorM-NG	Transportador en complejo con Cesio	3.81	<i>N. gonorrhoeae</i>	Lu <i>et al</i> ²³⁷	CS
4HUM	NorM-NG	Transportador en complejo con etidio	3.49	<i>N. gonorrhoeae</i>	Lu <i>et al</i> ²³⁷	ET
4HUN	NorM-NG	Transportador en complejo con rodamina	3.59	<i>N. gonorrhoeae</i>	Lu <i>et al</i> ²³⁷	RHQ
4LZ6	DinF-BH	Estructura del transportador DinF-BH	3.20	<i>H. halodurans</i>	Lu <i>et al</i> ²³⁸	-
4LZ9	DinF-BH	Transportador en complejo con rodamina	3.70	<i>H. halodurans</i>	Lu <i>et al</i> ²³⁸	RHQ
4Z3N	CibM	Exportador de colibactina	2.70	<i>E. coli</i>	Mousa <i>et al</i> ²³⁹	-
4Z3P	CibM	Exportador de colibactina	3.30	<i>E. coli</i>	Mousa <i>et al</i> ²³⁹	RB
5C6N	DinF-BH	Transportador en ausencia de verapamilo	3.00	<i>H. halodurans</i>	Radchenko <i>et al</i> ²²⁸	-

Tabla 5.2. Continuación

Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID de ligando
5C6O	DinF-BH	Transportador en complejo con verapamilo	3.00	<i>H. halodurans</i>	Radchenko <i>et al</i> ²²⁸	4YH
5C6P	Norm-NG	Transportador en complejo con verapamilo	3.00	<i>N. gonorrhoeae</i>	Radchenko <i>et al</i> ²²⁸	4YH
5T77	MurJ	Conformación abierta hacia el interior	2.00	<i>T. africanus</i>	Kuk <i>et al</i> ²⁴⁰	-
6FV6	Aq128	Conformación abierta hacia el exterior	3.80	<i>A. aeolicus</i> VF5	Zhao <i>et al</i> ^{NP}	-
6FV7	Aq128	Conformación abierta hacia el exterior	3.70	<i>A. aeolicus</i> VF5	Zhao <i>et al</i> ^{NP}	-
6FV8	Aq128	Conformación abierta hacia el exterior	3.00	<i>A. aeolicus</i> VF5	Zhao <i>et al</i> ^{NP}	-
6IDP	VcmN	Transportador en forma "recta"	2.21	<i>V. cholerae</i>	Kusakizako <i>et al</i> ²⁴¹	-
6IDR	VcmN	Transportador en forma "curva"	2.50	<i>V. cholerae</i>	Kusakizako <i>et al</i> ²⁴¹	-
6IDS	VcmN	Mutante D35N del transportador VcmN	2.79	<i>V. cholerae</i>	Kusakizako <i>et al</i> ²⁴¹	-
6NC6	MurJ	Flipasa de lípidos cerrada hacia el interior	3.20	<i>T. africanus</i>	Kuk <i>et al</i> ²⁴²	-
6NC7	MurJ	Flipasa de lípidos abierta hacia el interior	3.00	<i>T. africanus</i>	Kuk <i>et al</i> ²⁴²	-
6NC8	MurJ	Flipasa de lípidos ocluida hacia el interior	2.60	<i>T. africanus</i>	Kuk <i>et al</i> ²⁴²	-
6NC9	MurJ	Flipasa de lípidos abierta hacia el exterior	1.80	<i>T. africanus</i>	Kuk <i>et al</i> ²⁴²	-
6Z70	Aq128	Estado abierto hacia el exterior	2.00	<i>A. aeolicus</i> VF5	Zhao <i>et al</i> ²⁴³	-
6Z71	Aq128	Estado abierto hacia el exterior	3.50	<i>A. aeolicus</i> VF5	Zhao <i>et al</i> ²⁴³	-
7PHP	NorM	Conformación abierta hacia el exterior	3.47	<i>V. cholerae</i>	Bloch <i>et al</i> ²⁴⁴	-
7PHQ	ScaDMT	Transportador de metales divalentes	8.45	<i>S. capitis</i>	Bloch <i>et al</i> ²⁴⁴	-
7PIJ	ScaDMT	Transportador de metales divalentes	3.78	<i>S. capitis</i>	Bloch <i>et al</i> ²⁴⁴	-

Mientras que las estructuras reportadas de transportadores en complejo con rodamina y etidio son útiles para estudiar las interacciones que diferentes sustratos pueden establecer con los residuos que conforman las cavidades de unión, el verapamilo es un compuesto de interés farmacológico, al tratarse de un inhibidor de amplio espectro de transportadores de eflujo. En el caso de los transportadores MATE, este compuesto ejerce su efecto mediante la ocupación y bloqueo del sitio de unión de sustratos. Esta estructura permitió un primer acercamiento al estudio del mecanismo de inhibición en estos transportadores, un recurso útil en la búsqueda y el diseño de compuestos con potencial actividad inhibitoria.²²⁸

Cabe destacar que, aunque no han sido incluidas en la recopilación de estructuras de este capítulo (al no tratarse de un transportador bacteriano), el estudio de las estructuras reportadas de PfMATE (y otros transportadores homólogos, como aquellos presentes en organismos eucariotas) ha permitido obtener información importante sobre las características estructurales y funcionales de los miembros de esta familia de transportadores.^{6,231,245}

V.2.2. Sitios de unión de sustratos y mecanismo de eflujo

Las cavidades de unión de los transportadores MATE han sido descritas como cavidades relativamente grandes y flexibles, al igual que para el resto de los transportadores de múltiples antibióticos enunciados en este trabajo escrito. Las proteínas NorM (de *V. cholerae*) y DinF (de *B. halodurans*) poseen cavidades compuestas principalmente por residuos aromáticos e hidrofóbicos, además de algunos residuos polares y cargados, todos ellos importantes para establecer interacciones con diversos sustratos. Cabe destacar la importancia de la presencia de residuos ácidos en las cavidades de unión de estos transportadores para la unión de sustratos catiónicos y en eventos clave de protonación.⁶

No obstante, también se han identificado transportadores como NorM (de *N. gonorrhoeae*), cuyas cavidades de unión de sustratos contienen principalmente residuos polares y ácidos importantes para la unión de sustratos catiónicos mediante interacciones iónicas y de puentes de hidrógeno. Los sitios de unión con esta composición de aminoácidos se han reportado también en miembros de las familias ABC y MFS (Sav1866 y QacA, respectivamente) descritos en capítulos anteriores. Estas cavidades de unión también poseen una elevada flexibilidad que resulta importante para unir una gran variedad de sustratos catiónicos con características estructurales diferentes.⁶

En cuanto al mecanismo de eflujo de sustratos, los transportadores MATE utilizan la energía generada por el importe de protones o sodio hacia el interior celular. Aunque no se conoce la causa concreta de este fenómeno, se ha descrito a algunos transportadores como dependientes del importe de sodio (NorM-VP y NorM-GN), mientras que otros se han reportado como dependientes del importe de protones (DinF-BH, NorM-PS y VcmN), y otros como transportadores que pueden funcionar de manera indistinta gracias al importe de ambos iones (NorM-VC).^{6,231}

El mecanismo específico de transporte de los miembros de esta familia no se ha determinado detalladamente. No obstante, se ha propuesto que operan bajo un mecanismo de acceso alternante, en el que los transportadores adquieren de manera alternante y sucesiva dos conformaciones en las cuáles la cavidad de unión de sustratos se encuentra orientada (o abierta) hacia el interior o exterior de la membrana. Tampoco se ha determinado la manera en la que ocurre el acoplamiento de los procesos de traslocación de protones o cationes al interior celular y el eflujo de sustratos al exterior del citoplasma.^{228,231}

Considerando lo anterior, para los transportadores tipo DinF se ha propuesto que la protonación de un residuo que se encuentra en la hélice número 1 provoca la liberación de sustratos (previamente unidos) hacia el exterior del citoplasma en un proceso que no involucra cambios conformacionales significativos en la estructura del transportador. Por otro lado, se ha reportado para los transportadores tipo NorM-NG que la liberación de sustratos al exterior (como consecuencia del acoplamiento de sodio) involucra una serie de cambios conformacionales importantes en múltiples hélices del transportador.²²⁸

V.3. Transportadores de eflujo de la familia AbgT

La familia AbgT de transportadores está involucrada de manera importante en la síntesis de ácido fólico. Recibe su nombre debido a que el transportador más representativo de esta familia (y el primero en ser identificado) ha sido AbgT (de *E. coli*), cuya participación en la importación de *p*-aminobenzoil glutamato, precursor necesario para la síntesis de ácido fólico, ha sido ampliamente descrita. Es debido a ello que esta vía sintética (ausente en mamíferos) ha sido considerada para el diseño de compuestos con actividad antibacteriana, tales como las sulfonamidas.^{6,246,247}

Posteriormente se identificó a un segundo miembro de esta familia; el transportador MtrF de *N. gonorrhoeae*, asociado a niveles elevados de resistencia a antibióticos. Se reportó que MtrF confería resistencia ante sustancias hidrofóbicas, en cooperación con el complejo tricomponente MtrCDE, de la familia RND. Adicionalmente, se observó que MtrF no solo no participaba en la importación de *p*-aminobenzoil glutamato, sino que llevaba a cabo el eflujo de un metabolito derivado de este, el ácido *p*-aminobenzoico, pues su expresión se había asociado a una disminución de la síntesis de ácido fólico. Lo anterior llevó a la hipótesis de que MtrF participaba en el eflujo de sulfonamidas.^{6,247}

V.3.1. Recopilación de estructuras

En el año 2015 se reportaron las primeras estructuras de los miembros de esta familia. La primera estructura corresponde a MtrF; esto permitió refutar la hipótesis de que esta proteína era un componente adicional del complejo MtrCDE, ya que se determinó que MtrF era un transportador funcional independiente. Posteriormente fue reportada la estructura de YdaH de (*A. borkumensis*), cuya participación en el eflujo de ácido *p*-aminobenzoico y

sulfonamidas fue también observada, aunque de manera más eficiente que MtrF. Se ha propuesto que esto puede deberse a que YdaH funciona gracias al gradiente de sodio a través de la membrana, mientras que MtrF funciona gracias al gradiente de protones.^{6,246,248}

Tabla 5.3. Estructuras correspondientes a los transportadores de la familia AbgT, reportadas en el RCSB PDB

Código PDB	Proteína	Descripción asociada a la estructura	Resolución (Å)	Organismo	Referencia	ID de ligando
4R1I	MtrF	Transportador de eflujo de sulfonamidas	3.96	<i>N. gonorrhoeae</i>	Su <i>et al</i> ²⁴⁸	-
4R0C	YdaH	Determinación de la topología de YdaH	2.96	<i>A. borkumensis</i>	Bolla <i>et al</i> ²⁴⁶	-

V.3.2. Sitios de unión de sustratos

Poco se conoce acerca de la estructura y función de los transportadores AbgT en la actualidad, puesto que solo se ha llevado a cabo la caracterización parcial de algunos miembros de esta familia, siendo MtrF el transportador mejor caracterizado hasta el momento. Tanto MtrF como YdaH fueron reportados como dímeros en su conformación funcional; cada monómero está conformado por 9 hélices transmembranales. La estructura de los transportadores AbgT puede dividirse en un núcleo interno de naturaleza hidrofóbica (correspondiente a la interfaz entre ambos monómeros), y un núcleo externo conformado por los extremos laterales del dímero (**Figura 5.2**).^{6,246}

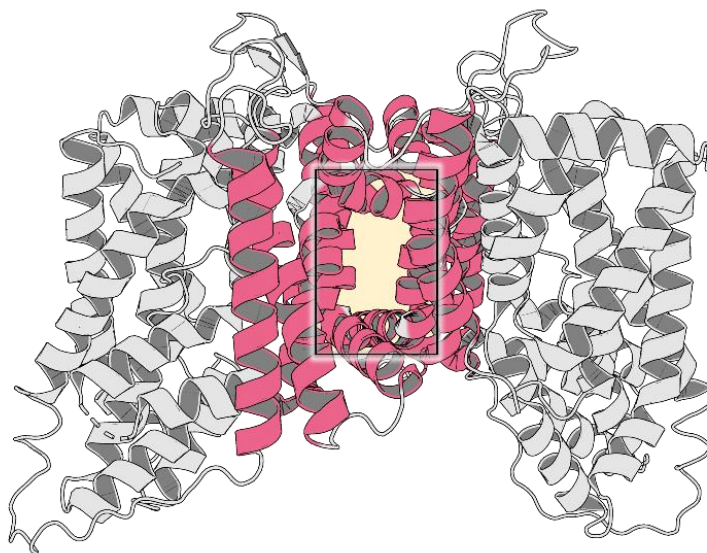


Figura 5.2. Localización propuesta de la cavidad de unión de sustratos de los transportadores AbgT (código PDB: 4R0C). Dicha cavidad (de carácter hidrofóbico), se encontraría en la interfaz del dímero funcional en el núcleo interno del transportador (recuadro negro). Figura elaborada con PyMOL.

Los datos estructurales disponibles sugieren que el canal de entrada de sustratos al transportador YdaH se encuentra en el núcleo interno, mientras que la región del núcleo externo forma dos estructuras cilíndricas (1 por cada protómero) que podrían fungir como una cavidad de unión de sustratos conectada al espacio periplásmico. La entrada de sustratos a esta cavidad tendría lugar gracias al canal formado por el núcleo interno, accesible desde el citoplasma.²⁴⁶

No hay información suficiente para describir el posible mecanismo de eflujo de los transportadores AbgT. No obstante, se han llevado a cabo estudios de dinámica molecular utilizando la información estructural disponible para evaluar las interacciones que el ácido *p*-aminobenzoico y la sulfametazina (sustratos de eflujo reportados) establecen con YdaH. Estos estudios representaron una primera aproximación para comprender las causas del reconocimiento multiespecífico de sustratos en los transportadores AbgT e identificar a los residuos involucrados en el acoplamiento de sodio durante el eflujo de sustratos.^{247,248}

V.4. Transportadores de eflujo de la familia PACE

La familia PACE fue descrita por primera vez en el año 2013, mediante la identificación del transportador Acel (de *A. baumannii*) tras el análisis de los posibles factores relacionados con la tolerancia a clorhexidina. La relación funcional entre Acel y la capacidad de eflujo de clorhexidina fue establecida gracias a la identificación de una mayor expresión del gen que codifica para Acel tras la exposición a una concentración sub inhibitoria de clorhexidina. Los transportadores PACE deben su nombre a que los genes que codifican para los miembros de esta familia se encuentran presentes en proteobacterias, aunque no se limitan a este tipo de microorganismos.^{6,249}

Se han identificado genes de transportadores homólogos de Acel en los genomas de patógenos como *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella* y *Burkholderia*. Aunque Acel demostró una relativa especificidad por la clorhexidina, la caracterización de transportadores homólogos demostró que algunos miembros de esta familia pueden tener un amplio rango de reconocimiento de sustratos. Aunque no hay información detallada sobre su importancia clínica, Acel ha sido asociado al eflujo de agentes antisépticos como benzalconio, decualinio, acriflavina, proflavina y clorhexidina, entre otros.^{6,249,250}

Múltiples aspectos de los miembros de esta familia son aún desconocidos. Aunque hasta el momento no se ha reportado la estructura tridimensional de ningún transportador PACE, se ha propuesto que son relativamente pequeños y presentan la misma organización estructural de 4 hélices transmembranales propia de los miembros de la familia SMR. Se ha propuesto que probablemente se encuentren como oligómeros, aunque no se cuenta con evidencia suficiente para esta aseveración. Tampoco hay información disponible sobre su mecanismo de transporte, pero se ha reportado que la traslocación de protones hacia el interior celular es requerida para el eflujo de sustratos.^{6,249}

Pese a que no se ha reportado la resistencia a antibióticos de uso clínico mediada por esta familia de transportadores, han sido clasificados como transportadores de resistencia a antibióticos en múltiples artículos de revisión. Ya que la presencia de estos transportadores se relaciona con la supervivencia ante agentes tóxicos en múltiples patógenos bacterianos de importancia clínica, el estudio estructural de esta nueva familia de transportadores y la identificación del perfil de reconocimiento de sustratos de sus miembros son dos aspectos importantes para determinar si esta familia tiene una relación directa con la resistencia a antibióticos.^{6,249,251}

Conclusiones

La recopilación de información estructural aquí presentada, producto de una búsqueda exhaustiva en la base de datos del RCSB PDB, es un recurso de consulta útil para la identificación de las estructuras disponibles de transportadores bacterianos relacionados con la resistencia a múltiples antibióticos pertenecientes a las familias RND, ABC, MFS, SMR, MATE, AbgT y PACE.

Mediante la revisión de una gran cantidad de artículos científicos, se llevó a cabo la búsqueda de la información más importante relacionada con las diferentes familias de transportadores de eflujo mencionadas, con énfasis en sus sitios de unión, principales sustratos y mecanismo de eflujo, incluyendo además las particularidades de estos aspectos que han sido identificadas para los miembros de algunas de estas familias.

Es posible obtener una gran cantidad de información de aquellas estructuras que se encuentran en complejo con diferentes sustratos; esto ha permitido mejorar la comprensión de los mecanismos implicados en el eflujo multiespecífico de antibióticos, el estudio de interacciones proteína-ligando y el descubrimiento de nuevas cavidades de unión.

Con base en la información recopilada, es importante destacar que los transportadores de eflujo bacterianos participan en diversos procesos fisiológicos además del eflujo de antibióticos, puesto que son esenciales para el transporte de sustratos generalmente involucrados en la supervivencia bacteriana.

Con base en las referencias consultadas, es posible establecer una relación directa entre el eflujo multiespecífico de antibióticos y la elevada flexibilidad estructural de los transportadores de eflujo bacterianos pertenecientes a las familias incluidas en este trabajo.

El estudio de los transportadores relacionados con la resistencia a múltiples antibióticos es de gran interés en la actualidad, puesto que representa un mecanismo de resistencia importante y es responsable de un aumento considerable en la CMI de diversos antibióticos, principalmente en bacterias patógenas.

Es de gran importancia orientar la investigación sobre los transportadores de eflujo al diseño de compuestos con potencial actividad inhibitoria. Esto representaría un recurso terapéutico útil para aumentar la efectividad de los principales antibióticos de uso clínico que han sido identificados como sustratos de los transportadores de eflujo bacterianos.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibióticos> (2020).
2. Barros, C. H. N., Fulaz, S., Stanisic, D. & Tasic, L. Biogenic nanosilver against multidrug-resistant bacteria (MDRB). *Antibiotics* **7**, 1–24 (2018).
3. O' Neill, J. Tackling drug-resistant infections globally. *Arch. Pharm. Pract.* **7**, 110 (2016).
4. Murray, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* **399**, 629–655 (2022).
5. C Reygaert, W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* **4**, 482–501 (2018).
6. Henderson, P. J. F. *et al.* Physiological Functions of Bacterial “Multidrug” Efflux Pumps. *Chem. Rev.* **121**, 5417–5478 (2021).
7. Alvarez-Ortega, C., Olivares, J. & Martínez, J. L. RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front. Microbiol.* **4**, (2013).
8. Du, D. *et al.* Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 523–539 (2018).
9. Ranaweera, I. *et al.* Structural comparison of bacterial multidrug efflux pumps of the major facilitator superfamily. *Trends cell Mol. Biol.* **10**, 131–140 (2015).
10. Rose, P; Prlić, A; Altunkaya, A; Bi, C; Bradley, A; Christie, C; Di Costanzo, L; Duarte, J. The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic Acids Res.* (2016) doi:10.1093/nar/gkw1000.
11. Nikaido, H. RND transporters in the living world. *Res. Microbiol.* **169**, 363–371 (2018).
12. Colclough, A. L. *et al.* RND efflux pumps in Gram-negative bacteria; Regulation, structure and role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* **15**, 143–157 (2020).
13. Eicher, T., Brandstätter, L. & Pos, K. M. Structural and functional aspects of the multidrug efflux pump AcrB. *Biol. Chem.* **390**, 693–699 (2009).
14. Blair, J. M. A. *et al.* Expression of homologous RND efflux pump genes is dependent upon AcrB expression: Implications for efflux and virulence inhibitor design. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 424–431 (2015).
15. Aron, Z. & Opperman, T. J. The hydrophobic trap—the Achilles heel of RND efflux pumps. *Res. Microbiol.* **169**, 393–400 (2018).
16. Du, D. *et al.* Interactions of a Bacterial RND Transporter with a Transmembrane Small Protein in a Lipid Environment. *Structure* **28**, 625-634.e6 (2020).

17. Chorev, D. S. & Robinson, C. V. "Protein assemblies ejected directly from native membranes yield complexes for mass spectrometry". *Science* (80-.). **366**, 829–834 (2019).
18. Athar, M. *et al.* Tripartite efflux pumps of the RND superfamily: what did we learn from computational studies? *Microbiology* **169**, (2023).
19. Du, D., van Veen, H. W. & Luisi, B. F. Assembly and operation of bacterial tripartite multidrug efflux pumps. *Trends Microbiol.* **23**, 311–319 (2015).
20. Wang, Z. *et al.* An allosteric transport mechanism for the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Elife* **6**, (2017).
21. Tsutsumi, K. *et al.* Structures of the wild-type MexAB–OprM tripartite pump reveal its complex formation and drug efflux mechanism. *Nat. Commun.* **10**, 1520 (2019).
22. Glavier, M. *et al.* Antibiotic export by MexB multidrug efflux transporter is allosterically controlled by a MexA–OprM chaperone-like complex. *Nat. Commun.* **11**, 4948 (2020).
23. Su, C.-C. *et al.* Crystal structure of the CusBA heavy-metal efflux complex of *Escherichia coli*. *Nature* **470**, 558–562 (2011).
24. Su, C.-C. *et al.* Charged Amino Acids (R83, E567, D617, E625, R669, and K678) of CusA Are Required for Metal Ion Transport in the Cus Efflux System. *J. Mol. Biol.* **422**, 429–441 (2012).
25. Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T. & Yamaguchi, A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* **443**, 173–179 (2006).
26. Seeger, M. A. *et al.* Structural Asymmetry of AcrB Trimer Suggests a Peristaltic Pump Mechanism. *Science* (80-.). **313**, 1295–1298 (2006).
27. Su, C.-C. *et al.* Conformation of the AcrB Multidrug Efflux Pump in Mutants of the Putative Proton Relay Pathway. *J. Bacteriol.* **188**, 7290–7296 (2006).
28. Das, D. *et al.* Crystal structure of the multidrug efflux transporter AcrB at 3.1 Å resolution reveals the N-terminal region with conserved amino acids. *J. Struct. Biol.* **158**, 494–502 (2007).
29. Sennhauser, G., Amstutz, P., Briand, C., Storchenegger, O. & Grütter, M. G. Drug Export Pathway of Multidrug Exporter AcrB Revealed by DARPIn Inhibitors. *PLoS Biol.* **5**, e7 (2006).
30. Törnroth-Horsefield, S. *et al.* Crystal Structure of AcrB in Complex with a Single Transmembrane Subunit Reveals Another Twist. *Structure* **15**, 1663–1673 (2007).
31. Sennhauser, G., Bukowska, M. A., Briand, C. & Grütter, M. G. Crystal Structure of the Multidrug Exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **389**, 134–145 (2009).
32. Nakashima, R., Sakurai, K., Yamasaki, S., Nishino, K. & Yamaguchi, A. Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature* **480**,

-
- 565–569 (2011).
33. Monroe, N., Sennhauser, G., Seeger, M. A., Briand, C. & Grütter, M. G. Designed ankyrin repeat protein binders for the crystallization of AcrB: Plasticity of the dominant interface. *J. Struct. Biol.* **174**, 269–281 (2011).
 34. Nakashima, R. *et al.* Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. *Nature* **500**, 102–106 (2013).
 35. Eicher, T. *et al.* Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 5687–5692 (2012).
 36. Pak, J. E. *et al.* Structures of intermediate transport states of ZneA, a Zn(II)/proton antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 18484–18489 (2013).
 37. Eicher, T. *et al.* Coupling of remote alternating-access transport mechanisms for protons and substrates in the multidrug efflux pump AcrB. *Elife* **3**, (2014).
 38. Ababou, A. & Koronakis, V. Structures of Gate Loop Variants of the AcrB Drug Efflux Pump Bound by Erythromycin Substrate. *PLoS One* **11**, e0159154 (2016).
 39. Sjuts, H. *et al.* Molecular basis for inhibition of AcrB multidrug efflux pump by novel and powerful pyranopyridine derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 3509–3514 (2016).
 40. Oswald, C., Tam, H.-K. & Pos, K. M. Transport of lipophilic carboxylates is mediated by transmembrane helix 2 in multidrug transporter AcrB. *Nat. Commun.* **7**, 13819 (2016).
 41. Su, C.-C. *et al.* Structures and transport dynamics of a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *Nat. Commun.* **8**, 171 (2017).
 42. Zwama, M. *et al.* Hoisting-Loop in Bacterial Multidrug Exporter AcrB Is a Highly Flexible Hinge That Enables the Large Motion of the Subdomains. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
 43. Qiu, W. *et al.* Structure and activity of lipid bilayer within a membrane-protein transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 12985–12990 (2018).
 44. Sakurai, K. *et al.* Crystal structures of multidrug efflux pump MexB bound with high-molecular-mass compounds. *Sci. Rep.* **9**, 4359 (2019).
 45. Su, C.-C. *et al.* Cryo-Electron Microscopy Structure of an *Acinetobacter baumannii* Multidrug Efflux Pump. *MBio* **10**, (2019).
 46. Tam, H.-K. *et al.* Binding and Transport of Carboxylated Drugs by the Multidrug Transporter AcrB. *J. Mol. Biol.* **432**, 861–877 (2020).
 47. Du, D. *et al.* Interactions of a Bacterial RND Transporter with a Transmembrane Small Protein in a Lipid Environment. *Structure* **28**, 625-634.e6 (2020).
 48. Fabre, L. *et al.* A “Drug Sweeping” State of the TriABC Triclosan Efflux Pump from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure* **29**, 261-274.e6 (2021).
 49. Lyu, M. *et al.* Cryo-EM Structures of a Gonococcal Multidrug Efflux Pump Illuminate a

- Mechanism of Drug Recognition and Resistance. *MBio* **11**, (2020).
50. Johnson, R. M. *et al.* Cryo-EM Structure and Molecular Dynamics Analysis of the Fluoroquinolone Resistant Mutant of the AcrB Transporter from Salmonella. *Microorganisms* **8**, 943 (2020).
 51. Tam, H.-K. *et al.* Allosteric drug transport mechanism of multidrug transporter AcrB. *Nat. Commun.* **12**, 3889 (2021).
 52. Higgins, A. J. *et al.* Cycloalkane-modified amphiphilic polymers provide direct extraction of membrane proteins for CryoEM analysis. *Commun. Biol.* **4**, 1337 (2021).
 53. Ornik-Cha, A. *et al.* Structural and functional analysis of the promiscuous AcrB and AdeB efflux pumps suggests different drug binding mechanisms. *Nat. Commun.* **12**, 6919 (2021).
 54. Bharatham, N. *et al.* Structure and function relationship of OqxB efflux pump from Klebsiella pneumoniae. *Nat. Commun.* **12**, 5400 (2021).
 55. Moseng, M. A. *et al.* Cryo-EM Structures of CusA Reveal a Mechanism of Metal-Ion Export. *MBio* **12**, (2021).
 56. Zhang, Z., Morgan, C. E., Bonomo, R. A. & Yu, E. W. Cryo-EM Determination of Eravacycline-Bound Structures of the Ribosome and the Multidrug Efflux Pump AdeJ of Acinetobacter baumannii. *MBio* **12**, (2021).
 57. Plé, C. *et al.* Pyridylpiperazine-based allosteric inhibitors of RND-type multidrug efflux pumps. *Nat. Commun.* **13**, 115 (2022).
 58. Morgan, C. E., Zhang, Z., Bonomo, R. A. & Yu, E. W. An Analysis of the Novel Fluorocycline TP-6076 Bound to Both the Ribosome and Multidrug Efflux Pump AdeJ from Acinetobacter baumannii. *MBio* **13**, (2022).
 59. Lyu, M. *et al.* Structural Basis of Peptide-Based Antimicrobial Inhibition of a Resistance-Nodulation-Cell Division Multidrug Efflux Pump. *Microbiol. Spectr.* **10**, (2022).
 60. Zhang, Z., Morgan, C. E., Cui, M. & Yu, E. W. Cryo-EM Structures of AcrD Illuminate a Mechanism for Capturing Aminoglycosides from Its Central Cavity. *MBio* **14**, (2023).
 61. Zhang, Z., Morgan, C. E., Bonomo, R. A. & Yu, E. W. Cryo-EM Structures of the Klebsiella pneumoniae AcrB Multidrug Efflux Pump. *MBio* (2023) doi:10.1128/mbio.00659-23.
 62. Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. & Yamaguchi, A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**, 587–593 (2002).
 63. Yu, E. W., McDermott, G., Zgurskaya, H. I., Nikaido, H. & Koshland, D. E. Structural Basis of Multiple Drug-Binding Capacity of the AcrB Multidrug Efflux Pump. *Science* (80-.). **300**, 976–980 (2003).
 64. Yu, E. W., Aires, J. R., McDermott, G. & Nikaido, H. A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: A crystallographic and site-directed mutagenesis study. *J. Bacteriol.* **187**, 6804–6815 (2005).

65. Drew, D. *et al.* The structure of the efflux pump AcrB in complex with bile acid. *Mol. Membr. Biol.* **25**, 677–682 (2008).
66. Veessler, D., Blangy, S., Cambillau, C. & Sciara, G. There is a baby in the bath water: AcrB contamination is a major problem in membrane-protein crystallization. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **64**, 880–885 (2008).
67. Long, F. *et al.* Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methionine-mediated metal transport. *Nature* **467**, 484–488 (2010).
68. Du, D. *et al.* Structure of the AcrAB–TolC multidrug efflux pump. *Nature* **509**, 512–515 (2014).
69. Hung, L.-W. *et al.* Crystal structure of AcrB complexed with linezolid at 3.5 Å resolution. *J. Struct. Funct. Genomics* **14**, 71–75 (2013).
70. Lei, H.-T. *et al.* Crystal Structure of the Open State of the Neisseria gonorrhoeae MtrE Outer Membrane Channel. *PLoS One* **9**, e97475 (2014).
71. Kumar, N. *et al.* Crystal structures of the Burkholderia multivorans hopanoid transporter HpnN. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 6557–6562 (2017).
72. Zhang, B. *et al.* Crystal Structures of Membrane Transporter MmpL3, an Anti-TB Drug Target. *Cell* **176**, 636-648.e13 (2019).
73. Su, C.-C. *et al.* MmpL3 is a lipid transporter that binds trehalose monomycolate and phosphatidylethanolamine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 11241–11246 (2019).
74. Su, C.-C. *et al.* A ‘Build and Retrieve’ methodology to simultaneously solve cryo-EM structures of membrane proteins. *Nat. Methods* **18**, 69–75 (2021).
75. Yang, X. *et al.* Structural Basis for the Inhibition of Mycobacterial MmpL3 by NITD-349 and SPIRO. *J. Mol. Biol.* **432**, 4426–4434 (2020).
76. Su, C.-C. *et al.* Structures of the mycobacterial membrane protein MmpL3 reveal its mechanism of lipid transport. *PLOS Biol.* **19**, e3001370 (2021).
77. Adams, O. *et al.* Cryo-EM structure and resistance landscape of M. tuberculosis MmpL3: An emergent therapeutic target. *Structure* **29**, 1182-1191.e4 (2021).
78. Mikolosko, J., Bobyk, K., Zgurskaya, H. I. & Ghosh, P. Conformational Flexibility in the Multidrug Efflux System Protein AcrA. *Structure* **14**, 577–587 (2006).
79. Su, C.-C. *et al.* Crystal Structure of the Membrane Fusion Protein CusB from Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **393**, 342–355 (2009).
80. Xu, Y. *et al.* Assembly and Channel Opening of Outer Membrane Protein in Tripartite Drug Efflux Pumps of Gram-negative Bacteria. *J. Biol. Chem.* **287**, 11740–11750 (2012).
81. Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. & Hughes, C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**, 914–919 (2000).

82. Higgins, M. K. *et al.* Structure of the Ligand-blocked Periplasmic Entrance of the Bacterial Multidrug Efflux Protein TolC. *J. Mol. Biol.* **342**, 697–702 (2004).
83. Bavro, V. N. *et al.* Assembly and Channel Opening in a Bacterial Drug Efflux Machine. *Mol. Cell* **30**, 114–121 (2008).
84. Pei, X.-Y. *et al.* Structures of sequential open states in a symmetrical opening transition of the TolC exit duct. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 2112–2117 (2011).
85. Phan, G. *et al.* Structural and Dynamical Insights into the Opening Mechanism of *P. aeruginosa* OprM Channel. *Structure* **18**, 507–517 (2010).
86. Su, C.-C. *et al.* Crystal structure of the *Campylobacter jejuni* CmeC outer membrane channel. *Protein Sci.* **23**, 954–961 (2014).
87. Monlezun, L. *et al.* New OprM structure highlighting the nature of the N-terminal anchor. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
88. Yonehara, R., Yamashita, E. & Nakagawa, A. Crystal structures of OprN and OprJ, outer membrane factors of multidrug tripartite efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **84**, 759–769 (2016).
89. Ntsogo Enguéné, Y. V. *et al.* Xenon for tunnelling analysis of the efflux pump component OprN. *PLoS One* **12**, e0184045 (2017).
90. Budiardjo, S. J. *et al.* Colicin E1 opens its hinge to plug TolC. *Elife* **11**, (2022).
91. Akama, H. *et al.* Crystal Structure of the Drug Discharge Outer Membrane Protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **279**, 52816–52819 (2004).
92. Federici, L. *et al.* The Crystal Structure of the Outer Membrane Protein VceC from the Bacterial Pathogen *Vibrio cholerae* at 1.8 Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **280**, 15307–15314 (2005).
93. Kulathila, R., Kulathila, R., Indic, M. & van den Berg, B. Crystal Structure of *Escherichia coli* CusC, the Outer Membrane Component of a Heavy Metal Efflux Pump. *PLoS One* **6**, e15610 (2011).
94. Lei, H.-T., Bolla, J. R., Bishop, N. R., Su, C.-C. & Yu, E. W. Crystal Structures of CusC Review Conformational Changes Accompanying Folding and Transmembrane Channel Formation. *J. Mol. Biol.* **426**, 403–411 (2014).
95. Nakashima, R. *et al.* Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. *Nature* **500**, 102–106 (2013).
96. Henderson, P. J. F. *et al.* Physiological Functions of Bacterial ‘multidrug’ Efflux Pumps. *Chem. Rev.* **121**, 5417–5478 (2021).
97. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1074–D1082 (2018).
98. Treviño, Natalia P. | Molina, N. B. Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana. *Fac. Ciencias Médicas* (2022).

99. Errecalde, J. O. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. (2004).
100. Seija, V., & Vignoli, R. Principales grupos de antibióticos. *Temas Bacteriol. y Virol. médica* 631–647 (2006).
101. Seifert, H., Stefanik, D., Olesky, M. & Higgins, P. G. In vitro activity of the novel fluorocycline TP-6076 against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **55**, 105829 (2020).
102. Sjuts, H. *et al.* Molecular basis for inhibition of AcrB multidrug efflux pump by novel and powerful pyranopyridine derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 3509–3514 (2016).
103. Zuo, Z., Weng, J. & Wang, W. Insights into the Inhibitory Mechanism of D13-9001 to the Multidrug Transporter AcrB through Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B* **120**, 2145–2154 (2016).
104. Zhang, B. *et al.* Crystal Structures of Membrane Transporter MmpL3, an Anti-TB Drug Target. *Cell* **176**, 636-648.e13 (2019).
105. Yang, X. *et al.* Structural Basis for the Inhibition of Mycobacterial MmpL3 by NITD-349 and SPIRO. *J. Mol. Biol.* **432**, 4426–4434 (2020).
106. Plé, C. *et al.* Pyridylpiperazine-based allosteric inhibitors of RND-type multidrug efflux pumps. *Nat. Commun.* **13**, 1–11 (2022).
107. Webber, A., Ratnaweera, M., Harris, A., Luisi, B. F. & Enguéné, V. Y. N. A Model for Allosteric Communication in Drug Transport by the AcrAB-TolC Tripartite Efflux Pump. *Antibiotics* **11**, (2022).
108. Lawrence, R. C., Subramaniapillai, S. G., Ulaganathan, V. & Nagarajan, S. Tackling drug resistance with efflux pump inhibitors: from bacteria to cancerous cells. *Crit. Rev. Microbiol.* **45**, 334–353 (2019).
109. Bilsing, F. L., Anlauf, M. T., Hachani, E., Khosa, S. & Schmitt, L. ABC Transporters in Bacterial Nanomachineries. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 6227 (2023).
110. Modi, A. *et al.* ABC transporters in breast cancer: their roles in multidrug resistance and beyond. *J. Drug Target.* **30**, 927–947 (2022).
111. El-Awady, R. *et al.* The role of eukaryotic and prokaryotic ABC transporter family in failure of chemotherapy. *Front. Pharmacol.* **7**, 1–15 (2017).
112. van Veen, H. W. *et al.* A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature* **391**, 291–295 (1998).
113. Dawson, R. J. P. & Locher, K. P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **443**, 180–185 (2006).
114. Dawson, R. J. P. & Locher, K. P. Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *S. aureus* in complex with AMP-PNP. *FEBS Lett.* **581**, 935–938 (2007).

115. Lin, H. T. *et al.* MacB ABC Transporter Is a Dimer Whose ATPase Activity and Macrolide-binding Capacity Are Regulated by the Membrane Fusion Protein MacA. *J. Biol. Chem.* **284**, 1145–1154 (2009).
116. Yamanaka, H., Kobayashi, H., Takahashi, E. & Okamoto, K. MacAB Is Involved in the Secretion of Escherichia coli Heat-Stable Enterotoxin II. *J. Bacteriol.* **190**, 7693–7698 (2008).
117. Nishino, K., Latifi, T. & Groisman, E. A. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **59**, 126–141 (2006).
118. Imperi, F., Tiburzi, F. & Visca, P. Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in Pseudomonas aeruginosa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 20440–20445 (2009).
119. Okada, U. *et al.* Crystal structure of tripartite-type ABC transporter MacB from Acinetobacter baumannii. *Nat. Commun.* **8**, 1336 (2017).
120. Fitzpatrick, A. W. P. *et al.* Structure of the MacAB–TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. *Nat. Microbiol.* **2**, 17070 (2017).
121. Lin, H.-T. V. *et al.* The Vibrio cholerae var regulon encodes a metallo- β -lactamase and an antibiotic efflux pump, which are regulated by VarR, a LysR-type transcription factor. *PLoS One* **12**, e0184255 (2017).
122. Tikhonova, E. B., Devroy, V. K., Lau, S. Y. & Zgurskaya, H. I. Reconstitution of the Escherichia coli macrolide transporter: the periplasmic membrane fusion protein MacA stimulates the ATPase activity of MacB. *Mol. Microbiol.* **63**, (2007).
123. Greene, N. P., Kaplan, E., Crow, A. & Koronakis, V. Antibiotic Resistance Mediated by the MacB ABC Transporter Family: A Structural and Functional Perspective. *Front. Microbiol.* **9**, (2018).
124. Ward, A., Reyes, C. L., Yu, J., Roth, C. B. & Chang, G. Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 19005–19010 (2007).
125. Xu, Y. *et al.* Crystal Structure of the Periplasmic Region of MacB, a Noncanonic ABC Transporter ,. *Biochemistry* **48**, 5218–5225 (2009).
126. Ishii, S., Yano, T., Okamoto, A., Murakawa, T. & Hayashi, H. Boundary of the Nucleotide-Binding Domain of Streptococcus ComA Based on Functional and Structural Analysis. *Biochemistry* **52**, 2545–2555 (2013).
127. Ilari, A. *et al.* Salmonella enterica serovar Typhimurium growth is inhibited by the concomitant binding of Zn(II) and a pyrrolyl-hydroxamate to ZnuA, the soluble component of the ZnuABC transporter. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1860**, 534–541 (2016).
128. Lee, J. Y., Yang, J. G., Zhitnitsky, D., Lewinson, O. & Rees, D. C. Structural Basis for Heavy Metal Detoxification by an Atm1-Type ABC Exporter. *Science (80-.)*. **343**, 1133–1136 (2014).
129. Choudhury, H. G. *et al.* Structure of an antibacterial peptide ATP-binding cassette

- transporter in a novel outward occluded state. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 9145–9150 (2014).
130. Mehmood, S. *et al.* Structural and Functional Basis for Lipid Synergy on the Activity of the Antibacterial Peptide ABC Transporter McjD. *J. Biol. Chem.* **291**, 21656–21668 (2016).
 131. Crow, A., Greene, N. P., Kaplan, E. & Koronakis, V. Structure and mechanotransmission mechanism of the MacB ABC transporter superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 12572–12577 (2017).
 132. Perez, C. *et al.* Structural basis of inhibition of lipid-linked oligosaccharide flippase PglK by a conformational nanobody. *Sci. Rep.* **7**, 46641 (2017).
 133. Bountra, K. *et al.* Structural basis for antibacterial peptide self-immunity by the bacterial ABC transporter McjD. *EMBO J.* **36**, 3062–3079 (2017).
 134. Mi, W. *et al.* Structural basis of MsbA-mediated lipopolysaccharide transport. *Nature* **549**, 233–237 (2017).
 135. Luo, Q. *et al.* Structural basis for lipopolysaccharide extraction by ABC transporter LptB2FG. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 469–474 (2017).
 136. Yang, H.-B. *et al.* Structure of a MacAB-like efflux pump from *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Commun.* **9**, 196 (2018).
 137. Ho, H. *et al.* Structural basis for dual-mode inhibition of the ABC transporter MsbA. *Nature* **557**, 196–201 (2018).
 138. Fan, C., Kaiser, J. T. & Rees, D. C. A structural framework for unidirectional transport by a bacterial ABC exporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 19228–19236 (2020).
 139. Chaptal, V. *et al.* Substrate-bound and substrate-free outward-facing structures of a multidrug ABC exporter. *Sci. Adv.* **8**, (2022).
 140. Hofmann, S. *et al.* Conformation space of a heterodimeric ABC exporter under turnover conditions. *Nature* **571**, 580–583 (2019).
 141. Angiulli, G. *et al.* New approach for membrane protein reconstitution into peptidiscs and basis for their adaptability to different proteins. *Elife* **9**, (2020).
 142. Zeytuni, N. *et al.* Structural insight into the *S. aureus* ATP-driven exporter of virulent peptide toxins. *Sci. Adv.* **6**, (2020).
 143. Tang, X. *et al.* Structural basis for bacterial lipoprotein relocation by the transporter LolCDE. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **28**, 347–355 (2021).
 144. Kehlenbeck, D. *et al.* Cryo-EM structure of MsbA in saposin-lipid nanoparticles (Salipro) provides insights into nucleotide coordination. *FEBS J.* **289**, 2959–2970 (2022).
 145. Chi, X. *et al.* Structural mechanism of phospholipids translocation by MlaFEDB complex. *Cell Res.* **30**, 1127–1135 (2020).

146. Thaker, T. M. *et al.* Asymmetric drug binding in an ATP-loaded inward-facing state of an ABC transporter. *Nat. Chem. Biol.* **18**, 226–235 (2022).
147. Sharma, S. *et al.* Mechanism of LolCDE as a molecular extruder of bacterial triacylated lipoproteins. *Nat. Commun.* **12**, 4687 (2021).
148. Thélot, F. A. *et al.* Distinct allosteric mechanisms of first-generation MsbA inhibitors. *Science (80-.)*. **374**, 580–585 (2021).
149. Galazzo, L. *et al.* The ABC transporter MsbA adopts the wide inward-open conformation in *E. coli* cells. *Sci. Adv.* **8**, (2022).
150. Verma, V. A. *et al.* Discovery of Inhibitors of the Lipopolysaccharide Transporter MsbA: From a Screening Hit to Potent Wild-Type Gram-Negative Activity. *J. Med. Chem.* **65**, 4085–4120 (2022).
151. Kieuvongngam, V. & Chen, J. Structures of the peptidase-containing ABC transporter PCAT1 under equilibrium and nonequilibrium conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **119**, (2022).
152. Nakamura, H. *et al.* Structural basis for heme detoxification by an ATP-binding cassette-type efflux pump in gram-positive pathogenic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **119**, (2022).
153. Sedzicki, J. *et al.* Mechanism of cyclic β -glucan export by ABC transporter Cgt of *Brucella*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **29**, 1170–1177 (2022).
154. Spellmon, N. *et al.* Molecular basis for polysaccharide recognition and modulated ATP hydrolysis by the O antigen ABC transporter. *Nat. Commun.* **13**, 5226 (2022).
155. Lyu, J. *et al.* Structural basis for lipid and copper regulation of the ABC transporter MsbA. *Nat. Commun.* **13**, 7291 (2022).
156. Schmitt, L., Benabdelhak, H., Blight, M. A., Holland, I. B. & Stubbs, M. T. Crystal Structure of the Nucleotide-binding Domain of the ABC-transporter Haemolysin B: Identification of a Variable Region Within ABC Helical Domains. *J. Mol. Biol.* **330**, 333–342 (2003).
157. Zaitseva, J., Jenewein, S., Jumpertz, T., Holland, I. B. & Schmitt, L. H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *EMBO J.* **24**, 1901–1910 (2005).
158. Zaitseva, J. *et al.* A structural analysis of asymmetry required for catalytic activity of an ABC-ATPase domain dimer. *EMBO J.* **25**, 3432–3443 (2006).
159. Oswald, C., Jenewein, S., Smits, S. H. J., Holland, I. B. & Schmitt, L. Water-mediated protein–fluorophore interactions modulate the affinity of an ABC-ATPase/TNP–ADP complex. *J. Struct. Biol.* **162**, 85–93 (2008).
160. Sherman, D. J. *et al.* Decoupling catalytic activity from biological function of the ATPase that powers lipopolysaccharide transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 4982–4987 (2014).
161. Wang, Z. *et al.* Structural and functional studies of conserved nucleotide-binding protein

- LptB in lipopolysaccharide transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452**, 443–449 (2014).
162. Xu, Y. *et al.* The Crystal Structure of the YknZ Extracellular Domain of ABC Transporter YknWXYZ from *Bacillus amyloliquefaciens*. *PLoS One* **11**, e0155846 (2016).
 163. Mann, E., Mallette, E., Clarke, B. R., Kimber, M. S. & Whitfield, C. The *Klebsiella pneumoniae* O12 ATP-binding Cassette (ABC) Transporter Recognizes the Terminal Residue of Its O-antigen Polysaccharide Substrate. *J. Biol. Chem.* **291**, 9748–9761 (2016).
 164. Dong, H., Zhang, Z., Tang, X., Paterson, N. G. & Dong, C. Structural and functional insights into the lipopolysaccharide ABC transporter LptB2FG. *Nat. Commun.* **8**, 222 (2017).
 165. Bao, Z. *et al.* Structure and mechanism of a group-I cobalt energy coupling factor transporter. *Cell Res.* **27**, 675–687 (2017).
 166. Zhang, Q. *et al.* Discovery of the first macrolide antibiotic binding protein in *Mycobacterium tuberculosis*: a new antibiotic resistance drug target. *Protein Cell* **9**, 971–975 (2018).
 167. Bi, Y., Mann, E., Whitfield, C. & Zimmer, J. Architecture of a channel-forming O-antigen polysaccharide ABC transporter. *Nature* **553**, 361–365 (2018).
 168. May, J. M. *et al.* The Antibiotic Novobiocin Binds and Activates the ATPase That Powers Lipopolysaccharide Transport. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 17221–17224 (2017).
 169. Padayatti, P. S. *et al.* Structural Insights into the Lipid A Transport Pathway in MsbA. *Structure* **27**, 1114-1123.e3 (2019).
 170. Chen, L. *et al.* Cryo-electron Microscopy Structure and Transport Mechanism of a Wall Teichoic Acid ABC Transporter. *MBio* **11**, (2020).
 171. Caffalette, C. A., Corey, R. A., Sansom, M. S. P., Stansfeld, P. J. & Zimmer, J. A lipid gating mechanism for the channel-forming O antigen ABC transporter. *Nat. Commun.* **10**, 824 (2019).
 172. Simpson, B. W. *et al.* Combining Mutations That Inhibit Two Distinct Steps of the ATP Hydrolysis Cycle Restores Wild-Type Function in the Lipopolysaccharide Transporter and Shows that ATP Binding Triggers Transport. *MBio* **10**, (2019).
 173. Li, Y., Orlando, B. J. & Liao, M. Structural basis of lipopolysaccharide extraction by the LptB2FGC complex. *Nature* **567**, 486–490 (2019).
 174. Bi, Y. & Zimmer, J. Structure and Ligand-Binding Properties of the O Antigen ABC Transporter Carbohydrate-Binding Domain. *Structure* **28**, 252-258.e2 (2020).
 175. Tang, X. *et al.* Cryo-EM structures of lipopolysaccharide transporter LptB2FGC in lipopolysaccharide or AMP-PNP-bound states reveal its transport mechanism. *Nat. Commun.* **10**, 4175 (2019).
 176. Yang, C.-S. *et al.* Crystal structure of the N-terminal domain of TagH reveals a potential

- drug targeting site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **536**, 1–6 (2021).
177. Li, J. *et al.* Structures of the CcmABCD heme release complex at multiple states. *Nat. Commun.* **13**, 6422 (2022).
 178. Zhao, H., Lee, J. & Chen, J. The hemolysin A secretion system is a multi-engine pump containing three ABC transporters. *Cell* **185**, 3329–3340.e13 (2022).
 179. George, N. L., Schillmiller, A. L. & Orlando, B. J. Conformational snapshots of the bacitracin sensing and resistance transporter BceAB. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **119**, (2022).
 180. Yum, S. *et al.* Crystal Structure of the Periplasmic Component of a Tripartite Macrolide-Specific Efflux Pump. *J. Mol. Biol.* **387**, 1286–1297 (2009).
 181. Lewis, V. G., Ween, M. P. & McDevitt, C. A. The role of ATP-binding cassette transporters in bacterial pathogenicity. *Protoplasma* **249**, 919–942 (2012).
 182. Schindler, B. D. & Kaatz, G. W. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug Resist. Updat.* **27**, 1–13 (2016).
 183. *Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria*. (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-39658-3.
 184. Chufan, E. E., Sim, H.-M. & Ambudkar, S. V. Molecular Basis of the Polyspecificity of P-Glycoprotein (ABCB1). in 71–96 (2015). doi:10.1016/bs.acr.2014.10.003.
 185. Pan, L. & Aller, S. G. Equilibrated Atomic Models of Outward-Facing P-glycoprotein and Effect of ATP Binding on Structural Dynamics. *Sci. Rep.* **5**, 7880 (2015).
 186. Alam, A., Kowal, J., Broude, E., Roninson, I. & Locher, K. P. Structural insight into substrate and inhibitor discrimination by human P-glycoprotein. *Science (80-.).* **363**, 753–756 (2019).
 187. Kondratov, R. V., Komarov, P. G., Becker, Y., Ewenson, A. & Gudkov, A. V. Small molecules that dramatically alter multidrug resistance phenotype by modulating the substrate specificity of P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 14078–14083 (2001).
 188. Müller, H. *et al.* New functional assay of P-glycoprotein activity using Hoechst 33342. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 7470–7479 (2007).
 189. Davidson, A. L. & Chen, J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 241–268 (2004).
 190. Sachdeva, S., Palur, R. V., Sudhakar, K. U. & Rathinavelan, T. E. coli group 1 capsular polysaccharide exportation nanomachinery as a plausible antivirulence target in the perspective of emerging antimicrobial resistance. *Front. Microbiol.* **8**, 1–19 (2017).
 191. Garcia, Í. R. *et al.* Microbial resistance: The role of efflux pump superfamilies and their respective substrates. *Life Sci.* **295**, 120391 (2022).
 192. Akhtar, A. A. & Turner, D. P. The role of bacterial ATP-binding cassette (ABC) transporters in pathogenesis and virulence: Therapeutic and vaccine potential. *Microb.*

-
- Pathog.* **171**, 105734 (2022).
193. Handzlik, J., Matys, A. & Kieć-Kononowicz, K. Recent Advances in Multi-Drug Resistance (MDR) Efflux Pump Inhibitors of Gram-Positive Bacteria *S. aureus*. *Antibiotics* **2**, 28–45 (2013).
 194. Lubelski, J., Konings, W. N. & Driessen, A. J. M. Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 463–476 (2007).
 195. Pasqua *et al.* The Varied Role of Efflux Pumps of the MFS Family in the Interplay of Bacteria with Animal and Plant Cells. *Microorganisms* **7**, 285 (2019).
 196. Piddock, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps ? not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 629–636 (2006).
 197. Lin, M.-F., Lin, Y.-Y. & Lan, C.-Y. Contribution of EmrAB efflux pumps to colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Microbiol.* **55**, 130–136 (2017).
 198. Piddock, L. J. V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 382–402 (2006).
 199. El-Awady, R. *et al.* The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy. *Front. Pharmacol.* **7**, (2017).
 200. Yousefian, N. *et al.* Structural characterization of the EmrAB-TolC efflux complex from *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1863**, 183488 (2021).
 201. Yin, Y., He, X., Szewczyk, P., Nguyen, T. & Chang, G. Structure of the Multidrug Transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science (80-.)*. **312**, 741–744 (2006).
 202. Heng, J. *et al.* Substrate-bound structure of the *E. coli* multidrug resistance transporter MdfA. *Cell Res.* **25**, 1060–1073 (2015).
 203. Zomot, E. *et al.* A New Critical Conformational Determinant of Multidrug Efflux by an MFS Transporter. *J. Mol. Biol.* **430**, 1368–1385 (2018).
 204. Nagarathinam, K. *et al.* Outward open conformation of a Major Facilitator Superfamily multidrug/H⁺ antiporter provides insights into switching mechanism. *Nat. Commun.* **9**, 4005 (2018).
 205. Wu, H.-H., Symersky, J. & Lu, M. Structure of an engineered multidrug transporter MdfA reveals the molecular basis for substrate recognition. *Commun. Biol.* **2**, 210 (2019).
 206. Debruycker, V. *et al.* An embedded lipid in the multidrug transporter LmrP suggests a mechanism for polyspecificity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **27**, 829–835 (2020).
 207. Wu, H.-H., Symersky, J. & Lu, M. Structure and mechanism of a redesigned multidrug transporter from the Major Facilitator Superfamily. *Sci. Rep.* **10**, 3949 (2020).
 208. Kumar, S. *et al.* Structural basis of inhibition of a transporter from *S. aureus*, NorC, through a single-domain camelid antibody. *Commun. Biol.* **4**, 836 (2021).

209. Brawley, D. N. *et al.* Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from *S. aureus*. *Nat. Chem. Biol.* **18**, 706–712 (2022).
210. Hinchliffe, P. *et al.* Structure of the periplasmic adaptor protein from a major facilitator superfamily (MFS) multidrug efflux pump. *FEBS Lett.* **588**, 3147–3153 (2014).
211. Yardeni, E. H., Zomot, E. & Bibi, E. The fascinating but mysterious mechanistic aspects of multidrug transport by MdfA from *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **169**, 455–460 (2018).
212. Mitchell, B. A., Brown, M. H. & Skurray, R. A. QacA Multidrug Efflux Pump from *S. aureus*: Comparative Analysis of Resistance to Diamidines, Biguanidines, and Guanylhydrazones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 475–477 (1998).
213. Kumar, S., Mukherjee, M. M. & Varela, M. F. Modulation of Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily. *Int. J. Bacteriol.* **2013**, (2013).
214. Varela, M. F., Stephen, J., Bharti, D., Lekshmi, M. & Kumar, S. Inhibition of Multidrug Efflux Pumps Belonging to the Major Facilitator Superfamily in Bacterial Pathogens. *Biomedicines* **11**, 1448 (2023).
215. Drew, D., North, R. A., Nagarathinam, K. & Tanabe, M. Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS). *Chem. Rev.* **121**, 5289–5335 (2021).
216. Mitchell, C. J., Nguyen, K. M. & Deber, C. M. Toward a broad-spectrum peptide-based inhibitor of small multidrug resistance efflux pumps. *Pept. Sci.* (2023) doi:10.1002/pep2.24327.
217. Burata, O. E., Yeh, T. J., Macdonald, C. B. & Stockbridge, R. B. Still rocking in the structural era: A molecular overview of the small multidrug resistance (SMR) transporter family. *J. Biol. Chem.* **298**, 102482 (2022).
218. Kermani, A. A. *et al.* The structural basis of promiscuity in small multidrug resistance transporters. *Nat. Commun.* **11**, 6064 (2020).
219. Bay, D. C., Rommens, K. L. & Turner, R. J. Small multidrug resistance proteins: A multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**, 1814–1838 (2008).
220. Nasie, I., Steiner-Mordoch, S. & Schuldiner, S. New Substrates on the Block: Clinically Relevant Resistances for EmrE and Homologues. *J. Bacteriol.* **194**, 6766–6770 (2012).
221. Shcherbakov, A. A. *et al.* Structure and dynamics of the drug-bound bacterial transporter EmrE in lipid bilayers. *Nat. Commun.* **12**, 172 (2021).
222. Fleishman, S. J. *et al.* Quasi-symmetry in the Cryo-EM Structure of EmrE Provides the Key to Modeling its Transmembrane Domain. *J. Mol. Biol.* **364**, 54–67 (2006).
223. Chen, Y.-J. *et al.* X-ray structure of EmrE supports dual topology model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 18999–19004 (2007).

224. Kermani, A. A. *et al.* Crystal structures of bacterial small multidrug resistance transporter EmrE in complex with structurally diverse substrates. *Elife* **11**, (2022).
225. Shcherbakov, A. A., Spreacker, P. J., Dregni, A. J., Henzler-Wildman, K. A. & Hong, M. High-pH structure of EmrE reveals the mechanism of proton-coupled substrate transport. *Nat. Commun.* **13**, 991 (2022).
226. Dey, S. *et al.* All-atoms molecular dynamics study to screen potent efflux pump inhibitors against KpnE protein of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1–15 (2023) doi:10.1080/07391102.2023.2214232.
227. Saleh, M., Bay, D. C. & Turner, R. J. Few Conserved Amino Acids in the Small Multidrug Resistance Transporter EmrE Influence Drug Polyselectivity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2018).
228. Radchenko, M., Symersky, J., Nie, R. & Lu, M. Structural basis for the blockade of MATE multidrug efflux pumps. *Nat. Commun.* **6**, 7995 (2015).
229. Kuroda, T. & Tsuchiya, T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1794**, 763–768 (2009).
230. Sharma, S., Kaushik, V., Kulshrestha, M. & Tiwari, V. Different Efflux Pump Systems in *Acinetobacter baumannii* and Their Role in Multidrug Resistance. in 155–168 (2023). doi:10.1007/5584_2023_771.
231. Castellano, S. *et al.* Conserved binding site in the N-lobe of prokaryotic MATE transporters suggests a role for Na⁺ in ion-coupled drug efflux. *J. Biol. Chem.* **296**, 100262 (2021).
232. Su, X.-Z., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T. & Tsuchiya, T. AbeM, an H⁺-Coupled *Acinetobacter baumannii* Multidrug Efflux Pump Belonging to the MATE Family of Transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 4362–4364 (2005).
233. Long, F., Rouquette-Loughlin, C., Shafer, W. M. & Yu, E. W. Functional Cloning and Characterization of the Multidrug Efflux Pumps NorM from *Neisseria gonorrhoeae* and YdhE from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3052–3060 (2008).
234. Burse, A., Weingart, H. & Ullrich, M. S. NorM, an *Erwinia amylovora* Multidrug Efflux Pump Involved in In Vitro Competition with Other Epiphytic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 693–703 (2004).
235. Xu, X.-J. *et al.* Molecular Cloning and Characterization of the HmrM Multidrug Efflux Pump from *Haemophilus influenzae* Rd. *Microbiol. Immunol.* **47**, 937–943 (2003).
236. He, X. *et al.* Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. *Nature* **467**, 991–994 (2010).
237. Lu, M. *et al.* Structures of a Na⁺-coupled, substrate-bound MATE multidrug transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 2099–2104 (2013).
238. Lu, M., Radchenko, M., Symersky, J., Nie, R. & Guo, Y. Structural insights into H⁺-coupled multidrug extrusion by a MATE transporter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1310–1317 (2013).

239. Mousa, J. J. *et al.* MATE transport of the E. coli-derived genotoxin colibactin. *Nat. Microbiol.* **1**, 15009 (2016).
240. Kuk, A. C. Y., Mashalidis, E. H. & Lee, S.-Y. Crystal structure of the MOP flippase MurJ in an inward-facing conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 171–176 (2017).
241. Kusakizako, T. *et al.* Structural Basis of H⁺-Dependent Conformational Change in a Bacterial MATE Transporter. *Structure* **27**, 293-301.e3 (2019).
242. Kuk, A. C. Y., Hao, A., Guan, Z. & Lee, S.-Y. Visualizing conformation transitions of the Lipid II flippase MurJ. *Nat. Commun.* **10**, 1736 (2019).
243. Zhao, J. *et al.* The structure of the Aquifex aeolicus MATE family multidrug resistance transporter and sequence comparisons suggest the existence of a new subfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, (2021).
244. Bloch, J. S. *et al.* Development of a universal nanobody-binding Fab module for fiducial-assisted cryo-EM studies of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, (2021).
245. Zakrzewska, S. *et al.* Inward-facing conformation of a multidrug resistance MATE family transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 12275–12284 (2019).
246. Bolla, J. R. *et al.* Crystal structure of the Alcanivorax borkumensis YdaH transporter reveals an unusual topology. *Nat. Commun.* **6**, 6874 (2015).
247. Shome, S., Sankar, K. & Jernigan, R. L. Simulated Drug Efflux for the AbgT Family of Membrane Transporters. *J. Chem. Inf. Model.* **61**, 5673–5681 (2021).
248. Su, C.-C. *et al.* Structure and Function of Neisseria gonorrhoeae MtrF Illuminates a Class of Antimetabolite Efflux Pumps. *Cell Rep.* **11**, 61–70 (2015).
249. Kornelsen, V. & Kumar, A. Update on Multidrug Resistance Efflux Pumps in Acinetobacter spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **65**, (2021).
250. Gaurav, A., Bakht, P., Saini, M., Pandey, S. & Pathania, R. Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. *Microbiology* **169**, (2023).
251. Hassan, K. A. *et al.* Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. *Res. Microbiol.* **169**, 450–454 (2018).