



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Explorando la farmacobilidad del sitio de unión a aurovertina,  
un inhibidor exógeno de la  $F_0F_1$ -ATP sintasa.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Doctor en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA

Luis Fernando Cofas Vargas

Dr. Enrique García Hernández

Instituto de Química, UNAM

Dr. Héctor Riveros Rosas

Facultad de Medicina

Dr. Diego Prada Gracia

Unidad de Investigación en Biología

Computacional y Diseño de Fármacos,

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Ciudad Universitaria, CD. MX. Octubre, 2022

La presente tesis fue realizada en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique García Hernández. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del Proyecto PAPIIT IN206221. Agradezco al Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACyT) por la beca de doctorado otorgada con número 508395 y el apoyo del Posgrado en Ciencias Bioquímicas por los gastos de asistencia al 9no. Taller de Dinámica Molecular realizado en Cuernavaca en 2019.

# Índice general

Resumen . . . . .	1
Abstract . . . . .	2
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
Estructura y función de la $F_O F_1$ -ATP sintasa . . . . .	4
Inhibidores naturales de la $F_O F_1$ -ATP sintasa . . . . .	5
$F_O F_1$ -ATP sintasa como blanco farmacológico . . . . .	8
Resistencia a antibióticos y la $F_O F_1$ -ATP sintasa como blanco antimicrobiano . . . . .	9
Sitios de unión a aurovertina como potenciales blancos farmacológicos . . . . .	11
<b>Hipótesis</b>	<b>16</b>
<b>Objetivos</b>	<b>17</b>
<b>Métodos</b>	<b>18</b>
Simulaciones de dinámica molecular . . . . .	18
Sitios de unión a aurovertina . . . . .	20
Análisis de componentes principales . . . . .	20
Modelo de estados de Markov . . . . .	21
Identificación solvente-sitio y acoplamiento guiado . . . . .	21
Predicción de energías libres de unión relativas . . . . .	22
Análisis de secuencia del sitio de unión a AUR . . . . .	23
<b>Resultados</b>	<b>24</b>
Patrones de interacción proteína-inhibidor . . . . .	24
Patrones de interacción proteína-inhibidor . . . . .	24
Dinámica conformacional del sitio de unión a AUR . . . . .	31
Efectos de AUR en los sitios catalíticos . . . . .	36

---

Identificación de sitios solvente y cálculos de energía libre . . . . .	39
Comparación de energía de unión con enzimas bacterianas . . . . .	44
<b>Discusión y conclusiones</b>	<b>49</b>
<b>Referencias</b>	<b>51</b>
<b>Apéndice I. Archivos de entrada y scripts</b>	<b>69</b>
Minimización . . . . .	69
Equilibración térmica NVT paso 1 . . . . .	69
Equilibración térmica NVT paso 2 . . . . .	70
Equilibración térmica NVT paso 3 . . . . .	70
Equilibración térmica NVT paso 4 . . . . .	71
Equilibración térmica NPT paso 5 . . . . .	71
Producción NPT . . . . .	72
Parametrización de AUR . . . . .	72
Alineamiento y centrado (eliminación de rotación y traslación, así como condi- ciones periódicas de fronteras) . . . . .	72
Aislamiento de subunidades . . . . .	73
Cálculo de ángulos diedros . . . . .	73
Cálculo de autocorrelación de ángulos diedros . . . . .	74
Análisis de contactos $F_1$ -AUR . . . . .	74
Análisis de puentes de hidrógeno entre $F_1$ y AUR . . . . .	75
Análisis de componentes principales sobre ángulos diedros . . . . .	75
Jupyter notebook utilizado para calcular los paisajes conformacionales y los mo- delos de estado de Markov . . . . .	76
Generación de topologías para el cálculo de energía libre mediante el método MMPBSA . . . . .	84
Parámetros utilizados para el cálculo de MMPBSA . . . . .	84
Protocolo de rDock . . . . .	84
Restricciones farmacofóricas utilizadas en rDock . . . . .	86

---



# Índice de figuras

1	Figura 1. Representación esquemática de la arquitectura de la ATP sintasa y sitios de unión a inhibidores alostéricos exógenos y endógenos. . . . .	6
2	Figura 2. Función de autocorrelación de cadena principal de ángulos diedros de residuos del sitio de unión a AUR. . . . .	25
3	Figura 3. Análisis de contactos del sitio de unión a AUR en la subunidad $\beta_{TP}$ . . . . .	26
4	Figura 4. Análisis de contactos en el sitio de unión a AUR en $\beta_E$ . . . . .	27
5	Figura 5. Puentes de hidrógeno en $\beta_{TP}$ -AUR <sup>+</sup> . . . . .	29
6	Figura 6. Puente de hidrógeno proteína-inhibidor en el sitio de unión de AUR en $\beta_E$ y red de puentes de hidrógeno entre residuos DCT de $\alpha_{DP}$ y $\beta_{DP}$ . . . . .	30
7	Figura 7. Paisajes de energía libre (PEL) calculados de ángulos diedros de residuos del sitio de unión a AUR en $\beta_{TP}$ . . . . .	32
8	Figura 8. Paisajes de energía libre (PEL) calculados de ángulos diedros de residuos del sitio de unión a AUR en $\beta_E$ . . . . .	33
9	Figura 9. Paisajes de energía libre de ángulo diedro (PEL) para residuos de $\alpha_{TP}$ . . . . .	34
10	Figura 10. Gráfico de valores propios (“scree plot”) a partir de dPCA de residuos del sitio de unión a AUR. . . . .	35
11	Figura 11. Varianza acumulada por residuo ( $\sigma^2$ ) de cadenas laterales en el sitio $\beta_E$ . . . . .	36
12	Figura 12. Paisajes de energía libre (PEL) calculados de ángulos diedros de residuos del sitio de unión a nucleótidos en $\beta_{TP}$ . . . . .	37
13	Figura 13. Paisajes de energía libre (PEL) calculados de ángulos diedros de residuos del sitio de unión a nucleótidos en $\beta_E$ . . . . .	38
14	Figura 14. Gráfico de valores propios (“scree plot”) a partir de dPCA de residuos del sitio de unión a nucleótidos en $\beta_{TP}$ . . . . .	38

15	Figura 15. Descomposición energética por residuo, identificación de sitios solventes y acoplamiento molecular dirigido. . . . .	40
16	Figura 16. Acoplamiento molecular dirigido. . . . .	42
17	Figura 17. Descomposición energética por residuo, identificación de sitios solvente para $\beta_E$ . . . . .	42
18	Figura 18. Comparación de la descomposición energética por residuo para el sitio de unión a AUR de bovino y dos especies patógenas. . . . .	43
19	Figura 19. Comparación de la descomposición energética por residuo para el sitio de unión a AUR en $\beta_{TP}$ y $\beta_E$ de bovino y <i>E. coli</i> . . . . .	45
20	Figura 20. Conservación del sitio de unión a AUR en $F_0F_1$ -ATP sintasas bacterianas. . . . .	47

# Dedicatoria

Dedico esta tesis con todo mi amor y cariño a mi esposa, quien siempre me ha apoyado e impulsado para lograr mis metas. A mi padre y a mi madre, quienes me han apoyado incondicionalmente toda la vida.

# Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor y director de tesis, el Dr. Enrique García Hernández, quien en cada etapa del doctorado me ha guiado con sus conocimientos, me ha brindado todo su apoyo y amistad, lo que permitió que esta tesis llegara a buen término, y a la vez, me ha hecho crecer en el ámbito personal y académico.

También quiero agradecer a los integrantes de mi comité tutor, los Dres. Héctor Riveros Rosas y Diego Prada Gracia, quien estuvieron muy involucrados en el desarrollo del proyecto y en mi formación académica.

Agradezco a mi familia, por apoyarme en todo momento. En especial, quiero mencionar a mi esposa, quien siempre ha estado ahí brindándome su apoyo total y dándome ánimos para alcanzar mis metas.

También agradezco a mis padres, quienes siempre me han dado mucho apoyo, el cual me ha permitido llegar hasta este punto. Agradezco a todos mis amigos Homero, Eduardo, LP, por darme su apoyo y su amistad durante todo este tiempo.

Además, quiero agradecer la UNAM, al Instituto de Química y a la Unidad de Computo y Tecnologías de la Información y Comunicación por brindarme los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación. No hubiese podido arribar a estos resultados de no haber sido por su ayuda incondicional.

Muchas gracias a todos.

# Resumen

Además de desempeñar un papel central en la mitocondria como principal productor de ATP, la  $F_0F_1$ -ATP sintasa realiza diversas funciones reguladoras clave en la membrana citoplasmática. El mal funcionamiento de esta enzima ha sido relacionado con un número creciente de patologías humanas, como la hipertensión, la aterosclerosis, el cáncer y algunas enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes y del envejecimiento. Además, se ha demostrado que la inhibición de esta enzima compromete la supervivencia de varios patógenos bacterianos de interés para la salud pública. Por lo tanto, la  $F_0F_1$ -ATP sintasa se ha convertido en un nuevo blanco farmacológico tanto para tratar enfermedades humanas como para combatir la resistencia a antibióticos. El mecanismo rotatorio que impulsa la catálisis de la  $F_0F_1$ -ATP sintasa se basa en múltiples eventos de comunicación intra e intersubunidad, lo que ofrece la oportunidad de desarrollar nuevos tipos de inhibidores. Muchos inhibidores exógenos naturales se unen a diferentes cavidades transitorias fuera de los sitios catalíticos, cavidades que pueden considerarse como sitios alostéricos "validados" por la naturaleza. Como primer paso para el desarrollo basado en estructura de nuevos fármacos alostéricos que inhiban a la  $F_0F_1$ -ATP sintasa, en este trabajo llevamos a cabo una caracterización computacional de los sitios de unión del antibiótico fúngico aurovertina. Usando simulaciones de dinámica molecular y cálculos de energía libre de unión de punto final, se revelaron aspectos novedosos de los sitios de unión de aurovertina en lo referente a la comunicación intra e intersubunidades, tendencias conformacionales, residuos "calientes" de unión y sitios de solvatación preferencial que podrían ser útiles como guías farmacofóricas en campañas de cribado virtual masivo de moléculas tipo fármaco.

# Abstract

In addition to playing a central role in the mitochondria as the main producer of ATP,  $F_0F_1$ -ATP synthase performs diverse key regulatory functions at the cytoplasm membrane. Its malfunction has been linked to a growing number of human pathologies, such as hypertension, atherosclerosis, cancer, and some neurodegenerative, autoimmune, and aging diseases. Furthermore, inhibition of this enzyme has been shown to compromise the survival of several bacterial pathogens of public health concern. Therefore,  $F_0F_1$ -ATP synthase has emerged as a novel drug target both to treat human diseases and to combat antibiotic resistance. The rotary mechanism driving  $F_0F_1$ -ATP synthase catalysis is based on multiple intra- and intersubunit communication events, offering the opportunity to develop new types of inhibitors. Importantly, many natural exogenous inhibitors bind to different transient cavities outside the catalytic sites, cavities that can be considered as inhibitor allosteric sites “validated” by nature. As a first step to pave the way for structure-based development of new allosteric drugs targeting  $F_0F_1$ -ATP synthase, in this work we carried out a computational characterization of the binding sites of the fungal antibiotic aurovertin. Using molecular dynamics simulations and end-point binding free energy calculations, novel aspects of the aurovertin binding sites were revealed regarding intra- and intersubunit communications, conformational trends, hot spot binding residues, and solvent sites that could be useful as pharmacophoric guides in virtual screening campaigns.

# Introducción

La mayoría del ATP requerido por los organismos aeróbicos es generado por la  $F_0F_1$ -ATP sintasa, una proteína multimérica que cataliza la condensación de ADP y Fosfato inorgánico a través de un mecanismo de rotación impulsado por la fuerza protón motriz generada por la cadena respiratoria (Kühlbrandt, 2019; Morelli et al., 2020; Walker, 2013). También cataliza con alta eficiencia la hidrólisis de ATP, pudiendo restaurar el gradiente de protones bajo demanda fisiológica (v.gr., para generar potencial de membrana en bacterias en condiciones anaeróbicas) (Rees et al., 2012). Esta enzima se encuentra en la membrana mitocondrial interna, en la membrana tilacoidal de cloroplastos y en la membrana plasmática de bacterias (Kühlbrandt, 2019). Debido a su papel crucial en el metabolismo, una función inadecuada de esta enzima, *v. gr.*, disminución de la actividad catalítica, mal ensamblaje o plegamiento, o la sobreexpresión de subunidades, eventos causados generalmente por mutaciones, puede causar un desbalance energético en la célula y desencadenar diversas enfermedades en humanos, incluyendo Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, diabetes, hipertensión, cáncer y aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno (Galber et al., 2021; Nesci et al., 2019). Además de su localización canónica, recientemente se ha identificado a la  $F_0F_1$ -ATP sintasa en la membrana citoplasmática de adipocitos, hepatocitos, queratinocitos, células del sistema nervioso central y células endoteliales (Fu & Zhu, 2010; Taurino & Gnoni, 2018). En estos ambientes no canónicos, esta enzima recibe el nombre de  $F_0F_1$ -ATP sintasa ectópica. Además de tener la capacidad de realizar síntesis e hidrólisis de ATP como su contraparte mitocondrial, se ha descrito que esta enzima posee otras funciones regulatorias como el metabolismo del colesterol y los lípidos, la supervivencia y proliferación celular, la homeostasis del pH y el reconocimiento tumoral (Taurino & Gnoni, 2018). Al igual que ocurre con la enzima mitocondrial, el mal funcionamiento de la  $F_0F_1$ -ATP sintasa ectópica se ha implicado en el desarrollo de diversas afecciones como diabetes, hipertensión y diversos tipos de cáncer. Existe evidencia de que tanto la angiogénesis como la metástasis podrían tratarse con moléculas inhibitoras de la  $F_0F_1$ -ATP sintasa como angiostatina, anticuerpos, oligomicina, efrapeptina,

polifenoles y moléculas similares a la aurovertina (Arakaki et al., 2003, 2007; Taurino & Gnoni, 2018; Y. H. Wu et al., 2013). Por lo tanto, la  $F_O F_1$ -ATP sintasa se ha convertido en un blanco farmacológico atractivo para el tratamiento de estas afecciones. Además, se ha demostrado que esta enzima es un buen blanco farmacológico para combatir el creciente problema de la resistencia a los antimicrobianos mediante la desestabilización de la bioenergética bacteriana (Cook et al., 2014; Hards & Cook, 2018). El ejemplo más notable de esto fue el descubrimiento de la bedaquilina, un fármaco utilizado para tratar la tuberculosis (Lakshmanan & Xavier, 2013; Luo et al., 2020), lo cual consolidó el interés de utilizar la  $F_O F_1$ -ATP sintasa como un blanco antimicrobiano especie-específico. Otros estudios han demostrado que la inhibición de la  $F_O F_1$ -ATP sintasa de *Staphylococcus aureus* sensibiliza al patógeno a varias clases de antibióticos para los cuales ha desarrollado resistencia (Vestergaard et al., 2021). Recientemente, se han reportado nuevas clases de inhibidores alostéricos que actúan sobre la enzima de *Escherichia coli* (Avila-Barrientos et al., 2022; Ruiz-Blanco et al., 2021).

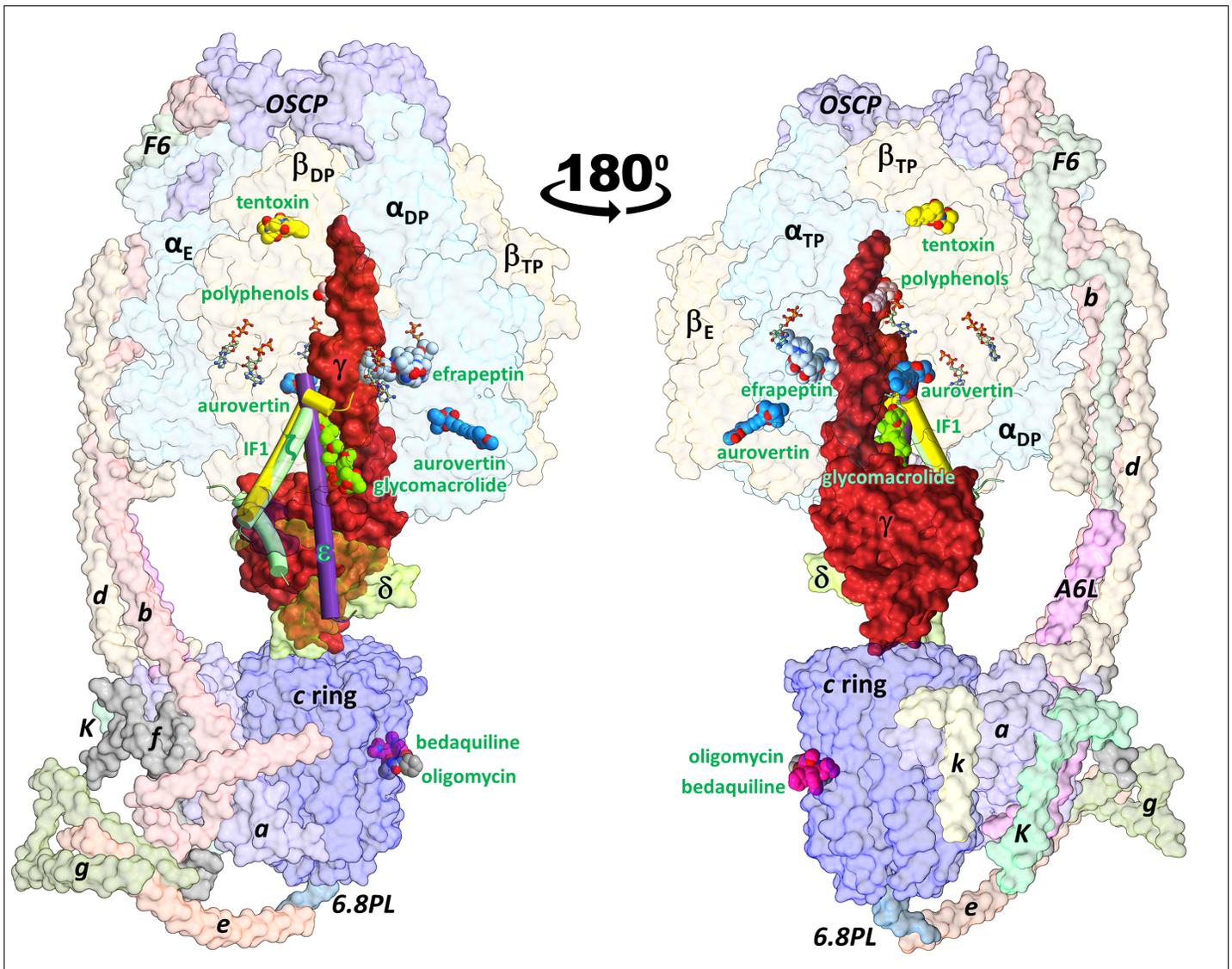
## Estructura y función de la $F_O F_1$ -ATP sintasa

Todas las  $F_O F_1$ -ATP sintasas comparten una arquitectura básica compuesta por un subcomplejo  $F_1$  expuesto al solvente y un subcomplejo  $F_O$  transmembranal (Figura 1) (Hong & Pedersen, 2008; Kühlbrandt, 2019). El subcomplejo  $F_1$  contiene la maquinaria catalítica, la cual está compuesta por un hexámero de pares alternativos de subunidades  $\alpha/\beta$ , de cuyo centro sobresale la subunidad  $\gamma$  en forma de varilla rotativa. La subunidad  $\epsilon$  ( $\delta$  en las ATP sintasas mitocondriales) se une en una región expuesta al solvente de la subunidad  $\gamma$ . Las subunidades homólogas tridominio  $\alpha$  y  $\beta$  contienen cada una un sitio de unión a nucleótidos (SUN), pero solo las subunidades  $\beta$ , con la participación de unos pocos residuos clave de una subunidad  $\gamma$  vecina, son catalíticas. De acuerdo con la ocupación de nucleótidos observada en la primera estructura cristalográfica de  $F_1$  de *Bos taurus* ( $BtF_1$ ) (Abrahams et al., 1994), las subunidades  $\beta$  suelen denominarse como  $\beta_E$  (sitio vacío),  $\beta_{DP}$  (unido a ADP) y  $\beta_{TP}$  (unido a ATP), aunque se han observado diferentes ocupaciones de nucleótidos en estructuras posteriores (Kühlbrandt, 2019). La subunidad  $\beta_E$  muestra una conformación abierta, con el dominio C-terminal (DCT) completamente expuesto al solvente. Las subunidades  $\beta_{DP}$  y  $\beta_{TP}$  adoptan una conformación

cerrada similar, aunque  $\beta_{DP}$  presenta mayor contacto con las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  adyacentes. Estas conformaciones, en las que cada subunidad  $\beta$  hace contactos únicos con la subunidad central asimétrica, constituyen la base estructural del mecanismo de cambio de unión que comprende cambios conformacionales alternativos de las subunidades  $\beta$  acoplados a la rotación de la subunidad  $\gamma$  (Abrahams et al., 1994). En bacterias y cloroplastos,  $F_O$  está compuesto por las subunidades  $a$ ,  $b_2$  y el anillo  $c$  ( $c_{8-17}$  subunidades), mientras que las enzimas mitocondriales tienen una composición más compleja (Figura 1). Los protones atraviesan la membrana a través de un canal formado por la subunidad  $a$  y el anillo  $c$  (Kühlbrandt, 2019; Neupane et al., 2019). A medida que este anillo gira, arrastra a las subunidades  $\gamma/\epsilon(\delta)$  que están en contacto no covalente con éste, proporcionando energía para que las subunidades  $\beta$  produzcan y liberen ATP. Las subunidades  $b$  ( $b$ ,  $d$ , F6, A6L en las  $F_OF_1$ -ATP sintasas mitocondriales) funcionan como un brazo estator periférico que impide la rotación de  $F_1$  a través de la subunidad  $\delta$  (OSCP en  $F_OF_1$ -ATP sintasas mitocondriales) ancladas en el lado N-terminal del anillo  $\alpha/\beta$  (Kühlbrandt, 2019; Neupane et al., 2019). Durante el ciclo rotacional, las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $a+$  y  $c$  experimentan cambios conformacionales o espaciales, por lo que pueden denominarse subunidades dinámicas. Además, las  $F_OF_1$ -ATP sintasas mitocondriales contienen varias subunidades supernumerarias (Figura 1) implicadas en la dimerización de la enzima que promueve la formación de las crestas mitocondriales (Blum et al., 2019). Recientemente, se resolvieron las estructuras de los estados de espera de unión y catalítica para la enzima *Bacillus* PS3, donde para cada estado, las subunidades  $\beta$  toman tres conformaciones diferentes, dando un total de seis estados conformacionales (Sobti et al., 2021).

## Inhibidores naturales de la $F_OF_1$ -ATP sintasa

Se ha identificado un número creciente de unidores endógenos y exógenos de  $F_OF_1$ -ATP sintasa (Hong & Pedersen, 2008; B. A. Patel et al., 2020). Como se ilustra en la Figura 1, los sitios de unión a varios inhibidores a lo largo de la enzima se han determinado estructuralmente. Estos inhibidores bloquean la progresión de los cambios conformacionales al interferir en la comunicación entre las subunidades dinámicas. Las ATP sintasas poseen mecanismos de inactivación/reactivación de la síntesis de ATP bajo condiciones de baja y alta energía disponible,



**Figura 1:** Representación esquemática de la arquitectura de la ATP sintasa y sitios de unión a inhibidores alostéricos exógenos y endógenos. Los inhibidores cuya estructura 3D en complejo con la enzima se ha resuelto experimentalmente se superpusieron a la estructura crioEM de la enzima de cerdo en una conformación inhibida por la subunidad IF1 (código pdb 6j5i). La estructura mínima de los subcomplejos F<sub>1</sub> y F<sub>0</sub> está compuesta por las subunidades  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  y  $ab_2c_{8-17}$ , respectivamente. Las ATP sintasas eucariotas contienen subunidades supernumerarias, principalmente en el sector F<sub>0</sub>. Los inhibidores de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintasa se pueden clasificar como endógenos o exógenos. Las subunidades inhibitoras endógenas  $\epsilon$  (código pdb 6oqr (Sobti et al., 2020)),  $\zeta$  (código pdb 5dn6 (Morales-Rios et al., 2015)) e IF1 (código pdb 6j5i (Gu et al., 2019)) se muestran en cilindros. Los inhibidores exógenos aurovertina B (código pdb 1cow (van Raaij et al., 1996)), resveratrol (código pdb 2jiz (Gledhill et al., 2007)), tentoxina (código pdb 1kmh (Groth & Pohl, 2001)), efrapeptina (código pdb 1efr (Abrahams et al., 1996)), oligomicina (código pdb 6cp5 (Srivastava et al., 2018)), glicomacrólido apoptolidina A (códigos pdb 7DM3 (Reisman et al., 2022)) se muestran en esferas. También se muestra la posición del fármaco antituberculoso bedaquilina (código pdb 7jg8 (Guo et al., 2021)), que ocupa sitios en el anillo c equivalentes a los de la oligomicina. Los nucleótidos se muestran en “sticks”.

mediante el uso de moléculas endógenas o funcionales. En mitocondrias, esta autorregulación es llevada a cabo por la IF1 (Cabezón et al., 2003). Esta proteína se encuentra conservada

evolutivamente en todas las eucariotas y desempeña un papel crucial en la prevención de la reacción de hidrólisis de la ATP sintasa y en el cambio metabólico de oxidación fosforilativa a glucólisis bajo condiciones de pérdida de potencial transmembranal. IF1 forma un dímero a pH ácido ( $<6.7$ ) y exhibe efectos inhibitorios, el cual se une a  $F_1$ -ATPasa o  $F_1F_1$ -ATP sintasa formando un complejo 1:1, requiriendo la hidrólisis de dos moléculas de ATP. Al restablecerse el potencial transmembranal, la dirección de rotación del rotor se revierte, la IF1 se desprende y prosigue la síntesis de ATP. A pH básico ( $\approx 8.0$ ), IF1 forma un tetrámero el cual no puede interactuar con la ATP sintasa (Nakamura et al., 2013). En bacterias y cloroplastos, la subunidad  $\epsilon$  inhibe la actividad ATPasa en forma dependiente de la concentración de ATP. La subunidad  $\epsilon$  consiste de una hoja  $\beta$  rígida unida a la subunidad  $\gamma$  y al anillo  $c$ , y un dominio C-terminal  $\alpha$ -helicoidal, el cual puede unir ATP (Kato-Yamada & Yoshida, 2003; Yagi et al., 2007). Cuando la concentración de ATP es muy baja en la célula bacteriana, el ATP se libera de la subunidad  $\epsilon$ . El dominio C-terminal de la subunidad, con estructura  $\alpha$ -helicoidal, sufre un cambio conformacional para adoptar una forma extendida, incrustándose en una cavidad formada entre la subunidad  $\gamma$ , una subunidad  $\beta$  y una subunidad  $\alpha$ , impidiendo la rotación de  $F_1$  y por tanto la actividad hidrolítica (Krah, 2015). La afinidad de unión de la  $F_1F_1$ -ATP sintasa a ATP para *Bacillus* PS3 es de  $4.3 \mu\text{M}$  (Yagi et al., 2007),  $2.3 \text{ mM}$  para *B. subtilis* (Kato-Yamada, 2005) y  $22 \text{ mM}$  para *E. coli* (Yagi et al., 2007); por lo tanto, la concentración requerida de ATP para inducir el estado no inhibitorio difiere considerablemente entre especies (Krah, 2015). En otras  $\alpha$ -proteobacterias, específicamente en *Paracoccus denitrificans*, se ha encontrado que la subunidad  $\epsilon$  no presenta una función inhibitoria, en su lugar, la subunidad  $\zeta$  es la responsable de esta función. El mecanismo de inhibición de esta subunidad es similar al descrito para IF1 y para la subunidad  $\epsilon$ , uniéndose a la misma cavidad (Morales-Rios et al., 2015; Zarco-Zavala et al., 2018).

También se han resuelto las estructuras 3D de varios inhibidores exógenos (Hong & Pedersen, 2008; B. A. Patel et al., 2020). Los glicomacrólidos apoptolidina A y amocidina A se unen a la misma cavidad que las subunidades inhibitorias (Reisman et al., 2022). El herbicida tentoxina y los antibióticos efrapeptina C y aurovertina B (AUR) se unen a cavidades no equivalentes en las interfaces  $\alpha/\beta$  (Abrahams et al., 1996; Groth & Pohl, 2001; van Raaij et al.,

1996). La tentoxina causa la inhibición de la  $F_1$ -ATP sintasa cloroplástica a concentraciones tan bajas como  $0.4 \mu\text{M}$ . No obstante, no muestra efecto sobre las enzimas homólogas bacterianas y mitocondriales. Las efrapeptinas son péptidos producidos por especies como *Tolypocladium*, que son hongos de suelo, algunos de los cuales son patógenos de insectos, mientras otros existen como saprófitos (Bandani et al., 2000). Estos péptidos inhiben la fotofosforilación en plantas y bacterias, y la fosforilación oxidativa en mitocondria y en algunas bacterias. Las efraptinas se unen al sector  $F_1$  de bovino con una  $K_d$  de aproximadamente  $10 \text{ nM}$ . La inhibición por el péptido de la hidrólisis de ATP en estado estacionario no se ve afectada por la competición con ATP, mientras que la inhibición de la síntesis de ATP en estado estacionario es competitiva con ADP o fosfato. La tasa de asociación de efrapeptina con  $F_1$ -ATPasa no se ve afectada por altas concentraciones de ADP, pero disminuye en presencia de fosfato (Abrahams et al., 1996). La estructura cristalográfica de  $F_1$  bovina unida a efrapeptina ha sido resuelta con una resolución de  $3.1 \text{ \AA}$  (Abrahams et al., 1996). El péptido interactúa con residuos de las subunidades  $\alpha\text{E}$ ,  $\alpha_{TP}$ ,  $\beta_E$  y  $\gamma$  de forma hidrofóbica (Figura 1). A pesar de que se conocen sus propiedades insecticidas y probablemente antifúngicas, aún se desconoce la significancia biológica de las efrapeptinas. El antibiótico oligomicina es un macrólido producido por bacterias del género *Streptomyces*, el cual actúa específicamente bloqueando el canal de protones en la fracción  $F_O$  de la ATP sintasa (Symersky et al., 2012). Las bacterias u hongos utilizan estas moléculas para inhibir las  $F_O F_1$ -ATP sintasas de otros organismos como medio de autodefensa o invasión. Los polifenoles vegetales resveratrol, piceatanol y quercetina también se unen a  $F_1$ , aunque la relevancia funcional de su inhibición sigue sin ser esclarecida (Gledhill et al., 2007).

## **$F_O F_1$ -ATP sintasa como blanco farmacológico**

La  $F_O F_1$ -ATP sintasa puede afectar el potencial de membrana y la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que tiene un efecto en el nivel de estrés oxidativo celular que promueve envejecimiento y muerte celular. La desregulación de la  $F_O F_1$ -ATP sintasa perjudica principalmente a las células del tejido cerebral, cardíaco y del músculo esquelético, por su alta demanda energética. En efecto, este fenómeno se relaciona con enfermedades que abarcan fenómenos de isquemia, padecimientos degenerativos y muerte celular (Taurino & Gnani, 2018).

En algunos casos, la inhibición de la actividad de síntesis de la  $F_0F_1$ -ATP sintasa puede actuar como un regulador que genere un estrés oxidativo suave, haciendo las veces de un interruptor metabólico hacia la glucólisis, lo cual tiende a favorecer el desarrollo de células cancerígenas (Nuskova et al., 2020). En su localización ectópica se ha propuesto como blanco terapéutico para regular isquemia, obesidad, presión sanguínea, respuestas de inflamación y generar estrategias antitumorales (Taurino & Gnoni, 2018). En enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer se encuentran asociados tanto una disminución en la expresión de la subunidad  $\beta$  y una acumulación de la subunidad  $\alpha$  en el citosol, eventos que entre otros efectos, causa la disminución de la capacidad catalítica de esta enzima (Goldberg et al., 2018). Por ejemplo, el fármaco J147 es un inhibidor de la actividad hidrolítica, cuyo sitio de unión no ha sido dilucidado, pero se sabe que se une a la subunidad  $\alpha$ , el cual ha sido utilizado para tratar toxicidad cerebral relacionada con el envejecimiento y demencia (Goldberg et al., 2018). Recientemente, se ha encontrado una nueva familia de glicomacrólidos, los cuales se unen selectivamente al HTH de la ATP sintasa de células cancerosas, causando apoptosis (Reisman et al., 2022)

## **Resistencia a antibióticos y la $F_0F_1$ -ATP sintasa como blanco antimicrobiano**

La crisis de resistencia a antibióticos se atribuye principalmente a su uso excesivo, a las prescripciones inapropiadas por parte del sector salud, así como a su uso extensivo en agricultura y ganadería (Ventola, 2015). Por otro lado, el desarrollo de nuevos antibióticos por parte de la industria farmacéutica ha estado detenido debido a obstáculos económicos y regulatorios. Debido a esto, el 80% de las grandes empresas farmacéuticas han abandonado la investigación en el área de antibióticos. Además, la investigación sobre nuevos fármacos en la academia se ha reducido debido a crisis económicas (Bartlett et al., 2013; Piddock, 2012; Ventola, 2015). El desarrollo de antibióticos no es considerada una inversión para la industria farmacéutica, debido a que los antibióticos son usados por periodos relativamente cortos y son generalmente curativos, lo que no los hace lucrativos como aquellos fármacos utilizados para tratar condiciones crónicas como diabetes, desórdenes psiquiátricos, asma o reflujo gastro-

esofágico (Bartlett et al., 2013; Golkar et al., 2014; Gould & Bal, 2013; Ventola, 2015; Wright, 2014). La resistencia a antibióticos puede ser adquirida por dos formas: mutaciones genéticas y mediante transferencia horizontal de genes (Varela et al., 2021). Las mutaciones genéticas alteran la acción del antibiótico utilizando alguno de los siguientes mecanismos: modificando la diana biológica (disminuyendo la afinidad por el fármaco), disminuyendo la captación de la molécula, activando mecanismos de eflujo para extrudir el fármaco o realizando cambios globales en vías metabólicas importantes mediante la modulación de redes regulatorias (Abraham & Chain, 1988; Arias et al., 2011; Brown & Wright, 2016; Connell et al., 2003; D’Costa et al., 2011; S. B. Hoffman, 2001; Pagès et al., 2008; Wilson, 2014). La transferencia horizontal de genes entre especies bacterianas permite el intercambio de material genético, proporcionando mayor plasticidad genética, lo que se traduce en una mayor adaptabilidad y puede conferir resistencia a diversos antibióticos (Keeling & Palmer, 2008). Se ha reportado que *S. aureus* puede intercambiar genes con otros *Staphylococcus* y con otros géneros bacterianos (Gyles & Boerlin, 2014), lo que ayudaría a explicar tanto su capacidad infectiva así como su resistencia a prácticamente todos los antibióticos conocidos hasta el momento (Mukherjee et al., 2021). Para evitar que la resistencia antimicrobiana se vuelva una situación catastrófica global, existe una necesidad imperiosa de encontrar nuevas dianas terapéuticas para tratar las enfermedades humanas y atacar la resistencia a los fármacos (Franco-Serrano et al., 2018; P. S. Hoffman, 2020; Vasan et al., 2019). Dada la importancia que tiene la  $F_0F_1$ -ATP sintasa en la bioenergética celular, y que su mecanismo catalítico ofrece diversos puntos de inhibición que pueden ser explotados, en los últimos años se ha intensificado la búsqueda de nuevas moléculas antimicrobianas que sean capaces de actuar de manera selectiva en enzimas de patógenos bacterianos. A pesar de lo anterior, bedaquilina es el único fármaco aprobado para el tratamiento antimicrobiano cuya diana farmacológica es la  $F_0F_1$ -ATP sintasa. La mayoría de los esfuerzos para encontrar moléculas inhibitorias de esta enzima se han centrado en el estudio del anillo de subunidades *c*, las cuales presentan de las menores conservaciones observadas entre todas las subunidades de la  $F_0F_1$ -ATP sintasa (Cofas Luis, 2017). En general, los inhibidores descritos hasta ahora para el anillo *c*, incluyendo a la bedaquilina, interactúan con el sitio de traslocación de protones, bloqueando la actividad catalítica de la enzima. Este sitio presenta una conservación variable a

lo largo de la evolución, y relativamente más alta en comparación con la secuencia completa de las subunidades *c*. Las moléculas DCCD (N,N'-diciclohexilcarbodiimida) y venturicidina A son ejemplos de inhibidores que se unen a indiscriminadamente a  $F_0F_1$ -ATP sintasas, tanto bacterianas como eucariotas (Vestergaard et al., 2022). La bedaquilina, al validar a la  $F_0F_1$ -ATP sintasa como blanco antimicrobiano, ha demostrado que la selectividad puede ser alcanzada al explotar las diferencias en composición entre especies del sitio de traslocación de protones (Preiss et al., 2015). *Streptococcus pneumoniae*, un patógeno de preocupación global, causante de neumonía, principalmente en pacientes inmunocomprometidos. La optoquina es una molécula derivada de quinina que presenta acción inhibitoria sobre la  $F_0F_1$ -ATP sintasa de esta bacteria, aunque presenta varios efectos secundarios por lo cual no ha sido utilizada para el tratamiento de este tipo de infecciones (Moore, 1915). El principal uso actual que se le da a esta molécula es como herramienta diagnóstica para diferenciar a *S. pneumoniae* de otros *Streptococcus* menos susceptibles a optoquina (Pikis et al., 2001). Diversos grupos se encuentran buscando nuevos inhibidores basados en optoquina que sean especie específicos contra *S. pneumoniae* (X. Wang et al., 2019).

## Sitios de unión a aurovertina como potenciales blancos farmacológicos

Los eventos de comunicación entre subunidades que ocurren a lo largo del mecanismo de rotación implican la formación de cavidades transitorias. Como se describió anteriormente, la naturaleza ha aprovechado estas cavidades como sitios para la inhibición alostérica, en los que péptidos y moléculas pequeñas se insertan como cuñas en un engranaje, obstaculizando el ciclo rotatorio. Por lo tanto, se ha planteado la hipótesis de que estas cavidades transitorias pueden explotarse para desarrollar potenciales moduladores alostéricos farmacológicos de esta enzima (Huang et al., 2008; B. A. Patel et al., 2020). Dado que los fármacos alostéricos no se unen al sitio activo, no compiten con los ligandos/sustratos endógenos, lo que implica que normalmente requieren una optimización de menor potencia que los fármacos ortostéricos (Nussinov & Tsai, 2014). Además, las moléculas alostéricas se unen a cavidades que están menos

conservadas que los sitios activos (Bhat et al., 2020; Chatzigoulas & Cournia, 2021; Lu et al., 2019). Sin embargo, no existen estudios sistemáticos destinados a explorar el potencial farmacológico de las cavidades de  $F_0F_1$ -ATP sintasa a las que se unen las moléculas exógenas. Como primer paso para llenar este vacío de información, en este estudio realizamos una caracterización computacional del sitio de unión AUR. Las AURs son un grupo de policétidos reducidos que son producidos en hongos, las cuales presentan actividades antitumorales, micotóxicas, nematocidas y antimicrobianas (Li et al., 2018; Linnett & Beechey, 1979; B. A. Patel et al., 2020; van Raaij et al., 1996). Estas moléculas inhiben varias  $F_0F_1$ -ATP sintasas eucariotas y bacterianas (van Raaij et al., 1996). Existen 21 aurovertinas conocidas (denominadas de la A a la U) (Azumi et al., 2008; Guo et al., 2013). Los compuestos relacionados incluyen avertoxinas, citreoviridinas, verrucosidinas y asteltoxinas (Li et al., 2018). Especies como *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli*, *Paracoccus denitrificans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas capsulata* y *Rhodopseudomonas sphaeroides* han sido reportadas como sensibles a aurovertina D. Sin embargo, se han aislado mutantes de *E. coli* resistentes a aurovertina, pero aún sensibles a otros inhibidores (Satre et al., 1980). Hasta ahora se desconoce si otras especies bacterianas son sensibles a las aurovertinas. La estructura del complejo  $BtF_1$ -AUR muestra que hay dos sitios de unión a AUR, uno en  $\beta_E$  y otro en  $\beta_{TP}$ , en una cavidad hidrofóbica ubicada entre el dominio de unión a nucleótidos (DUN) y DCT (Figuras 1 y 2A) (Issartel & Vignais, 1984; van Raaij et al., 1996; Verschoor et al., 1977). Debido a un contacto más cercano entre las subunidades, no hay espacio disponible para la unión a AUR en  $\beta_{DP}$ . Así, se ha propuesto que el mecanismo de inhibición consiste en prevenir estéricamente la conversión de  $\beta_{TP}$  a  $\beta_{DP}$  (dirección de hidrólisis) o  $\beta_E$  a  $\beta_{DP}$  (dirección de síntesis) (van Raaij et al., 1996). AUR inhibe completamente la síntesis, mientras que deja una actividad residual significativa (hasta un 40 %) en la dirección de hidrólisis (Johnson et al., 2009; van Raaij et al., 1996). La base de este efecto diferencial en ambas actividades catalíticas sigue sin ser esclarecida (Johnson et al., 2009; van Raaij et al., 1996). La capacidad de AUR para interrumpir el desarrollo de líneas celulares o tumores malignos a través de la unión específica a la  $F_0F_1$ -ATP sintasa ectópica hace de esta molécula un blanco atractivo para desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (R. Wu et al., 2020). Aunque aún no se ha explorado experi-

mentalmente, presumiblemente AUR también podría causar efectos deseados similares a los provocados por otros inhibidores de esta enzima en otros tipos de enfermedades (Galber et al., 2021). En este contexto, la presente caracterización computacional del sitio de unión a AUR tuvo como objetivo aportar una nueva base para el desarrollo de moduladores de la actividad humana de  $F_0F_1$ -ATP sintasa e inhibidores especie-específicos que bloquean el ciclo de vida de los patógenos.

# Planteamiento del Problema

La medicina moderna busca modular la actividad de novedosas dianas terapéuticas que abran la posibilidad de tratar enfermedades para las cuales no se cuenta aún con cura efectiva, o cuyo tratamiento produce efectos secundarios considerables. La gran mayoría de los fármacos aprobados hasta la fecha para uso clínico  $\approx 99.5\%$  se unen directamente al sitio activo de proteínas (Sheik Amamuddy et al., 2020). Por lo general, los efectos secundarios asociados con este tipo de moléculas ortostéricas están relacionados con la reactividad cruzada con proteínas que no son el blanco por inhibir. En cambio, las moléculas alostéricas se unen a cavidades que se encuentran menos conservadas que los sitios activos (Bhat et al., 2020; Chatzigoulas & Cournia, 2021; Lu et al., 2019), proporcionando el potencial para modular de manera más selectiva los blancos terapéuticos de interés (Chatzigoulas & Cournia, 2021; Nesci et al., 2019). En particular, los sitios alostéricos que carecen de unidores endógenos (es decir, sitios alostéricos no funcionales) son atractivos, ya que no compiten con los ligandos endógenos, por lo que normalmente requieren una optimización de potencia más baja que los fármacos ortostéricos (Chatzigoulas & Cournia, 2021; Nussinov & Tsai, 2012). En este contexto, es relevante que la evolución biológica haya ”descubierto” cientos de moléculas exógenas que, actuando como unidores alostéricos, inhiben la catálisis de la  $F_0F_1$ -ATP sintasa al bloquear la progresión de los cambios conformacionales que impulsan el mecanismo rotatorio de la enzima. Este aspecto es útil para diseñar inhibidores específicos de la  $F_0F_1$ -ATP sintasa, ya que algunas regiones del sitio activo de esta enzima están altamente conservadas en diversas P-loop NTPasas, como por ejemplo la miosina, la fosfofructocinasa y la adenilato cinasa (Leipe et al., 2003; Walker et al., 1982).

En este trabajo llevamos a cabo una caracterización computacional de los sitios de unión a AUR con el objetivo de aportar nuevos conocimientos sobre las bases estructurales y energéticas del reconocimiento de inhibidores para el desarrollo futuro de moduladores de la actividad de la  $F_0F_1$ -ATP sintasa. Los subcomplejos  $F_1$  bovino y humano comparten una alta identidad de secuencia (98% y 99% de identidad para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ,

respectivamente), mientras que los residuos que forman el sitio de unión de AUR son idénticos en las dos especies. Por lo tanto, asumimos que las propiedades derivadas del análisis de la estructura de Bt $F_1$  reflejarían en gran medida las del ortólogo humano. Usando simulaciones de dinámica molecular y cálculos de energía libre de unión de punto final, se revelaron aspectos novedosos de los sitios de unión de AUR con respecto a las comunicaciones intra e intersubunidades, tendencias conformacionales, residuos de unión de puntos calientes y sitios solventes que podrían ser útiles como guías farmacofóricas en campañas de acoplamiento virtual masivo. Además, el análisis de secuencias bacterianas proporcionó información sobre la conservación de los residuos más importantes para el reconocimiento molecular identificados en este estudio. Esta información podría ser relevante para la búsqueda de moléculas inhibidoras de esta enzima para tratar enfermedades humanas o interrumpir el ciclo de vida de patógenos.

# Hipótesis

El esclarecimiento de los patrones de interacción y de los efectos de la aurovertina sobre  $F_0F_1$ -ATP sintasa permitirá una comprensión más profunda del mecanismo inhibitorio de este antibiótico, información que eventualmente podría ser utilizada para encontrar novedosas moléculas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades y/o el ataque a microorganismos resistentes a antibióticos.

# Objetivos

## Objetivo general

Caracterizar in silico las propiedades conformacionales y energéticas del sitio de unión a aurovertina.

## Objetivos particulares

1. Caracterizar la dinámica conformacional del sector F1 de bovino, en presencia y en ausencia de aurovertina.
2. Identificar patrones de contactos proteína-inhibidor.
3. Establecer los residuos más relevantes para el reconocimiento molecular.
4. Elucidar si existen diferencias de interacción con aurovertina entre el sector F1 de bovino y especies bacterianas patógenas.

# Métodos

## Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron con el programa AMBER 16 y el campo de fuerza FF14SB (Case et al., 2016; Maier et al., 2015), usando las estructuras cristalográficas de la  $F_1$ -ATPasa mitocondrial de bovino resueltas en el estado basal (PDB ID: 2jdi) y en complejo con aurovertina B (PDB ID: 1cow). En ambas estructuras, los primeros 8 a 23 residuos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , así como los últimos cuatro residuos carboxilo terminales de las subunidades  $\beta$  no están resueltos. Para evitar agregar cargas artificiales, el primer y el último residuo resuelto de cada cadena fue acetilado y metilado, respectivamente. En la estructura de estado basal, los segmentos 402-409 y 388-396 de las cadenas B ( $\alpha_{TP}$ ) y E ( $\beta_E$ ), respectivamente, no están resueltos. Estos residuos corresponden a el segmento asa del motivo HTH en cada subunidad, los cuales fueron modelados como asas usando el programa Modeller v9.20 (Šali & Blundell, 1993). Los segmentos de la subunidad  $\gamma$  45-79 y 87-208 no están resueltos en ambas estructuras. Por lo tanto, sólo los residuos correspondientes a las hélices  $\alpha$  largas fueron incluidos en las simulaciones. Estas hélices permanecieron estables a lo largo de la trayectoria, y las regiones embebidas en el hexámero catalítico mantuvieron invariante su conformación con respecto a las estructuras cristalográficas (RMSD  $<0.5$  Å sobre los átomos pesados de la cadena principal entre la estructura promedio de las simulaciones MD y las estructuras cristalográficas). Se realizaron también simulaciones de dos complejos  $F_1$ -AUR bacterianos. En estos casos, AUR fue acoplada sobre las estructuras cristalográficas de  $F_1$  de *E. coli* (PDB ID: 3oaa (Cingolani & Duncan, 2011)) y *Mycobacterium smegmatis* (PDB ID: 6foc (Zhang et al., 2019)) usando a  $BtF_1$  como plantilla. Las conformaciones de las cadenas laterales que exhibían choques estéricos con el inhibidor fueron modificadas usando la librería de rotámeros. Dunbrack 2010 (Shapovalov & Dunbrack, 2011). En el caso de residuos faltantes, los residuos terminales correspondientes fueron bloqueados de manera similar a  $BtF_1$ . En la enzima micobacteriana, los segmentos 42-46 y 109-113 de las tres subunidades  $\beta$ , ambos en el DNT, fueron modelados. Se

realizaron tres réplicas de 1  $\mu$ s por sistema, acumulándose un tiempo total de simulación de 12  $\mu$ s. Las proteínas fueron protonadas a pH 7.4 usando PDBFixer (Eastman et al., 2017). Todos los nucleótidos e iones  $Mg^{2+}$  fueron incluidos. Los parámetros para ATP y ADP fueron obtenidos de (Meagher et al., 2003). Usando el módulo tLeap de AMBER, la proteína fue colocada en una caja octaédrica trunca, abarcando inicialmente 12 Å desde el soluto en cada dirección, y fue solvatada utilizando el modelo de agua TIP3P (Jorgensen et al., 1983). Se aplicó el esquema de repartición de masa del hidrógeno usando ParmEd (<https://github.com/ParmEd/ParmEd>), lo cual permitió el uso de un tiempo de integración de 4 fs (Hopkins et al., 2015). El sistema fue geoméricamente optimizado durante 5,000 ciclos para ajustar la orientación del solvente y para eliminar choques estéricos locales, usando el algoritmo de descenso escarpado (“steepest descent”). Las velocidades iniciales fueron asignadas para llegar a una distribución de 150 K, elevando lentamente la temperatura hasta alcanzar 310 K en 0.8 ns en el ensamble NVT. El sistema fue sometido a una segunda ronda de equilibración durante 1 ns a 310 K en el ensamble NPT. El tiempo de producción se realizó en el ensamble NPT. Los sistemas fueron simulados usando condiciones periódicas de frontera y sumatoria de Ewald (espaciado de la cuadrícula de 1 Å) implementados en el módulo PMEDM para tratar las interacciones electrostáticas de largo alcance, con un corte de 9 Å para interacciones directas (Darden et al., 1993). El mismo criterio de corte fue utilizado para las interacciones Lennard-Jones. El control de la presión y de la temperatura se logró utilizando el termostato de Langevin con una frecuencia de colisión de 4  $ps^{-1}$  y el baróstato de Berendsen con un tiempo de relajación de presión de 2 ps, respectivamente. El algoritmo SHAKE fue usado para fijar cualquier enlace que involucrara átomos de hidrógeno (Miyamoto & Kollman, 1992; Ryckaert et al., 1977). A menos que se indique lo contrario, no se aplicó alguna otra restricción. Las coordenadas fueron salvadas cada 10 ps. Los archivos de topología y de parámetros necesarios para AUR fueron generados usando el módulo antechamber y el campo de fuerza general de Amber (“General Amber force field, GAFF2) para moléculas orgánicas, usando las cargas atómicas AM1-BCC (Case et al., 2016; J. Wang et al., 2004) (los parámetros resultantes pueden consultarse en el apéndice II).

## Sitios de unión a aurovertina

Los residuos de unión a aurovertina en los sitios  $\beta_E$  y  $\beta_{TP}$  se definieron como aquellos en los que cualquier par de átomos pesados inhibidor-residuo estaba dentro de 5 Å en la estructura cristalográfica del complejo aurovertina-BtF<sub>1</sub>. En ambas cavidades, se encontró el mismo conjunto de residuos haciendo interacción con el inhibidor:  $\beta A^{338}$ ,  $\beta I^{339}$ ,  $\beta L^{342}$ ,  $\beta I^{344}$ ,  $\beta P^{350}$ ,  $\beta L^{351}$ ,  $\beta L^{378}$ ,  $\beta Q^{379}$ ,  $\beta Y^{381}$ ,  $\beta K^{382}$ ,  $\beta Q^{385}$ ,  $\beta Q^{411}$ ,  $\beta R^{412}$ ,  $\beta E^{454}$ ,  $\beta Q^{455}$ ,  $\beta Y^{458}$ ,  $\beta K^{469}$ . Adicionalmente,  $\alpha E^{399}$  se encontró en el sitio de unión de  $\beta_{TP}$ .

## Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica de reducción de la dimensionalidad de los datos que mantiene la máxima información posible (Stein et al., 2006). PCA convierte un conjunto de movimientos correlacionados en un conjunto de componentes principales ortogonales, que contienen la tendencia dominante de los movimientos colectivos de la proteína. Para separar adecuadamente los movimientos generales de la molécula de los internos (Altis et al., 2008), se realizó PCA de ángulo diedro (dPCA) en los residuos del sitio de unión a la aurovertina sobre todos los conformeros de las trayectorias usando CPPTRAJ (Roe & Cheatham, 2013). Estos ángulos se transformaron en un espacio de coordenadas métricas lineales para evitar problemas de circularidad, utilizando las funciones  $\sin(x)$  y  $\cos(x)$ . Después se calculó la matriz de covarianza 2N. El siguiente paso fue la descomposición (diagonalización) de la matriz de covarianza, donde se eliminaron las correlaciones lineales instantáneas entre variables y se calcularon los vectores y los valores propios. Los valores propios se ordenaron de manera descendente. Se construyeron paisajes bidimensionales de energía libre (PEL) proyectados los dos primeros componentes principales PC1 y PC2, utilizando PyEMMA (Scherer et al., 2015) que implementa la siguiente ecuación:

$$F(x) = -k_B * T * \ln P(x) \quad (1)$$

donde  $F(x)$  es el paisaje de energía libre de la coordenada  $x$ ,  $k_B$  la constante de Boltz-

mann,  $T$  es la temperatura absoluta y  $P(x)$  es la distribución de probabilidad de la coordenada  $x$ , tomada del histograma bidimensional de PC1 vs PC2.

## Modelo de estados de Markov

Para identificar la abundancia relativa de conformaciones visitadas, se construyeron modelos de estado de Markov utilizando los conjuntos de datos PC1 y PC2 con la librería de python pyEMMA (Scherer et al., 2015). Se generó un conjunto de 1,000 microestados conformacionales utilizando el método de agrupamiento de k-medias. En MSM, los saltos sin memoria entre estos microestados se describen con la matriz de probabilidad de transición. Esta matriz de transición se construyó utilizando la máxima probabilidad y una estimación bayesiana. Se implementó el análisis de conformeros de Perron-cluster (PCCA) (Deuffhard & Weber, 2005) para agrupar microestados en macroestados con base en similitudes cinéticas.

## Identificación solvente-sitio y acoplamiento guiado

Los sitios solvente se determinaron utilizando el método MDMix, como se describe en (Alvarez-Garcia & Barril, 2014). Se obtuvieron tres réplicas de 20 ns cada una, usando la estructura cristalográfica de  $BtF_1$  en complejo con aurovertina, de la cual se eliminaron las moléculas inhibitorias. Se utilizaron condiciones similares a las mencionadas en la sección de DM, pero con las siguientes diferencias: la proteína fue solvatada en una caja de agua/etanol 80/20% v/v, y se aplicaron restricciones cartesianas de 0.1 kcal/mol  $A^2$  sobre los átomos pesados de la proteína. Después de alinear las trayectorias, se obtuvieron mapas de densidad para el cosolvente orgánico mediante la construcción de una malla estática de cuadrículas en toda la caja de simulación y contando la aparición de los átomos de la sonda en cada cuadrícula durante la trayectoria. La frecuencia observada se convirtió en energía libre de unión ( $\Delta G_{SS}$ ) aplicando la relación de Boltzmann, considerando la distribución atómica de la sonda observada y la distribución esperada en solvente bulto a 1.0 M. Los sitios solvente se filtraron imponiendo un umbral de energía de -1 kcal /mol. Los sitios solvente se utilizaron como guías farmacofóricas para acoplar aurovertina B y compuestos relacionados en el sitio de unión a

la aurovertina utilizando rDock (Ruiz-Carmona et al., 2014). Los estados de protonación del ligando se generaron con Open Babel v. 2.3.1 (O’Boyle et al., 2011).

## Predicción de energías libres de unión relativas

Las energías libres de unión relativas para el complejo ( $G_{PL}$ ) y los reactivos libres ( $G_P$ ,  $G_L$ ) se calcularon con base en el método MM-PBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area). Este método combina la mecánica molecular y un modelo de solvatación continua para calcular las energías libres de enlace de punto final (ecuación 2) (Genheden & Ryde, 2015) (Genheden and Ryde, 2015). Para realizar este cálculo se utilizó la aproximación de trayectoria única (E. Wang et al., 2019). No se observó convergencia utilizando las aproximaciones de dos o tres trayectorias. Los cambios de energía libre ( $\Delta G$ ) y su descomposición por residuo de unión se calcularon con MMPBSA.py (Miller et al., 2012) de acuerdo con:

$$\Delta G_b = \langle G_{PL} - G_P - G_L \rangle = \Delta H - T\Delta S = \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv} - T\Delta S \quad (2)$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{int} + \Delta E_{ele} + \Delta E_{vdW} \quad (3)$$

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{NP} \quad (4)$$

$$\Delta G_{NP} = \gamma * SASA + b + E_{disp} \quad (5)$$

donde  $\Delta E_{MM}$  es el cambio de energía potencial en el vacío,  $\Delta G_{solv}$  es la energía de solvatación y  $T\Delta S$  es el cambio de entropía conformacional.  $\Delta E_{MM}$  se divide en cambios de energías covalentes ( $\Delta E_{int}$ ), electrostáticas ( $\Delta E_{ele}$ ) y van der Waals ( $\Delta E_{vdW}$ ). La energía libre de solvatación ( $\Delta G_{solv}$ ) consta de las energías de solvatación polar y no polar (ecuación 4). El primer término se calcula resolviendo la ecuación de Poisson-Boltzmann. En un sentido amplio, esto significa calcular la energía asociada con la transferencia de carga del vacío al continuo. El segundo modela la formación de cavidades de soluto y las interacciones no electrostáticas entre el soluto y el continuo cerca de la cavidad. Esto generalmente se calcula con una aproximación

basada en el área de la superficie y un término de interacción atractiva entre el soluto y el solvente ( $E_{disp}$ ).  $T\Delta S_{conf}$  contiene las entropías derivadas del cambio del número de partículas y la congelación de enlaces giratorios. La primera contribución tiene una penalización de  $\approx 3$  kcal/mol (Amzel, 1997; García-Hernández & Hernández-Arana, 1999); la segunda generalmente se calcula empleando el análisis de modo normal o la aproximación cuasi-armónica (Chang et al., 2005; L. Wang et al., 2015), aunque este término no se calculó en este estudio, ya que el enfoque de trayectoria única no se consideran los cambios estructurales asociados con la unión del ligando, además por el tamaño del sistema, aunado a que este cálculo no mejora los cálculos de energía. Los cálculos de  $\Delta G_b$  se realizaron utilizando 400 conformeros (“snapshots”) espaciados cada 6 ns. Las constantes dieléctricas ( $\epsilon$ ) para solvente y soluto se establecieron en 80 y 2, respectivamente, utilizando una fuerza iónica de 150 mM.  $\Delta G_{NP}$  se modeló incluyendo términos de cavidad y dispersión, calculados como una relación lineal proporcional al área superficial accesible al solvente (SASA) y como un método integrado basado en superficie (Tan et al., 2007), respectivamente. Se utilizaron los radios basados en el tipo de átomo/carga (Tan et al., 2006). Se utilizó superficie lisa (“smooth surface”, sasopt=2), con valores de  $\gamma$  y  $b$  de  $0.0378 \text{ kcal/mol\AA}^2$  y  $-0.5692 \text{ kcal/mol}$ , respectivamente (Ye et al., 2010). Los archivos de topología necesarios se crearon utilizando el script de ante-MMPBSA.py implementado en AmberTools.

## Análisis de secuencia del sitio de unión a AUR

Secuencias de la subunidad  $\beta$  de  $F_0F_1$ -ATP sintasas bacterianas fueron descargadas de la base de datos UniProt (Bateman et al., 2021). El programa Jalview2 (Waterhouse et al., 2009) fue usado para curar la base de datos, excluyendo las secuencias (identidad  $< 100\%$ ). La base de datos curada fue usada para generar el alineamiento de secuencias múltiple con el programa Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014). El logo de secuencias fue generado usando el servidor Weblogo3 (Crooks et al., 2004). Virtualmente, los mismos resultados fueron obtenidos utilizando cortes de 98 y 99% de identidad de secuencias.

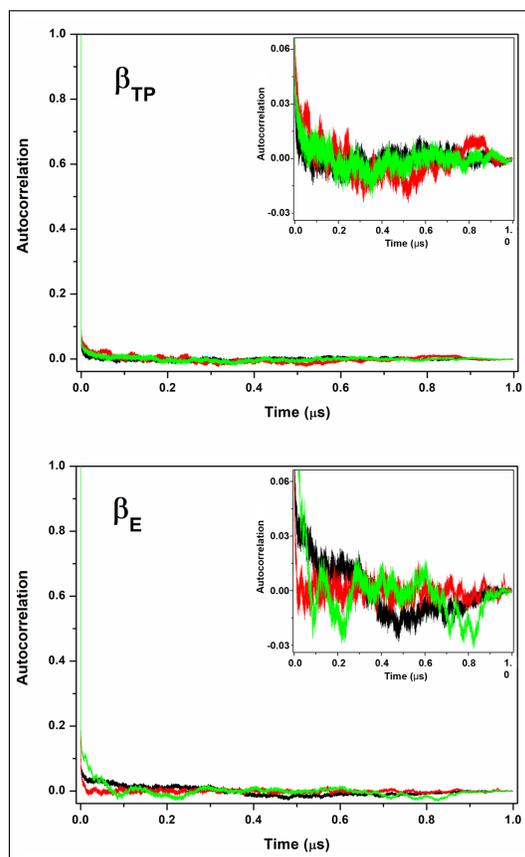
# Resultados

## Patrones de interacción proteína-inhibidor

Se realizó la caracterización computacional de la interacción de  $F_1$  con AUR ( $AUR^+$ ), utilizando la estructura cristalográfica del subcomplejo de bovino unido a dos moléculas del inhibidor (van Raaij et al., 1996). Como estructura de referencia del subcomplejo sin AUR ( $AUR^-$ ), se usó la estructura denominada estado basal (Bowler et al., 2007). Estas estructuras, como la mayoría de las resueltas experimentalmente hasta el momento, se encuentran en la conformación de espera catalítica, que corresponde a un subpaso de  $40^\circ$  del ciclo rotatorio (Sobti et al., 2021). Por tanto, el siguiente análisis se circunscribe al estudio del comportamiento conformacional de este estado metaestable en el ciclo rotatorio de la enzima. En la estructura cristalográfica del complejo  $BtF_1$ , AUR muestra el mismo modo de unión en los sitios  $\beta_{TP}$  y  $\beta_E$  ( $\beta_{TP-AUR^+}$  y  $\beta_E-AUR^+$ , respectivamente) interactuando con un conjunto idéntico de 17 residuos de subunidades  $\beta$  que se encuentran hasta  $5 \text{ \AA}$  del inhibidor (Figura 3A). Cada sitio está compuesto por **1)** seis residuos hidrófobos del DUN:  $\beta A^{338}$ ,  $\beta I^{339}$ ,  $\beta L^{342}$ , en la última hélice del DUN, y  $\beta I^{344}$ ,  $\beta P^{350}$ ,  $\beta L^{351}$ , en el asa que precede a DCT, y **2)** once residuos del DCT: tres residuos hidrófobos ( $\beta L^{378}$ ,  $\beta Y^{381}$ , en el motivo hélice-giro-hélice (HTH) del DCT, y  $\beta Y^{458}$ , en el último giro del dominio) y ocho residuos polares ( $\beta Q^{379}$ ,  $\beta K^{382}$ ,  $\beta Q^{385}$ ,  $\beta Q^{411}$  y  $\beta R^{412}$ , en HTH, y  $\beta E^{454}$ ,  $\beta Q^{455}$  y  $\beta K^{469}$  en las dos últimas hélices de la proteína). Los residuos polares contactan al inhibidor principalmente a través de sus átomos no polares, por lo que la interacción es predominantemente hidrofóbica. Las cadenas laterales de  $\beta Q^{411}$  y  $\beta R^{412}$  forman un puente de hidrógeno con los oxígenos del carbonilo del biciclo (O25) y del anillo pirona (O19), respectivamente. La pirona forma un apilamiento  $\pi$ - $\pi$  con  $\beta Y^{458}$ . El sitio de unión a  $\beta_{TP}$  contiene además al residuo  $\alpha E^{399}$ , localizado en el HTH de la subunidad  $\alpha_{TP}$ , el cual hace un contacto de van der Waals con el átomo AUR O17 ( $> 20 \text{ \AA}$  en  $\beta_E$ ).

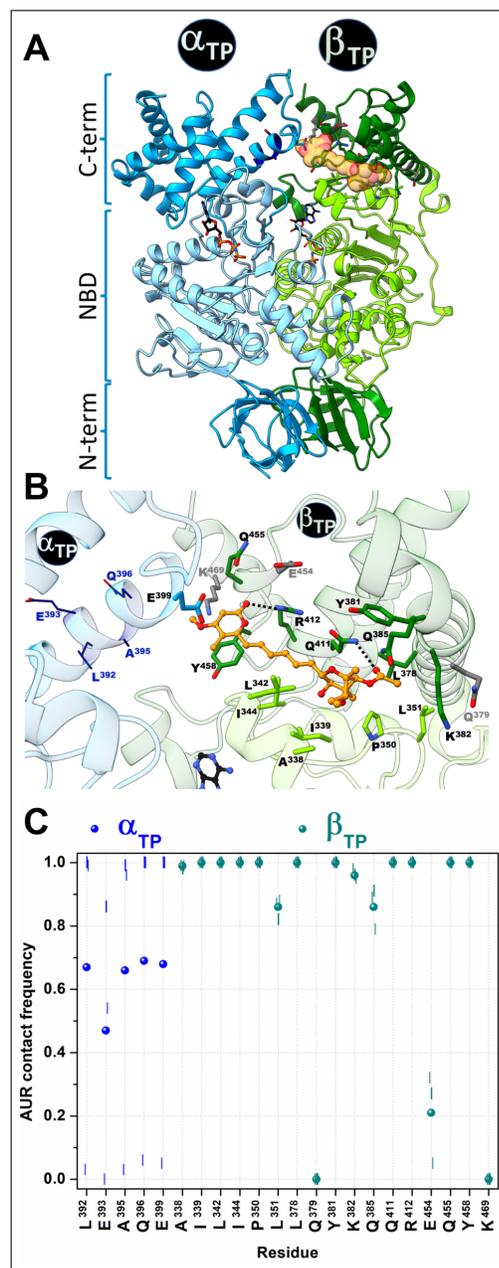
Para caracterizar la dinámica de las interacciones proteína-inhibidor, se realizaron tres réplicas de DM de  $1 \mu s$  cada una para  $BtF_1$  unida a las dos moléculas de AUR, un tiempo

**Figura 2:** *Función de autocorrelación de cadena principal de ángulos diedros de residuos del sitio de unión a AUR. Para el análisis de autocorrelación con CPPTRAJ, se calculó la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de cada valor de  $\phi$  y  $\psi$  para cada confórmero en función del tiempo. Los recuadros son acercamientos de las correspondientes gráficas. Se produjeron tres réplicas de DM, las cuales se muestran en negro, rojo y verde.*

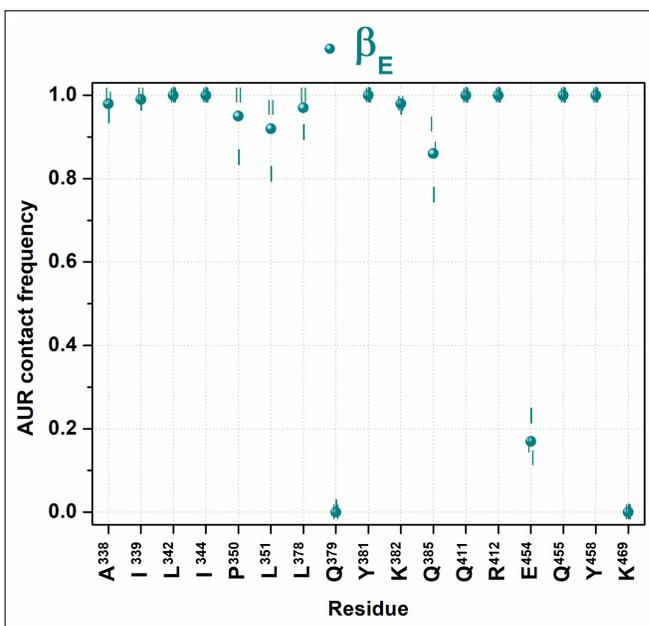


que es 2-3 órdenes de magnitud menor que la velocidad de rotación real de la enzima (Sekiya et al., 2017). Un análisis de autocorrelación de los ángulos diedros de la cadena principal indicó que la relajación de ambos sitios de unión se produjo dentro de los primeros 0.2  $\mu\text{s}$  de simulación (Figura 2). Por lo tanto, el análisis se realizó sobre una trayectoria concatenada de los últimos 0.8  $\mu\text{s}$  de cada réplica, dando un total de 2.4  $\mu\text{s}$  analizados por sistema. Tres residuos de la subunidad  $\beta$  ( $\beta Q^{379}$ ,  $\beta E^{454}$ ,  $\beta K^{469}$ ) perdieron la interacción con el inhibidor en ambos sitios de unión durante la simulación (residuos grises en la Figura 3B), con frecuencias de contacto acumuladas  $<0.25$  (Figura 3C). Por lo tanto, estos residuos se excluyeron de los análisis posteriores. Se establecieron patrones de interacción similares con el inhibidor en  $\beta_E$  (Figura 4).

**Figura 3:** Análisis de contactos del sitio de unión a AUR en la subunidad  $\beta_{TP}$ . En la estructura cristalográfica de BtF<sub>1</sub> en complejo con AUR B (PDB ID: 1cow), una molécula inhibidora está unida a  $\beta_{TP}$  y una segunda a  $\beta_E$ . Solo se muestra el sitio  $\beta_{TP}$ . **A)** Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  tienen una organización de tres dominios: un dominio barril  $\beta$  N-terminal (DNT), un dominio central de unión a nucleótidos (DUN) y un dominio helicoidal C-terminal. Los sitios de unión de aurovertina están en posiciones equivalentes en  $\beta_E$  y  $\beta_{TP}$ , en una cavidad entre DUN y DCT. AUR y nucleótidos se muestran en esferas y "sticks" amarillos, respectivamente. **B)** Estructura del sitio de unión de AUR. Los residuos dentro de los 5 Å del inhibidor se muestran en barras. Tres residuos de la subunidad  $\beta$  que perdieron contacto con AUR durante las simulaciones de DM están en gris. Cuatro residuos de la subunidad  $\alpha$  (que se muestran en la estructura alámbrica) que inicialmente estaban a  $> 5 \text{ \AA}$  del inhibidor, entraron en estrecho contacto con éste durante las simulaciones. AUR se muestra en "balls-and-sticks". Los puentes de hidrógeno entre  $\beta R^{412}\text{-O19}$  y  $\beta Q^{411}\text{-O25}$ , que permanecieron formados a lo largo de las simulaciones, se muestran con líneas punteadas negras. **C)** Frecuencia acumulada de interacción AUR-proteína observada en las simulaciones de DM. Los resultados de las trayectorias individuales se muestran como líneas verticales; los símbolos circulares corresponden a los valores medios de las tres réplicas.



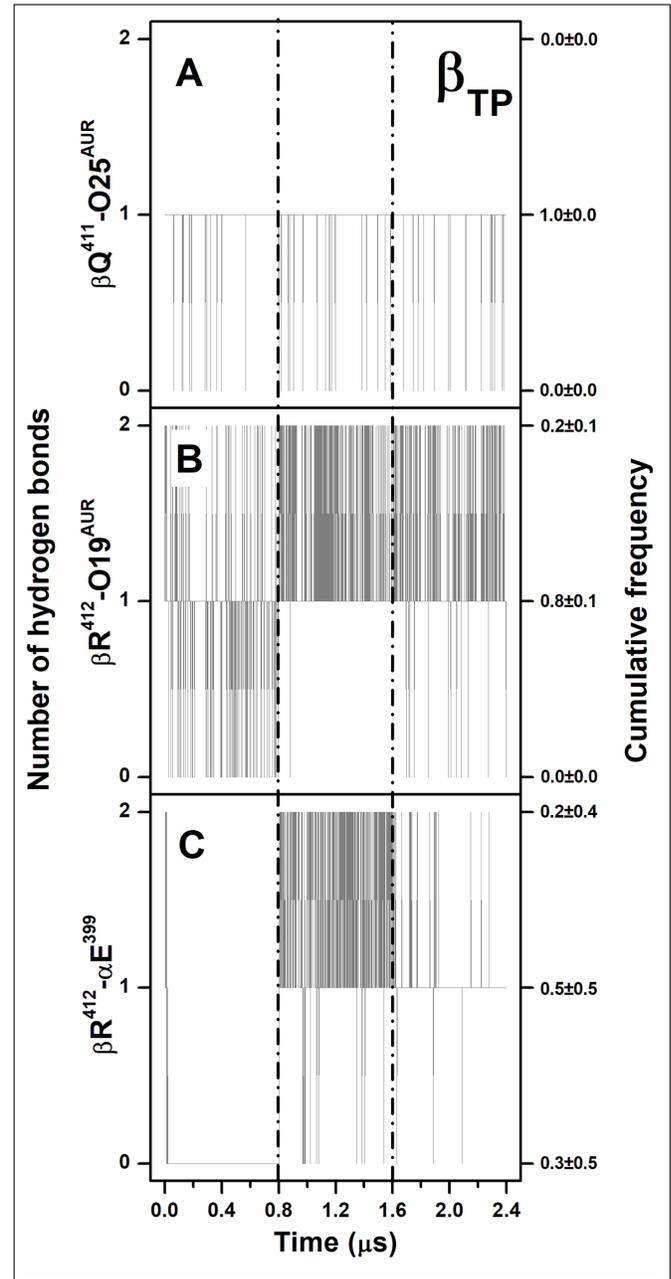
**Figura 4:** *Análisis de contactos en el sitio de unión a AUR en  $\beta_E$ . Frecuencia acumulada de interacción AUR-proteína observada en las simulaciones de DM. Los resultados de las trayectorias individuales se muestran como líneas verticales; los símbolos circulares corresponden a los valores medios de las tres réplicas.*

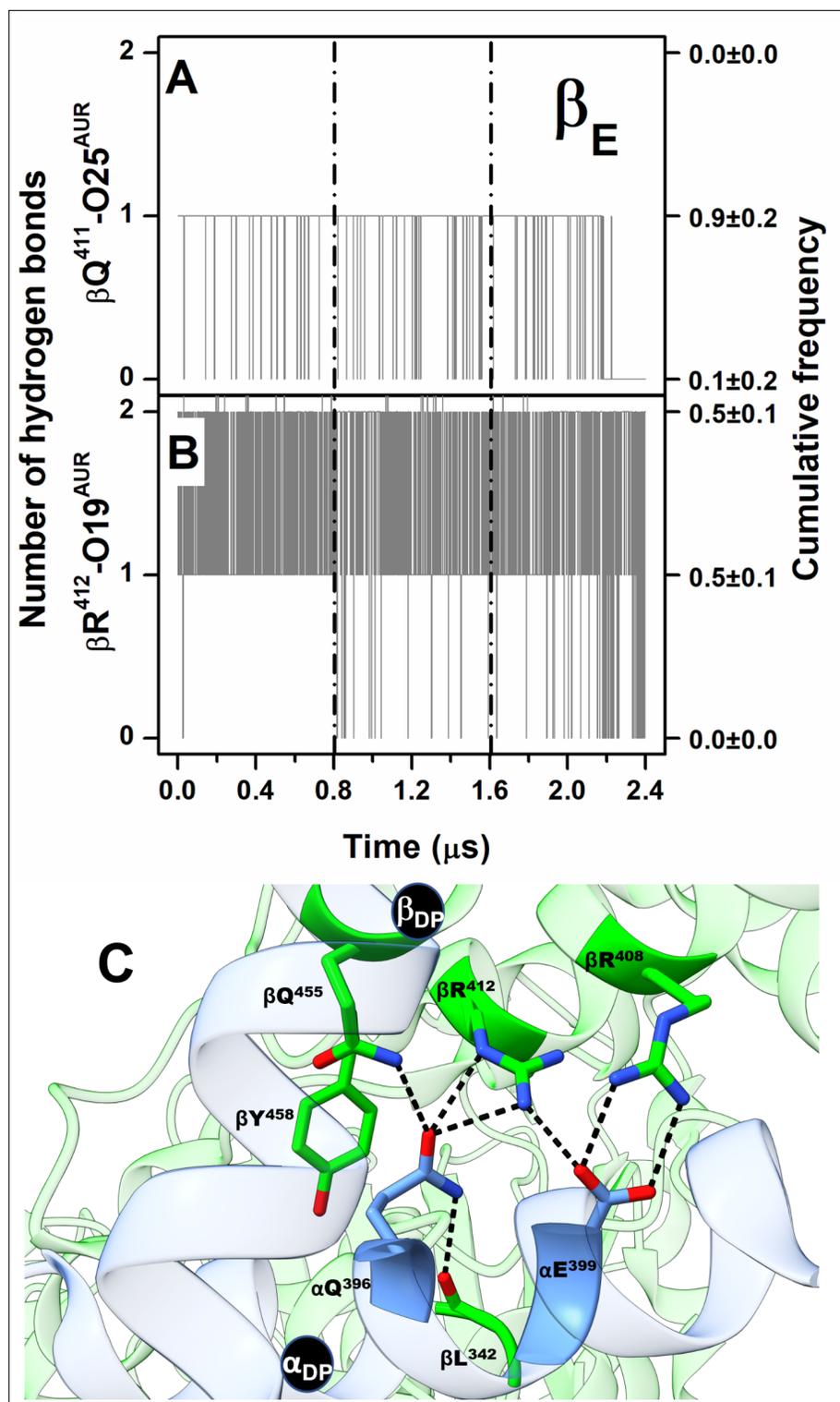


La subunidad  $\alpha_{TP}$  presentó una gran variabilidad conformacional. En dos trayectorias, el motivo HTH de esta subunidad se acercó a AUR, por lo que cuatro residuos adicionales ( $\alpha L^{392}$ ,  $\alpha E^{393}$ ,  $\alpha A^{395}$ ,  $\alpha Q^{396}$ ) contactaron persistentemente al inhibidor (Figura 3C). En la otra trayectoria, este HTH se mantuvo alejado de AUR, e incluso la interacción con  $\alpha E^{399}$  se interrumpió por completo. En promedio, cada uno de estos cuatro residuos de  $\alpha_{TP}$  tuvo una frecuencia de contacto acumulada  $> 0.5$ , por lo que, junto con  $\alpha E^{399}$ , se consideraron como residuos de unión de AUR. En general, los modos de unión y de interacción de AUR observados en la estructura cristalográfica se mantuvieron en ambos sitios de unión durante las trayectorias de DM. Los puentes de hidrógeno entre  $\beta R^{412}$ -O19 y  $\beta Q^{411}$ -O25 permanecieron formados a lo largo de las simulaciones, excepto en el sitio  $\beta_E$ , donde el puente  $\beta Q^{411}$ -O25 se rompió en los últimos  $0.3 \mu s$  de una de las trayectorias debido a la disociación parcial del ligando (Figuras 5A-B y S6A-B). Recurrentemente, los residuos  $\alpha E^{399}$  y  $\beta R^{412}$ , que están a  $8-10 \text{ \AA}$  entre sí en las estructuras cristalográficas, formaron un puente salino en el sitio  $\beta_{TP}$  (Figura 3C). Este contacto, ya sea mono o bidentado, estuvo presente en  $\approx 70\%$  y  $\approx 90\%$  para  $AUR^+$  y  $AUR^-$ , respectivamente. La interacción entre  $\beta Q^{455}$  y  $\alpha E^{399}$  se observó  $\approx 60\%$  del tiempo para  $AUR^-$ , mientras que en  $AUR^+$  se bloqueó por completo esta interacción. Aunque esporádicamente ( $\approx 2\%$ ), se observó para  $AUR^-$  la interacción entre  $\beta R^{408}$  y  $\alpha E^{399}$ , residuos que están separados  $\approx 10 \text{ \AA}$  entre sí en la estructura cristalográfica. Esta red de puentes de hidrógeno

ocluyó transitoriamente el sitio  $\beta_{TP}$ , generando un impedimento estérico para el acceso de AUR. Interesantemente,  $\beta R^{408}$ ,  $\beta R^{412}$ ,  $\beta Q^{455}$  y  $\alpha E^{399}$  son parte de una red cooperativa de puentes de hidrógeno (en la que también participa  $\alpha Q^{396}$ ) que estabiliza la interacción entre los DCT de  $\alpha_{DP}$  y  $\beta_{DP}$ , como se ilustra en la Figura 6C (Mao et al., 2008). Por lo tanto, estos resultados sugieren que  $\alpha_{TP}$  y  $\beta_{TP}$  exhiben una clara tendencia a interactuar entre sí hacia la adopción de una conformación similar a  $\alpha_{DP}/\beta_{DP}$  (Figura 6C). La importancia de esta red de puentes de hidrógeno ha sido demostrada a través de experimentos de mutagénesis dirigida, demostrándose que su perturbación afecta la actividad catalítica e incluso puede impedir el ensamblaje de la enzima (Mao et al., 2008). Es importante resaltar que estas mutaciones no cambian la afinidad por los nucleótidos (Ichikawa et al., 2005; Mao et al., 2008). Por lo tanto, AUR parece debilitar la interacción entre los DCT de  $\alpha_{TP}$  y  $\beta_{TP}$ , lo que sugiere que la acción de este inhibidor está parcialmente relacionada con la interrupción de la comunicación dinámica de los cambios conformacionales entre estas subunidades. En concordancia con esto, inhibidores como IF1,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  o glicomacrólidos previenen la formación de las interacciones establecidas en la interfaz de los DCT de las subunidades  $\alpha_{DP}$  y  $\beta_{DP}$  (Cabezón et al., 2003; Cingolani & Duncan, 2011; Morales-Rios et al., 2015; Reisman et al., 2022).

**Figura 5:** Puentes de hidrógeno en  $\beta_{TP}\text{-AUR}^+$ . *A,* *B)* Puentes de hidrógeno entre proteína-inhibidor. *C)* Puentes de hidrógeno  $\alpha_{TP}\text{-}\beta_{TP}$ . Se muestran los resultados para las tres réplicas concatenadas, después de haber sustraído los primeros  $0.2 \mu\text{s}$  de cada simulación. Las trayectorias para cada réplica están delimitadas por líneas punteadas. La frecuencia acumulada se refiere a la fracción total de tiempo que cada número de puentes de hidrógeno fue observado en las simulaciones.



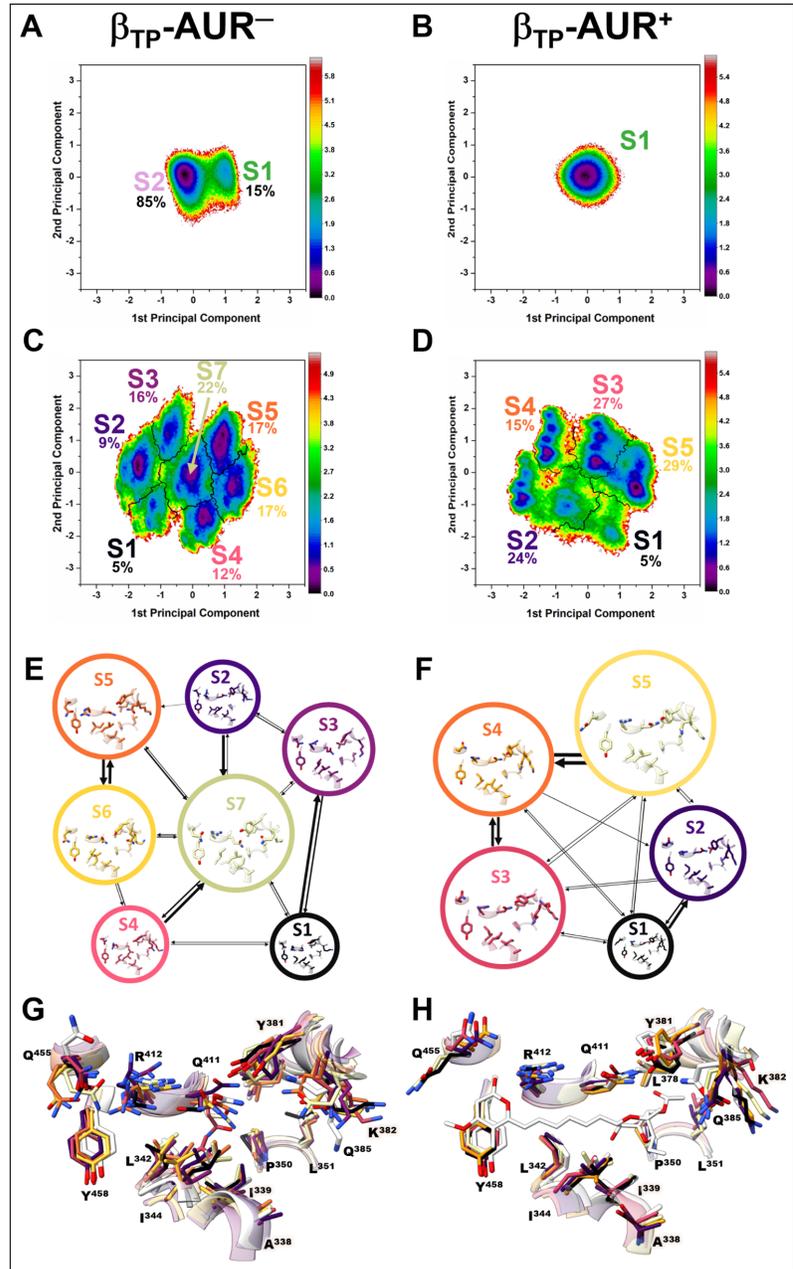


**Figura 6:** Puente de hidrógeno proteína-inhibidor en el sitio de unión de AUR en  $\beta_E$  y red de puentes de hidrógeno entre residuos DCT de  $\alpha_{DP}$  y  $\beta_{DP}$ . A)  $\beta Q^{411}-O25$ . B)  $\beta R^{412}-O19$ . Se muestran los datos de las tres réplicas concatenadas, después de restar los primeros  $0.2 \mu s$  de simulación de cada una de ellas. Las trayectorias de cada réplica están delimitadas por líneas discontinuas. Las frecuencias acumulativas se refieren a la fracción total de tiempo en que se observó cada número de puentes de hidrógeno en las simulaciones. C) Puentes de hidrógeno formados por residuos  $\alpha_{DP}$  (en azul) y  $\beta_{DP}$  (en verde), ocluyendo el sitio de unión de AUR.

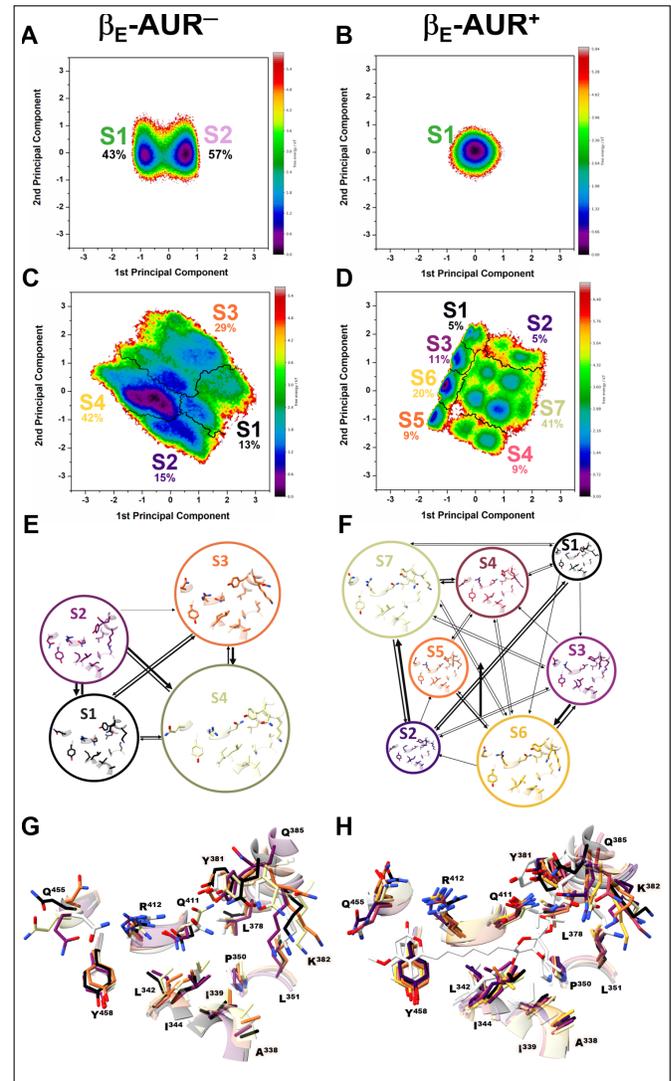
## Dinámica conformacional del sitio de unión a AUR

Se realizó un análisis de componentes principales sobre los ángulos diedros para evaluar las fluctuaciones conformacionales de los sitios de unión de AUR. El uso de estas coordenadas internas permite una adecuada separación entre las fluctuaciones internas y la dinámica molecular general (Altis et al., 2008). La Figura 7 muestra el paisaje conformacional del sitio de unión a  $\beta_{TP}$ . Los resultados de  $\beta_E$  se muestran en la Figura 8. Un análisis de los ángulos diedros de la cadena principal reveló dos cuencas de atracción (S1 y S2) para  $AUR^-$  que, según una inspección de los conformeros de cada estado, varían significativamente solo en el ángulo  $\psi$  de  $\beta I^{344}$  (Figuras 7A y 8A). S1 adoptó un valor de  $\psi=120\pm 13^\circ$ , la cual es una conformación similar a la observada en las dos estructuras cristalográficas de  $BtF_1$ , mientras que S2 se distribuyó alrededor de  $\psi=57\pm 11^\circ$ . S1 estuvo menos poblado en  $\beta_{TP}$  y casi equipoblado con S2 en  $\beta_E$  (Figura 8A). AUR disminuyó la dinámica general de ambos sitios a una amplitud similar (Figuras 7A y 7B), poblando la misma cuenca y única de atracción equivalente a S1 (Figuras 7B y 8B), es decir, la conformación cristalográfica. Debido a la mayor movilidad del sitio de unión libre de ligando en  $\beta_E$ , el inhibidor indujo una mayor rigidez de la cadena principal en comparación con el sitio  $\beta_{TP}$ . Los cinco residuos de  $\alpha_{TP}$  también formaron una sola cuenca de atracción para  $AUR^+$  y tres cuencas para  $AUR^-$  (Figura 9).

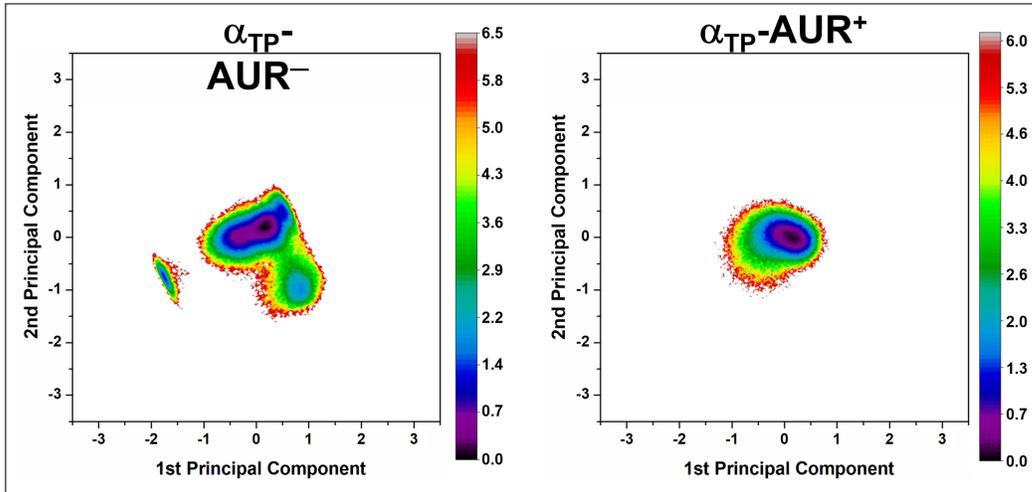
**Figura 7:** Paisajes de energía libre (PEL) calculados de ángulos diedros de residuos del sitio de unión a AUR en  $\beta_{TP}$ . PEL (en unidades de  $kBT$ ) fueron obtenidos a partir de un dPCA proyectado sobre los primeros componentes principales en la ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) del inhibidor. **A,B**) dPCA de cadena principal. Uno y dos estados conformacionales metaestables fueron observados para  $AUR^+$  (S1) y  $AUR^-$  (S1, S2), respectivamente. El porcentaje de frecuencia acumulada es indicado. La principal diferencia entre S1 y S2 fue el valor del ángulo  $\psi$  de  $I^{344}$ . **C,D**) dPCA de cadena lateral. Las líneas negras delimitan los macroestados identificados a través de un análisis de modelos de estado de Markov. **E,F**) Ruta de transición de red conformacional del modelo de estado de Markov. El espesor de las flechas de conexión es proporcional a la probabilidad de transición. **G,H**) Superposición de conformaciones representativas de cada cuenca de atracción en **E,F**).



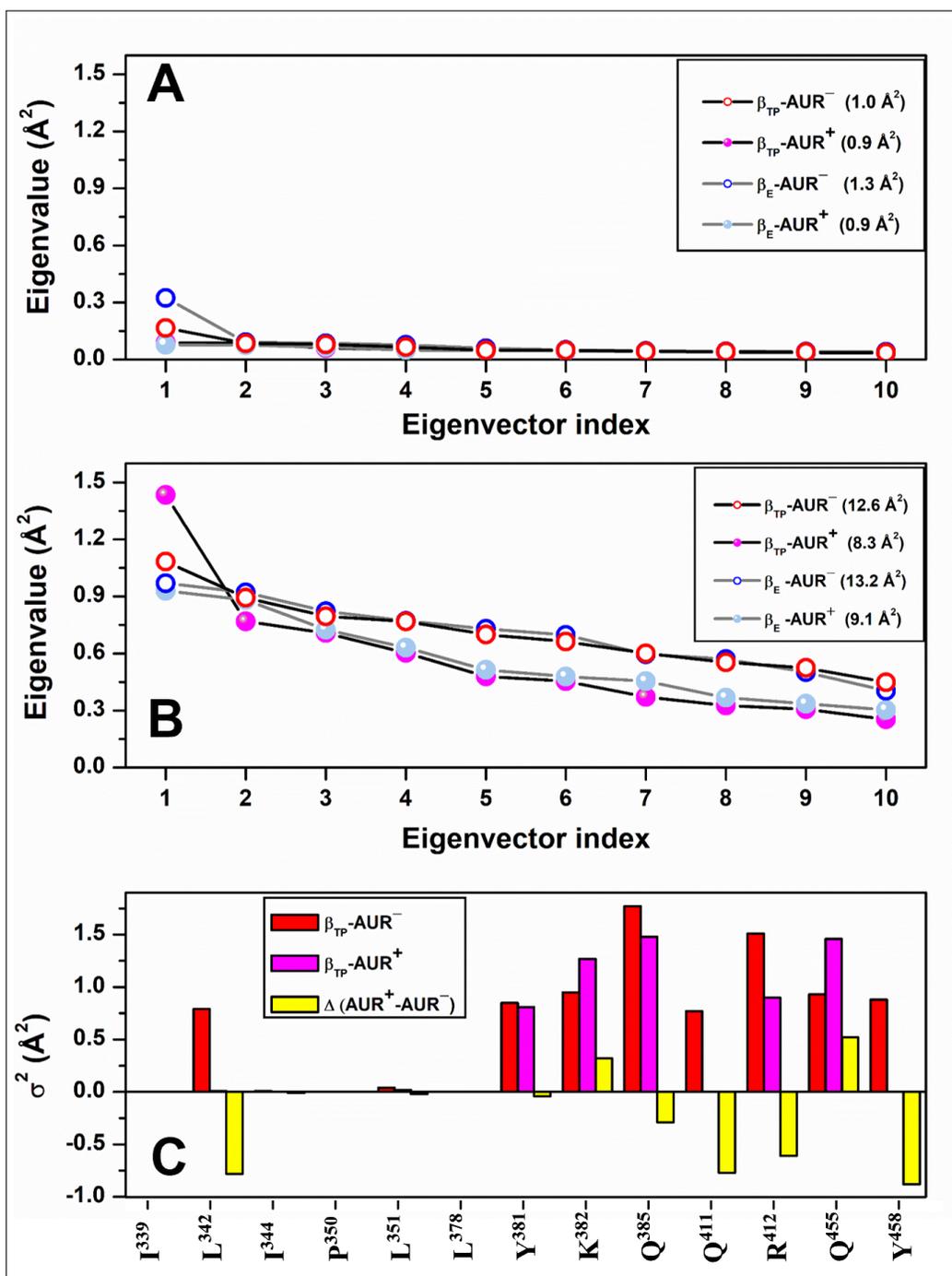
**Figura 8:** Paisajes de energía libre (PEL) calculados de ángulos diedros de residuos del sitio de unión a AUR en  $\beta_E$ . PEL (en unidades de kBT) fueron obtenidos a partir de un dPCA proyectado sobre los primeros componentes principales en la ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) del inhibidor. **A,B)** dPCA de cadena principal. Uno y dos estados conformacionales metaestables fueron observados para  $AUR^+$  (S1) y  $AUR^-$  (S1, S2), respectivamente. El porcentaje de frecuencia acumulada es indicado. La principal diferencia entre S1 y S2 fue el valor del ángulo  $\psi$  de  $I^{344}$ . **C,D)** dPCA de cadena lateral. Las líneas negras delimitan los macroestados identificados a través de un análisis de modelos de estado de Markov. **E,F)** Ruta de transición de red conformacional del modelo de estado de Markov. El espesor de las flechas de conexión es proporcional a la probabilidad de transición. **G,H)** Superposición de conformaciones representativas de cada cuenca de atracción en **E,F**.



Un análisis de los ángulos diedros de cadenas laterales reveló un comportamiento conformacional más complejo, compuesto por varias cuencas de atracción (Figuras 7C y 8C). El número de cuencas de atracción y la varianza total disminuyeron para  $AUR^+$  (Figuras 7D, 10B y 8D). En  $\beta_{TP}$ , el inhibidor congeló por completo las cadenas laterales de  $\beta L^{342}$ ,  $\beta Q^{411}$  y  $\beta Y^{458}$ , mientras que las cadenas laterales de  $\beta I^{339}$ ,  $\beta I^{344}$ ,  $\beta P^{350}$ ,  $\beta L^{351}$  y  $\beta L^{378}$  ya estaban congeladas sin el inhibidor (Figuras 4E-H y 5C).  $\beta Q^{385}$  y  $\beta R^{412}$  disminuyeron parcialmente su movilidad con AUR, mientras que los residuos periféricos  $\beta K^{382}$  y  $\beta Q^{455}$  la aumentaron ligeramente. Finalmente, independientemente de la presencia de AUR,  $Y^{381}$  tenía casi la misma movilidad. Se observaron resultados similares para  $\beta_E$  (Figura 10). En general, estos resultados mostraron que el sitio de unión a AUR se encuentra preformado en ambas subunidades catalíticas, experimentando con la unión al inhibidor reordenamientos y restricciones conformacionales relativamente menores, aunque la reducción de la movilidad fue mayor en el sitio  $\beta_E$ .

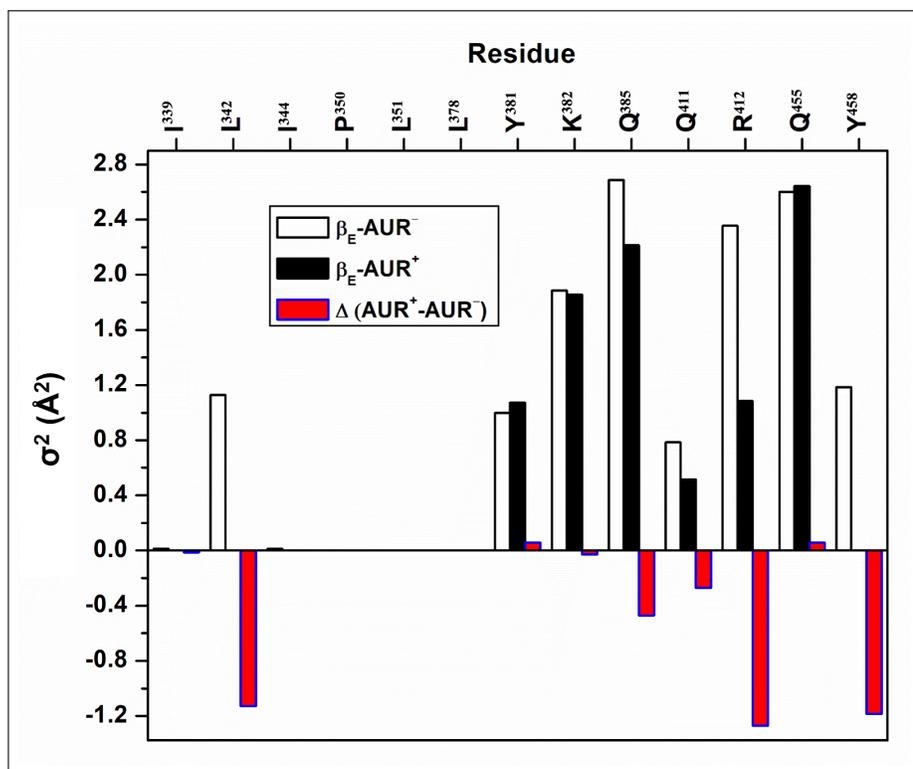


**Figura 9:** Paisajes de energía libre de ángulo diedro (PEL) para residuos de  $\alpha_{TP}$ .  $L^{392}$ ,  $E^{393}$ ,  $A^{395}$ ,  $Q^{396}$  y  $E^{399}$  contactaron con AUR en el sitio de unión de  $\beta_{TP}$ . Los PEL (en unidades de kBT) se obtuvieron a partir de un dPCA de cadena principal proyectado sobre los dos primeros componentes principales en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) del inhibidor.



**Figura 10:** Gráfico de valores propios (“scree plot”) a partir de dPCA de residuos del sitio de unión a AUR. La distribución de los valores propios para los primeros 10 vectores propios de ángulos diedros cadena principal y cadenas laterales se muestran en A) y B), respectivamente. Los valores entre paréntesis indican la varianza total para el sistema indicado. C) Varianza acumulada por residuo  $\sigma^2$  de cadenas laterales en el sitio  $\beta_{TP}$ .  $\Delta(AUR^+ - AUR^-)$  es la diferencia de  $\sigma^2$  en presencia menos en ausencia del inhibidor. Los valores corresponden al 70% de la varianza total.

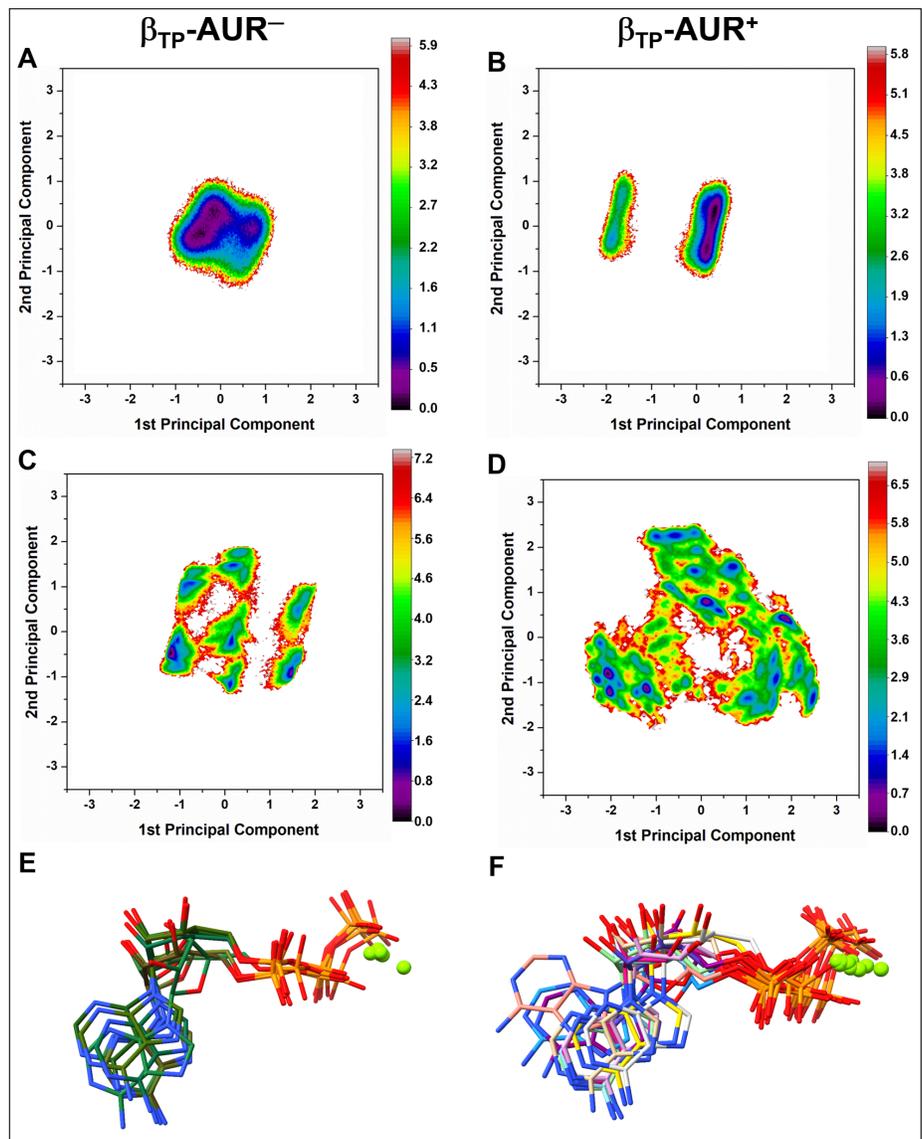
**Figura 11:** Varianza acumulada por residuo ( $\sigma^2$ ) de cadenas laterales en el sitio  $\beta_E$ .  $\Delta(AUR^+ - AUR^-)$  es la diferencia de  $\sigma^2$  en presencia menos en ausencia del inhibidor. Los valores corresponden al 70 % de la varianza total.



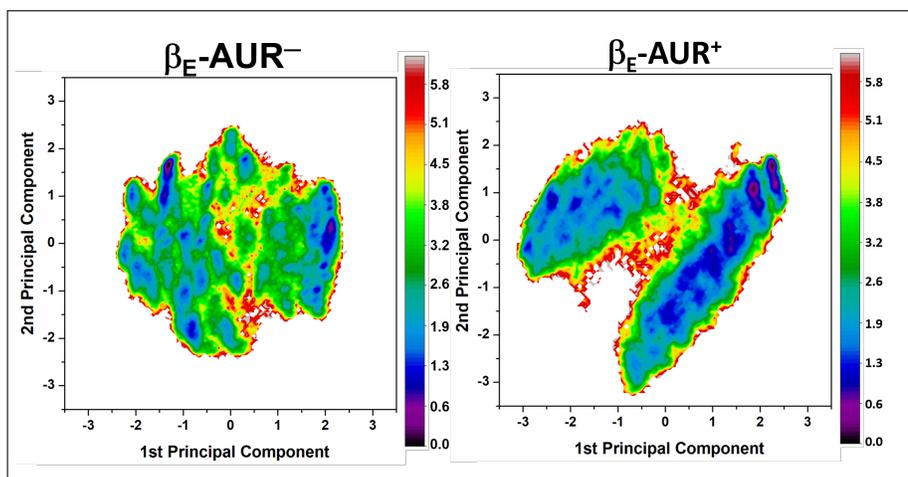
## Efectos de AUR en los sitios catalíticos

Los estudios *in vitro* han demostrado que AUR ejerce un leve efecto cooperativo positivo en los sitios catalíticos de  $BtF_1$  y  $EcF_1$  (Al-Shawi et al., 1990; Issartel & Vignais, 1984; Issartel et al., 1983b, 1983a; Johnson et al., 2009; Satre et al., 1980; van Raaij et al., 1996; Weber & Senior, 1998; Wise et al., 1983). AUR aumenta las afinidades de ADP/ATP entre 3 y 7 veces ( $\approx 0.4$ - $1.1$  kcal/mol de energía libre de Gibbs). Asimismo, la citreoviridina, molécula similar a AUR, disminuye la  $K_m$  en  $F_1$  de *Trypanosoma cruzi* (Cataldi de Flombaum & Stoppani, 1981). La distancia más cercana entre los átomos AUR y ATP en  $\beta_{TP}$  es  $\approx 12$  Å. Por lo tanto, además de actuar como bloqueador físico, AUR tiene efectos sobre  $F_1$  más allá de sus propios sitios de unión. Para investigar estos efectos, analizamos las propiedades conformacionales de los sitios de unión a nucleótidos en  $\beta_{TP}$  y  $\beta_E$ . La Figura 12 muestra los paisajes conformacionales para la cadena principal y los ángulos diedros de los residuos de unión a nucleótidos en  $\beta_{TP}$ . Sorprendentemente, se observaron paisajes más complejos y movilidades más grandes para  $AUR^+$  en  $\beta_{TP}$  (Figuras 6A-D y 7). Adicionalmente, se observó un aumento significativo de la movilidad de ATP para  $AUR^+$  (Figura 12E-F). Interesantemente, incluso en ausencia de

**Figura 12:** Paisajes de energía libre (PEL) calculados de ángulos diedros de residuos del sitio de unión a nucleótidos en  $\beta_{TP}$ . **A)** PEL de cadena principal para  $AUR^-$ . **B)** PEL de cadena principal para  $AUR^+$ . **C)** PEL de cadena lateral para  $AUR^-$ . **D)** PEL de cadena lateral para  $AUR^+$ . PEL (en unidades de kBT) fueron obtenidos a partir de un dPCA proyectado sobre los dos primeros componentes principales en la ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) del inhibidor. Residuos con ángulos  $\chi$  ( $V^{160-164}$ ,  $R^{189}$ ,  $T^{190}$ ,  $R^{260}$ ,  $Y^{311}$ ,  $Y^{345}$ ,  $P^{346}$ ,  $Q^{416}$ ,  $F^{418}$ ,  $F^{424}$ ,  $T^{425}$ ) hasta 5 Å del nucleótido en  $\beta_E$  fueron incluidos en el análisis. **E)** y **F)** Conformaciones representativas de MgATP para  $AUR^-$  y  $AUR^+$ , respectivamente. Los átomos de magnesio se muestran como esferas verdes.

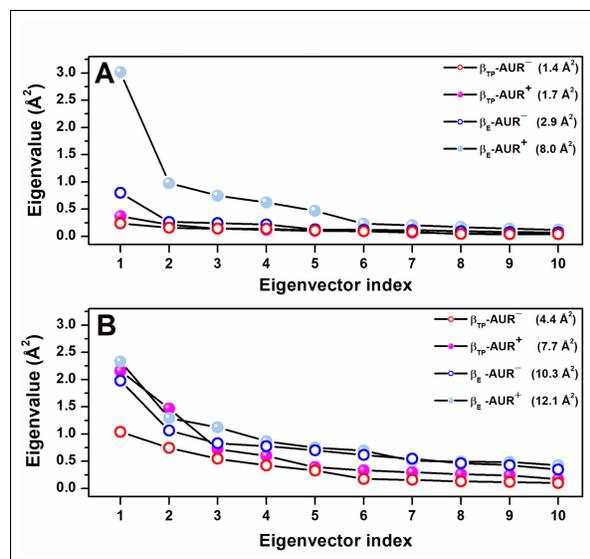


nucleótidos en el sitio catalítico, se observó una mayor movilidad en  $\beta_E$  para  $AUR^+$  en comparación con  $AUR^-$  (Figuras 13 y 14). En general, estos resultados son consistentes con una entropía conformacional favorable que contribuye al aumento de la afinidad por los nucleótidos provocado por el inhibidor.



**Figura 13:** Paisajes de energía libre (PEL) calculados de ángulos diedros de residuos del sitio de unión a nucleótidos en  $\beta_E$ . PEL (en unidades de  $kBT$ ) fueron obtenidos a partir de un dPCA proyectado sobre los dos primeros componentes principales en la ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) del inhibidor. Residuos con ángulos  $\chi$  ( $V^{160-164}$ ,  $R^{189}$ ,  $T^{190}$ ,  $R^{260}$ ,  $Y^{311}$ ,  $Y^{345}$ ,  $P^{346}$ ,  $Q^{416}$ ,  $F^{418}$ ,  $F^{424}$ ,  $T^{425}$ ) hasta 5 Å del nucleótido en  $\beta_E$  fueron incluidos en el análisis.

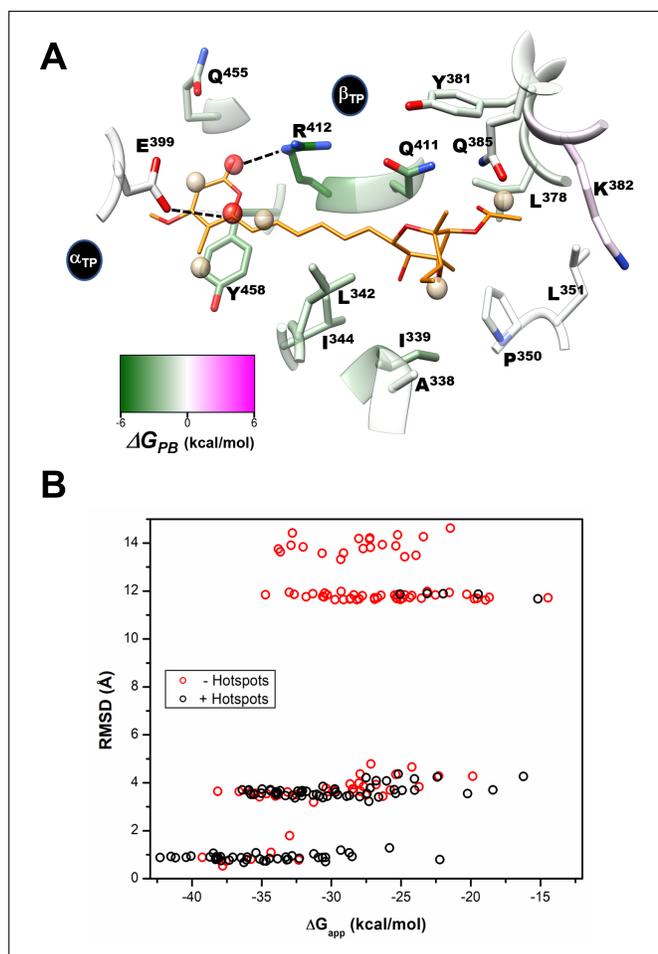
**Figura 14:** Gráfico de valores propios (“scree plot”) a partir de dPCA de residuos del sitio de unión a nucleótidos en  $\beta_{TP}$ . A) Ángulos diedros de cadena principal. B) Ángulos diedros de cadenas laterales. La distribución de valores propios para los primeros 10 vectores propios son mostrados. Los valores entre paréntesis indican la varianza total para el sistema correspondiente. Residuos con ángulos  $\chi$  ( $V^{160-164}$ ,  $R^{189}$ ,  $T^{190}$ ,  $R^{260}$ ,  $Y^{311}$ ,  $Y^{345}$ ,  $P^{346}$ ,  $Q^{416}$ ,  $F^{418}$ ,  $F^{424}$ ,  $T^{425}$ ) hasta 5 Å del nucleótido en  $\beta_{TP}$  fueron incluidos en el análisis.



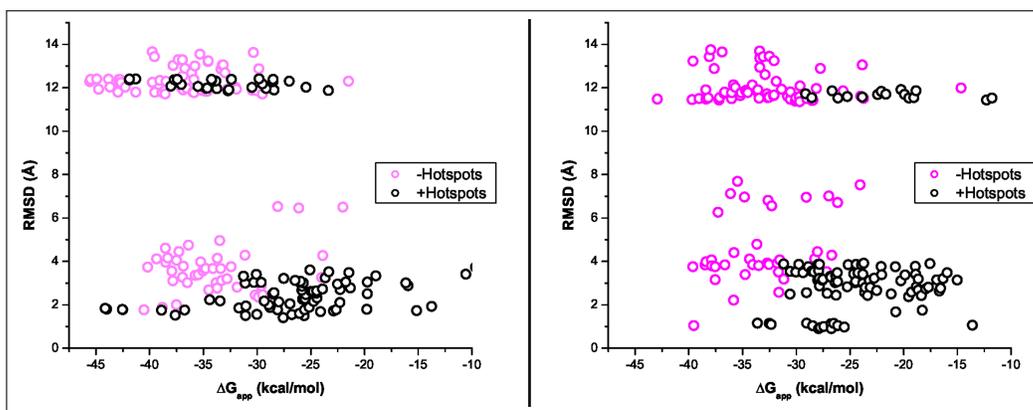
## Identificación de sitios solvente y cálculos de energía libre

Para investigar la relevancia energética de cada uno de los residuos que forman el sitio de unión a AUR, realizamos simulaciones de DM en una caja de cosolvente etanol/agua utilizando el método MDMix (Alvarez-Garcia & Barril, 2014). En breve, este enfoque permite que el solvente orgánico difunda libremente sobre la superficie de la proteína a través de un proceso gobernado únicamente por la evolución temporal de las energías atómicas y los grados de libertad del sistema. Aquellas regiones de la proteína que interactúan favorablemente con el cosolvente definirán sitios solvente (SS) caracterizados por ocupaciones más altas que en el solvente bulto, a partir de las cuales es posible calcular la energía libre de interacción ( $\Delta G_{SS}$ ) en cada sitio. Los sitios activos y alostéricos suelen definir SS, ya que tienen la estereoquímica apropiada para formar interacciones estables con moléculas orgánicas (Alvarez-Garcia & Barril, 2014; Arcon et al., 2017). MDMix ha sido una herramienta valiosa no solo para ayudar a identificar los residuos dominantes o puntos calientes (“hot spots”) en el reconocimiento molecular (Arcon et al., 2017), sino también para guiar el acoplamiento molecular y el descubrimiento de nuevas moléculas farmacológicas, tanto ortostéricas como alostéricas (Avila-Barrientos et al., 2022; Rachman et al., 2020; Talibov et al., 2021). Como se reveló a partir de las trayectorias sin el inhibidor, el sitio de unión a AUR tendió a ocultarse debido a la propensión de formar puentes de hidrógeno entre los residuos de  $\alpha_{TP}$  y  $\beta_{TP}$ . Por lo tanto, para caracterizar la solvatación de la conformación competente para unirse al inhibidor, se aplicaron restricciones armónicas en todos los heteroátomos de proteínas. La Figura 15 muestra los SS determinados para el sitio  $\beta_{TP}$  a partir del promedio de tres trayectorias independientes, cada una de 20 ns.

**Figura 15:** *Descomposición energética por residuo, identificación de sitios solventes y acoplamiento molecular dirigido.* A) *Descomposición por residuo de la energía libre de unión ( $\Delta G_{PB}$ ) calculada con el método MMPBSA. Los residuos que favorecen la interacción con el inhibidor se muestran en color verde. El “plugin” CHEWD fue usado para generar la imagen (Raza et al., 2019). Sitios solventes hidrofóbicos ( $SS_{HP}$ ) e hidrofílicos ( $SS_{POL}$ ) identificados están mostrados como esferas café y rojas, respectivamente. Los cinco  $SS_{HP}$  se superponen con los carbonos apolares de la aurovertina, mientras que un  $SS_{POL}$  reproduce la interacción polar-polar entre  $\beta R^{412}$  y el O19 de la aurovertina. El otro  $SS_{POL}$  detectado, el cual interactúa con  $\alpha E^{399}$ , no presenta una interacción equivalente con la aurovertina. B) Puntaje de acoplamiento molecular para aurovertina ( $\Delta G_{app}$ ) obtenido con *rDock* usando guía (símbolos negros) y sin guía (símbolos rojos) con sitios solvente (“hot spots”) como farmacóforos. 100 modos de unión fueron realizados para cada condición. El RMSD para cada modo de unión fue calculado tomando como referencia a la observada en el cristal.*



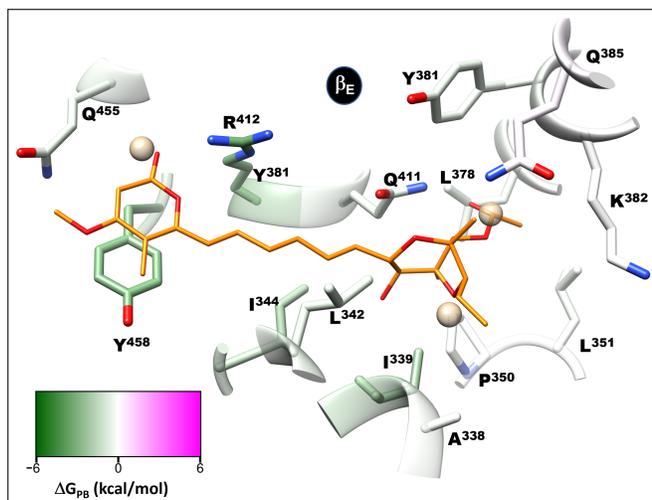
Se calcularon dos tipos de SS, uno para el grupo metilo y otro para el grupo hidroxilo del etanol, como sondas para interacciones hidrofóbicas ( $SS_{HP}$ ) y polares ( $SS_{POL}$ ), respectivamente. Los residuos  $\beta A^{338}$ ,  $\beta I^{339}$ ,  $\beta L^{342}$ ,  $\beta I^{344}$ ,  $\beta L^{351}$ ,  $\beta L^{378}$ ,  $\beta Y^{381}$ ,  $\beta K^{382}$ ,  $\beta R^{412}$ ,  $\beta Q^{455}$  y  $\beta Y^{458}$ , todos ellos involucrados en la unión a AUR, estabilizaron los cinco  $SS_{HP}$  detectados (Figura 15A). Se observaron tres  $SS_{HP}$  en la región de unión a pirona y otros dos  $SS_{HP}$  en la región terminal del biciclo de AUR. En particular,  $\beta Y^{458}$  desempeñó un papel dominante en la estabilización simultánea de tres  $SS_{HP}$ , lo que destaca la importancia de este residuo en la interacción con moléculas orgánicas.  $\alpha E^{399}$  y  $\beta R^{412}$  estabilizaron los dos  $SS_{POL}$  detectados. El  $SS_{POL}$  cercano a  $\alpha E^{399}$  no reprodujo ninguna interacción equivalente con AUR. Por el contrario, la interacción entre  $\beta R^{412}$  y uno de los  $SS_{POL}$  replicó la interacción entre este residuo y O19 de AUR, mientras que no se observó  $SS_{POL}$  para la interacción  $\beta Q^{411}$ -O25. Interesantemente, experimentos de acoplamiento molecular en  $BtF_1$  guiados por los seis SS que emulan la interacción con AUR (es decir, excluyendo el cercano a  $\alpha E^{399}$ ) mejoraron la capacidad de predecir la posición cristalográfica del inhibidor (Figura 15B). En ausencia de información de SS, la tasa de éxito de acoplamiento para predecir la posición correcta de AUR fue solo del 39%. Con relación con al modo de unión observado en el cristal, el biciclo y la pirona aparecieron invertidos en la mayoría de las poses. Por el contrario, la tasa de éxito aumentó al 91% con el uso de guías farmacofóricas. Resultados similares se obtuvieron con citreoviridina y asteltoxina, dos productos naturales similares a AUR (Figura 16). Por otro lado, se reprodujeron menos SS en el sitio  $\beta_E$ . Los dos  $SS_{POL}$  en  $\beta_{TP}$  no se resolvieron (Figura 17), lo que sugiere la importancia de la subunidad  $\alpha$  en la definición de la interacción con el inhibidor.



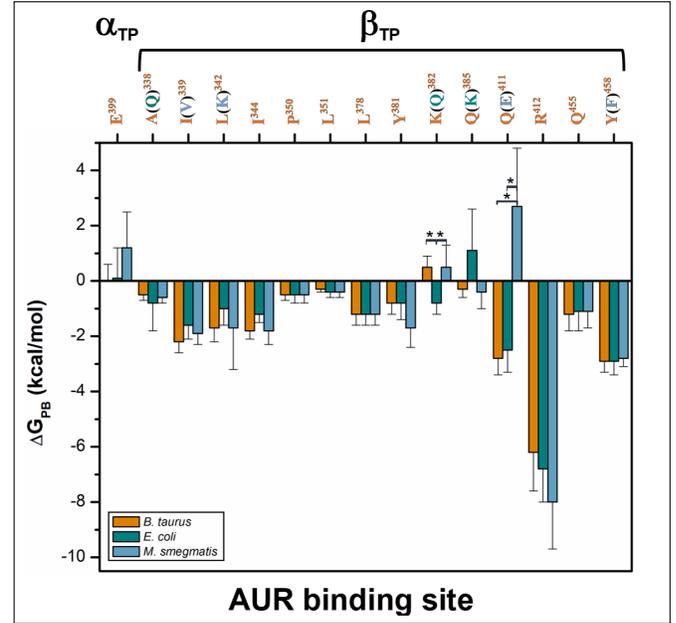
**Figura 16:** *Acoplamiento molecular dirigido. Puntaje de acoplamiento molecular.* ( $\Delta_{app}$ ) para citreoviridina (izquierda) y asteltozina (derecha) obtenidos con *rDock* usando guía (símbolos negros) y sin guía (símbolos rojos) con sitios solvente (“hot spots”) como farmacóforos. 100 modos de unión fueron calculados para cada condición. El RMSD para cada modo de unión fue calculado tomando como referencia al modo de unión con mayor  $\Delta_{app}$ .

Para evaluar la contribución energética por residuo en la interacción con AUR, se calculó la energía libre de unión ( $\Delta_{PB}$ ) utilizando el método MMPBSA (C. Wang et al., 2016). Según los valores de  $K_d$  reportados, el  $\Delta G_b$  experimental para AUR B con BtF<sub>1</sub> es -9,5 kcal/mol (Hong & Pedersen, 2008). Utilizando  $\epsilon=2$ , se obtuvieron valores de  $\Delta G_{PB}$  de  $-18.6 \pm 4.6$  y  $-16.3 \pm 3.1$  kcal/mol para los sitios  $\beta_{TP}$  y  $\beta_E$ , respectivamente. Estas magnitudes están razonablemente de acuerdo con la experimental, considerando la pérdida de entropía rotacional ( $T\Delta S \approx -3$  kcal/mol (Amzel, 1997; García-Hernández & Hernández-Arana, 1999)) y conformacional ( $T\Delta S \approx 0.5$  kcal/mol por enlace rotable congelado), contribuciones que no se incluyeron en los cálculos. En cambio, con  $\epsilon=1$ , se obtuvieron valores de  $\Delta_{PB} = -9.0 \pm 4.7$  y  $-7.1 \pm 4.5$  kcal/mol para los sitios  $\beta_{TP}$  y  $\beta_E$ , respectivamente, que claramente subestiman la afinidad

**Figura 17:** *Descomposición energética por residuo, identificación de sitios solvente para  $\beta_E$ .* Descomposición por residuo de la energía libre de unión ( $\Delta_{PB}$ ) calculada con el método MMPBSA. Los residuos que favorecen la interacción con el inhibidor se muestran en color verde. Sitios solventes hidrofóbicos ( $SS_{HP}$ ) identificados están mostrados como esferas café. Los tres  $SS_{HP}$  se superponen con los carbonos apolares de la aurovertina. El “plugin” CHEWD fue usado para generar la imagen (Raza et al., 2019).



**Figura 18:** Comparación de la descomposición energética por residuo para el sitio de unión a AUR de bovino y dos especies patógenas. Los números corresponden a  $BtF_1$ . Las variaciones en los residuos relativos a  $BtF_1$  se encuentran entre paréntesis. Los residuos que presentan una diferencia energética estadísticamente significativa ( $\alpha < 0.05$ ) de acuerdo con una distribución *t* de Student están marcados con

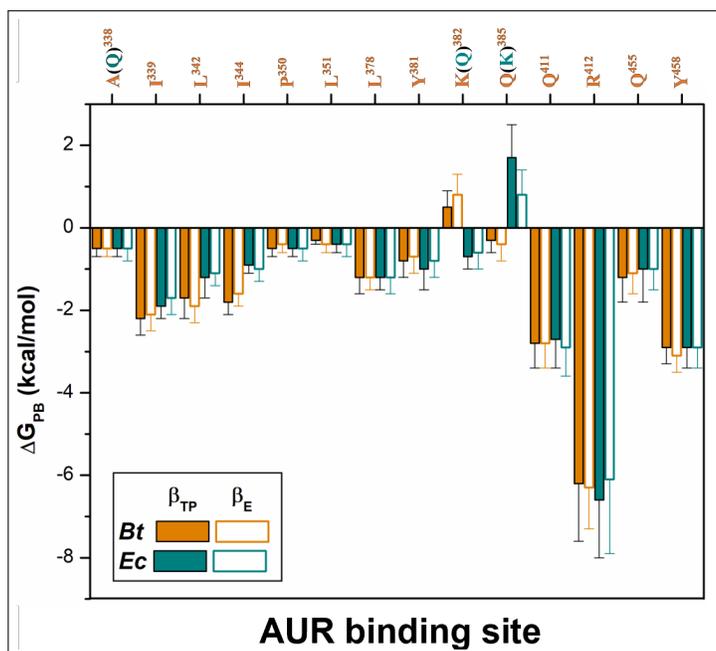


de unión experimental. Independientemente del valor utilizado para la constante dieléctrica interna, la puntuación relativa de energía por residuo se mantuvo constante. De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 15, los residuos que más contribuyen a la energía libre de unión en  $\beta_{TP}$  fueron  $\beta R^{412} > \beta Y^{458} \approx \beta Q^{411} > \beta I^{339} > \beta L^{342} \approx \beta I^{344} > \beta L^{378} \approx \beta Q^{455}$ , que varió entre  $-6.2 \pm 1.4$  ( $\beta R^{412}$ ) a  $-1.2 \pm 0.6$  ( $\beta Q^{455}$ ) kcal/mol ( $\epsilon=2$ ). Se obtuvieron resultados de  $\Delta G_{PB}$  similares para  $\beta_E$  (Figura 17). Estos ocho residuos, aproximadamente la mitad del sitio de unión de AUR, pueden considerarse como "puntos calientes" que determinan en gran medida la afinidad por el inhibidor. Es de destacar que estudios mutacionales han confirmado que la sustitución de  $\beta R^{412}$  genera insensibilidad hacia el inhibidor (Lee et al., 1989). Además, especies de *Bacillus* como *B. PS3* y *B. firmus* OF4 son naturalmente insensibles a esta molécula, lo que se ha atribuido a la sustitución de  $\beta R^{412}$  y  $\beta Y^{458}$  por F y R, respectivamente (Hicks & Krulwich, 1995; Saishu et al., 1983). Por el contrario, AUR inhibe a la  $F_O F_1$ -ATP sintasa de *Escherichia coli*, *Rhodospirillum rubrum*, *Alcaligenes faecalis* y *Paracoccus denitrificans* (Satre et al., 1979). Las enzimas de estas especies bacterianas conservan el mismo conjunto de ocho residuos calientes para la unión de AUR en  $BtF_1$  (Figura 18).

## Comparación de energía de unión con enzimas bacterianas

Para comparar la energía de unión a AUR de  $BtF_1$  con la de las bacterias patógenas, se calcularon las energías de interacción para el sector  $F_1$  de *E. coli* ( $EcF_1$ ) y *M. smegmatis* ( $MsF_1$ ). Las estructuras cristalográficas de estas enzimas bacterianas se han resuelto en ausencia de AUR (Cingolani & Duncan, 2011; Zhang et al., 2019). Por lo tanto, AUR se acopló a estas enzimas usando a  $BtF_1$  como plantilla. Se realizaron tres réplicas de DM de 1  $\mu$ s cada una para cada sistema bacteriano. Los sitios de unión de AUR de  $EcF_1$  y  $MsF_1$  tienen una identidad de secuencia del 79 y el 71 % con  $BtF_1$ , respectivamente. Los residuos  $A^{338}$ ,  $K^{382}$  y  $Q^{385}$  en  $BtF_1$  están reemplazados por Q, Q y K en  $EcF_1$ , respectivamente, mientras que los residuos  $I^{339}$ ,  $L^{342}$ ,  $Q^{411}$  e  $Y^{458}$  en  $BtF_1$  se reemplazan por V, K, E y F en  $MsF_1$ , respectivamente. A pesar de estos cambios, los perfiles de energía de las especies bacterianas fueron semejantes a los obtenidos para la enzima de bovino (Figura 18). Las sustituciones  $K^{382}Q$  y  $Q^{385}K$  entre  $BtF_1$  y  $EcF_1$  exhibieron efectos compensatorios casi completos, mientras que la sustitución de  $A^{338}Q$  no produjo cambios significativos, lo que es consistente con el hecho de que la interacción con el inhibidor estuvo mediada principalmente por los átomos de  $C\beta$  de ambos residuos. Los valores experimentales de  $K_d$  muestran que AUR se une a  $BtF_1$  y  $EcF_1$  con una fuerza similar (Issartel & Vignais, 1984; Issartel et al., 1983a), lo que es consistente con los valores globales de  $\Delta G_{PB}$  obtenidos en este estudio (valores de  $\Delta G_{PB}$  de  $-18.6 \pm 4.6$  frente a  $-16.6 \pm 4.4$  kcal/mol, respectivamente). Por lo tanto, el sitio de unión de AUR parecería inadecuado para diseñar moléculas que puedan discriminar entre  $EcF_1$  y la enzima de mamífero (Figura 19).

**Figura 19:** Comparación de la descomposición energética por residuo para el sitio de unión a AUR en  $\beta_{TP}$  y  $\beta_E$  de bovino y E. coli. Los números corresponden a  $BtF_1$ . Las variaciones en los residuos relativos a  $BtF_1$  se encuentran entre paréntesis. En ambos sistemas, ambas subunidades presentaron un comportamiento energético similar y de forma recurrente,  $\beta_E$  presentó el menor valor energético.

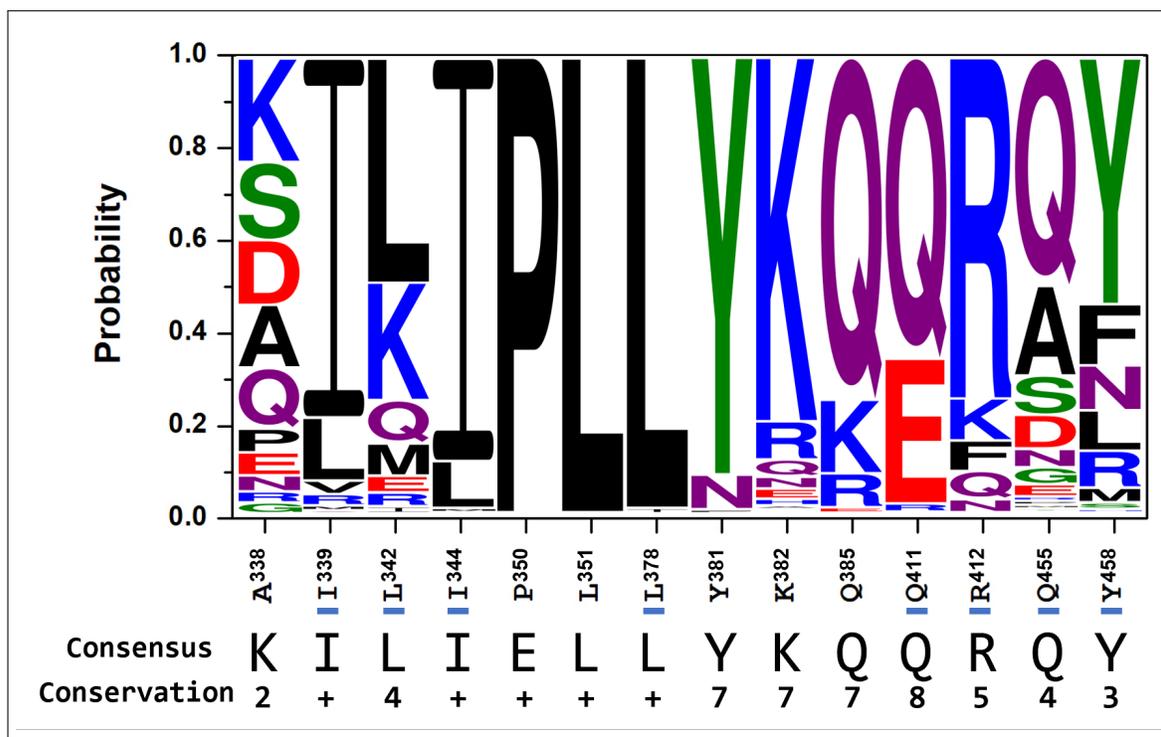


En cuanto a  $MsF_1$ , no se ha probado experimentalmente si AUR (o cualquier otro compuesto relacionado) tiene un efecto inhibitorio sobre esta enzima.  $\Delta G_{PB}$  no mostró cambios energéticos significativos para las mutaciones  $I^{339}V$ ,  $L^{342}K$  e  $Y^{458}F$ , revelando la formación de contactos hidrofóbicos equivalentes con el inhibidor en ambas enzimas. De hecho, los grupos polares de K en  $MsF_1$  y Y en  $BtF_1$  no entraron en contacto con AUR. La mayor variación energética se observó para la sustitución  $Q^{411}E$ . Este comportamiento parece surgir de la pérdida del puente de hidrógeno entre  $Q^{411}$  y AUR O25 en  $BtF_1$ , y de la generación de una repulsión electrostática con el grupo carboxilato del glutamato en  $MsF_1$ . Para minimizar esta repulsión, el modo de unión de AUR en la enzima bacteriana cambió durante las simulaciones, provocándose una rotación del biciclo para permitir que el O25 se expusiera más al solvente. En concordancia con este comportamiento, se obtuvo para  $MsF_1$  un valor de  $\Delta G_{PB}$  aún menor ( $-12.8 \pm 5.0$  kcal/mol). En nuestras simulaciones, AUR permaneció en el sitio  $\beta_{TP}$ -AUR a lo largo de la trayectoria, mientras que se disoció rápidamente del sitio  $\beta_E$  en las tres trayectorias. Con estos resultados, se podría plantear la hipótesis de que la afinidad de  $MsF_1$  por AUR es más débil. Sin embargo, se podrían buscar compuestos que reconozcan específicamente la mutación  $Q^{411}E$  en esta enzima bacteriana.

Dado el uso potencial del sitio de unión de AUR como blanco antimicrobiano, exploremos su conservación de secuencia en el dominio Bacteria. La Figura 20 muestra un logo de

secuencias construido a partir de 23,125 secuencias de subunidades  $\beta$  bacterianas recuperadas de la base de datos UniProt. Solo 3,409 secuencias ( $\approx 15\%$ ) contenían los mismos ocho residuos que más contribuyen a la afinidad de AUR en  $BtF_1$ , incluidos patógenos humanos de los géneros *Coxiella*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Legionella* y *Rickettsia*. Mientras que 12,511 secuencias ( $\approx 54\%$ ) tienen tanto R como Y/F en las posiciones 412 y 458 de  $BtF_1$ , respectivamente, solo 1,497 secuencias ( $\approx 6\%$ ) tienen estos residuos intercambiados. Según la evidencia experimental, estas últimas secuencias deberían ser insensibles a AUR. Los patógenos humanos pertenecientes a este tipo son de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bacillus*. Además, 7,297 ( $\approx 32\%$ ) secuencias, incluidas especies de los géneros *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Helicobacter*, *Mycobacterium* y *Vibrio*, presentan E en lugar de Q en la posición 411. Por lo tanto, solo considerando estas tres posiciones de residuos, entre  $\approx 6$  y  $\approx 48\%$  de las secuencias tendrían una afinidad nula o debilitada por AUR. En particular,  $P^{350}$ ,  $L^{351}$  y  $L^{378}$  fueron casi invariantes.  $I^{344}$  es otro residuo en buena medida conservado, con sustituciones menores principalmente por L y M. No es clara la razón de la conservación tan alta de estos residuos.

El análisis de secuencia sugiere que las especies bacterianas que contienen los mismos residuos calientes observados en  $BtF_1$  no podrían ser un buen punto de partida para la búsqueda de inhibidores especie-específicos en el sitio de aurovertina, ya que es muy probable que los inhibidores que actúen sobre estas enzimas, también lo hagan en la enzima de bovino/humano. Sin embargo, estos resultados también reflejan la gran diversidad de bacterias en las que se podría empezar a realizar esta búsqueda. Dentro de estas, bacterias multirresistentes de los géneros *Staphylococcus*, *Mycobacterium* y *Corynebacterium* causan enfermedades de interés de salud pública. El género *Staphylococcus* está compuesto por bacterias Gram positivas, el cual incluye al menos 40 especies. La mayoría de estos microorganismos son inocuos y residen normalmente sobre la piel y membranas mucosas de humanos y otros organismos. Su distribución es global y son componentes de la flora microbiana del suelo (Harris et al., 2002). Un miembro representativo de este género es *S. aureus*, la cual se encuentra en el tracto respiratorio y sobre la piel. Aunque no siempre es patogénica, es una causa común de infecciones de la piel como abscesos, infecciones respiratorias como sinusitis, e intoxicación alimentaria. Las cepas



**Figura 20:** Conservación del sitio de unión a AUR en  $F_0F_1$ -ATP sintasas bacterianas. Residuos (y numeración) en el eje  $x$  corresponden a la secuencia de bovino. Los residuos que, con base en los cálculos de  $\Delta G_{PB}$  en la Figura 15, contribuyen con una o más kcal/mol de energía de unión favorable en  $BtF_1$  están subrayados en azul. La secuencia consenso también es mostrada. La fila de Conservación corresponde a la escala de conservación que va de 0 (nula conservación) a 10 (=+, conservación completa de las propiedades fisicoquímicas del grupo de aminoácido) como se define en (Livingstone & Barton, 1993). Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de 23,125 entradas, utilizando Clustal Omega (Sievers et al., 2011). El logo de secuencias fue generado con el servidor Weblogo3 (Crooks et al., 2004).

patogénicas generalmente promueven infecciones al producir factores de virulencia tales como toxinas y la expresión de proteínas sobre la superficie celular que se adhieren e inactivan a los anticuerpos. La aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos, tales como meticilina, es un problema mundial en medicina clínica (Balemans et al., 2012; Harris et al., 2002; Kluytmans et al., 1997; Tong et al., 2015). *M. tuberculosis* es una bacteria aerobio-obligada causante de tuberculosis. Esta bacteria cuenta con una cubierta cerosa en su superficie celular primaria debido a la presencia de ácido micólico. La cubierta referida causa que las células sean impenetrables a la tinción de Gram. *M. tuberculosis* requiere de mucho oxígeno e infecta primariamente el tracto respiratorio de mamíferos. La tuberculosis genera hasta 30% de mortalidad. El tratamiento típico contra tuberculosis se realiza administrando isoniazida junto con fosfato de piridoxal, rifampicina, pirazinamida y etambutol. Un problema que se está extendiendo en

los últimos años es la aparición de cepas resistentes a antibióticos. Actualmente el tratamiento contra estas bacterias resistentes se basa en la administración de bedaquilina en conjunto con otros fármacos (Andries et al., 2005; Lu et al., 2014; Martínez et al., 1999; R. V. Patel et al., 2014; Rattan, 1998; Segala et al., 2012; Singh et al., 2015). No obstante, el tratamiento con este fármaco de nueva generación es muy costoso ( $\approx 30,000$  USD). *C. diphtheriae* es una bacteria patógena aeróbica, no móvil, no encapsulada, Gram positiva, causante de difteria en humanos, lo cual resulta de la producción de la toxina diftérica en conjunto con la infección de un bacteriófago, el cual provee el gen para producir dicha toxina. Es una enfermedad históricamente mortal, especialmente para niños, cuya tasa de mortalidad antes del desarrollo de la vacuna y de la antitoxina se encontraba cerca de 80%. En la actualidad, esta enfermedad es manejable. El Centro de Control de Enfermedades recomienda utilizar metronidazol, eritromicina y penicilina G procaína. Actualmente la tasa de mortalidad se encuentra entre 5 y 10% (Cerdeño-Tárraga et al., 2003; Murphy, 1996)(Murphy, 1996; Cerdeno-Tarraga et al., 2003).

# Discusión y conclusiones

Existe una lista grande de enfermedades incurables y microbios multirresistentes que son motivo de preocupación mundial (Franco-Serrano et al., 2018; P. S. Hoffman, 2020; Vasan et al., 2019). Por lo tanto, existe una necesidad apremiante de explotar nuevas dianas moleculares para diversificar los tratamientos para estas condiciones. Además, el mal funcionamiento de la  $F_OF_1$ -ATP sintasa está implicado en el desarrollo de múltiples enfermedades humanas (Ahmad et al., 2013; Huang et al., 2008; Nesci et al., 2019; B. A. Patel et al., 2020). Sin embargo, a pesar de los múltiples esfuerzos, todavía no se ha aprobado para uso clínico ningún modulador de esta prometedora diana farmacológica. En cambio, con la autorización de la bedaquilina como fármaco antituberculoso, esta enzima ha sido validada como diana antimicrobiana especie-específica (Nesci et al., 2019). La idea de utilizar inhibidores exógenos de la  $F_OF_1$ -ATP sintasa para tratar patologías humanas no es nueva. Se han publicado resultados alentadores para detener la progresión de diferentes líneas de células tumorales a través de la inhibición de esta enzima por polifenoles, aurovertinas y glicomacrólidos (Bianchi et al., 2018; Duan et al., 2020; Huang et al., 2008; Reisman et al., 2022; Shin et al., 2005; R. Wu et al., 2020). En principio, los sitios de unión de inhibidores exógenos también podrían ser la diana farmacológica para tratar otras enfermedades en las que está involucrada la  $F_OF_1$ -ATP sintasa, aunque aún se necesita más investigación al respecto. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio destinado a caracterizar una de las cavidades alostéricas no funcionales de la  $F_OF_1$ -ATP sintasa para explorar su capacidad farmacológica. Nuestros resultados muestran que los dos sitios de unión de AUR comparten propiedades conformacionales y patrones de reconocimiento similares. No obstante, una inspección más detallada de los resultados de energía libre, sitios solvente y puentes de hidrógeno sugiere que el sitio  $\beta_{TP}$  corresponde al sitio de alta afinidad reportado experimentalmente (Issartel & Vignais, 1984; Issartel et al., 1983a). Dos enfoques computacionales ortogonales identificaron la misma tríada ( $\beta R^{412}$ ,  $\beta Y^{458}$  y  $\beta Q^{411}$ ) como los residuos más estabilizadores para la interacción con el inhibidor, resultados que son consistentes con los datos experimentales de mutagénesis dirigida al sitio y con las diferentes sensibilidades

que tienen las enzimas de varias especies hacia AUR (Lee et al., 1989; van Raaij et al., 1996). Por lo tanto, estos residuos podrían usarse como puntos críticos primarios en campañas de búsqueda de fármacos. Las simulaciones revelaron que en la conformación de espera catalítica existe una clara tendencia de interacción entre los residuos de los DCT de  $\beta_{TP}$  y  $\alpha_{TP}$ , la cual no había sido reportada previamente. Esta tendencia, parcialmente interrumpida por AUR, parece estar en la vía de formación de una red de puentes de hidrógeno establecida entre  $\alpha_{DP}$  y  $\beta_{DP}$  que, según estudios mutacionales (Mao et al., 2008), es relevante para el correcto funcionamiento de la enzima. Además de actuar como bloqueador estérico de la propagación de los cambios conformacionales de las proteínas, AUR ejerce efectos de largo alcance, aumentando la flexibilidad conformacional de las cadenas laterales y del nucleótido en el sitio activo de la misma subunidad catalítica. Estas observaciones son consistentes con los efectos de afinidad cooperativa entre el inhibidor y los sustratos medidos experimentalmente (Issartel & Vignais, 1984; Issartel et al., 1983a). Los resultados de energía libre para la interacción entre AUR y  $F_1$  de dos especies bacterianas arrojan nueva luz sobre las posibilidades de utilizar el sitio de unión de AUR como blanco antimicrobiano. Aunque la identidad global entre los sitios de unión de AUR en  $BtF_1$  y  $EcF_1$  es 80%, los ocho residuos energéticamente relevantes para la unión del inhibidor se conservan por completo. Esta conservación concuerda con los valores de afinidad similares medidos tanto *in silico* como *in vitro* para las dos especies. Esto sugiere que el sitio de unión de AUR en  $EcF_1$  podría no ser una buena diana para el desarrollo de antibióticos especie-específicos. Por extensión, se puede sugerir una conclusión similar para las especies de *Coxiella*, *Haemophilus*, *Legionella* y *Rickettsia*. En cambio, la identidad de los ocho residuos importantes entre  $BtF_1$  y  $MsF_1$  es del 50%, sustituciones que, según las simulaciones de DM, debilitan la fuerza y cambian el modo de unión de AUR. Aunque se desconoce si AUR inhibe a  $MsF_1$ , esta diferencia en la composición podría ser útil para el desarrollo de fármacos antimicrobianos especie-específicos. De hecho, estos resultados no son inesperados, ya que se acepta que las mitocondrias se originaron a partir de un ancestro similar a las  $\alpha$ -proteobacterias (Fan et al., 2020; Roger et al., 2017), y *E. coli* es una  $\gamma$ -proteobacteria mientras que *M. smegmatis* es una actinobacteria relacionada más lejanamente. Un análisis del sitio de unión de AUR de todas las secuencias bacterianas reportadas hasta el momento sugiere que un número significativo de

especies son insensibles a esta clase de inhibidor, y que es probable que existan diversos grados de afinidad. La caracterización experimental de la unión de AUR a  $F_1$  o  $F_0F_1$ -ATP sintasa completa ha sido un desafío, y numerosos aspectos del mecanismo de inhibición siguen sin conocerse. En este sentido, se podrían contemplar nuevos experimentos basados en los resultados computacionales aquí presentados. Por ejemplo, mutaciones sitio dirigidas de los residuos clave serían útiles para mejorar nuestra comprensión del mecanismo de inhibición. Además, nuestro estudio sienta las bases para el diseño basado en estructura de fármacos dirigidos al sitio de unión de AUR para tratar patologías humanas en las que la  $F_0F_1$ -ATP sintasa está involucrada de manera central, o para el desarrollo de nuevas clases de antibióticos.

# Bibliografía

- Abraham, E. P., & Chain, E. (1988). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev. Infect. Dis.*, *10*(4), 677-678. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3055168>
- Abrahams, J. P., Buchanan, S. K., Van Raaij, M. J., Fearnley, I. M., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (1996). The structure of bovine F1-ATPase complexed with the peptide antibiotic efrapeptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *93*(18), 9420-9424. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9420>
- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., & Walker, J. E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, *370*(6491), 621-628. <https://doi.org/10.1038/370621a0>
- Ahmad, Z., Okafor, F., Azim, S., & Laughlin, T. F. (2013). ATP synthase: a molecular therapeutic drug target for antimicrobial and antitumor peptides. *Curr. Med. Chem.*, *20*(15), 1956-73. <https://doi.org/10.2174/0929867311320150003>
- Al-Shawi, M. K., Parsonage, D., & Senior, a. E. (1990). Adenosine triphosphatase and nucleotide binding activity of isolated beta-subunit preparations from Escherichia coli F1F0-ATP synthase. *J. Biol. Chem.*, *265*(10), 5595-5601. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2156822>
- Altis, A., Otten, M., Nguyen, P. H., Hegger, R., & Stock, G. (2008). Construction of the free energy landscape of biomolecules via dihedral angle principal component analysis. *J. Chem. Phys.*, *128*(24), 245102. <https://doi.org/10.1063/1.2945165>
- Alvarez-Garcia, D., & Barril, X. (2014). Molecular Simulations with Solvent Competition Quantify Water Displaceability and Provide Accurate Interaction Maps of Protein Binding Sites. *J. Med. Chem.*, *57*(20), 8530-8539. <https://doi.org/10.1021/jm5010418>
- Amzel, L. M. (1997). Loss of translational entropy in binding, folding, and catalysis. *Proteins*, *28*(2), 144-9.
- Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Göhlmann, H. W. H., Neefs, J.-M., Winkler, H., Van Gestel, J., Timmerman, P., Zhu, M., Lee, E., Williams, P., de Chaffoy, D., Huitric, E., Hoffner, S., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Lounis, N., & Jarlier, V. (2005). A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of Mycobacterium tuberculosis. *Science (80-. )*, *307*(5707), 223-227. <https://doi.org/10.1126/science.1106753>

- Arakaki, N., Kita, T., Shibata, H., & Higuti, T. (2007). Cell-surface H<sup>+</sup>-ATP synthase as a potential molecular target for anti-obesity drugs. *FEBS Lett.*, *581*(18), 3405-3409. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.041>
- Arakaki, N., Nagao, T., Niki, R., Toyofuku, A., Tanaka, H., Kuramoto, Y., Emoto, Y., Shibata, H., Magota, K., & Higuti, T. (2003). Possible role of cell surface H<sup>+</sup>-ATP synthase in the extracellular ATP synthesis and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Mol. Cancer Res.*, *1*(13), 931-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14638865>
- Arcon, J. P., Defelipe, L. A., Modenutti, C. P., López, E. D., Alvarez-Garcia, D., Barril, X., Turjanski, A. G., & Martí, M. A. (2017). Molecular Dynamics in Mixed Solvents Reveals Protein–Ligand Interactions, Improves Docking, and Allows Accurate Binding Free Energy Predictions. *J. Chem. Inf. Model.*, *57*(4), 846-863. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00678>
- Arias, C. A., Panesso, D., McGrath, D. M., Qin, X., Mojica, M. F., Miller, C., Diaz, L., Tran, T. T., Rincon, S., Barbu, E. M., Reyes, J., Roh, J. H., Lobos, E., Sodergren, E., Pasqualini, R., Arap, W., Quinn, J. P., Shamo, Y., Murray, B. E., & Weinstock, G. M. (2011). Genetic Basis for In Vivo Daptomycin Resistance in Enterococci. *N. Engl. J. Med.*, *365*(10), 892-900. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1011138>
- Avila-Barrientos, L. P., Cofas-Vargas, L. F., Agüero-Chapin, G., Hernández-García, E., Ruiz-Carmona, S., Valdez-Cruz, N. A., Trujillo-Roldán, M., Weber, J., Ruiz-Blanco, Y. B., Barril, X., & García-Hernández, E. (2022). Computational Design of Inhibitors Targeting the Catalytic  $\beta$  Subunit of Escherichia coli FOF1-ATP Synthase. *Antibiotics*, *11*(5), 557. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050557>
- Azumi, M., Ishidoh, K. I., Kinoshita, H., Nihira, T., Ihara, F., Fujita, T., & Igarashi, Y. (2008). Aurovertins F-H from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Nat. Prod.*, *71*(2), 278-280. <https://doi.org/10.1021/np070494e>
- Balemans, W., Vranckx, L., Lounis, N., Pop, O., Guillemont, J., Vergauwen, K., Mol, S., Gilissen, R., Motte, M., Lançois, D., De Bolle, M., Bonroy, K., Lill, H., Andries, K., Bald, D., & Koul, A. (2012). Novel Antibiotics Targeting Respiratory ATP Synthesis in Gram-Positive Pathogenic Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, *56*(8), 4131-4139. <https://doi.org/10.1128/AAC.00273-12>

- Bandani, A. R., Khambay, B. P., Faull, J. L., Newton, R., Deadman, M., & Butt, T. M. (2000). Production of efrapeptins by Tolypocladium species and evaluation of their insecticidal and antimicrobial properties. *Mycol. Res.*, *104*(5), 537-544. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001859>
- Bartlett, J. G., Gilbert, D. N., & Spellberg, B. (2013). Seven Ways to Preserve the Miracle of Antibiotics. *Clin. Infect. Dis.*, *56*(10), 1445-1450. <https://doi.org/10.1093/cid/cit070>
- Bateman, A., Martin, M.-J., Orchard, S., Magrane, M., Agivetova, R., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bursteinas, B., Bye-A-Jee, H., Coetzee, R., Cukura, A., Da Silva, A., Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T., Fan, J., Castro, L. G., ... Teodoro, D. (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.*, *49*(D1), D480-D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
- Bhat, A. S., Dustin Schaeffer, R., Kinch, L., Medvedev, K. E., & Grishin, N. V. (2020). Recent advances suggest increased influence of selective pressure in allostery. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, *62*, 183-188. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.02.004>
- Bianchi, G., Ravera, S., Traverso, C., Amaro, A., Piaggio, F., Emionite, L., Bachetti, T., Pfeffer, U., & Raffaghello, L. (2018). Curcumin induces a fatal energetic impairment in tumor cells in vitro and in vivo by inhibiting ATP-synthase activity. *Carcinogenesis*, *39*(9), 1141-1150. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy076>
- Blum, T. B., Hahn, A., Meier, T., Davies, K. M., & Kühlbrandt, W. (2019). Dimers of mitochondrial ATP synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *116*(10), 4250-4255. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816556116>
- Bowler, M. W., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., & Walker, J. E. (2007). Ground state structure of F1-ATPase from bovine heart mitochondria at 1.9 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, *282*(19), 14238-14242. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700203200>
- Brown, E. D., & Wright, G. D. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, *529*(7586), 336-343. <https://doi.org/10.1038/nature17042>
- Cabezón, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., & Walker, J. E. (2003). The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nat. Struct. Biol.*, *10*(9), 744-750. <https://doi.org/10.1038/nsb966>
- Case, D., Betz, R., Cerutti III, D., Cheatham, III, T., Darden, T., Duke, R., Giese, T., Gohlke, H., Goetz, A., Homeyer, N., Izadi, S., Janowski, P., Kaus, J., Kovalenko, A., Lee, T., LeGrand, S., Li, P., Lin, C., Luchko, T., ... Kollman, P. (2016). AMBER 16.

- Cataldi de Flombaum, M. A., & Stoppani, A. O. M. (1981). Influence of efrapeptin, aurovertin and citreoviridin on the mitochondrial adenosine triphosphatase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, *3*(3), 143-155. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(81\)90045-1](https://doi.org/10.1016/0166-6851(81)90045-1)
- Cerdeño-Tárraga, A. M., Efstratiou, A., Dover, L. G., Holden, M. T., Pallen, M., Bentley, S. D., Besra, G. S., Churcher, C., James, K. D., De Zoysa, A., Chillingworth, T., Cronin, A., Dowd, L., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Moule, S., Quail, M. A., . . . Parkhill, J. (2003). The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res.*, *31*(22), 6516-6523. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg874>
- Chang, C.-E., Chen, W., & Gilson, M. K. (2005). Evaluating the Accuracy of the Quasiharmonic Approximation. *J. Chem. Theory Comput.*, *1*(5), 1017-1028. <https://doi.org/10.1021/ct0500904>
- Chatzigoulas, A., & Cournia, Z. (2021). Rational design of allosteric modulators: Challenges and successes. *WIREs Comput. Mol. Sci.*, e1529. <https://doi.org/10.1002/wcms.1529>
- Cingolani, G., & Duncan, T. M. (2011). Structure of the ATP synthase catalytic complex (F(1)) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, *18*(6), 701-7. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2058>
- Cofas Luis. (2017). *Explorando el potencial farmacológico de la FOF1-ATP sintasa estudio estructural comparativo de los sitios de unión de inhibidores naturales del sector F1 de diferentes especies* [Tesis doctoral, UNAM]. <https://www.researchgate.net/publication/329687223>
- Connell, S. R., Tracz, D. M., Nierhaus, K. H., & Taylor, D. E. (2003). Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, *47*(12), 3675-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14638464><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC296194>
- Cook, G. M., Hards, K., Vilchèze, C., Hartman, T., & Berney, M. (2014). Energetics of Respiration and Oxidative Phosphorylation in Mycobacteria (G. F. Hatfull & W. R. Jacobs Jr., Eds.). *Microbiol. Spectr.*, *2*(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0015-2013>
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res.*, *14*(6), 1188-1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, *477*(7365), 457-461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>

- Deuffhard, P., & Weber, M. (2005). Robust Perron cluster analysis in conformation dynamics. *Linear Algebra Appl.*, *398*(1-3), 161-184. <https://doi.org/10.1016/j.laa.2004.10.026>
- Duan, J., Li, Y., Gao, H., Yang, D., He, X., Fang, Y., & Zhou, G. (2020). Phenolic compound ellagic acid inhibits mitochondrial respiration and tumor growth in lung cancer. *Food Funct.*, *11*(7), 6332-6339. <https://doi.org/10.1039/d0fo01177k>
- Eastman, P., Swails, J., Chodera, J. D., McGibbon, R. T., Zhao, Y., Beauchamp, K. A., Wang, L.-P., Simmonett, A. C., Harrigan, M. P., Stern, C. D., Wiewiora, R. P., Brooks, B. R., & Pande, V. S. (2017). OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics (R. Gentleman, Ed.). *PLoS Comput. Biol.*, *13*(7), e1005659. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005659>
- Fan, L., Wu, D., Goremykin, V., Xiao, J., Xu, Y., Garg, S., Zhang, C., Martin, W. F., & Zhu, R. (2020). Phylogenetic analyses with systematic taxon sampling show that mitochondria branch within Alphaproteobacteria. *Nat. Ecol. Evol.*, *4*(9), 1213-1219. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1239-x>
- Franco-Serrano, L., Huerta, M., Hernández, S., Cedano, J., Perez-Pons, J. A., Piñol, J., Mozo-Villarias, A., Amela, I., & Querol, E. (2018). Multifunctional Proteins: Involvement in Human Diseases and Targets of Current Drugs. *Protein J.*, *37*(5), 444-453. <https://doi.org/10.1007/s10930-018-9790-x>
- Fu, Y., & Zhu, Y. (2010). Ectopic ATP Synthase in Endothelial Cells: A Novel Cardiovascular Therapeutic Target. *Curr. Pharm. Des.*, *16*(37), 4074-4079. <https://doi.org/10.2174/138161210794519219>
- Galber, C., Carissimi, S., Baracca, A., & Giorgio, V. (2021). The ATP Synthase Deficiency in Human Diseases. *Life*, *11*(4), 325. <https://doi.org/10.3390/life11040325>
- García-Hernández, E., & Hernández-Arana, A. (1999). Structural bases of lectin-carbohydrate affinities: Comparison with protein-folding energetics. *Protein Sci.*, *8*(5), 1075-1086. <https://doi.org/10.1110/ps.8.5.1075>
- Genheden, S., & Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug Discov.*, *10*(5), 449-461. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>

- Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2007). Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *104*(34), 13632-13637. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706290104>
- Goldberg, J., Currais, A., Prior, M., Fischer, W., Chiruta, C., Ratliff, E., Daugherty, D., Dargusch, R., Finley, K., Esparza-Moltó, P. B., Cuezva, J. M., Maher, P., Petrascheck, M., & Schubert, D. (2018). The mitochondrial ATP synthase is a shared drug target for aging and dementia. *Aging Cell*, *17*(2), e12715. <https://doi.org/10.1111/accel.12715>
- Golkar, Z., Bagasra, O., & Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J. Infect. Dev. Ctries.*, *8*(2), 129-36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24518621>
- Gould, I. M., & Bal, A. M. (2013). New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence*, *4*(2), 185-191. <https://doi.org/10.4161/viru.22507>
- Groth, G., & Pohl, E. (2001). The structure of the chloroplast F1-ATPase at 3.2 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, *276*(2), 1345-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008015200>
- Gu, J., Zhang, L., Zong, S., Guo, R., Liu, T., Yi, J., Wang, P., Zhuo, W., & Yang, M. (2019). Cryo-EM structure of the mammalian ATP synthase tetramer bound with inhibitory protein IF1. *Science*, *364*(6445), 1068-1075. <https://doi.org/10.1126/science.aaw4852>
- Guo, H., Feng, T., Li, Z. H., & Liu, J. K. (2013). Ten new aurovertins from cultures of the basidiomycete *Albatrellus confluens*. *Nat. Products Bioprospect.*, *3*(1), 8-13. <https://doi.org/10.1007/s13659-012-0088-y>
- Guo, H., Courbon, G. M., Bueler, S. A., Mai, J., Liu, J., & Rubinstein, J. L. (2021). Structure of mycobacterial ATP synthase bound to the tuberculosis drug bedaquiline. *Nature*, *589*(7840), 143-147. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3004-3>
- Gyles, C., & Boerlin, P. (2014). Horizontally Transferred Genetic Elements and Their Role in Pathogenesis of Bacterial Disease. *Vet. Pathol.*, *51*(2), 328-340. <https://doi.org/10.1177/0300985813511131>
- Hards, K., & Cook, G. M. (2018). Targeting bacterial energetics to produce new antimicrobials. *Drug Resist. Updat.*, *36*, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2017.11.001>
- Harris, L. G., Foster, S. J., & Richards, R. G. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur. Cell. Mater.*, *4*, 39-60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14562246>

- Hicks, D. B., & Krulwich, T. A. (1995). The respiratory chain of alkaliphilic bacteria. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(95\)00024-D](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00024-D)
- Hoffman, P. S. (2020). Antibacterial Discovery: 21st Century Challenges. *Antibiot. (Basel, Switzerland)*, 9(5), 213. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050213>
- Hoffman, S. B. (2001). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, 23(5), 464-472. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
- Hong, S., & Pedersen, P. L. (2008). ATP Synthase and the Actions of Inhibitors Utilized To Study Its Roles in Human Health, Disease, and Other Scientific Areas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 72(4), 590-641. <https://doi.org/10.1128/membr.00016-08>
- Hopkins, C. W., Le Grand, S., Walker, R. C., & Roitberg, A. E. (2015). Long-Time-Step Molecular Dynamics through Hydrogen Mass Repartitioning. *J. Chem. Theory Comput.*, 11(4), 1864-1874. <https://doi.org/10.1021/ct5010406>
- Huang, T.-C., Chang, H.-Y., Hsu, C.-H., Kuo, W.-H., Chang, K.-J., & Juan, H.-F. (2008). Targeting therapy for breast carcinoma by ATP synthase inhibitor aurovertin B. *J. Proteome Res.*, 7(4), 1433-44. <https://doi.org/10.1021/pr700742h>
- Ichikawa, N., Chisuwa, N., Tanase, M., & Nakamura, M. (2005). Mitochondrial ATP synthase residue  $\beta$ arginine-408, which interacts with the inhibitory site of regulatory protein IF1, is essential for the function of the enzyme. *J. Biochem.*, 138(2), 201-207. <https://doi.org/10.1093/jb/mvi116>
- Issartel, J. P., & Vignais, P. V. (1984). Evidence for a Nucleotide Binding Site on the Isolated  $\beta$  Subunit from Escherichia coli F1-ATPase. Interaction between Nucleotide and Aurovertin D Binding Sites. *Biochemistry*, 23(26), 6591-6595. <https://doi.org/10.1021/bi00321a048>
- Issartel, J. P., Klein, G., Satre, M., & Vignais, P. V. (1983a). Binding of [14C]aurovertin D to Escherichia coli F1-ATPase and the isolated .beta. subunit. Correlation with inhibition of the ATPase activity. *Biochemistry*, 22(14), 3485-3492. <https://doi.org/10.1021/bi00283a027>
- Issartel, J. P., Klein, G., Satre, M., & Vignais, P. V. (1983b). Aurovertin Binding Sites on Beef Heart Mitochondrial F1-ATPase. Study with [14C]Aurovertin D of the Binding Stoichiometry and of the Interaction between Aurovertin and the Natural ATPase Inhibitor for Binding to F1. *Biochemistry*, 22(14), 3492-3497. <https://doi.org/10.1021/bi00283a028>
- Johnson, K. M., Swenson, L., Opiari, A. W., Reuter, R., Zarrabi, N., Fierke, C. A., Börsch, M., & Glick, G. D. (2009). Mechanistic basis for differential inhibition of the F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATPase by aurovertin. *Biopolymers*, 91(10), 830-840. <https://doi.org/10.1002/bip.21262>

- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, *79*(2), 926-935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
- Kato-Yamada, Y. (2005). Isolated  $\epsilon$  subunit of *Bacillus subtilis* F1-ATPase binds ATP. *FEBS Lett.*, *579*(30), 6875-6878. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.036>
- Kato-Yamada, Y., & Yoshida, M. (2003). Isolated epsilon subunit of thermophilic F1-ATPase binds ATP. *J. Biol. Chem.*, *278*(38), 36013-36016. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306140200>
- Keeling, P. J., & Palmer, J. D. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Genet.*, *9*(8), 605-618. <https://doi.org/10.1038/nrg2386>
- Kluytmans, J., van Belkum, A., & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.*, *10*(3), 505-20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/172932><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9227864><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC172932>
- Krah, A. (2015). Linking structural features from mitochondrial and bacterial F-type ATP synthases to their distinct mechanisms of ATPase inhibition. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, *119*(1), 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.06.005>
- Kühlbrandt, W. (2019). Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. *Annu. Rev. Biochem.*, *88*(1), 515-549. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-110903>
- Lakshmanan, M., & Xavier, A. S. (2013). Bedaquiline - The first ATP synthase inhibitor against multi drug resistant tuberculosis. *J. Young Pharm.*, *5*(4), 112-115. <https://doi.org/10.1016/j.jyp.2013.12.002>
- Lee, R. S., Pagan, J., Satre, M., Vignais, P. V., & Senior, A. E. (1989). Identification of a mutation in *Escherichia coli* F1-ATPase  $\beta$ -subunit conferring resistance to aurovertin. *FEBS Lett.*, *253*(1-2), 269-272. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80973-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80973-1)
- Leipe, D. D., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2003). Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins. *J. Mol. Biol.*, *333*(4), 781-815. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.08.040>
- Li, W., Ma, Z., Chen, L., & Yin, W.-B. (2018). Synthesis and production of the antitumor polyketide aurovertins and structurally related compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *102*(15), 6373-6381. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9123-1>
- Linnett, P. E., & Beechey, R. B. (1979). Inhibitors of the ATP Synthetase Systems. In *Methods Enzymol.* (pp. 472-518, Vol. 55). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(79\)55061-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)55061-7)

- Livingstone, C. D., & Barton, G. J. (1993). Protein sequence alignments: A strategy for the hierarchical analysis of residue conservation. *Bioinformatics*, *9*(6), 745-756. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/9.6.745>
- Lu, S., Huang, W., & Zhang, J. (2014). Recent computational advances in the identification of allosteric sites in proteins. *Drug Discov. Today*, *19*(10), 1595-1600. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2014.07.012>
- Lu, S., Shen, Q., & Zhang, J. (2019). Allosteric Methods and Their Applications: Facilitating the Discovery of Allosteric Drugs and the Investigation of Allosteric Mechanisms. *Acc. Chem. Res.*, *52*(2), 492-500. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00570>
- Luo, M., Zhou, W., Patel, H., Srivastava, A. P., Symersky, J., Bonar, M. M., Faraldo-Gómez, J. D., Liao, M., & Mueller, D. M. (2020). Bedaquiline inhibits the yeast and human mitochondrial ATP synthases. *Commun. Biol.*, *3*(1), 452. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01173-z>
- Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., & Simmerling, C. (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.*, *11*(8), 3696-3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
- Mao, H. Z., Abraham, C. G., Krishnakumar, A. M., & Weber, J. (2008). A functionally important hydrogen-bonding network at the  $\beta$ DP/ $\alpha$ DP interface of ATP synthase. *J. Biol. Chem.*, *283*(36), 24781-24788. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804142200>
- Martínez, A., Torello, S., & Kolter, R. (1999). Sliding motility in mycobacteria. *J. Bacteriol.*, *181*(23), 7331-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10572138><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC103697>
- Meagher, K. L., Redman, L. T., & Carlson, H. A. (2003). Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field. *J. Comput. Chem.*, *24*(9), 1016-1025. <https://doi.org/10.1002/jcc.10262>
- Miller, B. R., McGee, T. D., Swails, J. M., Homeyer, N., Gohlke, H., & Roitberg, A. E. (2012). MMPBSA.py : An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.*, *8*(9), 3314-3321. <https://doi.org/10.1021/ct300418h>
- Miyamoto, S., & Kollman, P. A. (1992). Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.*, *13*(8), 952-962. <https://doi.org/10.1002/jcc.540130805>

- Moore, H. F. (1915). The action of ethylhydrocuprein (optochin) on type strains of pneumococci in vitro and in vivo, and on some other microorganisms invitro. *J. Exp. Med.*, *22*(3), 269-269. <https://doi.org/10.1084/jem.22.3.269>
- Morales-Rios, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2015). Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *112*(43), 13231-13236. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517542112>
- Morelli, A. M., Ravera, S., & Panfoli, I. (2020). The aerobic mitochondrial ATP synthesis from a comprehensive point of view. *Open Biol.*, *10*(10), 200224. <https://doi.org/10.1098/rsob.200224>
- Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Pati Pandey, R., & Samuel Raj, V. (2021). Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96888>
- Murphy, J. R. (1996). *Corynebacterium Diphtheriae*. University of Texas Medical Branch at Galveston. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413281>
- Nakamura, J., Fujikawa, M., & Yoshida, M. (2013). IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice. *Biosci. Rep.*, *33*(5), 10-12. <https://doi.org/10.1042/BSR20130078>
- Nesci, S., Trombetti, F., Algieri, C., & Pagliarani, A. (2019). A Therapeutic Role for the F1FO-ATP Synthase. *SLAS Discov.*, *24*(9), 893-903. <https://doi.org/10.1177/2472555219860448>
- Neupane, P., Bhujju, S., Thapa, N., & Bhattarai, H. K. (2019). ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. *Biomol. Concepts*, *10*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1515/bmc-2019-0001>
- Nuskova, H., Mikesova, J., Efimova, I., Pecinova, A., Pecina, P., Drahota, Z., Houstek, J., & Mracek, T. (2020). Biochemical thresholds for pathological presentation of ATP synthase deficiencies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *521*(4), 1036-1041. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.033>
- Nussinov, R., & Tsai, C.-J. (2012). The Different Ways through Which Specificity Works in Orthosteric and Allosteric Drugs. *Curr. Drug Metab.*, *18*(9), 1311-1316. <https://doi.org/10.2174/138920012799362855>
- Nussinov, R., & Tsai, C.-J. (2014). Unraveling structural mechanisms of allosteric drug action. *Trends Pharmacol. Sci.*, *35*(5), 256-264. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2014.03.006>
- O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminform.*, *3*(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>

- Pagès, J.-M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, *6*(12), 893-903. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994>
- Patel, B. A., D'Amico, T. L., & Blagg, B. S. (2020). Natural products and other inhibitors of F1FO ATP synthase. *Eur. J. Med. Chem.*, *207*, 112779. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112779>
- Patel, R. V., Riyaz, S., & Park, S. W. (2014). Bedaquiline : A New Hope to Treat Multi - Drug Resistant Tuberculosis. *Curr. Top. Med. Chem.*, *14*, 1866-1874. <https://doi.org/10.2174/1568026614666140929114822>
- Piddock, L. J. (2012). The crisis of no new antibiotics-what is the way forward? *Lancet Infect. Dis.*, *12*(3), 249-253. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70316-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70316-4)
- Pikis, A., Campos, J. M., Rodriguez, W. J., & Keith, J. M. (2001). Optochin Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Mechanism, Significance, and Clinical Implications. *J. Infect. Dis.*, *184*(5), 582-590. <https://doi.org/10.1086/322803>
- Preiss, L., Langer, J. D., Yildiz, O., Eckhardt-Strelau, L., Guillemont, J. E. G., Koul, A., & Meier, T. (2015). Structure of the mycobacterial ATP synthase Fo rotor ring in complex with the anti-TB drug bedaquiline. *Sci. Adv.*, *1*(4), e1500106-e1500106. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500106>
- Rachman, M., Bajusz, D., Hetényi, A., Scarpino, A., Merő, B., Egyed, A., Buday, L., Barril, X., & Keserű, G. M. (2020). Discovery of a novel kinase hinge binder fragment by dynamic undocking. *RSC Med. Chem.*, *11*(5), 552-558. <https://doi.org/10.1039/C9MD00519F>
- Rattan, A. (1998). Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis: Molecular Perspectives. *Emerg. Infect. Dis.*, *4*(2), 195-209. <https://doi.org/10.3201/eid0402.980207>
- Raza, S., Ranaghan, K. E., van der Kamp, M. W., Woods, C. J., Mulholland, A. J., & Azam, S. S. (2019). Visualizing protein–ligand binding with chemical energy-wise decomposition (CHEWD): application to ligand binding in the kallikrein-8 S1 Site. *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, *33*(5), 461-475. <https://doi.org/10.1007/s10822-019-00200-4>
- Reisman, B. J., Guo, H., Ramsey, H. E., Wright, M. T., Reinfeld, B. I., Ferrell, P. B., Sulikowski, G. A., Rathmell, W. K., Savona, M. R., Plate, L., Rubinstein, J. L., & Bachmann, B. O. (2022). Apoptolidin family glycomacrolides target leukemia through inhibition of ATP synthase. *Nat. Chem. Biol.*, *18*(4), 360-367. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00900-9>

- Roe, D. R., & Cheatham, T. E. (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J. Chem. Theory Comput.*, *9*(7), 3084-3095. <https://doi.org/10.1021/ct400341p>
- Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A., & Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr. Biol.*, *27*(21), R1177-R1192. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015>
- Ruiz-Blanco, Y. B., Ávila-Barrientos, L. P., Hernández-García, E., Antunes, A., Agüero-Chapin, G., & García-Hernández, E. (2021). Engineering protein fragments via evolutionary and protein-protein interaction algorithms: de novo design of peptide inhibitors for FOF1-ATP synthase. *FEBS Lett.*, *595*(2), 183-194. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13988>
- Ruiz-Carmona, S., Alvarez-Garcia, D., Foloppe, N., Garmendia-Doval, A. B., Juhos, S., Schmidtke, P., Barril, X., Hubbard, R. E., & Morley, S. D. (2014). rDock: A Fast, Versatile and Open Source Program for Docking Ligands to Proteins and Nucleic Acids (A. Prlic, Ed.). *PLoS Comput. Biol.*, *10*(4), e1003571. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003571>
- Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., & Berendsen, H. J. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.*, *23*(3), 327-341. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5)
- Saishu, T., Kagawa, Y., & Shimizu, R. (1983). Resistance of thermophilic atpase (TF1) to specific F1-atpase inhibitors including local anesthetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *112*(3), 822-826. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(83\)91691-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(83)91691-1)
- Šali, A., & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, *234*(3), 779-815. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>
- Satre, M., Bof, M., & Vignais, P. V. (1980). Interaction of Escherichia coli adenosine triphosphatase with aurovertin and citreoviridin: Inhibition and fluorescence studies. *J. Bacteriol.*, *142*(3), 768-776.
- Satre, M., Klein, G., & Vignais, P. V. (1979). Isolation of Aurovertin-Resistant Mutants from Escherichia Coli. En *Methods Enzymol.* (pp. 178-182, Vol. 56). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(79\)56020-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)56020-0)
- Scherer, M. K., Trendelkamp-Schroer, B., Paul, F., Pérez-Hernández, G., Hoffmann, M., Plattner, N., Wehmeyer, C., Prinz, J. H., & Noé, F. (2015). PyEMMA 2: A Software Package for Estimation, Validation, and Analysis of Markov Models. *J. Chem. Theory Comput.*, *11*(11), 5525-5542. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00743>

- Segala, E., Sougakoff, W., Nevejans-Chauffour, A., Jarlier, V., & Petrella, S. (2012). New Mutations in the Mycobacterial ATP Synthase: New Insights into the Binding of the Diarylquinoline TMC207 to the ATP Synthase C-Ring Structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, *56*(5), 2326-2334. <https://doi.org/10.1128/AAC.06154-11>
- Sekiya, M., Sakamoto, Y., Futai, M., & Nakanishi-Matsui, M. (2017). Role of  $\alpha/\beta$  interface in F1 ATPase rotational catalysis probed by inhibitors and mutations. *Int. J. Biol. Macromol.*, *99*, 615-621. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.089>
- Shapovalov, M. V., & Dunbrack, R. L. (2011). A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure*, *19*(6), 844-858. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.03.019>
- Sheik Amamuddy, O., Veldman, W., Manyumwa, C., Khairallah, A., Agajanian, S., Oluyemi, O., Verkhivker, G. M., & Tastan Bishop, Ö. (2020). Integrated Computational Approaches and Tools for Allosteric Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.*, *21*(3), 847. <https://doi.org/10.3390/ijms21030847>
- Shin, Y.-K., Yoo, B. C., Chang, H. J., Jeon, E., Hong, S.-H., Jung, M.-S., Lim, S.-J., & Park, J.-G. (2005). Down-regulation of Mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase in Human Colon Cancer Cells with Induced 5-Fluorouracil Resistance. *Cancer Res.*, *65*(8), 3162-3170. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3300>
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. En *Methods Mol. Biol.* (pp. 105-116, Vol. 1079). [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_6)
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.*, *7*(1), 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Singh, S., Roy, K. K., Khan, S. R., Kashyap, V. K., Sharma, A., Jaiswal, S., Sharma, S. K., Krishnan, M. Y., Chaturvedi, V., Lal, J., Sinha, S., Gupta, A. D., Srivastava, R., & Saxena, A. K. (2015). Novel, potent, orally bioavailable and selective mycobacterial ATP synthase inhibitors that demonstrated activity against both replicating and non-replicating *M. tuberculosis*. *Bioorganic Med. Chem.*, *23*(4), 742-752. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.12.060>

- Sobti, M., Ueno, H., Noji, H., & Stewart, A. G. (2021). The six steps of the complete F1-ATPase rotary catalytic cycle. *Nat. Commun.*, *12*(1), 4690. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25029-0>
- Sobti, M., Walshe, J. L., Wu, D., Ishmukhametov, R., Zeng, Y. C., Robinson, C. V., Berry, R. M., & Stewart, A. G. (2020). Cryo-EM structures provide insight into how E. coli F1Fo ATP synthase accommodates symmetry mismatch. *Nat. Commun.*, *11*(1), 2615. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16387-2>
- Srivastava, A. P., Luo, M., Zhou, W., Symersky, J., Bai, D., Chambers, M. G., Faraldo-Gómez, J. D., Liao, M., & Mueller, D. M. (2018). High-resolution cryo-EM analysis of the yeast ATP synthase in a lipid membrane. *Science (80-. )*, *360*(6389), eaas9699. <https://doi.org/10.1126/science.aas9699>
- Stein, S. A., Loccisano, A. E., Firestine, S. M., & Evanseck, J. D. (2006). Chapter 13 Principal Components Analysis: A Review of its Application on Molecular Dynamics Data. [https://doi.org/10.1016/S1574-1400\(06\)02013-5](https://doi.org/10.1016/S1574-1400(06)02013-5)
- Symersky, J., Osowski, D., Walters, D. E., & Mueller, D. M. (2012). Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *109*(35), 13961-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207912109>
- Talibov, V. O., Fabini, E., FitzGerald, E. A., Tedesco, D., Cederfeldt, D., Talu, M. J., Rachman, M. M., Mihalic, F., Manoni, E., Naldi, M., Sanese, P., Forte, G., Lepore Signorile, M., Barril, X., Simone, C., Bartolini, M., Dobritzsch, D., Del Rio, A., & Danielson, U. H. (2021). Discovery of an Allosteric Ligand Binding Site in SMYD3 Lysine Methyltransferase. *ChemBioChem*, *22*(9), 1597-1608. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000736>
- Tan, C., Tan, Y.-H., & Luo, R. (2007). Implicit Nonpolar Solvent Models. *J. Phys. Chem. B*, *111*(42), 12263-12274. <https://doi.org/10.1021/jp073399n>
- Tan, C., Yang, L., & Luo, R. (2006). How Well Does PoissonBoltzmann Implicit Solvent Agree with Explicit Solvent? A Quantitative Analysis. *J. Phys. Chem. B*, *110*(37), 18680-18687. <https://doi.org/10.1021/jp063479b>
- Taurino, F., & Gnani, A. (2018). Systematic review of plasma-membrane ecto-ATP synthase: A new player in health and disease. *Exp. Mol. Pathol.*, *104*(1), 59-70. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.12.006>

- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.*, *28*(3), 603-61. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- van Raaij, M. J., Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (1996). The structure of bovine F1-ATPase complexed with the antibiotic inhibitor aurovertin B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *93*(14), 6913-6917. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.14.6913>
- Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L. M., Hernandez, A. J., Parvathi, A., & Kumar, S. H. (2021). Bacterial resistance to antimicrobial agents. *Antibiotics*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050593>
- Vasan, N., Baselga, J., & Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, *575*(7782), 299-309. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*, *40*(4), 277-83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4378521>
- Verschoor, G. J., van der Sluis, P. R., & Slater, E. (1977). The binding of aurovertin to isolated  $\beta$  subunit of F1 (mitochondrial ATPase) stoichiometry of  $\beta$  subunit in F1. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, *462*(2), 438-449. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(77\)90141-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(77)90141-4)
- Vestergaard, M., Roshanak, S., & Ingmer, H. (2021). Targeting the ATP Synthase in Staphylococcus aureus Small Colony Variants, Streptococcus pyogenes and Pathogenic Fungi. *Antibiot. (Basel, Switzerland)*, *10*(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040376>
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., & Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, *1*(8), 945-51. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01276.x>
- Walker, J. E. (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.*, *41*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1042/BST20110773>
- Wang, C., Nguyen, P. H., Pham, K., Huynh, D., Le, T. B. N., Wang, H., Ren, P., & Luo, R. (2016). Calculating protein-ligand binding affinities with MMPBSA: Method and error analysis. *J. Comput. Chem.*, *37*(27), 2436-2446. <https://doi.org/10.1002/jcc.24467>

- Wang, E., Sun, H., Wang, J., Wang, Z., Liu, H., Zhang, J. Z., & Hou, T. (2019). End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00055>
- Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general Amber force field. *J. Comput. Chem.*, *25*(9), 1157-1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>
- Wang, L., Wu, Y., Deng, Y., Kim, B., Pierce, L., Krilov, G., Lupyan, D., Robinson, S., Dahlgren, M. K., Greenwood, J., Romero, D. L., Masse, C., Knight, J. L., Steinbrecher, T., Beuming, T., Damm, W., Harder, E., Sherman, W., Brewer, M., ... Abel, R. (2015). Accurate and Reliable Prediction of Relative Ligand Binding Potency in Prospective Drug Discovery by Way of a Modern Free-Energy Calculation Protocol and Force Field. *J. Am. Chem. Soc.*, *137*(7), 2695-2703. <https://doi.org/10.1021/ja512751q>
- Wang, X., Zeng, Y., Sheng, L., Larson, P., Liu, X., Zou, X., Wang, S., Guo, K., Ma, C., Zhang, G., Cui, H., Ferguson, D. M., Li, Y., Zhang, J., & Aldrich, C. C. (2019). A Cinchona Alkaloid Antibiotic That Appears to Target ATP Synthase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Med. Chem.*, *62*(5), 2305-2332. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01353>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, *25*(9), 1189-1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Weber, J., & Senior, A. E. (1998). Effects of the Inhibitors Azide, Dicyclohexylcarbodiimide, and Aurovertin on Nucleotide Binding to the Three F<sub>1</sub>-ATPase Catalytic Sites Measured Using Specific Tryptophan Probes\*. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33210>
- Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, *12*(1), 35-48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>
- Wise, J. G., Duncan, T. M., Latchney, L. R., Cox, D. N., & Senior, A. E. (1983). Properties of F<sub>1</sub>-ATPase from the uncD412 mutant of *Escherichia coli*. *Biochem J*, *215*(2), 343-350. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6228224>
- Wright, G. D. (2014). Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Can. J. Microbiol.*, *60*(3), 147-54. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0063>
- Wu, R., Yang, X., Zhou, Q., Yu, W., Li, M., Wo, J., Shan, W., Zhao, H., Chen, Y., & Zhan, Z. (2020). Aurovertin B exerts potent antitumor activity against triple-negative breast cancer in vivo

- and in vitro via regulating ATP synthase activity and DUSP1 expression. *Pharmazie*, 75(6), 261-265. <https://doi.org/10.1691/ph.2020.0380>
- Wu, Y. H., Hu, C. W., Chien, C. W., Chen, Y. J., Huang, H. C., & Juan, H. F. (2013). Quantitative Proteomic Analysis of Human Lung Tumor Xenografts Treated with the Ectopic ATP Synthase Inhibitor Citreoviridin (S. Deb, Ed.). *PLoS One*, 8(8), e70642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070642>
- Yagi, H., Kajiwara, N., Tanaka, H., Tsukihara, T., Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., & Akutsu, H. (2007). Structures of the thermophilic F1-ATPase  $\epsilon$  subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(27), 11233-11238. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701045104>
- Ye, X., Wang, J., & Luo, R. (2010). A Revised Density Function for Molecular Surface Calculation in Continuum Solvent Models. *J. Chem. Theory Comput.*, 6(4), 1157-1169. <https://doi.org/10.1021/ct900318u>
- Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., & García-Trejo, J. J. (2018). Unidirectional regulation of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase nanomotor by the  $\zeta$  pawl-ratchet inhibitor protein of *Paracoccus denitrificans* and related  $\alpha$ -proteobacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, 1859(9), 762-774. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.06.005>
- Zhang, A. T., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., Cook, G. M., & Walker, J. E. (2019). The structure of the catalytic domain of the ATP synthase from *Mycobacterium smegmatis* is a target for developing antitubercular drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 116(10), 4206-4211. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817615116>

# Apéndice I. Archivos de entrada y scripts

En este apéndice se especifican cada uno de los scripts utilizados computacionalmente

## Minimización

```
# Minimization with Cartesian restraints on the heavy atoms of the protein
# Set restraintmask & restraint_wt to the correct values for your system
&cntrl
imin=1, maxcyc=5000,
ntpr=100,
/
```

## Equilibración térmica NVT paso 1

```
# Start DM from coordinates. Assign velocities for tempi=100K and warm up to 150K
# Set restraintmask restraint_wt to the correct values for your system
#
&cntrl
timlim=999999, imin=0,
ntx=1, iwrap=1,
ntxo=1, ntpr=500, ntwx=2500, ntwv=0, ntwe=0, ioutfm=1,
ntp=0, ntc=2,
ntb=1, ntf=2, cut=9.0,
ntt=3, temp0=150.0, tempi=100.0, ig=-1, gamma_ln=4.0,
nstlim= 50000, dt=0.004,
&end
```

## Equilibración térmica NVT paso 2

```
# Start DM from coordinates. Assign velocities for tempi=150K and warm up to 200K
# Set restraintmask & restraint_wt to the correct values for your system
#
&cntrl
timlim=999999, imin=0,
ntx=5,  irest=1,  iwrap=1,
ntxo=1, ntp=500, ntwx=2500, ntwv=0, ntwe=0, ioutfm=1,
ntp=0, ntc=2,
ntb=1, ntf=2, cut=9.0,
ntt=3, temp0=200.0, ig=-1, gamma_ln=4.0,
nstlim= 50000, dt=0.004,
&end
```

## Equilibración térmica NVT paso 3

```
# Start DM from coordinates. Assign velocities for tempi=200K and warm up to 250K
# Set restraintmask & restraint_wt to the correct values for your system
#
&cntrl
timlim=999999, imin=0,
ntx=5,  irest=1,  iwrap=1,
ntxo=1, ntp=500, ntwx=2500, ntwv=0, ntwe=0, ioutfm=1,
ntp=0, ntc=2,
ntb=1, ntf=2, cut=9.0,
ntt=3, temp0=250.0, ig=-1, gamma_ln=4.0,
nstlim= 50000, dt=0.004,
&end
```

## Equilibración térmica NVT paso 4

```
# Start DM from coordinates. Assign velocities for tempi=250K and warm up to 300K
# Set restraintmask & restraint_wt to the correct values for your system
#
&cntrl
timlim=999999, imin=0,
ntx=5,  irest=1,  iwrap=1,
ntxo=1, ntp=500, ntwx=2500, ntwv=0, ntwe=0, ioutfm=1,
ntp=0, ntc=2,
ntb=1, ntf=2, cut=9.0,
ntt=3, temp0=300.0, ig=-1, gamma_ln=4.0,
nstlim= 50000, dt=0.004,
&end
```

## Equilibración térmica NPT paso 5

```
# Start DM from coordinates. Assign velocities for tempi=300K and warm up to 310K
in NPT ensemble
&cntrl
timlim=999999, imin=0,
ntx=5,  irest=1,  iwrap=1,  ntc=2,
ntxo=1, ntp=500, ntwx=2500, ntwv=0, ntwe=0, ioutfm=1,
ntp=1, taup=2.0, pres0=1.0,
ntb=2, ntf=2, cut=9.0,
ntt=3, temp0=310.0, ig=-1, gamma_ln=4.0,
nstlim=250000, dt=0.004,
&end
```

## Producción NPT

```
# Constant Pressure DM
&cntrl
timlim=999999, imin=0,
ntx=5, irect=1, iwrap=1, ntc=2,
ntxo=1, ntp=250, ntwx=2500, ntwv=0, ntwe=0, ioutfm=1,
ntp=1, taup=2.0, pres0=1.0,
ntb=2, ntf=2, cut=9.0, barostat = 2
ntt=3, temp0=310.0, ig=-1, gamma_ln=4.0,
nstlim=250000, dt=0.004,
&end
```

## Parametrización de AUR

```
antechamber -i AUR.pdb -fi pdb -o AUR.mol2 -fo mol2 -c bcc -s 2 -at gaff2
parmchk2 -i AUR.mol2 -f mol2 -o AUR.frcmod -s 2
```

## Alineamiento y centrado (eliminación de rotación y traslación, así como condiciones periódicas de fronteras)

```
parm ./2jdi_WAT_WAT_1.prmtop
trajin md1-1000_2jdi_WAT_WAT_1.nc
center :1-2998 mass origin
image origin center
autoimage
reference ./2jdi_WAT_WAT_1.prmcrd
rms reference :2736,2737,2741,2742,2748,2749,2776,2777,2779,2780,2783,2809,2810,2852,2853,2854
@CA,C,N,O out rmsd_2jdi_WAT_WAT_1.dat time 0.1 mass
trajout md1-1000_2jdi_WAT_WAT_1_new.nc netcdf
go
```

## Aislamiento de subunidades

```
parm 1cow_aur_WAT_WAT_1_dry.prmtop
trajin 1cow_3us.nc
strip :1-2406,2877-2998,adp,AUR,2999-3005
trajout bTP_1cow_10.nc
go
quit
```

## Cálculo de ángulos diedros

```
parm bTP_1cow.prmtop
trajin bTP_1cow_10.nc 1 100000
multidihedral BB phi psi resrange 330,331,334,336,342,343,370,373,374,377,403,404,447,45
out PhiPsi1.dat
go
clear all
parm bTP_1cow.prmtop
trajin bTP_1cow_10.nc 100001 200000
multidihedral BB phi psi resrange 330,331,334,336,342,343,370,373,374,377,403,404,447,45
out PhiPsi2.dat
go
clear all
parm bTP_1cow.prmtop
trajin bTP_1cow_10.nc 200001 300000
multidihedral BB phi psi resrange 330,331,334,336,342,343,370,373,374,377,403,404,447,45
out PhiPsi3.dat
go
quit
```

## Cálculo de autocorrelación de ángulos diedros

```
readdata dih1.dat name DIH separate
autocorr DIH_0 out DIH_autocorr1.dat
go
clear all
readdata dih2.dat name DIH separate
autocorr DIH_0 out DIH_autocorr2.dat
go
clear all
readdata dih3.dat name DIH separate
autocorr DIH_0 out DIH_autocorr3.dat
go
quit
```

```
#must separate energy term from summary.EPTOP
#in this case, energy is stored each 2 fs
#add #Energy to the isolated energy term in a new file
```

## Análisis de contactos $F_1$ -AUR

```
parm ./1cow_aur_WAT_WAT_1_dry.prmtop
reference ./1cow_aur_WAT_WAT_1_dry.prmcrd
trajin ./1cow_3us.nc 1 last 100
nativecontacts name 1cow_aur_aur :856,857,859,860,863,2376,2737,2740,2741,2742,2747,2748,2749,2750,2751,2752,2753,2754,2755,2756,2757,2758,2759,2760,2761,2762,2763,2764,2765,2766,2767,2768,2769,2770,2771,2772,2773,2774,2775,2776,2777,2778,2779,2780,2781,2805
:856,857,859,860,863,2376,2737,2740,2741,2742,2747,2748,2749,2776,2777,2779,2780,2781,2805
skipnative byresidue out 1cow_aur_aur_res.dat noimage mindist maxdist distance 5.0
resout 1cow_aur_aur_pairs.dat map mapout resmap.gnu series seriesout 1cow_aur_aur_native.dat savenonnative nncontactpdb 1cow_aur_aur_nonative.pdb seriesnnout 1cow_aur_aur_nonative.series writecontacts 1cow_aur_aur_contacts.dat contactpdb
```

```
1cow_aur_aur_native.pdb resseries present resseriesout resseries.out
```

## Análisis de puentes de hidrógeno entre $F_1$ y AUR

```
parm ./1cow_aur_WAT_WAT_1_dry.prmtop
trajin ./1cow_3us.nc 1 last 10
hbond contacts :2407-2876,3009,3008 avgout avg_ATP_1cow_aur_bTP.dat series uuseries
hbond_ATP_1cow_aur_bTP.series nointramol
go
lifetime contacts[solutehb] out contacts-lifetime_ATP_1cow_aur_bTP.dat
go
create nhbvtime_ATP_1cow_aur_bTP.agr contacts[UU]
go
clear all
parm ./1cow_aur_WAT_WAT_1_dry.prmtop
trajin ./1cow_3us.nc 1 last 10
hbond contacts :488-974,3009,3008 avgout avg_ATP_1cow_aur_aTP.dat series uuseries
hbond_ATP_1cow_aur_aTP.series nointramol
go
lifetime contacts[solutehb] out contacts-lifetime_ATP_1cow_aur_aTP.dat
go
create nhbvtime_ATP_1cow_aur_aTP.agr contacts[UU]
go
```

## Análisis de componentes principales sobre ángulos diedros

```
parm ./bTP_1cow.prmtop
trajin ./bTP_1cow_10.nc
multidiedral BB chip chi2 chi3 chi4 chi5 resrange
330,331,334,336,342,343,370,373,374,377,403,404,447,450 out PhiPsi.dat
run
```

```

multihist dihedrals BB[*] out hist.dihedral.agr normint min -180 max 180 step 1
stat all out stat.dihedral.dat
matrix dihcovar dihedrals BB[*] out dihcovar.dat name DIH
diagmatrix DIH vecs 100 out modes.dihcovar.dat name DIHMODES
run

# Read in previously generated dihedral data
readdata PhiPsi.dat name BB
# Make sure cpptraj knows its dihedral data
dataset mode torsion BB
# Read in previously generated eigenvectors
readdata modes.dihcovar.dat name MyModes
# Project along eigenvectors
projection vecs modes MyModes out dih.project.dat beg 1 end 100 dihedrals BB
run

```

## **Jupyter notebook utilizado para calcular los paisajes conformacionales y los modelos de estado de Markov**

```

#modulos requeridos de python
import warnings
warnings.simplefilter(action='ignore', category=FutureWarning)
import sys
import pandas as pd
import numpy as np
np.set_printoptions(threshold=sys.maxsize)
from matplotlib import pyplot as plt
from matplotlib.ticker import (AutoMinorLocator, MultipleLocator)
from sklearn.decomposition import PCA
from sklearn.preprocessing import StandardScaler

```

```

import seaborn as sns

import csv

from collections import OrderedDict

cmaps = OrderedDict()

import mdshare

import pyemma

import pyemma.coordinates as coor

import pyemma.msm as msm

import pyemma.plots as mplt

from threading import Timer

import msmttools.analysis as msmana

import msmttools

T=310

k=1.380649e-23

#Aquí se cargan los componentes principales calculados con CPPTRAJ
comps = []

with open('dih.project.dat', 'r') as file:
my_reader = csv.reader(file, delimiter=' ')

for row in my_reader:
fields = row[0].split()
if not fields[0].startswith('#):
comps.append(fields[1:])

#Aquí se indica cómo debe leer cada columna del archivo anterior
comps = np.array(comps)
comp1 = comps[:,0].astype(float)
comp2 = comps[:,1].astype(float)
comp3 = comps[:,2].astype(float)
comp4 = comps[:,3].astype(float)

```

```

comp5 = comps[:,4].astype(float)
comp6 = comps[:,5].astype(float)
comp7 = comps[:,6].astype(float)
comp8 = comps[:,7].astype(float)
comp9 = comps[:,8].astype(float)
comp10 = comps[:,9].astype(float)
#Este comando genera la distribución de densidad del componente principal 1 sns.set_-
style(white)
kwargs = dict(kde=True, line_kws='lw': 3)
plt.figure(figsize=(4,3.5), dpi= 300)
sns.displot(comp1, color=black, bins=50, facecolor=dodgerblue, stat='density', **kwargs)
plt.title(PCA1)
#Asignación de variables para los dos primeros componentes principales
traj_coord_A = comp1
traj_coord_B = comp2
#Crea un arreglo de NumPy con los datos del paso anterior
comp1 = np.array(comp1)
comp2 = np.array(comp2)
#Convierte los datos anteriores a una tabla
dataset12 = pd.DataFrame('comp2': comp2, 'comp1': list(comp1), columns=['comp1',
'comp2'])
#Convierte la tabla anterior a un arreglo de NumPy
data12 = np.asarray(dataset12)
#Generación del paisaje de energía libre utilizando PyEMMA
fig, ax, misc = pyemma.plots.plot_free_energy(*data12.T, legacy=False, nbins=100,
ncontours=100, avoid_zero_count=False)
ax.set_xlabel('x')
ax.set_ylabel('y')
ax.set_xlim(-3.5,3.5)

```

```

ax.set_ylim(-3.5,3.5)
ax.set_aspect('equal')
fig.tight_layout()
fig = plt.gcf()
fig.set_size_inches(10, 10)
fig.set_dpi(300)
plt.savefig(FE_landscape_PCA12.png, format=png)
#Genera un arreglo de NumPy para cada trayectoria contenida en el arreglo
data12_1 = np.asarray(dataset12.iloc[0:80001])
data12_2 = np.asarray(dataset12.iloc[80001:160002])
data12_3 = np.asarray(dataset12.iloc[160002:240003])
#Asignación de variable la cual contiene el número de conformeros por trayectoria
x=80001
#Generación de microestados usando el método de agrupamiento k-medias
cluster = pyemma.coordinates.cluster_kmeans([data12_1,data12_2,data12_3], k=1000,
max_iter=200, n_jobs=8, chunksize=10000)
dtrajs_concatenated = np.concatenate(cluster.dtrajs)

#Generación de gráfico de \lag time"
its = pyemma.msm.its(cluster.dtrajs, lags=[1, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 50, 100, 200,
500, 1000], nits=None, errors='bayes', n_jobs=1)
# cluster.dtrajs, lags=[1, 50, 100], nits=None, errors='bayes', n_jobs=12)

fig, axes = plt.subplots(1, 3, figsize=(17.6, 6.6), dpi=300)
pyemma.plots.plot_feature_histograms(data12, feature_labels=['x', 'y'], ax=axes[0])
pyemma.plots.plot_density(*data12.T, ax=axes[1], cbar=False, alpha=0.1)
axes[1].scatter(*cluster.clustercenters.T, s=15, c='C1')
axes[1].set_xlabel('x')
axes[1].set_ylabel('y')

```

```

axes[1].set_xlim(-3,3)
axes[1].set_ylim(-3,3)
axes[1].set_aspect('equal')
pyemma.plots.plot_implied_timescales(its, ylog=False, ax=axes[2])
axes[2].set_ylim(0,2500)
fig.tight_layout()
#any lag time before the slow process (blue line) crosses the lag time threshold
(black line) would work. To maximize the kinetic resolution, we choose the lag time
1 step
#Construcción de la matriz de transición usando estimación Bayesiana y \Perron-cluster
cluster analysis
bayesian_msm = pyemma.msm.bayesian_markov_model(cluster.dtrajs, lag=200, conf=0.95,
dt_traj='10 ps')
nstates = 5
bymsm = bayesian_msm.pcca(nstates)

#Generación de modelos de estado de Markov
fig, ax = plt.subplots(figsize=(8, 8), dpi=1000)
_, _, misc = pyemma.plots.plot_state_map( *np.concatenate([data12_1, data12_2, data12_
3])[ :, :2].T, metastable_traj, ax=ax, cmap='inferno')
ax.set_xlabel('IC 1')
ax.set_ylabel('IC 2')
misc['cbar'].set_ticklabels([r' $\mathcal{S}_{%d}$ ' % (i + 1)
for i in range(nstates)])
fig.tight_layout()
#plt.savefig('MSM_1cow_bTP.png', transparent=True, dpi=300)

bayesian_msm.discrete_trajectories_full;

```

```

full = np.concatenate(bayesian_msm.discrete_trajectories_full)

bayesian_msm.metastable_sets;
#Asignación de macroestados
set0=bayesian_msm.metastable_sets[0]
#set0
set1=bayesian_msm.metastable_sets[1]

set2=bayesian_msm.metastable_sets[2]

set3=bayesian_msm.metastable_sets[3]

set4=bayesian_msm.metastable_sets[4]
#Cálculo de la frecuencia acumulativa de visita para cada macroestado
freq = unique, counts = np.unique(bayesian_msm.discrete_trajectories_full, return_
counts=True) dict(zip(unique, counts));

freq2 = np.stack((freq[1]), axis=0)
#freq2

index = np.take(freq2,set0)
sum(index)/(3*x)

cen = np.max(index)
cen

valmax=0
for ii in range(len(index)):
if index[ii]>valmax:

```

```

sitio=ii
valmax=index[ii]

print('centroide', 'posición-set0', 'ocurrencia')
print(set0[sitio],sitio,valmax)

rep=set0[sitio]

a = np.where(full==rep)
#print(a)
#correct numeration
b = []
for i in a:
b.append(i+1)
print('cpptraj')
print(b)
#Cálculo de matriz de probabilidad de transición
P = bymsm.coarse_grained_transition_matrix
T = P.clip(min=0)
print(T)

print(T[0].sum())
print(T[1].sum())
print(T[2].sum())
print(T[3].sum())
print(T[4].sum())

A = T[0]/T[0].sum()
B = T[1]/T[1].sum()

```

```

C = T[2]/T[2].sum()
D = T[3]/T[3].sum()
E = T[4]/T[4].sum()

print(A.sum())
print(B.sum())
print(C.sum())
print(D.sum())
print(E.sum())

P = np.stack((A,B,C,D,E),axis=0)
print(P)

bymsm.stationary_probability;
#Ruta de transición de red conformacional
M = msm.markov_model(P)
pos = np.array([[3.5,-2.5],[3.5,2.5],[-1.5,-2.5],[-1.5,2.5],[0.9,1.4]])
fig, misc =mpltt.plot_markov_model(M, state_colors=['#00000c', '#36055d', '#bc3754',
'#f98e09','#fcffa4'],arrow_label_format='%.4f', pos=pos, arrow_curvature=-0.8,
show_frame=True, state_labels=['1','2', '3', '4','5'], arrow_labels='weights')
fig.tight_layout()
fig = plt.gcf()
plt.rcParams['font.size'] = '26'
fig.set_size_inches(16,16)
fig.set_dpi(600)
plt.savefig(1cow_bTP_SC_PCA12.png, format=png)
#Fin del notebook

```

## Generación de topologías para el cálculo de energía libre mediante el método MMPBSA

```
ante-MMPBSA.py -p new_solvated_complex.prmtop -c dry_complex.top -r prot.top -l  
lig.top -s ':Na+,Cl-,WAT' -n ':AUR' --radii=mbondi2
```

## Parámetros utilizados para el cálculo de MMPBSA

```
#Input file for running PB
```

```
&general
```

```
startframe=1, endframe=240003, interval=600, verbose=3, keep_files=0,
```

```
entropy=0, netcdf=1,
```

```
/
```

```
&pb
```

```
istrng=150.0, inp=2, sasopt=2, indi=2
```

```
/
```

```
&decomp
```

```
idecomp=2,
```

```
print_res=369,372,373,376,817,818,821,823,828,829,830,857,860,861,864,886,887,890,891,893,9
```

```
dec_verbose=3,
```

```
/
```

## Protocolo de rDock

```
RBT_PARAMETER_FILE_V1.00
```

```
TITLE atp_synthase
```

```
RECEPTOR_FILE 1cow.mol2
```

```
RECEPTOR_FLEX 3.0
```

```

#####
### CAVITY DEFINITION: REFERENCE LIGAND METHOD
#####

SECTION MAPPER

SITE_MAPPER RbtLigandSiteMapper

REF_MOL reference.sdf

RADIUS 6.0

SMALL_SPHERE 1.0

MIN_VOLUME 100

MAX_CAVITIES 1

VOL_INCR 0.0

GRIDSTEP 0.5

END_SECTION

#####

# CAVITY DEFINITION: TWO SPHERES METHOD
#####

#SECTION MAPPER

# SITE_MAPPER RbtSphereSiteMapper

##HETATM 2815 O HOH 756 37.266 -20.992 -4.910 0.90 24.86 1CSE2940

# CENTER (-9.393,19.324,6.368)

# RADIUS 15.0

# SMALL_SPHERE 1.5

# LARGE_SPHERE 6.0

# MAX_CAVITIES 1

#END_SECTION

#####

#CAVITY RESTRAINT PENALTY

```

```
#####  
SECTION CAVITY  
SCORING_FUNCTION RbtCavityGridSF  
WEIGHT 1.0  
END_SECTION
```

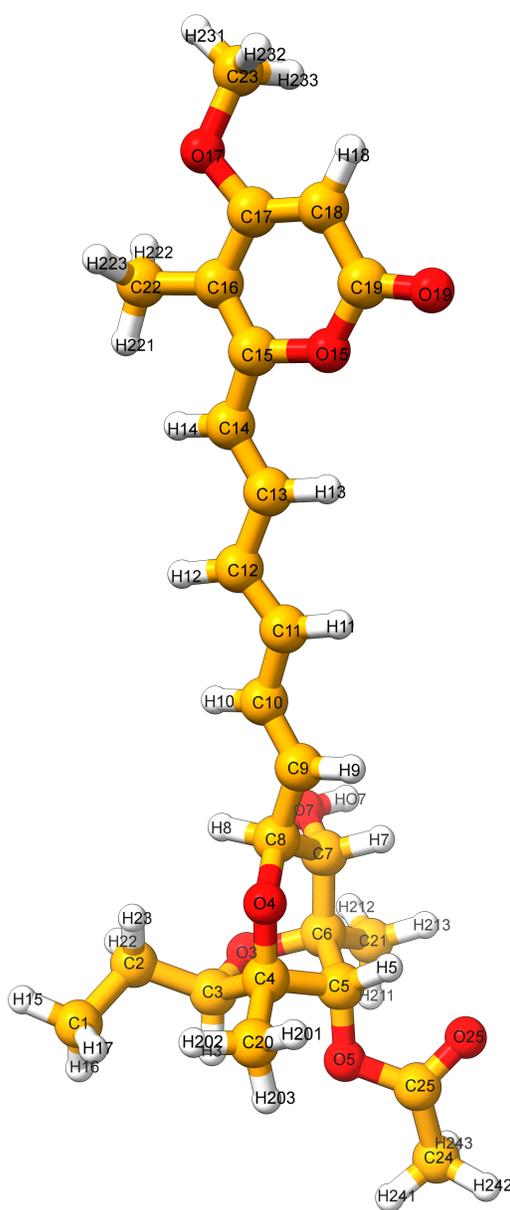
```
#####  
## PHARMACOPHORIC RESTRAINTS  
#####  
SECTION PHARMA  
SCORING_FUNCTION RbtPharmaSF  
WEIGHT 1.0  
CONSTRAINTS_FILE pharma.restr  
# OPTIONAL_FILE optional_pharma.restr  
# NOPT 1  
# WRITE_ERRORS FALSE  
END_SECTION
```

## Restricciones farmacofóricas utilizadas en rDock

```
87.758 84.500 103.500 0.3 Hyd  
87.329 82.500 102.675 0.4 Acc  
92.000 85.500 101.500 1.0 Hyd  
92.047 71.027 95.239 1.0 Hyd  
90.402 81.968 100.722 0.8 Hyd  
95.330 76.108 93.778 0.6 Hyd
```

# Apéndice II. Parámetros AUR

Tabla 1. Tipos de átomo y cargas parciales usadas para AUR. Los parámetros van der Waals y términos covalentes son aquellos asociados con los tipos de átomos particulares en el campo de fuerza de AMBER. NA = Nombre del átomo, TA = Tipo de átomo y CP = Carga parcial



NA	TA	CP	NA	TA	CP
C1	c3	-0.0921	H243	hc	0.079
C2	c3	-0.0904	H242	hc	0.079
C3	c3	0.1101	H241	hc	0.079
C4	c3	0.1328	H233	h1	0.054
C5	c3	0.0851	H232	h1	0.054
C6	c3	0.1448	H231	h1	0.054
C7	c3	0.1051	H223	hc	0.0507
C8	c3	0.1263	H222	hc	0.0507
C20	c3	-0.0781	H221	hc	0.0507
C21	c3	-0.0841	H213	hc	0.0577
C24	c3	-0.1501	H212	hc	0.0577
C25	c	0.6381	H211	hc	0.0577
O3	os	-0.4006	H203	hc	0.0554
O4	os	-0.4026	H202	hc	0.0554
O5	os	-0.4259	H201	hc	0.0554
O7	oh	-0.5758	H13A	hc	0.0357
O25	o	-0.538	H12A	hc	0.0357
C9	c2	-0.1422	H11A	hc	0.0357
C10	ce	-0.152	HO7	ho	0.403
C11	ce	-0.096	H9	ha	0.148
C12	cf	-0.148	H8	h1	0.0777
C13	cf	-0.058	H7	h1	0.0527
C14	ce	-0.163	H5	h1	0.1067
C15	cc	0.1911	H3	h1	0.0687
C16	cd	-0.1982	H22	hc	0.0622
C17	cd	0.2351	H21	hc	0.0622
C18	cc	-0.3862	H18	ha	0.171
C19	c	0.7398	H14	ha	0.144
C22	c3	-0.0369	H13	ha	0.152
C23	c3	0.1087	H12	ha	0.128
O15	os	-0.3372	H11	ha	0.134
O17	os	-0.3129	H10	ha	0.129
O19	o	-0.5855	-	-	-