



UNIVERSIDAD MAYOR
FACULTAD DE CIENCIAS, INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA

Escuela de Biotecnología

“Interfiriendo con el Mecanismo de Adhesión de *Streptococcus pyogenes*”

Michelle Elizabeth Mendoza Becerra

Proyecto de Tesis para optar al título
de Biotecnóloga

Santiago-Chile
2024



UNIVERSIDAD MAYOR
FACULTAD DE CIENCIAS, INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA

Escuela de Biotecnología

“Interfiriendo con el Mecanismo de Adhesión de *Streptococcus pyogenes*”

Michelle Elizabeth Mendoza Becerra

Proyecto de Tesis para optar al título
de Biotecnóloga

Tutor: Dr. Jaime Andrés Rivas Pardo

Santiago-Chile
2024

“nankurunaisa”

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar gracias a la Universidad Mayor y a la Escuela de biotecnología por permitirme desarrollarme como científica. Doy gracias a los docentes que a lo largo de mi carrera me ayudaron y me inspiraron a seguir mi formación. Agradezco especialmente al Dr. Jaime Andrés Rivas Pardo y al Dr. Sebastián Reyes Cerpa por permitirme desarrollar mi tesis en su laboratorio, guiándome desde mi llegada al laboratorio y siempre esperando lo mejor para mi desarrollo tanto como personal como profesional.

Agradezco a todos los integrantes del laboratorio de Biología Mecánica y al centro de Genómica Microbiana por ofrecer el constante apoyo y por brindarme una excelente experiencia durante mi trabajo, con mención especial a Tomás Hermosilla, Vicente Colarte, Sergio Canales, Natalie Duchens e Ivana Orellana por la ayuda brindada en mi instancia y la gran paciencia que tuvieron durante mi instancia de tesis.

Por otro lado, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todos mis amigos que estuvieron conmigo durante mi etapa universitaria. En especial, a Francisca Troncoso, Isidora Pittet, Natalie Duchens, Felipe Villegas, Javier Muñoz, Mateus Frazão, Vicente Colarte y Sergio Canales, quienes, en distintos momentos, me brindaron su apoyo y compañía, permitiéndome no decaer en este camino. Algunos estuvieron presentes a lo largo de todo el proceso, mientras que otros me acompañaron en los últimos tramos de mi carrera.

Así mismo, agradezco de corazón a mis amigas de toda la vida, Paula Ahumada, Camila Maudier y Camila Yañez, por estar siempre ahí, apoyándome y guiándome en cada aspecto de mi vida.

Finalmente, quiero expresar mi eterno agradecimiento a mi familia, comenzando por mis padres y siguiendo con mis hermanos, en especial a Bastián Mendoza, quien siempre me guio y me motivó cuando pensé en rendirme. Gracias por no dejarme caer y recordarme siempre que, como dices, “Para nosotros no es opción rendirnos”. También, a mis abuelos, Miriam Espinoza y Manuel Mendoza, les agradezco de todo corazón por haberme criado y formado en la persona que soy hoy en día. Sin ustedes, no habría llegado a donde estoy hoy. Los amo profundamente.

Información del laboratorio y Centro de Investigación

Centro de Genómica y Bioinformática – Universidad Mayor

Este trabajo de tesis se llevó a cabo en las dependencias del Centro de Genómica y Bioinformática (CGB) de la Universidad Mayor. El CGB es dirigido por la Dr. Sebastián Reyes, quién lidera y coordina a las diferentes unidades académicas organizadas en tres laboratorios de investigación: Laboratorio de Bioinformática, Laboratorio de Genómica Vegetal y Laboratorio de Genómica Microbiana.

El director de la tesis fue el profesor Jaime Andrés Rivas Pardo, líder del grupo de Biología Mecánica perteneciente al Laboratorio de Genómica Microbiana, el cual es dirigido por los profesores Dr. Sebastián Reyes y por el mismo Dr. Rivas Pardo. Cada uno posee una línea de investigación independientes que se reúnen en el estudio y caracterización de mecanismos involucrados en la relación patógeno-hospedero.

En el caso de este trabajo de investigación asociado al Dr. Rivas Pardo, este se enmarcó en la propuesta asociada al proyecto FONDECYT 1221064, dedicado comprender los mecanismos que gobiernan la adhesión bacteriana mediados por filamentos de pilina – Mecano-Farmacología de la Adhesión Bacteriana – proyecto de investigación financiado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID).

Abreviaturas

- **RAM:** Resistencia bacteriana a los antimicrobianos
- **FN:** Fascitis necrotizante
- **OD:** Densidad Óptica
- **IPTG:** Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- **Asn:** Asparagina
- **Lys:** Lisina
- **PDB:** Protein Data Bank
- **RPG:** Random Peptide Generator
- **AMP:** Ampicilina
- **CLO:** Cloranfenicol
- **KAN:** Kanamicina
- **TET:** Tetraciclina
- **PSMF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- **MT:** Magnetic Tweezer
- **RBS:** Unión al Ribosoma
- **MW:** Marcador Molecular

Índice

Abreviaturas	6
Índice	7
Índice de Tablas.....	10
Índice de Figuras.....	10
i. Resumen	12
ii. Summary.....	13
1. Introducción y Marco teórico	14
1.1 El Impacto de los Antibióticos y el Desafío Creciente de la Resistencia Bacteriana	14
1.2 Mecanismos de adhesión bacteriana	15
1.3 <i>Streptococcus pyogenes</i> : Enfermedades, importancia clínica y su mecanismo de adhesión.	17
1.4 Estructura de la Pili de <i>S. pyogenes</i>	19
2. Hipótesis y Objetivos.....	23
2.1 Hipótesis	23
2.2 Objetivos	23
2.2.1 Objetivo General	23
2.2.2 Objetivos Específicos	23
3. Materiales y Métodos	24
3.1 Materiales	24
3.1.2 Vectores	24
3.1.4 Medios de Cultivo	25
3.1.3 Cepas Bacterianas	25
3.1.6 Sistema de purificación	25
3.1.5 Amortiguadores	25
3.1.7 Biotinilación	26
3.1.8 Cámaras de Fluido	26
3.2 Desarrollo del péptido bloqueador del enlace isopeptídico de Spy0128.	26
3.2.1 Obtención del bolsillo de la proteína Spy0128	26
3.2.2 Desarrollo del péptido a través del Software RPG	27
3.3 Representaciones de vectores de expresión.....	28

3.3.1	Vector pFN18a HaloTag®_His-Tag_ Avitag™	28
3.3.3	Vector de expresión pBAD.....	29
3.4	Transformación de los vectores de expresión en <i>Escherichia coli</i>	30
3.4.1	Transformación en células de clonamiento XL10 GOLD con vectores de expresión.	30
3.4.2	Transformación en células de expresión BL21(DE3) pLysS con los vectores de expresión ..	31
3.5	Expresión de la proteína de Spy0128 en presencia y ausencia de los péptidos bloqueadores. ...	32
3.5.1	Expresión de la proteína Spy0128 en cepas <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS.	32
3.5.2	Expresión de los péptidos (C96, N14 y D3) en cepas de BL21(DE3) pLysS (pFN18a) quimio-competentes.	33
3.6	Purificación y verificación de la expresión de Spy0128 en presencia y ausencia de los péptidos bloqueadores.	35
3.6.1	Purificación de la proteína Spy0128 en presencia y ausencia de los péptidos bloqueadores.	35
3.6.2	Verificación de la expresión de Spy0128 y la expresión de los péptidos a través de geles de poliacrilamida SDS.	35
3.7	Preparación de proteínas para el uso del Microscopio de Pinzas Magnéticas.	37
3.7.1	Biotinilación de la proteína Spy0128 en ausencia y en presencia de los péptidos bloqueadores.	37
3.7.2	Elaboración de las cámaras de fluido.	37
3.7.3	Microscopio de pinzas magnéticas “MT”.	39
4.	Resultados	41
4.1	Creación y obtención de los péptidos bloqueadores del enlace isopeptídico.	41
4.1.1	Creación de los péptidos bloqueadores a partir de RPG.	41
4.1.2	Diseño del vector de expresión de los péptidos.	42
4.1.3	Expresión de los péptidos bloqueadores del enlace isopeptídico.	43
4.2	Evaluación de la intervención de péptidos bloqueadores del enlace isopeptídico de la proteína Spy0128 a través de geles SDS-PAGE.....	44
4.2.1	Expresión y purificación la proteína Spy0128 sin la intervención de los péptidos bloqueadores.	44
4.2.2	Verificación de la inducción y expresión la proteína Spy0128 con la intervención de los péptidos bloqueadores en diferentes condiciones de expresión.	45
4.2.3	Expresión y purificación la proteína Spy0128 con la intervención de los péptidos bloqueadores.	48

4.3 Extensión de la proteína Spy0128 con la ausencia y presencia de los péptidos bloqueadores.	52
4.3.1 Extensión de la proteína Spy0128 en la ausencia de los péptidos bloqueadores.	52
4.3.2 Extensión de la proteína Spy0128 con la intervención de los péptidos bloqueadores.	55
5. Discusión	62
6. Conclusión	71
7. Implicancias y Proyecciones	72
8. Referencias	73

Índice de Tablas

Capítulo 3: Materiales y Métodos	24.
- Tabla 3.1 Péptidos controles para el desarrollo del nuevo péptido bloqueador del enlace isopeptídico.....	28.
- Tabla 3.2 Protocolo de pulso utilizado para medir la extensión de la proteína Spy0128 con y sin intervención de los péptidos bloqueadores.....	40.
Capítulo 4: Resultados	41.
- Tabla 4.1 Resultados de la afinidad obtenidos a partir de RPG de los péptidos controles “D3” y “N14”.....	41.
- Tabla 4.2 Resultado de la afinidad obtenida del péptido creado a partir de RPG.....	42.

Índice de Figuras

Capítulo 1: Introducción y Marco teórico	13.
- Figura 1.1 Representación de la estructura del pili de <i>S. pyogenes</i> en la unión a la célula epitelial	19.
- Figura 1.2 Estructura cristalina de la pilina mayor de <i>Streptococcus pyogenes</i>	20.
Capítulo 3: Materiales y Métodos	24.
- Figura 3.1 Vector pFN18a HaloTag®__His-Tag_AviTag™ más la proteína Spy0128.....	29.
- Figura 3.2 Diagrama de la metodología de transformación bacteriana.....	31.
- Figura 3.3 Diagrama de flujo de la expresión de Spy0128.....	33.
- Figura 3.4 Diagrama de flujo de la expresión de Spy0128 y expresión de los péptidos.....	34.
- Figura 3.5 Diagrama de flujo de la purificación de la proteína Spy0128 en ausencia y presencia de los péptidos.....	35.
- Figura 3.6 Montaje de la cámara de fluido.....	38.
- Figura 3.7 Representación de la dinámica de desplegamiento de la estructura de la proteína.....	39.
Capítulo 4: Resultados	40.
- Figura 4.1 Diseño del Vector pBAD con diferentes péptidos bloqueadores.....	43.
- Figura 4.2 Gel de poliacrilamida SDS al 15% cargados con la inducción de los péptidos bloqueadores.....	44.
- Figura 4.3 Expresión y purificación de la proteína Spy0128 en conjunto con las proteínas de etiqueta (HaloTag® y AviTag).....	45.
- Figura 4.4 Coexpresión entre el péptido D3 y la proteína Spy0128 con diferentes condiciones de inducción.....	46.
- Figura 4.5 Coexpresión entre el péptido N14 y la proteína Spy0128 con diferentes condiciones de inducción.....	47.
- Figura 4.6 Coexpresión entre el péptido C96 y la proteína Spy0128 con diferentes condiciones de inducción.....	48.

- Figura 4.7 Coexpresión y purificación entre el péptido D3 y la proteína Spy0128.....49.
- Figura 4.8 Coexpresión y purificación entre el péptido N14 y la proteína Spy0128.....50.
- Figura 4.9 Coexpresión y purificación entre el péptido C96 y la proteína Spy0128.....50-51.
- Figura 4.10 Proteínas concentradas de Spy0128 con la intervención de los diferentes péptidos bloqueadores.....51.
- Figura 4.11 Resultados de la extensión de la proteína Spy0128 en el microscopio de pinzas magnéticas.....53.
- Figura 4.12 Histograma de estado de la proteína Spy0128.....54.
- Figura 4.13 Resultados de la extensión de la proteína Spy0128 con la intervención del péptido D3 en el microscopio de pinzas magnéticas.....55.
- Figura 4.14 Histogramas de estado de la proteína Spy0128 intervenida con el péptido bloqueador D3.....56.
- Figura 4.15 Resultados de la extensión de la proteína Spy0128 con la intervención del péptido N14 en el microscopio de pinzas magnéticas.....57.
- Figura 4.16 Histograma de estado de la proteína Spy0128 intervenida con el péptido bloqueador N14.....58.
- Figura 4.17 Resultados de la extensión de la proteína SPY0128 con la intervención del péptido C96 en el microscopio de pinzas magnéticas.....59.
- Figura 4.18 Histograma de estado de la proteína Spy0128 intervenida con el péptido bloqueador C96.....60.

i. Resumen

A lo largo de la historia, los microorganismos han coexistido con los humanos. A pesar de que muchos de ellos, en particular bacterias, son beneficiosos otros son responsables una de serie de enfermedades. Durante siglos, el tratamiento para microorganismos patogénicos descansó en las propias herramientas del hospedero y una serie de infusiones de origen animal y vegetal. No obstante, el descubrimiento y empleo de antibióticos en la primera mitad del siglo XX, transformó los procedimientos en medicina. Ahora se trataban heridas y otras afecciones con moléculas provenientes de hongos, que evitaban la proliferación o atenuación de los síntomas.

Lamentablemente, en los últimos años, se ha registrado un aumento en la resistencia al empleo de antibióticos por parte de bacterias patogénicas, dificultando el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas. Un ejemplo de ello es la bacteria *Streptococcus pyogenes*, agente etiológico de la infección bacteriana amigdalitis. Esta es una afección caracterizada por la inflamación de las amígdalas, pero que bajo ciertas circunstancias esta bacteria puede infectar otro tipo de tejidos de gran complicación clínica. Este es el caso de la fascitis necrotizante, donde la infección debe ser tratada por especialistas y adecuado el uso de antibióticos. No obstante, en muchos de estos casos, estas infecciones son refractarias al tratamiento con antibiótico, siendo la solución la remoción del tejido infectado.

La bacteria *S. pyogenes* se une al epitelio del hospedero por medio de una serie de estructuras especializadas en la unión, entre ellas el pilus, verdaderos filamentos moleculares que se proyectan desde la pared alcanzando largos de hasta varios micrones. En el caso de *S. pyogenes*, los pili se constituyen en su gran mayoría por Spy0128, proteína estructural que es capaz de soportar grandes fuerzas mecánicas sin desplegarse. Esta curiosa característica sólo es posible por la presencia de un enlace ubicado en el extremo C-terminal de Spy0128, enlace isopeptídico formado por las cadenas laterales de una Lys 179 y Asn 303.

Este proyecto de tesis se enfoca en la búsqueda de alternativas innovadoras para el tratamiento de infecciones provocadas por *S. pyogenes*, específicamente a través del desarrollo de un péptido diseñado mediante herramientas computacionales en el laboratorio de Genómica Microbiana. El objetivo principal del péptido es interferir con el enlace covalente, denominado enlace iso-peptídico Lys179-Asn303, presente en la proteína Spy0128. Esta estrategia abre una vía prometedora para el desarrollo de tratamientos que no dependan de los antibióticos tradicionales y que puedan ofrecer nuevas opciones terapéuticas en la lucha contra las infecciones bacterianas.

ii. Summary

Throughout history, microorganisms have coexisted with humans. Although many of them, particularly bacteria, are beneficial, others are responsible for a series of diseases. For centuries, the treatment for pathogenic microorganisms relied on the host's own tools and a series of infusions of animal and plant origin. However, the discovery and use of antibiotics in the first half of the 20th century transformed the procedures in medicine. Wounds and other conditions were now treated with molecules from fungi, which prevented the proliferation or attenuation of symptoms.

*Unfortunately, in recent years, there has been an increase in pathogenic bacteria's resistance to the use of antibiotics, making the treatment of various infectious diseases difficult. An example of this is the bacteria *Streptococcus pyogenes*, the etiological agent of the bacterial infection tonsillitis. This condition is characterized by inflammation of the tonsils, but under certain circumstances, this bacteria can affect other types of tissues of great clinical complication. This is the case of necrotizing fasciitis, where the infection must be treated by specialists and the appropriate use of antibiotics. However, in many of these cases, these infections are refractory to antibiotic treatment, the solution being the removal of the infected tissue.*

*The *S. pyogenes* bacteria attaches to the host epithelium through a series of structures specialized in attachment, including the pilus, true molecular filaments that project from the wall, reaching lengths of up to several microns. In the case of *S. pyogenes*, the pili are largely made up of Spy0128, a structural protein that is capable of withstanding large mechanical forces without unfolding. This curious characteristic is only possible due to the presence of a bond located at the C-terminal end of Spy0128, an isopeptide bond formed by the side chains of a Lys 179 and Asn 303.*

*This thesis project focuses on the search for innovative alternatives for the treatment of infections caused by *S. pyogenes*, specifically through the development of a peptide designed using computational tools in the Microbial Genomics laboratory. The main objective of the peptide is to interfere with the covalent bond, called the Lys179-Asn303 isopeptide bond, present in the Spy0128 protein. This strategy opens a promising avenue for developing treatments that do not depend on traditional antibiotics and can offer new therapeutic options in the fight against bacterial infections.*

1. Introducción y Marco teórico

1.1 El Impacto de los Antibióticos y el Desafío Creciente de la Resistencia Bacteriana

Una serie patologías de origen bacteriano comenzaron a tener cura, luego del descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 y la subsecuente implementación del uso de antibióticos en la medicina (1,2). Su uso no sólo quedó solo restringido para el tratamiento de infección, también se incorporó en una serie de procedimientos que involucraban el uso profiláctico (3,4), impactando de manera importante en nuestra sociedades reduciendo de manera significativa la mortalidad y desencadenado un aumento de la esperanza de vida de la población (4–6).

A pesar de la serie de beneficios que prometió al inicio el empleo de antibióticos, su uso extensivo y a veces inapropiado, junto con el propio desarrollo de resistencia por parte de microorganismo, ha conllevado a un aumento cada vez más preocupante en la resistencia bacteriana (4,7). Sumado a lo anterior, ya son varias décadas desde el desarrollo del último antibiótico. Daptomicina, molécula obtenida a partir de *Streptomyces roseosporus*, fue descrita e implementada en 1987 y es actualmente utilizada para tratar infecciones por *S. aureus* resistente a la vancomicina (8,9). Empresas farmacéuticas han centrado sus esfuerzos en la implementación de antibióticos sintéticos inspirados en moléculas antimicrobianas, sin embargo, la identificación de nuevas sustancias químicas con las características fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de antibióticos sigue siendo un desafío significativo.

Este desafío se ve agravado por el continuo desarrollo de la Resistencia bacteriana a los AntiMicrobianos (RAM). La RAM se produce por el uso indebido y excesivo de los antimicrobianos, este el principal factor que determina la aparición de patógenos farmacorresistentes. Estas características pueden ser adquiridas por una resistencia intrínseca natural debido a la presencia o ausencia de ciertas estructuras, a través de mutaciones en genes cromosómicos o mediante transferencia horizontal de genes que conducen a la resistencia de los antibióticos (10,11). Este último hace que el tratamiento de las infecciones bacterianas sea cada vez más difícil, aumentando el riesgo de propagación de las enfermedades, el desarrollo de patologías graves o llevando incluso a la muerte del paciente (12). Según OMS, la RAM es una amenaza para la salud mundial, y, ha sido declarada como una de las 10 principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad; las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos son responsables de alrededor de 700.000 muertes al año en todo el mundo y se estima que serán responsables de más de 10 millones de muertes al año en 2050 (11,13).

Además, los datos de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) indican que la RAM causó 1,27 millones de muertes en 2019 y estuvo asociada con casi 5 millones de fallecimientos en ese mismo año (14).

El costo asociado al tratamiento de infecciones resistentes es también considerable. Un informe del 2007 del Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) y de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) estimó que el costo total de la RAM en Europa, Oriente Medio y África, solo para cinco antibióticos, ascendió a 1.500 millones de euros, de los cuales el 60% (900 millones de euros) correspondió a costes hospitalarios (15). Según el Banco Mundial proyecta que para 2050, los costos globales atribuibles a la RAM podrían representar entre 1,1% (bajo impacto de RAM)-3,8% (Alto impacto de RAM) del PIB mundial y en el caso de países con ingresos bajos la pérdida superará el 5% del PIB, con un coste total estimado de aproximadamente 100 mil millones de USD. Esto resalta no solo el impacto en la salud, sino también el inmenso desafío económico que esta crisis representa para toda la humanidad (16); dado lo anterior, buscar nuevas alternativas al uso de antibióticos es una tarea crucial.

1.2 Mecanismos de adhesión bacteriana.

La adhesión es un paso crucial para que la bacteria colonice al hospedero, ya que le permite evitar la eliminación por los sistemas de defensa de este. Por lo tanto, la adhesión es clave para una colonización exitosa. La adhesión a las células del hospedero facilita la translocación de bacterias patógenas a través de las barreras celulares, así se genera un ambiente óptimo para que la bacteria pueda persistir y comience a replicarse e internalizarse en las células de hospedero. Luego de ese paso clave, los patógenos pueden propagarse dentro del huésped y expresar o liberar más factores de virulencia que permiten la infección por este (17,18). Estos factores de virulencia pueden ser toxinas bacterianas, hidratos de carbono o proteínas de la superficie celular. Estos patógenos deben adherirse a células específicas del hospedero para establecer una infección, este proceso es crucial y está mediado por adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias, que actúan como lectinas, las cuales reconocen los residuos de oligosacáridos en los receptores de glicoproteínas o glicolípidos de la célula hospedera (19–21). La presencia de estos factores de adhesión específicos no sólo determina la adhesión del patógeno, sino que también determina el tropismo del patógeno hacia los tejidos que posean los receptores de superficie correspondientes (19).

Las adhesinas tienen un tropismo hacia elementos estructurales de la membrana del huésped, como por ejemplo colágeno, fibronectina y laminina (18). Luego de la adhesión, las bacterias se enfrentan a una fuerza repulsiva que es causada por los mecanismos propios de la célula hospedera; para que la bacteria pueda mantenerse adherida y superar la fuerza repulsiva, utiliza una serie de estructuras filamentosas de superficie conocidas como Pili (latín “pelo”) o fimbrias (latín “hilo” o “fibra”) (19). Estos filamentos proteicos están compuestos por centenas o miles de repeticiones de subunidades llamadas pilinas, que unidas entre sí pueden llegar a formar estructuras de varios micrones de largo. Estas fibras participan en la adhesión de superficies bióticas y abióticas, la motilidad, transferencia de ADN, formación de biopelículas y también son factores de virulencia, tanto en bacterias Gramnegativas como en Grampositivas (17,19).

En bacterias Gramnegativas, las clasificaciones que se encuentran más representadas son Pili ensamblados por vía de chaperonas (tipo I y P), Pili tipo IV, entre otros. Estos se caracterizan por ser más gruesos y con sus subunidades asociadas no covalentemente, dependiendo de la clasificación de ensamblaje le otorga fuerza y estabilidad. Estas estructuras filamentosas, que tienen largos entre 1-4 μm y diámetro de 5-8 nm, son capaces de soportar fuerzas altas producidas por el hospedero (19,21). Un ejemplo destacado de los pili ensamblados por la vía chaperona-usher son los pili tipo I, que se encuentran distribuidos en la familia Enterobacteriaceae, incluyendo la *Escherichia coli* uropatógena. En este caso, el pili este compuesto por un heteropolímeros de varias y diferentes subunidades proteicas. Los Pili tipo I poseen una proteína adhesiva específica, localizada en el extremo distal de la estructura, que se une a hidratos de carbono en la superficie de las células del huésped, lo que facilita la colonización y evita la eliminación bacteriana en sitios como la vejiga (19).

En el caso de las bacterias Grampositivas la organización de estos filamentos es bastante diferente. Las principales subunidades—o proteínas estructurales—del pilus se encuentran conectadas covalentemente entre sí. Además, la unión de los filamentos pili a la pared celular es gestionada por una transpeptidasa, conocida como sortasa que reconoce una secuencia específica y cataliza la unión tipo peptídica a grupos presentes en la pared (18). Al igual que en el caso anterior, los pili de Grampositivos son largas estructuras filamentosas y flexibles, con longitudes que varían entre 0,3-3 μm y con un diámetro de 3-10 nm. No obstante, sus subunidades se unen entre sí por medio de enlaces isopeptídicos, que comunican cadenas laterales de residuos de lisina y asparagina, lo que se traduce no solo en cambios en el plegamiento y estructura de las subunidades estructurales, sino que también en

el comportamiento del pili bajo fuerza. Un ejemplo es *Streptococcus pyogenes*, bacteria que es capaz de unirse a epitelios humanos por medio de un gran filamento, constituido principalmente por la proteína Spy0128, la cual presenta dos dominios tipo inmunoglobulina, cada uno de estos con enlaces isopeptídicos intramoleculares (17,19,22).

1.3 *Streptococcus pyogenes*: Enfermedades, importancia clínica y su mecanismo de adhesión.

Streptococcus pyogenes es un estreptococo del grupo A o GAS, este presenta un crecimiento β -hemolítico en agar sangre. Es un patógeno de vida libre, su nicho ecológico es bastante estrecho, su único huésped biológico es el ser humano, por lo tanto, es de transmisión directa entre persona a persona y ocurre normalmente a través de microgotas respiratorias o con el simple contacto con la piel (23,24). Esta bacteria coloniza principalmente la nasofaringe y la piel, provocando una serie de enfermedades: faringitis, amigdalitis, impétigo, y la celulitis son sólo un par ejemplos de cuadros clínicos sencillos; sin embargo, esta bacteria también puede desencadenar enfermedades graves tales como la fiebre reumática, síndrome del shock tóxico estreptocócico y la temida fascitis necrotizante (19,22).

Mientras la faringitis y amigdalitis son enfermedades que se localizan en la primera porción de las vías respiratorias, atendiendo la garganta y amígdalas causando fiebre y dolor (19,25); otras enfermedades como la fiebre reumática y la celulitis logran colonizar tejidos más distantes. Por ejemplo, de un foco primario de infección en la garganta puede llegar a afectar tejidos por debajo de la piel que, incluso en situaciones más graves, pueden localizarse en la dermis, músculo, el corazón, y el cerebro (26–28). Sin embargo, uno de los cuadros más graves, por GAS, es sin duda la fascitis necrotizante, que consiste en una infección progresiva de la piel asociada a una destrucción y necrosis de la fascia y tejido graso, caracterizado por una toxicidad sistémica y la alta mortalidad (29). Por último, Síndrome del shock tóxico estreptocócico es una infección asociada a la rápida aparición de shock y fracaso multiorgánico, mediado por toxinas que actúan como superantígenos responsables de la activación masiva de las células del sistema inmune, produciendo destrucción tisular y toxicidad sistémica (29,30).

Tal como se ha mencionado previamente, *S. pyogenes* es responsable de diversas enfermedades. Cada año, se estima que más de 616 millones de personas en todo el mundo tienen un cuadro de faringitis estreptocócica (31). Por otro lado, se registran alrededor 500.000 casos de fiebre reumática, que resultan en aproximadamente 230.000 muertes anuales (32). En cuanto a la Fascitis necrotizante (FN),

se estima que hay entre 500 y 1000 casos al año a nivel mundial, con una prevalencia de 0,40 casos por 100.000 habitantes. Aunque la incidencia es baja, la mortalidad asociada a esta enfermedad es alta, variando según el tipo de FN. La tasa de mortalidad del FN1 “polimicrobiano” oscila entre el 14% y el 34%, mientras que FN tipo 2 “monomicrobiano”, la mortalidad es mayor, alcanzando entre el 22% y el 40%; los paciente con FN tipo 2 tienen un riesgo aún más elevado debido al desarrollo del síndrome Shock Tóxico estreptocócico, aumentando la tasa de mortalidad al 28%-70% (33,34). En Japón, el “*National Institute of Infectious Diseases*” reportó 474 casos de shock tóxico estreptocócico entre el 1 de enero y el 10 de marzo de 2024, en comparación con los 941 casos registrados en todo el año 2023, una cifra preocupante dado que la tasa de mortalidad de esta enfermedad supera el 30%. A nivel global, se estima que *S. pyogenes* es responsable de 181 millones de infecciones y 500,000 muertes anuales (35).

A estas cifras alarmantes, se suma el creciente problema de la resistencia bacteriana. Según el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), en un estudio de vigilancia realizado durante 10 años, entre 2014 y 2023, sobre la enfermedad invasora por *Streptococcus pyogenes*, se confirmaron 1352 cepas de las cuales 149 mostraron resistencia a eritromicina y/o clindamicina. Este análisis incluyó antibióticos del grupo MLSB de tipo B (macrólidos y lincosamidas) (36), herramientas del arsenal más sofisticado para el tratamiento de infecciones. En este mismo reporte, menciona que en el invierno de 2024 se observó un aumento considerable en los casos de infección por este patógeno. Esto se debió a su presencia en personas previamente infectadas con influenza, lo que provocó cuadros graves de infección e incluso la muerte en algunos casos.

La unión de *S. pyogenes* a células epiteliales o la dermis es el paso inicial más importante en la colonización del huésped, sin mecanismo de adherencia fuertes *S. pyogenes* no podría unirse a los tejidos del huésped, siendo eliminado por los mecanismos de fluidos mucosos, salivales y por exfoliación del epitelio. Por lo tanto, esta bacteria utiliza una variedad de componentes de superficie celular para la adhesión; la cápsula de ácido hialurónico, ciertas proteínas M, proteínas de unión a laminina y al colágeno, y el pili son parte de su conjunto de herramientas para asegurar una buena adhesión al epitelio (22).

La proteína M es un factor de virulencia ampliamente estudiado de esta bacteria, es una proteína que se encuentra en la pared celular de la bacteria que tiene un papel crucial en la infección hacia el

huésped; gracias a esta proteína *S. pyogenes* es conocido por ser antifagocítico en conjunto con la cápsula de ácido hialurónico (37,38), se ha demostrado que la ausencia de los genes que codifican a la proteína M “*emm*” permiten los fagocitos rápida del estreptococo (39,40). No obstante, es el pili de *S. pyogenes*, el cual explica en gran proporción la alta tasa de adhesión al epitelio; mutante nulas para el pili ya sea afectando la sortasa o proteínas del pili propiamente tal, han mostrado en ensayos *in vitro*, una muy baja tasa de infección (39,41).

1.4 Estructura de la Pili de *S. pyogenes*

El pili de *S. pyogenes* está formado por tres diferentes proteínas: Spy0125, Spy0128 y Spy130, moléculas que median la adhesión al tejido, estructura propia del pili, y anclaje del filamento a la pared de la bacteria. Mientras Spy0125 y Spy130, se presentan como una sola copia a lo largo del filamento, asegurando la comunicación bacteria-hospedero, Spy0128 se repite centenares o miles de veces en el pilus, encargándose de la disipación de energía mecánica (Figura 1.1).

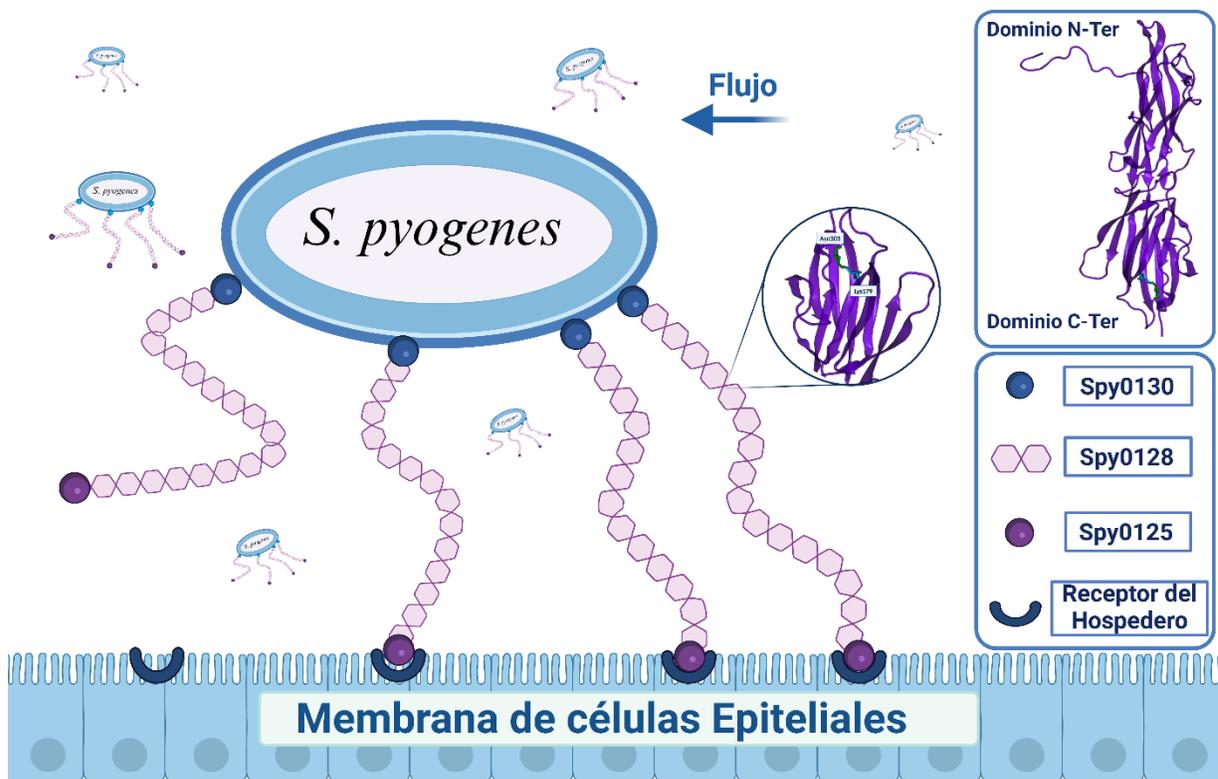


Figura 1.1 Representación de la estructura del pili de *S. pyogenes* en la unión a la célula epitelial. (Imagen preparada con Pymol y BioRender®).

La proteína Spy0128, considerado un antígeno T de Lancefield debido a su antigenicidad y su extrema resistencia a la digestión con tripsina (42,43), es una molécula que presenta dos dominios de

plegamiento tipo inmunoglobulina (Ig) arreglados en tándem (44,45). Cada dominio tipo Ig en Spy0128 contiene un enlace isopeptídico, que desempeña un papel crucial en la estabilidad mecánica de la proteína. Estos enlaces, específicamente Ly36—Asn168 y Lys179—Asn303, desvían la fuerza de desplegamiento lejos del dominio plegado, impidiendo su extensión y asegurando que la proteína permanezca inextensible ante cualquier tipo de fuerza aplicada.

A pesar de lo anterior, durante la constitución del pilus, las subunidades Spy0128 polimerizan por medio del C-terminal de una subunidad y la Lys161 de la siguiente, modo de que sólo el dominio C-terminal, que posee el enlace entre Lys179—Asn303, se encuentra bajo estrés mecánico (17,44). Estudios previos han confirmado que la subunidades de Spy0128 polimerizan mediante una reacción catalizada por la sortasa, uniendo el grupo carboxilo C-terminal de un monómero al N ζ de Lys161 del siguiente monómero. En resumen, bajo situaciones fisiológicas la fuerza se transmite a través de los residuos 161-179 y, posteriormente, a través del enlace isopeptídico C-terminal al residuo 303 (44,46).

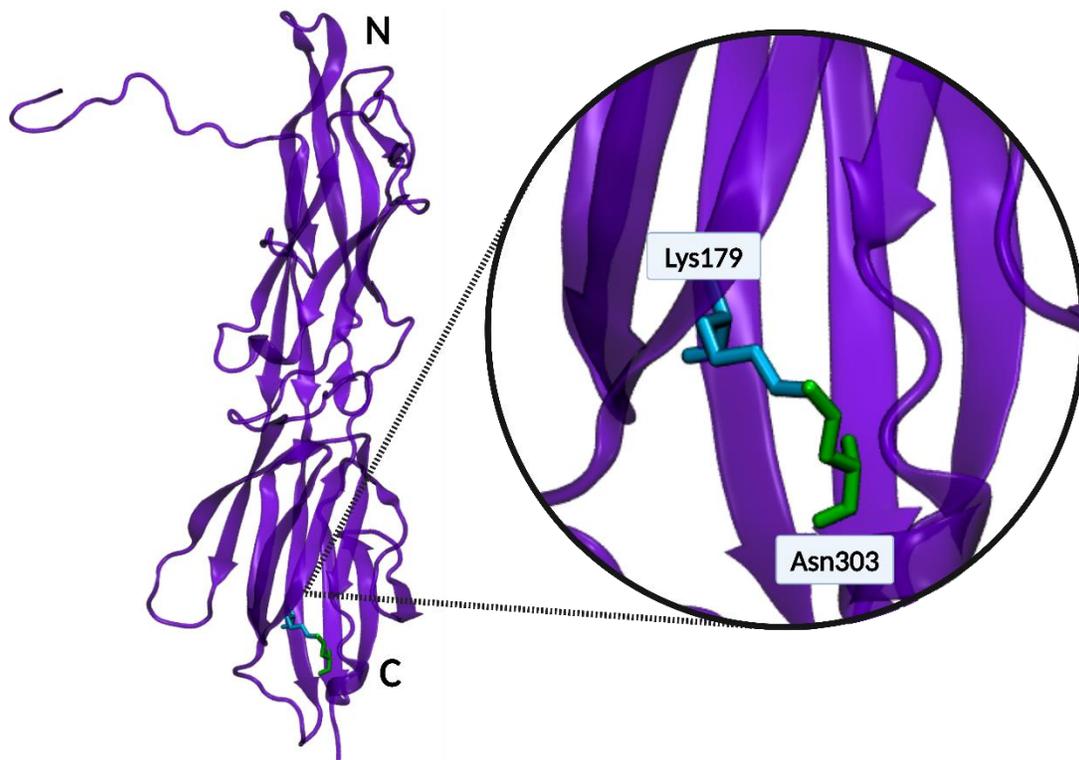


Figura 1.2 Estructura cristalina de la pilina mayor de *Streptococcus pyogenes*. Estructura cristalina de Spy0128 “3B2M” enfocando el enlace isopeptídico ubicado en el dominio C entre Asn303 y Lys179 (Imagen preparada con Pymol y BioRender®).

Las subunidades de la pilina (Spy0128) están constantemente expuestas a un entorno de estrés mecánico, con fuerzas mecánicas muy grandes. En estudios previos a través de espectroscopia de fuerza de una sola molécula, demostraron que la proteína Spy0128 es inextensible a fuerzas de hasta 800 pN (46), gracias a sus enlaces intramoleculares “isopeptídicos”. Otros estudios, revelaron que a través de análisis computacionales de distribución de fuerza internas de Spy0128 el enlace covalente proporciona una estabilidad mecánica concentrando las tensiones en él, proporcionando una estabilidad aumentada en situación de estrés mecánico.

Como se mencionó anteriormente, el enlace isopeptídico intramolecular presente en la proteína del pili de *S. pyogenes* permite la unión covalente de dos hebras beta, lo que le confiere una alta estabilidad mecánica. Estudios previos han demostrado que la inhibición de la formación de esta proteína en *S. pyogenes* reduce la adhesión bacteriana y disminuye su virulencia (17,46,47). Estos hallazgos han generado interés en desarrollar nuevas estrategias para interferir en la formación del enlace isopeptídico intramolecular. Por lo tanto, en este trabajo nos centraremos en la generación de péptidos que bloqueen la formación de este enlace en las proteínas nacientes del pili. Un péptido que interfiera en la formación del enlace isopeptídico podría impedir que la pilina cumpla su función como molécula inextensible (45,48), al interrumpir el enlace covalente responsable de la estabilidad mecánica de la proteína, lo que resultaría en un pili defectuoso.

Gracias a la capacidad de adhesión de esta bacteria, en los últimos años se han intensificado los esfuerzos para desarrollar nuevos tratamientos contra infecciones bacterianas. A diferencia de los antibióticos tradicionales, cuya efectividad disminuye debido a la aparición de bacterias multirresistentes, el enfoque en sistemas que interfieren con la función de los pili podría ofrecer una alternativa eficaz en el manejo de enfermedades infecciosas. Además, la complejidad que implica para una bacteria modificar sus mecanismos de adhesión, incluyendo mutaciones en los pili u otras estructuras, sugiere que este tipo de estrategias podría retrasar la aparición de resistencia a corto plazo, en contraste con lo que sucede actualmente con el uso de antibióticos.

Sabemos que *S. pyogenes* es una bacteria que causa una gran variedad de enfermedades. En los últimos años, han aparecido cepas cada vez más resistentes a diferentes antibióticos, lo que dificulta su tratamiento. Por ello, en este trabajo de tesis se propone el diseño de un péptido anti adhesivo que interfiera en la formación del enlace isopeptídico en la proteína naciente del pili. Este péptido se diseñó

utilizando un pipeline de código libre desarrollado en el laboratorio, llamado "Random Peptide Generator" (RPG). Esta herramienta permite crear péptidos de manera aleatoria y evaluarlos mediante acoplamiento molecular, obteniendo como resultado un péptido bloqueador del enlace isopeptídico, denominado péptido C96. Tras la generación del péptido y la selección de los péptidos controles, se llevaron a cabo pruebas *in vitro* para evaluar la interacción entre el péptido bloqueador y la proteína Spy0128, utilizando un espectrómetro de fuerza basado en pinzas magnéticas.

Con el objetivo de abordar esta problemática, se ha planteado la siguiente pregunta de investigación: ¿podría ser una potencial alternativa al uso de antibióticos interferir la adhesión bacteriana y así poder enfrentar infecciones provocadas por patógenos? De manera de acotar el problema a un sistema biológico molecular hemos planteado la siguiente pregunta de investigación: ¿Podemos mejorar los péptidos bloqueadores que fueron originalmente inspirados en la estructura de Spy0128?

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

- Es posible diseñar, mediante herramientas computacionales, péptidos que interfieren con mayor efectividad la formación del enlace isopeptídico entre Lys179—Asn303 en la proteína Spy0128 del pili de *Streptococcus pyogenes*.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de péptidos bloqueadores del enlace isopeptídico de la proteína Spy0128 del pili de *Streptococcus pyogenes*, diseñados mediante herramientas computacionales.

2.2.2 Objetivos Específicos

- 1) Desarrollar y expresar un péptido bloqueador del enlace isopeptídico de la proteína Spy0128 de *S. pyogenes*.
- 2) Evaluar la intervención de los péptidos bloqueadores del enlace isopeptídico de la proteína Spy0128.
- 3) Determinar los cambios de la extensión de la proteína Spy0128 con la presencia y ausencia de los péptidos bloqueadores.

3. Materiales y Métodos

3.1 Materiales

En el trabajo de tesis se utilizaron los siguientes reactivos: 30% acrilamida a bisacrilamida (protoGel®), 40% v/v acrilamida (Bio-Rad®), ácido acético glacial (Merck®), ácido clorhídrico (HCl) (Merck®), ácido clorhídrico (HCl) (Merck®), ácido etilendiaminotetraacético(EDTA) (Sigma-Aldrich®), Ácido4-(2-hidroxiethyl)piperacina-1-etanosulfónico,ÁcidoN-(2-hidroxiethyl)piperacina-N'-(2-etanosulfónico)(HEPES) (Merck®), agua libre de nucleasas (H2O L.N.) (Corning®), amortiguador fosfato salino (PBS) (Merck®), ampicilina (AMP), Tetraciclina (TET), Kanamicina (KAN) y Cloranfenicol (CLO) (US Biological®), APTES (Sigma-Aldrich®), arabinosa (Sigma-Aldrich®), azul de Coomasie (Bio-Rad), cloruro de calcio (CaCl2) (Sigma-Aldrich®), cloruro de sodio (NaCl) (Merck®), Leupeptina (Sigma-Aldrich®), ditiotreitól (DTT) (Sigma-Aldrich®), dodecilsulfato sódico (SDS) (Merck®), Dynabeads M-270 Streptavidin (ThermoFisher®), Seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich®), estándar de proteínas preteñidas PageRuler™ Plus de 10 a 250 kDa (ThermoFisher®), etanol (TCL), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (ThermoFisher®), fosfato de sodio (Na2HPO4) (Merck®), glicerol (Merck®), glicina (Sigma-Aldrich®), Glutaraldehido (G7776-10 mL) (Sigma-Aldrich®), HaloTag® 04 amino ligando (5 mg/mL en DMF/DMSO) (Promega®), HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand (ligando fluorescente del HaloTag®) (Promega®), Hellmanex (1%) (Hellma®), imidazol (Sigma-Aldrich®), InVision™ His-Tag In-gel Stain (ThermoFisher®), isopropil- β-D- 1-tiogalactopiranosido (IPTG) (US Biological®), metanol de grado técnico (Merck®), SuperSlip® Cover Glass, 24 x 40 mm y Micro Cover Glass (22_x_22 mm, N° 1) (Ted Pella, INC.), microesferas amino-poliestireno (2.5-2.9 mm) (Spherotech), N', N', N', N'- tetrametilendiamina (TEMED) (Bio-Rad®), Níquel (II) sulfato hexahidratado (Merck®), persulfato de amonio I (PSA) (Sigma-Aldrich®), SNAP-Surface® 488 (ligando fluorescente del SNAP-tag), Superslip® Cover Glass (24x40 mm N° 1) (Ted Pella, INC.), Tiamina (Merck®), 3-aminopropil(trimetoxisilano) (Silano) (Sigma-Aldrich®).

3.1.2 Vectores

La base de biología molecular de la tesis es el empleo de dos vectores circulares, los cuales son: pFN18a HaloTag® Spy0128 (Promega), por otro lado, el vector pBAD, el cual tendrá por separado los tres diferentes péptidos a utilizar (D3, N14, C96).

3.1.4 Medios de Cultivo

Para la obtención de ADN, expresión de la proteína Spy0128 y la expresión de los péptidos de interés, se utilizaron diferentes medios de cultivos para el efectivo crecimiento de las bacterias *E. coli* (XL10 GOLD y BL21(D3) pLysS). Con ese fin, se empleó el medio líquido Luria-Bertani (LB) (Tryptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L) y medio agar Luria-Bertani (Tryptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/l, cloruro de sodio 5 g/L y agar 15 g/L) provenientes de la empresa Bio-Rad® (CA, EE. UU). Por otro lado, para la expresión de los diferentes péptidos, se utilizó medio mínimo (Medio sales mínimas M9, suplementado con 0.2% de casaminoácidos (C2080, US Biological), 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂ y 1,5% Glicerol). Cada medio ya mencionado, se suplemento con los diferentes antibióticos específicos por cepa bacteriana y resistencia otorgada por los vectores utilizados, para ello se utilizó una concentración de 1x por cada antibiótico. Los antibióticos utilizados son: Ampicilina “AMP” (10 mg/mL), Cloranfenicol “CLO” (2,5 mg/mL), Kanamicina “KAN” (5 mg/mL) y Tetraciclina “TET” (3 mg/mL). Además, los medios fueron suplementados con 0,5 mM de IPTG y 0,2% p/v de Arabinosa para la inducir la expresión de la proteína recombinante y péptidos.

3.1.3 Cepas Bacterianas

Para la expresión de proteínas recombinantes y su clonamiento efectivo, se utilizó la bacteria *Escherichia coli*, específicamente las cepas XL10 Gold y BL21(D3) pLysS de la empresa Novagen.

3.1.6 Sistema de purificación

Con el fin de la obtención de la proteína de interés se utilizaron columnas de purificación con fritas constituidas con Sefarosa (IMAC Sepharose 6 Fast Flow) y cargadas con Níquel. Para la concentración de las fracciones purificadas se utilizaron unidades de filtrado Amicon 50-100 KDA (Merck Millipore).

3.1.5 Amortiguadores

Las actividades de purificación y visualización de proteínas se debieron realizar diferentes soluciones amortiguadoras. Específicamente para la purificación de proteínas, se utilizó amortiguador de equilibrio (20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl) y el amortiguador de Lavado con diferentes concentraciones de Imidazol (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM de NaCl, Imidazol (10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 400 mM)), por otro lado, para la separación electroforesis de proteínas se utilizó amortiguador de corrida 1x de una solución madre de 10X (Tris 0,2 M, Glicina 1,9 M, SDS 10%, Agua MiliQ), amortiguador de carga para proteínas (Load-Buffer 5x SDS, b-mercaptoetanol, azul de

coomassie y glicerol). Para visualizar estructuras específicas de la proteína de interés (secuencia His-Tag) se utilizaron los siguientes amortiguadores: Solución de fijación por Tris/Glicina geles (Etanol, Ácido acético y agua ultrapura), por otro lado, amortiguador fosfato 20 mM pH 7.8 (Fosfato de sodio monobásico, NaOH 3 M para ajustar el pH a 7.8 y agua ultrapura). Para realizar las cámaras de fluido se necesitó diferentes amortiguadores, entre ellos se encuentran: PBS (10 mM buffer Fosfato pH 7.4, 137 mM NaCl y 27 mM KCl), amortiguador Tris (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ y 1% BSA tiol bloqueado) y, por último, amortiguador HEPES (20 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl, 1% BSA tiol bloqueado y 1 mM EDTA).

3.1.7 Biotinilación

Para la reacción de biotinilación en la proteína de interés en la presencia o ausencia del péptido, se empleó la proteína ligasa de biotina BirA. La reacción de biotinilación se llevó a cabo usando 1 mg/ml (BirA 500) o 3 mg/ml (Bulk BirA)], en amortiguador bicina 50 mM pH 8.3 (BiomixA 10X), suplementado con el Biomix B (10 mM ATP, 10 mM MgO Ac, 50 μM d-biotina) y BIO 200 (50 μM de biotina). El kit de biotinilación, incluyendo las enzimas fue adquirido desde la empresa AVIDITY.

3.1.8 Cámaras de Fluido

Para la preparación de las cámaras de fluido se utilizaron diferentes materiales, incluyendo solventes, agentes químicos y microesferas de referencias. Para el lavado se de los vidrios cubre objetos se utilizó el detergente Hellmanex III 1%, agua MiliQ, acetona (99.5%), y etanol (100%) (Merck®). Por otro lado, para la preparación química de las cámaras se utilizó silano 1%, glutaraldehído 1%, microesferas de referencia (diluidas 200x durante la preparación de la cámara), Halo ligando (diluidas 500x durante la preparación de la cámara), PBS, amortiguador TRIS/BSA 1% y amortiguador HEPES/BSA 1%.

3.2 Desarrollo del péptido bloqueador del enlace isopeptídico de Spy0128.

3.2.1 Obtención del bolsillo de la proteína Spy0128

Para el diseño del péptido, en primer lugar, fue necesario utilizar una modelo de la proteína Spy0128. Para esto se buscó en la base de datos “Protein Data Bank” (PDB), obteniendo un modelo cristalográfico de la adhesina Spy0128 de *Sreptococcus pyogenes* serotype M1. El modelo (PDB Id 3B2M) se visualizó en “Pymol”, programa de visualización molecular, eliminando las múltiples cadenas de proteínas, aguas y otros átomos presentes en el cristal. Se utilizó la función mutagénesis del programa permitir la

interrupción de la comunicación entre cadenas laterales de los residuos participantes del enlace isopeptídico (Lys179--Asn303). En este caso, se modificó desde el aminoácido Asn303 para interrumpir el enlace isopeptídico; se removió el aminoácido manteniendo la cadena lateral intacta para la Lys179. Más tarde, y por medio de la función “sculpting”, se movió la última hebra generando un bolsillo para la unión del péptido. La posición 303, se volvió a mutar hasta Asn, de modo de restituir la secuencia aminoacídica.

3.2.2 Desarrollo del péptido a través del pipeline RPG

El desarrollo del péptido, diseñado para interferir en el enlace isopeptídico de Spy0128 de *S. pyogenes*, se preparó a través del pipeline RPG, programa de código libre elaborado en el laboratorio para gestionar la preparación de péptidos de manera al azar y evaluarlos mediante acoplamiento molecular. RPG, que recibe su nombre por “Random Peptide Generator”, es una herramienta rápida y sencilla que funciona gestionando por varios programas: OpenBabel, UCSF chimera y Autodock Vina. RPG puede ser entendido como un pipeline de trabajo, que cumple con una serie de etapas: i) preparación de la librería; ii) conversión de péptidos en estructura 3D; y iii) evaluación del complejo péptido-proteína mediante acoplamiento molecular.

Cómo primera etapa para la construcción de la librería, el programa consulta sobre el largo y los aminoácidos que se serán iterados en cada posición. A continuación, RPG da paso a la construcción de la librería que tiene como salida un archivo List.txt cada uno de los péptidos anotados con los aminoácidos que lo componen. En la segunda etapa de RPG, se toma un número determinado péptidos escritos desde el archivo “List.txt” y los convierte a estructuras tridimensionales utilizando UCSF chimera. Luego de obtener los péptidos procesados por Chimera, se continuó con la tercera etapa del pipeline, donde se probó el acoplamiento molecular de cada uno de los péptidos con la proteína de interés. La proteína debe tener el bolsillo previamente creado para simular la unión de péptido-proteína, aquí se creó un archivo de configuración para determinar la flexibilidad que tendrán los péptidos para unirse al bolsillo de la proteína. El proceso mencionado anteriormente, se ejecutó con Autodock Vina, cada uno de los acoplamientos entregó un valor de afinidad que después es utilizado como medida de comparación, para escoger el mejor péptido. Ya finalizada la tercera etapa del programa, se obtuvieron los archivos que contienen una lista de los péptidos generados con sus afinidades obtenidas con cada uno de los acoplamientos realizados, seleccionamos en el programa el

valor de afinidad que deseamos observar. RPG facilita un archivo Excel para ver los péptidos obtenidos con sus respectivos aminoácidos y la afinidad.

Cómo controles para el desarrollo del péptido de interés, se utilizó RPG para obtener la afinidad del péptido N14 mencionado anteriormente, el cual es un péptido formado a partir de la cadena misma de la proteína. Este péptido ya fue estudiado previamente en la intervención del enlace isopeptídico de Spy0128, siendo este un control positivo para el desarrollo del trabajo. Por otro lado, se encuentra el péptido D3, el cual fue creado por un integrante del laboratorio a través de diferentes herramientas como *Pymol* y *Quimera*; este péptido se creó para la intervención del enlace isopeptídico del dominio 3 de SpaD de la bacteria *Corynebacterium diphtheriae*, por lo tanto, el péptido D3 será escogido como el control negativo.

Tabla 3.1 Péptidos controles para el desarrollo del nuevo péptido bloqueador del enlace isopeptídico.

Péptidos	Aminoácidos
N14 (original)	EFTDKDMTITFTNKKDAE
D3	EIKNIKQ

Para el diseño del péptido bloqueador del enlace isopeptídico Lys179—Asn303, se escogió un largo de 10 aminoácidos fijando la posición N° 4 con una Asn de modo que este en proximidad para la formación del enlace con la Lys179; así formar un péptido que compita con la formación del enlace isopeptídico en la proteína entre la Lys179—Asn303. Luego de escoger el largo y la posición fija de la Asn del péptido de interés, se realizaron iteraciones entre las posiciones restantes del péptido bloqueador, hasta obtener un péptido con la mejor afinidad.

3.3 Representaciones de vectores de expresión

3.3.1 Vector pFN18a HaloTag®_His-Tag_ Avitag™

Dado que la finalidad del trabajo era evidenciar tanto la intervención del enlace isopeptídico como el cambio en elasticidad de la proteína Spy0128, la proteína fue clonada en un vector de expresión que incluye reporteros de expresión como mecánicos. Estos reporteros permiten seguir la expresión de manera específica en geles, como el desplegamiento en los ensayos mecánicos. Específicamente se empleó el vector pFN18a HaloTag®_His-Tag_ Avitag™, el cual se caracteriza por presentar genes de

resistencia al antibiótico ampicilina, promotor y terminador T7, y la secuencia del operador Lac. El vector además cuenta con una serie de etiquetas que permiten inmovilización y seguimiento de la proteína, —HaloTag®—, purificación de la molécula—His-Tag—, y finalmente anclaje a estreptavidina— Avitag™—. Además, el constructo, contiene entre el HaloTag® y His-Tag un sitio de clonamiento para ubicar la proteína de interés. La poliproteína Spy0128, además del marco de lectura para la pilina de *S. pyogenes* se encuentran los dominios reporteros I27, originalmente tomados de la proteína titina, molécula modelo en el campo de la elasticidad de proteínas (**Figura 3.1**). Estos dominios rodean dos marcos de lectura de Spy0128 dando origen a la proteína química Spy0128.

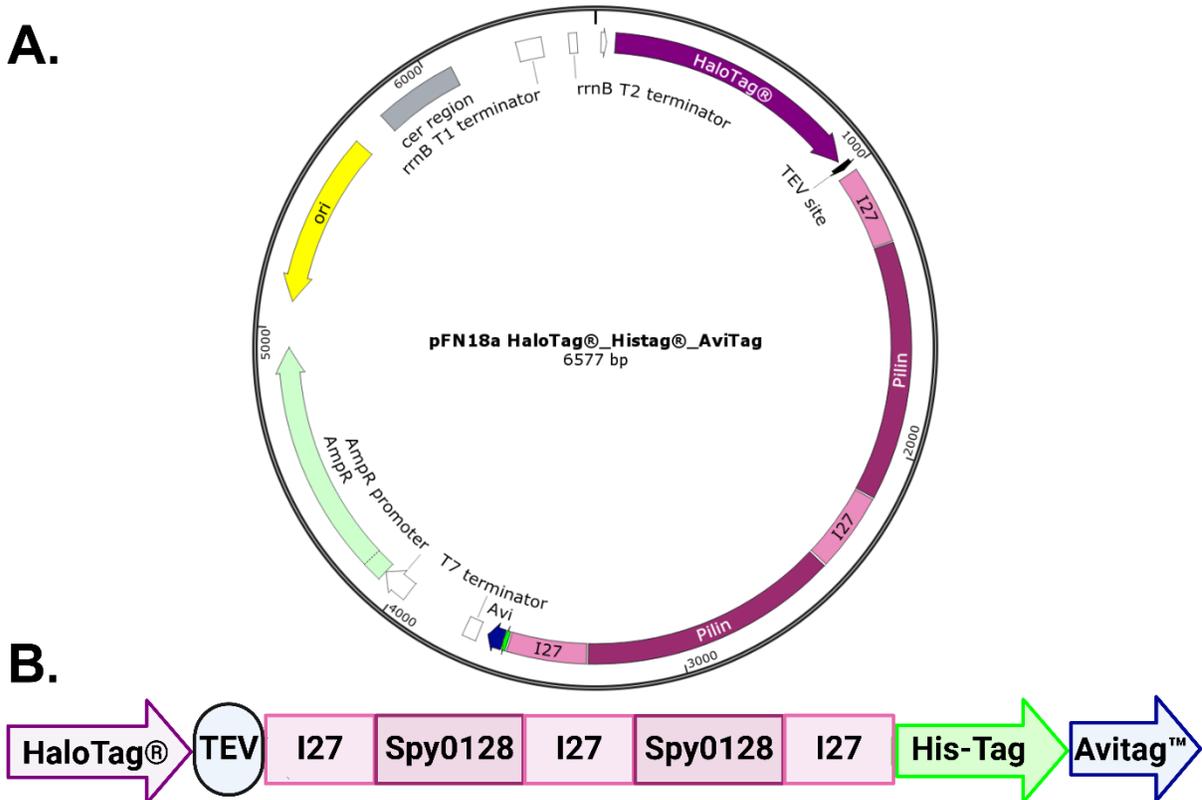


Figura 3.1 Vector pFN18a HaloTag®_His-Tag_ Avitag™, más la proteína Spy0128. **A.** El vector pFN18a contiene genes de resistencia a ampicilina, posee el origen de replicación, el promotor T7 y por consiguiente el constructo de la proteína Spy0128. **B.** El diseño de la proteína se basa en primer lugar una proteína de etiqueta HaloTag®, luego un sitio de corte TEV, los dominios control para la fuerza mecánica I27 y la proteína Spy0128, luego la proteína de etiqueta de polihistidinas “His-Tag” importante para la purificación y, por último, Avitag™ proteína responsable para lograr la biotinylation del constructo (Imagen preparada con SnapGene y BioRender®).

3.3.3 Vector de expresión pBAD

pBAD se caracteriza por presentar genes de resistencia al antibiótico kanamicina siendo un marcador de selección, antes de presentar como se conforma el vector, debemos mencionar que los diferentes

péptidos bloqueadores se encuentran insertos por separados en el vector. El vector pBAD se conforman por: el promotor araBAD que es parte del operón de arabinosa, luego con el sitio de unión al ribosoma “RBS”, continuando viene la secuencia codificante a los péptidos, Sitio de corte del Virus del grabado del Tabaco “TEV”, el cual es reconocido por una proteasa TEV, por último, la secuencia codificante para la proteína de etiqueta SNAP-tag®, proteína importante para la verificación de la expresión de los péptidos.

3.4 Transformación de los vectores de expresión en *Escherichia coli*

3.4.1 Transformación en células de clonamiento XL10 GOLD con vectores de expresión.

Para obtener un stock de ADN con el fin de trabajar con él, se realizaron transformaciones en células quimio-competentes de clonamiento específicamente *E. coli* XL10 GOLD con los vectores ya mostrados anteriormente (**Figura 3.1, Figura 4.1**). Para ello se utilizó 2-5 µL de ADN en 100 µL de células quimio-competentes dando golpes suaves al tubo para mezclar el ADN con las células bacterianas (**Figura 3.2 I**), continuando con la incubación en hielo durante 30 minutos (**Figura 3.2 II**); transcurrido los 30 minutos se realizó el shock térmico a 42 °C durante 2 minutos (**Figura 3.2 III**). Luego, se sacaron los tubos y se colocaron en hielo durante 5 minutos y se agregó 250 µL de medio LB líquido estéril (**Figura 3.2 IV**), se dejó el tubo en agitación en un incubador a 37 °C y a 180 rpm durante 1 hora. Se Inoculó las células transformadas en una placa Petri con LB agar estéril agregando en el agar los antibióticos correspondientes para la cepa y los plásmidos (**Figura 3.2 V**), se colocó la placa Petri en una estufa a 37 °C durante toda la noche, se obtuvieron y se escogieron colonias que no presentaran colonias satélites. Para obtener stock de ADN se crecieron las colonias y se ocupó el kit de extracción de ADN de Favorgen “FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit”.

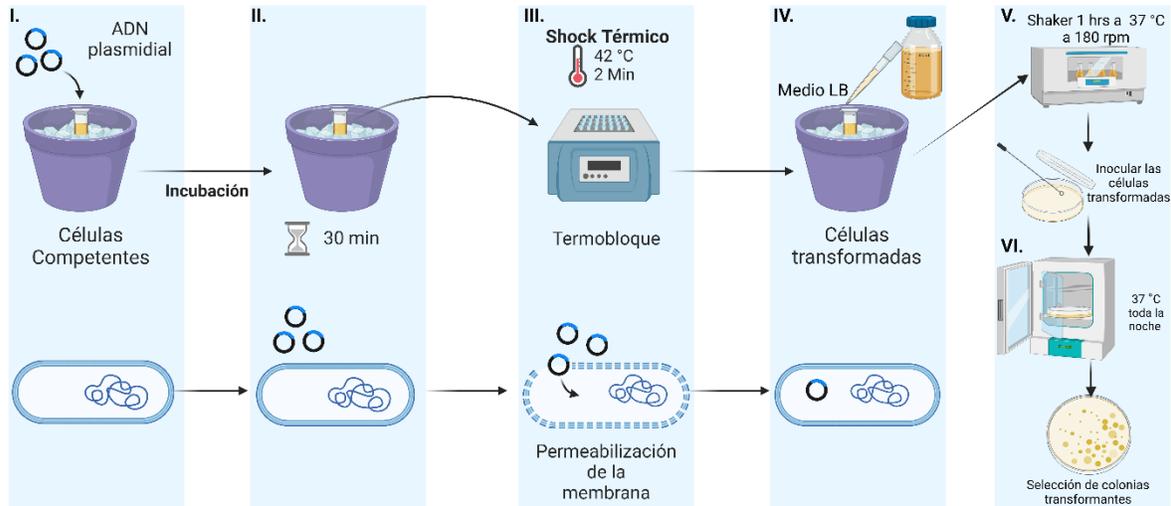


Figura 3.2 Diagrama de la metodología de transformación bacteriana. I. El ADN se debe ingresar al tubo que contiene las células quimio-competentes. II. Incubación durante 30 minutos en hielo. III. Golpe térmico a 42 °C durante 2 minutos en un termobloque. IV. Recuperación de las células bacterianas agregando 250 µL de medio LB líquido estéril. V. Incubación de las bacterias a 37 °C a 180 rpm durante una hora; inoculación de las células transformadas en placas Petri con medio LB agar estéril con los antibióticos correspondientes. VI. Incubación de placa en una estufa de 37 °C toda la noche para obtener colonias (Imagen preparada con BioRender®).

3.4.2 Transformación en células de expresión BL21(DE3) pLysS con los vectores de expresión

Para expresar la proteína Spy0128, se realizó en primer lugar la transformación del vector pFN18a HaloTag®_Histag®_Avitag™ con las células quimio-competentes de expresión específicamente *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Para esto, se siguió el mismo protocolo de transformación mencionado anteriormente (Figura 3.2) escogiendo una colonia que no presentara colonias satélites y se creció en LB líquido estéril con los antibióticos correspondientes a la cepa y al vector utilizado.

Para expresar la proteína Spy0128 y los péptidos, se debió realizar células quimio-competentes de la colonia transformada con el vector pFN18a HaloTag®_His-Tag_Avitag™. Para esto, se creció en un Falcon de 50 mL, 20 mL de medio LB líquido (antibióticos: AMP, CLO) la colonia ya transformada en un agitador orbital 180 rpm programado a 37 °C hasta llegar a una OD₆₀₀, para luego colocar el tubo en hielo durante 10 minutos para centrifugarlo a 9000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el pellet en 12,5 mL de CaCl₂ 0,1M (debe estar frío y estéril), se centrifugó nuevamente el tubo a 9000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el pellet en 3,5 mL de CaCl₂ 0,1M y 1 mL de glicerol al 50%, para luego colocar 100 µL de las células quimio-competentes en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL autoclavados para ser guardados en el refrigerador de -80 °C.

Para lograr la expresión de los péptidos y la proteína Spy0128, se transformó el vector pBAD en las células quimio-competentes *E. coli* BL21(DE3) pLysS (pFN18a HaloTag®_His-Tag_Avitag™) con el mismo protocolo comentado anteriormente (**Figura 3.2**, en este caso las bacterias transformadas poseen 3 diferentes resistencias a antibióticos, las cuales son: AMP, KAN, CLO). Luego se escogió una colonia que no presentara colinas satélites y se creció en LB líquido estéril con los antibióticos correspondientes a la cepa y a los vectores utilizados.

3.5 Expresión de la proteína de Spy0128 en presencia y ausencia de los péptidos bloqueadores.

3.5.1 Expresión de la proteína Spy0128 en cepas *E. coli* BL21(DE3) pLysS.

Las células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformadas con el vector pFN18a se crecieron durante toda la noche, para luego realizar la transferencia del inóculo a medios de 300 mL de LB previamente estéril. Esto se realizó en un incubador orbital a 180 rpm equilibrado a 37 °C hasta llegar a OD₆₀₀; tras alcanzar la densidad óptica deseada se indució durante 18h hrs en un incubador orbital a 180 rpm programado a 20° C. Pasado las horas de inducción, las bacterias se centrifugaron a máxima velocidad a 4 °C durante 15 minutos, descartando el sobrenadante y rescatando el pellet obtenido, para luego agregar PBS (1x), PMSF 0,1 mM y leupeptina 1 µM; se rompieron las células con el pulso ultrasónico “Pulse 150 Ultrasonic Homogenizer” de la marca Benchmark, se realizaron 75 ciclos, 8 segundos de pulso y 16 segundos de descanso a una amplitud de 60%. Se centrifugaron a máxima velocidad y a una temperatura de 4 °C se guardó el sobrenadante y se descartó el pellet obtenido (**Figura 3.3**).

En paralelo, se realizó el control negativo a partir del inóculo mencionado anteriormente, en este caso no se indujeron con IPTG y se continuó con el protocolo de la inducción: luego de llegar a OD₆₀₀, se dejaron creciendo durante 18hrs en un incubador orbital programado a 20° C, se centrifugó a máxima velocidad a 4 °C durante 15 minutos, luego agregar PBS (1x), PMSF 0,1 mM y leupeptina 1 µM se rompieron las células con el pulso ultrasónico, realizando el mismo protocolo mencionado anteriormente. Se centrifugaron a máxima velocidad y a una temperatura de 4° C se guardó el sobrenadante y se descartó el pellet obtenido.

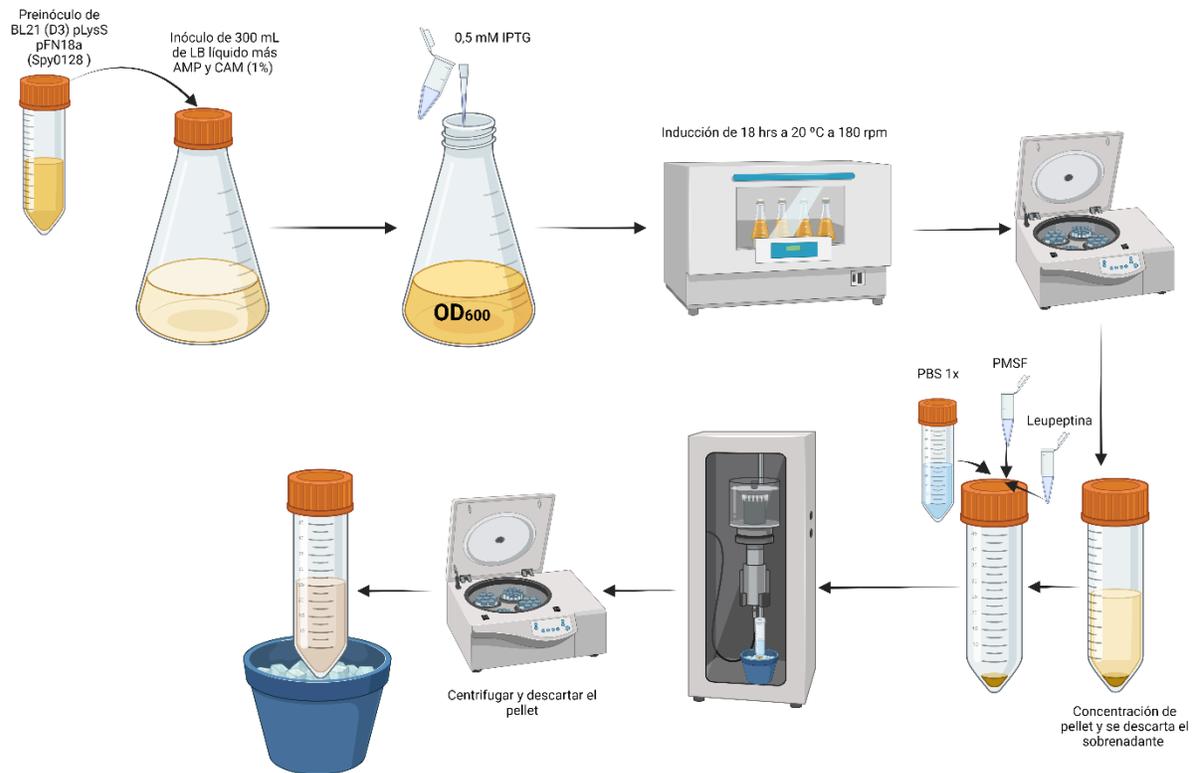


Figura 3.3 Diagrama de flujo de la expresión de Spy0128. Metodología utilizada para expresar Spy0128 en conjunto con la proteína de etiqueta HaloTag® (Imagen preparada con BioRender®).

3.5.2 Expresión de los péptidos (C96, N14 y D3) en cepas de BL21(DE3) pLysS (pFN18a) quimio-competentes.

Se escogió una colonia resultante de la transformación del vector pBAD (C96), pBAD (N14) y pBAD (D3) en cepas BL21(DE3) pLysS (pFN18a HaloTag®_His-Tag_Avitag™) quimio-competentes, para luego crecer la colonia con medio LB estéril más antibióticos (AMP, KAN y CLO) toda la noche. Se centrifugó las células a 2000-3000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente (25 °C) y se descartó el sobrenadante (medio LB) para luego colocar medio M9 estéril (10,5 g en 1 L) más casaminoácidos (0,2%) y acompañado por suplementos: Glicerol (1,5%), Tiamina (40 mg/mL), MgSO₄ (2 mM) y CaCl (0,1 mM) y los siguientes antibióticos: AMP, KAN y CAM; se dejaron creciendo las células a 37 °C a 180 rpm hasta llegar OD₆₀₀.

Las células se indujeron con L-arabinosa (0,2%) durante 3hrs en un incubador orbital a 180 rpm programado a 37 °C, terminando la inducción de los péptidos se centrifugó el medio a 2000-3000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente (25 °C) para eliminar completamente el medio M9 de las

células. Luego para inducir la proteína, se agregó medio LB estéril con los antibióticos ya mencionados anteriormente, agregando IPTG (0,5 mM) y se dejó 18hrs en un incubador orbital 180 rpm programado 37 °C. Finalizada la inducción de la proteína, se centrifugaron las células a máxima velocidad durante 15 minutos a 4 °C, el pellet obtenido se resuspendió en PBS (1x), PMSF (0,1 mM) y leupeptina (1 μM) para romper las células con el pulso ultrasónico, se realizaron 75 ciclos, 8 segundos de pulso y 16 segundos de descanso a una amplitud de 60%. El producto obtenido se centrifugó a máxima velocidad durante 30 minutos a 4 °C y se guardó el sobrenadante (extracto crudo de proteínas) y se descartó el pellet (**Figura 3.4**). En paralelo, se realizó el control negativo a partir del inoculo usado anteriormente, en este caso, no se indujeron con IPTG ni con L-arabinosa, continuando con el protocolo mencionado anteriormente exceptuando los inductores de la proteína y péptidos.

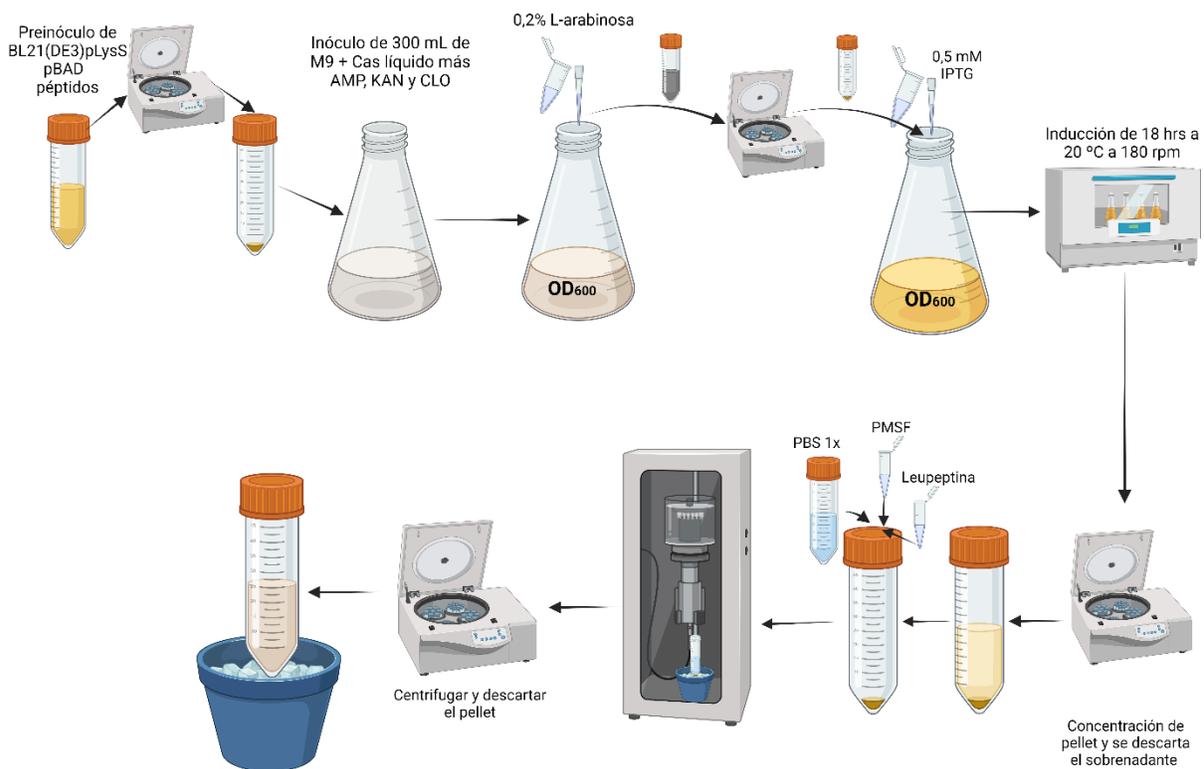


Figura 3.4 Diagrama de flujo de la expresión de Spy0128 y expresión de los péptidos. Metodología utilizada para expresar Spy0128 en conjunto con la proteína de etiqueta HaloTag® y la expresión de los péptidos (C96, N14, D3) en conjunto con la proteína de etiqueta Snap-tag® (Imagen preparada con BioRender®).

3.6 Purificación y verificación de la expresión de Spy0128 en presencia y ausencia de los péptidos bloqueadores.

3.6.1 Purificación de la proteína Spy0128 en presencia y ausencia de los péptidos bloqueadores.

La purificación de Spy0128 en presencia y ausencia de los péptidos bloqueadores se realizó a partir de columnas de purificación cargadas con Níquel. En primer lugar, se debió equilibrar la columna con amortiguador de equilibrio (5 volúmenes del volumen de la resina) todo el procedimiento a partir de este paso es en hielo, se dejó recirculando el extracto crudo durante 1-2 hrs por la resina, luego se lavó la columna de purificación con amortiguador de lavado con 10 mM (10 volúmenes), a continuación, se ocupó amortiguador de elución con diferentes concentraciones de imidazol (20 mM, 50 mM, 100 mM y 400 mM) iniciando con 5 volúmenes del amortiguador de elución de 20 mM y terminando con la concentración de 400 mM, se recolectó la elución de la columna de purificación (**Figura 3.5**).

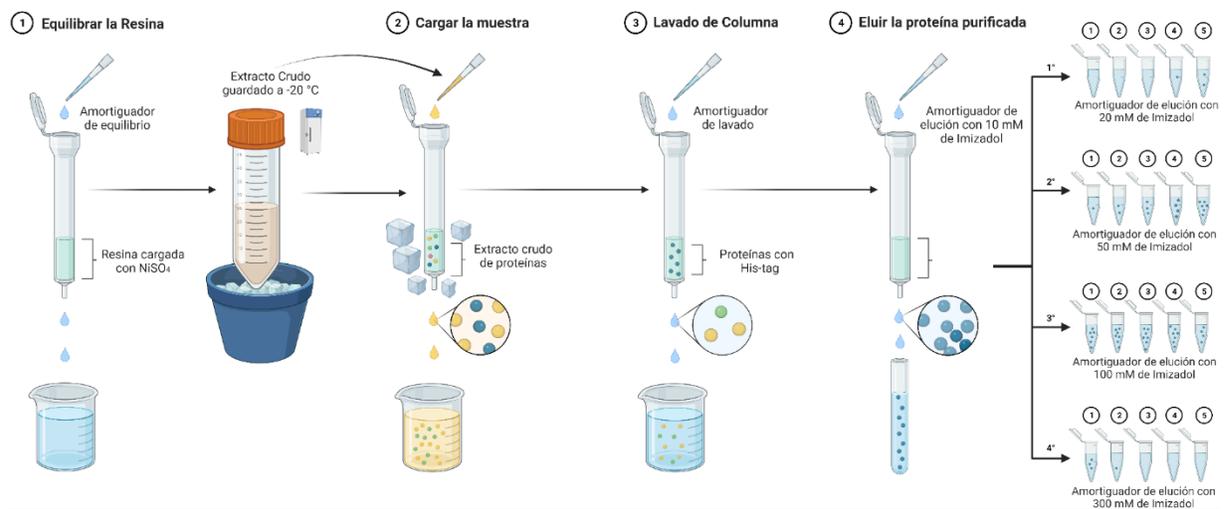


Figura 3.5 Diagrama de flujo de la purificación de la proteína Spy0128 en ausencia y presencia de los péptidos. Metodología utilizada para purificar la proteína Spy0128 en presencia y ausencia de los péptidos bloqueadores gracias a la proteína His-Tag (Imagen preparada con BioRender®).

3.6.2 Verificación de la expresión de Spy0128 y la expresión de los péptidos a través de geles de poliacrilamida SDS.

Para confirmar la expresión de la proteína Spy0128 sin la expresión de los péptidos bloqueadores, se utilizaron las muestras con mayor concentración de proteína obtenidas en la purificación. Las muestras con altas concentraciones de proteínas se concentraron en unidades de filtrado Amicon® 50 kDa (Merck Millipore, UFC203024) a 3000 xg a 4 °C hasta llegar a un volumen final de 70-80 µL aproximadamente,

recuperando lo concentrado en un tubo de microcentrifuga de 0,6 mL. A partir de la proteína concentrada, se tomó 19 µL de la muestra a un nuevo tubo de 1.5 mL, se agregó 1 µL de “HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand” (1X) y se dejó incubando durante 20 minutos a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se agregó 5 µL de buffer de carga SDS-PAGE (5X), luego se desnaturalizaron las proteínas a 95 °C por 10 minutos para ser cargadas en el gel de poliacrilamida SDS 8%. Al gel ya mencionado, se incluyó controles: extracto crudo no inducido y extracto crudo inducido.

Por otro lado, la confirmación de la expresión Spy0128 en conjunto con la expresión de los péptidos bloqueadores, los procedimientos fueron parecidos a los mencionados anteriormente. Exceptuando, solo en la preparación de la muestra con las sondas fluorescente, hubo dos tipos de geles en este caso, en primer lugar, uno con extractos crudos con diferentes tipos de inducción: Sin inducción Spy0128 (-Spy0128) y sin inducción de los péptidos (-Pep), inducción Spy0128 (+Spy0128) e inducción de péptidos (+Pep), +Spy0128 y -Pep, por último -Spy0128 y +Pep. En segundo lugar, las proteínas purificadas y concentradas con sus respectivos controles (extracto crudo no inducido y extracto crudo inducido). Siguiendo, se utilizó igualmente 1 µL de “HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand” (1X) y en otro tubo 1 µL de SNAP-Surface® 488 y 19 µL de muestra se dejaron incubando 20 minutos a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se agregó 5 µL de buffer de carga SDS-PAGE (5X), luego se desnaturalizaron las proteínas a 95 °C por 10 minutos para ser cargadas en el gel de poliacrilamida SDS en gradiente (10%-15%).

Continuado, se realizó una electroforesis vertical, en un gel de poliacrilamida SDS ((8%) (10%-15%)), para cargar el gel, se utilizó 5 µL del estándar de proteínas preteñidas PageRuler™ Plus (10 a 250 KDa) y el estándar de proteínas preteñida RGB PlusRGB “Maestrogen” 245kDa-11kDa y se cargó los 25 µL de muestras desnaturalizadas. Para proteger la integridad de las sondas fluorescentes, la electroforesis se corrió protegida de la luz y bajo condiciones de voltaje constante a 100 V por 1 hora, para luego ser dejadas a 120 V por aproximadamente 2-3 horas, o hasta que el frente de migración se cayera del gel.

El gel fue visualizado usando un transiluminador con captura digital y equipado con epiluminiscencia. En primer lugar, se visualizó con luz azul para poder excitar las sondas fluorescentes, capturando una foto al gel completo, en segundo lugar, se realizó la tinción “InVision™ His-Tag In-Gel Stain” para visualizar los His-Tag de la proteína, ocupando la solución “Fixing Solution” durante una hora en agitación suave, para ser lavado con agua MiliQ durante 10 minutos en agitación suave, dejando el gel en la tinción de InVision durante 1 hora en agitación suave y se finalizó utilizando el “phosphate buffer”

durante 10 minutos en agitación suave, visualizando la tinción en el transiluminador con luz ultravioleta. En tercer lugar, se procedió a teñir el gel con azul de Coomassie con agitación suave durante la noche, al día siguiente se realizó la destinción del gel con solución de destinción durante el día hasta lograr visualizar las bandas. Se utilizó la misma cámara y se tomó una nueva foto con luz blanca.

3.7 Preparación de proteínas para el uso del Microscopio de Pinzas Magnéticas.

3.7.1 Biotinilación de la proteína Spy0128 en ausencia y en presencia de los péptidos bloqueadores.

La biotinilación de la proteína Spy0128 es fundamental para permitir la inmovilización de la proteína a la microesfera paramagnética, por tanto, evaluar la intervención de la proteína. En esta reacción, una molécula de biotina se une covalente al grupo amino de uno de los residuos contenidos en la secuencia Avi-Tag®. Este procedimiento, se realizó empleando el kit de reacción BirA 500-RT de Avidity, que permite la unión entre la biotina y la secuencia Avitag™ gracias al uso de ATP y la enzima biotina ligasa (biotin-protein ligase) y se dejó la reacción durante 3 horas a 30 °C. Posteriormente, para conservar las proteínas biotiniladas, se guardaron en el congelador de -20 °C con glicerol al 30%.

3.7.2 Elaboración de las cámaras de fluido.

Para lograr desplegar la proteína de interés se necesitó realizar un ambiente óptimo, para ello se utilizaron cámaras de fluido, estas permiten crear una interfase para que ocurra el experimento. Para la preparación de las cámaras se utilizaron cubreobjetos de 24 x 40 mm (largos), el cual funciona como plataforma para la funcionalización y donde ocurrirá la inmovilización de las proteínas, y segundo vidrio más corto de 22 x 22mm (cortos), el cual funciona para cerrar y generar la cámara de fluido.

Para armar las cámaras, se inició con la limpieza de los cubreobjetos, para ello se utilizó el detergente Hellmanex al 1% por 30 minutos en un baño ultrasónico a 50 °C, seguido de lavados con agua miliQ (10 veces), los cubreobjetos de cortos fueron lavados en etanol y secados en la estufa a 60 °C. Por otro lado, los cubreobjetos largos se sumergieron en acetona por 30 minutos en el baño ultrasónico, luego se lavaron nuevamente con agua MiliQ (10 veces) y se lavó con etanol 99% (HPLC), para luego sumergir los portaobjetos largos nuevamente en etanol 99% para colocarlos en el baño ultrasónico durante 30 minutos, finalmente secarlos con aire comprimido y secarlos en la estufa a 60 °C. A continuación, los cubreobjetos largos ya lavados, se prepararon químicamente con amino-sinalizados empleando (3-

Aminopropil) trimetoxisilano al 1% en una solución alcohólica (Etanol o Metanol) durante 20 minutos y luego se lavaron 3 veces con una solución alcohólica (Etanol o Metanol) y secados nuevamente en una estufa a 100 °C durante 1-2 horas.

Con ambos cubreobjetos limpios y funcionalizados, se formó la cámara de fluido entre ambos vidrios usando Parafilm de (40 x 20 mm) como espaciador, se colocó sobre las orillas superiores e inferiores de los cubreobjetos largos, gracias al grosor del Parafilm se forma una interfase de aproximadamente 200-300 μm , entre el cubreobjeto largo y corto (**Figura 3.6**). Para sellar la unión de los cubreobjetos evitando todo tipo de filtración por los bordes, se calentaron los cubreobjetos superpuestos entre sí en un bloque térmico a 90 °C; posteriormente, sobre el vidrio superior o cubreobjeto corto, se trazó una línea con un lápiz hidrofóbico para evitar filtraciones.

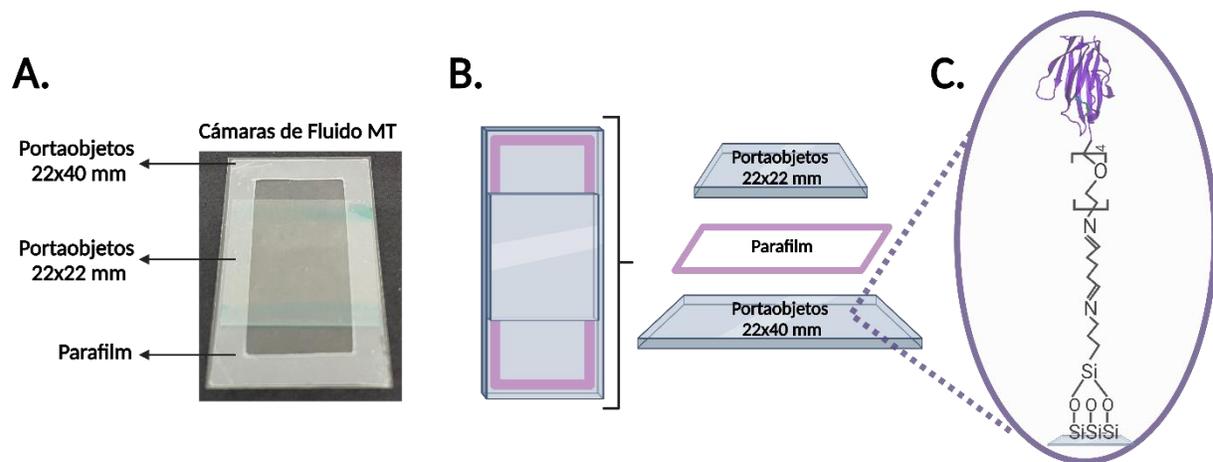


Figura 3.6 Funcionalización de superficies y preparación de la cámara de fluido. A. Fotografía de una cámara de fluido utilizada en el experimento de pinzas magnéticas. B. esquema del montaje de la cámara de fluido. C. Química de superficie utilizada en la funcionalización del portaobjetos con el ligando HaloTag® O4. La funcionalización incluye una química de 3 pasos: adición de un grupo amino por medio de amino-silanización, adición de un entrecruzador –glutaraldehído–, y finalmente la adición del cloro-alcano o sustrato de HaloTag.

Formada la cámara de fluido, se realizó la preparación de la cámara, adicionando en primer lugar glutaraldehído al 1% en amortiguador PBS dejando la incubación de este durante 1 hora, continuando en segundo lugar, se agregaron sin lavar la cámara, las esferas de poliestireno con amino de superficie en una dilución de 200X en amortiguador PBS durante 20 minutos. Luego se agregó 100 μL de Halo-amino(O4)-ligando en una dilución de 500x durante mínimo 4 horas o dejar toda la noche a 4 °C, transcurrido el tiempo se lavó 2 veces la cámara con 100 μL de amortiguador Tris/BSA 1% y se dejó la cámara con 200 μL de amortiguador Tris/BSA 1% durante toda la noche; dejando pasivar los grupos

aldehídos reactivos no modificados con los grupos amino presente en el BSA. Por otro lado, las microesferas paramagnéticas de estreptavidina “DynaBead” M270 se prepararon un día antes de ser ocupadas (30 μ L de microesferas y 1 mL de HEPES/BSA 1%) dejándolas en un rotor a 4 °C; luego de que las cámaras hayan pasado toda la noche con el amortiguador Tris/BSA 1%, se debieron lavar 3 veces con 100 μ L de amortiguador HEPES/BSA 1%, para continuar con la incubación de la proteína de interés adicionando 200 μ L de esta en la cámara de fluido, lavando nuevamente 3 veces con 100 μ L de amortiguador HEPES/BSA 1%, finalizando con la adición de 50 μ L de microesferas paramagnéticas de estreptavidina M270 a la cámara de fluido y llevando la cámara al microscopio de pinzas magnéticas.

3.7.3 Microscopio de pinzas magnéticas “MT”.

Para lograr ver la extensión de la proteína Spy0128 con la presencia y ausencia del péptido C96, utilizaremos el microscopio de pinzas magnéticas “Magnetic Tweezer (MT)”, el cual fue desarrollado en el laboratorio por un estudiante; este microscopio tiene la ventaja de poder estudiar la dinámica de proteínas y biomoléculas en el rango fisiológico de fuerza, estas dinámicas ocurren en escalas de tiempo de los milisegundos.

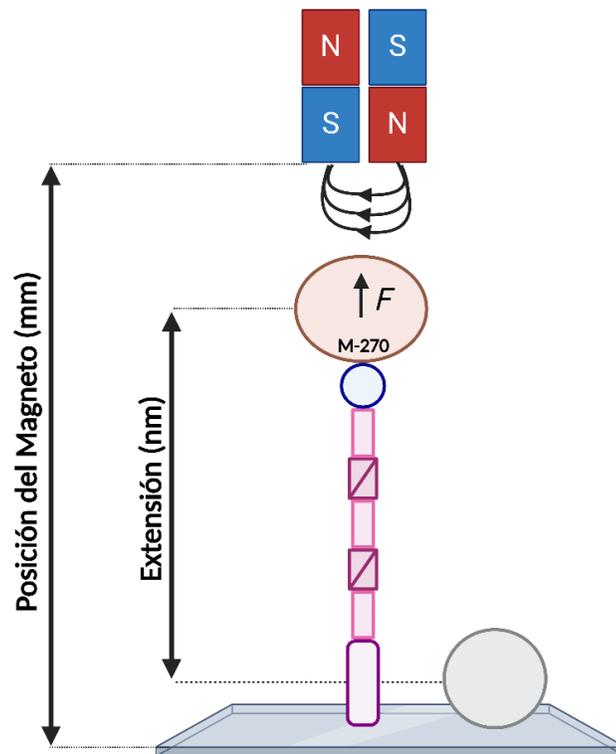


Figura 3.7 Representación de la dinámica de desplegamiento de la estructura de la proteína. Unión covalente de la proteína HaloTag® al Halo-amino(O4)-ligando funcionalizado en la cámara de fluido, por el otro extremo se

une la esfera paramagnética de estreptavidina a la biotina ejerciendo la fuerza en la estructura de la proteína; por otro lado, se encuentra a la esfera de referencia anclada a la cámara de fluido.

Se colocó la cámara de fluido cargada con la proteína y las microesferas paramagnéticas, en el microscopio de pinzas magnéticas. El análisis de la extensión de la proteína se realizó a partir de dos softwares, el primero es MT_Optimus, en este programa seleccionaremos las microesferas para el análisis, para ello ocupamos la opción ROI (*Region Of Interest*) la cual nos mostrara la región de interés donde se encuentran nuestras microesferas, las seleccionaremos e iremos a la opción “Measure” esta permite realizar la medición de las microesferas seleccionadas (**Figura 3.7**), luego se generó un conjunto de imágenes con la función “Stack” y se debió enfocar nuevamente las microesferas para generar la relación de las microesferas y finalmente ocupar el pulso magnético con el protocolo de la **Tabla 1**.

Tabla 3.2 Protocolo de pulso utilizado para medir la extensión de la proteína Spy0128 con y sin intervención de los péptidos bloqueadores.

Posición del Magneto (mm)	Tiempo (Seg)	Tipo de fuerza
5.5	30	Lineal
1.5	30	Constante
1.5	30	Lineal
5.5	30	Constante

Para el análisis de la extensión de los diferentes registros capturados en los ensayos de elasticidad, se utilizó el programa Igor 8 (WaveMetrics). En él se graficaron los datos entregados por el programa MT_Optimus permitiendo el análisis y la estadística de la extensión de Spy0128.

4. Resultados

4.1 Creación y obtención de los péptidos bloqueadores del enlace isopeptídico.

4.1.1 Creación de los péptidos bloqueadores a partir de RPG.

Antes de generar el péptido de interés, se analizó la afinidad de los péptidos bloqueadores que serán utilizados como controles en este estudio. Para ello se utilizó RPG como herramienta de análisis; en primer lugar, se estudió la afinidad del péptido N14 **Tabla 3.1** (control positivo), en este caso solo se utilizaron 10 aminoácidos del péptido debido a la capacidad de procesamiento del programa (KEMTITFNTNK) y, en segundo lugar, el péptido D3 **Tabla 3.1** (control negativo), se diseñó previamente en el laboratorio para la bacteria *Corynebacterium diphtheriae* tiene 7 aminoácidos (EIKNIKQ).

El ensayo de acoplamiento molecular realizado por medio de RPG para el péptido N14 reveló una afinidad de -7.6 kcal/mol (**Tabla 4.1**). Este resultado es determinante para comparar las afinidades de los demás péptidos bloqueadores, debido a que es la cadena de la hebra original de la proteína. Por otro lado, el péptido D3, consistente en una cadena de 7 aminoácidos “EIKNIKQ” y que se diseñó previamente en el laboratorio y que es usado como control negativo, tiene una afinidad medida por medio de RPG de -7.4 kcal/mol (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1 Resultados de la afinidad obtenidos a partir de RPG de los péptidos controles “D3” y “N14”.

Nombres de los Péptidos	Afinidad kcal/mol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N14 (original)	-7.6	K	E	M	T	I	T	F	T	N	K
D3	-7.4	E	I	K	N	I	K	Q	-	-	-

Por último, el péptido creado a partir de RPG se generó a partir de reiteradas iteraciones de las posiciones de los aminoácidos tomando en consideración que en su creación debía contener al menos un aminoácido de asparagina para la intervención del enlace isopeptídico entre Lys179-Asn303. En el diseño se utilizó una asparagina en la posición N°4 (**Tabla 4.2**). Luego de fijar la posición, se iteraron las posiciones restantes con una lista de 20 aminoácidos, generada por el programa. Una vez finalizada la última etapa de la generación de péptidos, se obtuvieron los archivos que contenían una lista con las afinidades obtenidas de cada uno de los acoplamientos realizados, y seleccionamos en RPG un valor de

afinidad del -7.6 kcal/mol para lograr observar péptidos con mayores afinidades a la obtenida por el péptido original (**Tabla 4.1**). Se obtuvo un péptido con el valor más alto de afinidad -9.0 kcal/mol, nombrado como C96 (**Tabla 4.2**). Este péptido tuvo una afinidad mucho mayor a la cadena original o péptido N14; por lo tanto, este péptido es utilizado para los ensayos de intervención *in vitro* del enlace isopeptídico de Spy0128.

Tabla 4.2 Resultado de la afinidad obtenida del péptido creado a partir de RPG “Random Peptide Generator”.

Péptido de RPG	Afinidad kcal/mol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Diseño péptido 1°	¿?	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-
C96	-9.0	Q	W	G	N	M	F	N	K	W	K

4.1.2 Diseño del vector de expresión de los péptidos.

El vector seleccionado para incluir las secuencias codificantes de los péptidos bloqueadores es el pBAD. En este vector se clonaron de manera independiente los tres péptidos bloqueadores. El péptido C96, específicamente desarrollado para interferir con el enlace isopeptídico entre Lys179--Asn303 de la proteína Spy0128, por otro lado, los péptidos: N14 control positivo y D3 control negativo del sistema (**Figura 4.1 B1-3**).

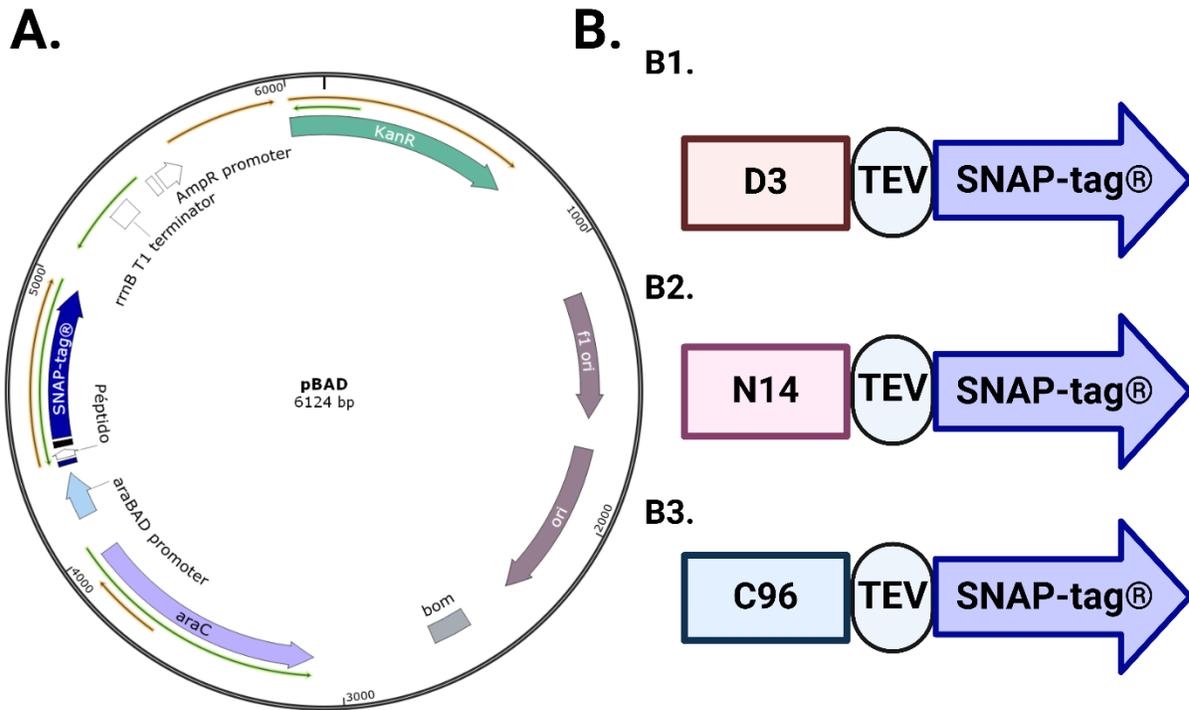


Figura 4.1 Diseño del Vector pBAD con diferentes péptidos bloqueadores. **A.** Mapa circular del vector pBAD, el cual posee un promotor de arabinosa “araBAD”, que controla la expresión de los péptidos. La secuencia del péptido es antecedido por la región de unión al ribosoma “RBS” y sucedido por una secuencia de corte TEV junto a la fusión SNAP-Tag, usado en los ensayos de seguimiento en geles. **B.** Representación de los péptidos. **B.1.** El péptido C96 creado en el laboratorio por el software “RPG” luego el sitio de corte TEV y la proteína de etiqueta. **B.2.** El péptido N14, luego el sitio de corte TEV y la proteína de etiqueta. **B.3.** El péptido D3 creado en el laboratorio, luego el sitio de corte TEV y la proteína de etiqueta (Imagen preparada con SnapGene y BioRender®).

4.1.3 Expresión de los péptidos bloqueadores del enlace isopeptídico.

Tras el diseño del vector pBAD, se buscó evaluar la expresión de los péptidos en conjunto con la proteína de etiqueta SNAP-tag®, esencial para detectar la presencia de los péptidos. La inducción de la expresión del péptido se llevó a cabo por la adición de L-arabinosa, registrando más tarde y por medio de electroforesis vertical en poliacrilamida-SDS al 15%, la presencia o ausencia de los diferentes péptidos. Para confirmar la expresión de los péptidos, se cargaron los extractos crudos obtenidos de la bacteria inducida en conjunto con la sonda fluorescente SNAP-Surface® Alexa Fluor® 488 para evidenciar la presencia de la proteína de etiqueta SNAP-tag®.

En los geles y bajo iluminación con luz azul, se observaron bandas en todas las condiciones ensayadas (**Figura 4.2**). En la condición de inducción con el péptido D3—22.6 kDa—, se detectó una banda por debajo de los 25 kDa. En la condición de inducción con el péptido N14—23.8 kDa—, se observó una

banda cercana a los 25 kDa. Finalmente, en la condición de inducción con el péptido C96—23 kDa—, se detectaron dos bandas, una con mayor masa molecular que la otra, ambas cercanas a los 25 kDa. Las bandas fueron detectables sólo en la condición en presencia del inductor arabinosa, no así en su ausencia, descartando fuga de expresión y confirmando el adecuado control del promotor pBAD.

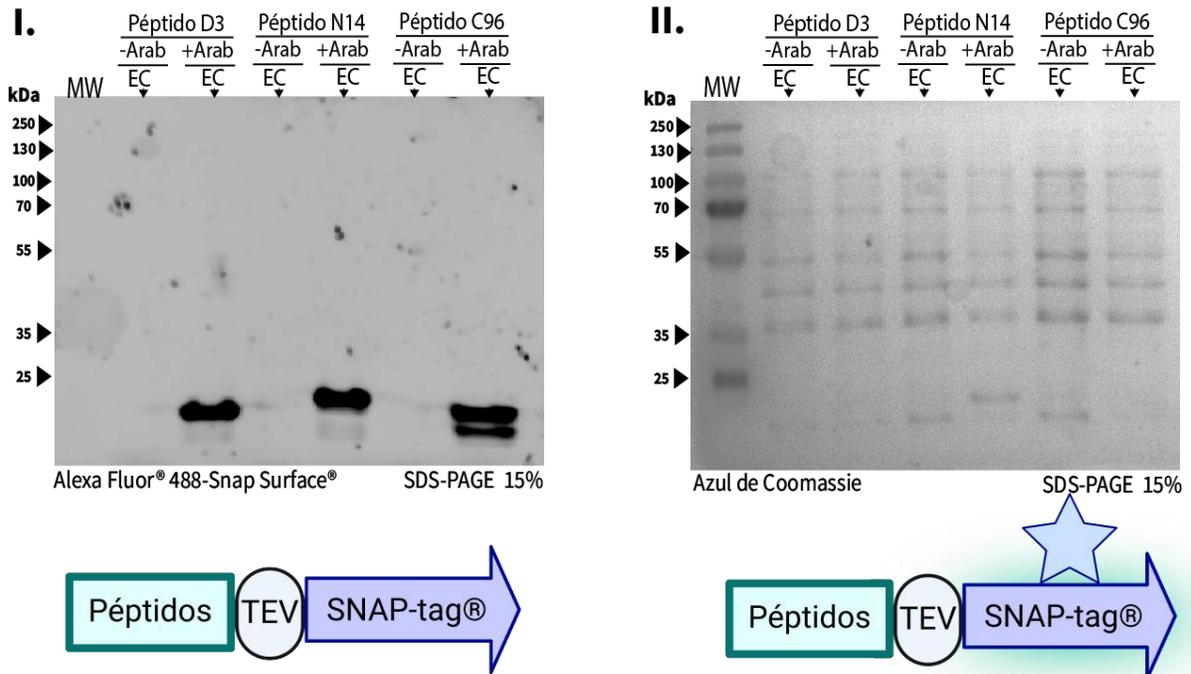


Figura 4.2 Gel de poliacrilamida SDS al 15% cargados con la inducción de los péptidos bloqueadores. I, tinción con la sonda fluorescente SNAP-Surface® Alexa Fluor® 488. **II,** tinción con azul de Coomassie. **Carril 1:** estándar de proteína preteñidas PageRuler™ Plus de 10 a 250 kDa (Marcador Molecular “MW”), **Carril 2:** control negativo de la inducción del Péptido D3 (-Ara), **Carril 3:** inducción del Péptido D3 (+Ara), **Carril 4:** control negativo de la inducción del Péptido N14 (-Ara), **Carril 5:** inducción del péptido N14 (+Ara), **Carril 6:** control negativo de la inducción del Péptido C96 (Ara-), por último, **Carril 7:** inducción del Péptido C96 (Ara+).

4.2 Evaluación de la intervención de péptidos bloqueadores del enlace isozeptídico de la proteína Spy0128 a través de geles SDS-PAGE.

4.2.1 Expresión y purificación la proteína Spy0128 sin la intervención de los péptidos bloqueadores.

Buscamos evaluar la expresión de la proteína Spy0128 en conjunto con sus proteínas de fusión HaloTag® e His-Tag (Figura 3.1) por medio del inductor IPTG. Tras la expresión de la proteína, se purificó las proteínas obtenidas para evaluarlas a través de una electroforesis vertical, utilizado un gel de poliacrilamida-SDS al 8%, cargando en el gel las fracciones obtenidas en la purificación con

cromatografía de afinidad en columnas. La afinidad se produjo gracias a las histidinas (6x His-Tag) que se encuentran expresadas en el constructo, donde las histidinas tienen afinidad por el níquel presente en la columna de purificación.

Para distinguir las proteínas de etiqueta asociadas a nuestra proteína de interés, se utilizó la sonda fluorescente HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand, la que se une covalentemente a la proteína de etiqueta HaloTag®. Por otro lado, se utilizó la tinción InVision, la cual se une específicamente en secuencias His-Tag. A partir de lo presentado en la **Figura 4.3**, podemos concluir que efectivamente nuestra proteína de interés se expresó y se purificó correctamente. La proteína Spy0128 se expresa como proteína de fusión a la proteína de etiqueta HaloTag® y la proteína His-Tag, obteniendo bandas superiores a los 130 kDa, en perfecta concordancia con la masa molecular esperada de 133 kDa.

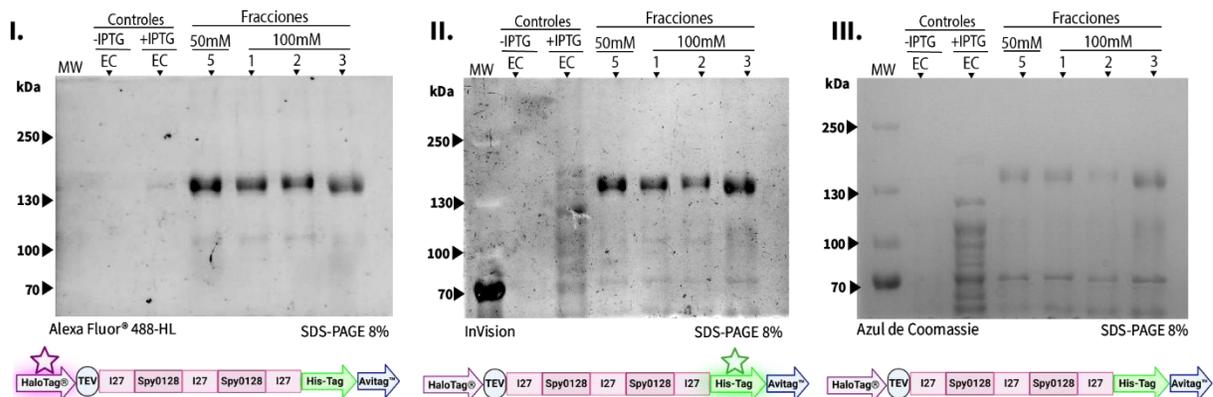


Figura 4.3 Expresión y purificación de la proteína Spy0128 en conjunto con las proteínas de etiqueta (HaloTag® y AviTag). I, tinción con sonda fluorescente HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand. II, Tinción con InVision. III, tinción con azul de Coomassie. **Carril 1:** estándar de proteína preteñidas PageRuler™ Plus de 10 a 250 kDa (Marcador Molecular “MW”), **Carril 2:** control negativo de la inducción (-IPTG), **Carril 3:** control positivo de la inducción (+IPTG), **Carril 4:** Fracción N° 5 de la elución con amortiguador de elución con 50 mM de imidazol, **Carril 5-7:** fracciones N° 1-3 de la elución con amortiguador de elución con 100 mM de imidazol.

4.2.2 Verificación de la inducción y expresión la proteína Spy0128 con la intervención de los péptidos bloqueadores en diferentes condiciones de expresión.

A continuación, se buscó evaluar la expresión secuencial de los péptidos bloqueadores seguido por la inducción de la proteína HaloTag®-Spy0128-His-Tag. Para ello se realizaron coexpresiones de los constructos de interés, en primer lugar, induciendo los péptidos en conjunto con su proteína de fusión SNAP-tag®, seguido de la proteína Spy0128 con su respectiva proteína de etiqueta HaloTag®. La

expresión secuencial se evaluó a través de una electroforesis vertical, utilizando un gel de poliacrilamida SDS de 10% y 15% (Figura 4.4, 4.5, 4.6).

Para diferenciar la proteína de fusión de los péptidos se utilizó la sonda fluorescente SNAP-Surface® Alexa Fluor® 488 “S”, la que se une covalentemente a la proteína SNAP-tag®. Por otro lado, para diferenciar las proteínas de etiqueta que presenta nuestra proteína de interés, se utilizó la sonda fluorescente HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand “H”, la que se une covalentemente a la proteína de etiqueta HaloTag®. Por otro lado, al igual que en el caso de la expresión de la proteína Spy0128, se utilizó InVision para identificar la etiqueta His-Tag.

A partir de lo presentado en la Figura 4.4, confirmamos la expresión tanto del péptido D3 como de la expresión de la proteína quimérica Spy0128, obteniendo una banda cercana a los 20 kDa además de un doble bandeo superior a los 135 kDa. Este doble marcaje, explicaría proteínas de alta masa molecular separadas por unas cuantas decenas de kDa, por lo que, considerando la evidencia de marcaje y migración bajo SNAP-tag®, HaloTag®, e InVision, podría tratarse de una proteína quimérica Spy0128 y una versión decorada (Figura 4.4 I). Cabe mencionar, en el caso de la condición de expresión de la proteína Spy0128 y con marcaje con el ligando del HaloTag, se aprecia un gran número de bandas de baja masa molecular ubicadas aproximadamente a 75 kDa y 50 kDa, probablemente asociadas a hidrólisis de la proteína quimérica.

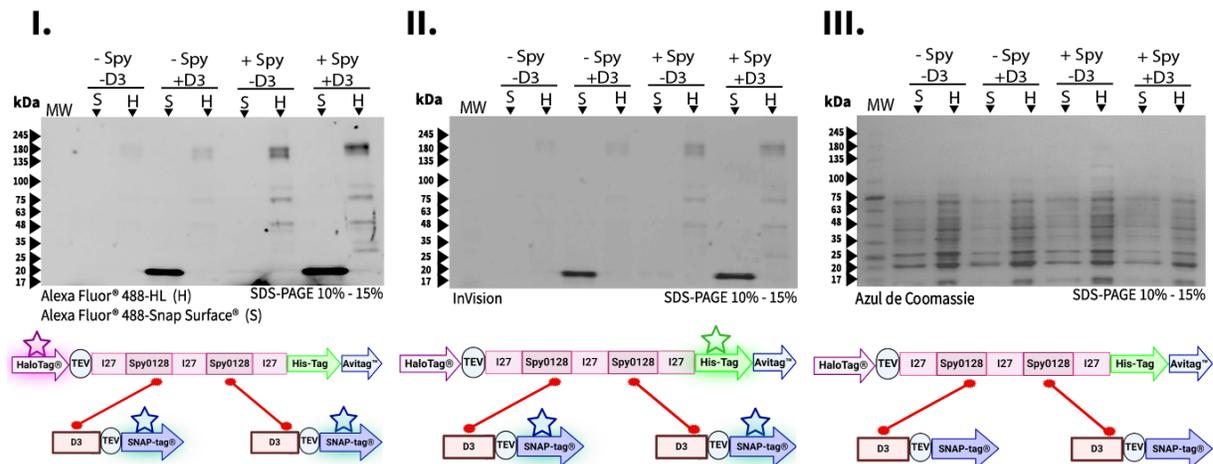


Figura 4.4 Coexpresión entre el péptido D3 y la proteína Spy0128 con diferentes condiciones de inducción. I, se encuentra la tinción con las sondas fluorescentes en primer lugar para todas las condiciones se encuentra la sonda SNAP-Surface® Alexa Fluor® 488 “S” y en segundo lugar la sonda fluorescente Halo-Tag® Alexa Fluor® 488 Ligand “H”. II, Tinción con InVision. III, tinción con azul de Coomassie. En el carril 1: estándar de proteínas preteñida RGB PlusRGB “Maestrogen” 245kDa-11kDa (Marcador Molecular “MW”), Carriles 2-3: condiciones de

coexpresión de -Spy y -D3, **Carriles 4-5:** condiciones de coexpresión de -Spy y +D3, **Carriles 6-7:** condiciones de coexpresión +Spy y -D3, por último, **Carriles 8-9:** condiciones de coexpresión +Spy y +D3.

Por otro lado, repetimos los mismos ensayos y análisis de la coexpresión para el péptido N14. Tal cual como en el caso anterior, se obtuvo banda cercana a los 25 kDa en las condiciones de inducción de sólo el péptido y una única banda a superior a los 130 kDa en la condición de inducción de la proteína (**Figura 4.5**). Aquí la decoración no parece tan evidente; doble bandeado no está presente, tampoco las bandas de baja masa molecular asociadas probablemente a la hidrólisis.

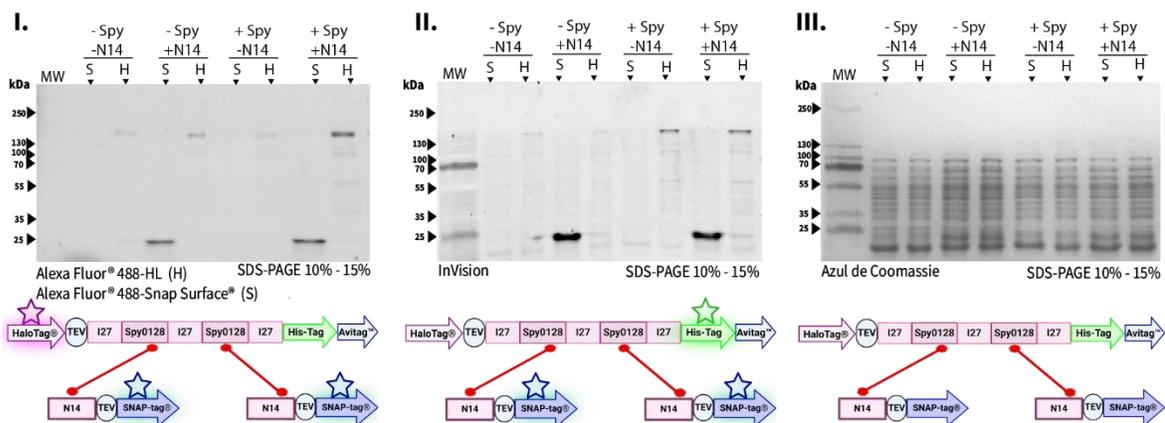


Figura 4.5 Coexpresión entre el péptido N14 y la proteína Spy0128 con diferentes condiciones de inducción. I, se encuentra la tinción con las sondas fluorescentes en primer lugar para todas las condiciones se encuentra la sonda SNAP-Surface® Alexa Fluor® 488 “S” y en segundo lugar la sonda fluorescente Halo-Tag® Alexa Fluor® 488 Ligand “H”. II, Tinción con InVision. III, tinción con azul de Coomassie. En el carril 1: se encuentra el estándar de proteína preteñidas PageRuler™ Plus de 10 a 250 kDa (Marcador Molecular “MW”), Carriles 2-3: condiciones de coexpresión de -Spy y -N14, Carriles 4-5: condiciones de coexpresión de -Spy y +N14, Carriles 6-7: condiciones de coexpresión +Spy y -N14, por último, Carriles 8-9: condiciones de coexpresión +Spy y +N14.

Por último, se ensayó la coexpresión de la proteína en la presencia del péptido C96, péptido especialmente diseñado para intervenir con la formación del enlace. De los ensayos de expresión, se obtuvo una banda cercana a los 25 kDa en las condiciones donde inducimos el péptido y mientras que una banda superior a los 130 kDa en la condición de inducción de la proteína (**Figura 4.6**). Las bandas obtenidas en estos ensayos corresponden a los pesos moleculares tanto del péptido como de la proteína, confirmado por las bandas obtenidas tanto para la tinción con la sonda fluorescente HaloTag® ligando, la tinción InVision y la tinción con azul de Coomassie. Aquí la decoración, tal cual como en el caso anterior, no parece tan evidente; doble bandeado no está presente, tampoco las bandas de baja masa molecular asociadas probablemente a hidrólisis.

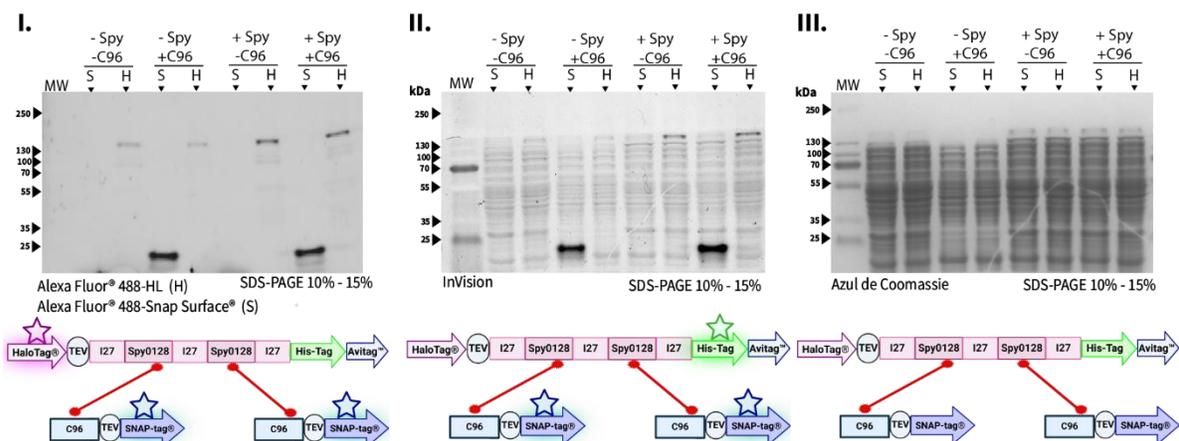


Figura 4.6 Coexpresión entre el péptido C96 y la proteína Spy0128 con diferentes condiciones de inducción. I, se encuentra la tinción con las sondas fluorescentes en primer lugar para todas las condiciones se encuentra la sonda SNAP-Surface® Alexa Fluor® 488 “S” y en segundo lugar la sonda fluorescente Halo-Tag® Alexa Fluor® 488 Ligand “H”. II, Tinción con InVision. III, tinción con azul de Coomassie. En el **carril 1**: se encuentra el estándar de proteína preteñidas PageRuler™ Plus de 10 a 250 kDa (Marcador Molecular “MW”), **Carriles 2-3**: condiciones de coexpresión de -Spy y -C96, **Carriles 4-5**: condiciones de coexpresión de -Spy y +C96, **Carriles 6-7**: condiciones de coexpresión +Spy y -C96, por último, **Carriles 8-9**: condiciones de coexpresión +Spy y +C96.

Estos resultados nos confirman que la bacteria puede expresar tanto los péptidos bloqueadores como la proteína de interés, no obstante, las decoraciones de la proteína Spy0128 puede ser marginal. En las condiciones donde existe tanto el péptido como la proteína quimérica Spy0128, y son tratados con el ligando de SNAP-tag®, no hay evidencia de proteína decorada a alta mas molecular o bandas de hidrolisis, sólo lo que sería la banda correspondiente al péptido (**Figura 4.4, 4.5 y 4.6**). En el caso de que exista una posible decoración con el péptido, puede ser muy baja, por lo que se hace necesario purificar la proteína, de modo de poder cuantificar de manera precisa la decoración y posibles cambios en la movilidad electroforética.

4.2.3 Expresión y purificación la proteína Spy0128 con la intervención de los péptidos bloqueadores.

Una vez confirmado que la bacteria puede expresar tanto los péptidos bloqueadores como la proteína de interés, se buscó evaluar la expresión y purificación del constructo en conjunto con sus proteínas de fusión, ya mencionadas anteriormente. Tras hecha la expresión secuencial entre los péptidos y la proteína, se realizó la purificación de las proteínas obtenidas para evaluarlas por medio de la técnica de electroforesis vertical, utilizando un gel de poliacrilamida SDS al 8% cargando las fracciones obtenidas en la purificación por medio de cromatografía de afinidad. Al igual que en la sección anterior, para diferenciar las proteínas de etiqueta que presenta nuestra proteína de interés, se utilizó la sonda

fluorescente HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand, la que se une covalentemente a la proteína de etiqueta HaloTag® e InVision la que tiñe la secuencia His-Tag.

A partir de lo presentado en la **Figura 4.7**, podemos concluir que efectivamente nuestra proteína de interés se expresó y se purificó correctamente, debido a que queda unida a la proteína HaloTag® y la proteína His-Tag, observamos dos bandas que prácticamente migran por debajo de los 135 kDa, correspondientes a la masa molecular de la proteína. Por otra parte, no se obtuvo ninguna banda por arriba de esta masa molecular de la proteína, tal como se apreció en los geles de extractos crudos. Se observan un par de bandas por debajo de los 100 kDa y por arriba de los 75 kDa posiblemente asociados a hidrólisis de la proteína decorada. En la tinción con azul de Coomassie, se observan diferentes bandas por debajo del peso molecular de la proteína de interés, confirmando contaminantes en la purificación que nos son eliminados en los pasos cromatográficos.

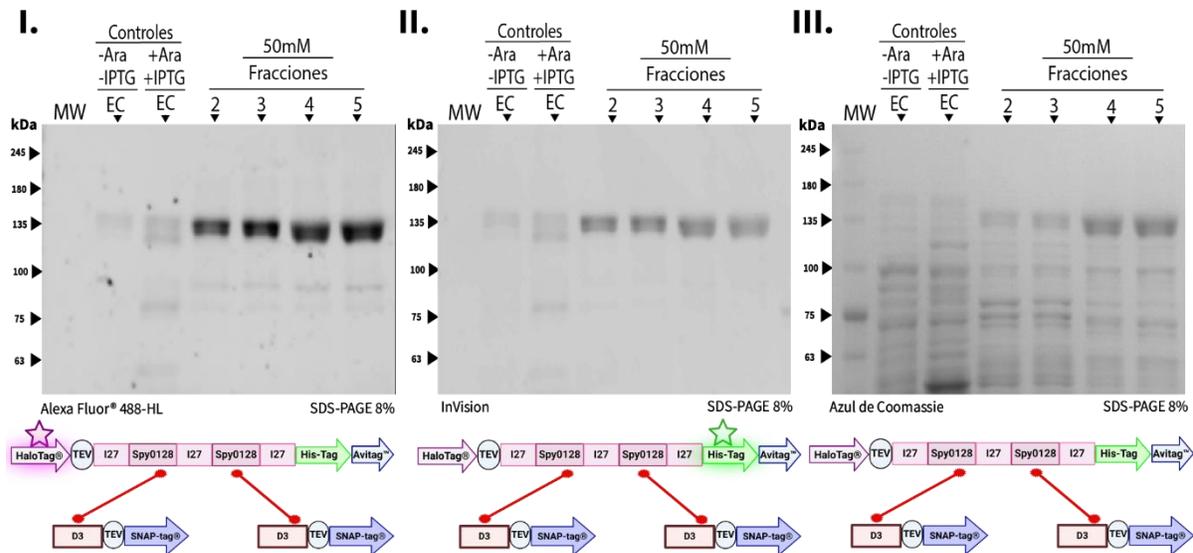


Figura 4.7. Coexpresión y purificación entre el péptido D3 y la proteína Spy0128. I, tinción con la sonda fluorescente Halo-Tag® Alexa Fluor® 488 Ligand. II, Tinción con InVision. III, tinción con azul de Coomassie. En el **Carril 1**: el estándar de proteínas preteñida RGB PlusRGB “Maestrogen” 245kDa-11kDa (Marcador Molecular “MW”), **Carril 2**: Control negativo de la coexpresión -D3 -Spy0128 “-Ara, -IPTG” (Extracto crudo), **Carril 3**: Control positivo de la coexpresión +D3 +Spy0128 “+Ara, +IPTG” (Extracto crudo), **Carril 4-7**: fracciones N° 2-5 obtenidas a partir del amortiguador de elución 50 mM de imidazol.

En el caso del ensayo de coexpresión de Spy0128 en presencia del péptido control N14, la proteína se puede purificar e identificar al menos una banda por arriba de los 130 kDa que coincide con la masa molecular de la proteína (**Figura 4.8**). No obstante, en fracciones eluidas a 50 y 100 mM imidazol, se

puede encontrar una banda extra ahora localizada por debajo de los 250 kDa, aproximadamente con una masa molecular de 180 kDa (**Figura 4.8 I, II, III**). Esta banda podría ser evidencia de la decoración de la proteína con el péptido N14. Bajo la tinción con InVision, es posible ver que hay varias bandas extras de menor masa molecular, probablemente asociadas con hidrólisis de la proteína quimérica.

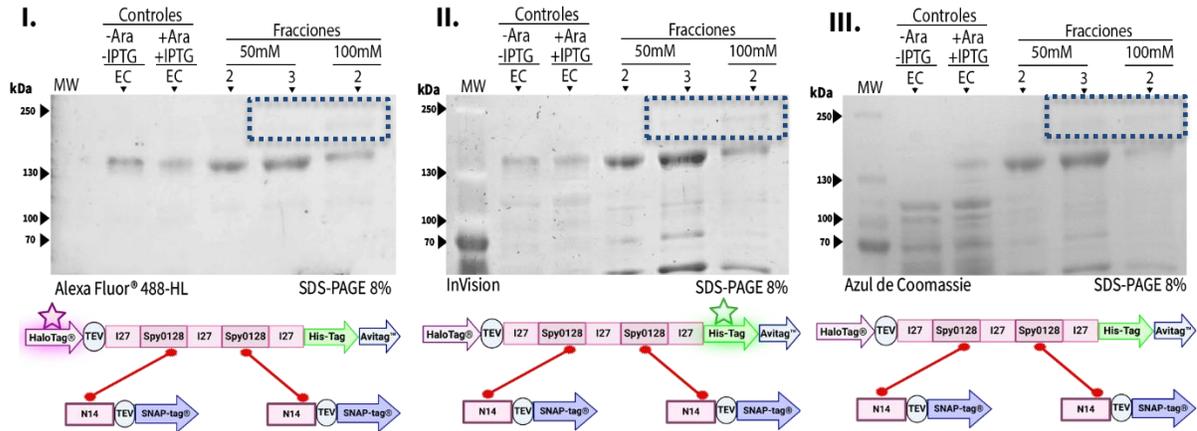


Figura 4.8 Coexpresión y purificación entre el péptido N14 y la proteína Spy0128. I, tinción con la sonda fluorescente Halo-Tag® Alexa Fluor® 488 Ligand. II, Tinción con InVision. III, tinción con azul de Coomassie. En el **Carril 1:** Estándar de proteína preteñidas PageRuler™ Plus de 10 a 250 kDa (Marcador Molecular “MW”), **Carril 2:** Control negativo de la coexpresión -N14 -Spy0128 “-Ara, -IPTG” (Extracto crudo), **Carril 3:** Control positivo de la coexpresión +N14 +Spy0128 “+Ara, +IPTG” (Extracto crudo), **Carril 4-5:** fracciones N° 2-3 obtenidas a partir del amortiguador de elución 50 mM de imidazol. **Carril 6:** fracción N° 2 obtenida a partir del amortiguador de elución 100 mM de imidazol.

Por último, en la coexpresión de la proteína Spy0128 en la presencia del ahora diseñado péptido C96, se logró purificar la proteína evidenciando una banda que coincide con la masa molecular de la proteína quimera pero además una banda localizada a alta masa molecular (**Figura 4.9**, ver carriles 5 y 6). Al igual que en el caso anterior, la banda se observa mejor en la condición capturada en InVision, tinción para His-Tag, sugiriendo una posible decoración de la proteína con el péptido.

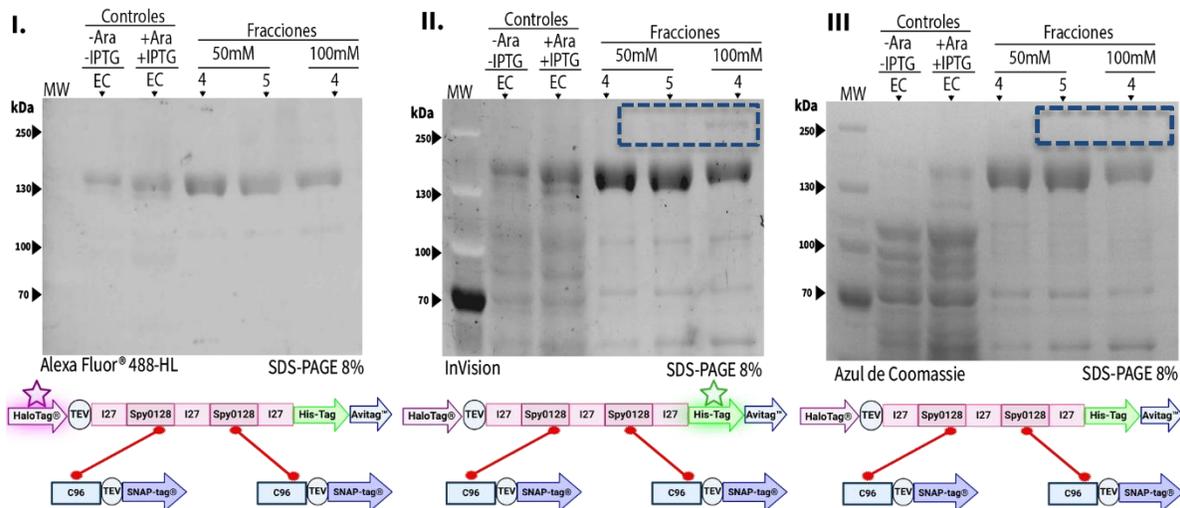


Figura 4.9 Coexpresión y purificación entre el péptido C96 y la proteína Spy0128. I, tinción con la sonda fluorescente Halo-Tag® Alexa Fluor® 488 Ligand. II, Tinción con InVision. III, tinción con azul de Coomassie. En el **Carril 1**: Estándar de proteína preteñidas PageRuler™ Plus de 10 a 250 kDa (Marcador Molecular “MW”), **Carril 2**: Control negativo de la coexpresión -C96 -Spy0128 “-Ara, -IPTG” (Extracto crudo), **Carril 3**: Control positivo de la coexpresión +C96 +Spy0128 “+Ara, +IPTG” (Extracto crudo), **Carril 4-5**: fracciones N° 4-5 Fracciones obtenidas a partir del amortiguador de elución 50 mM de imidazol. **Carril 6**: fracción N° 4 obtenida a partir del amortiguador de elución 100 mM de imidazol.

Luego de este análisis, y con la idea de facilitar la detección de la posible proteína Spy0128 decorada con los péptidos, las fracciones de las diferentes purificaciones fueron concentradas mediante unidades de filtración Amicon (100 kDa) y luego decoradas con el ligando del HaloTag®. Para facilitar el ensayo y hacerlo compartivo para los diferentes tres péptidos, las condiciones fueron analizadas mediante electroforesis de poliacrilamida SDS al 8% agregando la misma cantidad de proteína total. En la **Figura 4.10**, se resumen este ensayo donde se puede apreciar la banda aproximadamente a 130 kDa, evidencia de la proteína quimérica Spy0128. No obstante, en el caso de los peptidos D3 y N14, esta banda es acompañada por una segunda banda a alta masa molecular, aproximadamente 250 kDa.

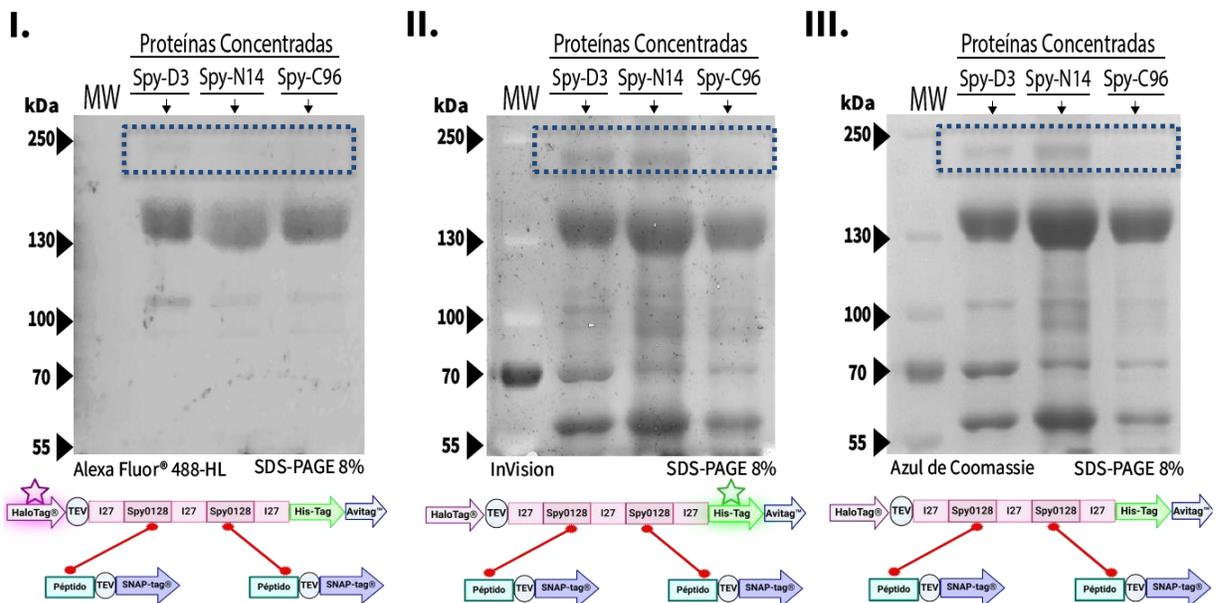


Figura 4.10 Proteínas concentradas de Spy0128 con la intervención de los diferentes péptidos bloqueadores. **I**, tinción con la sonda fluorescente Halo-Tag® Alexa Fluor® 488 Ligand. **II**, Tinción con InVision. **III**, tinción con azul de Coomassie. En el **Carril 1**: Estándar de proteína preteñidas PageRuler™ Plus de 10 a 250 kDa (Marcador Molecular “MW”), **Carril 2**: Proteína Spy0128 intervenida con el péptido D3, **Carril 3**: Proteína SPY0128 intervenida con el péptido N14, por último, **Carril 4**: Proteína Spy0128 intervenida con el péptido C96.

Por lo tanto, luego de terminar con los ensayos de coexpresión podemos concluir que se logró confirmar la expresión, purificación y concentración de las proteínas Spy0128, tanto en ausencia como presencia de los diferentes péptidos bloqueadores (**Figuras 4.7, 4.8, 4.9, 4.10**). Sorprendentemente, el péptido D3, el cual escogimos inicialmente para usarlo como control de nuestro sistema, al no contener necesariamente un contexto de secuencia, mostró muy buenos resultados en los ensayos de migración electroforética. Bandas de alta masa molecular y doble bandeado estaban presentes en estos ensayos (**Figura 4.7 y 4.19**). Por otro lado, el péptido C96 no mostró, al menos en estos ensayos in vitro, evidencias importantes de decoración o mayores que el péptido N14.

4.3 Extensión de la proteína Spy0128 con la ausencia y presencia de los péptidos bloqueadores.

4.3.1 Extensión de la proteína Spy0128 en la ausencia de los péptidos bloqueadores.

Luego de la expresión de la proteína sin la coexpresión de los péptidos, probamos la extensión de la proteína en el microscopio de pinzas magnéticas. Esto se realizó siguiendo los protocolos mencionados en la metodología, donde se expuso a la proteína a una fuerza constante evaluando la ganancia de extensión y usando los reporteros de desplegamiento dominios I27. En la **Figura 4.11**, se visualizan 4

peldaños en el gráfico, correspondientes a los dominios reporteros y la proteína de etiqueta HaloTag®. La extensión máxima de la proteína fue de aproximadamente 270 nm; la primera extensión que se visualiza posee un largo de 41 nm por el efecto de la fuerza ejercida por la posición del magneto que en este caso fue 1,6 mm de la cámara, dada esa posición, la fuerza ejercida en la esfera paramagnética fue de 80 pN para lograr la extensión de la proteína de etiqueta HaloTag®. Por otro lado, las siguientes tres extensiones que se logran visualizar corresponden a los reporteros de extensión I27, el primer dominio de I27 midió 20 nm de extensión por el efecto de la fuerza ejercida por la posición del magneto que fue 1,6 mm de la cámara, la fuerza ejercida fue de 92 pN; el siguiente dominio de I27 midió 29 nm de extensión dado por la posición del magneto que fue de 1,5 mm de la cámara ejerciendo una fuerza de 97 pN; por último, el siguiente dominio de I27 midió 21 nm de extensión dado por la posición del magneto que en este caso fue 1,4 mm de la cámara ejerciendo una fuerza de 103 pN; para entender el proceso que ocurrió se encuentra un esquema en el costado derecho de la imagen para ejemplificar el proceso de extensión de la proteína.

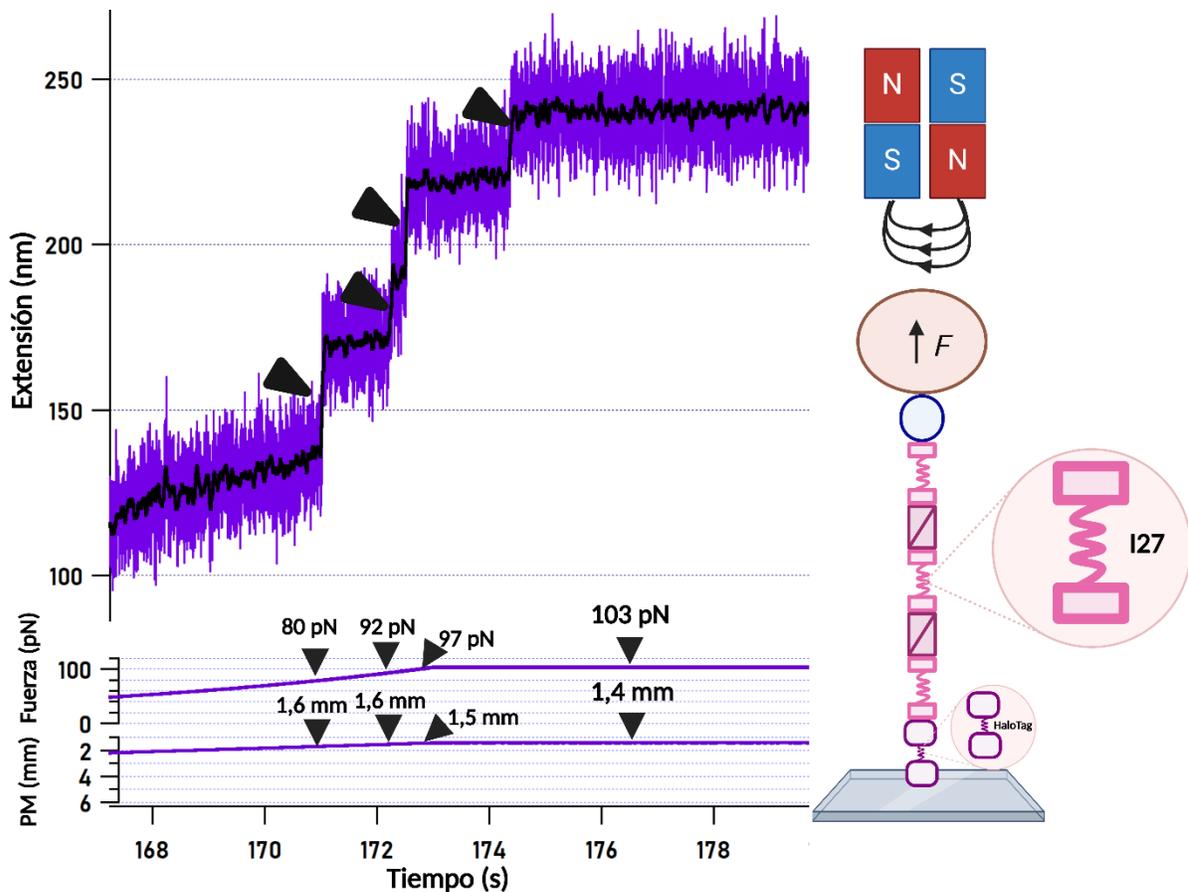


Figura 4.11 Resultados de la extensión de la proteína Spy0128 en el microscopio de pinzas magnéticas. En el costado izquierdo de la imagen se encuentra el gráfico de extensión de la proteína Spy0128, en donde se visualiza

los dominios reporteros de extensión de la proteína y la extensión de la proteína de etiqueta HaloTag®; en la parte inferior del gráfico se encuentran las posiciones del magneto y las fuerzas ejercidas por la posición de este, por otro lado, en el costado derecho se encuentra un esquema representativo de la extensión de los dominios reporteros de la proteína.

Para determinar de manera precisa la dimensión de cada uno de los eventos de desplegamiento se utilizó el mismo programa mencionado anteriormente "Igor", ejecutando histogramas de posición de las microesferas. En la **Figura 4.12 A**, se presenta el histograma de posición obtenido a partir del gráfico mostrado anteriormente, generando 4 picos por cada transición de estado que generaba la esfera paramagnética cuando se desplegaba un dominio de la proteína, con el mismo orden que se comentó anteriormente, representando los datos a través de un histograma de posición con una distribución gaussiana de los datos en la parte superior y en la parte inferior se encuentran el histograma con la distribución gaussiana. En la **Figura 4.12 B** se representan los datos obtenidos a partir del histograma de posición presentado en la **Figura 4.12 A** estos valores se obtuvieron gracias a las diferentes deltas de transición de la microesfera "pico", para lograr medir cada perturbación se realizó la resta de cada posición de los "picos" obteniendo el valor de cada transición ocurrida, obteniendo diferentes transiciones correspondientes a las distancias de los dominios de extensión y proteína de etiqueta. En primer lugar, la diferencia entre el pico 0-1 da como resultado una extensión de 41 nm correspondiente a la proteína HaloTag®; en segundo lugar, la diferencia entre el pico 1-2 da una extensión de 20 nm asociada a la extensión del dominio reportero I27; en tercer lugar y cuarto lugar la diferencia entre los picos 2-3 y 3-4 dan como resultado extensiones de 29 nm y 21 nm respectivamente.

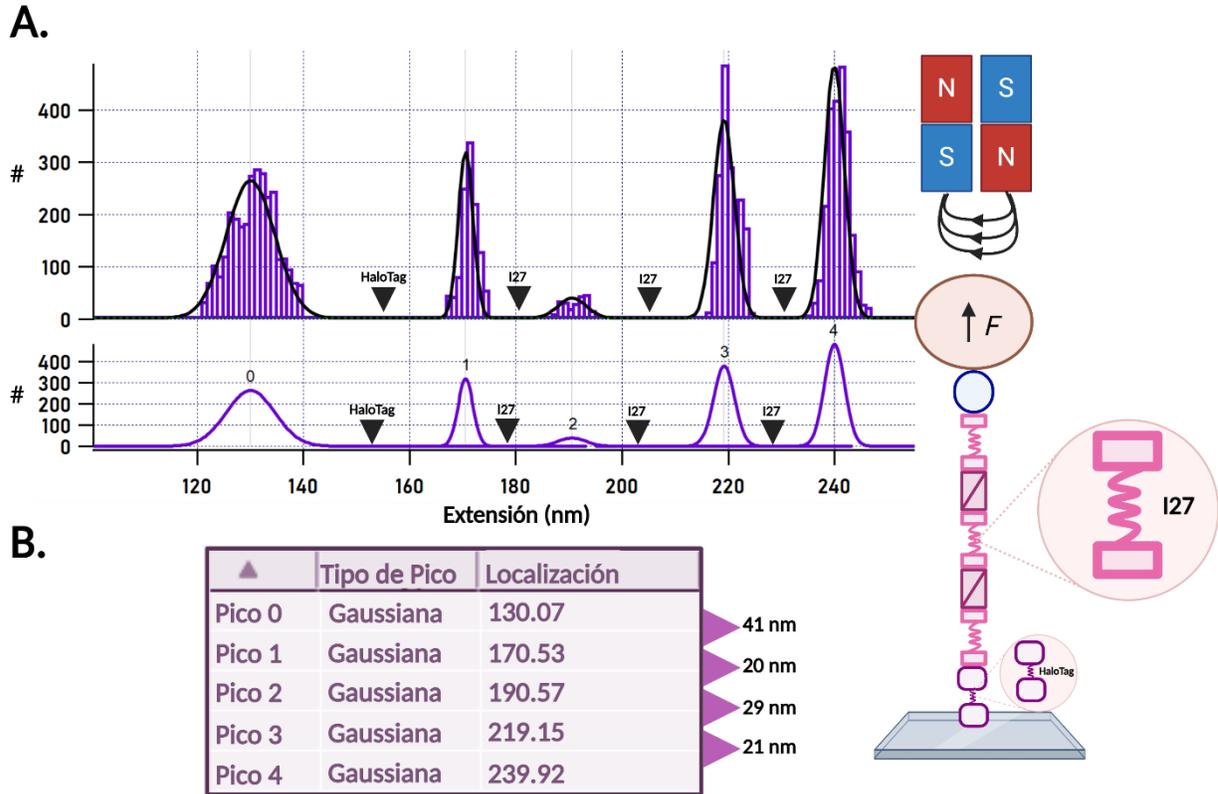


Figura 4.12 Histogramas de estado de la proteína Spy0128. A. Histograma de estado de Spy0128 obtenido a partir del gráfico de extensión de la proteína, en el eje x es la extensión (nm) y en el eje y se encuentra la cantidad de veces que la esfera paramagnética estuvo en ese estado. **B.** Tabla de datos obtenida por la transición de estado de la esfera paramagnética.

4.3.2 Extensión de la proteína Spy0128 con la intervención de los péptidos bloqueadores.

Luego de la expresión de la proteína Spy0128 con el péptido bloqueador D3, se realizaron los ensayos de extensión de la proteína coexpresada en el microscopio de pinzas magnéticas; esto se realizó con los protocolos mencionados en la metodología de este trabajo. Para determinar de manera precisa la dimensión de cada uno de los eventos de desplegamiento se utilizó el mismo programa mencionado anteriormente "Igor", ejecutando histogramas de posición de las microesferas para todas las condiciones mostradas de aquí en adelante.

La proteína coexpresada con el péptido D3 tuvo una extensión máxima de 820 nm aproximadamente, resultado de una proteína intervenida con el péptido control "Negativo". En la **Figura 4.13**, se encuentran 4 extensiones totales de desplegamiento; en primer lugar, el primer dominio desplegado posee una extensión de 25 nm correspondiente a un dominio reportero "I27", el siguiente dominio

tuvo una extensión de 57 nm asociado a la extensión de la proteína de etiqueta HaloTag®; los siguientes dos dominios que se encuentran en el gráfico tuvieron una extensión de 28 nm y 16 nm, coincidiendo con la extensión aproximada de los dominios reporteros “I27”; la extensión completa de la proteína fue de 25 segundos aproximadamente.

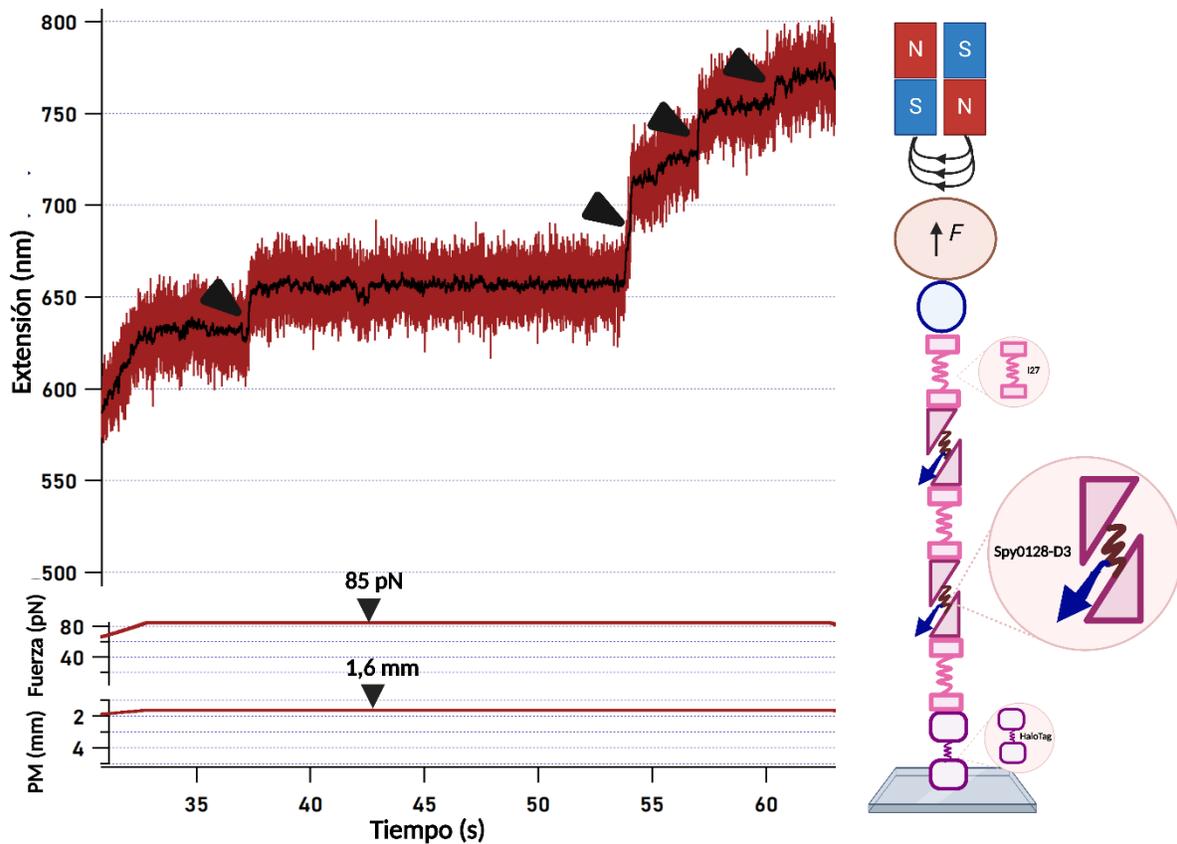


Figura 4.13 Resultados de la extensión de la proteína Spy0128 con la intervención del péptido D3 en el microscopio de pinzas magnéticas. En el costado izquierdo de la imagen se encuentra el gráfico de extensión de la proteína Spy0128+D3, obteniendo una proteína intervenida con el desplegamiento de sus respectivos reporteros de extensión y la extensión de la proteína de etiqueta HaloTag®; en la parte inferior del gráfico se encuentran las posiciones del magneto y las fuerzas ejercidas por la posición de este, por otro lado, en el costado derecho se encuentra un esquema representativo de la extensión de los dominios reporteros de la proteína intervenida.

En la **Figura 4.14 A** se presenta el histograma de posición obtenido a partir del gráfico mostrado anteriormente, generando 4 picos por cada transición de estado que generaba la esfera paramagnética cuando se desplegaba un dominio de la proteína, con el mismo orden que se comentó anteriormente, representando los datos a través de un histograma de posición con una distribución gaussiana de los datos en la parte superior y en la parte inferior solo se encuentran el histograma con la distribución gaussiana. En la **Figura 4.14 B**, se presentan los datos obtenidos a partir del histograma de posición mostrado en la **Figura 4.14 A**, como ya se mencionó anteriormente, estos datos se obtuvieron gracias

las diferentes transiciones de estado de la microesfera paramagnética, generando un pico de transición, para calcular las extensiones de los dominios se restaron los valores obtenidos de los diferentes picos de transición; entre los picos 0-1 se generó el desplegamiento de un dominio reportero I27 midiendo 25 nm de extensión, entre los picos 1-2 se desplego la proteína de etiqueta HaloTag® midiendo 57 nm, por otro lado, entre los picos 2-3 se generó una extensión de 12 nm, por último, entre los picos 3-4 y 4-5 se generó el desplegamiento de los dos últimos dominios reporteros de I27 midiendo 28 nm y 16 nm respectivamente.

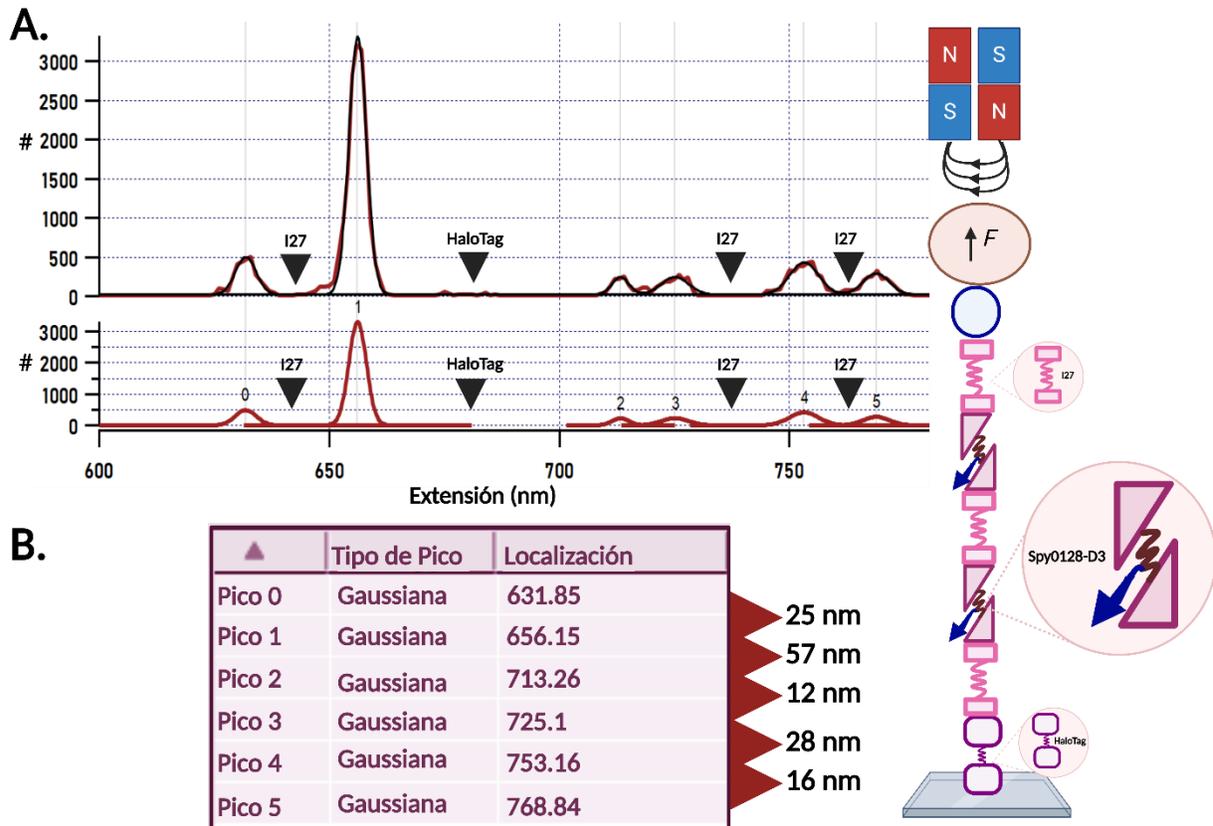


Figura 4.14 Histogramas de estado de la proteína Spy0128 intervenida con el péptido bloqueador D3. A. Histograma de estado de Spy0128+D3 obtenido a partir del gráfico de extensión de la proteína intervenida, en el eje x es la extensión (nm) y en el eje y se encuentra la cantidad de veces que la esfera paramagnética estuvo en ese estado. **B.** Tabla de datos obtenida por la transición de estado de la esfera paramagnética.

La extensión total de la proteína Spy0128+N14, mostrada en la **Figura 4.15**, fue de aproximadamente 680 nm, lo que indica que la proteína fue intervenida. Esta figura presenta 3 dominios de desplegamiento que se produjeron por la posición del magneto que fue 1.6 mm de la cámara de fluido, lo que ejerció una fuerza total de 84 pN hacía la microesfera paramagnética. El primer dominio reportero que se desplego fue un "I27" que tuvo una extensión final de 22 nm, siguiendo con una extensión de 13 nm, por último el otro dominio de "I27" que obtuvo una extensión final de 26 nm.

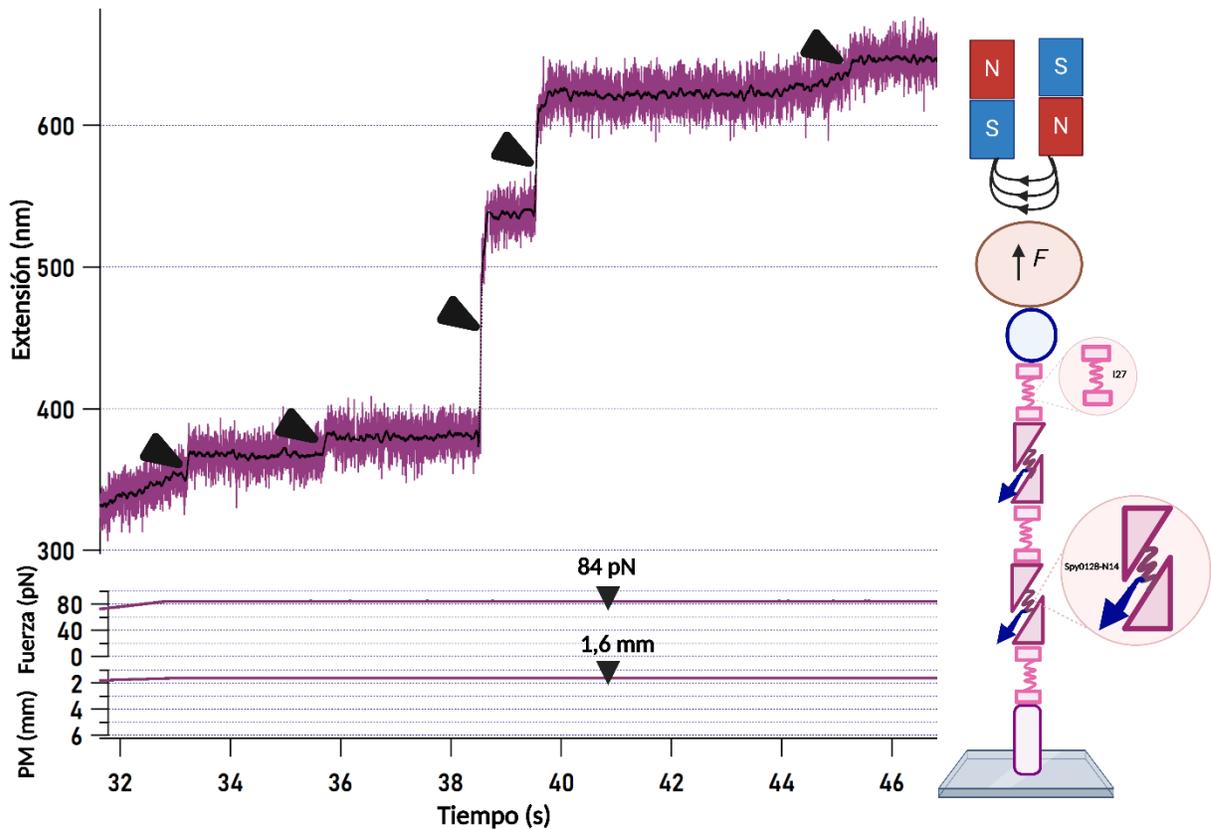


Figura 4.15 Resultados de la extensión de la proteína Spy0128 con la intervención del péptido N14 en el microscopio de pinzas magnéticas. En el costado izquierdo de la imagen se encuentra el gráfico de extensión de la proteína Spy0128+N14, obteniendo una proteína intervenida con el desplegamiento de “3” reporteros de extensión; en la parte inferior del gráfico se encuentran las posiciones del magneto y las fuerzas ejercidas por la posición de este, por otro lado, en el costado derecho se encuentra un esquema representativo de la extensión de los dominios reporteros de la proteína intervenida.

En la **Figura 4.16 A**, se presenta el histograma de posición obtenido a partir del gráfico mostrado anteriormente, generando 3 picos por cada transición de estado que generaba la esfera paramagnética cuando se desplegaba un dominio de la proteína, siendo dos dominios con una extensión asociada a los dominios reporteros “127” y un desplegamiento no claro, en la parte superior están representados los cambios de estados de la esfera en un histograma de posición generado a partir del gráfico de extensión de la proteína intervenida y en la parte inferior se encuentra el histograma con la distribución gaussiana de los datos . En la **Figura 4.16 B**, se presentan los datos obtenidos a partir del histograma de posición mostrado en la **Figura 4.16 A**, los diferentes cambios de estado o de posición de la microesfera paramagnética muestran los dominios desplegados dela proteína intervenida, estos picos se calculan igualmente como se mencionó anteriormente, entre la diferencia de los picos generados, en este caso entre el pico 0-1 se presentó un dominio reportero “127” midiendo 22 nm de extensión

final y continuando entre los picos 2-3 hubo una extensión de 13 nm, por último, otra extensión de interés fue entre los picos 4-5 que midió 26 nm de extensión concordando con la extensión de los reporteros “I27”. Hubo otros picos sin lograr asociarlos a algún dominio, solo siendo del comportamiento de la proteína intervenida.

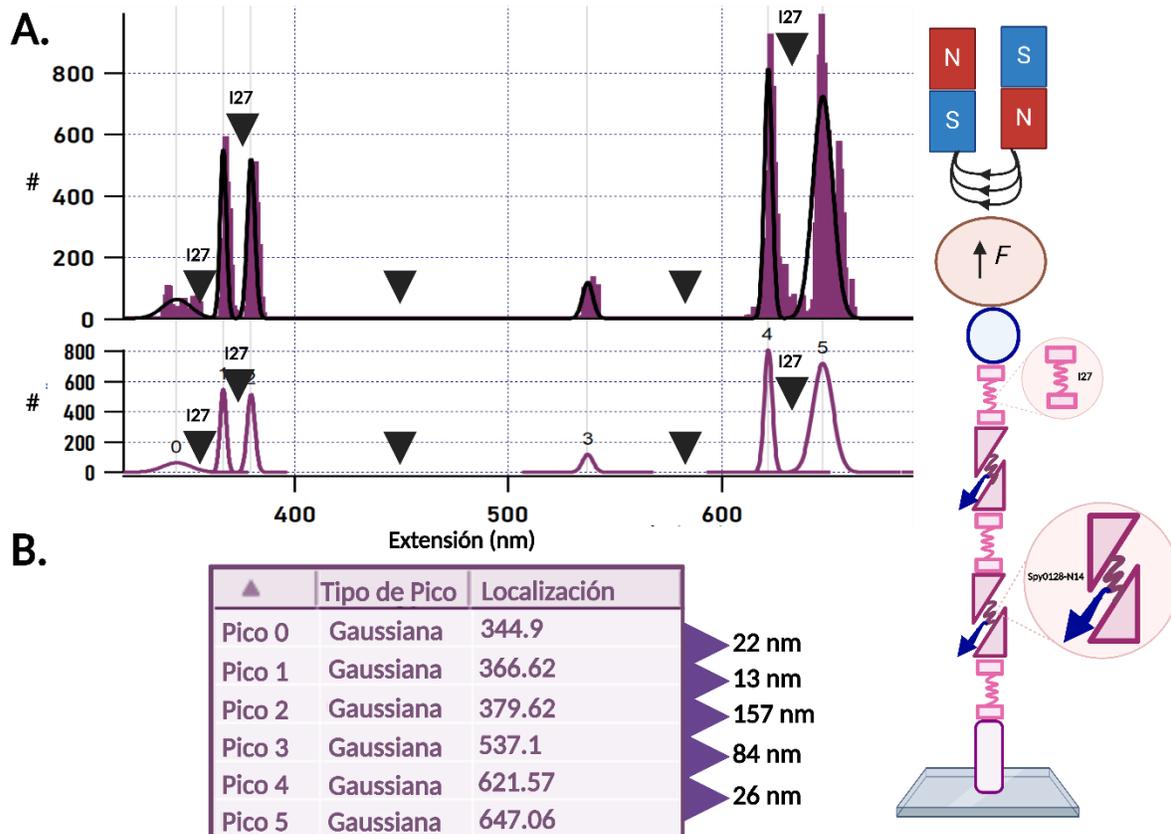


Figura 4.16 Histogramas de estado de la proteína Spy0128 intervenida con el péptido bloqueador N14. **A.** Histograma de estado de Spy0128+N14 obtenido a partir del gráfico de extensión de la proteína intervenida, en el eje x es la extensión (nm) y en el eje y se encuentra la cantidad de veces que la esfera paramagnética estuvo en ese estado. **B.** Tabla de datos obtenida por la transición de estado de la esfera paramagnética.

Por último, en la **Figura 4.18**, se presenta la proteína Spy0128 con el péptido C96, la cual muestra una intervención reflejada en una extensión final de 740 nm. El primer desplegamiento midió 51 nm ocasionado por la posición del magneto a la cámara de fluido que fue de 2,6 mm generando una fuerza de 43 pN a la microesfera paramagnética, este valor está asociado a la proteína de etiqueta HaloTag®; el siguiente desplegamiento de la proteína asociado a un dominio reportero de extensión “I27” midió 20 nm determinado por la posición del magneto que fue de 1,9 mm ejerciendo una fuerza de 60 pN en la microesfera, por último, el siguiente dominio reportero “I27” desplegado midió 27 nm de extensión ocasionado por la posición del magneto que en este caso fue 1,6 mm de la cámara de fluido ejerciendo

una fuerza de 84 pN a la microesfera. En este caso el desplegamiento de la proteína y de los dominios fue de 32 segundos en total en donde en solo 6 segundos se logró ver los dominios reporteros.

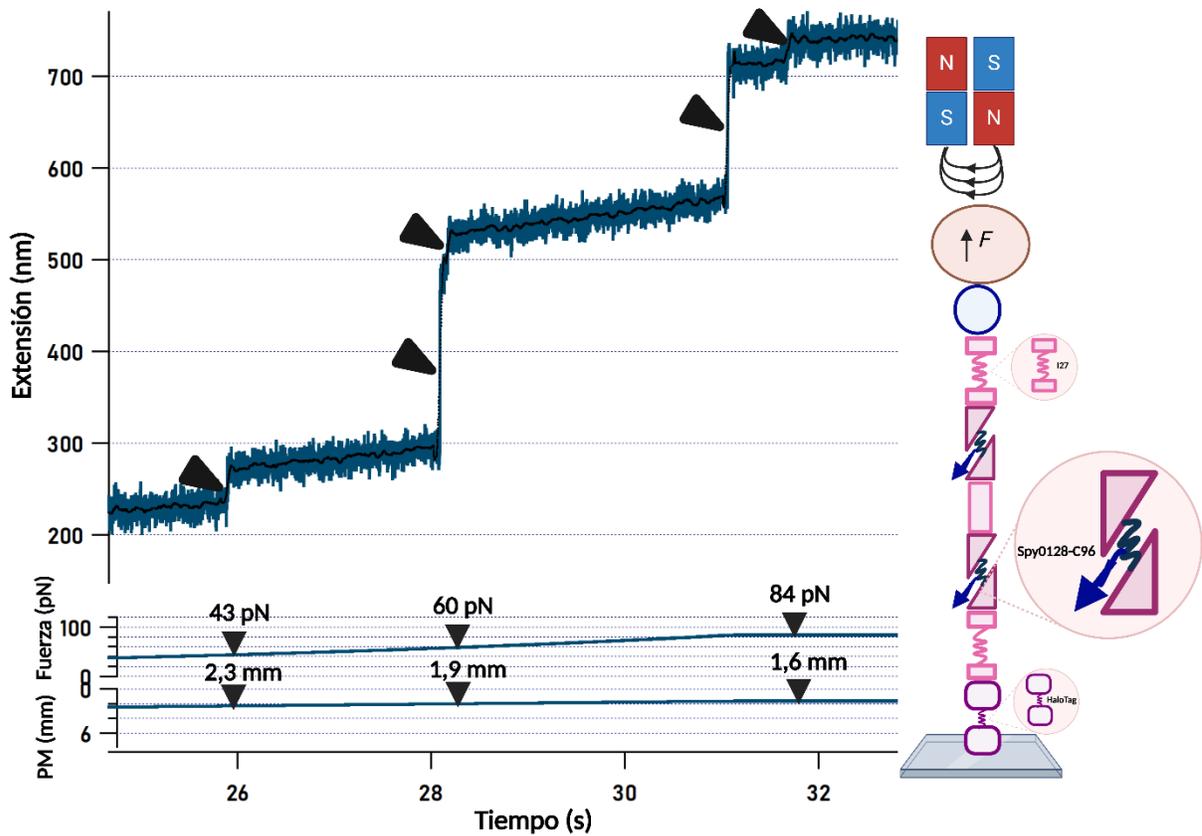


Figura 4.17 Resultados de la extensión de la proteína Spy0128 con la intervención del péptido C96 en el microscopio de pinzas magnéticas. En el costado izquierdo de la imagen se encuentra el gráfico de extensión de la proteína Spy0128+C96, obteniendo una proteína intervenida con el desplegamiento de “2” reporteros de extensión y la proteína de etiqueta HaloTag®; en la parte inferior del gráfico se encuentran las posiciones del magneto y las fuerzas ejercidas por la posición de este, por otro lado, en el costado derecho se encuentra un esquema representativo de la extensión de los dominios reporteros de la proteína intervenida.

En la **Figura 4.18 A** se presenta el histograma de posición obtenido a partir del gráfico mostrado anteriormente, generando 3 picos por cada transición de estado que generaba la esfera paramagnética cuando se desplegaba un dominio de la proteína, el primer dominio presentado en esta extensión es la proteína de etiqueta HaloTag® y los siguientes desplegamientos marcados en el histograma son los dominios reporteros “127”, en la parte inferior se encuentra el histograma con la distribución gaussiana de los datos obtenidos del gráfico. En la **Figura 4.18 B**, se presentan los datos obtenidos a partir del histograma de posición mostrado en la **Figura 4.18 A**, los diferentes cambios de estado o de posición de la microesfera paramagnética muestran los dominios desplegados de la proteína intervenida, estos picos se calculan mediante el mismo protocolo mencionado en las figuras anteriores. Entre los picos 0-

1 se encuentra la proteína de etiqueta HaloTag® midiendo 51 nm de extensión, entre los picos 2-3 se encuentra el primer dominio de "I27" midiendo 20 nm de extensión y por último, el siguiente dominio reportero "I27" se encontró entre los picos 4-5 midiendo 27 nm de extensión. Al igual que en los otros gráficos hubo otros picos sin lograr asociarlos a algún dominio, solo siendo del comportamiento de la proteína intervenida.

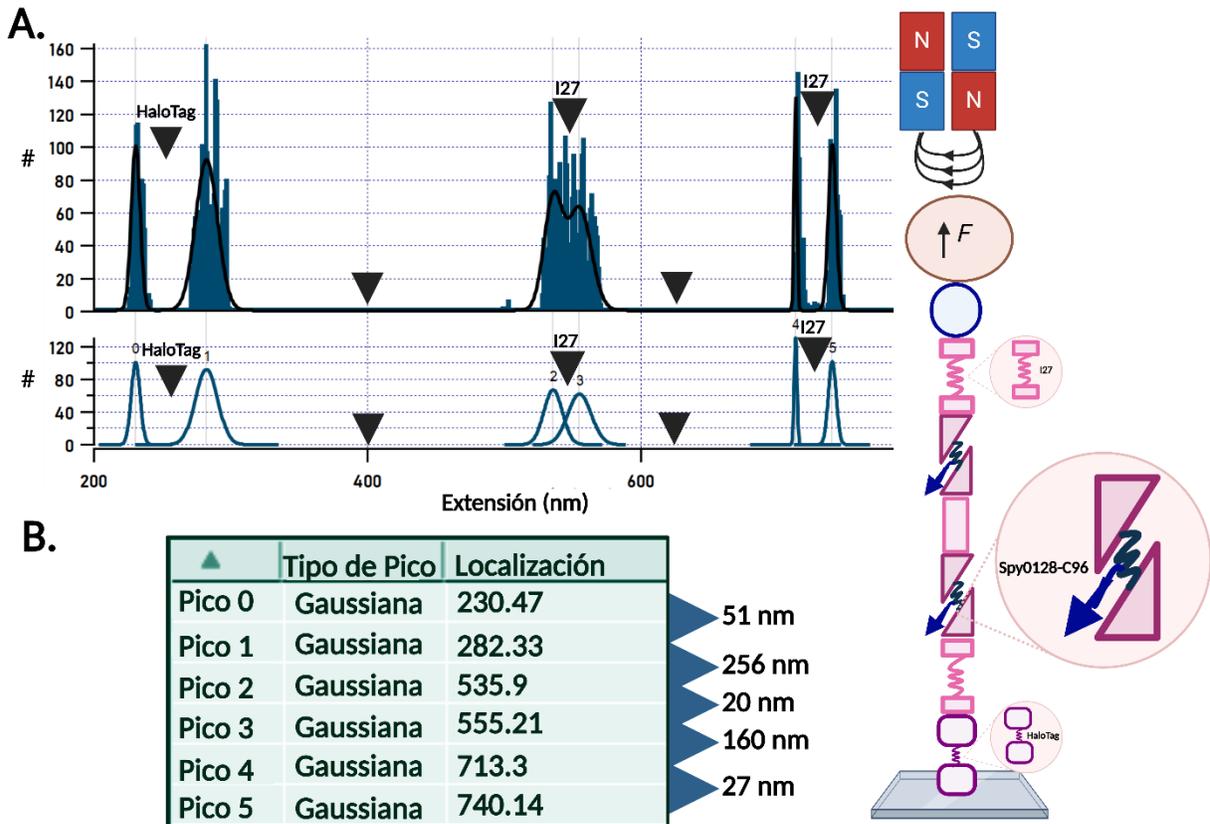


Figura 4.18 Histogramas de estado de la proteína Spy0128 intervenida con el péptido bloqueador C96. **A.** Histograma de estado de Spy0128+C96 obtenido a partir del gráfico de extensión de la proteína intervenida, en el eje x es la extensión (nm) y en el eje y se encuentra la cantidad de veces que la esfera paramagnética estuvo en ese estado. **B.** Tabla de datos obtenida por la transición de estado de la esfera paramagnética.

Tras los resultados presentado en los ensayos de elasticidad de Spy0128 llevados a cabo por medio del espectrómetro de fuerza basado en pinzas magnéticas, comprobamos el despegamiento de la proteína tanto en condiciones sin intervención como con la intervención de los péptidos bloqueadores. Esto confirma la intervención tanto del péptido control N14, ya utilizado anteriormente para intervenir el enlace isopeptídico y del péptido de interés C96, el cual fue creado a partir de herramientas computacionales. Sin embargo, los resultados obtenidos de la extensión de la proteína Spy0128 con el péptido D3--control negativo--, se confirma la acción como péptido bloqueador del enlace isopeptídico de la proteína Spy0128.

5. Discusión

A lo largo de la historia, los microorganismos han coexistido con los humanos. Si bien, muchos son necesarios para llevar a cabo procesos fundamentales, constituyéndose en componentes críticos como en nuestra microbiota, muchas de estas bacterias las asociamos a procesos fisiopatológicos. No obstante, gracias al descubrimiento y desarrollo de los antibióticos a partir de 1928, hemos logrado establecer una serie de estrategias fundamentales en la medicina llevada de la mano de estas moléculas. Actualmente, los antibióticos son ampliamente empleados para el tratamiento de enfermedades y procedimientos quirúrgicos (1,2), no obstante, una combinación de herramientas propias de los microorganismos junto al mal uso de estas moléculas ha llevado a la aparición de bacterias resistentes (10,11). Esto se ha traducido en una verdadera emergencia sanitaria, debido al bajo desarrollo de nuevos antibióticos, y la aparición cada vez más frecuente de resistencia a antibióticos.

Estos microorganismos han desarrollado sistemas complejos para poder colonizar diferentes superficies, estos sistemas complejos son conocidos como adhesinas, las cuales se encuentran expuestas en la superficie de las bacterias, reconociendo los residuos de oligosacáridos en los receptores de glicoproteínas o glicolípidos de la célula hospedera (19–21). Luego de la adhesión de la bacteria al hospedero, estos microorganismos se enfrentan una fuerza repulsiva que es causada por los mecanismos propios de la célula hospedera, y para que la bacteria se mantenga adherida utiliza estructuras filamentosas de superficie conocidas como pili, estas fibras participan en la adhesión de superficies bióticas y abióticas, la motilidad, transferencia de ADN, formación de biopelículas y también son factores de virulencia, tanto en bacterias Gramnegativas como en Grampositivas. En particular, el pili de las bacterias Grampositivas se encuentran conectadas covalentemente entre sí por medio de enlaces isopeptídicos que comunican las cadenas laterales de residuos de lisina y asparagina, lo que se traduce no solo en cambios en el plegamiento y estructura de las subunidades estructurales, sino que también en el comportamiento del pilus bajo fuerza (22,23).

Streptococcus pyogenes es un patógeno extracelular que puede causar una amplia gama de enfermedades (23,24). La adhesión de este patógeno al huésped se realiza a través del pilus, una estructura filamentosa compuesta por repeticiones de la proteína Spy0128 junto a dos proteínas accesorias, Spy125 y Spy130 que aseguran el anclaje del filamento al epitelio y pared bacteriana, respectivamente (17,39,40). Esta proteína presenta dos dominios, denominados como CnaB N- y C-

terminal, los cuales son capaces de soportar altos niveles de fuerza sin desplegarse, todo gracias a un enlace covalente presente en su dominio C terminal. Específicamente en el dominio C-terminal y en particular los residuos Asn303 y Lys179 los que forman un enlace isopeptídico que comunican la primera y última hebra beta del plegamiento, dejando sólo una pequeña porción del dominio expuesta al estrés mecánico (44,45). Esta pequeña porción del dominio disipa la fuerza mecánica, asegurando la adherencia del patógeno a la superficie del huésped sin comprometer su unión (44,49). En este contexto, hemos propuesto una estrategia basada en péptidos bloqueadores que interfieran con el enlace isopeptídico de Spy0128, específicamente atacando el enlace formado entre Asn303 y Lys179, con el objetivo de desestabilizar la conformación de la pilina y reducir, eventualmente, la capacidad de la adhesión de *S. pyogenes*.

Inicialmente el desarrollo del péptido se hizo completamente inspirado en la estructura de la proteína. En una segunda iteración se usó el pipeline RPG, elaborado localmente en el laboratorio y que consiste en una herramienta rápida y sencilla para la búsqueda de estructuras afines—acoplamiento molecular—. RPG usa una línea de trabajo que se basa en tres programas: OpenBabel, UCSF chimera y Autodock Vina. Es una plataforma eficaz para generar péptidos en cuatro pasos claves: en primer lugar, la selección del número de aminoácidos y la posición de cada uno de estos; en segundo lugar, el programa comienza a iterar cada una de las posiciones de aminoácidos escogida generando un archivo de texto que contiene cada péptido creado para en un tercer paso generar en estructuras tridimensionales utilizando UCSF chimera. Finalmente, un conjunto de péptidos es evaluados por medio de acoplamiento, que en nuestro caso en particular consisten en péptidos la proteína Spy0128, la cual previamente se ha tratado para ensayar en su bolsillo de unión de los péptidos. Cada uno de los acoplamientos realizados arrojó un valor de afinidad que es más tarde utilizado como medida de comparación para discernir que péptido es el mejor.

En este caso, se hizo la comparación con los péptidos mencionados en la metodología, el péptido N14 se compone por 19 aminoácidos “EFTDKDMTITFTNKKDAE”. Este péptido ya había sido probado como péptido bloqueador del enlace isopeptídico (17); obteniendo resultados favorables en la intervención del enlace isopeptídico de Spy0128. El péptido N14 fue creado a partir de la hebra original de la proteína Spy0128, diseñado con residuos extra en cada extremo como consecuencia de la biología molecular empleada para el diseño. En el caso de este trabajo de tesis, el análisis de afinidad en RPG solo se utilizaron los aminoácidos implicados en la cadena original de proteína, por lo tanto, los residuos y

posiciones comprendidas en el péptido “KDMTITFTNK”. Además, nuestro pipeline cuenta con una limitación, en donde el cálculo sin sesgo por arriba de 10 posiciones se encarece notablemente el tiempo de cómputo. De este modo, al evaluar el péptido N14 logramos una afinidad de -7,6 Kcal/mol, valor usado como referencial para el desarrollo de péptidos. Por otro lado, tomamos también el péptido D3, originalmente preparado por un integrante del laboratorio para la intervenir del enlace isopeptídico del dominio 3 de SpaD de la bacteria *Corynebacterium diphtheriae*. El péptido posee 7 aminoácidos “EIKNIKQ”, que, en comparación con el péptido original, obtiene bajo nuestro ensayo de acoplamiento molecular en RPG una afinidad de -7,4 Kcal/mol. Finalmente, el desarrollo y aumento de la afinidad de un péptido, se logra al ensayar de manera iterativa usando RPG. Se considerarán 10 posiciones de aminoácidos para imitar el péptido original, arbitrariamente fijando una posición de asparagina “N° 4”, e iterando las otras posiciones con los diferentes 20 aminoácidos. El péptido de mayor afinidad, obtenido en el tercer ciclo de iteración y nombrado como C96, obtuvo una afinidad de -9,0 Kcal/mol y este compuesto por los siguientes aminoácidos “QWGNMFNKWK”. Estos hallazgos preliminares nos entregaban ideas de que el péptido C96 podría ser más afín respecto a N14 y D3, por lo tanto, encontrar una mayor decoración en las proteínas Spy0128.

Una vez finalizado las simulaciones computacionales de los péptidos mencionados, trabajamos en el desarrollo del sistema de expresión de los péptidos. Para ello utilizamos el vector de expresión pBAD, posee el promotor araBAD, este es inducible por L-arabinosa siempre y cuando no exista glucosa en el medio de cultivo (50) y los diferentes péptidos bloqueadores. Para inducir el promotor, se creció la bacteria en medio mínimo M9CA (VWR) suplementado con 40 µg/ml timina, 2 mM sulfato de magnesio, 0,1 mM cloruro de calcio y 1,5% glicerol como fuente de carbono para que la bacteria logará crecer a una OD₆₀₀, para así inducir el promotor araBAD con L-arabinosa (17,50). Para confirmar la expresión de los péptidos bloqueadores, se realizaron las inducciones correspondientes a las células ya transformadas con el vector pBAD con los diferentes péptidos bloqueadores, obteniendo los resultados presentados en la **Figura 4.2**, en donde cada control negativo de inducción (-Ara) presentado confirmó que no hay una expresión basal de los péptidos bloqueadores, por otro lado, las condiciones con inducción de L-arabinosa confirmaron la expresión de los péptidos visualizando dicha expresión por la unión de la sonda fluorescente SNAP-Surface® Alexa Fluor® 488 a la proteína de etiqueta SNAP-tag®, obteniendo en la condición del péptido D3 una banda cercana a los 25 kDa, cercano al peso molecular de este péptido que es de 22,6 kDa; para la condición del péptido N14 se obtuvo una banda por arriba a la mencionada anteriormente más cercana a los 25 kDa correspondiendo a un valor cercano del peso

molecular de este que es de 23,8 kDa. Por último, en la condición con el péptido C96 se obtuvieron dos bandas; una cercana al peso molecular de este péptido que es de 23 kDa y por debajo de ella, se encuentra una banda que pudo ser provocada por la hidrólisis del péptido, la que se puede asociar al peso molecular de la proteína de etiqueta SNAP-tag® que es de 19,3 kDa. Confirmando en esta figura, el diseño y la expresión de la proteína de etiqueta en conjunto con los péptidos bloqueadores.

Luego el paso clave es ver la expresión de la proteína sin la intervención de los péptidos, para ello se utilizó el vector pFN18a **Figura 3.1**, es un vector de expresión que nos entrega gran versatilidad, gracias a sus componentes, mencionados en la metodología. Destacando las dos proteínas de etiquetas, que juegan un rol fundamental para analizar la expresión y purificación de la proteína de interés; HaloTag® por su lado, no tan solo nos sirve para lograr ver la integridad de la proteína, sino que también tiene una función específica para lograr estirar la proteína de interés, funciona como anclaje a la cámara de fluido, uniéndose al Halo Ligando funcionalizado en la cámara (51). Por otro lado, His-Tag proteína de etiqueta importante para ver la integridad del constructo y clave para el proceso de purificación, debido a que se une al ion metálico Níquel que es en este caso, y también a cobre o cobalto (52,53). En la **Figura 4.3**, confirmamos la expresión y purificación de la proteína Spy0128 obteniendo 4 bandas en los diferentes carriles de las fracciones purificadas; destacando que el peso molecular de esta proteína esta por arriba de los 130 kDa, concordando con el peso molecular del constructo que es 133 kDa, por otro lado, existe una banda clara en las tinciones con InVision y la tinción con azul de Coomassie de aproximadamente 70 kDa que pudo ser producto de hidrólisis de la proteína, teniendo en su contenido la proteína de etiqueta His-Tag.

Luego de haber confirmado la expresión de los péptidos y la proteína de interés, se realizaron coexpresiones, en primer lugar, expresando el péptido con el fin de tener una concentración alta de péptidos dentro de la bacteria, para que luego cuando se realice la expresión de la proteína, interfiera el enlace de la proteína naciente. En las **Figuras 4.4, 4.5 y 4.6** se presentaron las pruebas de coexpresión donde confirmamos la coexpresión tanto de los péptidos bloqueadores y la proteína Spy0128, en esta ocasión se cargaron los extractos crudos de las inducciones para realizar las pruebas. En las tres figuras mostradas, se visualiza una banda correspondiente a la proteína Spy0128 de aproximadamente 133 kDa y una banda correspondiente a las masas moleculares de los péptidos bloqueadores, ya mencionados anteriormente. Por otro lado, en las condiciones sin expresión de la proteína se identifica una banda correspondiente a la proteína, observando una expresión basal de Spy0128. Estos resultados

fueron clave para continuar la coexpresión de los péptidos bloqueadores con la proteína Spy0128 a gran escala para su purificación.

Transcurrida la purificación de la proteína Spy0128 coexpresada con los péptidos bloqueadores, analizamos los resultados obtenidos y presentados en las **Figura 4.7, 4.8 y 4.9**. En la **Figura 4.7** se presentó la purificación de la proteína Spy0128+D3 observando una expresión basal de Spy0128 en condiciones sin inducción de la proteína, por otro lado, en la misma imagen logramos ver en los carriles de las fracciones purificadas una banda por arriba de los 135 kDa concordando con el peso molecular de la proteína que es de 133 kDa. En el caso de una intervención por el péptido presentado, se debió observar bandas por arriba de las presentadas en la **Figura 4.7**, recordando que el peso molecular del péptido D3 es de 22,6 kDa y en el caso que hubiera intervenido un Spy0128, la proteína debería tener un peso molecular aproximado de 155,6 kDa y en el caso, de la intervención de dos Spy0128, se debería haber visto una proteína decorada a los 178,2 kDa. En la **Figura 4.7** presentada no se logró visualizar ninguna banda correspondiente a los mencionado anteriormente.

En la **Figura 4.8**, observamos la purificación de la proteína Spy0128 con el péptido N14, en la imagen podemos confirmar una expresión basal de Spy0128 en condiciones sin inducción de la proteína, pero logramos identificar en los carriles de las fracciones purificadas bandas correspondientes al peso molecular de la proteína Spy0128—133 kDa—, pero en esta ocasión en los últimos dos carriles de la **Figura 4.8** logramos obtener una banda por arriba de los 130 kDa y por debajo de los 250 kDa marcada en un rectángulo en cada una de las diferentes tinciones presentadas en la Figura. Estas bandas observadas pueden ser asociadas a proteínas intervenidas con el péptido N14—23.8 kDa—, si el péptido fue capaz de intervenir las dos Spy0128, la suma de los pesos moleculares de los constructos debió ser de aproximadamente 180 kDa concordando con el peso molecular de la banda presentada en las tres diferentes tinciones (**Figura 4.8 I. II. III.**)

Por último, en la **Figura 4.9** se presenta la purificación de la proteína Spy0128 con el péptido C96, confirmando en la figura la expresión basal de la proteína en condiciones sin inducción del constructo, por otro lado, los carriles con las fracciones purificadas se observa una banda por arriba de los 130 kDa correspondiendo al peso molecular de la proteína Spy0128—133kDa--, en esta ocasión no se logró observar bandas por arriba de los 133 kDa en la tinción con la sonda fluorescente Alexa Fluor® 488 Halo Ligando, por otro lado, en la tinción con InVision aparecen bandas decoradas por arriba de los 130 kDa

y por debajo de los 250 kDa observados también en la tinción con azul de Coomassie. Recordando que el péptido C96 tiene un peso molecular de 23 kDa y la suma en el caso de la intervención de las dos Spy0128 del constructo de la proteína deberíamos observar bandas de aproximadamente 179 kDa, asociándolas con las bandas obtenidas en la **Figura 4.9 II y III**.

En todas las **Figuras 4.7, 4.8 y 4.9**, se lograron ver múltiples bandas en las fracciones purificadas, esto puede ser porque generalmente las células eucariotes tienden a tener secuencias codificantes a histidinas, generando contaminaciones indeseada en las purificaciones (54) o hubo una hidrólisis en las proteínas purificadas; con el fin de proponer una solución en ensayos futuros se intentara optimizar la tasa de Níquel cargado en la columna y la concentración de imidazol para lograr disminuir todo tipo de contaminante. Por otro lado, en todas las condiciones mencionadas, hubo una expresión basal de las proteínas a pesar de las células competentes BL21 (DE3)pLysS se caracterizan por una alta eficiencia de expresión de proteínas y lo más importante el plásmido pLysS se encarga específicamente de codificar la lisozima T7, esta reduce los niveles de expresión basal de los genes de interés bajo el control del promotor T7, destacando que este no interfiere con el nivel de expresión alcanzando después de la inducción por IPTG (55,56).

Por último, para confirmar el peso molecular de las bandas obtenidas por arriba de los 130 kDa en las **Figuras 4.8 y 4.9**, se utilizaron unidades de filtrado Amicon 100 kDa, para concentrar las proteínas de alto peso molecular solo quedando las proteínas por arriba de los 100 kDa. Los resultados de las concentraciones se presentan en la **Figura 4.10**, donde logramos observar en las tres diferentes carriles y tinciones bandas correspondientes al peso molecular de la proteína Spy0128 –133kDa–, por otro lado, se observan bandas claras por arriba de los 130 kDa y por debajo de los 250 kDa en los diferentes carriles observados. En esta ocasión, el carril correspondiente a Spy0128 con el péptido D3 se observó una banda cercana a los 250 kDa en las tres diferentes tinciones presentadas en la **Figura 4.10**, no observada en la **Figura 4.7**, dado esto observamos una posible interrupción no deseada en nuestra proteína en la condición con nuestro péptido control. Por otro lado, en los carriles correspondientes a Spy0128 con el péptido N14 se observa claramente una proteína por debajo de los 250 kDa observada en las tres diferentes tinciones. Finalmente, en el carril correspondiente a Spy0128 con el péptido C96 se observa una banda de baja concentración por debajo de los 250 kDa en las diferentes tinciones presentadas, sin obtener un resultado parecido al mostrado en la **Figura 4.9**, en este caso se esperaba ver una banda más intensa por debajo de los 250 kDa. A pesar de concentrar solo proteínas de alto

peso molecular, hubo una contaminación de bandas por debajo de los 130 kDa, infiriendo dos razones en particular: en primer lugar, las unidades de filtrado utilizadas en este trabajo se encontraban en uso, lo que pudo conllevar a la contaminación vista en la figura y, en segundo lugar, pudo ser hidrólisis de las proteínas debido a que a través de las 3 tinciones mostradas en la figura se logran visualizar bandeos por debajo de los 130 kDa.

Tras la confirmación de una banda por arriba de los 130 kDa y por debajo de los 250 kDa presentada en la **Figura 4.10**, se llevó a cabo el análisis de desplegamiento de la proteína con y sin los péptidos bloqueadores. Para ello, se utilizó un espectrómetro de fuerza basado en pinzas magnéticas “Magnetic Tweezer”, que es una técnica de espectroscopia de fuerza y torsión de moléculas individuales, en este trabajo en particular, específicamente de proteínas. Este utiliza un campo magnético, originando a partir de imanes permanentes para atraer una partícula magnética y así estirando la biomolécula a sujeta a ella (51,57). En este caso, estiraremos la proteína Spy0128 sin la intervención de los péptidos bloqueadores, en la **Figura 4.11** y **Figura 4.12** comprobamos el desplegamiento de la proteína Spy0128, el cual alcanzó una extensión final de la proteína de 270 nm aproximadamente, en primer lugar, se presentó el desplegamiento de la proteína de etiqueta HaloTag® con una extensión final de 41 nm valor cercano obtenido en un estudio previo del dominio de esta proteína que fue de 36 nm de extensión final (58); siguiendo con la extensión de 3 dominios de I27 los cuales midieron 20 nm, 29 nm y 21 nm de extensión aplicando fuerzas de 92 pN, 97 pN y 103 pN respectivamente; estas extensiones concuerdan con estudios previos de desplegamiento del dominio inmunoglobulina investigado 27 de titina (I27) en microscopio de fuerza atómica “AFM” que a fuerzas de desplegamiento altas (200 pN) los dominios de I27 llegaban a pedir 24,76 nm de extensión (59).

Para comprobar los indicios de una posible intervención del péptido D3 mencionada anteriormente y (péptido control negativo) presentados en la **Figura 4.10**, realizamos el desplegamiento de la proteína en la condición con la expresión del péptido D3, obteniendo los resultados mostrados en la **Figura 4.13** y **Figura 4.14** podemos confirmar que el péptido D3 intervino la proteína Spy0128, debido a la extensión que de aproximadamente 810 nm, en este desplegamiento, se observó cuatro eventos correspondientes al dominio reportero I27, proteína de etiqueta HaloTag® y los otros dos dominios reporteros I27, midiendo una extensión de 25 nm, 57 nm, 28 nm y 16 nm respectivamente. A partir de los resultados obtenidos, el péptido diseñado para el dominio 3 de SpaD de la bacteria *Corynebacterium diphtheriae*, puede también interferir en el enlace isopeptídico de Spy0128 debido a la presencia de la

asparagina, a pesar de que los análisis computacionales indicaban una afinidad baja hacia el bolsillo de la proteína.

Por otro lado, para confirmar la banda obtenida en la **Figura 4.10** en la condición Spy0128 con el péptido bloqueador N14 “control positivo de la intervención del enlace isopeptídico”, se realizó el desplegamiento de la proteína Spy0128 coexpresada con el péptido N14, presentados en las **Figura 4.13** y la **Figura 4.14**, confirmando en estas figuras la intervención de Spy0128 con el péptido bloqueador. Se muestra una extensión final de la proteína intervenida de 700 nm aproximadamente, obteniendo dos eventos correspondientes a los reporteros de extensión I27 que midieron 22 nm y 26 nm. Logramos observar 3 eventos en los gráficos presentados que tuvieron extensiones de 13 nm, 157 nm, y 84 nm, los eventos con mayor extensión pueden ser asociados a proteínas intervenidas con el péptido bloqueador debido a que no se logran asociar a dominios reporteros de la proteína, por otro lado, el evento de 13 nm no se logra asociar a ningún reportero de extensión o algún evento de proteína con intervención.

Por último, para comprobar si el péptido creado a partir de RPG “C96” intervino la proteína Spy0128, se realizó desplegamiento de la proteína coexpresada, resultados mostrados en las **Figura 4.17** y la **Figura 4.18**. Tras lo visualizado en las figuras mencionadas, confirmamos la intervención de la proteína gracias a la extensión máxima obtenida que fue de 720 nm aproximadamente, donde logramos ver tres eventos correspondientes a dos reporteros de extensión I27 y la proteína de etiqueta HaloTag® logrando extensiones de 27 nm, 20 nm y 51 nm, respectivamente. Por otro lado, en el desplegamiento de la proteína se visualizó dos eventos con gran extensión con valores de 256 nm y 160 nm, sin lograr asociar estas extensiones a dominios reporteros de nuestra proteína; se sugiere que estas extensiones pueden estar relacionadas con la intervención de la proteína con nuestro péptido bloqueador. Comprobando que el péptido creado a través de herramientas computacionales, logro intervenir el enlace isopeptídico de la proteína Spy0128.

El desarrollo de una estrategia de atacar la proteína estructural proteína Spy0128 del patógeno *S. pyogenes*, genera una nueva idea para la creación de novedosas alternativas para combatir las infecciones provocadas por esta bacteria. Interferimos el enlace isopeptídico del dominio C terminal, debido a que este enlace covalente es fundamental para la rigidez mecánica de la proteína generando una proteína inextensible que soporta todas las fuerzas mecánicas ejercidas por el hospedero. A

diferencia de los antibióticos que se basan en interferir vías de síntesis, membranas, entre otras; el enfoque es atacar a la bacteria por una estrategia dirigida hacia la adhesión, siendo una alternativa que no generaría resistencia en corto plazo. Si bien la estrategia es prometedora, aún se encuentra en etapas iniciales, por lo que se necesitan más ensayos, y en especial ver cómo afecta en primer lugar a *S. pyogenes* y luego a otras bacterias.

Hemos propuesto una nueva estrategia antimicrobiana usando péptidos, que parecen ser prometedores para desarrollar nuevos tratamientos. Sin embargo, antes de avanzar en esta investigación, es importante mejorar la especificidad de estos péptidos. Por ejemplo, el péptido D3, creado para un enlace covalente con una bacteria específica, mostró actividad contra el pili de *S. pyogenes*. Aunque estos resultados son prometedores, los datos sugieren que aún hay mejorar el diseño. En particular, los péptidos diseñados con herramientas computacionales y probados en el laboratorio han mostrado ser efectivos al bloquear el enlace isopeptídico de Spy0128. Esto abre nuevas posibilidades para seguir investigando estos péptidos como posibles tratamientos para las infecciones bacterianas.

6. Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis respaldan la viabilidad de desarrollar nuevas alternativas para combatir bacterias mediante la generación de herramientas peptídicas capaces de interferir con los pili de los patógenos. Utilizando biología computacional, se identificaron los primeros candidatos para simular las interacciones péptido-proteína. Posteriormente, se validaron estos péptidos a través de biología molecular, logrando desarrollar un sistema de expresión para los péptidos utilizando el vector pBAD, y para la proteína de interés con el vector pFN18a-HaloTag®, cada uno de ellos con Tags para el seguimiento del péptido y proteína. Este enfoque facilitó la detección en geles de acrilamida y confirmó la coexpresión de péptidos y proteínas mediante el uso de sondas fluorescentes. Además, el microscopio equipado con pinzas magnéticas fue fundamental para confirmar la intervención de la proteína por los péptidos bloqueadores.

A partir del estudio realizado en esta tesis, concluimos que se acepta la hipótesis, ya que se logramos diseñar péptidos a través de herramientas computacionales capaces de interferir con el enlace isopeptídico entre Lys179—Asn303 de la proteína Spy0128. A pesar de que los rendimientos de decoración y formación del enlace intermolecular péptido-proteína pueden ser bajos, se confirmó el aumento de masa y decoración fluorescente— en ensayos de electroforesis en geles de poliacrilamida SDS—y por el aumento de la extensibilidad de Spy0128—ensayos mecánicos—. Sorprendentemente, el péptido D3 no diseñado para la intervención específica, también logra decorar e intervenir la proteína Spy0128, lo que sugiere que es necesario revisar más profundamente el diseño de los péptidos. Probablemente, existan propiedades fisicoquímicas universales en el desarrollo de estas estructuras, las cuales deban ser consideradas para futuros diseños.

En resumen, nuestros resultados entregan bases fundamentales para el diseño y expresión de péptidos que intenten interferir con el mecanismo de adhesión de bacterias basados en filamentos tipo pili. La biología computacional ofrece una alternativa al desarrollo puramente racional, considerando las propias características de proteínas. No obstante, es probable que existan otras alternativas para favorecer la formación de un complejo proteína-péptido, que además busque y fomente la formación de un enlace isopeptídico intermolecular. El actual advenimiento de otras herramientas computacionales, tales como AlphaFold o RosettaFold, pueden ofrecer una guía más adecuadas para el desarrollo de péptidos bloqueadores.

7. Implicancias y Proyecciones

El diseño de péptidos bloqueadores presentados en esta tesis podría abrir el camino para el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de infecciones bacterianas. Enfocándonos específicamente en la adhesión y elasticidad bacteriana—primeras etapas de la colonización—diseñando péptidos que interfieran con proteínas del mecanismo adhesión, la investigación en dos proyectarse en dos grandes caminos: optimización del diseño y ensayos de biológicos de unión.

En primer lugar, es crucial optimizar el diseño de los péptidos bloqueadores para asegurar que su interferencia sea específica al enlace isopeptídico de *Streptococcus pyogenes*. Aunque nuestros resultados demostraron la efectividad de estos péptidos en Spy0128 de *S. pyogenes*, se necesita evaluar el potencial de impacto en otras proteínas de bacterias patogénicas. Nuestra estrategia se basa en aumentar la afinidad péptido-proteína, por medio de sustituciones en la secuencia manteniendo la capacidad de formación del enlace isopeptídico intermolecular. No obstante, se hace necesario confirmar que este arreglo de péptidos no interfiera con otros mecanismos de adhesión, presente en otras bacterias incluyendo Grampositivas, que forman parte de la microbiota natural.

Por otro lado, el proyecto debe necesariamente transitar hasta ensayos de unión donde se evalué la efectividad de los péptidos en la adhesión bacteriana, por ejemplo, sobre monocapas de células epiteliales. Específicamente se deben considerar múltiples concentraciones y cuantificar cualquier efecto adverso que tiene el tratamiento de los péptidos sobre las células. Esto nos permitirá confirmar la eficacia del péptido y establecer su viabilidad para posibles estudios en animales.

Finalmente, la fase clave de este proyecto consistirá en ensayos preclínicos destinados a evaluar la prevención de infecciones y enfermedades causadas por *S. pyogenes* utilizando estos péptidos bloqueadores. Todo esto para determinar si estos péptidos pueden ser desarrollados como una opción terapéutica, marcando un avance significativo en la biotecnología aplicada a la lucha contra patógenos bacterianos.

8. Referencias

1. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. septiembre de 2010;74(3):417-33.
2. Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol*. junio de 1929;10(3):226-36.
3. Adedeji WA. THE TREASURE CALLED ANTIBIOTICS. *Ann Ib Postgrad Med*. diciembre de 2016;14(2):56-7.
4. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharm Ther*. abril de 2015;40(4):277-83.
5. Muteeb G, Rehman MT, Shahwan M, Aatif M. Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals*. 15 de noviembre de 2023;16(11):1615.
6. Resistencia a los antibióticos: la necesidad de soluciones globales - *The Lancet Infectious Diseases* [Internet]. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(13\)70318-9/abstract](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(13)70318-9/abstract)
7. Spellberg B, Gilbert DN. The Future of Antibiotics and Resistance: A Tribute to a Career of Leadership by John Bartlett. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 de septiembre de 2014;59(Suppl 2):S71-5.
8. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol*. 1 de octubre de 2019;51:72-80.
9. Camargo Rubio RD. Bioética prescripción antibiótica y resistencia bacteriana. *Acta Colomb Cuid Intensivo*. 1 de octubre de 2023;23(4):363-9.
10. Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol*. mayo de 2016;14(5):320-30.
11. Huemer M, Shambat SM, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence — Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep* [Internet]. 12 de diciembre de 2020;21(12). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7726816/>
12. Antimicrobial resistance [Internet]. Disponible en: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>
13. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
14. CDC. Antimicrobial Resistance. 2024 About Antimicrobial Resistance. Disponible en: <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/about/index.html>
15. Los costos de la Resistencia Antimicrobiana y los beneficios de reducirla | Actualidad | semFYC [Internet]. Disponible en: <https://www.semfyec.es/actualidad/costos-amr-ram-happypatient-antibioticos-semfyec>

16. World Bank [Internet]. Para 2050, las infecciones resistentes a los medicamentos podrían causar daños económicos similares a los de la crisis financiera de 2018. Disponible en: <https://www.bancomundial.org/es/news/press-release/2016/09/18/by-2050-drug-resistant-infections-could-cause-global-economic-damage-on-par-with-2008-financial-crisis>
17. Rivas-Pardo JA, Badilla CL, Tapia-Rojo R, Alonso-Caballero Á, Fernández JM. Molecular strategy for blocking isopeptide bond formation in nascent pilin proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 de septiembre de 2018;115(37):9222-7.
18. Vaca DJ, Thibau A, Schütz M, Kraiczy P, Happonen L, Malmström J, et al. Interaction with the host: the role of fibronectin and extracellular matrix proteins in the adhesion of Gram-negative bacteria. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2020;209(3):277-99.
19. Proft T, Baker EN. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 27 de octubre de 2008;66(4):613.
20. Berne C, Ducret A, Hardy GG, Brun YV. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbiol Spectr*. agosto de 2015;3(4):10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015.
21. Craig L, Volkmann N, Arvai AS, Pique ME, Yeager M, Egelman EH, et al. Type IV Pilus Structure by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography: Implications for Pilus Assembly and Functions. *Mol Cell*. 1 de septiembre de 2006;23(5):651-62.
22. Kline KA, Fälker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B. Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host Microbe*. 18 de junio de 2009;5(6):580-92.
23. Hirose Y, Yamaguchi M, Sumitomo T, Nakata M, Hanada T, Okuzaki D, et al. Streptococcus pyogenes upregulates arginine catabolism to exert its pathogenesis on the skin surface. *Cell Rep* [Internet]. 30 de marzo de 2021 [citado 3 de septiembre de 2024];34(13). Disponible en: [https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247\(21\)00238-2](https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247(21)00238-2)
24. Bessen DE. Population Biology of the Human Restricted Pathogen, Streptococcus pyogenes. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. julio de 2009;9(4):581-93.
25. Amigdalitis estreptocócica: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000639.htm>
26. Impétigo: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000860.htm>
27. Celulitis: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000855.htm>
28. Fiebre reumática: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/003940.htm>

29. Actualización en fascitis necrotizante | Seminarios de la Fundación Española de Reumatología [Internet]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-seminarios-fundacion-espanola-reumatologia-274-articulo-actualizacion-fascitis-necrotizante-S1577356611001205>
30. Síndrome de shock tóxico: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000653.htm>
31. Avire NJ, Whiley H, Ross K. A Review of Streptococcus pyogenes: Public Health Risk Factors, Prevention and Control. Pathogens. febrero de 2021;10(2):248.
32. Artola CB, Solorzano NG, Matamoros DO. Fiebre reumática: actualización de los criterios diagnósticos. Rev Medica Sinerg. 1 de febrero de 2020;5(2):e357-e357.
33. Tetay Salgado S, Rodríguez Cárdenas YA, Ruiz Mora GA. Fascitis necrotizante de origen odontogénico: revisión de literatura y reporte de caso. Rev Cient Odontol. 2017;780-8.
34. Parra Caballero P, Pérez Esteban S, Patiño Ruiz ME, Castañeda Sanz S, García Vadillo JA. Actualización en fascitis necrotizante. Semin Fund Esp Reumatol. 1 de abril de 2012;13(2):41-8.
35. DIPRECE [Internet]. División de Prevención y Control de Enfermedades. Disponible en: <https://diprece.minsal.cl/>
36. Instituto de Salud Pública de Chile [Internet]. [citado 3 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://www.ispch.gob.cl/boletin/>
37. Cunningham MW. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. Clin Microbiol Rev. julio de 2000;13(3):470-511.
38. M Protein - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/m-protein>
39. Abbot EL, Smith WD, Siou GPS, Chiriboga C, Smith RJ, Wilson JA, et al. Pili mediate specific adhesion of Streptococcus pyogenes to human tonsil and skin. Cell Microbiol. 2007;9(7):1822-33.
40. Relationship of M protein genes in group A streptococci. - PMC [Internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC397365/>
41. Raz A, Tanasescu AM, Zhao AM, Serrano A, Alston T, Sol A, et al. Streptococcus pyogenes Sortase Mutants Are Highly Susceptible to Killing by Host Factors Due to Aberrant Envelope Physiology. PLoS ONE. 20 de octubre de 2015;10(10):e0140784.
42. Cunningham MW. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. Clin Microbiol Rev. julio de 2000;13(3):470-511.
43. Group A Streptococcus produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens | PNAS [Internet]. Disponible en: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0507808102>
44. Kang HJ, Coulibaly F, Clow F, Proft T, Baker EN. Stabilizing Isopeptide Bonds Revealed in Gram-Positive Bacterial Pilus Structure. Science. 7 de diciembre de 2007;318(5856):1625-8.

45. Wang B, Xiao S, Edwards SA, Gräter F. Isopeptide Bonds Mechanically Stabilize Spy0128 in Bacterial Pili. *Biophys J.* 7 de mayo de 2013;104(9):2051-7.
46. Alegre-Cebollada J, Badilla CL, Fernández JM. Isopeptide Bonds Block the Mechanical Extension of Pili in Pathogenic *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem.* 9 de abril de 2010;285(15):11235-42.
47. Biais N, Ladoux B, Higashi D, So M, Sheetz M. Cooperative Retraction of Bundled Type IV Pili Enables Nanonewton Force Generation. *PLoS Biol.* abril de 2008;6(4):e87.
48. Solovyova AS, Pointon JA, Race PR, Smith WD, Kehoe MA, Banfield MJ. Solution structure of the major (Spy0128) and minor (Spy0125 and Spy0130) pili subunits from *Streptococcus pyogenes*. *Eur Biophys J.* 1 de febrero de 2010;39(3):469-80.
49. Alegre-Cebollada J, Badilla CL, Fernández JM. Isopeptide Bonds Block the Mechanical Extension of Pili in Pathogenic *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem.* 9 de abril de 2010;285(15):11235-42.
50. Siegele DA, Hu JC. Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proc Natl Acad Sci.* 22 de julio de 1997;94(15):8168-72.
51. Single-molecule magnetic tweezers to probe the equilibrium dynamics of individual proteins at physiologically relevant forces and timescales | *Nature Protocols* [Internet]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41596-024-00965-5>
52. Waugh DS. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol.* 1 de junio de 2005;23(6):316-20.
53. Bornhorst JA, Falke JJ. [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol.* 2000;326:245-54.
54. Priestersbach A, Kubicek J, Schäfer F, Block H, Maertens B. Chapter One - Purification of His-Tagged Proteins. En: Lorsch JR, editor. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 2015 p. 1-15. (Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part D; vol. 559). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687914000688>
55. Oakley JL, Coleman JE. Structure of a promoter for T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci.* octubre de 1977;74(10):4266-70.
56. Davanloo P, Rosenberg AH, Dunn JJ, Studier FW. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* abril de 1984;81(7):2035-9.
57. An Introduction to Magnetic Tweezers | *SpringerLink* [Internet]. Disponible en: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-3377-9_18
58. Aubin-Tam ME, Olivares AO, Sauer RT, Baker TA, Lang MJ. Single-molecule protein unfolding and translocation by an ATP-fueled proteolytic machine. *Cell.* 15 de abril de 2011;145(2):257-67.

59. Altered mechanical properties of titin immunoglobulin domain 27 in the presence of calcium | European Biophysics Journal [Internet]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00249-012-0875-8>