

INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades Infecciosas

La definición del concepto de “Enfermedad” que entrega la Real Academia Española (RAE) es “Estado producido en un ser vivo por la alteración de la función de uno de sus órganos o de todo el organismo”(1). Es decir, una enfermedad es cualquier condición que impida el correcto funcionamiento de un órgano, psique o del organismo como un todo, con causas que pueden ser tanto internas como externas(2). Se le conoce como causa interna, a todas las causas o desórdenes que provengan del hospedero que impidan el correcto funcionamiento del cuerpo, como lo son factores genéticos o hereditarios. Por otro lado, todas las causas externas como su nombre lo menciona, se define como todo lo que no provenga del hospedero, pero que sí afecte el funcionamiento del cuerpo, estos pueden ser diversos factores como picaduras de insectos, bacterias, hongos, virus e incluso polvo(3-5).

La mayoría de las enfermedades infecciosas son usualmente causadas por microorganismos(6). Estas enfermedades se catalogan dependiendo de qué agente es el causante de la enfermedad y a su vez por el daño o respuesta que genera este en el hospedero. Los agentes más comunes causantes de las enfermedades son las bacterias, virus, hongos y parásitos que pueden transmitirse entre personas(7). Todo microorganismo que sea capaz de causar una enfermedad es llamado patógeno, y estos patógenos al ser agentes externos buscan una forma de ingresar al organismo para poder así causar la enfermedad, las rutas que usualmente escogen para ingresar al organismo son mediante la boca, ojos, nariz o la piel. Al lograr ingresar al organismo, los patógenos causan diversos daños en tejidos del cuerpo y este daño se produce debido a interrupciones del patógeno o por medio de procesos metabólicos de ellos, ya que estos pueden secretar enzimas o toxinas que dañan al órgano o sistema, estas secreciones pueden afectar no solo a un órgano, sino que también pueden dañar a más de uno o a tejidos circundantes que a largo plazo puede provocar un daño mayor en el organismo.

El cuerpo humano posee un sistema especializado en resguardar la integridad homeostática del cuerpo censando constantemente el estado del cuerpo mismo(8). Sin embargo, no solo realiza dichas funciones, sino que este sistema llamado sistema inmunológico, es una red compleja entre tejidos, células y órganos que no solo se encargan de velar el buen funcionamiento del cuerpo, sino también cumple la función de proteger y actuar frente a una amenaza externa(9-10).

Como se mencionó anteriormente, una de las características fisiológicas del sistema inmune es la defensa, la cual es compleja y versátil. A su vez, existen diversos tipos de respuestas inmunes, entre estas están la respuesta inmune innata y la adaptativa(11). En primer lugar, la respuesta inmune innata es esencial para protegerse contra un antígeno durante las primeras horas de la infección, por el contrario, hay respuestas que se desencadenan cuando el cuerpo se ve expuesto constantemente a distintos antígenos, por lo que el organismo ya se encuentra preparado con diferentes medidas para reaccionar a este tipo de infecciones, esta definición corresponde a la respuesta inmune adaptativa, la cual en sí es más especializada(12).

La respuesta del sistema inmune frente a un patógeno comienza con el reconocimiento de un antígeno que intenta ingresar o afectar al organismo. Este es reconocido mediante receptores presentes en las barreras físicas como la piel y mucosas, las cuales se activan causando inflamación en la zona afectada(13). La inflamación es un gatillante del sistema inmunológico, debido a que este es el primer paso de una serie de eventos que involucran distintos procesos biológicos para lograr lidiar con una amenaza, este proceso permite una respuesta focalizada en la zona afectada, además de facilitar la llegada de células inmunitarias lo que genera una respuesta específica ante algún antígeno(14).

Pese a la alta capacidad de manejo que posee el sistema inmune a amenazas externas, este no es perfecto. Existen distintos factores que pueden afectar la eficacia de la respuesta inmune, estos factores pueden ser intrínsecos o extrínsecos, en los primeros se encuentra la edad, estrés, estado fisiológico entre otros, y en los factores extrínsecos se encuentran la estación del año, la temperatura, etc(15). Es por esto, que no depende netamente de la capacidad de infección que posea el patógeno a la hora de infectar al huésped, ya que sumado a esto este posee mecanismos que le permiten adaptarse, evadir al sistema inmune y facilitar la infección del hospedero.

Como se ha descrito en la literatura, todos los tejidos y órganos del cuerpo son susceptibles a infecciones. Se ha observado que algunos de ellos se encuentran más expuestos que otros, entre los cuales se encuentran los pulmones, órgano esencial del sistema respiratorio, el cual se encuentra constantemente expuesto al exterior, debido a que en ellos ocurre el intercambio gaseoso que permite que ingrese oxígeno a la sangre y se expulsa dióxido de carbono(16). El sistema respiratorio comienza en la nariz y boca, descendiendo por la laringe hasta la faringe, donde después este se divide en bronquios izquierdo y derecho, donde cada uno de estos está compuesto de bronquiolos y alveolos, estos últimos son pequeños sacos de aire que se encuentran rodeados de vasos capilares y

son los principales efectores del intercambio gaseoso. Debido a la gran exposición que comprende el sistema respiratorio, este es más susceptible a ser afectado por enfermedades respiratorias, siendo las más comunes influenza, bronquitis, neumonía y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) entre otras(17).

1.2 Neumonía

La neumonía es una enfermedad respiratoria de carácter infeccioso que ocasiona inflamación en el tejido pulmonar(18). En esta enfermedad los alvéolos acumulan líquido o pus, por lo que la persona se ve afectada con diversos síntomas y signos como lo son tos con flema, fiebre, escalofríos y dificultad para respirar. La neumonía puede ser causada por diferentes patógenos, como lo son bacterias, virus u hongos y puede ser adquirida dentro de la comunidad donde reside la persona o directamente en un hospital o centro asistencial. Por otro lado, esta enfermedad puede ser aún más grave en personas mayores, niños pequeños y personas con sistemas inmunológicos debilitados. Se ha registrado que solo en el año 2019 fallecieron 2,5 millones de personas a causa de neumonía en el mundo, y cerca de 600.000 fueron niños menores de 5 años.

NÚMERO DE MUERTES 2019

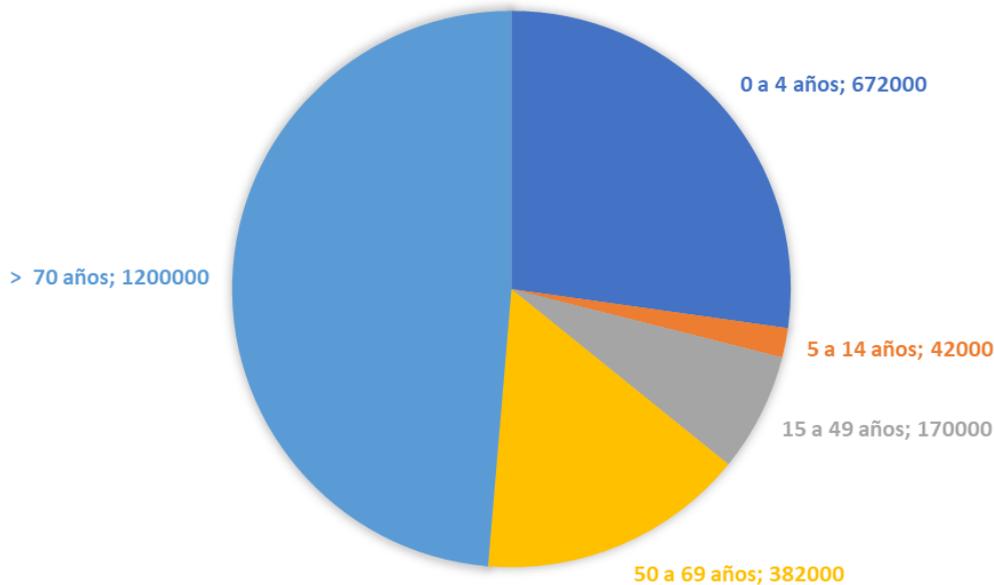


Figura 1: Gráfico comparativo con diferentes edades y las muertes asociadas a neumonía de cada uno de estos rangos etarios durante el 2019(19).

La neumonía bacteriana es una infección grave de los pulmones que surge después de una gripe o resfriado que no se trató debidamente o que empeora a lo largo del tiempo. Diferentes

bacterias pueden causar esta enfermedad, dentro de ellas la más común es *Streptococcus pneumoniae* o también llamado neumococo y en el caso de los virus, el que más habitualmente causa neumonía es el virus de la gripe.

1.2.1 *Streptococcus pneumoniae*

Dentro de las bacterias Gram positivas, se encuentran organismos capaces de generar enfermedades invasoras. Su nombre proviene de su capacidad por presentarse en sitios estériles, tales como, bacteriemia, meningitis, empiema, endocarditis, artritis(20-21). Además de ello, estas bacterias son altamente resistentes a antibióticos como la penicilina(22).

Uno de estos organismos es *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) la cual es una cocácea que se presenta como diplococo, es anaerobia facultativa y pertenece al grupo viridans (grupo que reúne tanto *Streptococcus* alfa hemolíticos y no hemolíticos con más de 30 especies descritas), gracias a estas propiedades es capaz de mejorar su crecimiento con una fuente de catalasa como los eritrocitos(20-23). Los polisacáridos de su pared celular contienen los factores de virulencia, y se considera al ser humano como su principal reservorio, no obstante, esta bacteria puede utilizar de hospederos a otros mamíferos domésticos. Normalmente se puede encontrar tanto en mucosa nasal como en mucosa faríngea. En la actualidad se conocen más de 90 serotipos de *S. pneumoniae*, pero los que tienen mayor impacto clínico y son responsables del 80 % las infecciones neumocócicas invasoras son doce: serotipo 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 18, 19 y 23.

Las enfermedades causadas por este neumococo contemplan, otitis media, neumonía, sinusitis, meningitis, endocarditis, artritis séptica, peritonitis y bacteriemia, convirtiendo a esta bacteria en una importante causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial(24). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, anualmente se producen 500.000 muertes en niños menores de 5 años a causa de enfermedad neumocócica, así también, este agente se ubica entre las dos primeras causas de meningitis bacteriana en niños y jóvenes(24). En Estados Unidos, se estiman 1 millón de casos anuales de neumonía neumocócica con un 5 a 7 % letalidad, siendo aún mayor frente a enfermedades invasoras como sepsis o meningitis y a pesar de la amplia disponibilidad de antibióticos y vacunas, fallecen 1,5 millones de personas en todo el mundo(25).

1.3 Principales tratamientos y resistencia a antibióticos

Como se mencionó anteriormente, las personas más susceptibles a este tipo de enfermedades son niños menores a 5 años, a su vez de adultos mayores y personas inmuno

comprometidas o con el sistema inmune debilitado. Debido a esto, es que se toman medidas preventivas para minimizar el contagio o la posibilidad de verse afectado con esta bacteria. Una de las formas de prevención en contra de este patógeno son mediante vacunas que se aplican en ciertas edades, en las cuales las personas son más vulnerables a dicho patógeno. Como se observa en la Figura 2, se puede ver el calendario de vacunación del año 2023 que es entregado por el ministerio de salud (MINSAL) en Chile. En él se puede visualizar que la primera vacuna preventiva contra *S.pneumoniae* para menores de 5 años se aplica entre los 2 y 4 meses, la cual se llama Neumocócica conjugada y luego existe una vacuna para ser aplicada a los 6 y 12 meses respectivamente.

VACUNACIÓN DEL LACTANTE		
EDAD	VACUNA	PROTEGE CONTRA
Recién Nacido	BCG	Enfermedades invasoras por <i>M. tuberculosis</i>
	Hepatitis B	Hepatitis B
2 y 4 meses	Hexavalente	Hepatitis B, Difteria, Tétanos, Tos Convulsiva, Enfermedades invasoras por <i>H. influenzae</i> tipo b (Hib), Poliomieltis
	Neumocócica conjugada	Enfermedades invasoras por <i>S. pneumoniae</i>
	Meningocócica recombinante (inicio segundo semestre)	Enfermedades invasoras por <i>N. meningitidis</i> (serogrupo B)
6 meses	Hexavalente	Hepatitis B, Difteria, Tétanos, Tos Convulsiva, Enfermedades invasoras por <i>H. influenzae</i> tipo b (Hib), Poliomieltis
	Neumocócica conjugada*	Enfermedades invasoras por <i>S. pneumoniae</i>
12 meses	SRP	Sarampión, Rubéola y Parotiditis
	Meningocócica conjugada	Enfermedades invasoras por <i>N. meningitidis</i> (A, C, W, Y)
	Neumocócica conjugada	Enfermedades invasoras por <i>S. pneumoniae</i>
18 meses	Hexavalente	Hepatitis B, Difteria, Tétanos, Tos Convulsiva, Enfermedades invasoras por <i>H. influenzae</i> tipo b (Hib), Poliomieltis
	Hepatitis A	Hepatitis A
	Varicela	Varicela
VACUNACIÓN DEL ADULTO		
Embarazadas desde las 28 semanas de gestación	dT _p (acelular)	Difteria, Tétanos, Tos Convulsiva
Personas mayores de 65 años y más	Neumocócica polisacárida	Enfermedades invasoras por <i>S. pneumoniae</i>

Figura 2: Calendario de vacunación , entregado por el MINSAL, en el cual se pueden ver las vacunas que se aplican para prevenir el contagio con *S.pneumoniae*, y las etapas en las cuales estas son aplicadas(26).

La siguiente etapa de vacunación contra *S. pneumoniae* es para personas mayores a 65 años. Se puede observar que, entre la primera etapa y esta, no existe otra vacuna preventiva contra este patógeno. Si bien las vacunas administradas en los primeros años de vida ayudan a generar memoria inmunológica contra este patógeno, las personas siguen siendo susceptibles a infectarse con él pero

en menor medida que las personas no vacunadas y cuando la infección ocurre en cualquiera de los dos casos, el tratamiento más comúnmente utilizado son los antibióticos.

Los antibióticos principalmente empleados para tratar este patógeno son los betalactámicos. Su mecanismo de acción implica la inhibición de la formación de la pared bacteriana, afectando directamente al peptidoglicano de dos formas, primero afectando la última parte de la formación de este, la transpeptidación y la segunda forma es activando la autolisina endógena, la cual degrada el peptidoglicano(27). Estos antibióticos son llamados bactericidas parciales, ya que actúan durante el crecimiento bacteriano y son tiempo dependiente, lo que quiere decir que su efectividad está estrictamente relacionada con la concentración de antibiótico presente, por lo que la ingesta de estos antibióticos a sus correctas horas es un punto esencial que hay que tomar en consideración en su tratamiento.

Uno de los problemas que existen en la actualidad con diversos antibióticos, es el excesivo uso de estos. Al ingerir antibióticos de forma exagerada, las bacterias o patógenos que son susceptibles a estos comienzan a generar una resistencia que dificulta aún más combatirlos. Una de las causas de esta resistencia, sucede por la mala o deficiente ejecución del tratamiento y del empleo de estos antibióticos(28-29). Si se exponen constantemente estos patógenos a un ambiente hostil donde se encuentre presente un antibiótico betalactámico como lo es la amoxicilina, pero no se alcance a llegar a la concentración necesaria para que dicho antibiótico haga efecto, solo se estimula una respuesta adaptativa por parte de la bacteria, lo que a posterior se puede transformar en una resistencia. Algunos estudios indican que las cepas más resistentes usualmente se encuentran presentes en niños, ya que *S. pneumoniae* es un patógeno que se encuentra naturalmente en la zona nasofaringe, debido a esto se han realizado estudios para comprobar cómo han evolucionado las capacidades de resistencia de este patógeno, indicando que, en el año 2000, el 60% de los neumococos era susceptible, un 20 % tenía una resistencia intermedia y 20% era totalmente resistente a betalactámicos(30).

1.4 Método de adhesión de *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae, posee la capacidad de colonizar personas sanas y ser completamente asintomático. Es un importante precursor de enfermedad neumocócica y se ha evidenciado que los serotipos que con frecuencia producen infección son los mismos identificados en la mayoría de los portadores sanos (25). Asimismo, la transición de portación a enfermedad se encuentra condicionada por

múltiples factores de riesgo como la edad, condiciones inflamatorias, área geográfica, situación socioeconómica, genética y sistema inmunitario (31).

No solo los factores de virulencia asociados a su serotipo son cruciales en el proceso de colonización al hospedero, sino que también es de gran relevancia la capacidad de este microorganismo de anclarse al huésped usando apéndices proteicos alargados y flexibles llamados Pili. Los Pili pueden cumplir con el rol de establecimiento de la infección, transferencia de ADN, adhesión a la matriz extracelular y formación de biopelículas. Además, en Gram positivos, los Pili consisten en un esqueleto formado por múltiples copias unidas covalentemente de una pilina principal a la que se asocian pilinas menores.

El Pili de *S. pneumoniae* viene dado por un elemento genético llamado *rlrA*, que codifica siete genes requeridos para la formación de este complejo proteico, el elemento regulador *rlrA*, la pilina que forma la columna vertebral (*RrgB*), una adhesina (*RrgA*), una pilina menor (*RrgC*) y tres sortasas (*SrtC-1*, *SrtC-2*, *SrtC-3*)(32-34). Los Pili poseen la capacidad de adherirse a las vías respiratorias, así como también a células epiteliales, interactuando con proteínas como colágeno, fibronectina y laminina(35). Es importante considerar que en ocasiones *RrgB* no se encuentra presente pero *RrgA* es capaz de compensar exitosamente su ausencia(36).

RrgA, está constituido por 893 aminoácidos, que alberga cuatro dominios, uno de ellos con el dominio de integrina de unión a colágeno y tres dominios tipo inmunoglobulina, que se estabilizan a través de enlaces isopeptídicos. Por otro lado, las pilinas menores están involucradas en el anclaje del polímero de Pilus al peptidoglicano, en el proceso de adhesión al huésped. Así mismo, pilina mayor y menor poseen una estructura modular común que también se encuentra estabilizado por enlaces isopeptídicos, por lo que se puede resumir que *RrgA*, *RrgB* y *RrgC* se ven estabilizados por el mismo tipo de interacción. Sus estructuras cristalográficas se aprecian en la figura 3.

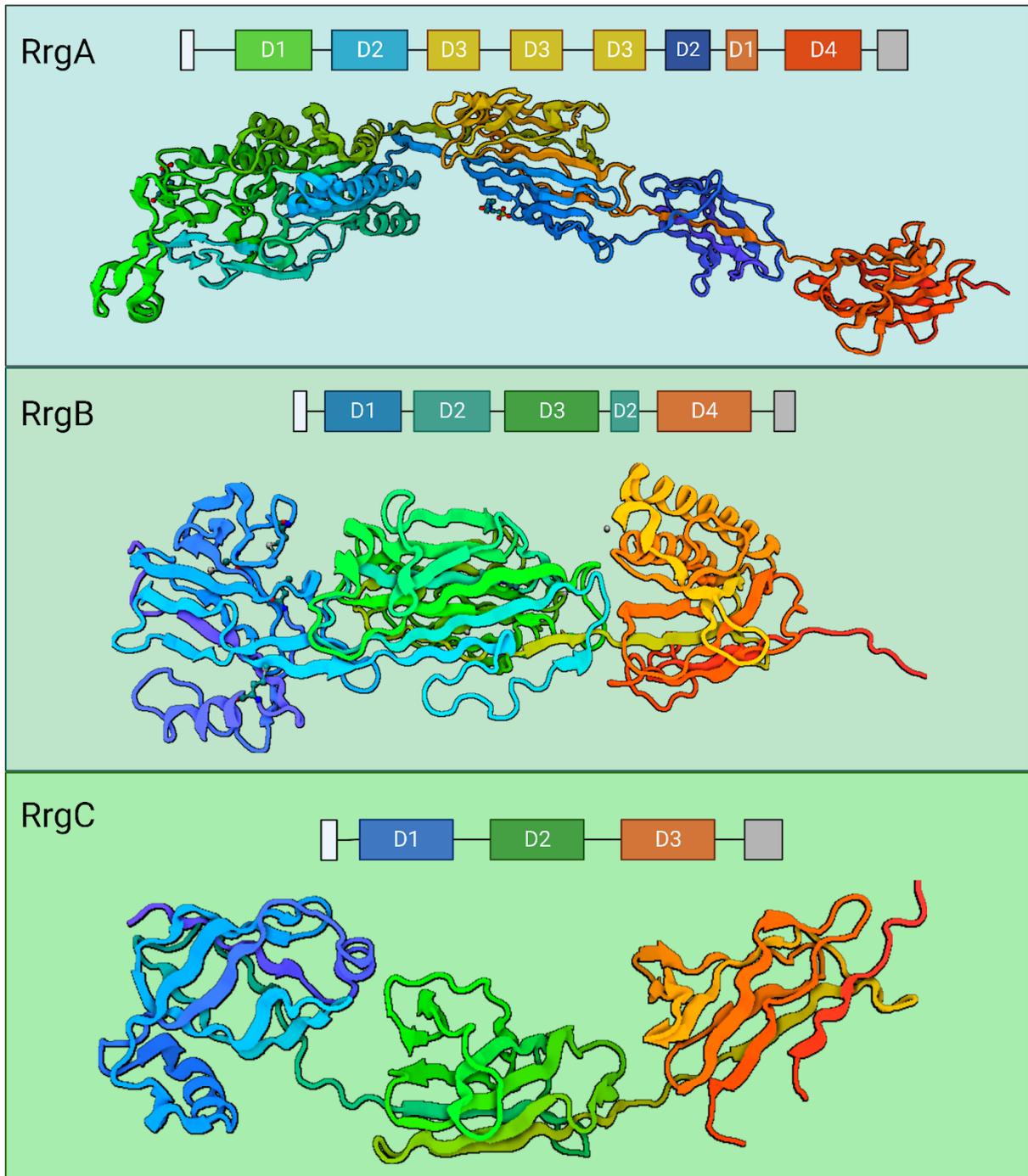


Figura 3; representación de los tres pili, RrgA (2WW8) pili menor con adhesina, RrgB (2Y1V) y RrgC pilus menor que se ancla a los peptidoglicanos (4OQ1) (37-39).

Con los antecedentes anteriores, se destaca que tanto los pili mayores y menores contienen enlaces isopeptídicos, capaces de unirse al tejido. Pero aún en la actualidad se desconoce cuánta fuerza es capaz de soportar cada uno de ellos y si los enlaces que contiene RrgB (Pilus mayor con más unidades repetidas) son más estables mecánicamente que los de las menores RrgA y RrgC. La

estabilidad mecánica, es un factor de interés por diversas razones, entre ellas, la capacidad del huésped a través de acciones fisiológicas como la tos de liberar el organismo al medio e infectar a otros, así como también contener parte de la estructura tridimensional, la que impide la acción de proteasas. Por otro lado, al conocer cuál es más o menos resistente, puede dar luces de un foco de interés farmacéutico para el diseño de péptidos miméticos capaces de interferir con la formación de estos enlaces.

1.4.1 Enlaces isopeptídicos

La capacidad estabilizadora que posee RrgB, está dada por los enlaces isopeptídicos que se encuentran en cada uno de sus 4 dominios. Además, la formación de esta cadena solamente se logra por el enlace peptídico encontrado en el D1, debido a que este funciona como ancla permitiendo que 2 unidades de rrgB puedan adherirse entre sí. En otro aspecto, cabe destacar como se conlleva la formación de este tipo de enlaces, estos enlaces intramoleculares son observados en bacterias Gram Positivas y se constituyen comúnmente por un residuo de lisina y un residuo de asparagina, en conjunto a un residuo de aspartato, siendo este el cual cumple la función de aminoácido catalítico permitiendo la formación del enlace propiamente tal. En esta proteína se encuentra un enlace peptídico en cada uno de los dominios D1, D2, D3 y D4, específicamente entre Lys 41-Asn 184 (D1), Lys 193-Asn 318 (D2), Lys 349-Asn 428 (D3) y Lys 453-Asn 623 (D4). Estos enlaces son similares a los encontrados en proteínas involucradas en el *pili* de otros microorganismos como SspB de *Streptococcus gordonii* y Ag I/II de *Streptococcus mutans* donde el átomo NZ de la lisina y el átomo CG de la asparagina, se unen en una reacción que libera amonio(40-41). Los enlaces isopeptídicos de RrgB cumplen la función de unir de manera covalente las cadenas presentes en cada uno de sus dominios, lo que le brinda gran estabilidad estructural a la proteínas y como se mencionó anteriormente, el enlace presente en el D1 posee la función de ancla, la cual mantiene estable cola IPQTG de una proteína RrgB y el D1 de la siguiente proteína como se puede ver en la Figura 4.

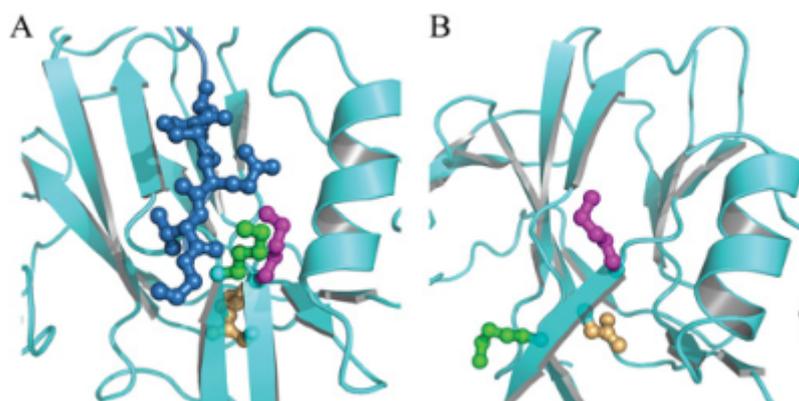


Figura 4: Esquematación del reordenamiento de las cadenas del dominio D1 cuando se encuentra presente la cola IPQTG, se ve Lys 183 y Lys 162 de color verde y magenta (traducir del paper).

Si bien, no están totalmente descritas las funciones que poseen los enlaces isopeptídicos dentro de *S.pneumoniae*, se pueden extrapolar ciertas características que estos poseen en otras bacterias como lo es *Streptococcus pyogenes*. Se ha descrito que algunas de estas características conllevan una mejoría en la resistencia a temperaturas, ya que se ha demostrado que cuando estas proteínas son expuestas a temperaturas estas se despliegan, pero cuando esta posee enlaces isopeptídicos la temperatura requerida para desplegarla aumenta. En cualquier caso, la presencia de estos enlaces isopeptídicos sigue presentando una serie de beneficios para la bacteria, ya sea estructural, adaptativo o preventivo frente a distintos cambios en temperatura o con respecto a fuerzas que impidan o dificulten la colonización de esta al hospedero o lugar al cual ella se deba adherir.

1.5 Descripción de la propuesta

El interés por el área de investigación que conlleva el desarrollo de péptidos anti-adhesivos ha aumentado de gran manera en vista a generar nuevos tratamientos de enfermedades causadas por bacterias, considerando el gran aumento de bacterias multirresistentes a diversos antibióticos que existen hoy en día. Una investigación que fue realizada por Rivas-Pardo JA y cols. en la que se utilizó como modelo de estudio *Streptococcus pyogenes*, demostró que la elaboración de moléculas peptídicas que bloquean la formación del enlace isopeptídico de esa bacteria, hacen posible interrumpir las cualidades mecánicas del *pilus*(42). Esta afirmación fue comprobada con un análisis de molécula individual, en donde se observó que la molécula que posee esta adhesina intervenía presentaba una mayor elongación en comparación a la silvestre, lo que se puede interpretar como un cambio radical en las propiedades mecánicas de estas proteínas a causa de verse expuestas a un esfuerzo mecánico externo.

Si bien el estudio antes mencionado aborda de buena forma las propiedades necesarias para demostrar el comportamiento de dichas proteínas a un esfuerzo mecánico externo, estos mecanismos no podían explicar ni entender de manera más precisa lo que sucedía mientras esta fuerza era aplicada, lo cual si se piensa en retrospectiva es una limitante bastante grande para poder entender el “todo” de este proceso que se lleva a cabo. En cambio con los nuevos equipos y programas es posible diseñar un ambiente idóneo para poder ver en tiempo real que sucede con estas proteínas al ser sometidas a una fuerza, utilizando simulaciones moleculares que son capaces de detectar el más mínimo cambio en la estructura de la proteína, permitiendo así una mejor

comprensión de estos eventos que ocurren en milésimas de segundos y que el estudio antes mencionado no pudo observar.

A continuación, y utilizando una serie de herramientas *in silico* se diseñaron y evaluaron diversos péptidos que poseen la capacidad de unirse a uno de los dominios presentes en la proteína RrgB de *S.pneumoniae*, con tal de poder intervenir la formación natural del enlace peptídico presente entre las cadenas laterales de lisina y asparagina del dominio D1 de esta proteína. El desarrollo de este péptido está basado en los principios existentes de intervención molecular, es decir, entorpecer y/o intervenir un proceso asociado al metabolismo o fisiología de un microorganismo, mediante el uso de pequeñas moléculas, en este proceso en específico es la formación del enlace isopeptídico.

El péptido será desarrollado en base a estructuras provenientes de la proteína a intervenir, el cual luego será evaluado por medio de herramientas *in silico*. Intentando así imitar y optimizar la conformación que tiene la hebra beta complementaria que forma este enlace, buscando de esta manera una molécula que posea una mayor estabilidad y afinidad que su contraparte silvestre.

Este proceso conlleva dos grandes pasos, siendo el primero determinar mediante literatura cuál dominio presenta mayor importancia en la proteína RrgB, ubicar al enlace isopeptídico de este y diseñar un péptido que posea una mayor afinidad que el péptido silvestre. Luego de ello comienza el segundo proceso, el cual comprende la intervención de la proteína con dicho péptido previamente diseñado y posteriormente contrastar como su adhesión afecta la estabilidad de esta, mediante el uso de distintos programas de análisis.

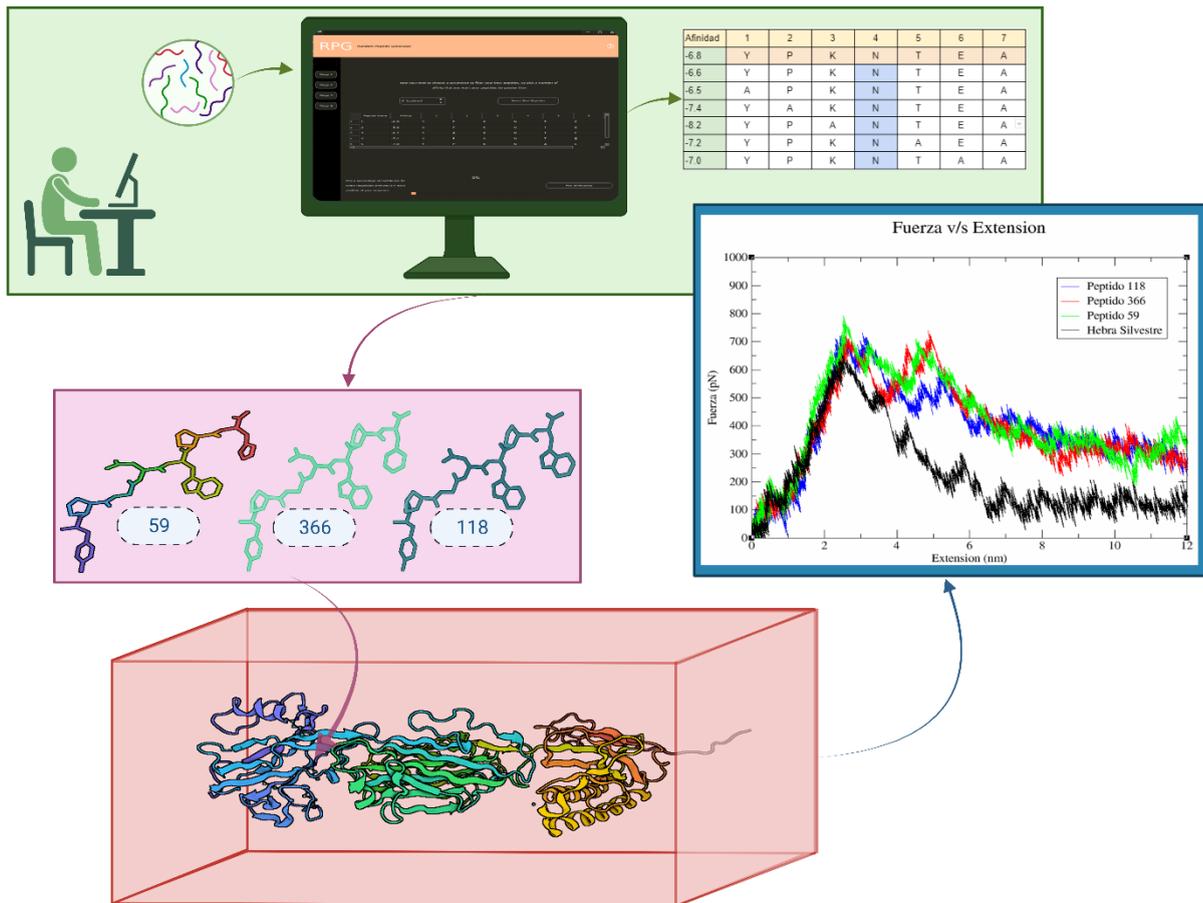


Figura 5: Resumen gráfico de la tesis realizada.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.1 Hipótesis

“El uso de péptidos que imitan estructuras nativas del dominio D1 impiden la formación del enlace isopeptídico y modifican así la elasticidad de RrgB”

1.2 Objetivos

- **General:**

- “Desarrollar herramientas basadas en péptidos para afectar la elasticidad del dominio D1 de RrgB de *S. pneumoniae*”
- **Específicos:**
 - Desarrollar y evaluar péptidos bloqueadores de enlaces isopeptídicos para RrgB por medio de acoplamiento molecular de
 - Estudiar la mecánica de la proteína RrgB en presencia y ausencia del péptido bloqueador usando simulación molecular

MATERIALES Y MÉTODOS

Material utilizado

1.1.1 Software empleados:

- Campos de fuerza oplsAA y SIRAH: Los campos de fuerza utilizados representan un conjunto de fórmulas matemáticas y parámetros proteicos usado para simulación *in silico* de biomoléculas (43).
- Editor de texto Geany: Editor multipropósito usado para leer archivos de texto independiente del formato (44).

- Editor de texto Kate: Editor utilizado para el reemplazo de múltiples términos de manera simultánea (45).
- GROMACS: Software de uso libre usado para la simulación dinámica de biomoléculas (46).
- Herramienta de trazado de gráficos XMGRACE: Programa de graficado en 2D que permite la fácil visualización de gráficos de línea e histogramas (47).
- Microsoft Office Excel versión 2021: Herramienta usada para análisis a partir de grandes cantidades de datos (48).
- PyRx Autodock Vina: Programa de acoplamiento molecular y estudio de interacciones proteína – proteína (49).
- Python versión 3.10: Lenguaje de programación usado para automatizar ciertas tareas (50).
- Sistema operativo Linux 20.4
- Sistema Operativo Windows 10
- UCSF Chimera: Programa de visualización tridimensional interactiva que permite hacer predicciones de estructuras peptídicas (51).
- Visual Molecular Dynamics (VMD): Programa de visualización molecular para representar y analizar dinámicas moleculares (52)
- Visualizador molecular Pymol: Visualizador multi plataforma de macromoléculas (53).
- OpenBabel: Herramienta que permite convertir, analizar o guardar datos relacionados con modelamiento molecular, bioquímica o áreas afines(54).

1.1.1 Equipos:

- Unidad de procesamiento de cálculos de alto rendimiento (WALL-E):
 - SAMSUNG SSD 980 PRO 1TB M.2 2280 PCI-Express 4.0 x4 NVMe 1.3c Samsung V-NAND MZ-V8P1T0B/AM
 - AMD Ryzen 9 5950X 4.9GHz Turbo 16Core 32 Hilos 105W TDP Pci-e 4.0 Zen 3
 - CORSAIR DDR4 32GB 3200Mhz Vengeance RGB Pro 2x 16GB CMW32GX4M2D3200C18
 - ASUS ROG Strix GeForce RTX 3080 10GB GDDR6X
- Unidad de procesamiento de cálculos de alto rendimiento (EVA):
 - SAMSUNG SSD 980 PRO 1TB M.2 2280 PCI-Express 4.0 x4 NVMe 1.3c Samsung V-NAND MZ-V8P1T0B/AM
 - AMD Ryzen 7 5800X 4.7GHz Turbo 8Core 16 Hilos 105W TDP Pci-e 4.0 Zen 3

- o G.Skill RipjawsV F4-3200C16S-16GVK (1 x 16GB | DIMM DDR4-3200)
- o ASUS ROG Strix GeForce RTX 3080 12GB GDDR6X OC EVA Edition

Metodología

Preparación de la proteína.

En primer lugar, para lograr modificar la estructura elástica de la proteína utilizando un péptido diseñado desde cero, se buscó la proteína RrgB del pili de *Streptococcus pneumoniae* en una base de datos que contiene toda la información estructural de esta. Este repositorio, conocido como Protein Data Bank o PDB por sus siglas en inglés(55), permite la descarga en distintos formatos que se necesite para trabajar con ellas. Luego, se descargó el modelo cristalográfico de la adhesina RrgB en dicha base de datos, bajo el código de 2y1v en un formato “.pdb”, se cargó en el visualizador molecular Pymol y se observó que la unidad asimétrica presente en el cristal se encontraba repetida 3 veces la sección que incluye los cuatro dominios D1, D2, D3 y D4 de la proteína RrgB, además de otros componentes como iones. La presencia de dichos componentes pueden interferir en la correcta realización tanto de la dinámica molecular, como de la creación del bolsillo o en sí del péptido mismo, por lo que esta debió ser sometida a una limpieza estructural para conservar sólo una de las estructuras de la proteína RrgB.

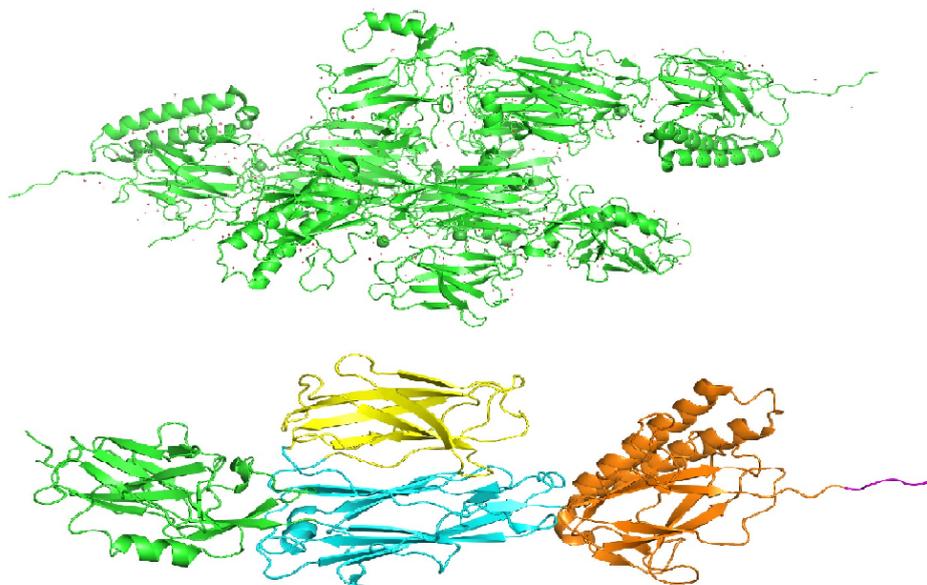


Figura 6: Comparación antes y después de limpiar la proteína, en la imagen superior se observa más de una cadena, además de presentar iones, en cambio en la imagen inferior se ve la proteína RrgB con sus dominios identificados, D1 (verde), D2 (celeste), D3 (amarillo), D4 (naranja) y la cola IPQTG (magenta).

Se procedió a eliminar todas las cadenas innecesarias para este trabajo dejando así solo una. Después, se identificaron los cuatro dominios que componen a esta proteína denominados D1, D2, D3 y D4 con la posición de sus respectivos enlaces isopeptídicos, las cuales corresponden a Lys 41-Asn 184, Lys 193-Asn 318, Lys 349-Asn 428 y Lys 453-Asn 623. Luego de haber identificado los componentes necesarios, se creó un archivo “.pdb” nuevo que contiene solo una de estas estructuras, este archivo se encuentra ubicado espacialmente en un plano XYZ, no obstante, para facilitar su uso en las dinámicas moleculares que se ejecutarán en el próximo objetivo, este archivo debió ser alineado en uno de estos ejes. Para esta ocasión, se alineó con el eje Z en base a su centro de masa mediante el Visualizador molecular VMD, utilizando las líneas de comandos que se pueden observar en la Figura 7.

```
$all writepdb pan.pdb
$all moveby [vecinvert [measure center $all]]
measure center $all (este comando sirve para ver si esta bien centrado, el valor debe ser cero o "e" elevado a algo)
$all moveby { 0 0 0}
$all move [transaxis y 0] -> probar hasta orientar al eje z
$all writepdb l10_limpia_centrada_Z.pdb
```

Figura 7: Comandos utilizados para centrar la proteína utilizando el visualizador molecular VMD, paso fundamental para la ejecución tanto de RPG como de programas posteriores.

Diseño del péptido.

Para comenzar con el diseño del péptido, se determinó cuál dominio presente en la proteína era el más importante, ya que de esta forma se puede generar un mayor efecto contra la estabilidad de la proteína y por ende a su capacidad de adhesión. Posteriormente, se determinó que el dominio D1 era el más importante, debido a que este interactúa con una cola de 5 aminoácidos denominada IPQTG que se encuentra después del D4. Ambas partes, tanto el dominio D1 como la cola IPQTG, poseen un rol importante en la estabilidad de la proteína, esto sucede cuando esta cola ingresa en el dominio D1, causando una reorganización de las cadenas de este dominio, provocando que la lisina y la asparagina se acerquen, permitiendo así la formación del enlace isopeptídico(37).

Luego de haber determinado que dominio poseía una mayor importancia en la estabilidad estructural, se utilizó la función mutagénesis del programa Pymol para así poder romper el enlace isopeptídico. Esto se logró mutando la asparagina Asn 184 por otro aminoácido, luego se guardó este cambio y posteriormente se volvió a mutar dicho aminoácido con una asparagina, si bien

estructuralmente hablando no hubo un cambio en los aminoácidos, el programa no detectó el enlace isopeptídico. Esto permitió mover las cadenas de la proteína utilizando la función de sculpting, con ello se creó un bolsillo dejando expuesta la lisina Lys 41, determinando el largo necesario del péptido para así facilitar la unión de este con la dicha lisina, además de identificar la cadena complementaria, que será la base del péptido. Luego, se determinó que el largo ideal para el péptido creado era de siete aminoácidos, por lo que tomando como referencia la cadena complementaria se obtuvo el péptido original YPKNTEA, este se formó tomando a cada lado desde la asparagina tres aminoácidos.

Al ya conocer cuál es el péptido original, se debió determinar qué cambios se podrían realizar para que este sea mejor. Para poder realizar cambios y comparaciones entre ellos se utilizó un programa llamado Random Peptide Generator (RPG), el cual fue desarrollado por uno de los miembros del laboratorio, este software es más sencillo y rápido de utilizar para el usuario, ya que un varios programas con características únicas en una interfaz más simplificada, estos programas son OpenBabel, UCSF chimera y Autodock Vina.

En vista de encontrar o diseñar un péptido mejor que el original se dió inicio al proceso de diseño. Primero se determinó la importancia de cada aminoácido y su respectiva posición, para poder así entender cómo la posición y el tipo de aminoácido afecta la afinidad final de dicho péptido. Para lograr esto, se realizó un escaneo de alaninas, de esta manera se logró observar de forma sencilla cómo cada posición en el péptido afecta de manera directa la afinidad de este. Este escaneo consta en reemplazar con una alanina cada posición en el péptido, generando así un péptido por cada iteración, es decir, se generaron 6 péptidos como se ve en la Tabla 1, esto debido a que la asparagina no se reemplaza, ya que esta es la que forma el enlace isopeptídico.

Y	P	K	N	T	E	A	Original
A	P	K	N	T	E	A	Primera posición
Y	A	K	N	T	E	A	Segunda posición
Y	P	A	N	T	E	A	Tercera posición
Y	P	K	N	A	E	A	Cuarta posición
Y	P	K	N	T	A	A	Quinta posición
Y	P	K	N	T	E	A	Sexta posición

Tabla 1: Representación del escaneo de alaninas desde el péptido original, donde se ve una formación de “escalera” de las alaninas utilizadas, mostrando como este aminoácido es utilizado para reemplazar cada posición sin tomar en cuenta la cuarta posición que corresponde a la asparagina.

Todos estos análisis se realizaron en el programa RPG, este posee una interfaz que funciona con diferentes etapas, en la primera se decide el largo del péptido que se requiere, luego se seleccionan los aminoácidos que pueden ir en cada una de las posiciones que están previamente determinadas por el largo elegido y posteriormente se escogen los aminoácidos de una lista completa con 20 aminoácidos distintos. Al finalizar la selección, el programa comienza a iterar cada una de las posiciones generando así un péptido nuevo por cada aminoácido probado en dicha posición, es decir, si se modifica solo una posición del péptido utilizando los 20 aminoácidos existentes, se obtienen 20 péptidos con esa posición modificada con cada uno de esos aminoácidos. Finalmente, en esta etapa se genera un archivo de texto llamado List.txt que contiene cada uno de los péptidos anotados con los aminoácidos que los componen.

1	YPYNWPG
2	YPENWPR
3	YPNNWPP
4	YPMNWPD
5	YPCNWPP
6	YPSNWPS
7	YPINWPD
8	YPNNWPV
9	YPQNWPV
10	YPVNWPC
11	YPMNWPK
12	YPWNWPT
13	YPHNWPC
14	YPTNWPP
15	YPDNWPH
16	YPMNWPY
17	YPMNWPC
18	YPCNWPS
19	YPWNWPL
20	YPYNWPL

Figura 8: Extracto del archivo obtenido en el primer paso de RPG, denominado List.txt donde se anotan todos los péptidos generados aleatoriamente, tomando en cuenta los aminoácidos seleccionados para cada una de las distintas posiciones.

La segunda etapa de RPG obtiene los péptidos escritos desde el archivo List.txt y los convierte a estructuras tridimensionales utilizando UCSF chimera. Sin embargo, el requerimiento computacional no permite procesar una gran cantidad de péptidos de una sola vez, por lo que realizando algunas pruebas se determinó que 400 era un número procesable, esto quiere

decir que se pueden modificar de a dos posiciones por vez, si es que en ambas se seleccionan los 20 aminoácidos disponibles.

Luego de tener los péptidos ya procesados por Chimera, se llevó a cabo la tercera etapa de RPG, en donde se probó el acoplamiento molecular de cada uno de estos péptidos con una proteína objetivo. Dicha proteína debe tener un bolsillo previamente creado para simular un lugar donde estos péptidos pueden unirse, por lo cual se creó un archivo de configuración para determinar la flexibilidad que tendrán estos péptidos para poder unirse al bolsillo. Este proceso, se ejecutó con la

ayuda de Autodock Vina, cada uno de los acoplamientos entregó un valor de afinidad que después es utilizado como medida de comparación, para así poder discernir que péptido es el mejor.

Una vez finalizada la tercera etapa, se obtienen archivos que contienen una lista con todas las afinidades obtenidas de cada uno de los acoplamientos realizados, y se selecciona en RPG que valor de afinidad se quiere observar. Además de poder ver qué aminoácidos son los que más se repiten en cada posición, cada uno de estos archivos se pueden descargar y convertir a excel para facilitar su comparación, como se puede apreciar en la Figura 9.

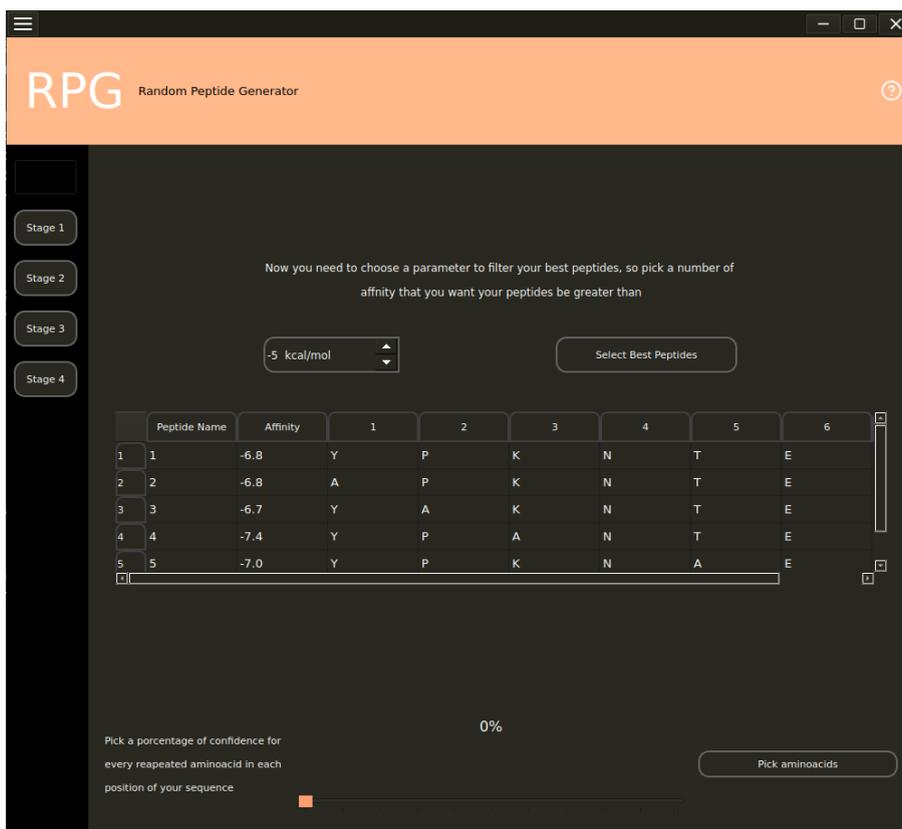


Figura 9: Etapa 4 del programa RPG, donde se pueden visualizar los mejores péptidos obtenidos seleccionando previamente un nivel de afinidad determinado, pudiendo así clasificar y posteriormente descargar solo los resultados requeridos para este análisis.

Luego de terminar de comparar los resultados de afinidad y a su vez determinar qué aminoácidos son los que más se repiten en las posiciones modificadas, estos se seleccionan y posteriormente se deciden otras dos posiciones a modificar para así repetir el proceso que conlleva las cuatro etapas de RPG. Se seleccionan los resultados anteriores y se comienza desde este paso, de esta manera se puede modificar el péptido con 2 aminoácidos a la vez hasta llegar a un péptido que obtenga una afinidad mucho mayor al péptido original.

X	X	X	N	X	X	X	Original
X	T	A	N	X	X	X	Primer Cambio
Y	T	A	N	E	X	X	Segundo Cambio
Y	T	A	N	E	N	X	Tercer Cambio

Tabla 2: Explicación de cómo se eligen los aminoácidos y cómo estos van modificando los péptidos hasta llegar a formar el mejor péptido posible en cuanto a afinidad.

Como se puede ver en la Tabla 2, se comenzó con un péptido original en el cual se modificaron dos posiciones cada vez que se ejecutó RPG. Luego se eligió el aminoácido que más se repite entre todos los resultados, modificando así el péptido para obtener un péptido con una mejor afinidad que el original, el cual es el objetivo principal de esta investigación.

Luego de seleccionar el péptido que posee la mejor afinidad, se dio paso al uso de otros programas mediante los cuales se comprobó tanto la estabilidad como la viabilidad de este péptido, de esta forma, se corroboró la decisión de utilizar este péptido. Se utilizaron distintos programas para realizar esta validación, dentro de ellos se utilizó el programa APBS Poisson Boltzmann, el cual visualiza la electrostática tanto del péptido escogido como la de la proteína y por otro lado se usó el programa Procheck para realizar un análisis más profundo de este péptido.

Caracterización Mecánica:

Este proceso se realizó utilizando un protocolo de dinámicas moleculares dirigidas, las cuales permiten aplicar fuerzas sobre un sistema molecular, pudiendo así imitar las condiciones mecánicas a las que se somete este *pilus* durante la adhesión. Para ello se utilizó GROMACS, software de uso libre para la realización y análisis de dinámicas moleculares en conjunto con el sistema operativo Linux, de esta forma se lograron evitar problemas de compatibilidad con las líneas de código que se utilizaron. En conjunto, se usaron los campos de fuerza SIRAH y OPLS-AA, los cuales están conformados por un conjunto de combinaciones de fórmulas matemáticas y parámetros proteicos que usualmente son utilizados para describir las energías asociadas a una proteína, en conjunto con sus coordenadas atómicas. Los enlaces isopeptídicos no son reconocidos por defecto en estos campos de fuerza, por esta razón, las características necesarias para formar estos enlaces fueron previamente parametrizadas en el campo de fuerza OPLS-AA, tarea que realizaron integrantes del laboratorio. Con el objetivo de lograr una caracterización mecánica de la proteína se siguió el esquema de trabajo representado en la Figura 10.

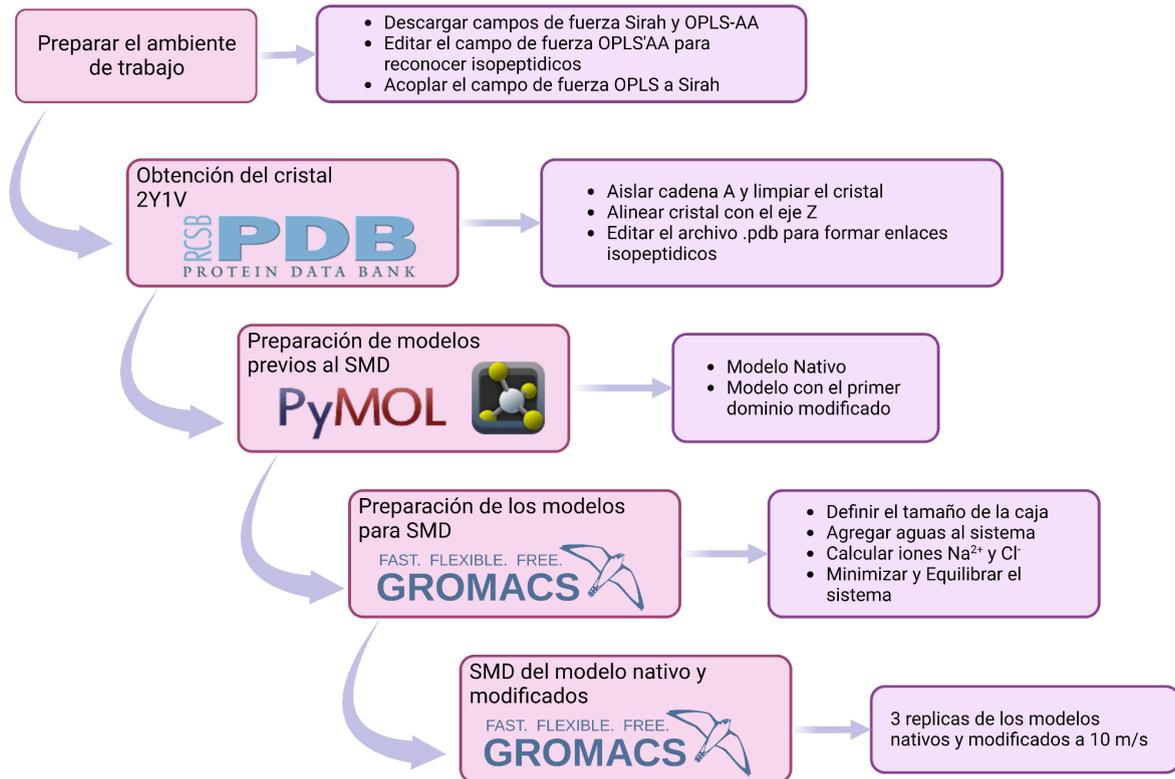


Figura 10: Diagrama de flujo para la caracterización mecánica de los péptidos utilizados para entorpecer la formación del enlace peptídico en el dominio D1 de la proteína RrgB perteneciente a la adhesina de *Streptococcus pneumoniae*.

Para comenzar, se utilizó el archivo de la proteína RrgB previamente preparado en el objetivo anterior, este ya se encuentra limpio y centrado en el eje Z como se ven en la Figura 6. Es necesario de que estos parámetros, haciendo referencia al centrado y la limpieza de la proteína, sean realizados de esta forma, ya que a la hora de aplicar las fuerzas para estirar la proteína, esto suceda solamente en el eje previamente descrito y que no haya ningún tipo de interferencia o impedimento para realizar este proceso, a su vez de optimizar los recursos computacionales en la fase de estiramiento proteico. Como se mencionó con anterioridad, en los campos de fuerza no se encontraban descritos los enlaces isopeptídicos, hasta que se incluyeron en el campo de fuerza OPLS-AA. Tanto la Lisina como la Asparagina que forman parte de dichos enlaces poseen una nomenclatura específica para cada una siendo Lisina “LYS” como “LYY” y Asparagina “ASN” cómo “ASS”. Por otra parte, para identificar los enlaces isopeptídicos presentes en la proteína hay que modificar manualmente los aminoácidos, esto se realizó con el editor de texto Geany, modificando así los residuos de lisina y asparagina que conformaban dichos enlaces isopeptídicos.

Para determinar cómo era el comportamiento de los enlaces isopeptídicos frente al estiramiento de la proteína a causa de una gran fuerza se establecieron 2 modelos. Esto, debido a que ya se tenía conocimiento de que el dominio D1 es el más importante tanto para la estructura como la estabilidad de la proteína: (i) Modelo silvestre que mantenía la capacidad de formar sus 4 enlaces isopeptídicos; (ii) Sistema modificado para no formar el enlace Lys 41- Asn 184 que corresponde al dominio D1.

El protocolo de las dinámicas moleculares comienza con el archivo de la cadena polipeptídica previamente descrito. El archivo debió ser convertido a un formato que pueda ser leído por GROMACS y luego este nuevo archivo creado es denominado topología, ya que este contiene todos los atributos constantes de cada átomo que compone a la proteína, los enlaces y los ángulos que estos poseen, las distancias entre estos y una serie de interacciones que ya se encuentran parametrizados en los campos de fuerza previamente mencionados. Luego de haber generado la topología, se dió paso a la creación del sistema que va a contener nuestro modelo de estudio. Para ello, se generó un espacio que pueda simular de mejor manera un ambiente biológico, que posea un conjunto de leyes físico químicas y energéticas con tal de poder predecir cómo se va a comportar la proteína ante una fuerza que intente desplegarla y a dicho ambiente se le va a denominar sistema acuoso. Uno de los pasos esenciales para la creación de este, es definir el tamaño que poseerá, dado que al llegar a la fase de estiramiento se espera que la proteína en cuestión alcance una mayor longitud nanométrica que su tamaño inicial, esto debido a las fuerza de elongación que se le aplicarán. En caso de que la cadena polipeptídica fuera a salir de este sistema el proceso fallará. Los cálculos de las dimensiones se realizaron utilizando la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} & (\textit{Aminoácidos totales} - \textit{Contribución de los enlaces}) \times 4 \\ & (603 - (143 + 125 + 79 + 170)) \times 4 \\ & (603 - 517) \times 4 \\ & 86 \times 4 = 344 \approx 350 \end{aligned}$$

Ecuación 1: Cálculo de la longitud del sistema en el eje Z usando como ejemplo al modelo silvestre.

El número de aminoácidos totales de la proteína se obtuvo con la información presente en el archivo del cristal, mientras que la contribución de cada enlace peptídico se calculó verificando cuántos aminoácidos existen entre la lisina y la asparagina que forman los enlaces en los dominios de RrgB, dado que estos se consideran como segmentos inextensibles no deberían afectar con la elongación total de la proteína. Los cálculos que se realizaron en la fórmula 1 corresponden al sistema silvestre de la proteína por lo que se toma en consideración los 4 enlaces peptídicos que existen en la proteína, en caso de querer hacer el sistema que involucre al primer dominio solo se tomará en consideración la contribución de los enlaces presentes en los dominios D2, D3 y D4 a la hora de

realizar la fórmula antes descrita. Este cálculo se realizó para determinar la longitud que tiene el sistema solo en relación al eje z, esto debido a dos razones específicas: La primera razón siendo el alineamiento de la proteína, y la segunda razón es que esta se encuentra centrada en el eje Z, por lo que cuando se le aplique la fuerza de elongación a la proteína esta se estirara solo en este eje. Estos parámetros limitan el sistema, y a su vez optimizan los recursos computacionales necesarios para poder ejecutar esta dinámica. Luego de haber determinado este sistema o “caja”, este debe llenarse con moléculas de agua, con tal de que la proteína no esté en el vacío. A este sistema acuoso se le llama sistema híbrido, ya que está compuesto por dos tipos de moléculas de agua: Atomística (SOL) que recubre la proteína formando una capa o coraza (shell), que posee la capacidad de determinar el comportamiento de si está mejorando la resolución de estos y el agua de grano grueso (WT4) que ocupa el resto del espacio. Se utiliza este sistema híbrido para ahorrar recursos computacionales y optimizar la velocidad de realización de estos sistemas, cabe destacar que las estaciones de trabajo realizan todos los cálculos y cuentas de manera autónoma sobre la cantidad presente de ambos tipos de agua, estos datos deben ser extraídos mediante líneas de comandos para poder seguir con este proceso.

Luego de haber recuperado el número de aguas, es necesario calcular el número de iones que va a tener el sistema, para que así se pueda neutralizar la carga neta que tiene la proteína, este valor se muestra cuando uno termina de generar la topología, es decir, en un inicio de este proceso. Se le añadieron al sistema iones sodio (Na^{2+}) e iones cloro (Cl^-), en relación a las siguientes fórmulas:

$$Total\ 1 = \frac{(N^\circ\ de\ aguas\ SOL) \times Concentración}{56}$$

$$Total\ 1 \pm \left(\frac{Carga\ total}{2} \right)$$

Ecuación 2: Fórmula usada para calcular el número de iones sodio y cloro que van dentro del sistema. Se usa el número de aguas atomísticas (SOL) dado la relevancia que poseen al interactuar directamente con la proteína, en conjunto con la concentración de sales presentes en el cristal al momento de la purificación (de no saber el valor se usa un valor general de 0,15), además de un valor constante de 56.

El cálculo realizado entregó dos resultados, para poder definir qué valor representa a cada ion se debe tener en consideración la carga energética del sistema, si este valor es negativo la cantidad de iones sodio va a ser mayor, por el contrario, si la carga del sistema es positiva el ion cloro va a ser mayor que el ion sodio, de esta forma se neutraliza la carga del sistema. El sistema que se generó en este caso es negativo, por lo que la cantidad de iones sodio fue mayor a las de los iones cloro para así neutralizar la carga del sistema. Cabe mencionar, que como este sistema acuoso se está realizando bajo la nomenclatura del campo de fuerza OPLS-AA, esta no es compatible y no es reconocible por el

campo de fuerza SIRAH, por lo que hay que reemplazar esta terminología con una que sea compatible con el campo de fuerza SIRAH. Para ello se utilizó un archivo “.py” que intercambia automáticamente todos los términos de OPLS-AA, por uno que sí sea compatible con SIRAH utilizando como referencia una tabla de conversión.

Al terminar de conformar el sistema acuoso, este contiene todas las partes necesarias que lo conforman, incluyendo la proteína, aguas e iones, por lo que se puede comenzar con el siguiente paso, el cual es minimizar. La función que cumple el minimizado, es llegar al mínimo de energía local del sistema acuoso, esté utilizando el algoritmo de Monte-Carlo, busca posiciones de átomos al azar hasta encontrar el conformero que posea menos energía, lo que lo vuelve más estable, dando a entender que un conformero es un tipo de isómero que se diferencian entre sí por la rotación en torno a un enlace covalente simple(56). Al finalizar el proceso de minimizado, se da inicio a la siguiente fase que conlleva el equilibrado del sistema, este se somete a diversas variables de presión y temperatura, permitiendo que la proteína llegue a un estado estacionario el cual es el idóneo para poder continuar recopilando información de esta. Al finalizar el proceso de equilibrado, se entregaron al programa los puntos de estiramiento desde donde se verá ejecutada la variable energética, la cual puede ser velocidad o fuerza constante dependiendo del caso, tomando en consideración que sin importar cuál de estas se elija, la dirección de estiramiento entre ambos puntos va a ser contraria con tal de estirar la proteína. En este caso los puntos de estiramiento definidos fueron el primer y último carbono α de la secuencia peptídica de RrgB.

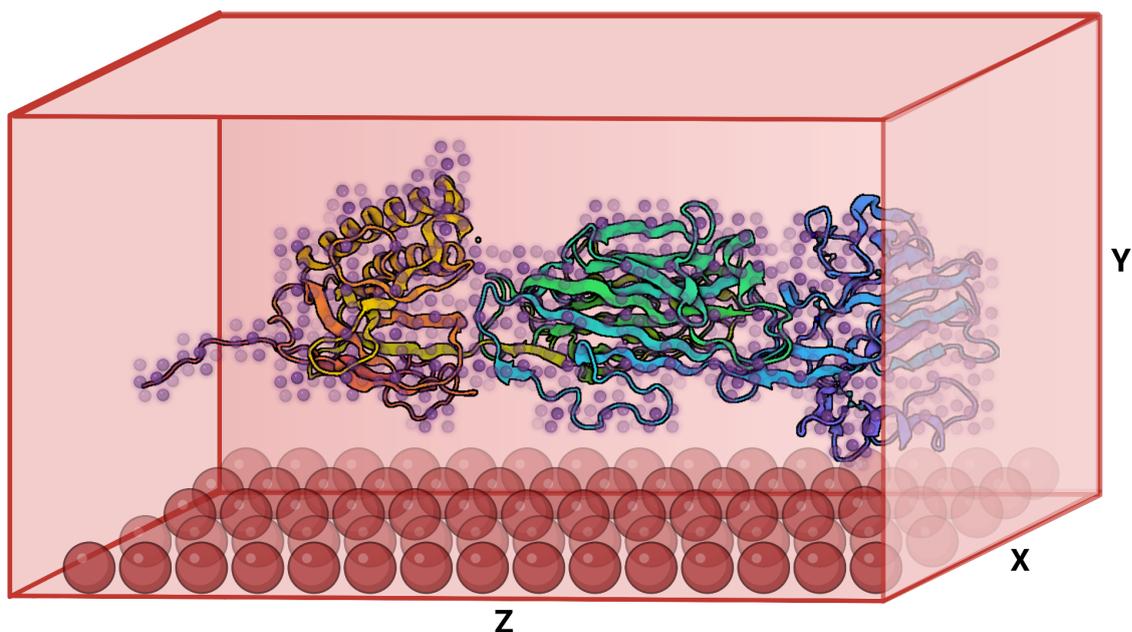


Figura 11: Diagrama de un sistema acuoso completo con la proteína RrgB correspondiente en su interior mostrando los 2 tipos de aguas que lo componen, siendo el agua de grano grueso las bolitas de color rojo y el agua atomística las bolitas de color azul que rodean a la proteína.

Las dinámicas moleculares se realizaron aplicando velocidad constante, utilizando modelo de proteína silvestre y con el D1 modificado ambas se ejecutaron a velocidades de 10 y 100 m/s. Esto debido a que de esta forma se puede comparar como estas velocidades influyen en la entrega de los resultados y el tiempo requerido para estos. Se realizaron 3 réplicas por cada modelo que se probó, en un inicio solo se realizó el modelo silvestre de la proteína, luego se modificó el D1 y por último se incluyó el péptido escogido con el diseño anterior y se añadió en la dinámica para comprobar cómo este afectaba en los resultados entregados por la dinámica. Cada dinámica molecular dirigida o SMD por sus siglas en inglés entrega dos resultados siendo el primero dos archivos organizados en columnas, donde se representan la fuerza ejercida durante el proceso de desplegamiento, estas se entregan en kJ/mol/nm además de la extensión obtenida durante este proceso en nanómetros, luego la fuerza obtenida se transforma a pico newton (pN) dividiendo está en el factor de conversión 1,661. El segundo grupo de resultados es un archivo que posee toda la información asociada a números durante la dinámica como por ejemplo las posiciones, trayectoria, etc. Este se transforma utilizando una serie de comandos que permiten después visualizar en una animación cómo se realizó el proceso de desplegamiento y cómo cambiaba la proteína durante este proceso. Logrando así contrastar de mejor forma cual es el comportamiento de los enlaces isopeptídicos y su impacto en la misma dinámica, o en este caso en la animación de esta.

PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Diseño del péptido

Se determinó mediante literatura que el dominio 1 posee una mayor importancia estructuralmente hablando dentro de la proteína, por lo cual para el diseño del péptido se analizó la hebra beta complementaria que posee la asparagina y que forma el enlace isopeptídico nativamente. Se definió la longitud del péptido a 7 aminoácidos por lo que se dio paso al análisis a profundidad con iteraciones de aminoácidos en distintas posiciones de este para determinar la variación de dichos cambios y su relación con la afinidad obtenida. Se comenzó con un intercambio de alaninas para determinar cuál posición poseía un mayor impacto en la variación de las afinidades, dando como resultado la Tabla 3.

Intercambio de alaninas

Peptide number	Affinity	1	2	3	4	5	6	7	
1	-6.8	Y	P	K	N	T	E	A	Original
1	-6.6	Y	P	K	N	T	E	A	Intercambio de Alanina
2	-6.5	A	P	K	N	T	E	A	
3	-7.4	Y	A	K	N	T	E	A	
4	-8.2	Y	P	A	N	T	E	A	
5	-7.2	Y	P	K	N	A	E	A	
6	-7.0	Y	P	K	N	T	A	A	

Tabla 3: Resultados obtenidos del intercambio de alaninas, con su correspondiente afinidad y el péptido original para una comparación.

Se utilizó RPG para la realización de estas iteraciones, al ser pocos resultados posibles en este caso, haciendo referencia al intercambio de alaninas, no se presentó ningún inconveniente para su ejecución, pero debido a que pruebas posteriores requieren una mayor capacidad de procesamiento se limitó el cambio a dos posiciones a la vez.

$$20^6 \Rightarrow 64000000$$

Fórmula X: Cantidad de iteraciones posibles para la creación de péptidos, siendo 20 la cantidad de aminoácidos posibles y 6 las posiciones que pueden tomar.

Como se puede ver en la fórmula anterior, existen cerca de 64 millones de pruebas posibles para encontrar un péptido con mayor afinidad, por lo cual se necesita un poder computacional extremadamente alto para su análisis. Debido a esto, se modifican de a dos posiciones dando como resultado solo 400 iteraciones posibles, las cuales son analizadas en su totalidad sin mayores inconvenientes por las unidades de procesamiento que se poseen.

Primera modificación

209	-9.0	Y	P	G	N	R	E	A	Modificación tercer y quinto aminoácido
252	-9.0	Y	P	G	N	I	E	A	
272	-9.0	Y	P	A	N	W	E	A	
280	-9.0	Y	P	G	N	F	E	A	
299	-9.0	Y	P	G	N	A	E	A	
346	-9.0	Y	P	W	N	G	E	A	
191	-9.1	Y	P	G	N	Y	E	A	
307	-9.4	Y	P	G	N	W	E	A	
326	-9.6	Y	P	Y	N	G	E	A	

Tabla 4: Mejores resultados de la primera modificación realizada en RPG, donde se modificó el tercer y el quinto aminoácido, todos los otros aminoácidos se dejan igual que el original y solo el tercero y el quinto se iteran los 20 aminoácidos posibles dando en total 400 resultados, siendo estos los que poseen una mayor afinidad.

Luego de reconocer que aminoácido es el que más se repite entre los mejores resultados, se mantiene ese en dicha posición, para luego proceder y volver a ejecutar RPG cambiando los aminoácidos modificados y elegir nuevas posiciones para poder iterar. Se escogió la Glicina en la tercera posición como definitiva y se procedió a modificar otra posición, eligiendo la primera posición, como no hubo un consenso se volvió a ejecutar la quinta posición, como se ve en la tabla 5.

Segunda modificación

125	-9.1	Y	P	G	N	L	E	A	Modificación primer y quinto aminoácido
135	-9.1	F	P	G	N	H	E	A	
246	-9.1	I	P	G	N	W	E	A	
296	-9.6	Y	P	G	N	W	E	A	
306	-9.2	Y	P	G	N	D	E	A	
363	-9.5	F	P	G	N	W	E	A	

Tabla 5: Mejores resultados de la segunda modificación realizada en RPG, donde se modificó el primer y el quinto aminoácido, se dejan sin modificar todos los aminoácidos tomando en cuenta los resultados anteriores, solo se modifican la primera y la quinta posición con los 20 aminoácidos posibles dando un total de 400

resultados. Estos resultados son ordenados de acuerdo a su afinidad la cual se muestra en la segunda columna de la tabla.

Luego, se repitió lo que se realizó en el paso anterior, solo que esta vez se escogió para la primera posición la tirosina, debido a que esta fue la que más se repitió entre los mejores resultados. Cabe destacar que estos resultados haciendo referencia al valor de la afinidad fue decidido en RPG, como se explicó en la metodología este programa posee parámetros modificables que entregan resultados específicos, siendo así se decidió utilizar solo como “Mejores resultados” a aquellos que posean una afinidad mayor a -9.

Tercera modificación

15	-9.1	Y	T	G	N	P	E	A	Modificación segundo y quinto aminoácido
164	-9.3	Y	V	G	N	W	E	A	
264	-9.2	Y	P	G	N	H	E	A	
308	-9.1	Y	D	G	N	W	E	A	

Tabla 6: Mejores resultados de la tercera modificación realizada en RPG, donde se modificó el segundo y el quinto aminoácido, se dejan sin modificar todos los aminoácidos tomando en cuenta los resultados anteriores, solo se modifican la segunda y la quinta posición con los 20 aminoácidos posibles dando un total de 400 resultados.

Cuarta modificación

219	-10.4	Y	P	G	N	W	F	P	Modificación sexto y séptimo
281	-10.4	Y	P	G	N	W	T	W	
294	-10.4	Y	P	G	N	W	S	W	
307	-10.4	Y	P	G	N	W	P	V	
319	-10.4	Y	P	G	N	W	V	F	
214	-10.5	Y	P	G	N	W	P	G	
98	-10.6	Y	P	G	N	W	P	A	
187	-10.6	Y	P	G	N	W	P	H	
62	-10.8	Y	P	G	N	W	P	Y	
399	-10.8	Y	P	G	N	W	A	W	
69	-10.9	Y	P	G	N	W	P	F	
173	-10.9	Y	P	G	N	W	P	P	
303	-11.3	Y	P	G	N	W	P	W	

Tabla 7: Mejores resultados de la cuarta modificación realizada en RPG, donde se modificó el sexto y el séptimo aminoácido, se dejan sin modificar todos los aminoácidos tomando en cuenta los resultados anteriores, solo se modifican la sexta y la séptima posición con los 20 aminoácidos posibles dando un total de 400 resultados.

Se continuó realizando el mismo proceso de seleccionar posiciones, realizar las iteraciones y analizar los resultados, para así llegar a lo que se esperaría como el mejor péptido obtenido hasta el momento. Este se obtuvo en la cuarta modificación, debido a que posee una afinidad de -11.3, la cual es superior a muchos intentos previos. Este péptido con el número 303 fue el que poseyó la mejor afinidad, aun así, se realizaron otras modificaciones mediante RPG para comprobar si este resultado se repetía.

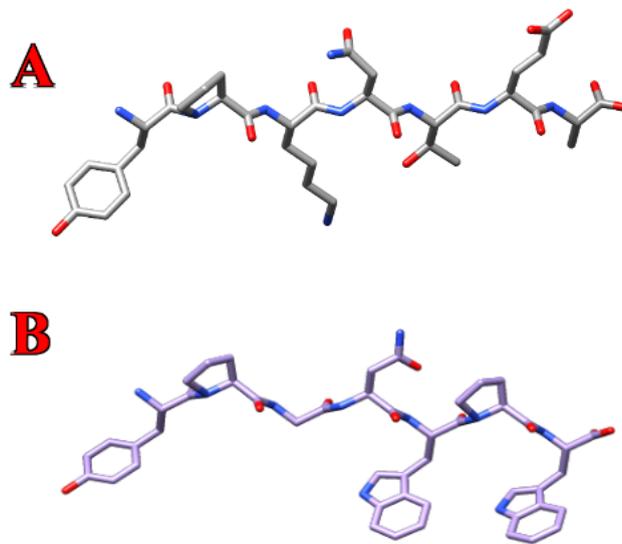
Quinta modificación

350	-10.1	Y	P	G	N	W	P	C	Modificación tercer y séptimo aminoácido
71	-10.2	Y	P	G	N	W	P	S	
123	-10.2	Y	P	G	N	W	P	T	
168	-10.3	Y	P	P	N	W	P	W	
205	-10.3	Y	P	G	N	W	P	D	
220	-10.3	Y	P	G	N	W	P	Q	
233	-10.3	Y	P	G	N	W	P	I	
296	-10.3	Y	P	G	N	W	P	V	
317	-10.3	Y	P	G	N	W	P	L	
340	-10.3	Y	P	G	N	W	P	G	
211	-10.4	Y	P	G	N	W	P	N	
393	-10.4	Y	P	G	N	W	P	A	
59	-10.5	Y	P	G	N	W	P	H	
153	-10.5	Y	P	A	N	W	P	W	
264	-10.8	Y	P	G	N	W	P	Y	
366	-10.9	Y	P	G	N	W	P	F	
118	-11.3	Y	P	G	N	W	P	W	

Tabla 8: Mejores resultados de la tercera modificación realizada en RPG, donde se modificó el tercer y el séptimo aminoácido, se dejan sin modificar todos los aminoácidos tomando en cuenta los resultados anteriores, solo se modifican la tercera y la séptima posición con los 20 aminoácidos posibles dando un total de 400 resultados.

Como se mencionó con anterioridad, esta última modificación se realizó para comprobar si el resultado anterior se repetía, el mejor péptido de la modificación anterior tenía un ID 303 y una estructura de YPGNWPW, la cual se repitió en esta modificación, solo que en esta posee un ID 118 pero la misma estructura y afinidad que se obtuvo en la anterior modificación.

Péptido original y Mejor péptido:



Figuras 12: Visualización en Chimera, donde se ven (A) el péptido original obtenido de la cadena complementaria del enlace peptídico y (B) el mejor péptido obtenido con las iteraciones en RPG.

Luego que obtener el mejor péptido se comenzó a realizar distintas pruebas y comparaciones para corroborar la viabilidad de utilizar este péptido, debido a esto se ejecutaron distintos programas como se ve en las siguientes figuras.

La interacción electrostática es esencial para entender cómo un péptido o una proteína se va a comportar en procesos moleculares. Debido a esto, el péptido debió ser transformado de formato PDB a PQR para ser analizado por el servidor online de APBS, que muestra las interacciones electrostáticas de este péptido como se puede ver en la figura 13.

Electrostática del mejor péptido en cuanto a afinidad:

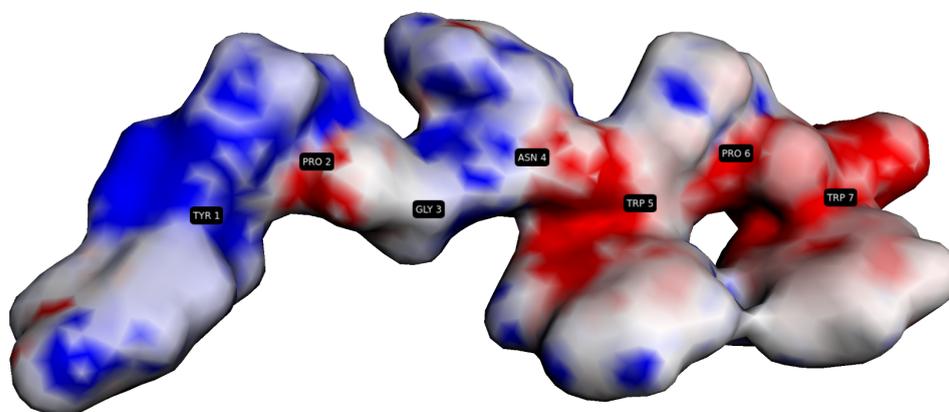


Figura 13: Visualización electrostática del mejor péptido utilizando el servidor online APBS poisson boltzmann, utilizando una visión de Van der Waals, donde a su vez se notan los aminoácidos que lo componen.

Si bien la figura 13 se puede visualizar que no se presenta una carga dominante en el péptido, si no que se encuentra bien distribuida ambas cargas, aun así se pueden visualizar zonas donde claramente predominan ciertas cargas, esto se puede visualizar en la figura donde las zonas azules representan la carga positiva de la zona y las zonas rojas representan las zonas negativas. En general, los aminoácidos están constituidos por un carbono alfa al cual se unen un grupo funcional amino, uno carboxilo, un hidrógeno y un grupo R o lateral. Las diferencias entre los aminoácidos se deben a la estructura de sus grupos laterales o R (residuo o resto de la molécula). Debido a esto, se puede dilucidar que las zonas rojas se deban a los grupos carboxilos presentes en dicho aminoácido y a su vez de las zonas azules que se ven representadas gracias a los grupos amino presentes en cada aminoácido. Esto se puede ver representado de mejor manera en la siguiente figura, donde se observa el mismo péptido mostrado anteriormente, solamente que este presenta cierta transparencia y su estructura está representada en formato Licorice, en la cual se puede ver la estructura de este péptido y de cada uno de los aminoácidos que lo componen.

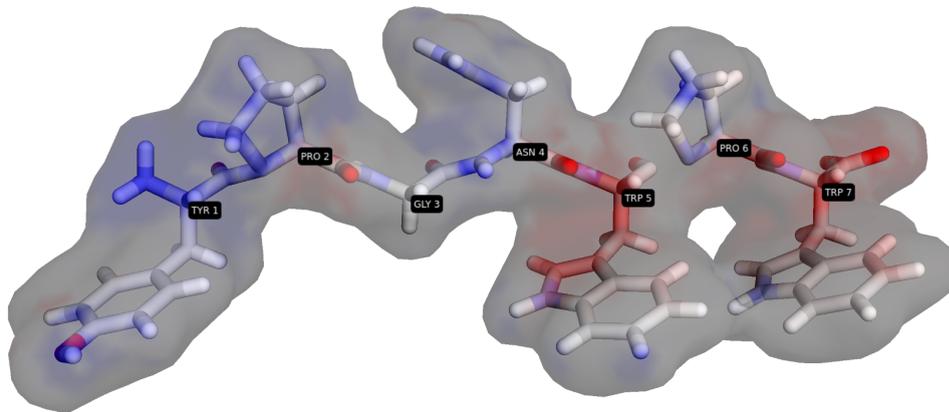


Figura 14: Visualización electrostática del mejor péptido utilizando el servidor online APBS poisson boltzmann, utilizando una visión de Van der Waals, donde a su vez se notan los aminoácidos que lo componen. Donde se aplica cierta transparencia para mostrar la estructura del péptido en licorice.

Como se puede ver en la figura 14, cada grupo amino presente está coloreado de azul, pero se ven claramente los que forman parte de los aminoácidos Prolina 2 (PRO 2) y Tirosina 1(TYR 1). De esta misma forma se ven representados los grupos carboxilos representados con color rojo como se puede visualizar en el aminoácido Triptófano 7 (TRP 7), las zonas con carga neutra se ven representadas con color blanco, aunque usualmente los grupos R o cadenas laterales presentes en cada uno de estos aminoácidos, son las que se encuentran coloreadas de este color.

Resultados de procheck del péptido:

Luego de haber terminado de analizar el péptido en cuanto a su electrostática, su archivo .pdb fue subido a un servidor de procheck. En él, fue sometido a distintos análisis que comprueban su viabilidad, de estos siendo el más importante el análisis de Ramachandran el cual se puede ver en la siguiente figura 15.

Resultados de Ramachandran:

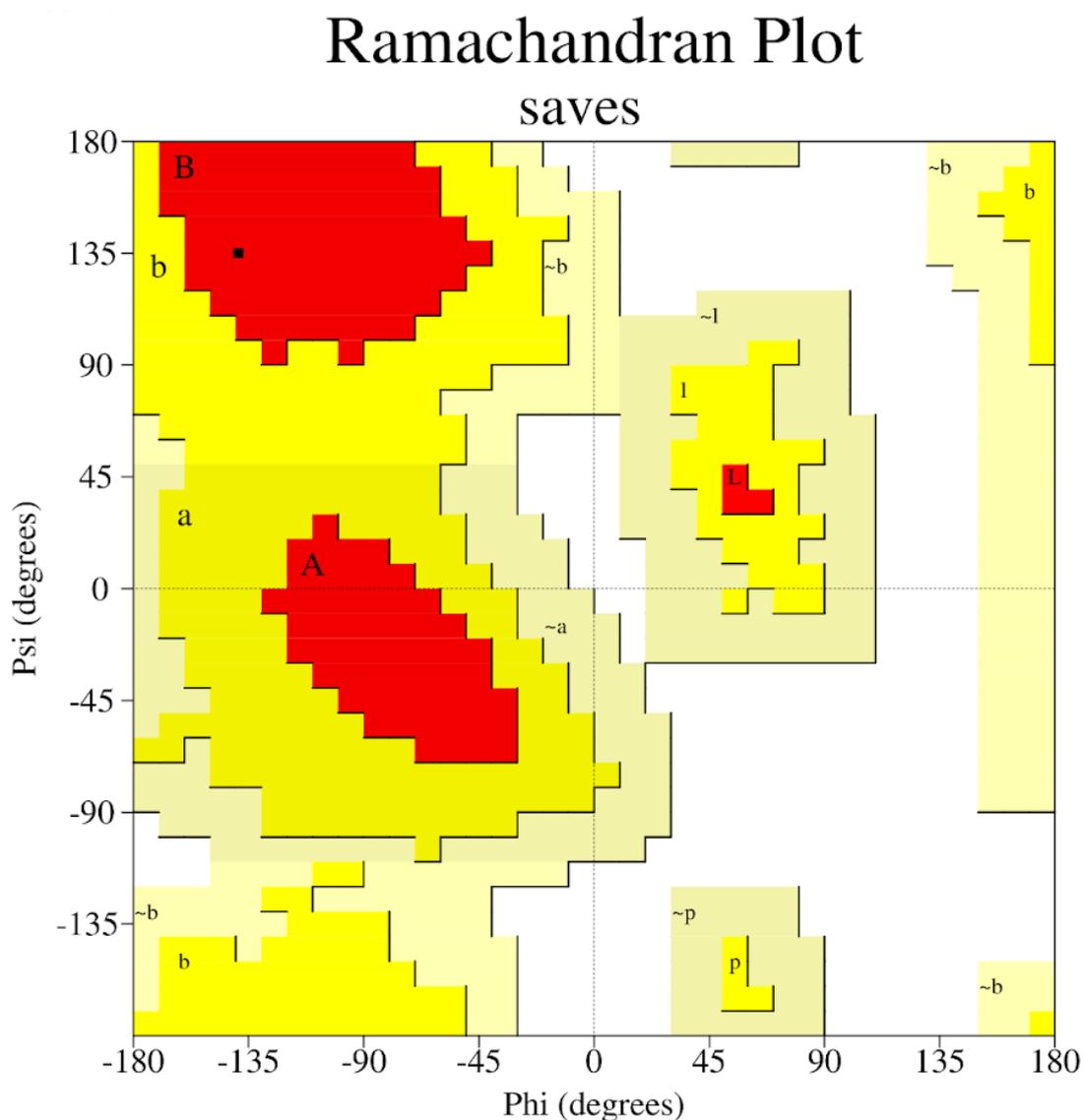


Figura 15: Resultados obtenidos al finalizar el análisis de Ramachandran, en el cual se ve si el péptido es biológicamente compatible, dicho gráfico está compuesto por 4 cuadrantes siendo 3 zonas las más importantes de color rojo denominadas con las letras A, B, L, representando así las “right-handed alpha-helix (A), Beta sheets(B) and Left-handed alpha-helix(L)” además de mostrar los grados Phi y Psi en los ejes X e Y

respectivamente. Se ve un cuadrado negro en el area B del primer cuadrante representando las características encontradas en los aminoácidos presentados del peptido estudiado.

Residuos en ubicaciones favorecidas (A, B, L)	2	100.0 %
Residuos en regiones adicionales permitidas (a,b,l,p)	0	0.0 %
Residuos en regiones generosamente permitidas (~a, ~b,~l,~p)	0	0.0 %
Residuos en regiones no permitidas	0	0.0 %
Número de residuos no glicina y no prolina	2	100.0 %
Número de residuos finales(excl. Gly y Pro)	2	
Número de residuos de glicina	1	
Número de residuos de prolina	2	
Número total de residuos	7	

Tabla 9: Estadísticas presentadas en el Gráfico de Ramachandran.

Caracterización mecánica y parametrización de la proteína.

Si bien uno pensaría que el primer paso antes de ejecutar cualquier tipo de dinámica o simulación es encontrar el dominio más importante, este paso nos lo saltamos debido a que la literatura que se encuentra junto al archivo del cristal menciona que el dominio con mayor importancia es el primero, ya que está estrictamente relacionado con la unión y estabilización de la proteína Rrgb, como se mencionó anteriormente, en este dominio el enlace peptídico que solamente se forma cuando dos proteínas de Rrgb se interconectan permitiendo así generar el pili de *Streptococcus pneumoniae* debido a esto si interrumpir este enlace peptídico se alteraría la integridad estructural de la proteína de forma directa impidiendo así la formación del pili y por consecuencia la adhesión de este patógeno a una superficie. Como ya se conoce el dominio en el que se realizan estas dinámicas hay que determinar el resto de parámetros que se ven involucrados para así poder ejecutar de manera correcta y obtener resultados acorde a las pruebas que se quieren mostrar. Cabe destacar que todos

los gráficos de simulaciones que se mostrarán serán de Fuerza (pN) por Extensión (nm), ya que la finalidad de estas pruebas es comparar el trabajo (área bajo la curva) de cada uno de los péptidos.

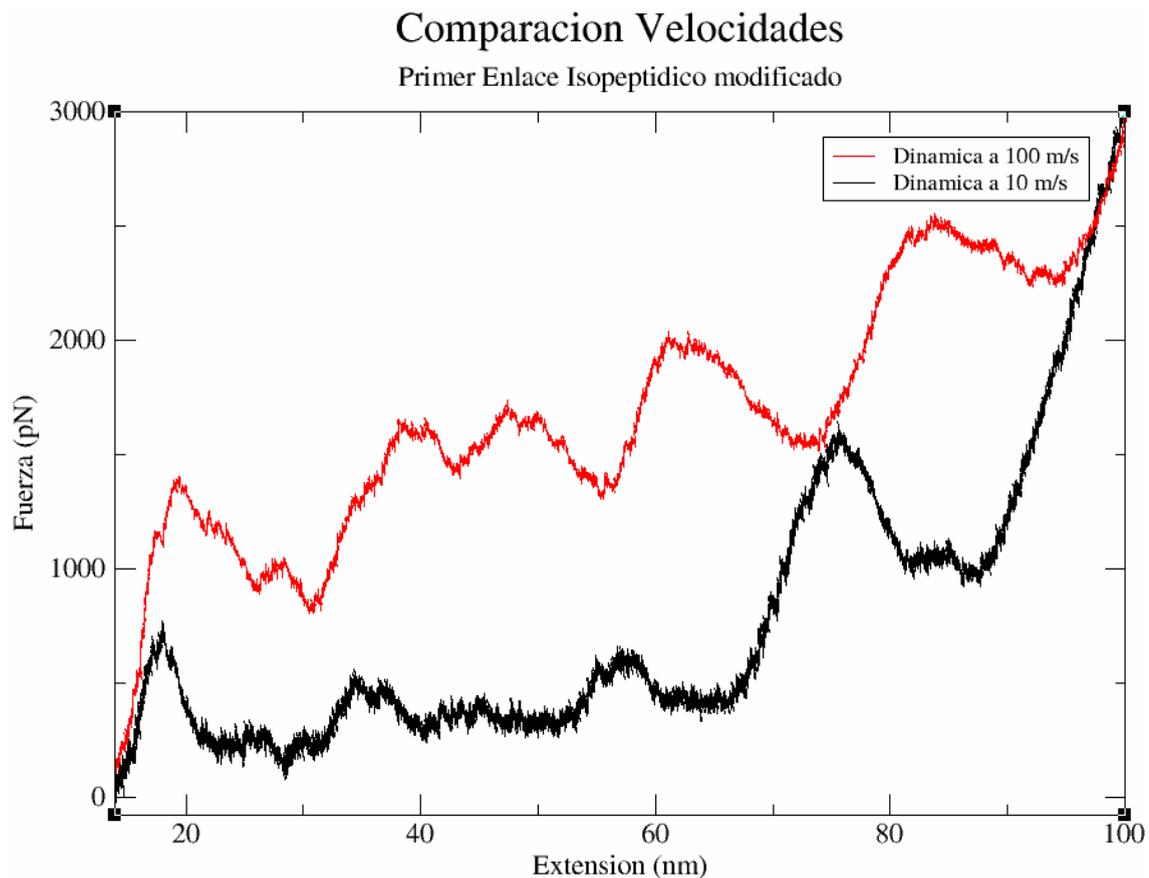


Figura 16: Gráfico de fuerza v/s extensión donde se comparan 2 velocidades a las cuales se puede ejecutar una dinámica a 10 y 100 m/s respectivamente, siendo la velocidad de 10 m/s marcada de color negro y la de 100 m/s marcada de color rojo.

Se realizó una comparación de resultados de las velocidades, para así poder determinar que velocidad sería escogida para la posterior ejecución de las dinámicas siguientes, ya que al determinar la velocidad óptima se puede realizar un análisis más preciso de los resultados, dando así una discusión más precisa, observando eventos que a distintas velocidades no se puedan ver a simple vista, pero que sí posean impacto en los resultados. En la Figura 16 se pueden visualizar dos graficas, una roja que representa la velocidad de 100 m/s y una de color negro que representa la velocidad de 10 m/s, a su vez se puede ver que la gráfica de color negro presenta los eventos mejor definidos que la de velocidad superior ambas poseen 5 eventos claramente distinguibles entre si. Luego de determinar la velocidad de ejecución se procedió a realizar dinámicas con la proteína en estado nativo, es decir, sin presentar ningún tipo de modificación en sus enlaces isopeptidicos dando como resultado la Figura 17.

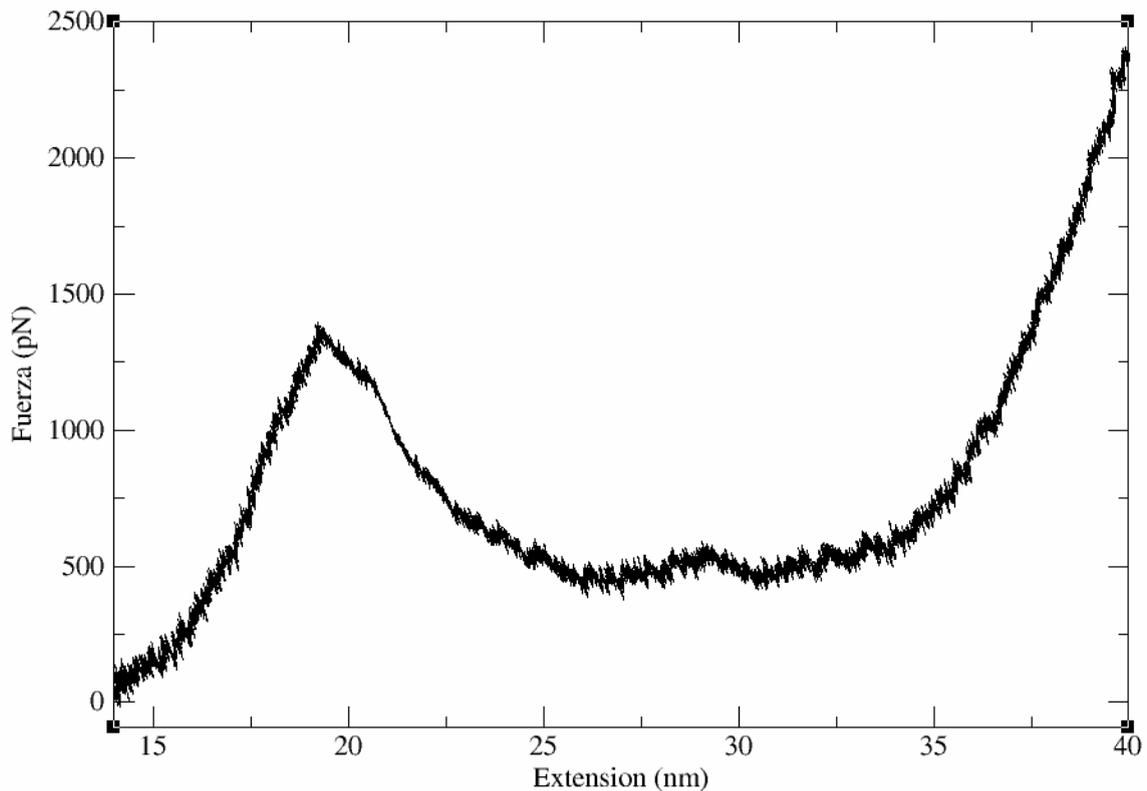


Figura 17: Gráfico que representa una simulación molecular de la proteína silvestre lanzada a una velocidad de 10 m/s, se ven representadas la fuerza ejercida en pN y la extensión resultante, al ser la proteína nativa esta no presenta ninguna modificación en sus enlaces.

En esta figura se realizó una simulación de la proteína en estado Nativo, lo que quiere decir que no presenta ningún tipo de modificación, esta se ejecutó a una velocidad de 10m/s ya que esta fue la velocidad escogida previamente para la realización de los análisis, debido a que los resultados mostrados a esta velocidad presentan una mayor nitidez permitiendo así una mejor comparación y detección de eventos, específicamente hablando de esta figura se ve un gran suceso cercano a los 20 nm que presenta una fuerza cercana a los 1500 pN, luego de este se ve un evento cercano a los 30 nm de una magnitud de 500 pN. Cuando la extensión de la proteína supera los 35 nm esta comienza con el sobre estiramiento, que indica que la proteína ya no demuestra ningún tipo de modificación estructural, debido a esto la fuerza aumenta de manera indefinida como se puede ver al finalizar el gráfico.

Se realizaron tres réplicas en cada tipo de análisis, como se ve en la figura 18, se pueden visualizar 3 gráficas una verde, roja y negra respectivamente, cada una de estas se realizó modificando el primer enlace peptídico de nuestra proteína, se pueden notar algunas diferencias pequeñas, pero todas

poseen cuatro eventos notorios y un evento de menor tamaño cercano a los 45 nanómetros de extensión.

Modificación isopeptídico 1

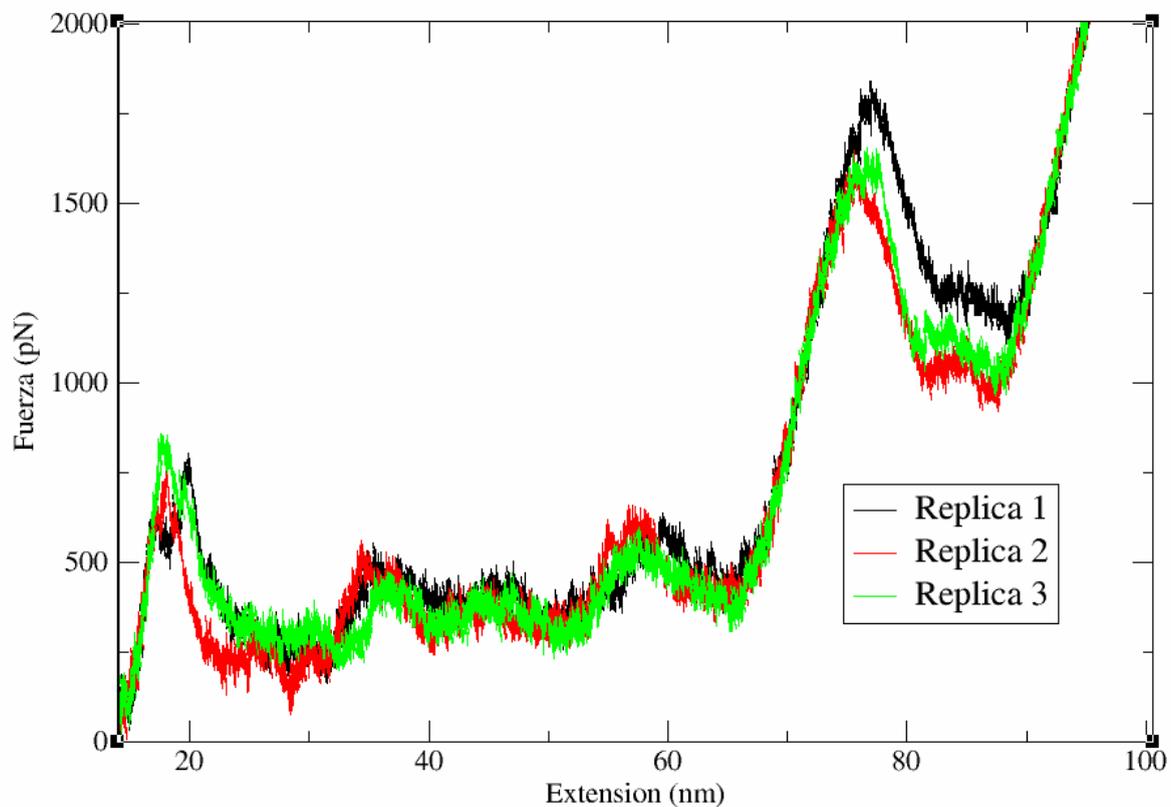


Figura 18: Gráfico que representa las réplicas realizadas de una simulación molecular modificando el primer enlace isopeptídico a 10 m/s, cada una de las réplicas representada con un color correspondiente siendo: negro la primera replica, rojo la segunda replica, verde la tercera replica.

Si bien en cada una de las réplicas se realizó el sistema acuoso desde 0, los parámetros de estos no cambian. Sin embargo, el único factor que puede afectar el resultado obtenido es el minimizado, como se mencionó en la metodología, la característica principal es que este es azaroso, ya que se ve afectado estrechamente por las simulaciones de Monte Carlo, por lo que las réplicas poseen pequeñas diferencias, no obstante los eventos más notorios siguen presentes, debido a estos pequeños cambios son requeridas las réplicas para así poder sacar un estándar de los resultados obtenidos, y de esta forma mostrar los resultados correctos con sus posibles variaciones.

Fuerza v/s Extension

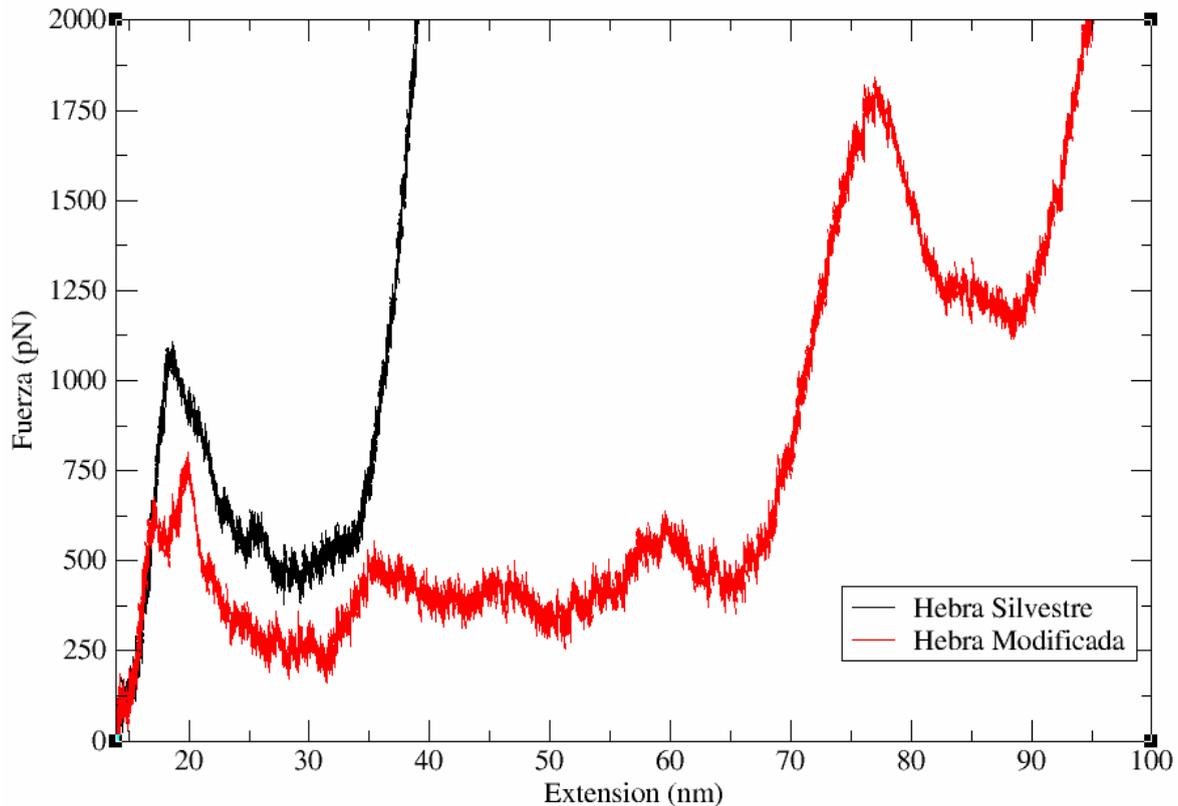


Figura 19: Gráfico de Fuerza v/s Extensión que muestra la diferencia en las curvas mostradas cuando se ve modifica el enlace peptídico en esta. Siendo representada la hebra Silvestre en color negro y la Hebra que presenta una modificación en el enlace isopeptídico en color rojo.

La figura 19 muestra un gráfico de fuerza v/s extensión donde se comparan 2 dinámicas. Una de ellas, realizada en una hebra silvestre (nativa) de color negro y una hebra modificada de color rojo, para así poder mostrar de manera gráfica como cambian la cantidad de eventos que ocurren en dichas hebras con la única modificación, siendo la eliminación o alteración de un enlace isopeptídico, en el caso de esta hebra modificada se alteró el enlace presente en el dominio 1. Se puede observar a simple vista la variación en la extensión que ocurre en ambas hebras, la hebra silvestre muestra una extensión de 35 nm antes de llegar al sobreestiramiento, en comparación a la hebra silvestre que presenta una elongación de 95 nm antes de comenzar con el sobreestiramiento, además de esto se puede visualizar la diferencia en la cantidad de eventos o modificaciones estructurales que le ocurren a cada una de la hebras. La hebra silvestre muestra 2 eventos, uno de gran fuerza llegando a los 20 nm y otro de menor medida cercano a los 25 nm, por otro lado la hebra modificada muestra seis eventos, dos que ocurren muy cerca uno del otro con fuerzas similares cercanos a los 20 nm, tres de

menor fuerza que ocurren a 35 nm; 45 nm; 60 nm; respectivamente y por último un gran evento que ocurre previo a comenzar con el sobre estiramiento llegando a los 80 nm de extensión.

Caracterización de péptidos.

Al terminar de analizar el comportamiento de las simulaciones de la proteína en estado Nativo y con la presencia de las modificaciones, se dio paso a realizar los siguientes análisis que requieren la integración de un péptido, ya que estos evalúan el trabajo requerido para remover este de una posición previamente dada. Para ello se seleccionaron 3 péptidos del análisis en el objetivo anterior, tomando como referencia el mejor péptido obtenido, el que posee la mejor afinidad y 2 péptidos que se encontraban entre los mejores. Específicamente, se tomaron los péptidos 118 con una afinidad de 11.3; el péptido 59 con una afinidad de 10.5 y el péptido 366 con una afinidad de 10.9. A cada uno de estos se les asignó la misma posición de partida que simula la ubicación del lugar donde se formará el enlace peptídico, entre la Lisina 41 perteneciente al dominio 1 de la proteína Rrgb y la Asparagina 4 que se encuentra en cada uno de los péptidos probados.

Como se ve en la figura 20, cada uno de los péptidos poseen la misma ubicación de partida en la proteína, cabe destacar que en dicha figura se muestra solo una parte de la proteína, específicamente del dominio 1 de esta proteína, ya que este es el dominio que fue modificado y es en el cual se realizaron todas estas pruebas, se puede observar que la imagen se ve cortada, sin embargo, no es impedimento para que se vea de forma clara cómo están ubicados cada uno de ellos. Cada una de las simulaciones son de Fuerza(pN) vs Extensión(nm) a una velocidad constante de 10 m/s.

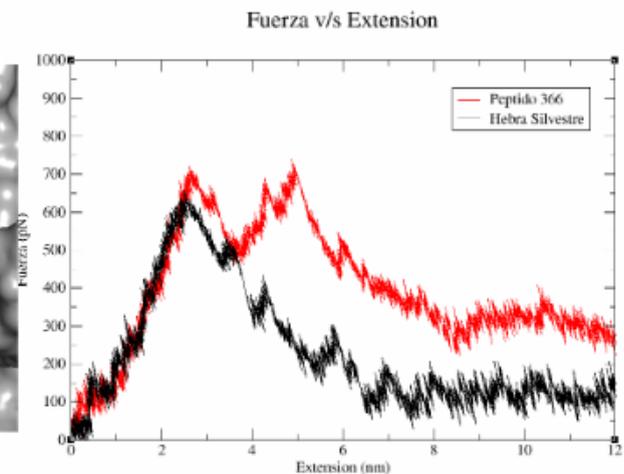
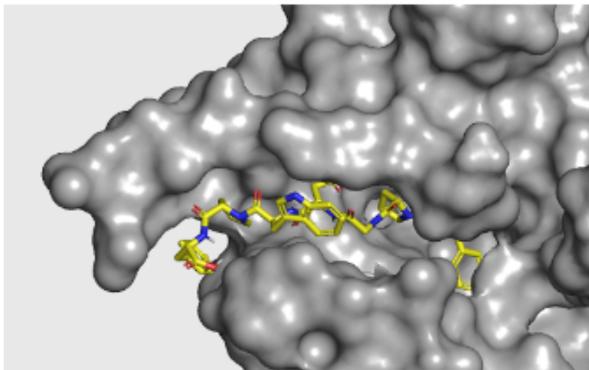
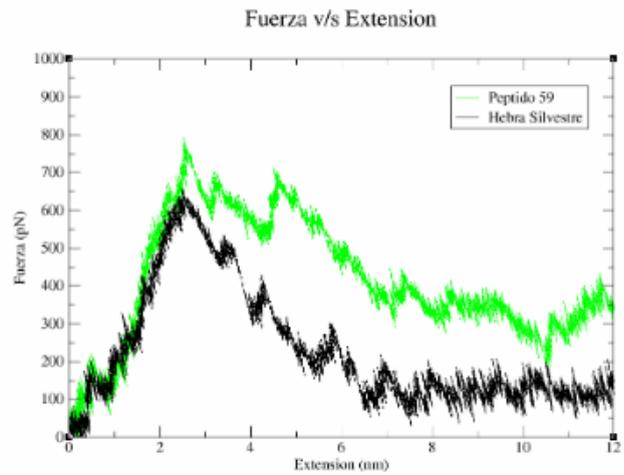
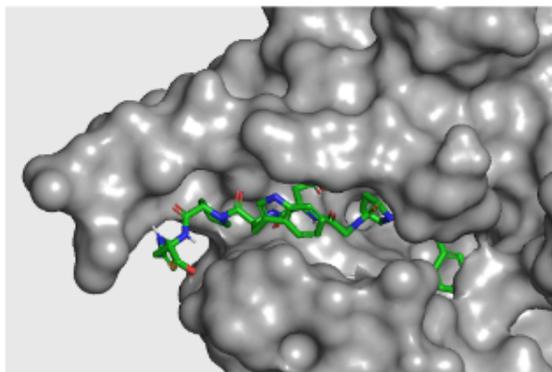
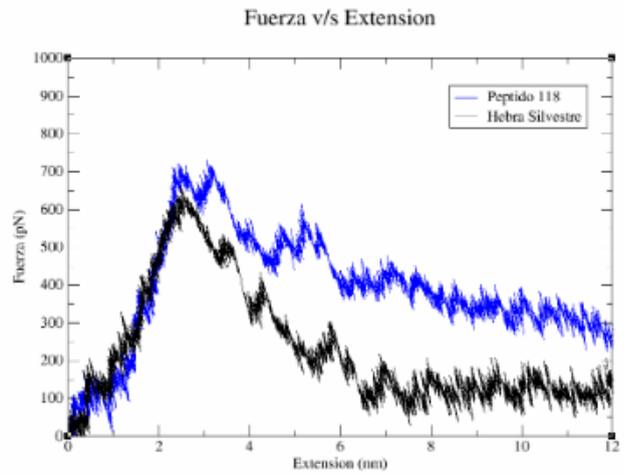
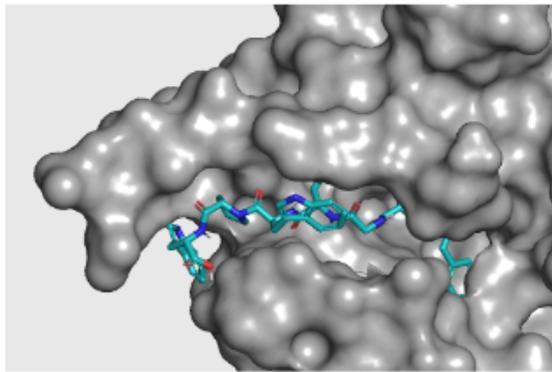


Figura 20: Conjunto de gráficos e imágenes que muestran la diferencia de trabajo requerido para remover el péptido, en la columna de la izquierda se visualizan imágenes de cada uno de los péptidos utilizados en su posición correspondiente siendo el orden 118(celeste); 59(verde); 366(amarillo) respectivamente. En la columna de la derecha se ven 3 gráficos comparativos que muestran el trabajo requerido con cada uno de los péptidos analizados, siendo la hebra silvestre representada con color negro y los péptidos con un color representativo 118(Azul); 59(verde); 366(rojo).

Como se aprecia en la figura 20, la segunda columna de esta muestra los resultados obtenidos de cada uno de los péptidos probados, tomando como referencia la hebra nativa de color negro, ya que el propósito de este experimento es conocer cuánto es la diferencia de trabajo necesaria para remover dichos péptidos de la proteína. En este contexto, lo más relevante es el área bajo la curva y la diferencia en esta área esperando que sea mayor, lo que implica mayor trabajo requerido para remover el péptido probado. Se puede ver en los 3 gráficos un aumento de área, pero no se conoce cuál de estos es mejor, debido a esto se decidió acoplar todos los resultados en una misma figura para una mejor comparación entre sí, lo que dio como resultado la figura 21.

Fuerza v/s Extension

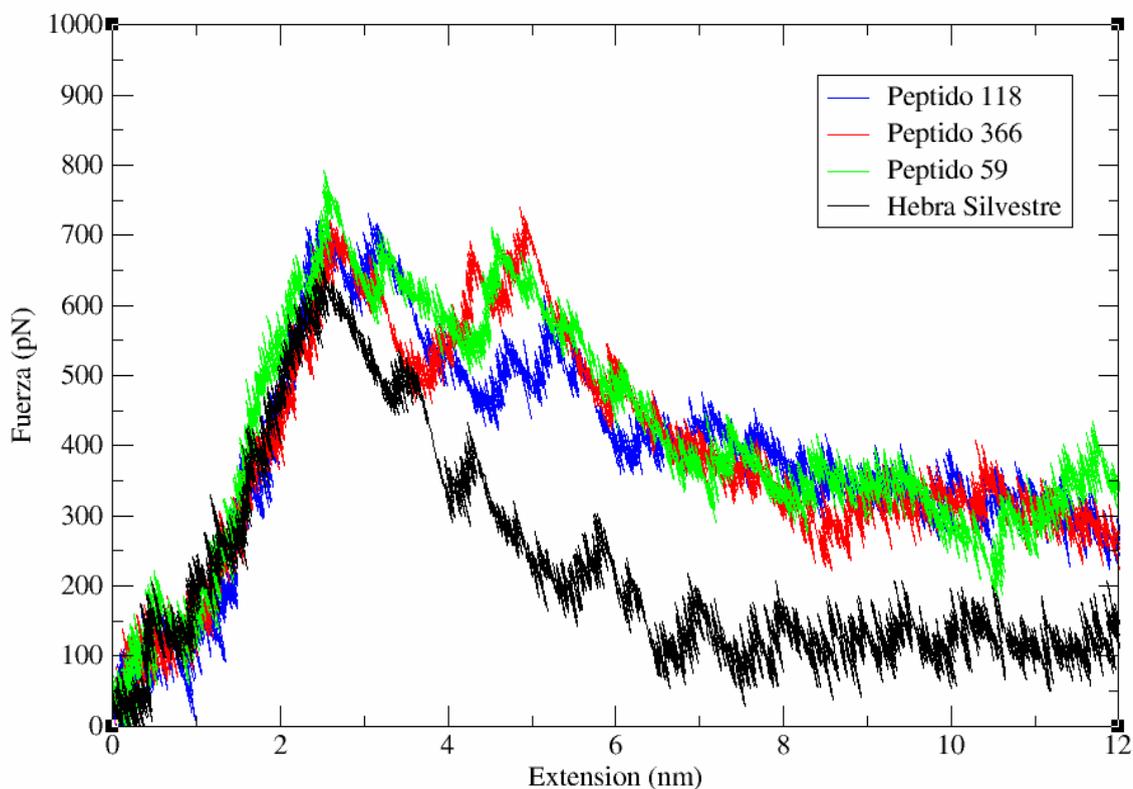


Figura 21: Gráfico donde se muestra una unión de todas las gráficas obtenidas de cada péptido a la hora de medir el trabajo requerido para remover dicho péptido del bolsillo, todos estos comparados al péptido que se encuentra en la hebra silvestre. Los péptidos probados son 118(azul); 366(rojo); 59(verde).

Al obtener los resultados de todos los péptidos probados, además de la hebra nativa es necesario calcular el área bajo la curva. Para esto se utilizó el programa igor, el cual muestra en la figura 22 como es una comparación del valor del área bajo cada una de estas curvas con respecto a la hebra nativa (control).

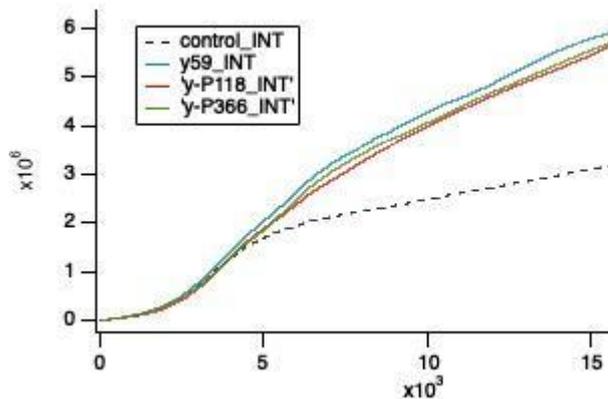


Figura 22: Una comparación que muestra las diferencias en valor del área bajo la curva de cada uno de los péptidos anteriormente mostrados, para así poder determinar cuánto es la mejoría en cuanto al trabajo requerido para su remoción de dichos péptidos en comparación a la hebra silvestre(control).

Se puede ver que el péptido 59 posee la mayor cantidad de área bajo la curva, este en la figura 22 se ve de color celeste, pero aún no se conoce cuanto mejor es este péptido con respecto a los otros. Debido a esto, se utilizó una metodología poco convencional, la cual implica imprimir cada una de los resultados obtenidos, es decir, las curvas de los gráficos Fuerza y Extensión, recortar el área bajo la curva de cada una de estas y estandarizar el valor por medio del peso de cada uno de estos recortes, los resultados obtenidos de estos se pueden visualizar en la tabla 10.

Nombre	Masa (g)	Masa normalizada	% Mejoría
Nativa	0,7782	0	0,00%
Péptido 118	1,1184	0,3402	34,02%
Péptido 59	1,2161	0,4379	43,79%
Péptido 366	1,2625	0,4843	48,43%

Tabla 10: Tabla en la que se muestra una estandarización de los resultados, para demostrar la mejoría de trabajo de cada uno de los péptidos estudiados, utilizando la masa obtenida luego de masar el área bajo la curva recortada del gráfico impreso. La segunda columna es el valor obtenido en gramos, y la siguiente columna es el valor de la curva nativa siendo restada a cada uno de dichos valores y la última columna muestra el valor normalizado en porcentaje que se denomina mejoría.

Como se mencionó anteriormente la tabla 10, muestra el resultado luego de masar el área recortada de cada curva previamente obtenida, si bien ya se conocía cuál era el mejor péptido, acá se puede visualizar cuánto mejor es en porcentaje cada uno de los péptidos. Concordando con el resultado de igo, el cual arrojó que el péptido 59 es el mejor, ya que presenta una mejoría de 48% en

comparación con la hebra nativa, lo cual nos indica que se requiere un 48% más de trabajo para remover este péptido de la proteína.

DISCUSIÓN

La presencia de enlaces isopeptídicos juegan un papel de alta importancia en la virulencia y potencial patológico de bacterias Gram positivo, haciéndolas resilientes a actividad proteolítica además de otorgar resistencias a desafíos térmicos y mecánicos (57). En el caso de *Streptococcus pneumoniae*, bacteria capaz de generar una serie de enfermedades infecciosas entre las que se encuentran meningitis y neumonía, estas enfermedades si bien presentan tratamiento, pueden complicarse y poner en riesgo a la persona que las presente.

En este trabajo se desarrolló la idea de generar un péptido con la capacidad de intervenir la formación de uno de los enlaces isopeptídicos de la adhesina RrgB de *S.pneumoniae*, a modo de solución en contra de la adherencia de esta bacteria al huésped, produciendo así una molécula más afín que las estructuras presentes de RrgB y a su vez más estable para que de esta forma se genere una unión de carácter irreversible, comprometiendo así la estabilidad estructural silvestre de esta bacteria.

Para conocer qué dominio se debe intervenir se realizó una búsqueda en la literatura, la cual indicaba que el primer dominio D1 presentaba un rol más importante de carácter estructural, en comparación a los tres dominios restantes. El diseño del péptido que tendrá la función de intervenir en el dominio D1 de la proteína depende de 2 partes. Primero, decidir qué enlace se desea intervenir dada las capacidades miméticas de la molécula, con tal de que la estructura del péptido pueda ser reconocida con la proteína para que así se pueda garantizar una buena afinidad (58) y segundo definir en qué posición irá la asparagina que va estrechamente relacionado con el primero punto. Se decidió que la asparagina sea el aminoácido fijo y no la lisina, dicha decisión no es trivial, ya que como se demostró en la investigación de Rivas y cols. (42) el momento que se realiza la intervención es crucial para el éxito de esta propuesta cuando se migre de un ambiente *in silico* a uno *in vitro* e incluso *in vivo*. Como bien se mencionó en el apartado de introducción los enlaces isopeptídicos de RrgB se forman entre aminoácidos de lisina y asparagina, y, una característica en común entre ellos es que la lisina siempre está río arriba de la asparagina. Esto quiere decir que cuando la adhesina

esta en vías de expresión, en otras palabras, cuando la cadena polipeptídica sale desde el ribosoma para adquirir su estructura terciaria en la membrana plasmática previo al mismo anclaje de la adhesina al peptidoglicano (59), la primera parte en salir hacia el espacio extracelular es precisamente la sección con el aminoácido de lisina. De esta manera el péptido debería ser capaz de unirse a esa sección específica antes que ocurra el plegamiento de la proteína y por ende antes que se exprese la sección con la asparagina. Siguiendo con el diseño del péptido se mencionó que se dejó como término fijo la Asn en la cuarta posición, debido a que este aminoácido posee dicha posición en el péptido original extraído de la cadena silvestre. Una vez aplicado el proceso de escaneo de alaninas se vio en algunos casos que cuando se reemplaza un aminoácido de la secuencia la afinidad subía. Por lo general, los reemplazos que se hicieron en esas posiciones específicas fueron la mayoría de los casos por aminoácidos con cadenas laterales de carácter hidrofóbico como la misma valina u otros aminoácidos con anillos aromáticos. Esto se relaciona con una característica estructural de los isopéptidos, siendo estos rodeados por residuos hidrofóbicos y aromáticos (60).

Respecto al proceso de refinamiento de péptidos, este se hizo adecuando a condiciones *in silico* una metodología de escaneo de alaninas, que generalmente se usa realizando mutaciones sitio dirigidas para evaluar la funcionalidad o estabilidad de una proteína bajo condiciones definidas dependiendo del diseño experimental que se desea seguir (61). Específicamente hablando se utilizó el programa de RPG que posee las características para estandarizar dicho proceso, y así poder facilitar las mutaciones sitio dirigidas que se mencionan, ya que se pueden seleccionar las posiciones pertenecientes a este péptido que serán modificadas. RPG que posee todos estos programas integrados que facilitan la creación y análisis de péptidos como lo son Chimera, Autodock Vina y Pymol. entrega los resultados con un valor de afinidad definido, el cual se utilizó como medida para así poder definir qué mutaciones refinan el péptido, esta medida de afinidad está en un valor negativo, ya que representan la energía liberada durante la unión del ligando al sitio de unión, lo que también se traduce como la energía necesaria para comprometer dicha unión (62).

En cuanto a los resultados obtenidos de este proceso de refinamiento se debe aclarar que se ejecutaron 5 modificaciones posteriores al escaneo de alaninas, cabe destacar que cada una de las modificaciones corresponde a una alteración en dos posiciones del péptido original, tomando como primera modificación las 2 mejores posiciones obtenidas del escaneo de alaninas, como se puede ver en la Tabla 3, esta se ven dos péptidos con afinidades superiores al péptido original, el primer péptido sería el número 4 con una afinidad de -8.2 y el segundo sería el péptido número 5 con una afinidad de -7.2, si bien este último no era el segundo más alto obtenido se escogió de manera arbitraria ya que de todas formas se encontraba entre los mejores resultados. Luego de definir qué posiciones se modifican se ingresan estos datos a RPG indicando que en la tercera y quinta posición

se iteran entre los 20 aminoácidos posibles, generando de esta forma 400 péptidos a analizar, este número no es arbitrario, ya que en ese momento dicho el programa no poseía la capacidad de analizar a fondo una mayor cantidad de péptidos, de esta forma uno se asegura que todos los péptidos son analizados, al acabar dicho análisis se selecciona un valor de afinidad y entrega los mejores péptido con respecto a ese valor escogido, para los análisis siguientes se mantuvieron los aminoácidos que más se repetían entre los mejores resultados o los que poseían una mejor afinidad, este proceso se repitió 4 veces más, dando como resultado péptidos con una afinidad mucho mayor al original eligiendo como el “mejor” péptido al número 118 de la quinta modificación con una afinidad de -11.3, que en comparación a la afinidad de -6.8 del péptido original se ve a simple vista un gran aumento de esta. Estructuralmente hablando las diferencias entre este péptido y su predecesor no son muchas, este posee una estructura de YPGNWPW y el péptido original YPKNTEA, el péptido tiene 4 modificaciones en donde 2 de ellas son triptófanos aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas, una glicina y una prolina, lo cual tiene mucho sentido si tomamos en cuenta lo mencionado anteriormente que los enlaces isopeptidicos son mucho más afines a ambientes hidrofóbicos.

Se dio paso al análisis de este péptido más a fondo utilizando servidores para ver como se visualizar electrostáticamente la molécula, utilizando el servidor APBS de poisson y boltzmann, donde se pudo ver que si bien la molécula no posee una predominancia en carga ya que hay zonas donde predomina un color por sobre otro está claramente estructurado como se ve en la figura 12. Luego se analizo esta molecula en un servidor que ejecute Procheck, en donde se vieron los resultados obtenidos del grafico de Ramachandran, la finalidad de este grafico es ver la viabilidad biologica de la molecula, sabiendo que este grafico se divide en cuadrantes y a su vez se ven las estructuras terciarias a las que pertenecería la molécula a analizar, cómo se visualiza en la figura 14 se ve un punto negro ubicado en el cuadrante superior izquierdo específicamente hablando en la zona roja demarcada con una “B” lo que significa que este peptido formará una estructura de beta plegada, lo cual indica que es sumamente compatible con la proteína, ya que el enlace isopeptídico como se menciona anteriormente se forma entre cadenas, y la estructuraterciaria predominante de la adhesina es de beta plegada. Este análisis muestra en la parte inferior del gráfico una descripción de los resultados del gráfico, además de la cantidad de aminoácidos analizados.

Con respecto a la caracterización mecánica de la proteína, se comenzó este proceso realizando dinámicas moleculares utilizando la proteína sin ningún tipo de modificación también llamada en estado silvestre, para poder así determinar cual es el aporte energético que tienen los enlaces isopeptidicos pertenecientes a RrgB cuando esta se ve sometida a una fuerza mecánica externa.

Como se utilizó literatura para determinar qué dominio era el más influyente, no hubo necesidad de ejecutar dinámicas para cada dominio, por ende las simulaciones sólo se realizaron en el dominio D1 de la proteína. Los resultados obtenidos de la modificación del enlace isopeptídico que se encontraba en el dominio D1 de la proteína se pueden visualizar en la figura 18, en esta se comparan los gráficos obtenidos luego de cada una de las dinámicas realizadas, en esta se puede ver a simple vista como la proteína en estado nativo tiene una resistencia mecánica mucho más fuerte que su contraparte modificada, lo que también puede ser visualizado con la extensión total que presenta la proteína, como se ve en la gráfica de color rojo la proteína logra una extensión cercana a 95 nm lo cual es casi el triple que la elongación de la proteína en estado silvestre, esto concuerda con lo dicho en la literatura obtenida en conjunto al cristal de la proteína, donde se explica la importancia de cada dominio y específicamente se habla de que el dominio D1 posee el mayor aporte a la resistencia mecánica, además de formar parte del mecanismo de unión entre distintas proteínas de RrgB, formando así la cadena que conforma la adhesina de *Streptococcus pneumoniae*, como se explicó previamente en la introducción(37). El punto anterior también puede ser usado para darle validez al uso del péptido como interferente del proceso de adhesión, dada la capacidad que tienen los péptidos antimicrobianos para desestabilizar estructuras proteicas (63), dado el hecho que el péptido diseñado en este trabajo tendrá como función prevenir la formación del enlace isopeptídico lo que causa irregularidades en el plegamiento y adquisición de estructura secundaria.

En cuanto a los resultados obtenidos por las dinámicas ligando – proteína, y como se bien se mencionó en el apartado de resultados, se eligieron 3 péptidos para ser utilizados en dichas dinámicas para así poder comparar los resultados. Recordar que las afinidades mostradas por un proceso de acoplamiento molecular se representan con valores negativos ya que representan la energía liberada durante la unión del ligando al sitio de unión, lo que también se traduce como la energía necesaria para comprometer dicha unión (62). Teniendo en cuenta lo anterior se esperaba que a afinidades más altas las fuerzas de desprendimiento reportadas fueran más altas, lo que no se vio en los experimentos realizados, si bien todos los péptidos escogidos poseen una afinidad mucho mayor en comparación al péptido silvestre y entre ellos se encontraba el péptido número 118 que fue el que obtuvo la afinidad más alta en el proceso de refinamiento de péptidos, este no fue el que nos entregó la mayor fuerza a la hora de desprenderse del sitio de unión durante las dinámicas. Como se mencionó en el apartado de los resultados, se tomaron los péptidos 118 con una afinidad de 11.3; el péptido 59 con una afinidad de 10.5 y el péptido 366 con una afinidad de 10.9, todos poseen afinidades con valor superior al 6.8 del péptido original, y durante las SMD todos mostraron resultados satisfactorios en cuanto a la fuerza como se ve en la figura 19, tomando en cuenta que el

área que se forma bajo cada una de las gráficas, corresponde al trabajo necesario para remover dicho péptido del sitio de unión. Pero aun así el péptido 118 que posee el valor más alto de afinidad obtenido luego del refinamiento fue el que obtuvo peores resultados en comparación a los otros péptidos estudiados, esto da a entender que los péptidos que poseen mejores resultados en cuanto a la fuerza mostrada poseen características en su composición aminoacídica que le dan ventajas por sobre el resto de las cadenas. Como se explicó anteriormente, aminoácidos hidrofóbicos y aquellos con anillo aromático juegan un papel de alta importancia al momento de formar los isopéptidos en condiciones naturales, como se explicó anteriormente el péptido que presenta la mejor afinidad tuvo cuatro cambios en su estructura que le brindaron esta afinidad, siendo dos de estos triptófanos dando una estructura YPGNWPW lo que corrobora lo anteriormente descrito, al comparar el mejor péptido 118 con los otros dos escogidos para determinar si los cambios estructurales hacia aminoácidos hidrófobos se reiteraba en sus estructuras, se pudo notar que el péptido 59 poseía una estructura YPGNWPW y el péptido 366 una estructura YPGNWPW, todos poseen cambios estructurales que implican aminoácidos hidrófobos lo que justifica, la afinidad demostrada en los análisis anteriores. Con respecto a la mejoría en cuanto a fuerza necesaria para su remoción, puede ser explicada por la misma estructura de los péptidos, si bien, el péptido 118 posee la mejor afinidad este no posee tan buenos resultados durante la prueba de trabajo en comparación con los otros 2 péptidos, esto se puede explicar debido a las diferencias en los aminoácidos que se encuentran luego de la Asparagina(N). El triptófano(W) que se caracteriza por poseer una cadena lateral con un grupo indol, siendo este un compuesto orgánico bicíclico con un anillo de 6 miembros(benceno) unido a uno de 5 miembros(pirrol), posee una estructura mucho más grande en envergadura que otros aminoácidos, lo que podría explicar porque el péptido 118 que posee dos triptófanos no requiere tanto trabajo para ser removido, ya que este se acopla con mayor dificultad a la cadena complementaria. Esto también puede explicar cómo puede una histidina(H) presente en el péptido 59 y una fenilalanina(F) presente en el péptido 366, generar un cambio tan grande en el trabajo requerido, ya que en ambos casos el grupo funcional es más pequeño estructuralmente hablando que el grupo indol presente en el triptofano, la histidina presenta un imidazol como grupo funcional, el cual se caracteriza por ser un anillo pentagonal nitrogenado y la fenilalanina posee un benceno como su grupo funcional. En los complejos proteína-proteína ocurren muchos tipos de interacciones, no solo estructurales y uno de estos se llama interacción del catión π , la cual representa una fuerte unión de carácter no covalente que suele suceder entre cadenas laterales de aminoácidos aromáticos como los la Fenilalanina, Tirosina y el Triptófano, lo que provee de una superficie de potencial electrostático negativo la cuál es altamente afín por aminoácidos catiónicos (64-65). Tomando en consideración la estructura presente en el enlace donde se encuentra Lys-41

específicamente hablando de la estructura DMDKIAN, el aminoácido donde se unirá nuestro péptido, podemos ver que la carga electrostática presente es mayoritariamente positiva, por la presencia de un aminoácido de Lys, por lo que se puede determinar que la diferencia en fuerzas mostradas en las simulaciones de proteína-ligando, están estrechamente relacionadas con el aminoácido Asn presente en los péptidos interactuando con el aminoácido de Lys presente en la cadena complementaria, asuvez de los aminoácidos que componen el péptido interactuando entre pi para formar interacciones del catión π , aumentando así la fuerza generada, pero aun así tomando en cuenta las interacciones estequiométricas que dichos péptidos generan, ya que el tamaño del péptido es un factor que hay que tomar en consideración, haciendo referencia al tamaño de las cadenas laterales de este y no de la longitud en sí. Debido a estas razones se puede entender como el programa de Vina entregó un resultado de afinidad, que no era congruente con los resultados mostrados en la Tabla 10, ya que los algoritmos que componen Vina no toman en consideración la interacción del catión π , ni otros tipos de factores que puedan discernir la mejoría de un péptido por sobre otro.

Esta área de estudio que implica el desarrollo de péptidos anti-adhesivos genera un gran interés en la actualidad, debido a la gran capacidad de combate que tienen estos en contra de bacterias específicas, impidiendo que estas se adhieran y a su vez afecten al huésped, permitiendo así combatir de forma paralela la crisis que existe referente a la resistencia de antibióticos lo que dificulta el tratamiento de varias enfermedades, en este caso las enfermedades neumocócicas.

PROYECCIONES

Los resultados presentados en este trabajo abren las puertas para un posible tratamiento para combatir el desarrollo de enfermedades infecciosas relacionadas a la bacteria *Streptococcus pneumoniae*. A un futuro, dada la naturaleza *in silico* de los resultados obtenidos, éstos deben ser extrapolados para comenzar una fase de experimentación *in vitro* con tal de poder evaluar el potencial biológico de la propuesta. Dentro de ella, se tiene que evaluar la efectividad del péptido en ensayos de molécula individual con tal de simular cómo actuaría este *in vivo*, resultados que según las mismas simulaciones hechas dentro del desarrollo de esta propuesta deberían dar buenos resultados. En cuanto al potencial biotecnológico del péptido este podría ser acoplado a un inhalador ya que gracias a este medio facilita el llegar a las áreas afectadas que usualmente son las vías aéreas . Este proyecto da los primeros pasos hacia estrategias de desarrollo de moléculas capaces de intervenir la catalización de enlaces relacionados a la estabilidad de bacterias Gram - positivo, logrando de igual manera intervenir procesos de adhesión relacionados.

CONCLUSIONES

- Mediante el uso de herramientas *in silico* fue capaz de generar una molécula que imita la estructura nativa del dominio D1 y es más afín en comparación a la estructura silvestre, modificando la elasticidad de la adhesina de *Streptococcus pneumoniae*, cumpliendo así lo propuesto en la hipótesis del trabajo.
- El protocolo propuesto de utilizar RPG como programa de acoplamiento molecular para la búsqueda y análisis de péptidos, representó una rápida y efectiva manera para encontrar candidatos con buen potencial para realizar intervención molecular, además de la capacidad de evaluación de forma rápida permitiendo una evaluación no solo más rápida, sino a su vez más extensa.
- Se logró realizar de las primeras caracterizaciones mecánicas respecto a cómo funcionan los enlaces isopeptídicos que se encuentran en la proteína RrgB, logrando de igual manera identificar cómo estos poseen gran importancia mecánica en la proteína.
- Se logró evaluar mecánicamente el comportamiento de la proteína, con los péptidos seleccionados y con la ausencia de estos, los péptidos analizados lograron el objetivo de ser más afines que el nativo, sentando así las bases para poder extrapolar estos resultados a un modelo con condiciones *in vitro*.

