



UNIVERSIDAD  
**MAYOR**

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias  

---

**ESCUELA DE  
BIOTECNOLOGÍA**

---

**Desarrollo de un péptido bloqueador del enlace isopeptídico de la proteína  
del pilus *Corynebacterium diphtheriae***

Vicente Alberto Colarte Contreras

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Santiago - Chile  
2022



UNIVERSIDAD  
**MAYOR**

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias  

---

**ESCUELA DE,  
BIOTECNOLOGÍA**

---

**Desarrollo de un péptido bloqueador del enlace isopeptídico de la proteína  
del pilus *Corynebacterium diphtheriae***

Vicente Alberto Colarte Contreras

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Tutor: Dr. Jaime Andrés Rivas Pardo

Santiago - Chile  
2022

*“No sé cuánto tiempo he estado aquí”  
-Dr. Mann, Interstellar*

## **Agradecimientos**

Doy gracias a la Universidad Mayor y a la Escuela de Biotecnología por permitirme desarrollarme como científico, siguiendo mis convicciones e ideales. Doy gracias a los docentes que a lo largo de la carrera me inspiraron y me mantuvieron centrado en mi formación. Agradezco a el Dr. Jaime Andrés Rivas Pardo y al Dr. Sebastián Reyes Cerpa por permitirme desarrollar mi tesis en su laboratorio, guiándome desde los inicios y esperando siempre lo mejor para mí en mi desarrollo tanto como persona como profesional. Agradezco a todos los integrantes del laboratorio de Biología Mecánica y al Centro de Genómica Microbiana por estar en constante apoyo y por brindarme una increíble experiencia durante esta investigación, con mención especial a Ivana Orellana por su ayuda en los sistemas computacionales y a Mateus Frazão por su buena disposición y amabilidad en los experimentos en el laboratorio.

Quiero agradecer con todo mi ser a mi mamá, papá, hermanos y a mi polola Ignacia Tapia por estar presentes en todo este proceso de formación como en el desarrollo de esta investigación. Escuchándome reclamar, intentando enseñarles sobre cosas que posiblemente no les interesaban o incluso para pasar una buena sobremesa en los almuerzos. Gracias por los abrazos, las lágrimas y las celebraciones de mis pequeños logros, por los pequeños pasos que fui dando en estos años.

Gracias a mis amigos y compañeros, por estar presentes en mi vida, por ayudarme a dar ese último esfuerzo en cada dificultad, por ser un hombro para llorar o para reír. Quiero agradecer profundamente a mis compañeros de generación Guillermo Albornoz, Sebastián Oyarce, Juan González, Tomás Hermsilla, Valentina Urbina, Bárbara Saavedra y María Jesús Araya, que me ayudaron a lo largo de la carrera y a lo largo de la tesis. Gracias por alegrar esos pequeños momentos en los que creíamos que todo estaba perdido.

## **Información del Laboratorio y Centro de Investigación**

### **Centro de Genómica y Bioinformática – Universidad Mayor**

El desarrollo de esta tesis se llevó a cabo en el Centro de Genómica y Bioinformática (CGB) de la Universidad Mayor, dirigido por la Dra. Elena Vidal. El CGB se organiza en tres unidades dedicadas a la investigación fundamental y aplicada: Laboratorio de Bioinformática, Laboratorio de Genómica Vegetal y Laboratorio de Genómica Microbiana.

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

Este trabajo de investigación, asociado al grupo de investigación del Dr. Rivas Pardo, se enmarcó en la propuesta relacionada al entendimiento de los mecanismos involucrados en la elasticidad del músculo estriado–*Mecano-Fisiología de Titina*–, proyecto de investigación apoyado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) mediante el fondo de investigación FONDECYT (11180705). Dentro de esta propuesta se planteaba como parte de sus objetivos específicos la implementación de una plataforma de biología molecular para la expresión de proteínas tándem y la caracterización de proteínas elásticas. Además, el trabajo teórico como experimental incluido en la tesis consto con el apoyo de fondos internos de la Universidad por medio del FDP 2021-20 PEP I-2022017.

## Abreviaturas

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **AMP:** Ampicilina
- **PAMs:** Péptidos antimicrobianos
- **bp:** Pares de bases, del inglés *base pairs*
- **CAM:** Cloranfenicol
- **CIP:** Fosfatasa Alcalina intestinal de ternera, del inglés *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*
- **CWSS:** Señal de la sortasa de la pared celular, del inglés *Cell Wall Sorting Signal*
- **DTT:** Ditioneitol
- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- **IPTG:** Isopropil-  $\beta$ -D- 1-tiogalactopiranosido
- **KAN:** Kanamicina
- **Kb:** Kilobases
- **kDa:** KiloDaltons
- **LB:** Luria-Bertani
- **NTC + H<sub>2</sub>O:** NTC con agua libre de nucleasas
- **NTC:** Control sin templado, del inglés *No Template Control*
- **PBS:** Tampón fosfato salino, del inglés *Phosphate Buffered Saline*
- **PCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa, del inglés *Polymerase Chain Reaction*
- **PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- **RAM:** Resistencia antimicrobiana
- **RMSD:** Raíz del Error Cuadrático Medio, del inglés *Root Mean Square Deviation*
- **RPM:** Revoluciones por minuto
- **RCF:** Fuerza centrífuga relativa, del inglés *Relative Centrifugal Force*
- **SDS:** Dodecilsulfato sódico
- **TEMED:** N', N', N', N'- tetrametiletildiamina
- **TET:** Tetraciclina
- **TRIS:** Tris- (hidroximetil)-aminometano

## Índice

Resumen.....	ix
Summary .....	x
Capítulo 1: Introducción y Marco teórico .....	1
- 1.1 Crisis mundial de Antibióticos.....	1
- 1.2 Bacterias Gram-Positivas.....	4
- 1.3 <i>Corynebacterium diphtheriae</i> y la enfermedad de la difteria .....	6
- 1.4 Formación de Pilinas en <i>Corynebacterium diphtheriae</i> .....	7
Capítulo 2: Hipótesis y Objetivos .....	12
Capítulo 3: Materiales y Métodos.....	13
Capítulo 4: Resultados.....	32
- 4.1 Rosetta produce diferentes interacciones del péptido con la proteína SpaD .....	32
- 4.2 Generación vector de expresión con SpaD .....	40
- 4.3 La secuencia codificante de SpaD se insertó con éxito en el vector de expresión pFN18a HaloTag® .....	41
- 4.4 SpaD se expresa en conjunto con la proteína de fusión HaloTag® .....	43
- 4.5 Intervención de la formación del enlace isopeptídico del Dominio 3 de SpaD .....	45
Capítulo 5: Discusión .....	47
Capítulo 6: Conclusiones .....	54
Capítulo 7: Implicancias y Proyecciones .....	55
Capítulo 8: Referencias .....	56
Anexos.....	65

## Índice de Figuras

Capítulo 1: Introducción y Marco teórico .....	1
- Figura 1.1 Línea de tiempo comparativa de la introducción clínica de antibióticos versus resistencias .....	2
- Figura 1.2 Representación gráfica mecanismos de adhesión de bacterias Gram-negativas y bacterias Gram-positivas .....	5
- Figura 1.3 Representación gráfica de la función de la sortasa en la formación de pilinas en bacterias Gram-positivas .....	9
- Figura 1.4 Estructura completa de la subunidad mayor SpaD de una de las pilinas de <i>C. diphtheriae</i> .....	10
Capítulo 3: Materiales y métodos .....	13
- Figura 3.1 Representación gráfica de la mutación del enlace isopeptídico en dominio 3 de SpaD .....	17
- Figura 3.2 Representación gráfica del constructo final de SpaD para trabajos de clonamiento o expresión .....	19
- Figura 3.3 Diagrama de flujo de la expresión de SpaD.....	23
- Figura 3.4 Diagrama de flujo de la expresión de SpaD parte 2 .....	24
- Figura 3.5 Diagrama de flujo de la purificación de SpaD.....	25
- Figura 3.6 Representación del constructo generado para la expresión del péptido .....	27
- Figura 3.7 Diagrama de flujo de la expresión del péptido y SpaD.....	29
Capítulo 4: Resultados.....	32
- Figura 4.1 Gráfico representativo de los 60.000 resultados obtenidos en <i>Rosetta</i> .....	32
- Figura 4.2 Gráfico representativo de los 60.000 resultados del péptido control (PolyG) obtenido en <i>Rosetta</i> .....	34
- Figura 4.3 Gráfico representativo de los ensayos del péptido candidato y del péptido control ..	37
- Figura 4.4 Visualización de los diez mejores resultados generados por <i>Rosetta</i> .....	38
- Figura 4.5 Visualización de los diez mejores resultados del péptido control PolyG generados por <i>Rosetta</i> .....	39
- Figura 4.6 Representación del vector de expresión <i>pFN18a HaloTag® SpaD CC</i> .....	41
- Figura 4.7 Electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v con digestiones vector de expresión <i>pFN18a HaloTag® SpaD CC</i> .....	42
- Figura 4.8 Expresión y purificación de SpaD-HaloTag® .....	43
- Figura 4.9 Expresión y purificación de expresión secuencial del Péptido-SpaD .....	45

## Resumen

Las bacterias son probablemente el dominio del árbol de la vida que ha logrado colonizar y habitar el mayor número de nichos ecológicos de la tierra. Las bacterias por sí solas abarcan cerca del 70% de la biomasa total de la superficie terrestre, teniendo una función crítica y vital en la sustentabilidad de nuestro medioambiente.

Dentro de los hábitats u hospederos que las bacterias colonizan están precisamente los tejidos humanos. Por medio de anclas moleculares, conocidas como pili, bacterias logran adherirse a múltiples superficies, desencadenando la formación de biopelículas y otras estructuras propias de la infección. En el caso de bacterias Gram-positivas, los pili están constituidos por cientos de subunidades de proteínas que se encuentran covalentemente ligadas entre sí configurando un filamento proteico que en ocasiones supera los micrones de largo.

En microorganismos como *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*), agente etiológico de la enfermedad difteria, el uso del pilus como medio de adherencia es un paso crítico para poder establecer la infección en el hospedero. Las subunidades de la proteína estructural del pilus son conocidas como SpaD, las que cuentan con un enlace isopeptídico intramolecular el cual les otorga estabilidad y resistencia al desplegamiento mecánico.

Debido a estas características de adherencia es que en los últimos años múltiples esfuerzos han sido dirigidos en emplear el pilus de bacterias patógenas como blanco para el desarrollo de posibles tratamientos para infecciones. A diferencia de los antibióticos tradicionales, los cuales pierden cada vez más efectividad debido a la aparición de bacterias multirresistentes, el desarrollo de sistemas que tienen como objetivo interferir en los mecanismos de adhesión parecieran seguir una estrategia que logra evadir el desarrollo de resistencia.

En este trabajo de tesis se buscó realizar la intervención del enlace isopeptídico del dominio 3 de la subunidad SpaD de la pilina de *C. diphtheriae* mediante la implementación de un péptido bloqueador. Utilizando simulaciones computacionales se adecuó el largo y motivo del péptido bloqueador. Además, fue necesario el diseño de los vectores de expresión apropiados para permitir la expresión secuencial de SpaD y el péptido bloqueador. Los resultados sugieren que cuando la proteína SpaD es expresada junto al péptido fusión SNAP-Tag, una fracción de las proteínas logra ser intervenida covalentemente con el péptido, consecuencia de una unión de un enlace intermolecular entre SpaD y el péptido. De este modo, nuestros resultados abren la posibilidad a futuras implementaciones terapéuticas contra bacterias patógenas donde los antibióticos tradicionales han fallado.

## Summary

Bacteria are probably the domain of the tree of life that has managed to colonize and inhabit the largest number of ecological niches on earth. Bacteria alone comprise about 70% of the total biomass on the earth's surface, playing a critical and vital role in the sustainability of our environment.

Within the habitats or hosts that bacteria colonize are precisely human tissues. Through molecular anchors known as pili, bacteria manage to adhere to multiple surfaces, triggering the formation of biofilms and other structures typical of infection. In the case of Gram-positive bacteria, the pili are made up of hundreds of protein subunits that are covalently linked to each other, forming a protein filament that sometimes exceeds microns in length.

In microorganisms such as *Corynebacterium diphtheriae*, the etiological agent of diphtheria disease, the use of the pilus as a way of adherence is a critical step to establish the infection in the host. The pilus structural protein subunits are known as SpaD, which have an intramolecular isopeptide bond which gives them stability and resistance to mechanical unfolding.

Due to these adherence characteristics, several efforts have been directed in recent years to use the pilus of pathogenic bacteria as a target for the development of possible treatments for infections. Unlike traditional antibiotics, which are losing more and more effectiveness due to the appearance of multi-resistant bacteria, where the development of pili-based systems could follow mechanisms that avoid the development of resistance.

In this thesis, we aimed to develop a peptide-based tool for the intervention of the isopeptide bond of domain 3 of the SpaD subunit of *C. diphtheriae* pilin through implementing a peptide blocker. Using computational simulations, we selected the length and the motif of the peptide blocker. Also, the development of appropriate DNA vectors to enable the sequential expression of SpaD and the peptide blocker. The results suggest that when the SpaD protein is expressed together with the SNAP-Tag fusion peptide, a fraction of the proteins manages to be intervened covalently with the peptide, a consequence of a binding of an intermolecular bond between SpaD and the peptide. In this way, our results open the possibility for future therapeutic implementations against pathogenic bacteria where traditional antibiotics have failed.

## **1. Introducción y Marco teórico**

### **1.1 Crisis Mundial Antibióticos**

Las bacterias son probablemente el dominio del árbol de la vida que ha logrado colonizar y habitar el mayor número de nichos ecológicos de la tierra (1). Estas abarcan cerca del 70% de la biomasa total de la superficie terrestre, teniendo una función vital en la sustentabilidad del medioambiente (2). Gracias a su gran adaptabilidad, los microorganismos de este dominio pueden actualmente habitar ambientes de alta acidez, temperaturas extremas, responder a cambios de humedad, colonizar suelos con alta disponibilidad de sales y metales tóxicos (3). Dentro de los ambientes capaces de ser colonizados, se encuentran los organismos vegetales y animales, donde en este último resalta el ser humano (4). Este cuenta con un conjunto de microorganismos presentes en diferentes partes del cuerpo, este conjunto es conocido como microbiota (5), esta se caracteriza por estar constituida principalmente por bacterias comensales (6). Sin embargo, también puede ser objeto de colonización por parte de bacterias patógenas, siendo las causantes de enfermedades o cuadros infecciosos (7). Estos agentes patógenos deben poder subsistir en este ambiente hostil, donde deberán utilizar un repertorio de estrategias, incluyendo señales químicas y esfuerzos mecánicos para poder mantenerse en el hospedero (3,8).

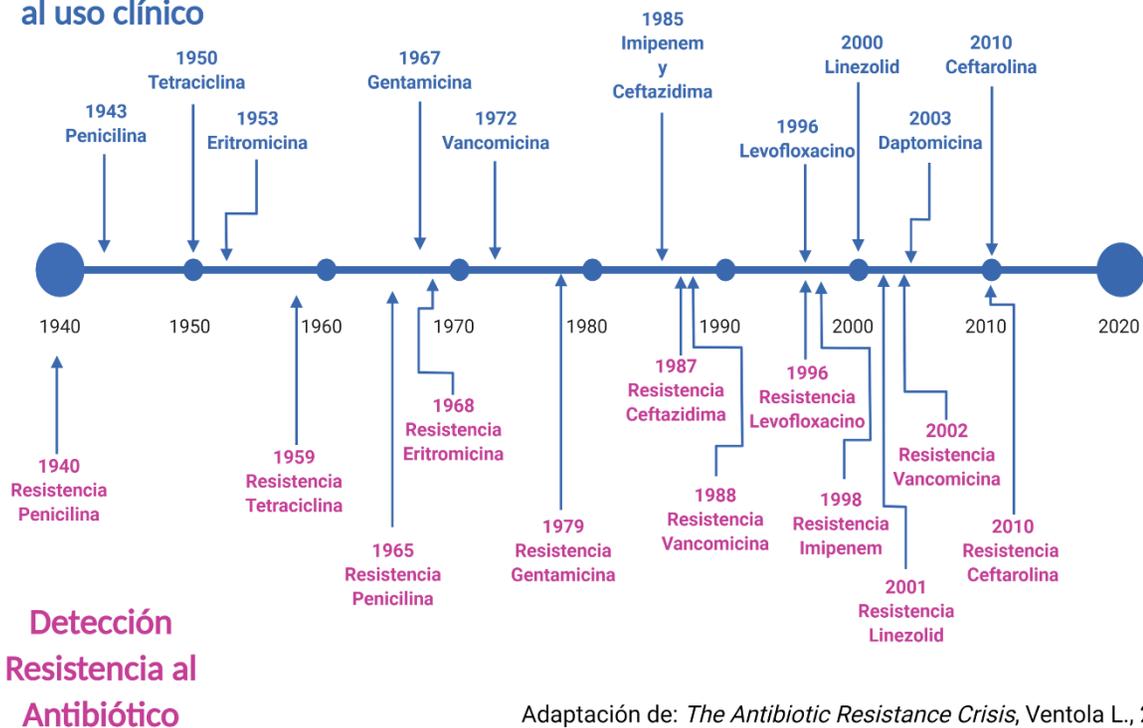
Las bacterias han tenido la posibilidad de adaptarse de manera adecuada a los ambientes durante miles de años, donde rutinariamente han sido sometidas a competir no sólo por los nutrientes disponibles, sino que además por sobrevivir a moléculas que limitan su crecimiento (9). En muchas ocasiones, compuestos producidos por organismos que cohabitan en los mismos nichos ecológicos, controlan el desarrollo de las bacterias (10). El ejemplo mejor conocido de estos compuestos son los antibióticos, productos naturales que son tóxicos para las bacterias y que en la actualidad se utilizan de manera frecuente como drogas, precisamente para el tratamiento de colonizaciones de tejidos, más bien conocidas como infecciones bacterianas (11,12).

En la era pre-antibiótica, la bacteriemia, presencia de bacterias en la sangre, era común y su mortalidad llegó al 15% de los infectados (8). Después de la introducción de las sulfamidas, antibióticos sintéticos de primera generación (13), es que se implementó para uso clínicos en la década de los 30's, disminuyó la mortalidad por bacteriemia hasta cerca de un 2% (14). No obstante, en 1928 el descubrimiento del bacteriólogo Sir Alexander Fleming, permitió un cambio en el curso de la medicina, instaurando un producto de uso común en la actualidad, la penicilina

(15). Esta tuvo un alto impacto en la historia de la salud, debido a que sería utilizada como el primer antibiótico producido de manera masiva en 1942. La penicilina fue utilizada para tratar a los soldados estadounidenses heridos en combate durante la segunda guerra mundial (16), y posteriormente, se instauró como una nueva estrategia para combatir microorganismos como las bacterias.

La implementación de la penicilina junto a otros antibióticos, como la estreptomina o la neomicina, marcó un hito en la historia dando el inicio a la que conocemos como la era de los antibióticos. Sin embargo, desde 1987 prácticamente no se han descubierto nuevos antibióticos de origen natural (**Figura 1.1**), y, en cambio, se han reemplazado por el desarrollo de variantes generadas por modificaciones químicas en las estructuras de estos, aumentando su eficiencia y eficacia (17). Se estima que esta crisis se produjo debido al alto costo de trabajo, aislamiento y producción que deben hacer las farmacéuticas para poder descubrir o generar antibióticos novedosos (18).

## Introducción del Antibiótico al uso clínico



**Figura 1.1. Línea de tiempo comparativa de introducción clínica de antibióticos versus resistencias.** En la figura se muestra una línea de tiempo que compara los años de introducción de los antibióticos contra el año en el que se presentó algún microorganismo con resistencia al antibiótico (Imagen preparada con BioRender®, www.biorender.com).

Sumado a todo lo anterior, se ha propuesto que el uso de antibióticos de manera profiláctica y no para tratar enfermedades en cultivos, granjas o acuicultura, ha acelerado esta crisis de antibióticos (19,20). Por otro lado, se ha visto que al interior de las Unidades de Cuidados Intensivos la indicación incorrecta de antibióticos ocurre aproximadamente entre un 30-60% de las veces (21). Así mismo, la administración de los antibióticos previos a los resultados de un cultivo bacteriano, la automedicación frente a resfriados de carácter vírico o el incumplimiento de la duración indicada del tratamiento, contribuyen aún más a esta crisis (22). En resumen, existe un uso inadecuado de antibióticos que según datos de estudios epidemiológicos, hay una relación directa entre el consumo de antibióticos y el aumento de cepas resistentes a los mismos (23–25). La razón estaría ligada a la capacidad que poseen las bacterias de transferir genes a sus descendientes o de adquirir segmentos génicos —plásmidos— desde otras bacterias filogenéticamente relacionadas (26), desde donde adquieren herramientas que les permiten evadir la función de los antibióticos.

Se ha propuesto que el desarrollo de Resistencia Antimicrobiana (RAM), ha sido una combinación de múltiples factores como los mencionado anteriormente, cambios graduales que en el tiempo se suman y producen que grupos de bacterias ya no respondan a los fármacos tradicionales (27). Esto último se traduce en que el tratamiento de infecciones sea cada vez más difícil, aumentando el riesgo de propagación de enfermedades, el desarrollo de patologías graves, culminando en la muerte de pacientes (28). De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) introdujo la RAM como una de las diez amenazas de la salud pública a nivel global, estimando que para el año 2050 podría llegar a generar cerca de diez millones de muertes al año (29). Además, en un estudio se estimó que solo una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, mata a más ciudadanos estadounidenses al año que los enfisemas, VIH/SIDA, Parkinson y homicidios combinados (30,31). En Estados Unidos, las infecciones por *S. aureus* significan una carga al sistema de salud, esto se traduce en costos entre \$21.000 a \$34.000 millones de dólares al año y más de 8 millones de días de hospitalización adicionales, todo esto de acuerdo con estadísticas proporcionadas por el sistema de salud pública de Estados Unidos (32). Frente a lo expuesto anteriormente, se hace imperativa la búsqueda de nuevas alternativas al uso de antibióticos.

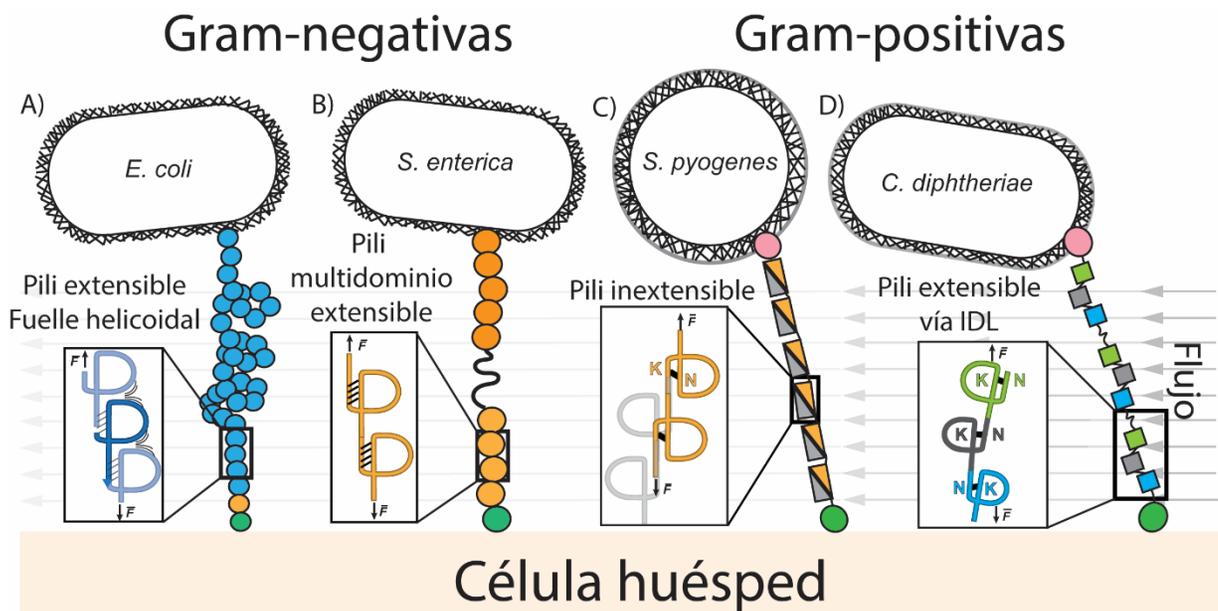
## 1.2 Bacterias Gram-Positivas y su mecanismo de adhesión

Las bacterias pertenecientes a los diferentes filo pueden ser agrupadas de acuerdo con diferencias estructurales de su pared celular. La tinción de Gram es una técnica empleada precisamente para identificar y clasificar estos microorganismos basándonos en algunas diferencias estructurales. Gracias a esta técnica, las bacterias que poseen una pared gruesa de peptidoglicán responden positivamente al cristal violeta presente en la tinción (Gram-positivo), mientras que las bacterias que, por el contrario, poseen una pared de peptidoglicán delgada en el espacio periplásmico generado entre dos membranas, donde la membrana externa es rica en lipopolisacáridos y proteínas, no responden a la tinción (Gram-negativo) (33–35). Esta diferencia tintorial entre Gram-positivas y Gram-negativas, demuestra diferencias estructurales que determinan funciones diversas, incluyendo la adherencia a través de filamentos proteicos para poder fijarse a una superficie (36).

En el caso de bacterias patógenas humanas, como así también de otro tipo de bacterias, han implementado una serie de estrategias que les permite subsistir en un ambiente que se torna hostil, que puede reaccionar frente a ellas, proponiendo constantes desafíos para su colonización (37,38). El desarrollo de verdaderas anclas moleculares o filamentos proteicos que se prolongan desde su pared, les permiten adherirse a superficies y enfrentarse a múltiples desafíos mecánicos, donde estos son conocidos como pili (39). Flujos repentinos de aire como espasmos y tos, movimientos de estructuras ciliadas y propulsión de las secreciones como moco y mucosas, o la simple fricción con una superficie diferente son sólo algunos ejemplos de los escenarios con los que una bacteria debe lidiar para colonizar exitosamente un tejido (40). Los pili, por lo tanto, deben contar con cierta habilidad de extenderse y de disipar energía elástica durante estos desafíos, de modo de poder asegurar la adhesión de la bacteria al tejido en cuestión.

Las bacterias Gram-negativas, en general, basan su sistema de adhesión en una cadena polimerizada de proteínas globulares, producto génico de operones que agrupan una serie de proteínas que se autoorganizan en el espacio periplasmático para la formación del pilus (41). De este modo, estas anclas moleculares miden tan sólo unos 2-3 nm de ancho y pueden prolongarse hasta varios micrómetros (1-4  $\mu\text{m}$ ) hacia la superficie del hospedero (42,43), siendo uno de los principales factores de virulencia de estos microorganismos (44). En el caso de *Escherichia coli*, las proteínas del pilus son polimerizadas con la ayuda de una proteína chaperona, que facilita el

intercambio de hebras beta entre las subunidades colindantes. De este modo las proteínas del pilus quedan unidas por enlaces hidrógeno, enlaces débiles donde dos átomos pesados son mediados por un átomo de hidrógeno (45,46). Por lo tanto, la capacidad de hacer frente a grandes demandas mecánicas no proviene necesariamente de la fortaleza de los enlaces que comunican las subunidades, sino que de la configuración que el pilus adoptan en el espacio (47,48). La excepción que confirma la regla es el pilus de *Salmonella enterica*, una bacteria gastrointestinal responsable de la salmonelosis (49). En este caso, el pilus está constituido por una única proteína, la cual está organizada por 53 dominios tipo B-inmunoglobulina (BIg). Esta proteína, conocida como Siie, puede soportar grandes demandas elásticas desplegando sus dominios, pero sin perder su comunicación a la superficie del tejido (**Figura 1.2**, panel **B**) (50).



**Figura 1.2. Representación gráfica de los mecanismos de adhesión de bacterias Gram-negativas y bacterias Gram-positivas.** En A, se representa el mecanismo de adhesión de *Escherichia coli*, el cual se basa en un fuente helicoidal. En el panel B, se representa el mecanismo de adhesión de *Salmonella enterica*, donde se adhiere por medio de una proteína multidominio extensible. En C, se representa el mecanismo de adhesión de *Streptococcus pyogenes*, donde utiliza un pili inextensible donde las proteínas se encuentran comunicadas covalentemente y protegidas por un enlace isopeptídico. Finalmente, el panel en D, representa el mecanismo de adhesión de *Corynebacterium diphtheriae*, donde utiliza un pili inextensible vía lazo delimitado por enlace isopeptídico (IDL, por sus siglas en inglés Isopeptide-Delimited Loop), el cual dado ciertas circunstancias podría desplegarse parcialmente de manera reversible.

Al igual que en bacterias Gram-negativo, en las bacterias Gram-positivos los pilus también constituyen uno de los mayores factores de virulencia (51) y se encuentran mediando la adhesión a superficies (52). No obstante, en este grupo de bacterias las subunidades que constituyen el pili

se encuentran ligadas covalentemente entre sí, gracias a una proteína llamada sortasa (**Figura 1.2**, paneles **C** y **D**) (53). Esta misma poliproteína puede ejercer múltiples funciones para el microorganismo, incluyendo la adhesión a una superficie tanto abiótica como biótica, por ejemplo, la infección a un hospedero, la captura de ácidos nucleicos del ambiente para la nutrición de la bacteria, movilidad dentro de un ambiente, colaborar en la formación de biofilm, o inclusive como una estructura de andamiaje para otros complejos macromoleculares (54).

### **1.3 *Corynebacterium diphtheriae* y la enfermedad de la difteria**

*Corynebacterium diphtheriae* es un bacilo Gram-positivo perteneciente a la clase de los *Actinomycetales* (55). Es un bacilo no-esporulado, anaeróbico facultativo y es causante de la enfermedad denominada como difteria (56). También es conocido como el bacilo de “Klebs-Löffler” en honor a su descubridor, el bacteriólogo alemán Friedrich Löffler en 1883 (57,58).

*C. diphtheriae* generalmente se localiza en el tracto respiratorio superior, produciendo la enfermedad conocida como difteria (59). En esta patología, *C. diphtheriae* ulcera la mucosa por medio de una exotoxina conocida como “toxina diftérica” que mata las células del tejido e induce la formación de una pseudomembrana inflamatoria de color gris, y se aloja principalmente en la nasofaringe, la amígdala o laringe (60,61). Además, la toxina se absorbe en la circulación y daña órganos remotos, desencadenando potencialmente la muerte (62). Aunque la infección primaria puede ocurrir en sitios distintos de la mucosa faríngea, las lesiones generalmente ocurren como inflamación pseudomembranosa local en la mucosa superficial de las vías respiratorias superiores y lesiones sistémicas del corazón y (en menor medida) los nervios periféricos (63,64).

La difteria fue una de las principales causas de mortalidad infantil en la era pre-vacunas, a pesar del alto crecimiento de los estándares de salubridad en los países industrializados en el siglo XX (65). En Reino Unido se producían cerca de 60.000 muertes infantiles al año a causa de la difteria (66). En zonas de temperaturas templadas casi 1 de cada 20 habitantes sufrían de difteria en su vida y del 5-10% de estos morían por la enfermedad (67). Sin embargo, a finales de la segunda guerra mundial, sería introducida la vacuna contra la difteria (68), donde esta sería desarrollada utilizando la toxina producida por la bacteria (69). Con esto se logró disminuir drásticamente los casos dicha enfermedad a nivel mundial, modificando la incidencia de más de un millón de casos al año a inicios del siglo XIX a tan solo 7 mil casos al año en 2016 (70).

A pesar de que la enfermedad ha sido controlada por varias décadas, en los últimos años se han presentado nuevos brotes en diferentes partes del planeta (71–73). Se ha estimado que estos brotes han surgido debido a las bajas tasas de coberturas de vacunas, resultantes del colapso de la infraestructura de atención médica por desastres naturales, declives económicos y políticos (74). En medio de estos brotes, se han detectado cepas de *C. diphtheriae* resistentes a múltiples antibióticos en países como Canadá, donde se describió uno de los primeros casos de infección por una cepa multirresistente en el país (75). La penicilina y la eritromicina han sido los antibióticos más comunes para el tratamiento de la difteria, sin embargo, se han presentado cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos como la penicilina G o la oxacilina y a antibióticos de diversos grupos como la eritromicina, rifampicina, tetraciclina y clindamicina (76).

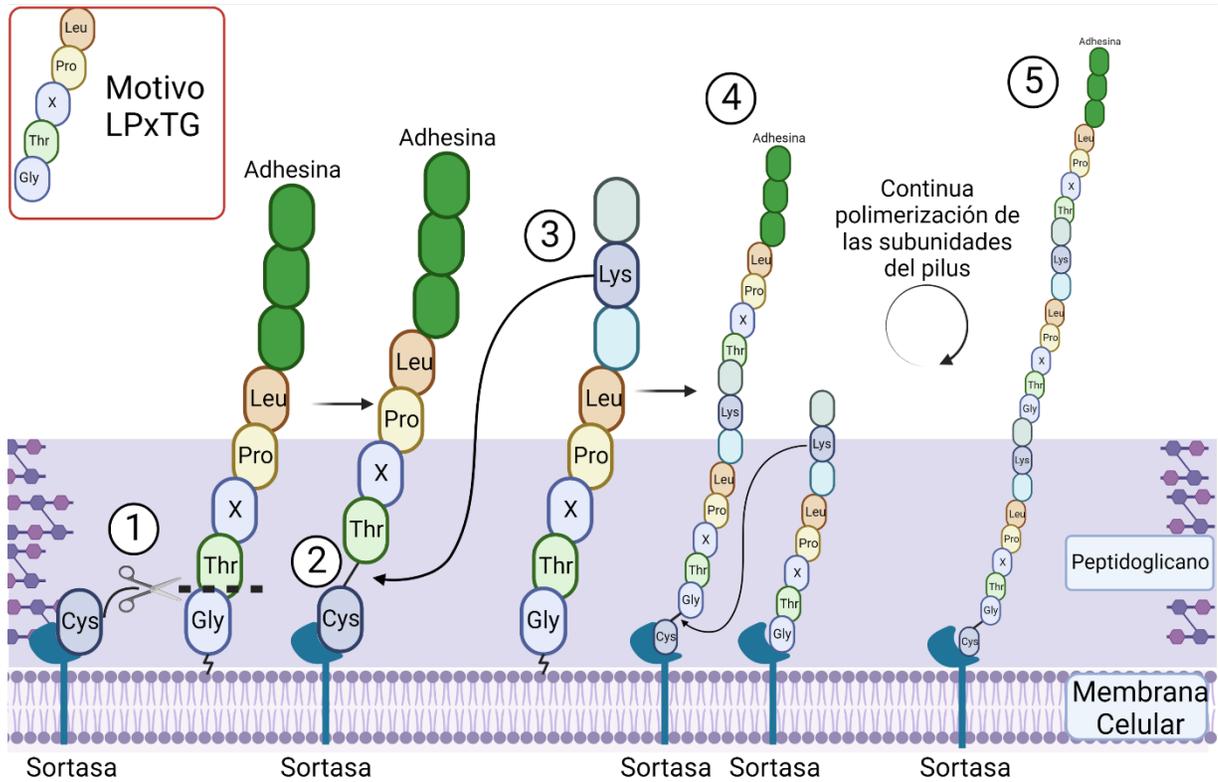
A causa de los brotes de estas cepas multirresistentes en menores de edad en zonas de Latinoamérica, se ha generado una alerta por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (77). Frente a la ausencia de nuevas estrategias para el control de microorganismos multirresistentes, surge una necesidad imperiosa de solucionar este problema (78,79). El diseño y empleo de estrategias peptídicas para intervenir en la formación de unidades estructurales que participan en la adhesión de las bacterias podría ser una alternativa efectiva a los antibióticos tradicionales (80).

#### **1.4 Formación de Pilinas en *Corynebacterium diphtheriae***

Debido a su participación en la infección de los tejidos orofaríngeos, *C. diphtheriae* se ha empleado para el estudio de los mecanismos de virulencia y colonización, incluyendo la caracterización estructural del pilus (81,82). En *C. diphtheriae* se han descrito diferentes estrategias de unión al tejido basado en pilinas, las cuales deben lograr soportar las grandes perturbaciones mecánicas impuestas por el hospedero (83). En el caso de los pilus basados en Spa, proveniente del inglés “Sortase-mediated pilin assembly”, están constituidos por las subunidades mayores A o D (84), que hace las funciones de la proteína estructural que se repite cientos de veces a lo largo del pilus (85). No obstante, acompañando a SpaA o SpaD se encuentran las subunidades menores SpaB y SpaC (86), donde SpaB se observa a intervalos regulares y mientras que SpaC aparece el extremo del filamento uniéndose al tejido en cuestión (87).

Las subunidades mayor SpaA y SpaD, posiblemente provienen de un ancestro común; comparten la misma estructura tridimensional y una gran similitud de secuencia aminoacídica. No obstante, los genes que codifican a estas dos pilinas difieren en organización transcripcional en la cual se encuentran. SpaA, que incluye los genes *spaA*, *spaB* y *spaC* también incluye a la sortasa transpeptidasa *srtA*. En cambio, el pilus SpaD incluye los genes *spaD*, *spaE*, *spaF*, junto a dos transpeptidasas putativas *srtB* y *srtC* (84,88).

Estas sortasas permiten la unión covalente del pilus a la pared celular del peptidoglicano (89), asegurando una comunicación estable del filamento con el cuerpo de la bacteria. No obstante, esta misma enzima por medio de su actividad transpeptidasa se encarga de polimerizar las diferentes subunidades del pilus (90). La sortasa, ubicada en la superficie celular de la bacteria, muestra una especificidad frente a proteínas extracelulares formadas por la bacteria que poseen una señal de la sortasa de la pared celular (CWSS, del inglés, *Cell Wall Sorting Signal*). Esta consiste en un motivo de Leucina-Prolina-X-Treonina-Glicina (LPXTG) seguido por un dominio hidrofóbico y una cadena corta de proteína de superficie (91). Para poder anclar una proteína de superficie a la pared celular, la sortasa escinde el motivo LPXTG entre una Treonina (T) y una Glicina (G), y une el residuo de la Treonina del polipéptido escindido al grupo amino dentro de la estructura del peptidoglicano (**Figura 1.3**) (92,93).

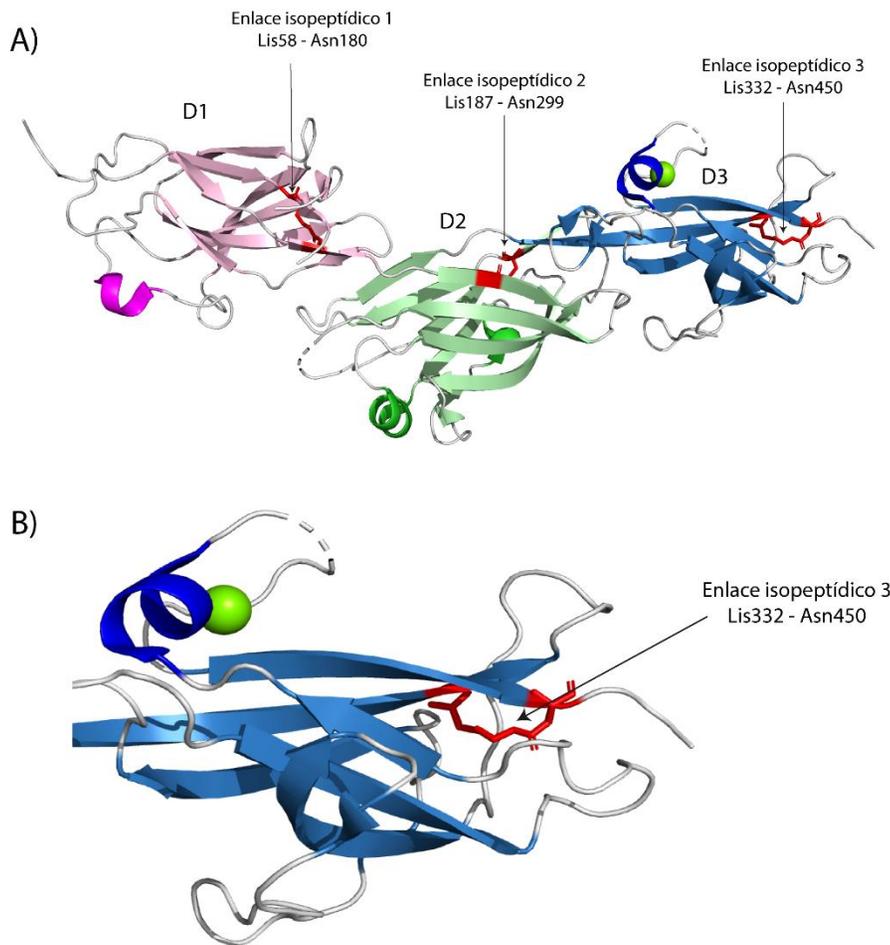


Adaptación de: *Pilins in gram-positive bacteria: A structural perspective*, Krishnan, V. (2015).

**Figura 1.3. Representación gráfica de la función de la sortasa en la formación de pilinas en bacterias Gram-positivas.** En la figura se muestra una representación de como la sortasa media la unión de subunidades, reconociendo el motivo LPxTG, hasta generar una pilina. 1) la sortasa reconoce el motivo anclado a la membrana, donde genera una escisión entre la treonina y la glicina. 2) se genera un intermediario temporal, donde está unida la sortasa con el pilus. 3) El intermediario recibe un ataque nucleofílico por parte del grupo amino de la lisina, donde generará un enlace covalente entre estas dos subunidades. 4) este proceso se repetirá continuamente hasta formar una estructura similar a la señalada en 5) (Imagen preparada con BioRender®, [www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

Por otro lado, el pilus de Gram-positivas presenta una característica única de este grupo de bacterias, completamente ausente en Gram-negativas. Las subunidades de la proteína estructural del pilus como SpaD utilizan un enlace isopeptídico intramolecular, el cual les otorga una formidable estabilidad y resistencia al desplegamiento mecánico (**Figura 1.4**) (94). Los enlaces isopeptídicos son enlaces amidas con la misma estructura que los enlaces peptídicos tradicionales, pero en este caso se encuentran formados entre las cadenas laterales de dos residuos de aminoácidos: un grupo amino de una Lisina y un grupo carbonilo de una Asparagina (95). El resultado de este enlace es un esqueleto polipeptídico y un circuito de fuerzas mecánicas que se transmiten axialmente a la adhesión del ligando de la pared celular (81). Los residuos que conforman estos enlaces están posicionados estratégicamente para unir la primera y la penúltima

o la última hebra-β a los dominios tipo Inmunoglobulina. En esta ubicación, este enlace cruzado imparte una mejora en la estabilidad térmica y una resistencia a las proteasas, junto con transmitir esfuerzos mecánicos sin alterar el plegamiento de la proteína (96).



**Figura 1.4. Estructura completa de la subunidad mayor SpaD de una de las pilinas de *C. diphtheriae*.** En A, se muestra la estructura de los tres dominios de SpaD con sus correspondientes enlaces isopeptídicos. En B, se muestra un acercamiento al enlace isopeptídico 3 de SpaD (Imagen preparada con PyMol)

Como se mencionó anteriormente, el enlace isopeptídico intramolecular presente en las proteínas del pilus de bacterias Gram-positivos, permite unir dos hebras beta de la proteína de manera covalente lo que entrega una alta estabilidad mecánica. Estudios previos han propuesto que un fallo en la polimerización apropiada de la proteína estructural del pilus, o pilina, produce un decrecimiento de la virulencia de la bacteria (51,97,98). Estos antecedentes han motivado la generación de estrategias que logren intervenir con la formación del enlace, entre ellas la implementación de péptidos que prevengan la formación del enlace isopeptídico intramolecular. Un péptido de estas características debe unirse en un tiempo oportuno, ya que de ese modo puede evitar la formación del enlace. La estrategia de un péptido bloqueador de isopeptidos se basa en construir un péptido ingenierizado que copia los mismos elementos de las hebras

involucradas en la formación del enlace isopeptídico, produciendo que la pilina no cumpla su función de una molécula inextensible, debido al acoplamiento del péptido sintético en el área de formación del enlace covalente (51).

Debido a estas características de adherencia, es que en los últimos años múltiples esfuerzos han sido dirigidos a emplear el pilus como blanco para el desarrollo de posibles tratamientos para infecciones. A diferencia de los antibióticos tradicionales los cuales pierden cada vez más efectividad debido a la aparición de bacterias multirresistentes (99), el desarrollo de sistemas que se basen en la interferencia de la función del pili podría contribuir al manejo de enfermedades infecciosas. Además, dada la complejidad que requiere para una bacteria implementar alternativas para sus sistemas de adhesión, incluyendo por ejemplo mutaciones coordinadas en las subunidades del pili, sugiere que estas podrían evitar el desarrollo de resistencias en el corto plazo.

Con todo lo mencionado anteriormente, sabemos que las infecciones por *C. diphtheriae* tienen el potencial de ser altamente resistentes a múltiples antibióticos, dejando obsoletos los métodos tradicionales para tratarla, por lo que proponemos diseñar un péptido anti-adhesivo que intervenga con la formación del enlace isopeptídico formado en *C. diphtheriae*. Para esto planteamos diseñar un candidato de péptido anti-adhesivo *in silico* por medio de herramientas computacionales, probar sus afinidades *in silico*, para luego realizar ensayos bioquímicos para poner a prueba el péptido en una versión *in vitro*.

## 2. Hipótesis y Objetivos

### Hipótesis:

- El péptido bloqueador isopeptídico D3 interviene con la formación del enlace isopeptídico de la subunidad mayor SpaD del pili de *Corynebacterium diphtheriae*

### Objetivo General:

- Diseñar y expresar un péptido capaz de inhibir la formación del enlace isopeptídico del dominio 3 de SpaD de *Corynebacterium diphtheriae*.

### Objetivos específicos:

1. Diseñar y evaluar mediante estrategias computacionales la capacidad de un péptido inspirado en la secuencia aminoacídica de SpaD para impedir la formación de su enlace isopeptídico.
2. Desarrollo de vectores de expresión adecuados para la expresión secuencial de la proteína SpaD y del péptido bloqueador.
3. Evaluación de la capacidad del péptido diseñado para impedir la formación del enlace isopeptídico del dominio 3 de SpaD por medio de ensayos bioquímicos.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Materiales

En el trabajo experimental se utilizaron los siguientes reactivos: 40% v/v acrilamida (Bio-Rad®), ácido acético glacial (Merck®), ácido clorhídrico (HCl) (Merck®), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich®), agarosa (Fermelo®), agua libre de nucleasas (H<sub>2</sub>O L.N.) (Corning®), HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand (ligando fluorescente del HaloTag) (Promega®), amortiguador fosfato salino (PBS) (Merck®), ampicilina (AMP) (Us Biological®), arabinosa (Sigma-Aldrich®), azul de Coomassie (Bio-Rad), cloranfenicol (CAM) (Us Biological®), cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich®), cloruro de sodio (NaCl) (Merck®), dodecilsulfato sódico (SDS) (Merck®), ditioneitol (DTT) (Sigma-Aldrich®), estándar de proteínas preteñidas PageRuler™ Plus de 10 a 250 kDa (ThermoFisher®), estándar de tamaño molecular 1 kilobase (1 Kb DNA Ladder) (Maestrogen®), etanol (TCL), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (ThermoFisher®), fosfato de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Merck®), glicerol (Merck®), glicina (Sigma-Aldrich®), imidazol (Sigma-Aldrich®), isopropil- β-D- 1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Us Biological®), kanamicina (KAN) (Us Biological®), metanol de grado técnico (Merck®), persulfato de amonio (PSA) (Sigma-Aldrich®), N', N', N', N'- tetrametiletilendiamina (TEMED) (Bio-Rad®), SNAP-Surface® 488 (ligando fluorescente del SNAP-tag), tetraciclina (TET) (Us Biological®) y tris- (hidroximetil)-aminometano (TRIS) (Merck®).

#### 3.1.2 Amortiguadores

Para llevar a cabo las diferentes actividades relacionadas a la purificación de las proteínas y otros ensayos, se emplearon diversos amortiguadores. Para la purificación de proteínas se utilizó el amortiguador de unión (fosfato de sodio 20 mM pH 7,4, cloruro de sodio 0,5 M, imidazol 20 mM), y el amortiguador de elución (fosfato de sodio 20 mM pH 7,4, cloruro de sodio 0,5 M, imidazol 50-500 mM), mientras que para la separación electroforética de ADN y de proteínas se utilizaron los amortiguadores de TAE (Tris-acetato de 0,04 M, EDTA 1 mM, pH 8,0.) y TGS (0,25M Tris, 1,92M glicina y SDS al 1%) respectivamente. También se utilizaron los buffers de carga (Gel Loading Dye 6x - NEB) y buffer de carga para proteínas (Load-Buffer 5X - SDS, β-mercaptoetanol, azul de Coomassie y glicerol).

#### 3.1.3 Medios de Cultivo

Para la expresión de la proteína y del péptido, se utilizó una estrategia de sistemas de expresión recombinante, por lo que se emplearon medios de cultivos para el crecimiento de bacterias *E. coli*

*BLR (DE3) pLysS*, en conjunto con sus vectores respectivos. Para ello se empleó el medio líquido Luria-Bertani (LB) (Tryptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L) y medio agar Luria-Bertani (Tryptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L y agar 15 g/L), obtenidos desde Bio-Rad® Laboratories (CA, EE. UU). Se creció el vector del péptido en un medio mínimo (Medio sales mínimas M9, suplementado con 0.2% de casaminoácidos (C2080, US Biological)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2 mM,  $CaCl_2$  0,1 mM y Glicerol 1,5%). Los medios de 400 mL se suplementaron con 4 mL de Ampicilina (10 mg/mL), 4 mL de Cloranfenicol (2,5 mg/mL), 4 mL de Tetraciclina (3 mg/mL) y 4 mL de Kanamicina (5 mg/mL), estériles, dependiendo del tipo de expresión y del vector utilizado. Además, estos medios también se suplementaron con 1 mM IPTG y/o 0.2% p/v Arabinosa para inducir la expresión de proteínas recombinantes.

#### **3.1.4 Enzimas**

Las enzimas utilizadas en el trabajo experimental fueron las siguientes: Fosfatasa Alcalina intestinal de ternera (CIP), T4 Ligasa, ADN polimerasa *Taq* y algunas enzimas de restricción como, *BamHI* (R0136S), *BglII* (R0144S) y *KpnI* (R0142) obtenidas desde New England Biolabs (NEB).

#### **3.1.5 Vectores**

Para el desarrollo de la biología molecular se emplearon diversos vectores que permitieron el clonamiento y también la expresión de las proteínas. Estos vectores fueron: pFN18a HaloTag® (Promega), pBAD (ATCC), pSNAP-Tag® (T7)-2 Vector (NEB) y pT7 Blue (Novagen).

#### **3.1.6 Sistemas de Purificación**

Para realizar la purificación de bandas de DNA desde electroforesis se utilizó, el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Por otro lado, para realizar la purificación de DNA plasmidial se utilizó un Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) y para realizar la purificación de proteínas se utilizaron columnas de purificación, constituidas con Sefarosa (IMAC Sepharose 6 Fast Flow) y cargadas con Níquel. Para realizar la concentración de las fracciones, se utilizaron unidades de filtrado Amicon® 30 kDa (Merck Millipore, UFC203024).

#### **3.1.7 Cepas Bacterianas**

Para la expresión de proteínas recombinantes y su correcto clonamiento, se utilizaron las cepas de *E. coli* XL10 y BLR (DE3) pLysS, que fueron ambas obtenidas desde Novagen.

## **3.2. Evaluación de las interacciones péptido-proteína mediante herramientas computacionales**

### **3.2.1 Instalación Rosetta versión 3.21**

Para poder realizar las interacciones péptido-proteína y sus evaluaciones respectivas, primero se instaló la herramienta computacional “Rosetta” en su versión 3.21. Esto se realizó mediante el tutorial publicado en la página: [www.bioinformaticsreview.com/20210908/installing-rosetta-on-ubuntu/](http://www.bioinformaticsreview.com/20210908/installing-rosetta-on-ubuntu/). Cabe destacar que, para utilizar Rosetta se debe solicitar una licencia académica primero.

Para poder ejecutar *Rosetta* se deben tener 6 archivos finales:

- ETQ.pdb
- ETQ.params
- Proteína\_A.pdb
- Crystal\_complex.pdb
- Dock.xml
- Options.txt

A lo largo de esta metodología se explicarán como se obtuvo cada uno, la ejecución del sistema con los archivos y el análisis de estos.

### **3.2.2 Selección del enlace isopeptídico de relevancia**

Para la generación de un sistema de intervención de una proteína, primero descargamos el archivo de la cristalografía de la proteína a intervenir, en este caso, SpaD. Esta fue obtenida de Protein Data Bank (PDB por sus siglas en inglés, <https://www.rcsb.org>). Para esta se utilizó el código de la proteína “4HSQ” que abarca dos de los tres dominios de la proteína, siendo estos, los dominios dos y tres. Dentro de estos dos dominios existen dos diferentes enlaces isopeptídicos. Para funciones de esta investigación, se determinó utilizar únicamente en el último enlace, formado por la unión de las cadenas laterales entre una Lisina (LYS) y una Asparagina (ASN), en los números de aminoácidos 332 y 450 respectivamente.

### 3.2.3 Generación archivos ETQ

Para el diseño de péptidos se requirieron múltiples herramientas, se utilizó principalmente *PyMol* y *Quimera* para la creación de estos. Primero se necesitó generar una secuencia de aminoácidos que se convertirían en el ligando o péptido a utilizar para los posteriores ensayos de acoplamiento. Esta secuencia se obtuvo a partir de la cadena donde se encuentra la Asparagina. Debido a esto, nos enfocamos en utilizar la misma secuencia de cadena complementaria a la lisina 332, utilizando siete aminoácidos de largo, dejando la asparagina entre los 7 aminoácidos. Esto resultó en un péptido con la siguiente secuencia: Glu-Ile-Lis-**Asn**-Ile-Lis-Gln (EIKNIKQ). Este péptido llevó por nombre, *Péptido bloqueador isopeptídico D3*.

*PyMol* además de ser una herramienta para la visualización y modelamiento de proteínas, posee la capacidad de generar péptidos o ligandos desde cero, siendo así la herramienta escogida para generarlos. Una vez se generó el péptido, se procedió a guardar en formato “.pdb”. Durante la creación del péptido se tomaron en consideración múltiples factores, ya que estos pueden llegar a afectar los análisis posteriores a los que serán sometidos estos ligandos, siendo el más importante la rigidez que posee la molécula cuando esta es generada artificialmente. Para poder sobrellevar este estado, la molécula creada se sometió a un proceso de minimización, en el que se relajó la molécula para que esta se comportara de la forma más natural y realista posible. Para esto se utilizó *Chimera*, debido a que esta herramienta posee la función de manera intrínseca y a su vez no altera la secuencia original de la molécula, pero permite los cambios de coordenadas de los átomos que componen el péptido.

Finalmente, nuestro archivo en formato “.pdb” fue transformado a un nuevo formato “.sdf”. Esto se logró a través del programa *OpenBabel*, utilizando las opciones:

- Formato de entrada: “.pdb”
- Opciones: Borrar hidrógenos, Agregar hidrógenos y Centrar coordenadas.
- Formato de salida: “.sdf”

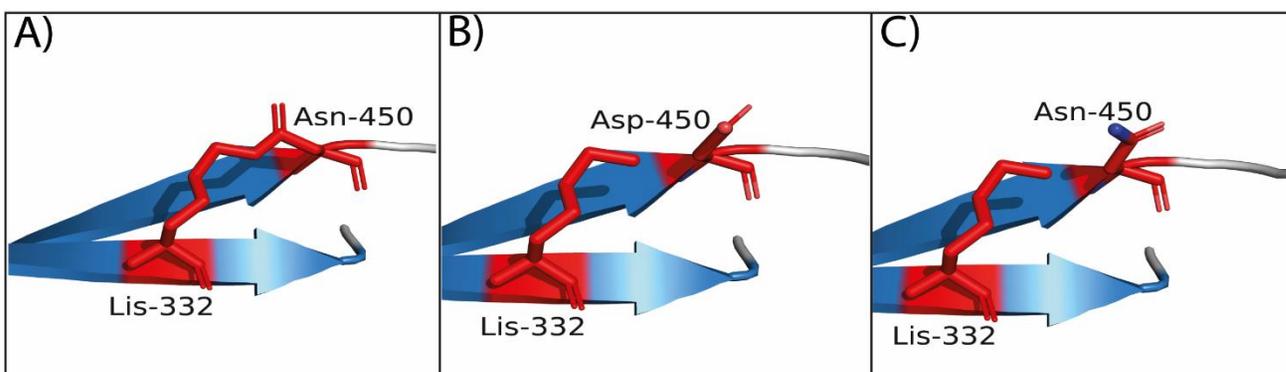
Finalmente, para poder generar el archivo que representaba al ligando (Péptido bloqueador isopeptídico D3), se utilizó el siguiente comando para transformarlo en el lenguaje de *Rosetta*:

```
<path-to-Rosetta>/rosetta_bin_linux_2020.08.61146_bundle/main/source/scripts/python/public/molfile_to_params.py -n ETQ -p ETQ --conformers-in-one-file archivo.sdf
```

Los archivos de salida fueron: “*ETQ.pdb*” y “*ETQ.params*”. Donde el archivo “.*params*” nos indicó los parámetros del ligando.

### 3.2.4 Modificación del enlace isopeptídico del Dominio 3 de SpaD

En el archivo “*4HSQ.pdb*” de la pilina SpaD, como se mencionó anteriormente, el dominio 3 posee un enlace isopeptídico intramolecular. Este enlace se alteró por medio la herramienta computacional de visualización molecular *PyMol*. Para lograr esto, se utilizó la función de “mutagénesis”, esta función nos permitió modificar el enlace de manera artificial. Mutamos la Asparagina-450 por algún otro aminoácido (Ácido aspártico en este caso), esto generó una ruptura artificial del enlace. Posteriormente se procedió a restaurar por Asparagina, de esta manera se mantiene la misma estructura, pero sin la unión del enlace isopeptídico (Figura 3.1).



**Figura 3.1. Representación gráfica de la mutación del enlace isopeptídico en el dominio 3 de SpaD.** En A) se muestra el enlace en su estado silvestre, mostrando la Lisina-332 y la Asparagina-450. En la figura B) se muestra la mutación del residuo de la Asparagina-450 por un Ácido Aspártico. En la figura C) se muestra la mutación nueva para devolver el residuo de Asparagina, rompiendo el enlace isopeptídico original (imagen preparada con *PyMol*).

Posterior a la modificación del enlace, el archivo de la proteína se exportó y se guardó como un nuevo archivo formato “.*pdb*”. Adicionalmente, se debió remover el ion Calcio y las moléculas de agua presentes en la proteína, debido que estas interfieren en los sistemas de *Rosetta*.

### 3.2.5 Generación del bolsillo de interacción péptido-proteína del dominio 3 de SpaD

Para la generación de un bolsillo de interacción péptido-proteína, se debió abrir el archivo previamente almacenado con el formato “.*pdb*” en la herramienta computacional *PyMol*. Esta aplicación nos permitió mover y modificar la estructura de la proteína. Esto se logró por medio de la herramienta “*Sculpting*” ubicada en la barra de “*Wizard*”. A partir de la cadena de la Asparagina-450, se tomó desde la Valina (Val) 445 hasta la Treonina (Thr) 455, esta cola aminoacídica se desplazó en

sentido contrario de la cadena que posee la Lisina-332, hasta producir un bolsillo lo suficientemente grande como para que un péptido entre a esta zona.

Para poder trabajar en nuestro sistema de acoplamiento molecular, primero se debieron cumplir con los formatos y parámetros de archivos solicitados por nuestro sistema.

Posterior a la generación del bolsillo, se debió utilizar el siguiente comando:

```
<path-to-Rosetta>/rosetta_bin_linux_2020.08.61146_bundle/tools/protein_tools/  
scripts/clean_pdb.py NombreProteína.pdb A
```

Este comando permite limpiar la proteína y corregir la numeración de los aminoácidos, adaptando el formato al uso que requiere *Rosetta*.

### **3.2.6 Generación del archivo Crystal Complex**

Para poder realizar cálculos de la Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSD por sus siglas en inglés, Root Mean Square Deviation), se generó una mezcla de los archivos: Proteína\_A.pdb y ETQ.pdb. El archivo ETQ.pdb se ubicó en el bolsillo generado en Proteína\_A.pdb, en la posición a simular. Este archivo nos permitió comparar el resultado entregado por *Rosetta* versus el que deseamos.

### **3.2.7 Archivos Dock.xml y Options.txt**

Los archivos “*Dock.xml*” y “*Options.txt*” describen los modos de función de *Rosetta*, estos están adjuntos en la sección de Anexos (Anexo 1 y Anexo 2, respectivamente).

### **3.2.8 Ensayos de acoplamiento molecular por Rosetta**

Para poder analizar el péptido y su interacción con los dominios dos y tres de SpaD, se debió hacer funcionar *Rosetta* con los seis archivos mencionados previamente. Esta herramienta se hizo funcionar por medio del comando:

```
<path-to-Rosetta>/rosetta_src_2020.08.61146_bundle/main/source/bin  
/rosetta_scripts.cuda.linuxgccrelease @ options.txt -nstruct 60000
```

Este permitió indicarle al programa cuantos ensayos de acoplamiento debió realizar y que archivo options.txt se utilizó.

Adicionalmente, se realizó el mismo proceso, pero con un péptido control, este siendo únicamente constituido por Glicinas (G), dejando un péptido con la estructura de GGGGGGGG.

### 3.2.9 Análisis de los resultados obtenidos por Rosetta

Para analizar los resultados obtenidos por *Rosetta*, primero se hizo una extracción de columnas de datos del archivo “SCORE” generado por *Rosetta* por medio del siguiente comando.

```
$ grep SCORE score.sc | sort -n -k1 | awk '{print $54, $2, $NF}' > Sorted_Ligand_Peptido.dat
```

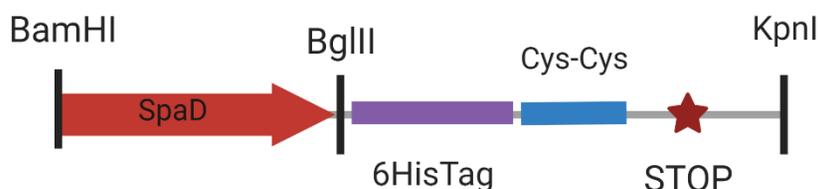
Una vez se extrajeron los datos de interés en un nuevo archivo para el análisis, se procedió a revisar cuales eran los archivos con la energética más negativa. Una vez se identificaron estos archivos, se procedió a buscarlos en los 60.000 resultados obtenidos y se extrajeron los archivos “.pdb” en una nueva carpeta para poder separarlos del resto. Estos se analizaron en la aplicación *PyMol*, revisando que se unieran al interior del bolsillo generado en el archivo “Proteína\_A.pdb”.

Estos 60.000 resultados se representaron gráficamente por su afinidad y distancia con respecto a cómo debería haber quedado situado el péptido en el bolsillo (indicado en el archivo *crystal\_complex.pdb*). Este gráfico se basa en el RMSD y en la afinidad generada entre el péptido y la proteína. Este gráfico se genera por medio de la herramienta *xmgrace* (<https://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>), donde funciona como un graficador 2D.

### 3.3. Generación de un vector de expresión para SpaD

#### 3.3.1 Diseño in silico de SpaD

La secuencia codificante a los dominios dos y tres de SpaD fue situada entre dos sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, *BamHI* y *KpnI*. Este inserto incluía río abajo una pequeña secuencia codificante para seis histidinas (HisTag) y posteriormente para dos cisteínas, lo que culmina en una secuencia de STOP (Figura 3.2).



**Figura 3.2. Representación gráfica del constructo final de SpaD para trabajos de clonamiento o expresión.** En la figura se representan las enzimas de restricción que se utilizarán en el trabajo experimental. Se representa primero el sitio de corte de *BamHI* río arriba de la secuencia codificante para SpaD, luego la secuencia de SpaD, luego el sitio de corte de *BglII*, continuado por seis secuencias codificantes para Histidina

(HisTag), luego dos secuencias codificantes para Cisteína, luego por una secuencia codificante por un codón de termino (STOP) y finalmente el sitio de corte de *KpnI* (Imagen preparada con BioRender®, [www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

### **3.3.2 Generación de un vector de expresión con SpaD**

Para la generación del vector de expresión con la secuencia de SpaD, se utilizó el servicio de clonamiento de la empresa GenScript, donde se solicitó sintetizar la secuencia codificante de SpaD y que se introdujera en el vector de expresión pFN18a HaloTag®.

### **3.3.3 Transformación de las células de clonamiento *XL10* con vector de expresión**

A partir del sistema diseñado anteriormente, se realizó una transformación de células quimio-competentes *E.coli XL10*. Se utilizaron 2-5 µL del vector comercial “*pFN18a HaloTag® SpaD CC*”, para ubicarlo en 100 µL de células quimio-competentes *XL10*. A este tubo se les dieron golpes suaves para mezclar las células con el plásmido. Se realizó una incubación en hielo por 10 minutos. Inmediatamente se les dio un golpe térmico a 42 °C por 2 minutos en un bloque térmico. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el tubo y se dejó reposar en hielo por 5 minutos. Posteriormente, se nutrieron las bacterias transformadas con 250 µL de medio LB líquido estéril, bajo esterilidad para llevarlas a crecer durante 1 hora a 37 °C en un agitador orbital a 180 revoluciones por minuto (rpm). Transcurrido el tiempo, se retiraron las células y se sembraron 50-100 µL del cultivo en placas Agar-LB suplementadas con AMP y TET. Las placas se dejaron creciendo durante la noche a 37 °C en una estufa. Al día siguiente se seleccionaron 3 colonias únicas, que no presentaban células satélites.

### **3.3.4 Verificación del vector *pFN18a HaloTag® CC SpaD* por PCR**

Para verificar que el vector de expresión *pFN18a HaloTag® SpaD CC* contenía efectivamente el inserto de interés, se realizó un PCR de colonias con partidores T7. Las colonias seleccionadas, fueron traspasadas a un tubo de microcentrífuga de 0.2 mL con 10 µL de medio LB líquido. Estas fueron resuspendidas suavemente. A partir de estas, se utilizaron 3 µL para un PCR convencional. Este se llevó a cabo utilizando la mezcla maestra *GoTaq® G2 Green* en un termociclador (Applied Biosystems™ Veriti™). El perfil térmico utilizado para la reacción incluyó una lisis térmica de 5 minutos de la colonia a 95 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, alineamiento de los partidores a 52 °C durante 30 segundos, seguido de una extensión del ADN por parte de la polimerasa a 72 °C durante 2 minutos (**Tabla 3.1**). Junto a esto, se utilizaron como controles negativos, una muestra sin templado ni agua (NTC, del inglés No Template Control), NTC

con el agua libre de nucleasas (NTC + H<sub>2</sub>O) y un control positivo que corresponde a pFN18a HaloTag® vacío (amplicon de 1kb).

**Tabla 3.1. Resumen del perfil térmico PCR para pFN18a HaloTag® SpaD CC.** En esta tabla se representan los pasos del PCR, con sus temperaturas, tiempos y número de ciclos.

Paso	T° (°C)	Tiempo	Ciclos
<i>Inicio</i>	95°C	5 minutos	1
<i>Desnaturalización</i>	95°C	30 segundos	35
<i>Alineamiento</i>	58°C	30 segundos	
<i>Extensión</i>	72°C	2 minutos	
<i>Elongación final</i>	72°C	5 minutos	1
<i>Conservación</i>	4°C	∞	1

La amplificación específica de nuestro inserto se evaluó utilizando un gel de agarosa al 1% p/v, este se utilizó en una electroforesis a 80 Voltios por 80 minutos. Se utilizó un estándar de ADN de 1 kb de MaestroGen.

Los 7 µL restantes de las colonias resuspendidas en medio LB, se utilizaron para inocular 10 mL de medio de cultivo LB líquido suplementado con los antibióticos AMP y TET y se dejaron creciendo durante la noche hasta llegar a la OD<sub>600</sub> 0.5 a 0.6. Posterior al crecimiento, se realizó una extracción del ADN plasmidial por medio de un kit (FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit). Se cuantificaron las concentraciones obtenidas por medio de absorbancia en un lector de placas (Tecan™ Infinite M200 PRO).

### 3.3.5 Digestión del vector pFN18a HaloTag® SpaD CC

Con el plásmido extraído y con concentración medida, se procedió a hacer una digestión por medio de las enzimas *BamHI* y *KpnI* para liberar el inserto codificante de SpaD. Para esto se utilizaron 2.000 ng de plásmido, 10U de enzima *BamHI*, 10U de enzima *KpnI*, 2 µL de buffer CutSmart® y se aforó hasta 20 µL de volumen final con agua libre de nucleasas. La digestión se dejó funcionando a 37 °C durante la noche. Se realizó una visualización de la digestión en un gel de agarosa al 1% p/v, utilizando como un control el mismo vector sin digerir para así poder diferenciar si fue digerido o no

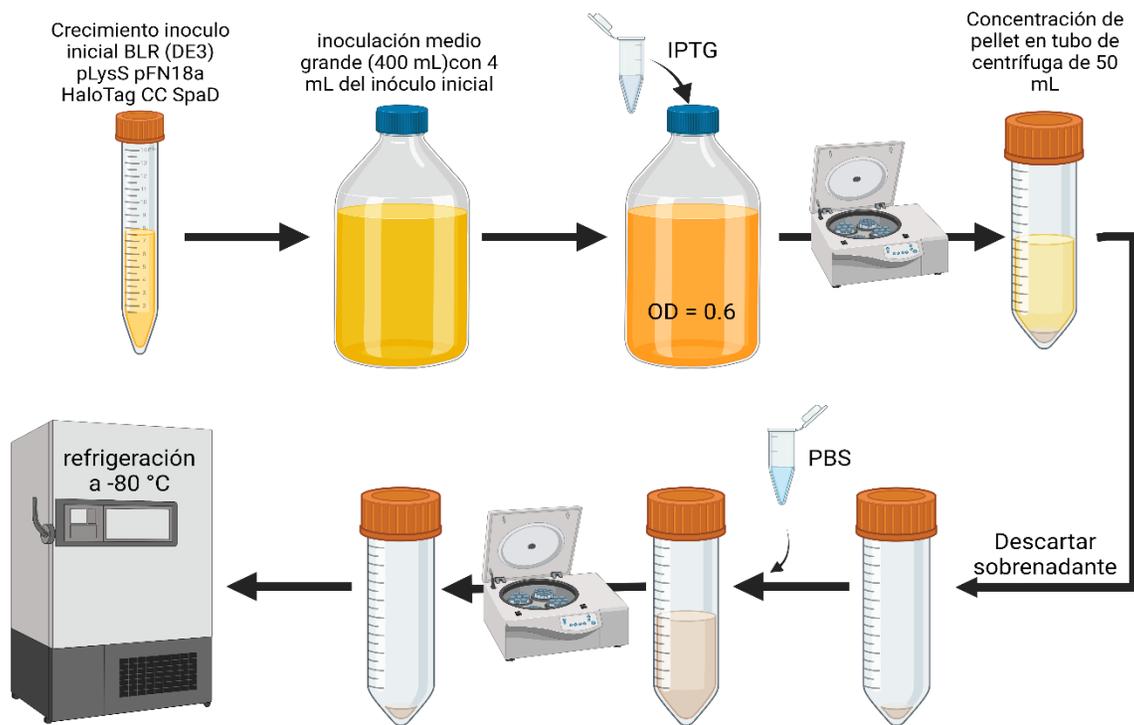
el vector. En conjunto a esto, se utilizó un estándar de ADN de 1 Kb de MaestroGen. El gel se corrió en la cámara de electroforesis a 80 Voltios por 80 minutos. El gel fue visualizado utilizando un transiluminador con captura digital y equipado con epiluminiscencia (SmartView Pro-1100 Imager System, UVC1-1100).

### **3.3.6 Transformación de cepas *BLR (DE3) pLysS* con el vector *pFN18a HaloTag® SpaD CC***

Se utilizó el mismo sistema de transformación por golpe térmico que en pasos anteriores, solo que se agregó un antibiótico extra, cloranfenicol (CAM), utilizando AMP, CAM y TET.

### **3.3.7 Expresión SpaD en *BLR (DE3) pLysS***

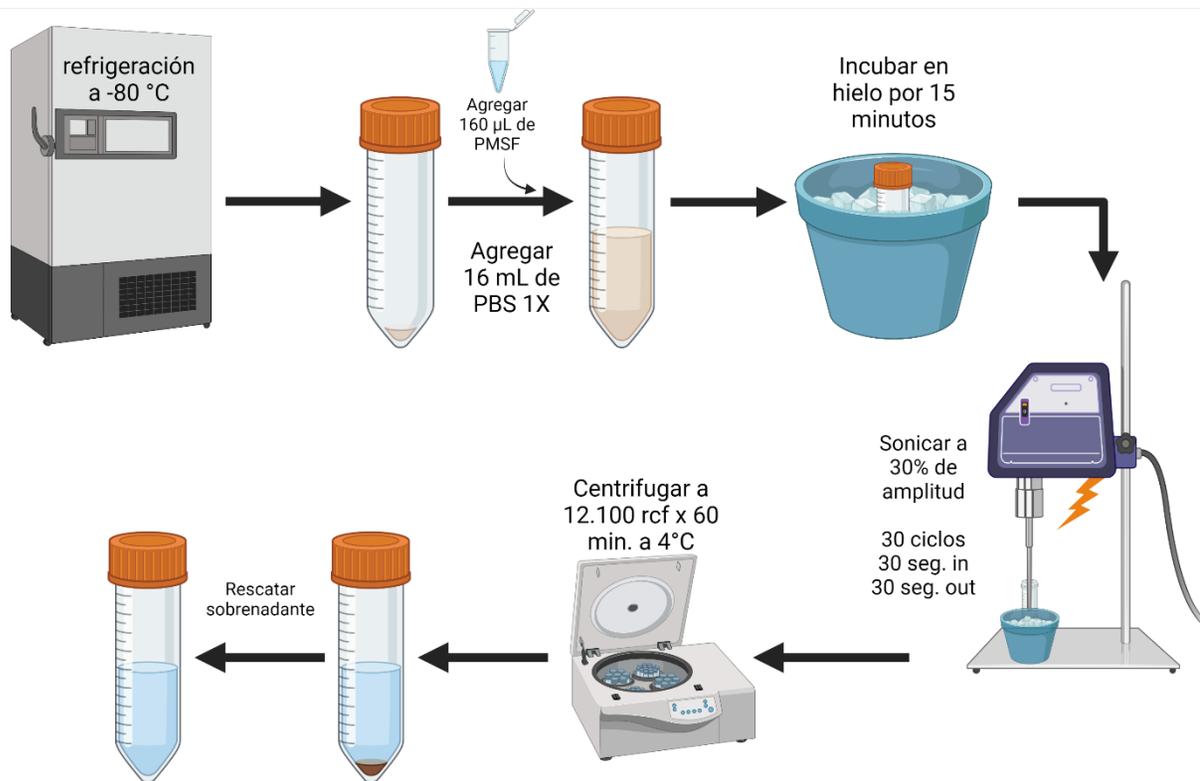
Para la expresión de SpaD, primero se realizó un crecimiento en 5 mL de medio LB con los antibióticos AMP, TET y CAM durante la noche. Al día siguiente, se utilizaron 4 mL de las bacterias crecidas (1% del volumen) de este medio para inocular 400mL de medio LB con AMP, CAM y TET. Una vez llegó a una OD<sub>600</sub> 0.5 a 0.6, se indujo con IPTG durante 4 horas o durante la noche. A la mañana siguiente, se centrifugaron a 12.100 rcf, por 15 minutos a 4°C los 400 mL inducidos. Se colectaron todos los pellets en un tubo de 50 mL. El pellet se resuspendió en 16 mL de PBS (1X) para lavar las células y se volvió a centrifugar a 12.100 rfc por 15 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se almacenó el pellet a -80 °C hasta su nuevo uso (**Figura 3.3**).



**Figura 3.3. Diagrama de flujo de la expresión de SpaD.** Metodología utilizada para expresar SpaD en conjunto con HaloTag® (Imagen preparada con BioRender®, www.biorender.com).

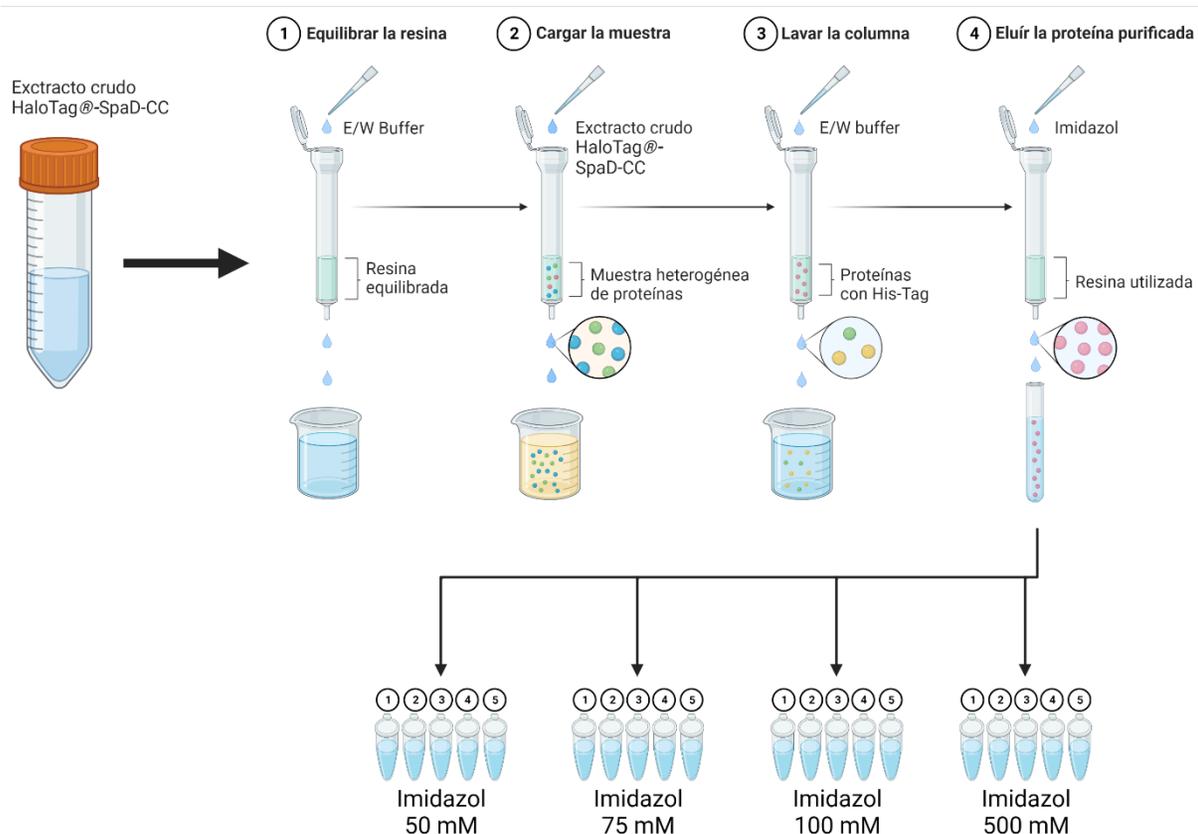
### 3.3.8 Purificación de SpaD

Los pellets provenientes de 400 mL fueron resuspendidos en 16 mL de PBS, adicionando 160  $\mu$ L de PMSF 10 mM e incubando en hielo por 15 minutos. Posteriormente las células fueron lisadas por ultrasonido, utilizando 30 ciclos de 30 segundos activos de ultrasonido (amplitud de 25-30%), seguidos por 30 segundos de descanso, todo esto en hielo permanentemente. Una vez terminado el uso del ultrasonido, se agregaron nuevamente 160  $\mu$ L de PMSF. Se procedió a centrifugar por 60 minutos a 12.100 rcf a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo de 50 mL nuevo, evitando tomar toda posible fase solida en el tubo. Este se almacenó a -80°C hasta su uso (**Figura 3.4**).



**Figura 3.4. Diagrama de flujo de la expresión de SpaD parte 2.** Metodología utilizada para extraer SpaD en conjunto con HaloTag® (Imagen preparada con BioRender®, [www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

Una vez se realizó la extracción de las proteínas expresadas, se procedió a purificar la proteína SpaD por medio de resinas constituidas con Sefarosa (IMAC Sepharose 6 Fast Flow), cargadas con Níquel. Primero se lavó con  $50\text{ mL}$  de E/W Buffer (fosfato  $50\text{ mM}$ , NaCl  $300\text{ mM}$ ), luego se filtró por gravedad el todo el sobrenadante al menos 3 veces y se procedió a lavar nuevamente con  $100\text{ mL}$  de E/W Buffer. Finalmente, se hace una precipitación por gradiente ascendente de imidazol  $50$ ,  $75$ ,  $100$  y  $500\text{ mM}$ , donde se utilizaron primero  $2,5\text{ mL}$  de imidazol  $50\text{ mM}$ , colectando  $500\text{ }\mu\text{L}$  en 5 tubos de microcentrífuga de  $1.5\text{ mL}$ , luego se repitió el mismo paso, pero con  $2,5\text{ mL}$  de imidazol  $75\text{ mM}$ , luego lo mismo con  $100\text{ mM}$  y finalmente lo mismo con  $500\text{ mM}$  (**Figura 3.5**). El contenido de cada uno de los tubos se cuantificó por absorbancia a  $280\text{ nm}$  de longitud de onda en un lector de placas (Tecan™ Infinite M200 PRO) y se almacenaron todos los tubos obtenidos y el sobrenadante filtrado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 3.5. Diagrama de flujo de la purificación de SpaD.** Metodología utilizada para purificar SpaD en conjunto con HaloTag® (Imagen preparada con BioRender®, www.biorender.com).

### 3.3.9 Verificación de la pureza de la proteína SpaD por gels de poliacrilamida SDS

Para poder verificar visualmente la presencia de la proteína SpaD, se utilizaron las muestras con mayor concentración en cada una de las concentraciones del gradiente, traspasando 19  $\mu\text{L}$  de la muestra a un nuevo tubo de microcentrifugación de 0.2 mL, a este se le agregó 1  $\mu\text{L}$  de *HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand* (1X) y se dejó incubando en oscuridad por 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se le agregaron 5  $\mu\text{L}$  de buffer de carga SDS-PAGE (5X). Se desnaturaron las proteínas a 95 °C por 15 minutos, luego se procedió a cargar las muestras en un gel de poliacrilamida SDS 10%.

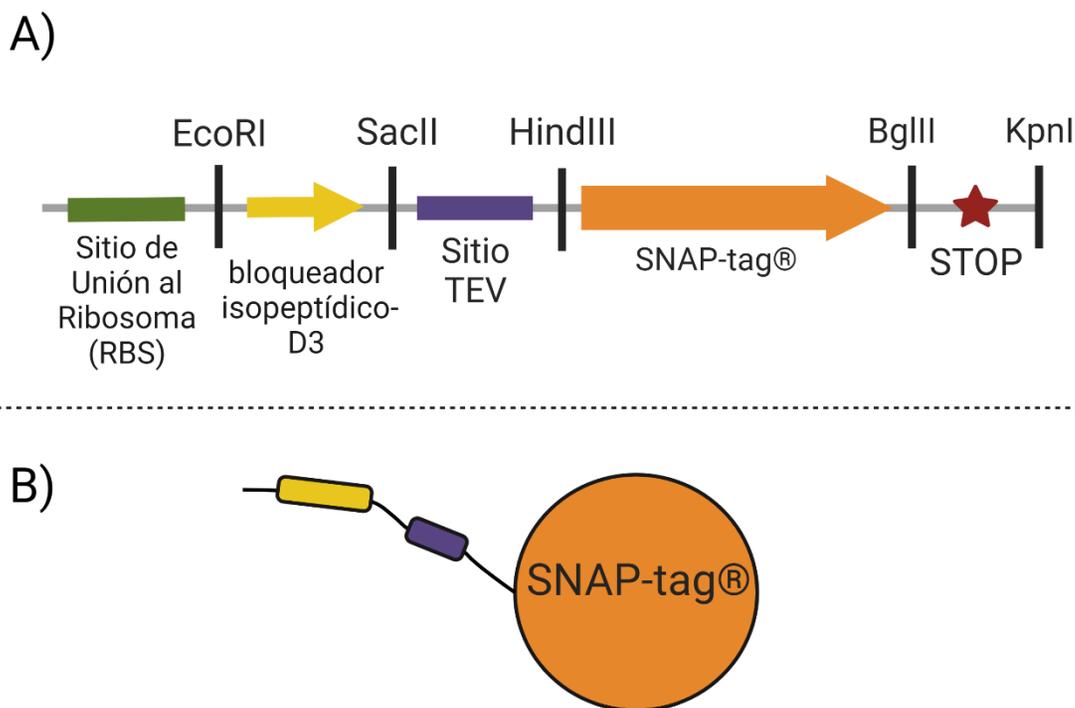
Para esto, se realizó una electroforesis vertical, en un gel de poliacrilamida al 10%, incluyendo SDS. Para cargar el gel, se utilizaron 5  $\mu\text{L}$  del estándar de proteínas preteñidas PageRuler™ Plus, de 10 a 250 kDa y luego se cargaron las muestras desnaturadas. Para proteger la integridad de la sonda fluorescente, la electroforesis se corrió protegida de la luz y bajo condiciones de voltaje constante a 80 Voltios por 40 minutos para luego ser dejadas a 120 V por aproximadamente 2 horas y 30 minutos, o hasta que el frente de migración se cayera del gel.

El gel fue visualizado usando un transiluminador con captura digital y equipado con epiluminiscencia (SmartView Pro-1100 Imager System, UVCI-1100). Primero se visualizó con luz azul para poder excitar *HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand*, capturando una foto al gel completo. Más tarde, se procedió a teñir el gel con azul de Coomassie con agitación suave durante la noche. Al día siguiente se realizó la destinción del gel con 3 lavados (o hasta que se haya removido completamente la sonda del fondo) de 1 hora con solución de destinción (25% Metanol, 15% Ácido acético y 60% Agua destilada). Se utilizó la misma cámara y se tomó una nueva foto con una base de luz blanca.

### **3.4. Generación del vector de expresión para el péptido sintético**

#### **3.4.1 Diseño in silico del vector de expresión para el péptido sintético**

Para generar el plásmido de expresión del péptido, se utilizó el plásmido comercial pSNAP-Tag® (T7)-2. Este expresará proteínas o péptidos en conjunto a una proteína de fusión (SNAP-Tag) de 20 kDa que se fusionará a la proteína o péptido de interés. Sin embargo, para poder realizar la inducción de los plásmidos de manera heteróloga, se transfirió de vector la secuencia codificante de la proteína SNAP-Tag al vector *pBAD-KanR*. Este nuevo vector nos permitió generar un sistema de expresión heteróloga al insertar la secuencia de la proteína SNAP-Tag. Este nuevo vector de expresión heteróloga (*pBAD-KanR bloqueador isopeptídico D3*) se generó por medio del servicio de síntesis de la empresa GenScript, donde se generó el siguiente inserto: Sitio de Unión al Ribosoma (RBS por sus siglas en inglés), sitio de reconocimiento de la enzima *EcoRI*, luego la secuencia codificante de nuestro péptido bloqueador isopeptídico D3, sitio de reconocimiento de la enzima *SacII*, sitio TEV, sitio de reconocimiento de la enzima *HindIII*, secuencia codificante de la proteína de fusión SNAP-Tag, sitio de reconocimiento de la enzima *BglII*, secuencia codificante codón de STOP y finalmente sitio de reconocimiento de la enzima *KpnI*. Toda esta secuencia sintetizada se insertó en el vector *pBAD-KanR*. Gracias a esto, se generó un constructo que contenía un inductor por arabinosa y que expresaba la proteína de fusión SNAP-Tag en conjunto con nuestro péptido (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6. Representación del constructo generado para la expresión del péptido.** En A) se puede apreciar una representación visual de cómo se diseñó el sistema de expresión del péptido. Luego esta secuencia se insertó en el vector *pBAD-KanR* (no representado) para su expresión heteróloga. En B) se puede apreciar una representación de cómo quedará el constructo posterior a su expresión (Imagen preparada con BioRender®, [www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

### 3.4.2 Generación de células quimio-competentes *BLR (DE3) pLysS pFN18a HaloTag® SpaD CC*

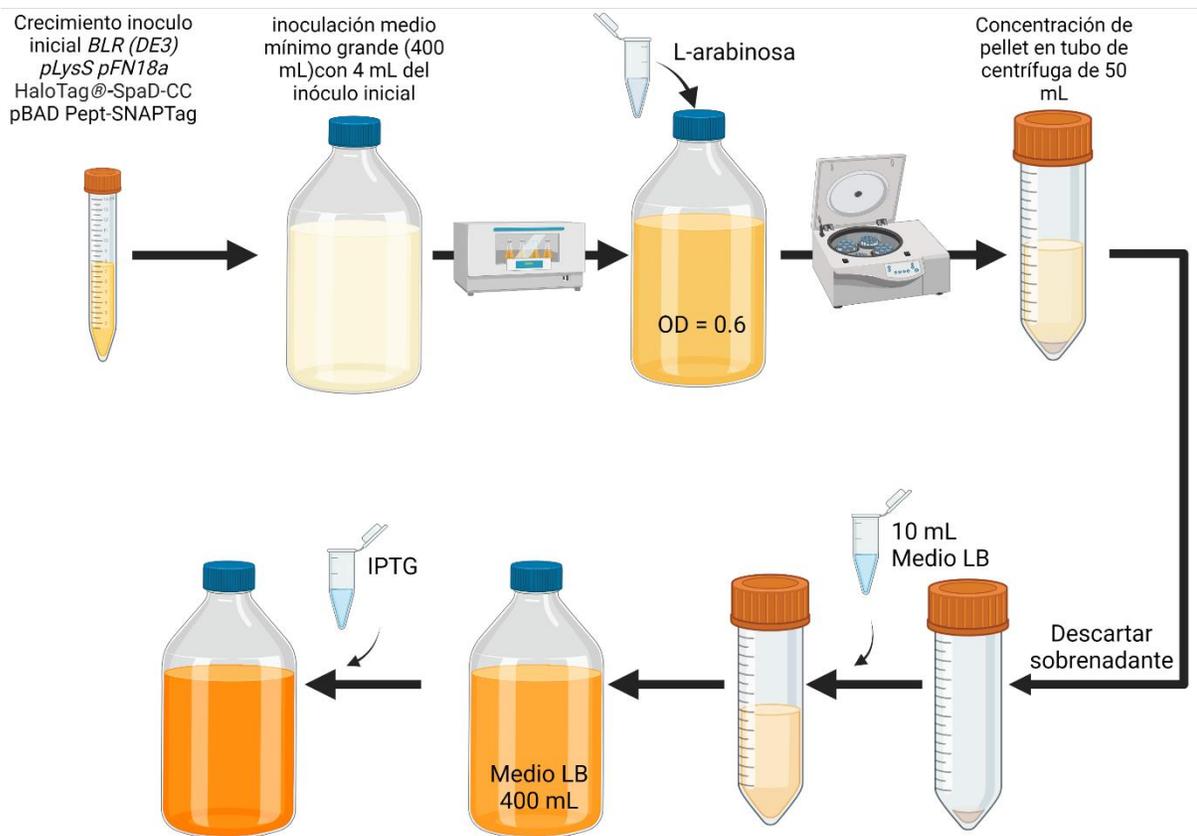
Se inocularon 5 mL de medio LB con 200  $\mu$ L de *BLR (DE3) pLysS pFN18a HaloTag® SpaD CC* suplementado con AMP, TET y CAM, se dejó el medio creciendo durante la noche. A la mañana siguiente, se inocularon 20 mL de medio LB nuevo con 200  $\mu$ L del medio inoculado previamente (1:100) en un tubo de centrifuga de 50 mL, este se suplementó con AMP, TET y CAM y se dejó creciendo hasta una  $OD_{600}$  0.5 a 0.6 en un agitador orbital a 180 rpm a 37 °C. Una vez alcanzó la OD deseada, se enfrió el tubo de centrifuga en hielo por 10 minutos. Se centrifugaron las células a 12.100 rcf por 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 12,5 mL de  $CaCl_2$  0,1 M estéril y frío. Se volvió a centrifugar el tubo a 12.100 rcf por 10 minutos a 4 °C, nuevamente se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 3,5 mL de  $CaCl_2$  y 1 mL de glicerol 50% estéril y frío. El volumen final se distribuyó en tubos de microcentrifuga con 100  $\mu$ L de las nuevas células quimio-competentes. Estos tubos se almacenaron a -80 °C hasta su nuevo uso.

### **3.4.3 Transformación de cepas *XL10* y *BLR (DE3) pLysS* con el vector *pBAD-KanR***

El vector *pBAD-KanR* se transformó en células de clonamiento *XL10* y las células de expresión *BLR (DE3) pLysS* que contenían el vector *pFN18a HaloTag® SpaD CC*. Esto se realizó por medio de la misma metodología mencionada anteriormente (ver **segmento 3.3.3**), pero se agregó el antibiótico kanamicina (KAN), dejando 4 antibióticos de uso: AMP, CAM, TET y KAN.

### **3.4.4 Expresión de *SNAP-Tag* - Péptido bloqueador isopeptídico *D3* y *HaloTag® SpaD* en *BLR (DE3) pLysS***

Para la expresión de *pBAD-KanR* bloqueador isopeptídico *D3*, primero se realizó un crecimiento en 5 mL de medio LB con los antibióticos AMP, CAM, TET y KAN durante la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 3.000 rfc por 10 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 4 mL de medio mínimo (Medio sales mínimas M9, suplementado con 0.2% de casaminoácidos (C2080, US Biological)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2 mM,  $CaCl_2$  0,1 mM y Glicerol 1,5%). Se inoculó un medio de 400 mL de medio mínimo estéril con los 4 mL de células (1% del volumen final) suplementado con AMP, CAM, TET y KAN. Una vez llegó a una  $OD_{600}$  0.5 a 0.6, se indujo con 0.2% p/v arabinosa durante 4 horas o durante la noche. A la mañana siguiente, se centrifugaron a 3.000 rcf, por 15 minutos a temperatura ambiente los 400 mL inducidos por arabinosa. Se colectaron todos los pellets en un tubo de centrifuga de 50 mL. El pellet se resuspendió en 4 mL de medio LB y se transfirió a un medio LB de 400 mL, suplementado con AMP, CAM, TET y KAN, donde se dejaron crecer durante 15 minutos para equilibrar los medios y se indujeron por IPTG 1mM durante 4 horas (**Figura 3.7**).



**Figura 3.7. Diagrama de flujo de la expresión del péptido y SpaD.** Metodología utilizada para expresar el péptido-SNAP-Tag en conjunto con HaloTag®-SpaD (Imagen preparada con BioRender®, www.biorender.com).

Finalmente, los 400 mL de medio inducido se centrifugaron a 12.100 rcf, por 15 minutos a 4 °C. Se colectaron todos los pellets en un tubo de 50 mL. El pellet se resuspendió en 16 mL de PBS (1X) para lavar nuevamente las células y se volvió a centrifugar a 12.100 rcf por 15 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet se almacenó a -80 °C hasta su nuevo uso.

### 3.4.5 Purificación de SNAP-Péptido bloqueador isopeptídico D3 en conjunto con HaloTag® SpaD

Para la purificación del conjunto SNAP-péptido con HaloTag® SpaD CC, los pellets provenientes de 400 mL fueron resuspendidos en 16 mL de PBS (1X), adicionando 160 µL de PMSF 10 mM y 160 µL de DTT 100 mM e incubando en hielo por 15 minutos. Se continuó con la misma metodología de purificación mencionada anteriormente (ver **segmento 3.3.8**), a diferencia que se adicionaron 160 µL de DTT 100 mM en conjunto al PMSF. Se procedió a centrifugar por 60 minutos a 12.100 rcf a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo de 50 mL nuevo, evitando tomar la fase sólida en el tubo. Este se almacenó a -80°C hasta su uso.

Nuevamente se utilizó la metodología descrita anteriormente (ver **sección 3.3.8**). El contenido de cada uno de los tubos se cuantificó por absorbancia a 280 nm de longitud de onda en un lector de placas (Tecan™ Infinite M200 PRO) y se almacenaron a -80 °C todos los tubos obtenidos y el sobrenadante filtrado.

#### **3.4.6 Verificación de la intervención de SpaD por el péptido sintético a través geles de poliacrilamida SDS**

Para verificar la presencia de la proteína SpaD intervenida con el péptido, se utilizaron las muestras con mayor concentración de cada una de las concentraciones del gradiente. Estas se concentraron por medio de unidades de filtrado Amicon® 30 kDa (Merck Millipore, UFC203024) a 5.000 rcf a 4 °C hasta llegar a un volumen final de 50 µL aproximadamente, luego se recuperó el volumen y se traspasó a un tubo de centrifuga de 0.2 mL. A partir de estos, se traspasaron (por duplicado de cada fracción) 19 µL de la muestra a un nuevo tubo de microcentrifuga de 0.2 mL. A un tubo se le agregó 1 µL de *HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand (1X)* y al otro se le agregó 1 µL de *SNAP-Surface® 488*, estos se dejaron incubando en oscuridad por 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se le agregaron 5 µL de buffer de carga SDS-PAGE (5X). Se desnaturaron las proteínas a 95 °C por 15 minutos, luego se procedió a cargar las muestras en un gel de poliacrilamida SDS 10%. A este se le incluyeron los controles: extracto crudo, filtrado y lavado, donde estos también fueron incubados y procesados como las muestras a analizar.

Luego de esto, se realizó una electroforesis vertical, en un gel de poliacrilamida al 10%, incluyendo SDS. Para cargar el gel, se utilizaron 5 µL del estándar de proteínas preteñidas PageRuler™ Plus, de 10 a 250 kDa y luego se cargaron las muestras desnaturadas. Para proteger la integridad de las sondas fluorescentes, la electroforesis se corrió protegida de la luz y bajo condiciones de voltaje constante a 80 Voltios por 40 minutos para luego ser dejadas a 120 V por aproximadamente 2 horas y 30 minutos, o hasta que el frente de migración se cayera del gel.

El gel fue visualizado usando un transiluminador con captura digital y equipado con epiluminiscencia. Primero se visualizó con luz azul para poder excitar los ligandos fluorescentes, capturando una foto al gel completo. Más tarde, se procedió a teñir el gel con azul de Coomassie con agitación suave durante la noche. Al día siguiente se realizó la destinción del gel con 3 lavados (o hasta que se haya removido

completamente la sonda del fondo) de 1 hora con solución de destinción. Se utilizó la misma cámara y se tomó una nueva foto con luz blanca.

## 4. Resultados

### 4.1 Rosetta produce diferentes interacciones del péptido con la proteína SpaD.

Como primer paso en la obtención de un péptido capaz de intervenir la formación del enlace isopeptídico del dominio 3 de la proteína SpaD de *C. diphtheriae*, se buscó generar y evaluar de manera computacional la intervención del enlace isopeptídico por medio del péptido candidato EIKNIKQ. Para esto se utilizó el programa computacional *Rosetta*, en el que se generaron interacciones del tipo péptido-proteína. Para esto, se realizaron 60.000 ensayos de posiciones diferentes del mismo péptido contra la proteína, además, se utilizó una posición del péptido en el bolsillo a modo de referencia para poder realizar los cálculos de RMSD (Figura 4.1).

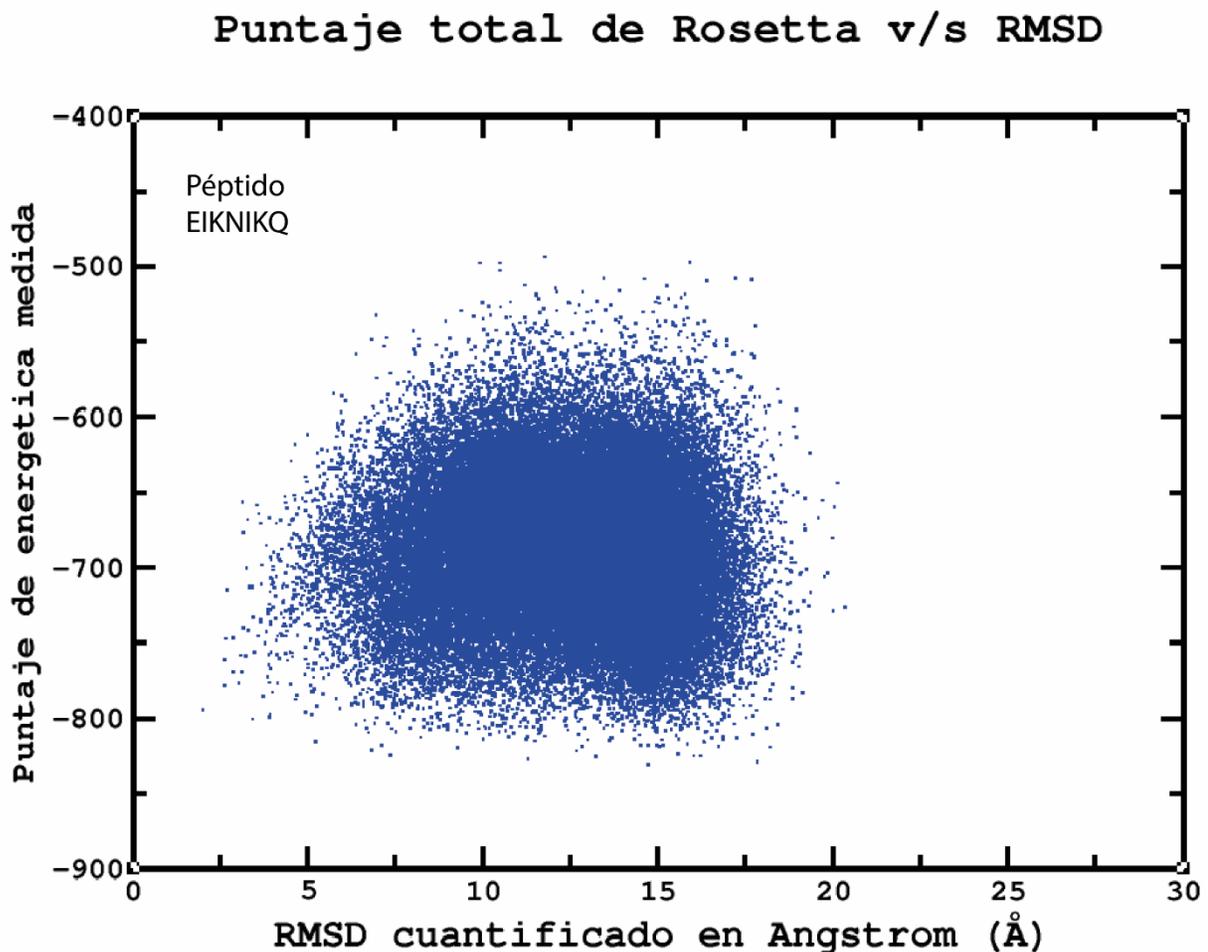


Figura 4.1. Gráfico representativo de los 60.000 resultados obtenidos en *Rosetta*. En el gráfico se compara la distancia de la posición del péptido obtenido (RMSD, medido en Ángstrom) con respecto al puntaje de energética medido en Unidades Energéticas de Rosetta (UER) obtenido en cada uno de los ensayos

Este gráfico representa los puntajes de energética, medido en Unidades Energéticas de Rosetta (UER), obtenidos por parte del péptido contra la proteína (Eje Y) versus la distancia de la posición del péptido ensayado contra la posición del péptido de referencia (Eje X), esto medido en las unidades de distancia: Ángstrom (Å). A partir de los datos entregados en este gráfico, deducimos que se logró generar el número de ensayos solicitados al sistema, se logró generar una distribución heterogénea de posiciones y distancia del péptido con respecto al péptido de referencia, se evidenció que no se forman agrupaciones de péptidos en el gráfico y que se muestran diferentes posiciones del péptido interactuando a lo largo de la proteína y no en un mismo lugar.

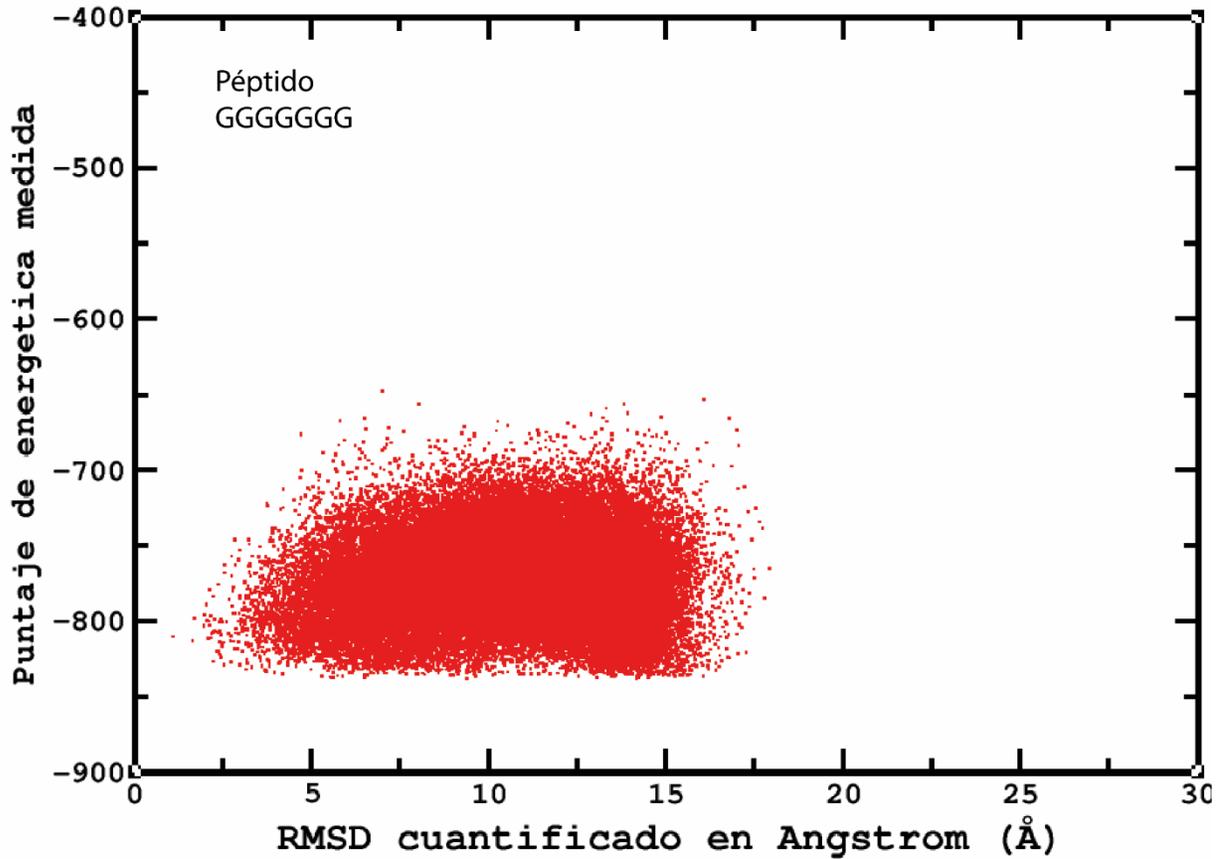
Posteriormente se buscó seleccionar los 10 mejores resultados obtenidos a partir de los 60.000 resultados generados. Para esto, se utilizó el comando indicado en la metodología (ver **segmento 3.2.9**), donde se realizó una organización de los datos obtenidos, ordenándolos por los resultados más negativos. A partir de estos, se seleccionaron los 10 mejores, obteniéndose una tabla de estos (**Tabla 4.1**).

**Tabla 4.1. Representación de los 10 mejores resultados de Docking del péptido candidato por medio de Rosetta.** En la tabla adjunta se muestran los 10 mejores resultados obtenidos por Rosetta, donde estos fueron ordenados por la energética obtenida.

Energética medida (UER)	Distancia en Angstrom (Å)	Código del péptido
-809	7.5	4HSQ_EIKNIQ_17050
-809	6.7	4HSQ_EIKNIQ_46177
-810	9.5	4HSQ_EIKNIQ_44577
-812	8.2	4HSQ_EIKNIQ_27397
-814	10.0	4HSQ_EIKNIQ_17316
-815	5.2	4HSQ_EIKNIQ_31432
-818	7.1	4HSQ_EIKNIQ_42044
-819	9.3	4HSQ_EIKNIQ_22368
-821	6.8	4HSQ_EIKNIQ_37362
-824	7.4	4HSQ_EIKNIQ_56072

Sin embargo, la evaluación del péptido candidato sin un péptido control carecía de sentido, por lo que se realizó la misma interacción del péptido candidato, pero con un péptido control, hecho únicamente de Glicinas (**Figura 4.2**).

## Puntaje total Rosetta v/s RMSD



**Figura 4.2.** Gráfico representativo de los 60.000 resultados del péptido control (PolyG) obtenido en *Rosetta*. En el gráfico se compara la distancia de la posición del péptido obtenido (RMSD, medido en Ångstrom) con respecto al puntaje de energética obtenido en cada uno de los ensayos.

En la figura se puede apreciar la distribución de los ensayos. Se puede apreciar una gran dispersión de los datos, mayor a la expuesta en la **Figura 4.1**. A partir de esto podemos suponer que el péptido control logra entrar al bolsillo, sin embargo, aún no podemos determinar con exactitud que péptido es mejor. Extrapolando esta idea, aun no podemos determinar si nuestro péptido candidato evaluado por medio del programa computacional Rosetta logra una buena unión al enlace isopeptídico del dominio 3 de SpaD.

Así mismo, se generó una tabla con los 10 mejores resultados obtenidos por el péptido control de Poly Glicinas (**Tabla 4.2**).

**Tabla 4.2. Representación de los 10 mejores resultados de Docking del péptido control por medio de Rosetta.** En la tabla adjunta se muestran los 10 mejores resultados obtenidos por Rosetta, donde estos fueron ordenados por la energética obtenida.

<b>Energética medida (UER)</b>	<b>Distancia en Angstrom (Å)</b>	<b>Código del péptido</b>
-887	9.8	4HSQ_PolyG_15150
-888	10	4HSQ_PolyG_40199
-891	9.6	4HSQ_PolyG_12754
-892	9.8	4HSQ_PolyG_16489
-893	9.4	4HSQ_PolyG_47751
-894	8.8	4HSQ_PolyG_45488
-895	9.9	4HSQ_PolyG_44843
-896	9.8	4HSQ_PolyG_58994
-899	9.8	4HSQ_PolyG_22833
-900	9.5	4HSQ_PolyG_28579

Esta tabla nos entrega información relevante a la hora de evaluar nuestro péptido, debido a que no sabemos si el péptido actúa de forma positiva por sí solo o si en realidad realiza una interacción con la proteína o inclusive si los parámetros establecidos fuerzan la entrada del péptido al bolsillo. A partir de estas tablas, se propuso una última tabla comparativa de los datos obtenidos, para poderlos comparar cuantitativamente (**Tabla 4.3**).

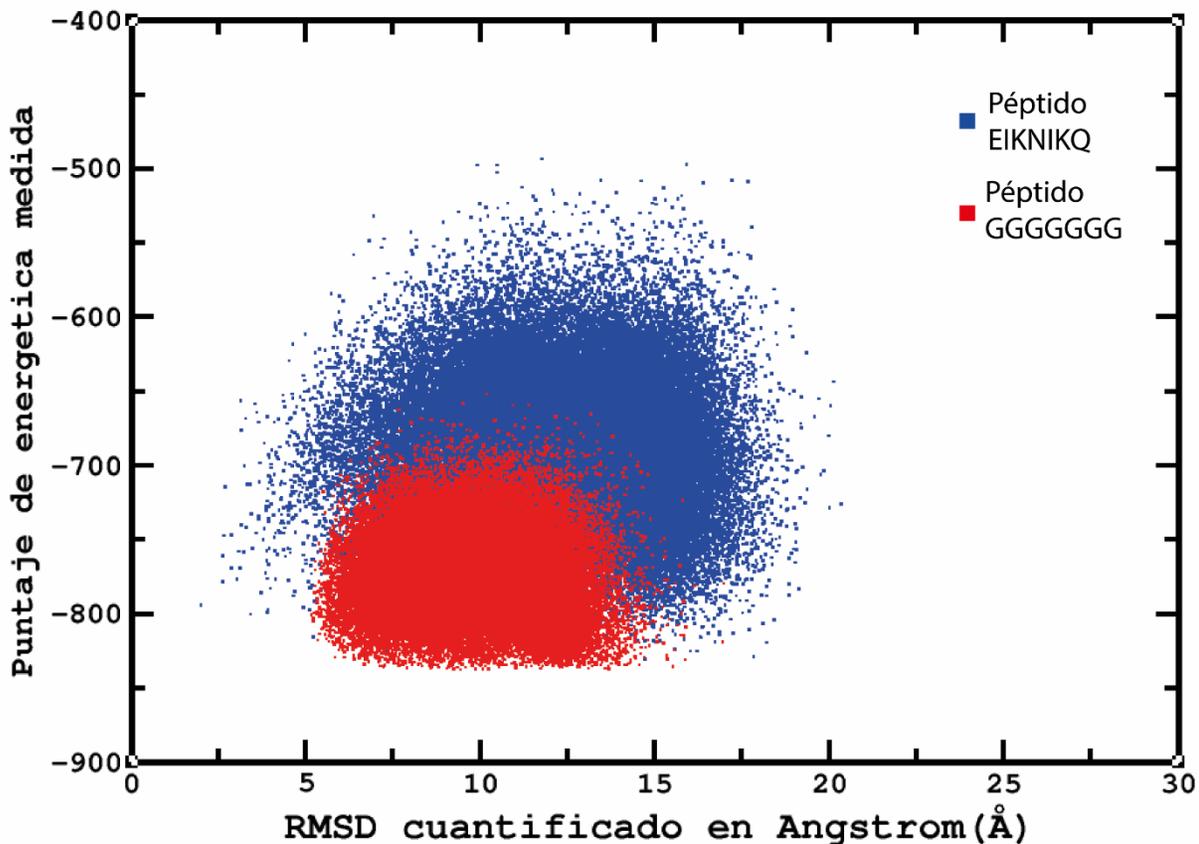
**Tabla 4.3. Tabla comparativa de las energéticas y RMSD del péptido candidato y péptido control.** En la tabla adjunta se muestran los 10 mejores resultados obtenidos por Rosetta del péptido candidato y el péptido control donde estos fueron ordenados por la energética obtenida.

	<b>Energética medida péptido EIKNIKQ (UER)</b>	<b>Energética medida péptido control (PolyG) (UER)</b>	<b>Distancia en Angstrom (Å) péptido EIKNIKQ</b>	<b>Distancia en Angstrom (Å) péptido control (PolyG)</b>
	-809	-887	7.5	9.8
	-809	-888	6.7	10
	-810	-891	9.5	9.6
	-812	-892	8.2	9.8
	-814	-893	10.0	9.4
	-815	-894	5.2	8.8
	-818	-895	7.1	9.9
	-819	-896	9.3	9.8
	-821	-899	6.8	9.8
	-824	-900	7.4	9.5
<b>Promedio</b>	<b>-815</b>	<b>-894</b>	<b>7.8</b>	<b>9.6</b>

A partir de esta tabla, se puede apreciar que se producen energéticas más negativas en el caso del péptido control, lo que no sería idóneo para nuestro análisis. Sin embargo, cuando nos fijamos en la distancia en Å del péptido candidato versus la distancia obtenida en el péptido control, nos encontramos con las diferencias que serán de mayor impacto a la hora de tomar una decisión. Se puede apreciar que en el péptido candidato se generan menores distancias, por lo que se acopla de mejor manera el péptido candidato que el péptido control. Además, se puede apreciar que las energías en ambos casos están relativamente cercanas, por lo que se pueden ver algunos ejemplos de uniones del péptido con la proteína con una alta afinidad. A partir de esto, se concluyó que el sistema de Rosetta logra generar resultados diferentes a partir de péptidos diferentes, indicando que los parámetros utilizados sirven para simular interacciones péptido-proteína de manera cuantitativa.

Ahora, si bien se logran caracterizar cualitativa y cuantitativamente las características de los ensayos, requeríamos una evaluación visual de ambos ensayos, por lo que decidimos hacer una superposición de los datos (**Figura 4.3**)

## Puntaje total de Rosetta v/s RMSD

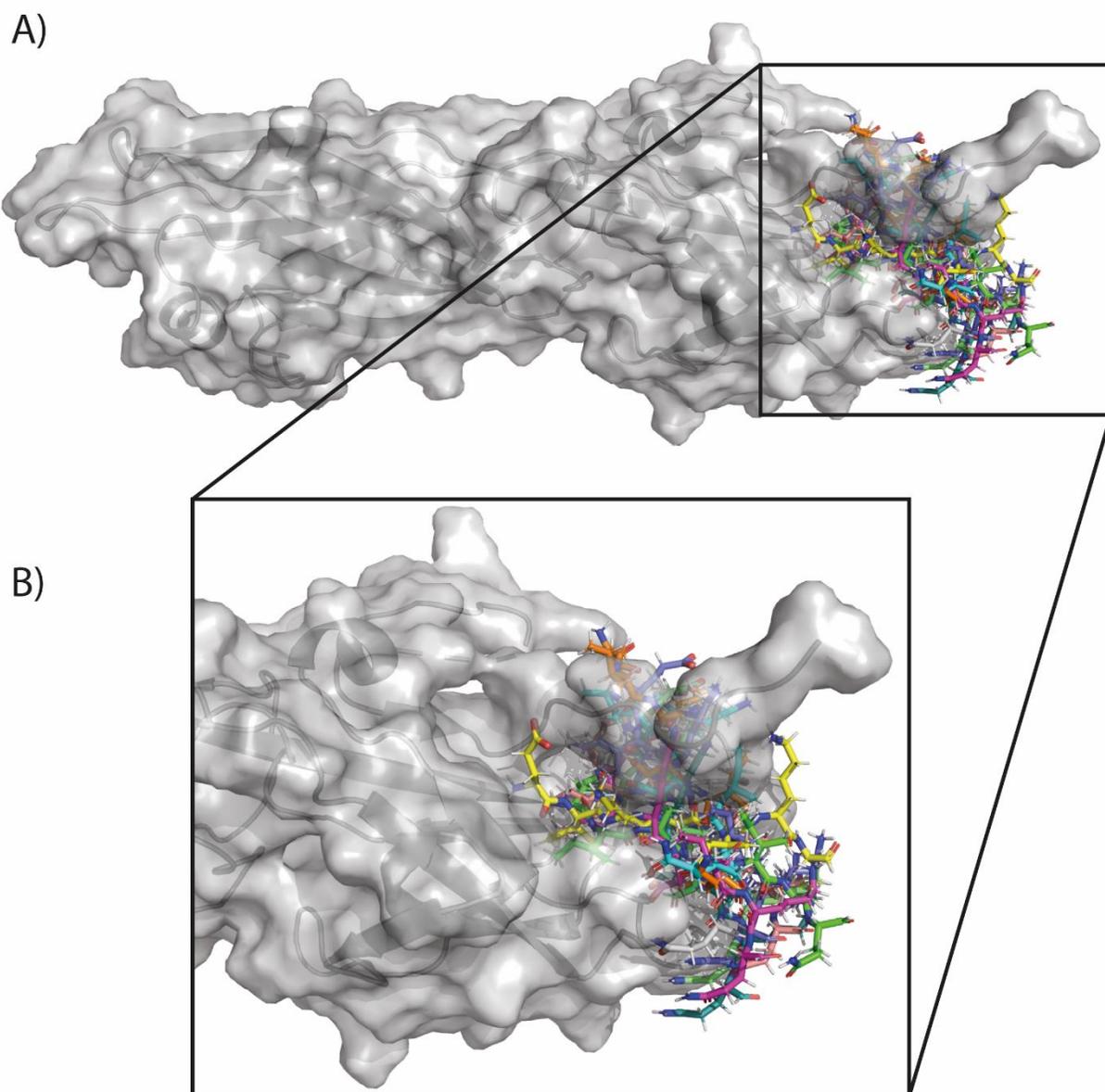


**Figura 4.3. Gráfico representativo de los ensayos del péptido candidato y del péptido control.** En el gráfico se muestran los 60.000 ensayos de Rosetta de ambos péptidos, donde el péptido candidato se ve en color azul y el péptido control se ve en rojo.

Con este gráfico se logran ver las diferencias en las distribuciones de los ensayos en cada uno de los péptidos. Se aprecia que el péptido control posee una mejor afinidad por el bolsillo, donde esto también se ve reflejado en la **Tabla 4.3** cuando nos fijamos en los promedios de las energéticas de los 10 mejores resultados de ambos casos. Sin embargo, las distancias de las posiciones de los péptidos obtenidos versus el péptido de referencia utilizado por Rosetta tienden a ser menores en el caso del péptido candidato.

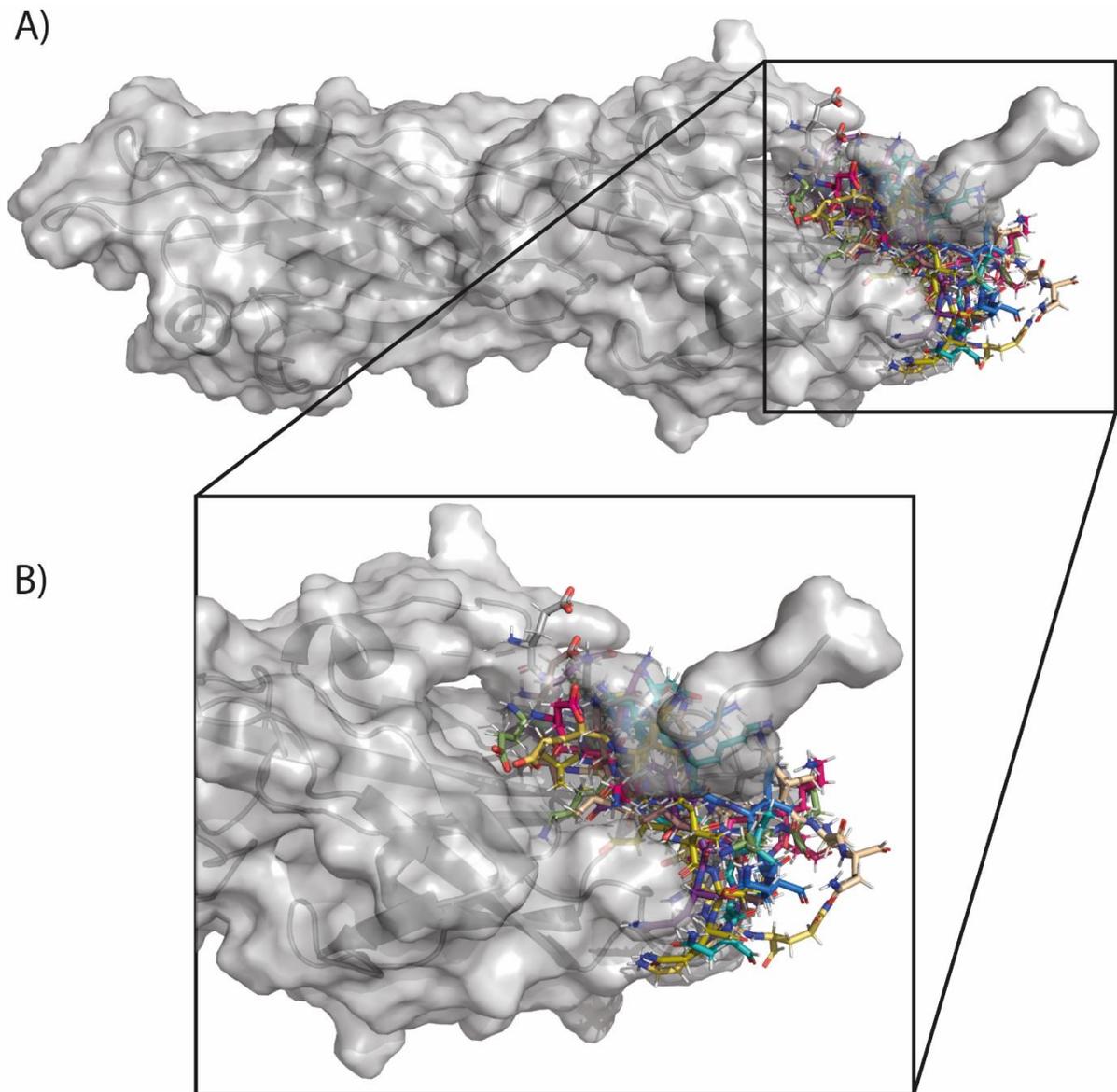
A pesar de toda la información entregada por el programa hasta el momento, se respondía parcialmente la aplicación de *Rosetta* para esta investigación, faltando analizar si los mejores péptidos generados efectivamente se podían unir al bolsillo y que tan bien lo hacían. Por lo tanto, con el fin de determinar la unión de los mejores, se utilizó la aplicación *PyMol* para evaluar visualmente

los 10 mejores resultados de cada uno de los experimentos (**Figura 4.4**). Los resultados fueron analizados buscando una posición correcta en el bolsillo generado en el dominio tres de SpaD y además se buscó una interacción en donde la asparagina del péptido interactuara con la lisina del bolsillo, formando un enlace.



**Figura 4.4. Visualización de los diez mejores resultados generados por Rosetta.** En A, se muestran simultáneamente los diez mejores resultados del péptido candidato generado por Rosetta, donde toman diferentes conformaciones y posiciones espaciales para distribuirse en el bolsillo generado para la intervención del enlace isopeptídico del dominio 3 de SpaD. En B, se muestra un acercamiento del bolsillo generado para la intervención del enlace.

En el gráfico se logra apreciar que los 10 mejores péptidos se unieron al bolsillo generado, por lo que se da a entender que se logra generar una unión con alta afinidad entre estos. También se aprecia que estos no generan superposiciones con la proteína, respetando la estructura de la proteína y del péptido. Sin embargo, faltaba evaluar la representación gráfica de los 10 mejores resultados del péptido control PolyG (**Figura 4.5**).



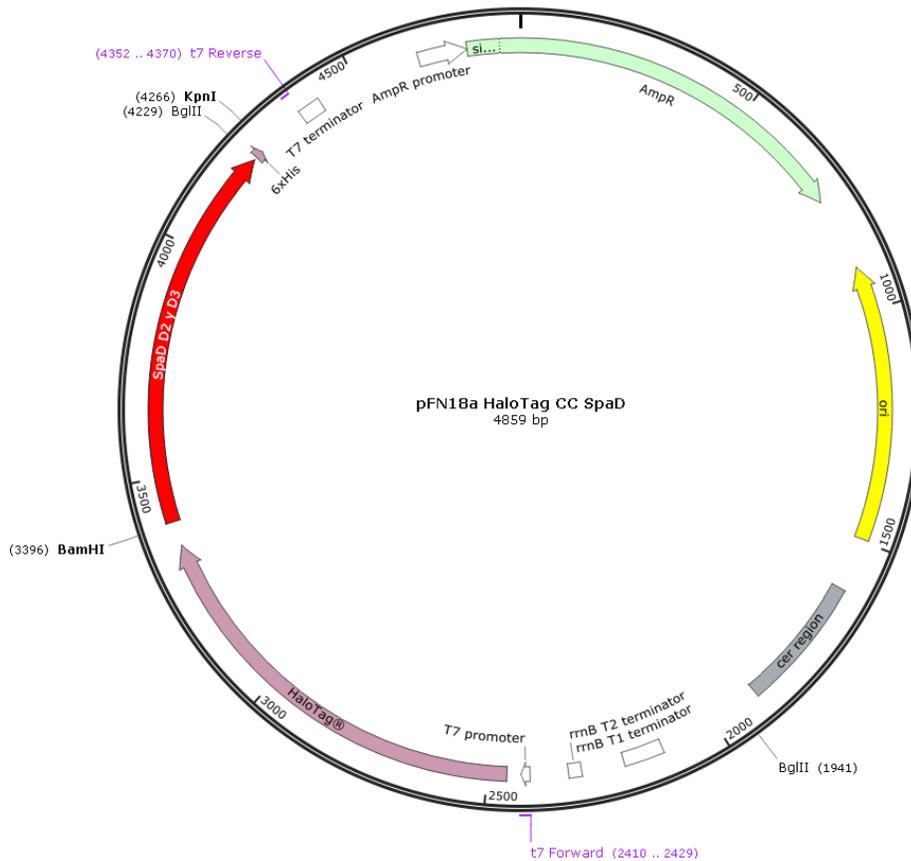
**Figura 4.5. Visualización de los diez mejores resultados del péptido control PolyG generados por Rosetta.** En A, se muestran simultáneamente los diez mejores resultados del péptido control PolyG generado por Rosetta, donde toman diferentes conformaciones y posiciones espaciales para distribuirse en el bolsillo generado para la intervención del enlace isopeptídico del dominio 3 de SpaD. En B, se muestra un acercamiento del bolsillo generado para la intervención del enlace.

En la imagen se logra ver que, al igual que en la imagen del péptido candidato, se genera un posicionamiento de los péptidos en el bolsillo. A simple vista, no se logran apreciar grandes diferencias, pero cuando nos fijamos en la **Tabla 4.3**, nos damos cuenta de que si las hay. A partir de esto se concluye que los péptidos control logran unirse al bolsillo, sin embargo, no logran distancias más cercanas que el péptido candidato.

#### **4.2 Generación vector de expresión con SpaD**

Una vez concluidos los ensayos computacionales, se dio paso a los trabajos de biología molecular para la expresión de la proteína por medio de un vector de expresión para su posterior intervención por medio del péptido evaluado computacionalmente.

Como primer paso para la generación del vector de expresión con los dominios dos y tres de SpaD, se utilizó el servicio de síntesis de la empresa GenScript. El diseño del inserto corresponde a una secuencia que inicia con el sitio de reconocimiento de la enzima *BamHI*, luego la secuencia codificante de los dominios dos y tres de la proteína SpaD de *Corynebacterium diphtheriae*, continúa con la secuencia de reconocimiento de la enzima *BglII*, luego, una secuencia codificante a seis histidinas (6x HisTag), luego dos secuencias codificantes para cisteínas, una secuencia codificante para un codón de stop y finalmente la secuencia de reconocimiento de la enzima *KpnI* (**Figura 4.6**).



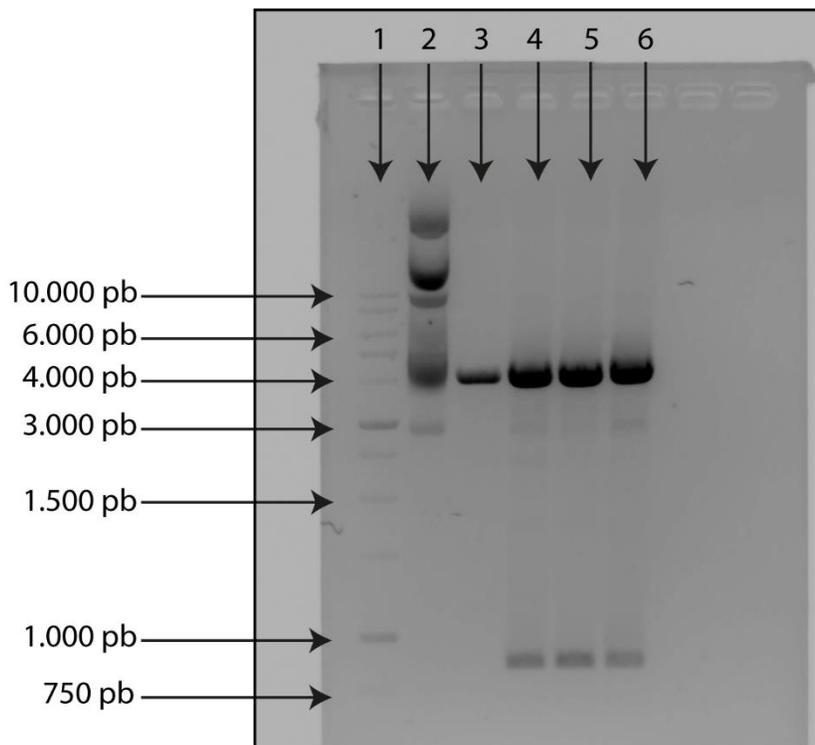
**Figura 4.6. Representación del vector de expresión *pFN18a HaloTag® SpaD CC*.** En la imagen se muestra una representación gráfica del vector de expresión *pFN18a HaloTag® SpaD CC* con sus respectivas enzimas de restricción, imagen generada por la aplicación *SnapGene®*.

Todo este inserto se clonó por medio de los sitios *BamHI* y *KpnI* en el vector de expresión *pFN18a HaloTag®*. A partir del resultado entregado por la empresa, se determinó que se presentan los requerimientos para poder realizar la expresión de la proteína, siendo estos un codón de inicio situado en la primera metionina del HaloTag®, una conexión entre la proteína de fusión y la secuencia codificante de SpaD, la secuencia codificante de HisTag y el codón de STOP. Este vector además nos serviría en un futuro para posibles expresiones concatenadas de la misma proteína para poder realizar experimentos de resistencia mecánica.

### 4.3 La secuencia codificante de SpaD se insertó con éxito en el vector de expresión *pFN18a HaloTag®*

Como medio de verificación de la inserción de la secuencia de interés en el vector de expresión, se realizó una doble digestión para la liberación del inserto codificante para SpaD. Esta digestión se realizó por medio de las enzimas de restricción *BamHI* y *KpnI*. En el carril 1 se muestra el estándar de

peso molecular 1Kb Maestrogen, en el carril 2 se muestra un control de ADN plasmidial sin digerir, en el carril 3 se muestra el vector vacío digerido por las enzimas *BamHI* y *KpnI*, desde el carril 4 hasta el 6 se aprecian las muestras de ADN plasmidial de las 3 colonias evaluadas, donde las tres fueron digeridas por las enzimas *BamHI* y *KpnI*. En el control del ADN sin inserto no digerido se aprecian múltiples bandas por encima de los 4 kilobases (kb). En el control de la digestión doble del vector sin inserto se puede apreciar una banda, que se sitúa en el tamaño de los 4kb, indicando una digestión correcta por las enzimas. Para la primera muestra se aprecian dos bandas, donde una se sitúa en los 4kb, posiblemente señalando al vector sin el inserto y la banda entre los 750 pares de bases (pb) y 1kb coinciden con el tamaño esperado del inserto, debido a que este mide 870 pb. Este patrón se repite en las tres muestras evaluadas en la electroforesis (**Figura 4.7**).

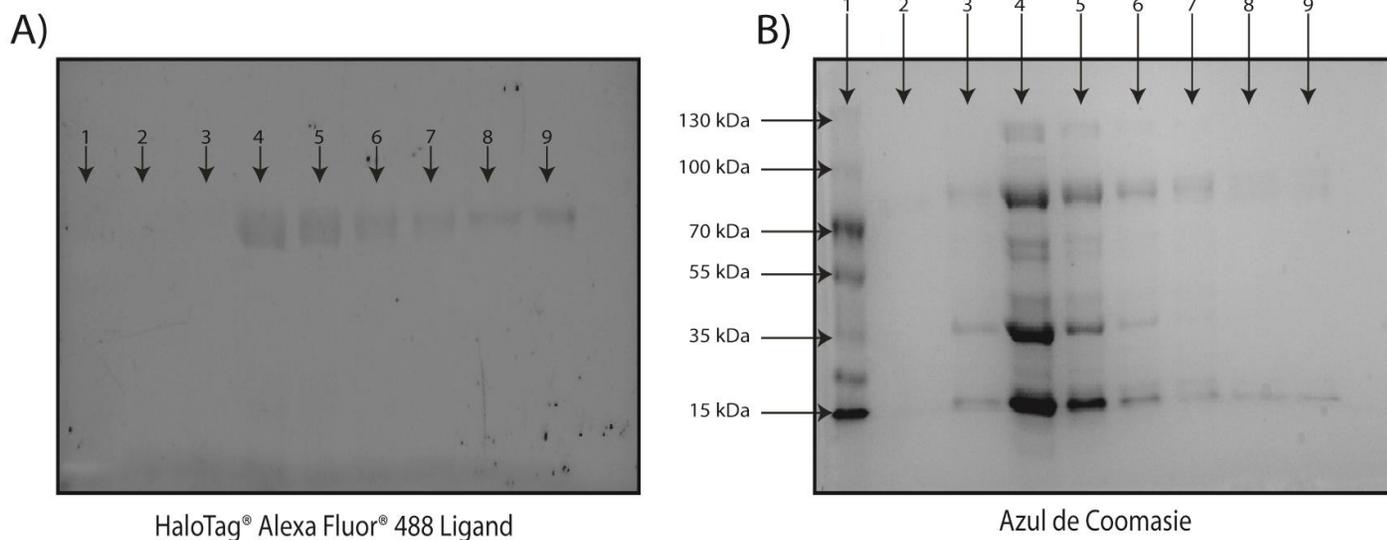


**Figura 4.7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v con digestiones vector de expresión *pFN18a HaloTag<sup>®</sup> SpaD CC*.** Los ADN fueron tratados con dos enzimas de restricción *BamHI* y *KpnI*, para comprobar la presencia del inserto en el plásmido. En el carril 1 se cargó estándar de peso molecular 1Kb Maestrogen, en el carril 2 se cargó una muestra de ADN *pFN18a HaloTag<sup>®</sup>* sin digerir, en el carril 3 se cargó una muestra de ADN *pFN18a HaloTag<sup>®</sup>* digerida con las enzimas *BamHI* y *KpnI*, en el carril 4 se cargó una muestra ADN colonia 1 *pFN18a HaloTag<sup>®</sup> SpaD CC* digerida con las enzimas *BamHI* y *KpnI*, en el carril 5 se cargó una muestra ADN colonia 2 *pFN18a HaloTag<sup>®</sup> SpaD CC* digerida con las enzimas *BamHI* y *KpnI* y en el carril 6 se cargó una muestra ADN colonia 3 *pFN18a HaloTag<sup>®</sup> SpaD CC* digerida con las enzimas *BamHI* y *KpnI*.

En el gel se puede apreciar que en el carril 2 el vector sin digerir produce una banda en la parte superior del gel y luego otras bandas hasta llegar a los 4 kb, posiblemente mostrando los estadios de un vector circular sin digerir, esto nos indica cómo se ve si nuestro vector con inserto no hubiese sido digerido correctamente. En el carril 3 vector control sin inserto digerido produce una banda única debido a la falta de inserto, pero nos sirve para determinar si la digestión producida en las muestras corresponde al vector sin el inserto. En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que se logró generar un vector de expresión para SpaD, en el que se pueden realizar ediciones genéticas, lo que nos servirá para poder expresar SpaD en conjunto con su proteína de fusión HaloTag®.

#### 4.4 SpaD se expresa en conjunto con la proteína de fusión HaloTag®

Una vez confirmada la existencia del inserto en el vector, se buscó evaluar la expresión de la proteína SpaD en conjunto con su proteína de fusión HaloTag® por medio del inductor IPTG. Una vez realizada la expresión, se realizó una purificación de las proteínas obtenidas para poder ser evaluadas por medio de la técnica de electroforesis vertical, utilizando un gel de poliacrilamida SDS al 10%, cargado con las fracciones obtenidas en la purificación por medio de cromatografía de afinidad en columnas. Esta afinidad se produjo por medio de las histidinas (6x HisTag) expresadas en el constructo, donde las histidinas tienen afinidad por el níquel presente en la columna.



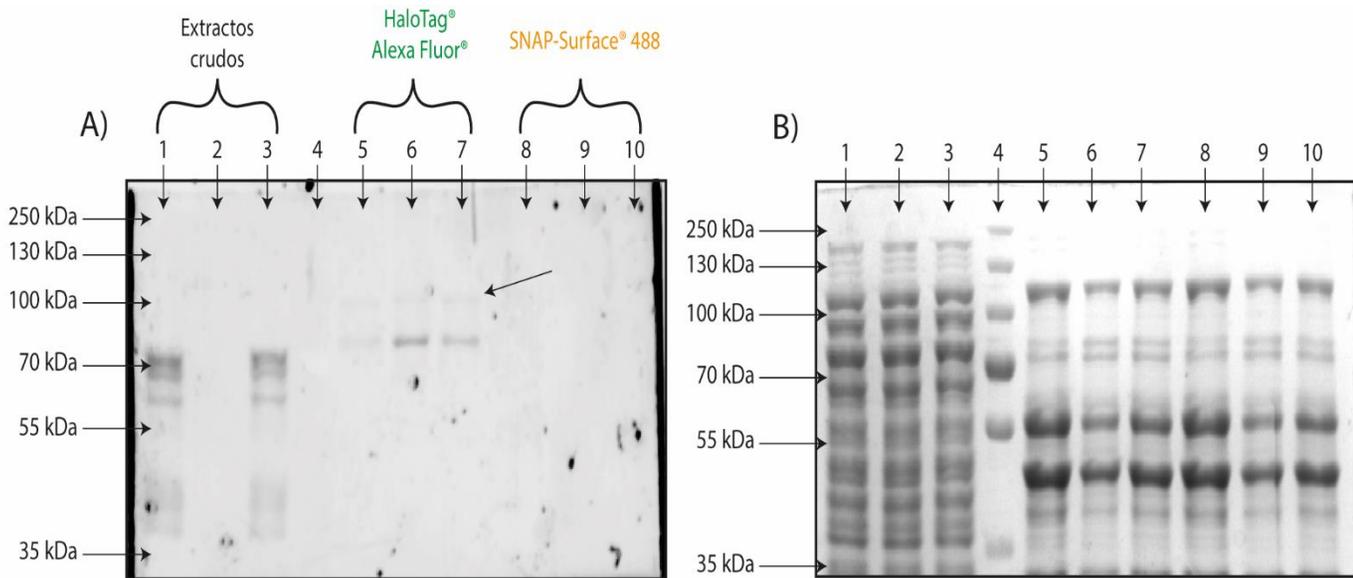
**Figura 4.8. Expresión y purificación de HaloTag®-SpaD.** En A, se ve un gel de poliacrilamida SDS al 10%, con tinción de HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand conjugado con la proteína HaloTag®, visualizado con luz azul. En B, se ve el mismo gel de poliacrilamida SDS al 10%, teñido con azul de Coomassie, conteniendo las primeras nueve fracciones obtenidas por cromatografía de columnas de la proteína HaloTag®-SpaD, con el estándar de proteínas preteñidas PageRuler™ Plus de 10 a 250 kDa. En el carril 1 se cargó el estándar de proteínas

preteñidas PageRuler™ Plus de 10 a 250 kDa, en el carril 2 se cargó la fracción 1 50 mM, en el carril 3 se cargó la fracción 2 50 mM, en el carril 4 se cargó la fracción 3 50 mM, en el carril 5 se cargó la fracción 4 50 mM, en el carril 6 se cargó la fracción 5 50 mM, en el carril 7 se cargó la fracción 1 75 mM, en el carril 8 se cargó la fracción 2 75 mM y en el carril 9 se cargó la fracción 3 75 mM.

Para distinguir las proteínas interferentes de nuestra proteína de interés, se utilizó la sonda fluorescente HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand, la que se une covalentemente a la proteína de fusión HaloTag® (**Figura 4.8 A**). A partir de este resultado podemos concluir que efectivamente se logra expresar y purificar SpaD, y que nuestra proteína de interés queda unida a la proteína de fusión y genera una banda superior a los 70 kDa. Los tamaños en el gel nos muestran que la expresión de la proteína SpaD en conjunto con HaloTag®, donde SpaD pesa aproximadamente 30.3 kDa y HaloTag® pesa 33.6 kDa, por lo que la suma de ambos tamaños es de aproximadamente 67 kDa. En el gel con tinción de azul de Coomassie (**Figura 4.8 B**) se aprecian bandas superiores a los 70 kDa y otras bandas que corresponderían a proteínas de menor tamaño molecular que prevalecieron a pesar de la purificación.

#### **4.5 Intervención de la formación del enlace isopeptídico del Dominio 3 de SpaD**

Finalmente, se buscó evaluar la expresión secuencial de la proteína HaloTag®-SpaD con el péptido-SNAP-Tag. En esta se buscaba evaluar la intervención de la formación del enlace isopeptídico del dominio 3 de SpaD por medio del péptido ingenierizado. Se realizaron expresiones heterólogas continuas para poder generar primero el péptido en altas concentraciones y luego la proteína. Posteriormente se realizó una extracción y purificación de las proteínas por medio de la cromatografía de afinidad por columnas y una posterior concentración de las fracciones obtenidas. Estas se cargaron en un gel de poliacrilamida SDS 10%, en conjunto con sus ligandos fluorescentes (**Figura 4.9**).



**Figura 4.9. Expresión y purificación de expresión secuencial del Péptido-SpaD.** En la figura A, se muestra un gel de poliacrilamida SDS al 10%, gel teñido con los fluoróforos HaloTag® Alexa Fluor® 488 o SNAP-Surface® 488, donde en el carril 1 se muestra el extracto crudo teñido con HaloTag® Alexa Fluor® 488 y SNAP-Surface® 488, en el carril 2 se muestra el mismo extracto crudo solo con tinción del fluoróforo SNAP-Surface® 488, en el carril 3 se muestra el mismo extracto crudo solo con tinción del fluoróforo HaloTag® Alexa Fluor® 488, en el carril 4 se muestra el estándar de proteínas preteñidas PageRuler™ Plus de 10 a 250 kDa, en el carril 5 se muestra la expresión secuenciada fracción 2 50mM concentrada con tinción del fluoróforo HaloTag® Alexa Fluor® 488, en el carril 6 se muestra la expresión secuenciada fracción 3 50mM concentrada con tinción del fluoróforo HaloTag® Alexa Fluor® 488, en el carril 7 se muestra se muestra la expresión secuenciada fracción 4 50mM concentrada con tinción del fluoróforo HaloTag® Alexa Fluor® 488, en el carril 8 se muestra la expresión secuenciada fracción 2 50mM concentrada con tinción del fluoróforo SNAP-Surface® 488, en el carril 9 se muestra la expresión secuenciada fracción 3 50mM concentrada con tinción del fluoróforo SNAP-Surface® 488 y en el carril 10 se muestra la expresión secuenciada fracción 4 50mM concentrada con tinción del fluoróforo SNAP-Surface® 488, visualizado con luz azul. En la figura B, se muestra el mismo gel de poliacrilamida SDS al 10%, teñido con azul de Coomassie, visualizado con luz blanca.

Como se puede apreciar en la figura, se realizó una carga de los pocillos del gel de poliacrilamida SDS 10%, donde en la **Figura 4.9 A** se presenta el gel cuando es irradiado con luz azul, produciendo una excitación de los fluoróforos afines a las proteínas de fusión asociadas a cada complejo. En los carriles 5, 6 y 7 se presentan las fracciones concentradas de la expresión secuencial, donde estos están teñidos únicamente por HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand. Se aprecian unas bandas por sobre los 70 kDa en los 3 carriles mencionados y además se aprecian unas bandas leves por encima de estas, siendo cercanas a los 100 kDa. En los carriles 8, 9 y 10 se presentan las cargas de las mismas fracciones concentradas en el mismo orden, sin embargo, estas fueron teñidas por medio de SNAP-Surface® 488, en estas no se aprecian bandas en la parte superior. En la **Figura 4.9 B** se muestran las diferentes proteínas presentes en el gel, donde se puede apreciar un bandeo intenso en los primeros 3 carriles debido al uso del extracto crudo (no purificado), de los carriles 5 al 10 se presentan las

fracciones concentradas de la purificación de la expresión secuenciada, donde están teñidas con diferentes fluoróforos.

Los resultados expuestos en la **Figura 4.9 A** muestran que se genera una intervención del enlace por medio del péptido, debido a la existencia de bandas superiores en 20 kDa frente a el complejo HaloTag®-SpaD. En conclusión, el dominio 3 de SpaD logra ser intervenido por el péptido basado en la secuencia nativa, pero no logra intervenir el total de proteínas expresadas, sino que interviene una pequeña fracción.

## 5. Discusión

Las bacterias son probablemente el dominio del árbol de la vida que ha logrado colonizar y habitar el mayor número de nichos ecológicos de la tierra (1) . Estas abarcan cerca del 70% de la biomasa total de la superficie terrestre, teniendo una función vital en la sustentabilidad del medioambiente (2). Estas han desarrollado sistemas complejos para poder subsistir en las superficies a colonizar. Estos complejos macromoleculares denominados pilinas o pilus, son altamente resistentes a cambios mecánicos en su ambiente, debido al desarrollo de un enlace covalente entre una asparagina y una lisina en sus cadenas, formando un enlace isopeptídico. Este logra disipar el estrés mecánico a lo largo de este complejo sin comprometer la unión a la superficie. Adicionalmente se presenta una crisis creciente con respecto a los antibióticos, las bacterias están generando resistencias a estos de una manera exponencial, donde encontramos bacterias multirresistentes. Bajo este contexto, buscamos generar los primeros conocimientos para una estrategia basada en péptidos para entorpecer la adhesión de *C. diphtheriae* a superficies, atacando el enlace isopeptídico del tercer dominio de la subunidad mayor SpaD.

El programa computacional *Rosetta* nos permite generar nuevos plegamientos de proteínas, generar nuevas enzimas, estabilizar enzimas, rediseñar estructuras proteicas, realizar interacciones péptido-proteína o proteína-proteína e inclusive generar interacciones ADN-proteína (100). Dentro de estos, la interacción péptido-proteína es de nuestro interés, debido a que nos permite simular la adhesión del péptido a la proteína blanco, que en nuestro caso fue el dominio dos y tres de SpaD. Se ha visto que en los diferentes programas existentes que simulan interacciones péptido-proteína, recaen en que la afinidad es uno de los parámetros más importantes dentro de estos (101). Gracias a este parámetro en conjunto con el RMSD se obtiene un gráfico que representa las mediciones de las interacciones de los péptidos con la proteína, midiendo la energética en unidades propias de Rosetta versus la distancia del péptido obtenido contra la del péptido referencia (**Figura 4.1 y 4.2**). Este gráfico generalmente tiende a tener una forma creciente desde el hemisferio inferior izquierdo hacia el hemisferio superior, desplazándose hacia la derecha a medida que va aumentando la energética (102). Sin embargo, en nuestro resultado se puede apreciar que los datos están más centrados, donde unos pocos logran menores energéticas y menores mediciones de RMSD. Esto se puede deber a la proteína modelo utilizada, ya que se ha visto que las interacciones del programa pueden variar dependiendo del tamaño del bolsillo, la naturaleza del péptido utilizado y los parámetros del programa (103). Cabe destacar que no se descarta la idea de mejorar el sistema propuesto, en este

aún se pueden incluir más parámetros, como aumentar o disminuir los máximos de torsión del péptido, abrir más el bolsillo de interacción de la proteína o inclusive utilizar otras variantes de Rosetta. Un ejemplo de esto último sería Rosetta DARC, donde en los pasos iniciales se determina el tamaño del bolsillo, se hace una reconstrucción tridimensional y se realizan interacciones a partir de un péptido inicial, luego se van iterando los 20 aminoácidos en cada posición del péptido, hasta lograr llegar a un candidato con la mejor afinidad. A partir de los resultados obtenidos de Rosetta, se determinó que en general se produjo un buen acoplamiento del péptido a la proteína en su bolsillo, por lo que se decidió que se utilizaría el péptido candidato para intervenir la formación del enlace isopeptídico en SpaD.

Una vez finalizadas las simulaciones computacionales del péptido con la proteína, comenzamos a trabajar en el desarrollo del sistema de expresión de la proteína. Para esto necesitábamos un vector de expresión, para funciones de esta investigación, utilizamos el vector *pFN18a HaloTag*<sup>®</sup>. Este vector nos entrega una gran versatilidad, gracias al posicionamiento de los sitios de corte por enzimas de restricción. Así mismo, nos entrega su mejor cualidad, una secuencia codificante a la proteína de fusión HaloTag<sup>®</sup>, donde jugará un rol fundamental en los próximos experimentos a realizar.

Con respecto al clonamiento del inserto en el vector de expresión, se logró generar un sistema de expresión para la proteína. Gracias a su diseño con diferentes sitios de corte, se pueden realizar modificaciones para cambiar el inserto de un vector a otro, insertar nuevas secuencias al mismo vector o inclusive utilizarlos como sistemas de verificación de inserto. En la **Figura 4.7**, la aparición de dos bandas en la digestión del vector con el inserto nos indica que efectivamente se generó una doble digestión en este. La presencia de una banda de aproximadamente 4 kb nos da indicio de que es el vector sin su inserto y la banda entre los 1.000 bp y 750 bp nos indica que es el inserto (870 bp). Esto nos corrobora que tanto los sitios *BamHI* y *KpnI* funcionan a la perfección como se planeó en el diseño propuesto. En los controles se puede apreciar la aparición de múltiples bandas en el carril 2, donde este consistía en utilizar el vector *pFN18a HaloTag*<sup>®</sup> *SpaD CC* sin digerir. Estas múltiples bandas se pueden asociar a los diferentes estados de un vector al momento de ser corrido en un gel de electroforesis, siendo estos: super enrollado, mellado, circular y linealizado (104). A partir de este experimento se concluyó que las colonias a las que se les realizó una extracción de ADN plasmidial, presentaban el vector con el inserto de interés, dando pie a la transformación de las células de expresión para poder expresar y purificar la proteína de interés.

Posterior a la generación y verificación del vector de expresión para nuestra proteína, se buscó evaluar la expresión de SpaD en conjunto con su proteína de fusión HaloTag®. En la **Figura 4.8 B**, se pueden ver bandas presentes cercanas a los 35 kDa, estas están presentes desde el carril 3 hasta el carril 7. Estas podrían representar los dominios dos y tres de la proteína SpaD o HaloTag®, considerando que al momento realizar la extracción se pueden producir cortes en la unión de las proteínas. También cabe la posibilidad de la presencia de proteasas, que, al encontrar zonas abiertas, como lo son la unión de SpaD con HaloTag®, corten estos sitios dejando libre a SpaD.

Posteriormente, cuando se realiza la purificación por cromatografía de afinidad, únicamente las proteínas que contengan el sistema HisTag podrán ser purificadas, por lo que esas bandas posiblemente correspondan únicamente a SpaD sin HaloTag®, sin embargo, esta idea no es concluyente por sí sola. Ahora, si bien HisTag es el método de purificación utilizado en esta investigación, no es el único (105). Frecuentemente, se utiliza HaloTag® para poder realizar purificaciones, donde HaloTag® se une irreversiblemente a una superficie afín, posteriormente se realiza un corte por medio de la enzima TEV que reconoce un sitio TEV situado entre HaloTag® y la proteína de interés (106). Sin embargo, para futuros análisis es fundamental mantener HaloTag® unido a SpaD, por lo que no podemos utilizar esa vía de purificación. Debido a esto se optó por un método de purificación basado en el C-terminal como lo es HisTag, donde se une a un ion metálico como el níquel, cobalto o cobre (107–109).

Por si solas, estas bandas no logran demostrar ser la proteína purificada, ya que podrían ser contaminantes como proteínas producidas por la propia bacteria, por lo que, como solución a esto, se utilizó un método de verificación de la expresión, donde se realiza una tinción por medio del fluoróforo ligando: *HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand*, donde este se une específicamente a la proteína HaloTag®. Esta proteína de fusión es un haloalcano deshalogenasa bacteriana mutada, que reacciona con los grupos cloroalcanos, formando enlaces covalentes (110). En este caso, realiza un enlace covalente con los dominios dos y tres de SpaD. Esto es de vital importancia, ya que permite la visualización de complejos por medio de fluoróforos y geles de poliacrilamida SDS, por otra parte, otorga estabilidad a el complejo, disminuyendo la posibilidad de degradación de esta en el interior de la célula, además y la inmovilización del complejo a superficies (111,112). Finalmente, cuando

HaloTag® es expuesto a su fluoróforo ligando y es irradiado con luz azul, produce la excitación del fluoróforo, emitiendo una luz verde visualizable en un transiluminador (**Figura 4.8 A**).

El uso de este fluoróforo nos permite determinar la posición de la banda en el gel. Por consiguiente, cuando es teñida con el fluoróforo ligando de HaloTag®, no se presentan bandas en los 33 kDa, descartando la opción de que sea HaloTag® libre. Sumado a esto, HaloTag® es una proteína estandarizada, posee un peso molecular determinado de 33 kDa (113), mientras que los dominios dos y tres SpaD por sí solos pesan 30.3 kDa aproximadamente. Se ha visto que cuando se han realizado purificaciones de la subunidad SpaD con sus 3 dominios, posee un peso de 47 kDa (88). Considerando que los dominios tienen tamaños similares considerando sus secuencias aminoacídicas, dos tercios de 47 kDa corresponderían a 30 kDa aproximadamente, lo que nos confirma finalmente que la banda presente en el gel corresponde a SpaD con sus dominios dos y tres.

En este mismo gel se generó una banda de cercana a los 70 kDa, siendo superior al tamaño estimado (67.2 kDa). En condiciones normales esto nos indicaría que no corresponde a nuestra proteína, sin embargo, se ha visto que las proteínas altamente estables por enlaces covalentes internos, como lo es SpaD con sus enlaces isopeptídicos, no se logran denaturar del todo, por lo que no realizan una elongación completa de su cadena, produciendo que migren menos de lo que deberían acorde a su tamaño molecular. Esto debido a que estos enlaces no quedan lo suficientemente expuestos al detergente SDS, por lo que no se rompen, generando una banda con un tamaño molecular más alta que lo esperado (114). En el caso de que pudiéramos realizar una denaturación completa de la proteína previamente a su corrida en el gel de poliacrilamida, se podría corroborar que el tamaño obtenido coincide con el tamaño esperado. Estos resultados permiten afirmar que SpaD se expresa en conjunto con la proteína de fusión HaloTag®, generando una banda por sobre los 70 kDa cuando esta es expresada y purificada.

Finalmente, se realizó la expresión secuencial del péptido y la proteína. Para esto primero se realizó la expresión del péptido con el vector *pBAD* y luego la expresión de la proteína con el vector *pFN18a HaloTag®*. Cabe destacar que este orden no es aleatorio, se ha visto que cuando el péptido es generado primero en altas concentraciones, permite la intervención de la proteína cuando esta se empieza a traducir (51). En la **Figura 4.9 B**, se pueden apreciar múltiples bandas en los carriles uno, dos y tres, esto se debe al uso de extracto crudo, lo que implica que es un conjunto de proteínas sin

purificar. Cuando visualizamos estos tres carriles por medio de sus ligandos (**Figura 4.9 A**), no se logran apreciar bandas superiores a 70 kDa, por lo que estimamos que no se presentan intervenciones de la proteína por el péptido o no hay una concentración suficiente para poder ser visualizada. Como fue mencionado, en el carril uno se logra apreciar una banda por sobre los 70 kDa, esta coincide con lo visto en la **Figura 4.8**, respaldando lo presentado. Sin embargo, cuando analizamos estos tres carriles nos llevamos una sorpresa, debido a que este no presenta bandas superiores a la de la unión de SpaD con HaloTag<sup>®</sup>, teorizábamos que al corresponder a un extracto crudo las concentraciones deberían ser mayores, al igual que las proteínas totales, esto explicaría la gran abundancia de proteínas en la Figura A. En los siguientes carriles de la misma figura, se pueden apreciar múltiples bandas en las fracciones purificadas, esto se puede deber a que generalmente las células eucariontes tienden a tener secuencias codificantes a histidinas, generando contaminaciones indeseadas en la purificación (115), por lo que para futuros ensayos proponemos la optimización de la tasa de Níquel utilizado y las concentraciones de imidazol para disminuir lo más posible los contaminantes.

En el momento que comenzamos a analizar los carriles que contienen las purificaciones y concentraciones de nuestra proteína de interés se comienzan a notar novedades. En el carril cinco se presenta un bandeo con pesos moleculares marcados cuando es visualizado en azul de Coomassie, sin embargo, cuando nos fijamos en el mismo carril cuando es visualizado por luz azul se presenta un bandeo limpio, donde se aprecian dos bandas, una levemente superior a los 70 kDa y otra cercana a los 100 kDa, este patrón se repite los dos carriles siguientes. La banda cercana a los 70 kDa ya establecimos anteriormente que correspondería a HaloTag<sup>®</sup>-SpaD, sin embargo, la banda cercana a los 100 kDa no está establecida aún. Teorizamos que esta banda corresponde a la intervención del péptido en el dominio 3 de SpaD, debido a que se realiza un aumento de cerca de 20 kDa, que correspondería a SNAP-Tag. Esta conclusión proviene de que SNAP-Tag es una proteína estandarizada al igual que HaloTag<sup>®</sup>, donde su peso molecular es de 20 kDa (116). Además, esta es visualizable gracias al ligando de HaloTag<sup>®</sup>, descartando la opción de que sea una proteína contaminante.

Cuando se realizó la purificación, se utilizaron diferentes concentraciones de Imidazol, siendo 50, 75, 100 y 500 mM, sin embargo, las primeras fracciones (50 mM) presentaban las mayores concentraciones, por lo que se trabajaron únicamente con esas. Generalmente en la primera fracción de la primera concentración no se aprecian proteínas de interés, debido a que estas tienden a

precipitar minutos posterior a la exposición de imidazol o a mayores concentraciones. En el quinto, sexto y séptimo carril (fracción 2 50mM, fracción 3 50mM y fracción 4 50mM respectivamente) se presencian 2 bandas, una que se posiciona levemente superior a los 70 kDa donde ya establecimos que estas corresponden a SpaD con HaloTag® y aparece otra banda, siendo de mayor peso molecular, cercanas a los 100 kDa, donde estimamos que corresponde a un aumento de 20 kDa. La explicación más lógica a esto es la intervención de la proteína por medio del péptido. Esta conclusión proviene de que SNAP-Tag es una proteína estandarizada al igual que HaloTag®, donde su peso molecular es de 20 kDa (109). Sin embargo, se necesitan más experimentos a futuro para poder corroborar esta idea, como la secuenciación de bandas de geles de poliacrilamida (117) o a través de un microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés *Atomic Force Microscopy*) cuando la proteína es purificada (118). Estos dobles bandeos en los carriles cinco, seis y siete nos indican las intervenciones, además, nos indican de manera cualitativa la cantidad de intervenciones. Se puede apreciar que las bandas correspondientes a SpaD son más intensas que las intervenidas, esto se puede deber a que esta estrategia no es cien por ciento efectiva (51).

Los carriles ocho, nueve y diez no presentan bandeos cuando son vistos con luz azul, estos tres carriles corresponden a las mismas fracciones, pero teñidas con el ligando de SNAP-Tag. Esto podría deberse a que SNAP Surface 488 es altamente sensible a su entorno (116), y además se ha visto que HaloTag® produce mayor luminiscencia que SNAP-Tag cuando es unido a su ligando fluoróforo (119), por lo que teorizamos que Alexa 488 se une de mejor manera, generando bandas altamente intensas que interfieren con la visualización de bandas de SNAP-Tag.

Para el desarrollo de una estrategia para atacar la subunidad mayor SpaD, nos basamos en la capacidad de implementación de múltiples pilinas por parte de *C. diphtheriae* para poder mediar la infección al hospedero (86). Estas deben poder disipar la energía que interpone el medio, lo que logran gracias a las subunidades repetidas a lo largo de su pilina, en este caso, SpaD (83,120). Ahora, uno de los puntos más críticos de la adhesión es la adhesina, que se sitúa en la punta de la pilina, esta unidad estructural va a mediar la adhesión al epitelio y va a mantener el resto de la pilina unida al mismo (121). A partir de esto surge la pregunta obvia de por qué no atacar a la adhesina, resulta que, si atacásemos a la adhesina tendríamos solo una oportunidad a lo largo de cada pilina empleada por *C. diphtheriae*, lo que reduciría drásticamente las probabilidades de acertar. Sin embargo, si atacamos a la subunidad mayor que conforma en gran parte el largo de la pilina (122), tendríamos múltiples

oportunidades para poder tener éxito. En el caso de generar la intervención de estos enlaces covalentes internos, teorizamos que se lograría disminuir la fuerza necesaria para desprender estas concatenaciones proteicas de la superficie. A diferencia de los antibióticos que se basan en atacar vías de síntesis, membranas u otros (123), buscamos atacar a la bacteria por una estrategia que no generaría resistencia en el corto plazo, debido a que interviene sus propios mecanismos de adhesión, generando el impacto que buscamos. Si bien esta estrategia es prometedora, aún está en etapas iniciales de su desarrollo, por lo que se necesitan más ensayos en diferentes bacterias Gram-positivo y la evaluación del desplegamiento mecánico de la proteína intervenida por medio de fuerza.

Si bien hemos descrito una nueva posibilidad de estrategia antimicrobiana, se ha visto que los péptidos son candidatos para nuevas formas de tratamientos, debido a su amplio espectro, ya que ataca tanto a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, posee baja toxicidad para el hospedero y una menor tasa de desarrollo de resistencias (124,125). Se ha descrito que las interacciones sinérgicas de los péptidos antimicrobianos (PAMs) con los antibióticos podrían ser la piedra angular para iniciar una nueva batalla contra las bacterias, gracias a que estos péptidos atacan específicamente a las bacterias, activan la respuesta inmune del hospedero e inactivan endotoxinas producidas por estas mismas (126,127).

## 6. Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis apoyan la idea de que es posible desarrollar estrategias peptídicas para interferir con las proteínas asociadas al pilus. En particular, métodos computacionales como *Rosetta* permitieron simular las interacciones péptido-proteína, entregando resultados basados en energética y distancia que colaboran en la búsqueda de mejores péptidos.

Desde el punto de vista de la biología molecular, se logró generar un sistema de expresión para SpaD por medio del vector *pFN18a HaloTag*<sup>®</sup>, permitiendo la expresión como proteína de fusión HaloTag<sup>®</sup>. Este constructo facilita la detección en geles de acrilamida y permite confirmar la intervención con el péptido preparado en el segundo vector *pBAD-SNAP-Tag*. De este modo, implementamos una herramienta de interrupción de la formación del enlace isopeptídico que puede ser visualizada por medio de geles de acrilamida usando sondas fluorescentes.

A partir de esta investigación se concluye que se acepta la hipótesis, debido a que se logra intervenir la formación del enlace isopeptídico de SpaD. Esto fue visualizado por medio de técnicas como electroforesis vertical en geles de poliacrilamida SDS, donde se ve un aumento del peso molecular de SpaD, gracias a la adición de SNAP-Tag y el uso de fluoróforos específicos.

## 7. Implicancias y proyecciones

El diseño de péptidos para atacar enlaces covalentes, como lo son los enlaces isopeptídicos, puede ser usado como nuevas terapias sinérgicas o nuevas terapias de base. Estas se basan en intervenir la formación de estos enlaces en etapas tempranas de la formación de las pilinas. Presumimos que existe una alta posibilidad de generar un producto para poder disminuir las infecciones mediadas por bacterias Gram-positivas.

Finalmente, logramos obtener los primeros resultados exitosos de la intervención de estas pilinas. Sin embargo, para poder realizar un análisis más profundo proponemos la implementación de versiones más avanzadas de *Rosetta* para poder generar diferentes conformaciones de péptidos que intervengan el enlace, mejorando la afinidad por la zona de este mismo. También proponemos la implementación de secuencias concatenadas que codifiquen para la proteína SpaD, por ejemplo, realizar dímeros o trímeros de esta proteína. La finalidad de realizar estas minicadenas proteicas es que podamos evaluarlas por medio del AFM, donde esta estrategia de estudio de moléculas únicas une covalentemente HaloTag® a una superficie y la cadena de HisTag a un cantilever, y así podremos estudiar la naturaleza de desplegamiento de la proteína en estadios nativos versus intervenida. Esto permitirá medir las fuerzas necesarias para poder desplegar parcialmente la proteína, debido a que posee un *“Isopeptide Delimited Loop”* (IDL), que evita el desplegamiento completo de esta. Una vez hayamos estudiado la naturaleza de la proteína nativa, compararemos estos resultados con los de la proteína intervenida. En el caso de que la fuerza de desplegamiento haya disminuido, podríamos asegurar que interviene y disminuye su fuerza de desplegamiento, confirmando que esta metodología es potencialmente efectiva para evitar o entorpecer infecciones.

Si bien se han presentado cerca de 2.000 variables de péptidos con capacidad antimicrobiana (PAMs), tan solo existen 8 patentes para estos, donde solo 3 poseen una patente a nivel internacional. Sin embargo, ninguno de estos ha sido utilizado para atacar los mecanismos de unión de una bacteria o con la misma longitud o composición aminoacídica. Esto abre una posibilidad de patentar el péptido o la metodología utilizada para generar péptidos antimicrobianos.

## 8. Referencias

1. Bauer MA, Kainz K, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. Microbial wars: Competition in ecological niches and within the microbiome. *Microb Cell*. 7 de mayo de 2018;5(5):215-9.
2. Yadav S, Kapley A. Antibiotic resistance: Global health crisis and metagenomics. *Biotechnol Rep*. marzo de 2021;29.
3. Doron S, Gorbach SL. Bacterial Infections: Overview. *Int Encycl Public Health*. 2008;273.
4. Tuson HH, Weibel DB. Bacteria-surface interactions. *Soft Matter*. 14 de mayo de 2013;9(18):4368-80.
5. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 1 de junio de 2017;474(11):1823-36.
6. Flint HJ, Duncan SH, Louis P. Gut microbial ecology. En: McClements DJ, Decker EA, editores. *Designing Functional Foods*. Woodhead Publishing; 2009. p. 38-67.
7. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut Microbiota: Role in Pathogen Colonization, Immune Responses and Inflammatory Disease. *Immunol Rev*. septiembre de 2017;279(1):70-89.
8. Otto M. Physical stress and bacterial colonization. *FEMS Microbiol Rev*. noviembre de 2014;38(6):1250-70.
9. Brooks AN, Turkarslan S, Beer KD, Lo FY, Baliga NS. Adaptation of cells to new environments. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. octubre de 2011;3(5):544-61.
10. Clardy J, Fischbach M, Currie C. The natural history of antibiotics. *Curr Biol CB*. 9 de junio de 2009;19(11):R437-41.
11. Landecker H. Antibiotic Resistance and the Biology of History. *Body Soc*. 1 de diciembre de 2016;22(4):19-52.
12. Barreto ML, Teixeira MG, Carmo EH. Infectious diseases epidemiology. *J Epidemiol Community Health*. marzo de 2006;60(3):192-5.
13. Griffith EC, Wallace MJ, Wu Y, Kumar G, Gajewski S, Jackson P, et al. The structural and functional basis for recurring sulfa drug resistance mutations in *Staphylococcus aureus* dihydropteroate synthase. *Front Microbiol*. julio de 2018;9.
14. Shlaes DM, Bradford PA. Antibiotics—from there to where?: How the antibiotic miracle is threatened by resistance and a broken market and what we can do about it. *Pathog Immun*. 2018;3(1):19-43.
15. Gaynes R. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerg Infect Dis*. mayo de 2017;23(5):849-53.

16. Quinn R. Rethinking antibiotic research and development: World War II and the penicillin collaborative. *Am J Public Health*. marzo de 2013;103(3):426-34.
17. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol*. octubre de 2019;51:72-80.
18. Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev*. enero de 2011;24(1):71-109.
19. Miranda CD, Godoy FA, Lee MR. Current Status of the Use of Antibiotics and the Antimicrobial Resistance in the Chilean Salmon Farms. *Front Microbiol*. 2018;9.
20. Martin MJ, Thottathil SE, Newman TB. Antibiotics Overuse in Animal Agriculture: A Call to Action for Health Care Providers. *Am J Public Health*. diciembre de 2015;105(12):2409-10.
21. Luyt CE, Bréchet N, Trouillet JL, Chastre J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Crit Care*. agosto de 2014;18(5).
22. Rather IA, Kim BC, Bajpai VK, Park YH. Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. *Saudi J Biol Sci*. mayo de 2017;24(4):808-12.
23. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. Vol. 40. 2015.
24. The antibiotic alarm. *Nature*. marzo de 2013;495(7440):141-141.
25. Joseph NM, Bhanupriya B, Shewade DG, Harish BN. Relationship between antimicrobial consumption and the incidence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Clin Diagn Res*. febrero de 2015;9(2).
26. Read AF, Woods RJ. Antibiotic resistance management. *Evol Med Public Health*. 2014;2014(1):147.
27. CDC. What Exactly is Antibiotic Resistance? [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2022 [citado 28 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
28. Antimicrobial resistance [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>
29. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. *AMR-review*; 2016 p. 84.
30. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States [Internet]. Disponible en: [www.jama.com](http://www.jama.com)
31. For whom the bug tolls: MRSA kills more people in U.S. annually than HIV/AIDS. Medical Education Publishing.

32. Spellberg B, Blaser M, Guidos RJ, Boucher HW, Bradley JS, Eisenstein BI, et al. Combating antimicrobial resistance: Policy recommendations to save lives. *Clin Infect Dis.* mayo de 2011;52(SUPPL. 5).
33. Tripathi N, Sapra A. Gram Staining. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [citado 28 de septiembre de 2022]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
34. Shanson DC. Classification and pathogenicity of microbes. *Microbiol Clin Pract.* 1989;3-32.
35. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* mayo de 2010;2(5):a000414.
36. Di Martino P. Bacterial adherence: much more than a bond. *AIMS Microbiol.* 11 de julio de 2018;4(3):563-6.
37. Ruby T, Monack DM. At home with hostility: How do pathogenic bacteria evade mammalian immune surveillance to establish persistent infection? *F1000 Biol Rep.* febrero de 2011;3(1).
38. Aujoulat F, Roger F, Bourdier A, Lotthé A, Lamy B, Marchandin H, et al. From environment to man: genome evolution and adaptation of human opportunistic bacterial pathogens. *Genes.* 26 de marzo de 2012;3(2):191-232.
39. Asadi A, Razavi S, Talebi M, Gholami M. A review on anti-adhesion therapies of bacterial diseases. *Infection.* febrero de 2019;47(1):13-23.
40. Siegel SJ, Weiser JN. Mechanisms of Bacterial Colonization of the Respiratory Tract. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69(1):425-44.
41. Berne C, Ducret A, Hardy GG, Brun YV. Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. *Microbiol Spectr.* julio de 2015;3(4).
42. Hoskisson PA. Microbe profile: *Corynebacterium diphtheria* - An old foe always ready to seize opportunity. *Microbiol U K.* junio de 2018;164(6):865-7.
43. Mcconnell SA, Mcallister RA, Amer BR, Mahoney BJ, Sue CK, Chang C, et al. Sortase-assembled pili in *Corynebacterium diphtheriae* are built using a latch mechanism.
44. Thanassi DG, Bliska JB, Christie PJ. Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev.* noviembre de 2012;36(6):1046-82.
45. Zav'yalov V, Zavialov A, Zav'yalova G, Korpela T. Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: structure and function from a clinical standpoint. *FEMS Microbiol Rev.* 1 de mayo de 2010;34(3):317-78.
46. Karas LJ, Wu CH, Das R, Wu JIC. Hydrogen bond design principles. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci.* 2020;10(6):e1477.

47. Persat A, Nadell CD, Kim MK, Ingremeau F, Siryaporn A, Drescher K, et al. The mechanical world of bacteria. *Cell*. 2015;161(5):988-97.
48. Hospenthal MK, Costa TRD, Waksman G. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 12 de mayo de 2017;15(6):365-79.
49. Yamaguchi E, Fujii K, Kayano M, Sakurai Y, Nakatani A, Sasaki M, et al. Is *Salmonella enterica* shared between wildlife and cattle in cattle farming areas? An 11-year retrospective study in Tokachi district, Hokkaido, Japan. *Vet Med Sci*. marzo de 2022;8(2):758-70.
50. Wagner C, Hensel M. Adhesive mechanisms of *salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol*. 2011;715:17-34.
51. Rivas-Pardo JA, Badilla CL, Tapia-Rojo R, Alonso-Caballero Á, Fernández JM. Molecular strategy for blocking isopeptide bond formation in nascent pilin proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(37):9222-7.
52. Danne C, Dramsi S. Pili of Gram-positive bacteria: Roles in host colonization. *Res Microbiol*. noviembre de 2012;163(9-10):645-58.
53. Lukaszczyk M, Pradhan B, Remaut H. The Biosynthesis and Structures of Bacterial Pili. Vol. 92, *Subcellular Biochemistry*. Springer International Publishing; 2019. 369-413 p.
54. Proft T, Baker EN. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - Structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(4):613-35.
55. Ott L, Ott L. Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. *AIMS Microbiol*. 2018;4(1):85-103.
56. Hassan SS, Jamal SB, Radusky LG, Tiwari S, Ullah A, Ali J, et al. The druggable pocketome of *Corynebacterium diphtheriae*: A new approach for in silico putative druggable targets. *Front Genet*. febrero de 2018;9(FEB).
57. Ott L, Möller J, Burkovski A. Interactions between the Re-Emerging Pathogen *Corynebacterium diphtheriae* and Host Cells. *Int J Mol Sci*. enero de 2022;23(6):3298.
58. Sutton-Fitzpatrick U, Grant C, Nashev Di, Fleming C. *Corynebacterium diphtheriae* bloodstream infection: The role of antitoxin. *BMJ Case Rep*. noviembre de 2019;12(11).
59. Tosepu R, Gunawan J, Effendy DS, Ahmad LOAI, Farzan A. The outbreak of diphtheria in Indonesia. *Pan Afr Med J*. 27 de diciembre de 2018;31:249.
60. Redfield RR, Kent CK, Leahy MA, Martinroe JC, Spriggs SR, Yang T, et al. Prevention of Pertussis, Tetanus, and Diphtheria with Vaccines in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports Centers for Disease Control and Prevention MMWR Editorial and Production Staff (Serials) MMWR Editorial Board. Vol. 67, *Recommendations and Reports*. 2018.

61. Marshall NC, Baxi M, MacDonald C, Jacobs A, Sikora CA, Tyrrell GJ. Ten Years of Diphtheria Toxin Testing and Toxigenic Cutaneous Diphtheria Investigations in Alberta, Canada: A Highly Vaccinated Population. *Open Forum Infect Dis.* enero de 2022;9(1).
62. Gillet D, Barbier J. Diphtheria toxin. En: Alouf J, Ladant D, Popoff MR, editores. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Fourth Edition)*. Boston: Academic Press; 2015. p. 111-32.
63. Hadfield TL, McEvoy P, Polotsky Y, Tzinslering VA, Yakovlev AA. The Pathology of Diphtheria. *J Infect Dis.* 1 de febrero de 2000;181:S116-20.
64. Skogmar S, Tham J. Severe diphtheria with neurologic and myocardial involvement in a Swedish patient: a case report. *BMC Infect Dis.* 31 de julio de 2018;18:359.
65. Zakikhany K, Efstratiou A. Diphtheria in Europe: current problems and new challenges. *Future Microbiol.* mayo de 2012;7(5):595-607.
66. Gower CM, Scobie A, Fry NK, Litt DJ, Cameron JC, Chand MA, et al. The changing epidemiology of diphtheria in the United Kingdom, 2009 to 2017. *Eurosurveillance.* 19 de marzo de 2020;25(11):1900462.
67. Galazka AM, Robertson SE, Oblapenko GP. Resurgence of diphtheria. *Eur J Epidemiol.* 1 de febrero de 1995;11(1):95-105.
68. Clarke KEN, MacNeil A, Hadler S, Scott C, Tiwari TSP, Cherian T. Global epidemiology of diphtheria, 2000-2017. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(10):1834-42.
69. World Health Organization null. Diphtheria vaccine: WHO position paper, August 2017 - Recommendations. *Vaccine.* 4 de enero de 2018;36(2):199-201.
70. Truelove SA, Keegan LT, Moss WJ, Chaisson LH, Macher E, Azman AS, et al. Clinical and Epidemiological Aspects of Diphtheria: A Systematic Review and Pooled Analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 24 de junio de 2020;71(1):89-97.
71. Sein C, Tiwari T, Macneil A, Wannemuehler K, Soulaphy C, Souliphone P, et al. Diphtheria outbreak in Lao People's Democratic Republic, 2012–2013. *Vaccine.* agosto de 2016;34(36):4321-6.
72. Dureab F, Al-Sakkaf M, Ismail O, Kuunibe N, Krisam J, Müller O, et al. Diphtheria outbreak in Yemen: The impact of conflict on a fragile health system. *Confl Health.* mayo de 2019;13(1).
73. Finger F, Funk S, White K, Siddiqui MR, Edmunds WJ, Kucharski AJ. Real-time analysis of the diphtheria outbreak in forcibly displaced Myanmar nationals in Bangladesh. *BMC Med.* marzo de 2019;17(1).
74. Weil LM, Williams MM, Shirin T, Lawrence M, Habib ZH, Aneke JS, et al. Investigation of a Large Diphtheria Outbreak and Cocirculation of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* among Forcibly Displaced Myanmar Nationals, 2017-2019. *J Infect Dis.* julio de 2021;224(2):318-25.

75. Mina NV, Burdz T, Wiebe D, Rai JS, Rahim T, Shing F, et al. Canada's first case of a multidrug-resistant *Corynebacterium diphtheriae* strain, isolated from a skin abscess. *J Clin Microbiol.* noviembre de 2011;49(11):4003-5.
76. Pereira GA, Pimenta FP, Santos FRW dos, Damasco PV, Júnior RH, Mattos-Guaraldi AL. Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. Vol. 103, *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2008 p. 507-10.
77. Epidemiological Update: Diphtheria (5 November 2021) - Haiti | ReliefWeb [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://reliefweb.int/report/haiti/epidemiological-update-diphtheria-5-november-2021>
78. Nwokoro E, Leach R, Årdal C, Baraldi E, Ryan K, Plahte J. An assessment of the future impact of alternative technologies on antibiotics markets. *J Pharm Policy Pract.* octubre de 2016;9(1).
79. Lima R, Del Fiol FS, Balcão VM. Prospects for the Use of New Technologies to Combat Multidrug-Resistant Bacteria. *Front Pharmacol.* 2019;10.
80. Krachler AM, Orth K. Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy. *Virulence.* 15 de mayo de 2013;4(4):284-94.
81. Echelman DJ, Alegre-Cebollada J, Badilla CL, Chang C, Ton-That H, Fernández JM. CnaA domains in bacterial pili are efficient dissipaters of large mechanical shocks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(9):2490-5.
82. Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell.* 24 de febrero de 2006;124(4):715-27.
83. Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H. *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. *Mol Microbiol.* abril de 2007;64(1):111-24.
84. Scott JR, Zähner D. Pili with strong attachments: Gram-positive bacteria do it differently. *Mol Microbiol.* 2006;62(2):320-30.
85. Hae JK, Paterson NG, Gaspar AH, Ton-That H, Baker EN. The *Corynebacterium diphtheriae* shaft pilin SpaA is built of tandem Ig-like modules with stabilizing isopeptide and disulfide bonds. *Natl Acad Sci U S Am.* 2009;106(43):18427.
86. Ton-That H, Schneewind O. Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol.* 2003;50(4):1429-38.
87. Broadway MM, Rogers EA, Chang C, Huang IH, Dwivedi P, Yildirim S, et al. Pilus gene pool variation and the virulence of *Corynebacterium diphtheriae* clinical isolates during infection of a nematode. *J Bacteriol.* 2013;195(16):3774-83.
88. Kang HJ, Paterson NG, Kim CU, Middleditch M, Chang C, Ton-That H, et al. A slow-forming isopeptide bond in the structure of the major pilin SpaD from *Corynebacterium diphtheriae* has implications for pilus assembly. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2014;70(5):1190-201.

89. Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O. Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*. 1999;285(5428):760-3.
90. Swaminathan A, Mandlik A, Swierczynski A, Gaspar A, Das A, Ton-That H. Housekeeping sortase facilitates the cell wall anchoring of pilus polymers in *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol*. noviembre de 2007;66(4):961-74.
91. Khare B, Narayana SVL. Pilus biogenesis of Gram-positive bacteria: Roles of sortases and implications for assembly. *Protein Sci*. 2017;26(8):1458-73.
92. Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol*. 2008;16(1):33-40.
93. Krishnan V. Pilins in gram-positive bacteria: A structural perspective. *IUBMB Life*. julio de 2015;67(7):533-43.
94. Kang HJ, Baker EN. Intramolecular isopeptide bonds: Protein crosslinks built for stress? *Trends Biochem Sci*. 2011;36(4):229-37.
95. Hendrickx APA, Budzik JM, Oh SY, Schneewind O. Architects at the bacterial surface-sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(3):166-76.
96. Schwarz-Linek U, Banfield MJ. Yet more intramolecular cross-links in Gram-positive surface proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(4):1229-30.
97. Konto-Ghiorghi Y, Mairey E, Mallet A, Duménil G, Caliot E, Trieu-Cuot P, et al. Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog*. mayo de 2009;5(5).
98. Totsika M, Heras B, Wurpel DJ, Schembri MA. Characterization of two homologous disulfide bond systems involved in virulence factor biogenesis in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *J Bacteriol*. junio de 2009;191(12):3901-8.
99. Duin DV, Paterson D. Multidrug Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Surg Res Commun*. 2016;30(2):377-90.
100. Fleishman SJ, Leaver-Fay A, Corn JE, Strauch EM, Khare SD, Koga N, et al. Rosettascripts: A scripting language interface to the Rosetta Macromolecular modeling suite. *PLoS ONE*. 2011;6(6).
101. Lei Y, Li S, Liu Z, Wan F, Tian T, Li S, et al. A deep-learning framework for multi-level peptide-protein interaction prediction. *Nat Commun*. diciembre de 2021;12(1).
102. Smith ST, Meiler J. Assessing multiple score functions in Rosetta for drug discovery. *PLoS ONE*. octubre de 2020;15(10).
103. Kaufmann KW, Meiler J. Using RosettaLigand for Small Molecule Docking into Comparative Models. *PLoS ONE*. diciembre de 2012;7(12).

104. Gibson EG, Oviatt AA, Osheroff N. Two-Dimensional Gel Electrophoresis to Resolve DNA Topoisomers. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2020;2119:15-24.
105. Kimple ME, Brill AL, Pasker RL. Overview of affinity tags for protein purification. *Curr Protoc Protein Sci.* 2013;(SUPPL.73).
106. Locatelli-Hoops S, Sheen FC, Zoubak L, Gawrisch K, Yeliseev AA. Application of HaloTag technology to expression and purification of cannabinoid receptor CB2. *Protein Expr Purif.* 2013;89(1):62-72.
107. Waugh DS. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol.* junio de 2005;23(6):316-20.
108. Kutyshenko VP, Mikoulinskaia GV, Chernyshov SV, Yegorov AY, Prokhorov DA, Uversky VN. Effect of C-terminal His-tag and purification routine on the activity and structure of the metalloenzyme, L-alanyl-D-glutamate peptidase of the bacteriophage T5. *Int J Biol Macromol.* marzo de 2019;124:810-8.
109. Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol.* 2000;326:245-54.
110. Los GV, Encell LP, McDougall MG, Hartzell DD, Karassina N, Zimprich C, et al. HaloTag: A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem Biol.* junio de 2008;3(6):373-82.
111. England CG, Luo H, Cai W. HaloTag Technology: A Versatile Platform for Biomedical Applications. *Bioconjug Chem.* junio de 2015;26(6):975-86.
112. N Peterson S, Kwon K. The HaloTag: Improving Soluble Expression and Applications in Protein Functional Analysis. *Curr Chem Genomics.* 20 de septiembre de 2012;6(1).
113. Chen W, Younis MH, Zhao Z, Cai W. Recent biomedical advances enabled by HaloTag technology HHS Public Access. Vol. 46, *Biocell.* 2022 p. 1789-801.
114. Wiita AP, Rama S, Ainaravapu K, Huang HH, Fernandez JM. Force-dependent chemical kinetics of disulfide bond reduction observed with single-molecule techniques [Internet]. 2006. Disponible en: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0511035103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0511035103)
115. Spriestersbach A, Kubicek J, Schäfer F, Block H, Maertens B. Purification of His-Tagged Proteins. *Methods Enzymol.* 2015;559:1-15.
116. Cole NB. Site-specific protein labeling with SNAP-tags. *Curr Protoc Protein Sci.* agosto de 2013;2013:30.1.1-30.1.16.
117. Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, et al. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature.* 1 de febrero de 1996;379(6564):466-9.
118. Yang B, Liu Z, Liu H, Nash MA. Next Generation Methods for Single-Molecule Force Spectroscopy on Polyproteins and Receptor-Ligand Complexes. *Front Mol Biosci.* 2020;7:85.

119. Erdmann RS, Baguley SW, Richens JH, Wissner RF, Xi Z, Allgeyer ES, et al. Labeling Strategies Matter for Super-Resolution Microscopy: A Comparison between HaloTags and SNAP-tags. *Cell Chem Biol.* abril de 2019;26(4):584-592.e6.
120. Lei H, Ma Q, Li W, Wen J, Ma H, Qin M, et al. An ester bond underlies the mechanical strength of a pathogen surface protein. *Nat Commun.* diciembre de 2021;12(1).
121. Dufrêne YF, Viljoen A. Binding Strength of Gram-Positive Bacterial Adhesins. *Front Microbiol.* 2020;11.
122. Gaspar AH, Ton-That H. Assembly of distinct pilus structures on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol.* febrero de 2006;188(4):1526-33.
123. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 2017;33(3):300-5.
124. Xu X, Zhong A, Wang Y, Lin B, Li P, Ju W, et al. Molecular Identification of a Moricin Family Antimicrobial Peptide (Px-Mor) From *Plutella xylostella* With Activities Against the Opportunistic Human Pathogen *Aureobasidium pullulans*. *Front Microbiol.* octubre de 2019;10.
125. De Mandal S, Panda AK, Murugan C, Xu X, Senthil Kumar N, Jin F. Antimicrobial Peptides: Novel Source and Biological Function With a Special Focus on Entomopathogenic Nematode/Bacterium Symbiotic Complex. *Front Microbiol.* 2021;12:555022.
126. Lewies A, Plessis LHD, Wentzel JF. Antimicrobial Peptides: the Achilles' Heel of Antibiotic Resistance? *Probiotics Antimicrob Proteins.* junio de 2019;11(2):370-81.
127. Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res.* 2019;11(7):3919-31.

## Anexo

Los archivos a continuación, empleados para los ensayos de acoplamiento molecular, se encuentran también disponibles en GitHub

<https://github.com/RivasPardoLab/Tesis-Vicho>

### ***Dock.xml***

```
<ROSETTASCRIPTS>

  <SCOREFXNS>
  <ScoreFunction name="ligand_soft_rep" weights="ligand_soft_rep"> # pointing to appropriate weights file in the database
    <Reweight scoretype="fa_elec" weight="0.42"/>
    <Reweight scoretype="hbond_bb_sc" weight="1.3"/>
    <Reweight scoretype="hbond_sc" weight="1.3"/>
    <Reweight scoretype="rama" weight="0.2"/>
  </ScoreFunction>

  </SCOREFXNS>
  <LIGAND_AREAS>
  </LIGAND_AREAS>
  <INTERFACE_BUILDERS>
  </INTERFACE_BUILDERS>
  <MOVEMAP_BUILDERS>
  </MOVEMAP_BUILDERS>
  <SCORINGGRIDS ligand_chain="X" width="45.0">
  </SCORINGGRIDS>

  <MOVERS>
    <StartFrom name="start_from" chain="X"> # we need to move the ligand into the pocket
      <PDB filename="%%startfrom%%" /> # corresponds to "-parser:script_vars" flags given in flags.txt
    </StartFrom>
    <Transform name="transform" chain="X" box_size="10.0" move_distance="0.1" angle="5.0" cycles="500"
repeats="1" temperature="5" initial_perturb="1.0" /> # initial transform step for low-resolution sampling. This box size can also be edited
according to dimensions that you're looking at.
    <InterfaceScoreCalculator name="add_scores" chains="X" scorefxn="ligand_soft_rep"
native="crystal_complex.pdb"/> # calculates the scores for the interface region only.
  </MOVERS>

  <PROTOCOLS>
    <Add mover_name="start_from"/>
    <Add mover_name="transform"/>
    <Add mover_name="add_scores"/>
  </PROTOCOLS>

</ROSETTASCRIPTS>
```

## Options.txt

```
#Pound signs indicate comments

#-in:file:s option imports the protein and ligand PDB structures
#-in:file:extra_res_fa option imports the parameters for the ligand

-in
    -file
        -s '4HSS_dom3_final_A.pdb ETQ.pdb'
        -extra_res_fa ETQ.params

# this is to set the initial centroid coordinate for the ligand starting position.
-parser:script_vars startfrom=./intento1.pdb

#the packing options allow Rosetta to sample additional rotamers for
#protein sidechain angles chi 1 (ex1) and chi 2 (ex2)
#no_optH false tells Rosetta to optimize hydrogen placements
#flip_HNQ tells Rosetta to consider HIS,ASN,GLN hydrogen flips
#ignore_ligand_chi prevents Roseta from adding additional ligand rotamer

-packing
    -ex1
    -ex2
    -no_optH false
    -flip_HNQ true
    -ignore_ligand_chi true

#parser:protocol locates the XML file for RosettaScripts

-parser
    -protocol dock2.xml

#overwrite allows Rosetta to write over previous structures and scores

-overwrite

#Ligand docking is not yet benchmarked with the updated scoring function
#This flag restores certain parameters to previously published values

-mistakes
    -restore_pre_talaris_2013_behavior true
```