

Enzimas de fagos que lisan a *Klebsiella pneumoniae* resistente a los antibióticos

Díaz Nachez Armando-Giovanni¹; Hernández Mora Ana-Fernanda¹; Martínez Pacheco José-Leonardo¹; Mederos Macías Anthony-Jeancarlo²; Ramírez Zuñiga María del Rosario¹; Reyes Martínez Juana Elizabeth¹; Reyes Cortes Ruth¹

¹División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato; Guanajuato capital, 36050

²Universidad Politécnica de Guanajuato; Avenida Universidad Sur # 1001 Comunidad Juan Alonso, 38496 Cortazar, Gto.
reyes.ruth@ugto.mx

Resumen

Klebsiella pneumoniae ha sido descrita como una bacteria multirresistente, debido a que ha desarrollado múltiples mecanismos de defensa contra la acción mediada por los antibióticos, tales como la producción de enzimas betalactamasas de amplio espectro (BLEES). Esta característica se encuentra ampliamente relacionada con su capacidad de desarrollarse en forma de biopelículas. La resistencia bacteriana es un problema de importancia crítica debido a que ocasiona una disminución de los tratamientos disponibles contra las enfermedades infecciosas. Ante esta problemática, se ha retomado el interés por estudiar alternativas para el tratamiento de las infecciones causadas por *K. pneumoniae* multirresistente. Una alternativa es la utilización de bacteriófagos. Los bacteriófagos o fagos, son virus que infectan bacterias de una manera específica a nivel de género y especie. Los fagos, presentan dos vías de desarrollo; lítica y lisogénica. Los fagos con ciclo de replicación lítica se multiplican dentro de la célula bacteriana y mediante diversas proteínas virales lisan a la bacteria al final del ciclo para liberar a los fagos maduros. La liberación de nuevos fagos permite la infección de nuevos hospederos de forma exponencial, inhibiendo el desarrollo bacteriano. El fago completo, así como las enzimas que producen la lisis celular han sido consideradas como eficientes agentes microbicidas. En este estudio analizamos la secuencia del fago ϕ K08-48 de *K. pneumoniae* e identificamos un marco de lectura para una enzima o endolisina -proteína que degrada la pared de peptidoglicano-. Nuestro objetivo consistió en generar un sistema de expresión heteróloga de la proteína para determinar el efecto de la enzima recombinante sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*.

Palabras clave: Bacteriófagos, *Klebsiella pneumoniae*, multirresistencia, enzimas líticas.

Introducción

Los antibióticos han jugado un papel importante salvando vidas desde su descubrimiento en 1940; sin embargo, la resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias se ha vuelto un problema serio a nivel mundial. La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno natural que los microorganismos adquieren con el tiempo, generalmente por mutaciones o modificaciones en su genoma, sin embargo, debido al excesivo uso de los antibióticos, este fenómeno se ha visto acelerado de una manera importante. El surgimiento de nuevas cepas resistentes a los fármacos puede comprometer la capacidad humana para el tratamiento de las infecciones comunes. A medida que la farmacorresistencia se distribuye en todo el mundo, los antibióticos son cada vez menos eficaces, lo que conduce a infecciones más difíciles de tratar y a un aumento en la mortalidad [1]. En 2017 la Organización Mundial de la Salud publicó una lista de los patógenos resistentes a múltiples antibióticos con prioridad alta para el desarrollo e investigación de nuevas alternativas de tratamiento; en esta lista se encuentra, entre otros organismos, *Klebsiella pneumoniae* [2].

Klebsiella pneumoniae es un patógeno asociado a infecciones nosocomiales, como la neumonía, las septicemias o las infecciones de los recién nacidos y los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos y es la segunda bacteria Gram negativa causante de infecciones invasivas [3]. Es clasificada como un microorganismo multirresistente debido a la resistencia a antibióticos betalactámicos y carbapenémicos. En algunos países, los carbapenémicos ya no son eficaces en más de la mitad de los pacientes con infecciones ocasionadas por *K. pneumoniae* debido a la producción de enzimas betalactamasas y carbapenemasas [4]. Por esta razón, el desarrollo de nuevas alternativas de terapia se ha vuelto un objetivo importante.

Entre las nuevas terapias se encuentra el uso de bacteriófagos o fagos, conocido como fagoterapia. Los fagos son virus que infectan a las bacterias y tienen todas las propiedades virales comunes: son parásitos intracelulares obligados, ya que hacen un uso extensivo de la maquinaria del hospedero para su replicación. Tienen genomas de DNA o de RNA relativamente pequeños y muestran una alta especificidad hacia la bacteria huésped. Hay diferentes tipos de morfología viral, pero la estructura más abundante son los fagos con cauda de ADN de doble cadena (dsDNA), en los que el material genético se encuentra protegido por una cápside (cabeza) unida a una cola o cauda [5]. La replicación viral se realiza a través de un ciclo lisogénico o lítico. El ciclo lisogénico es la replicación viral latente, que consiste en que el genoma del fago se inserta en el material genético de la bacteria huésped y se replica al mismo tiempo que el genoma bacteriano al pasar a las células hijas. El ciclo lítico inicia una vez que el genoma viral entra a la célula blanco, se replica y sintetiza todas las proteínas requeridas para el ensamblaje de nuevos viriones utilizando la maquinaria bacteriana. El ciclo termina con la lisis de la bacteria para la liberación de la progenie viral madura. Este ciclo de replicación consiste en cuatro etapas: la adsorción del fago a la célula hospedera; penetración del material genético; desarrollo intracelular y liberación de la progenie con la consecuente muerte bacteriana [6]

El uso de los fagos ha demostrado diversas ventajas como la alta especificidad hacia la bacteria patógena, - lo cual mantiene una microbiota normal-, baja toxicidad y un vasto repertorio de fagos que pueden ser utilizados aun cuando las bacterias sean resistentes a los antibióticos [7]. El fago **completo**, así como las enzimas que producen la lisis celular han sido consideradas como eficientes agentes microbicidas [8].

Previamente, nuestro equipo de trabajo aisló y caracterizó al bacteriófago K08-48, un bacteriófago perteneciente a la familia *Siphoviridae* que infecta y lisa a aislados de *Klebsiella pneumoniae* farmacorresistentes. El análisis de la secuencia del genoma viral mostró al menos 3 proteínas involucradas en la lisis celular durante el ciclo lítico; estas enzimas son la holina, endolisina y la espanina. Además de estas enzimas se encontró una proteína de la cauda viral con posible acción de depolimerasa [9]

Las depolimerasas son enzimas altamente específicas que actúan sobre la digestión de polisacáridos de la cápsula, exopolisacáridos y los lipopolisacáridos de la bacteria huésped. Este efecto expone los receptores de la superficie celular que son requeridos para la adhesión, facilitando la infección por el fago (Figura 1) [10]. Además, las depolimerasas tienen una gran potencial para inhibir la formación o para la desestabilización de biopelículas [11]. El crecimiento en biopelícula se caracteriza por la adhesión a una superficie biótica o abiótica con la producción de múltiples capas de polímeros extracelulares en donde las bacterias se encuentran embebidas [12]. La biopelícula protege al patógeno de condiciones adversas y de la respuesta inmune del huésped, además de impedir que los antimicrobianos lleguen a su célula blanco para ejercer su acción [12].

Los fagos utilizan a las enzimas como las depolimerasas para dispersarse libremente entre la matriz de la biopelícula. Por lo que, el uso de estas enzimas es de gran utilidad para degradar la capa de exopolisacáridos. Esta acción permite el acceso de las moléculas del sistema inmune para combatir al patógeno y facilita el transporte de los antimicrobianos hasta donde se encuentran las bacterias metabólicamente activas. La principal ventaja con el uso de estas enzimas degradadoras de polímeros es que la célula no se rompe y por ello no hay liberación de endotoxinas que puedan inducir un proceso inflamatorio agudo [9].

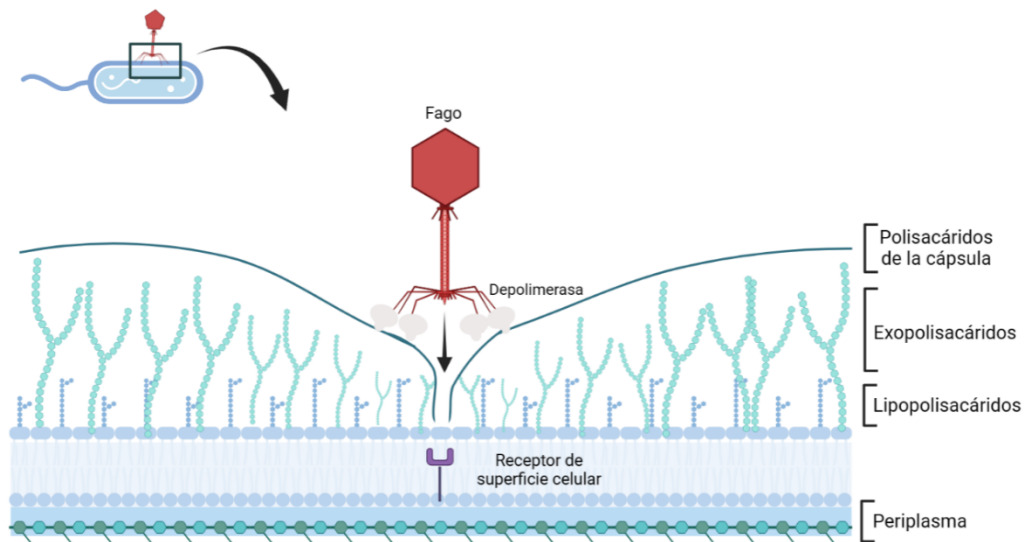


Figura 1.
Mecanismo de acción de las depolimerasas durante el inicio del proceso infeccioso de los bacteriófagos. Adaptado de Nazir A., (2023).

Por otra parte, las endolisinas o lisinas son enzimas que codifica el genoma viral para producir proteínas encargadas de desestabilizar la pared de peptidoglicano y destruir las células bacterianas, acción indispensable durante el ciclo de replicación lítica [13] [14]. Se han descrito cuatro tipos de mecanismos por los cuales las endolisinas actúan: actividad de glicosidasas, endopeptidasas, amidohidrolasas y transglicolasas [14]. Las endolisinas, como su nombre lo indica, lisan a la célula desde adentro; sin embargo, estas enzimas trabajan en conjunto con otras proteínas hidrofóbicas que generan poros (>100 nm de diámetro) en la membrana celular interna las cuales son llamadas holinas [15]. En conjunto todos estos componentes actúan para desestabilizar la envoltura celular para la liberación de la progenie viral madura (Figura 2).

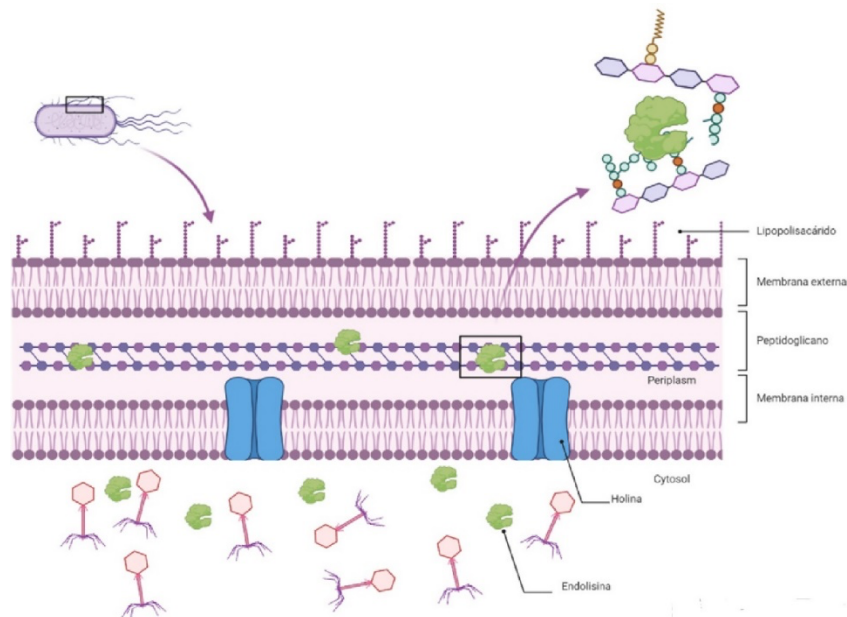


Figura 2. Mecanismo de acción de las endolisinas durante el final del ciclo lítico de los bacteriófagos.

En el presente trabajo, nuestro objetivo fue obtener un sistema de expresión heterólogo de la proteína viral endolisina del fago Φ K08-48 de *K. pneumoniae* para posteriormente determinar su efecto sobre cepas de *K. pneumoniae* resistentes y formadoras de biopelícula.

Estrategia experimental

El primer paso consistió en la amplificación de la secuencia que codifica para la endolisina (Figura 3) utilizando los oligos directo específicos de la enzima **endoFw**: GGATCCATGAAAACGCGGCTTACTTTC y reverso **endoRv**: CTCGAGTCATTTTCAGATCCTTAATGCATAG, siguiendo las condiciones de reacción: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, y 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineamiento a 59°C por 30 segundos y elongación a 72°C durante 45 segundos, con una extensión final de 72° por 10 minutos.

Posteriormente, el amplicon fue digerido con las enzimas de restricción XhoI y BamHI para realizar la ligación en el vector de expresión pET-32a (+). La construcción generada se transformó por choque térmico en células competentes de *E. coli* BL-21. Las células transformantes se seleccionaron en placas de LB-ampicilina (100 µg/mL) y se confirmó la construcción por PCR con los oligos directo **T7 Fw**: TAATACGACTCACTATAGGG y reverso **T7 Rv**: GCTAGTTATTGCTCAGCGG bajo las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, y 30 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, alineamiento a 59°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 45 segundos, con una elongación final da 72°C durante 10 minutos.

Una vez confirmada la presencia del constructo con la secuencia de interés en las clonas seleccionadas se realizó la inducción de la expresión de la endolisina con IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido). Para esto, un preinóculo bacteriano de la clona seleccionada se ajustó a una Densidad Óptica (DO) a 600 nm de 0.5, enseguida se añadió el inductor IPTG a una concentración final de 1mM por 1, 2, 3, y 4 horas. Finalmente, las células se lisaron empleando Buffer de lisis BugBuster Novagen y se analizó el homogenado total para determinar la expresión de la endolisina a través de un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%.

Todas las técnicas de amplificación, extracción de DNA plasmídico, electroforesPCR y clonación se realizaron de acuerdo con las técnicas estándar [16].

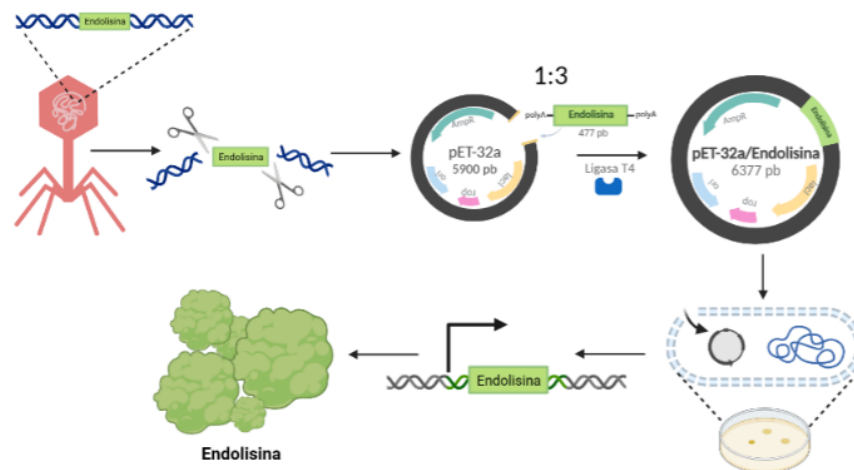


Figura 3. Estrategia experimental para la obtención de un sistema heterólogo de expresión de la endolisina del fago Φ K 08-48

Resultados

La amplificación del gen de la endolisina del fago Φ K08-48 fue de 477 pb. Este tamaño es similar a otras endolisinas identificadas como, la del fago de *K. pneumoniae* sin4 (ID: NC_049847.1) que tiene un tamaño de 496 pb muy similar a las endolisinas de bacterias Gram positivas y Gram negativas como: LysAB2 aislada del fago de *Acinetobacter baumannii* [17] y Lys46 aislada de un fago lisogénico de *Bacillus subtilis* [18]. El amplicón (figura 4A) fue purificado, digerido y ligado en el plásmido pET-32a (+).

Como resultado de la transformación se seleccionaron 4 clonas que presentaban la resistencia al antibiótico. De las 4 colonias seleccionadas, la clona 1 y la clona 7 amplificaron un fragmento correspondiente al tamaño del gen y de las secuencias que flanquean el sitio de multiclonación, lo cual se corroboró mediante PCR obteniendo el amplicón mostrado en la figura 4B (aproximadamente de ~1200 pb).

Posteriormente se realizó la inducción de la proteína con la finalidad de determinar la eficiencia de la expresión de la construcción pET32(+)/*EndoK08*. En las figuras 4C y 4D se muestran los extractos totales de los cultivos de la clona 1 y la clona 7 respectivamente inducidas de 1 a 4 horas. Siguiendo esta metodología se esperaba observar una banda en el gel de poliacrilamida, correspondiente a la proteína en un peso de aproximadamente 20 kDa, sin embargo, la intensidad de las bandas observadas sugiere una baja expresión de la endolisina. En este punto se requiere de estandarizar las condiciones de inducción para tener una expresión eficiente, esto dado que los resultados de PCR sugieren que sí se tiene el constructo con el gen de interés en el vector de expresión.

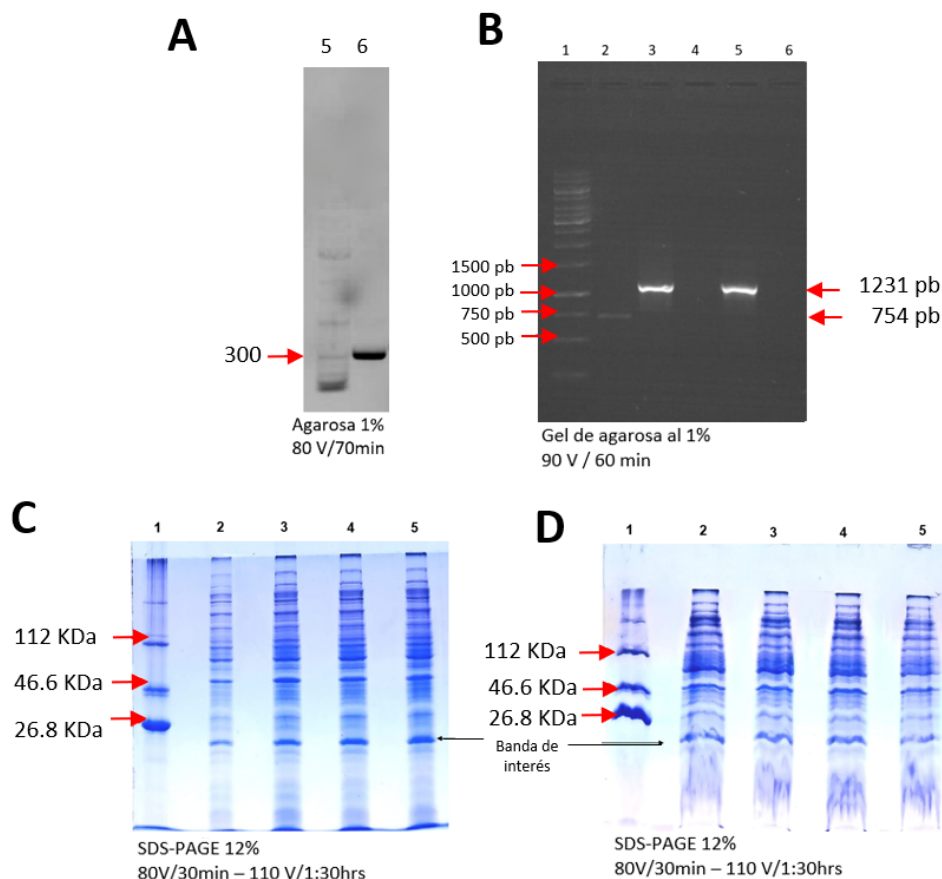


Figura 4. Obtención del constructo pET32(+)/*EndoK08* y análisis de la expresión de la endolisina mediante SDS-PAGE. A) amplificación de gen de la endolisina de 477 pb B) Las clonas 1 y 7 (carriles 3 y 5) que presentan amplificación con los oligos T7 de 1231 pb correspondiente a la secuencia de interés. C) SDS-PAGE al 12% que muestra la inducción de la proteína de interés en la clona 1 y D) en la clona 7 de 1 a 4 horas en los carriles 2,3 y5 respectivamente.

Conclusión

Se obtuvieron dos clonas que presentan la construcción pET-32a(+)/EndoK08, la cual corresponde a la secuencia de la endolisina del fago K08-48 de *K. pneumoniae* en el vector de expresión. La inducción de la expresión de la proteína recombinante mostró una expresión mínima alrededor de los 20 kDa, por lo que es necesario estandarizar las condiciones de expresión en el sistema de *E. coli* BL-21.

Bibliografía

- [1] Resistencia a los antimicrobianos. (2021, 17 noviembre). Organización Mundial de la Salud. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=Klebsiella%20pneumoniae%20es%20una%20bacteria,K>
- [2] La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos (2017, 27 febrero).. World Health Organization. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- [3] Vading, M., Nauclér, P., Kalin, M., & Giske, C. G. (2018). Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality. *PLOS ONE*, 13(4), e0195258. doi:10.1371/journal.pone.0195258
- [4] Moradigaravand, D., Martin, V., Peacock, S. J., & Parkhill, J. (2017). Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. *mBio*, 8(1). doi:10.1128/mbio.01976-16
- [5] Strathdee, S., Hatfull, G. F., Mutalik, V. K., & Schooley, R. T. (2023). Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. *Cell*, 186(1), 17-31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.017>
- [6] Mathur, M. D., Vidhani, S., Mehndiratta, P. L., Bhalla, P., & Reddy, B. (2003). Bacteriophage therapy: an alternative to conventional antibiotics. *Journal-Association of Physicians of India*, 51, 593-596
- [7] Asif, M., Alvi, I. A., Waqas, M., Basit, A., Raza, F., & Rehman, S. (2023). A K-17 serotype specific *Klebsiella* Phage JKP2 with biofilm reduction potential. *Virus Research*, 329, 199107. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199107>
- [8] Nelson, D. C., Schmelcher, M., Rodriguez-Rubio, L., Klumpp, J., Pritchard, D. G., Dong, S., & Donovan, D. M. (2012). Endolysins as Antimicrobials. *Bacteriophages, Part B*, 299–365.
- [9] Latka, A., Drulis-Kawa, Z. Advantages and limitations of microtiter biofilm assays in the model of antibiofilm activity of *Klebsiella* phage KP34 and its depolymerase. *Sci Rep* 10, 20338 (2020).
- [10] Nazir, A., Song, J., Chen, Y., & Liu, Y. (2023). Phage-Derived Depolymerase: Its Possible Role for Secondary Bacterial Infections in COVID-19 Patients. *Microorganisms*, 11(2), 424.
- [11] Wang, C., Li, P., Niu, W., Yuan, X., Liu, H., Huang, Y., ... Bai, C. (2019). Protective and therapeutic application of the depolymerase derived from a novel KN1 genotype of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in mice. *Research in Microbiology*.
- [12] Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual review of microbiology*, 49, 711–745.
- [13] Kim, S., Lee, D.-W., Jin, J.-S., & Kim, J. (2020). Antimicrobial activity of LysSS, a novel phage endolysin, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. doi:10.1016/j.jgar.2020.01.005
- [14] Abdelrahman, F., Easwaran, M., Daramola, O. I., Ragab, S., Lynch, S., Oduselu, T. J., Khan, F. M., et al. (2021). Phage-Encoded Endolysins. *Antibiotics*, 10(2), 124. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics10020124>
- [15] Donovan, D.M. Bacteriophage and Peptidoglycan Degrading Enzymes with Antimicrobial Applications. *Recent Pat. Biotechnol.* 2007, 1, 113–122
- [16] Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

[17] Chen X, Liu M, Zhang P, Leung SSY, Xia J. Membrane-Permeable Antibacterial Enzyme against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *ACS Infect Dis*. 2021 Aug 13;7(8):2192-2204. doi: 10.1021/acscinfecdis.1c00222. Epub 2021 Jul 7. PMID: 34232613

[18] Sarjoughian MR, Rahmani F, Abolmaali S, Astaneh SDA. *Bacillus* phage endolysin, lys46, bactericidal properties against Gram-negative bacteria. *Iran J Microbiol*. 2020 Dec;12(6):607-615. doi: 10.18502/ijm.v12i6.5036. PMID: 33613916; PMCID: PMC7884283.