

Análisis molecular in-silico del mecanismo de acción de las enzimas depolimerasas de los bacteriófagos vB_KpnP_BaqKPR2 de K. pneumoniae y vB_SauS_BaqSau1 de S. aureus.



Dayan Surig Lozano Solano

Análisis molecular *in-silico* del mecanismo de acción de las enzimas depolimerasas de los bacteriófagos vB_KpnP_BaqKPR2 de *K. pneumoniae* y vB_SauS_BaqSau1 de *S. aureus*.

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

DOCTORANTE

DAYAN SURIG LOZANO SOLANO

TUTOR

ANTONIO ACOSTA HOYOS PHD.

Barranquilla, marzo 11 de 2024

AGRADECIMIENTOS

A Dios gracias por permitirme llegar hasta aquí, en especial quiero agradecer a mi familia por su paciencia, comprensión y por su apoyo incondicional siempre, a mis hijos, mi madre, mis hermanos, Espe, Sandra, mis tíos, primos, a las masmis, a Leyla y a Flor por sus oraciones y a todos, ya por fin terminé, sé lo mucho que se preocuparon por mí.

A mi tutor Antonio Acosta por sus enseñanzas, paciencia y dedicación y a Paola Amar por convencerme de que yo también podía.

A Moi y Luna y Cris, por siempre estar ahí para mí, escucharme y prestarme su hombro y sus oídos en los momentos en que no era yo y sostenerme cuando mis fuerzas ya no me alcanzaban.

A todos mis compañeros de laboratorio por sus consejos, a Leo, Lisandro y Elwi, que siempre sacaban un ratito para responder a mis dudas.

A Fede, Robert y Jicli “Los Químicos” que, aunque se sumaron de último a este loco proyecto, fueron definitivos para sacarlo adelante.

A mis estudiantes, María, Sheyla y Jhonatan que con su trabajo me ayudaron a avanzar y de los cuales hoy me siento muy orgullosa.

A Lau por sus cafés, a Sindy, Saray, Roberto, Ericka, Jhon, Marta, Leo, Jani y sé que se me escapan muchos, fueron 8 largos años de esta travesía, pero a todos y cada uno de los que en algún momento me dieron sus palabras de apoyo y sus aportes, hoy les digo

¡GRACIAS TOTALES!

DEDICATORIA

A mi papá, sé lo orgulloso que estarías de mí, gózate mi triunfo donde quiera que
estés papi, te amo.

A mi hijos, Ángel y Luis, no quiero que sigan mis pasos, pero sí mi ejemplo, la
disciplina siempre superará a la inteligencia.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. RESUMEN	16
2. MARCO TEÓRICO	19
• <i>Staphylococcus aureus</i> resistente y multirresistente	20
• <i>Klebsiella pneumoniae</i> hipervirulenta y multi-resistente	21
• Enzimas derivadas de bacteriófagos como herramientas antimicrobianas para <i>S. aureus</i> y <i>K. pneumoniae</i> resistentes.	25
• Lisinas de fagos de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
• Depolimerasas codificadas por bacteriófagos	35
3. OBJETIVOS	38
• General	38
• Específicos	38
4. MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1 Aislamiento y caracterización de los bacteriófagos BaqSau1 de <i>Staphylococcus aureus</i> y BaqKPR2 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	39
4.1.1 Aislamiento de bacteriófagos de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	39
4.1.2 Caracterización morfológica.	44
4.1.3 Determinación del Índice de Multiplicidad (MOI)	46
4.1.4 Caracterización genómica de Baqsau1 y BaqKPR2.	48
4.1.5 Análisis de genómica estructural y funcional.	54
4.1.6 Análisis de genómica comparativa	56
4.2. Caracterización <i>in silico</i> de las depolimerasas de los bacteriófagos BaqSau1 y BaqKPR2.	58
4.2.1 Determinación de la estructura primaria y secundaria de las depolimerasas de los bacteriófagos BaqSau1 y BaqKPR2	58
4.2.2 Modelamiento de las depolimerasas de BaqSau1 y BaqKPR2	59
4.3 Determinación del mecanismo de acción de las depolimerasas de BaqSau1 y de BaqKPR2	62
4.3.1. Caracterización del mecanismo de acción de LysBaqSau1	62

4.3.2 Caracterización del mecanismo de reacción de la TSP de BaqKPR2	65
5. RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	69
Capítulo 1. Aislamiento y caracterización de los bacteriófagos BaqSau1 de <i>Staphylococcus aureus</i> y BaqKPR2 de <i>Klebsiella Pneumoniae</i> .	69
Capítulo 2. Caracterización <i>in sílico</i> de las depolimerasas de los bacteriófagos BaqSau1 y BaqKPR2.	108
Capítulo 3. Determinación del mecanismo de acción de las depolimerasas de BaqSau1 y de BaqKPR2	125
6. BIBLIOGRAFÍA.	154

LISTA DE FIGURAS

Nombre de la figura	Página
Figura 1. Lisinas de peptidoglicano de fagos de bacterias gram positivas	28
Figura 2. Estructura modular del dominio conservado CHAP de bacteriófagos de <i>S. aureus</i>	29
Figura 3. Mecanismos de acción de CHAP	32
Figura 4. Modelamiento de la Gp28 de BaqKPR2 y análisis filogenético de las depolimerasas descritas	37
Figura 5. Unidad de peptidoglicano de <i>S. aureus</i> .	63
Figura 6. Estructura del polisacárido capsular tipo K2	67
Figura 7. Placas de lisis de los bacteriófagos aislados	71
Figura 8. Rango de infección de BaqSau1.	72
Figura 9. Espectro de actividad lítica de BaqKPR2	73
Figura 10. Multiplicidad de infección (MOI) para BaqKPR2	74
Figura 11. Viabilidad de los bacteriófagos BaqSau1 y BaqKPR2 a diferentes temperaturas y tiempo.	76
Figura 12. Resistencia de BaqSau1 y BaqKPR2 a distintos pH.	77
Figura 13. Microfotografía de BaqSau1 y BaqKPR2	78
Figura 14. Electroferograma de las bibliotecas seleccionadas	79
Figura 15 Gráficas QC de las lecturas filtradas para ensamblaje de novo	80
Figura 16. Mapa genómico de BaqSau1	87
Figura 17. Esquemización de la RBP de BaqSau1.	89

Figura 18. Mapa genómico de BaqKPR2	94
Figura 19. Reporte del análisis de PhageTerm de BaqSau1	95
Figura 20. Reporte del análisis de PhageTerm de BaqKPR2	96
Figura 21. Agrupamiento de los géneros pertenecientes a Siphovirus de <i>Staphylococcus spp.</i>	97
Figura 22. Árbol filogenético de bacteriófagos de la familia Siphoviridae que infectan <i>Staphylococcus spp</i>	98
Figura 23. Agrupamiento de los bacteriófagos de <i>Klebsiella spp.</i>	99
Figura 24. Árbol filogenético de bacteriófagos de <i>Klebsiella spp</i>	100
Figura 25. Evaluación de calidad de los modelos de LysBaqSau1 obtenidos mediante los tres enfoques aplicados.	109
Figura 26. Estructura tridimensional de LysBaqSau1.	110
Figura 27. Estructura tridimensional del dominio catalítico CHAP y su sitio activo	111
Figura 28. Arquitectura de la TSP de BaqKPR2	112
Figura 29. Análisis comparativo de las TSP clásicas y la TSP de BaqKPR2	113
Figura 30. Análisis filogenético de las TSP con acción depolimerasa	115
Figura 31. Análisis electrostático de la TSP de BaqKPR2	117
Figura 32. Modelo estructural LysBaqSau1-SaMGT y los puntos de interacción del complejo.	129
Figura 33. Red de interacción del ligando en el complejo LysBaqSau1_SaMGT	130
Figura 34. Red de interacción mediante Docking dirigido Proteína – Ligando de LysBaqSau1 y NAG.	132

Figura 35. Modelo Docking Ciego Proteína – Ligando TSP_BaqKPR2 y el polisacárido capsular K2	135
Figura 36. Vista del modelo de interacción mediante Docking dirigido Proteína – Ligando de TSP-CPS_K2	137
Figura 37. Modelo Docking Proteína – Proteína del complejo de TSP_BaqKPR2+OmpK36	139
Figura 38. Modelo propuesto del mecanismo de interacción de LysBaqSau1 con la capa de peptidoglicano y la transglicosidasa SaMGT de <i>S. aureus</i> .	147

LISTA DE TABLAS

Nombre de la tabla	Página
Tabla 1. Depolimerasa descritas en la literatura hasta la fecha.	34
Tabla 2. Cepas utilizadas en el ensayo de Rango de huésped.	43
Tabla 3. Criterios de clasificación de bacteriófagos de familia Caudovirales según Ackerman H.	46
Tabla 4. Parámetros usados para la determinación de MOI óptima.	47
Tabla 5. Pipelines de ensamble, validación y anotado de los genomas.	50
Tabla 6. Pipelines utilizados para la anotación de los genomas	53
Tabla 7. Genomas usados en el análisis de genómica comparativa.	57
Tabla 8. Parámetros de las cajas de interacción para el docking mediante AutoDock Vina.	64
Tabla 9. Parámetros de la caja de interacción para el docking mediante AutoDock Vina	67
Tabla 10. Placas de lisis y microfotografías de los fagos aislados	70
Tabla 11. Análisis de concentración y calidad de DNA para secuenciación.	79
Tabla 12. Contigs obtenidos mediante el ensamble <i>de novo</i> .	80
Tabla 13. Comparación datos de anotación del genoma de los tres anotadores usados	81
Tabla 14. Caracterización genómica funcional de BaqSau1.	84
Tabla 15. Organización funcional del genoma de BaqSau1	87
Tabla 16. Caracterización genómica funcional de BaqKPR2.	91

Tabla 17. Organización funcional del genoma de BaqKPR2	94
Tabla 18. TSP de estructura clásica descritas en la literatura.	113
Tabla 19. Salida de puntuación de pyDockWEB del complejo LysBaqSau1-SaMGT	128
Tabla 20. Salida de puntuación del complejo TSP-Polisacárido obtenido mediante AutoDock Vina de los métodos DdPL y DcPL.	133
Tabla 21. Salida de puntuación de pyDockWEB del complejo TSP-OmpK36	138

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AMP-Kp	K. pneumoniae resistente a ampicilina
ANI	Identidad de nucleótidos promedio
BLEE-Kp	K. pneumoniae productor de Beta-lactamasas de espectro extendido
CBD	Dominio de unión al receptor
CDS	Secuencias codificantes
CHAP	Cysteine - and histidine-dependent aminohidrolase/peptidase
CHAP-K	Dominio CHAP de la lisisna codificada por el bacteriófago K
CoNS	Staphylococcus coagulasa negativos
CPB	Cultivo primario de bacteriófagos
CPS	Polisacárido capsular
DcPL	Docking ciego proteína-ligando
DdPL	Docking dirigido proteína-ligando
DPL	Docking proteína-ligando
Dpo	depolimerasas
DPP	Docking proteína – proteína
dsDNA	Genoma DNA de doble cadena
EPS	Exopolisacáridos capsular
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
GlcNAc -NAG	N-Acetil Glucosamina
GP u ORF	Posición del CDS de que codifica para una proteína
hd y hl	Diámetro y longitud de la cápside

h-VISA	hetero-resistencia
hv-Kp	K. pneumoniae hipervirulenta
IAAS	infecciones asociadas a la atención en salud
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IMP	K. pneumoniae productor de imipenemasa
KPC	K. pneumoniae productor de carbapenemasas
K-tipos	Serotipos capsular de K. pneumoniae
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LPS	Lipopolisacáridos capsular
LysGH15	Lisina del bacteriófago GH15
LysK	Lisina del bacteriófago K
LysRODI	Lisina del bacteriófago RODI
MBL-Kp	K. pneumoniae productor de Metallo- β -lactamasas
MDR-Kp	K. pneumoniae multiresistente
MOI	Multiplicidad Óptima de Infección
MurNAc - NAM	N-Acetil Murámico
NDM	K. pneumoniae productor de metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi
OMPK36	Osmoporina constitutiva de la pared celular de K. pneumoniae
OMS	Organización mundial de Salud
OPM	Proteínas de membrana externa
PBP	receptores de unión a la penicilina
RAST	Rapid Annotation Using Subsystem Technology
RBP	Proteína de unión a la bacteria
SaGMT	Transglicosidasa de membrana de S. aureus
SARM	S. aureus resistente a meticilina

SASM	S. aureus sensible a meticilina
SH3	Dominio de unión al sustrato de la Endolisina
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
tl y td	Longitud y ancho perpendicular de la cola
TS	Medio de cultivo Tripticasa de Soya
TSP	Proteína de punta de cola (del inglés Tails Spike Protein)
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UFP	Unidades formadoras de placas
VALs	Lisinas asociadas al virión
vB_KpnP_BaqKPR2	Virus bacteriano aislado de K. pneumoniae, tipo podoviridae, del nombre común BaqKPR2
vB_SauS_BaqSau1	Virus bacteriano aislado de S.aureus, tiposyphoviridae, del nombre común BaqSau1
VICTOR	Virus Classification and Tree Building Online Resource
VIM	K. pneumoniae productor de imipenemasa de Verona
VISA	resistencia intermedia
VRSA	resistencia a la Vancomicina

1. RESUMEN.

Klebsiella pneumoniae y *Staphylococcus aureus* son reconocidos a nivel mundial como importantes patógenos productores de infecciones intrahospitalarias y de la comunidad, causantes de una gran variedad de enfermedades en humanos que pueden llegar a ser graves y hasta poner en riesgo la vida de quienes lo padecen. En años recientes, estas bacterias han despertado un gran interés de clínicos y científicos por su alta tasa de resistencia a los antibióticos y por su capacidad para desarrollar resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, tanto así que en el año 2020 fue incluido en el listado de “*problemas sanitarios urgentes de dimensión mundial*” por la OMS (Organización mundial de Salud) (1). La capacidad de estos patógenos de desarrollar resistencia a distintas familias de antibióticos dificulta su tratamiento eficaz y genera sobre costos a los sistemas de salud.

La resistencia a los antibióticos, incluidas las enzimas beta-lactamasa de espectro extendido en *K. pneumoniae* y la propagación de cepas de *S. aureus* con susceptibilidad disminuida a Vancomicina ha llevado a la necesidad de desarrollar enfoques alternativos para combatir estas infecciones. En este contexto, los bacteriófagos y sus enzimas depolimerasas han surgido como una prometedora estrategia para abordar esta problemática. Estas enzimas son capaces de romper la estructura de los polisacáridos que conforman la pared celular de las bacterias, lo que debilita la integridad de la célula y conllevan a la lisis.

El presente trabajo tiene como objetivo proponer mecanismos de acción de las enzimas depolimerasas de los bacteriófagos *vB_KpnP_BaqKPR2* de *K. pneumoniae*

y *vB_SauS_BaqSau1* de *S. aureus* aislados de aguas residuales de la ciudad de Barranquilla y Sahagún Córdoba, respectivamente, por lo que se consideran fagos autóctonos.

Mediante este trabajo se ha podido hacer una aproximación atomística del mecanismo de acción de las depolimerasas de los bacteriófagos BaqSau1 y BaqKPR2, este es el primer estudio que brinda información acerca de la especificidad de los dominios catalíticos de una endolisina nativa hacia otros componentes importantes de la pared bacteriana en *S. aureus* y de igual forma brinda información importante del rol de las TSP y del dominio depolimerasa sobre la cápsula y otros componentes importantes de la pared bacteriana de *K. pneumoniae*. Receptores de membrana como la transglicosidasa SaGMT en *S. aureus* y la osmoporina OMPK36 en *K. pneumoniae* son importantes consideradas dianas terapéuticas. Este trabajo brinda un importante avance sobre el mecanismo de acción de dichas enzimas para ser usados como enzibióticos y para futuras investigaciones que conduzcan a realizar estudios *in-vitro* para poder confirmar los hallazgos.

La comprensión molecular del mecanismo de acción de estas depolimerasas es fundamental aumentando nuestro conocimiento sobre la biología de los bacteriófagos y su posible aplicación en el control de infecciones causadas por *K. pneumoniae* y *S. aureus* resistentes a múltiples fármacos representando una estrategia prometedora para combatir estas infecciones.

Palabras clave: Endolisinas, depolimerasas, Bacteriófagos, *S. aureus*, *K. pneumoniae*

2. MARCO TEÓRICO

Desde los inicios de la historia, las infecciones bacterianas han cobrado más vidas incluso que las distintas guerras que ha presenciado la humanidad (2). Antes del descubrimiento de la penicilina en la segunda década del siglo XX, considerada la era pre-antibiótica, la expectativa de vida al nacer a nivel mundial no superaba los 40 años (3), por lo que el desarrollo de los antibióticos representó un hito para la humanidad y trajo consigo cambios drásticos en la dinámica poblacional y la mejoría en la calidad de vida de las personas, junto con otros avances en la medicina y el saneamiento básico. Sin embargo, con el pasar del tiempo, a un siglo del descubrimiento de Flemming en la era pos-antibiótica, las bacterias resistentes a los antibióticos representan una gran amenaza para la salud pública mundial (4), por lo que tanto clínicos como científicos se encuentran en la ardua tarea de buscar alternativas viables para controlar las cada día más potentes bacterias multirresistentes (5).

En este respecto, la OMS en el año 2020 emitió una alerta mundial estableciendo un listado de los problemas de salud mundial que requiere medidas urgentes para su mitigación, entre los cuales *S. aureus* y *K. pneumoniae* son catalogados por esta entidad como principales patógenos bacterianos tanto en humano como en animales que presentan altas tasa de resistencia y multiresistencia a los antibióticos, entre otros (1).

***Staphylococcus aureus* resistente y multirresistente**

Staphylococcus aureus es quizá la bacteria gram positiva más abundante en la microbiota humano, se estima que al menos el 30% de la población se encuentran colonizada por esta bacteria (6). Sin embargo, *S. aureus* representa también un importante patógeno considerado un problema de salud pública mundial debido a las altas tasa de morbi-mortalidad, al arsenal de factores de virulencia que le permiten desarrollar enfermedades que van desde simples abscesos de piel hasta neumonías necrotizantes(7), la habilidad de adherirse a superficies abióticas como prótesis y catéteres (8) y adicional a esto, el aumento significativo en las últimas décadas de la incidencia de cepas resistente a la meticilina (SARM) causantes de infecciones adquiridas tanto intrahospitalario como en la comunidad (9).

Sólo en Colombia, según el informe de resultados de la vigilancia por laboratorio de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) del Instituto Nacional de Salud en el período comprendido entre 2012 y 2018 se reportó una prevalencia del 41,1% en servicios UCI tanto pediátrica como neonatal de aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM), seguido del servicio de UCI adulto de 31,3% (10). Sin embargo, SARM también ha sido aislado colonizando personas sanas y niños en edad escolar (11), en trabajadores de la salud (12) y en personas sanas sin factores de riesgo asociados (7). Pero la mayor preocupación es la propagación de cepas de *S. aureus* con alta resistencia a la Vancomicina (VRSA), con resistencia intermedia (VISA) o con hetero-resistencia (h-VISA), estas últimas han ido incrementándose de manera preocupante en los últimos años. En 2020, Shariati et al (13), reportó el incremento de la prevalencia

global de cepas VISA y hVISA que pasó de 1,2% y 4%, respectivamente, antes de 2010, al 4,3% y 5,3% en el 2019.

La gran variedad de factores de virulencia y la alta adaptabilidad de *S. aureus* dificulta el tratamiento ya que muchas cepas VISA pueden resistir a tratamientos con vancomicina y posterior al tratamiento pueden disminuir la resistencia y convertirse en hVISA, disminuyendo su virulencia en la forma aguda de la infección por una mayor tolerancia a los antibióticos y la evasión de la respuesta inmune. Clínicamente, esto se manifiesta como infecciones crónicas que persisten a pesar de tratamientos antibióticos aumentando la estancia hospitalaria y provocando sobrecostos a los sistemas de salud a nivel mundial (13).

Debido a la emergencia por SARM y de cepas con susceptibilidad disminuida, intermedia o hipervariable a vancomicina los tratamientos actuales para estas infecciones son cada vez más limitados y en los últimos años el número de medicamentos aprobados para tratarlas han disminuido considerablemente (14). La solución a esta problemática debe ir encaminada en el desarrollo y la investigación de alternativas viables de prevención y tratamientos eficaces y en este sentido los bacteriófagos, considerados enemigos naturales de las bacterias, y usados para controlarlas mucho antes del auge de los antibióticos (15), ofrecen esta alternativa.

***Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta y multi-resistente**

Mientras *S. aureus* es el principal coco gram positivo productor de infecciones graves y altas tasa de resistencia a los antibióticos en humanos, su contraparte de los

bacilos gram negativos es *K. pneumoniae*, éste último también forma parte del grupo de las bacterias consideradas prioritarias por la OMS (1).

Esta bacteria es la causante de una gran variedad de infecciones principalmente de vías urinarias, respiratorias y sepsis. La *K. pneumoniae* es un gran problema de salud pública afectando principalmente a neonatos, adultos mayores y personas inmunocomprometidas, por lo que también es considerado un patógeno oportunista (16) productor de infecciones hospitalarias y comunitarias.

La patogénesis de *K. pneumoniae* incluye una capsula de polisacáridos (CPS), lipopolisacáridos (LPS), exopolisacáridos (EPS) fimbrias, proteínas de membrana externa (OPM) y sideróforos de unión al hierro que le permiten evadir el sistema del complemento, que en cepas no encapsuladas suele ser suficiente para lograr controlar estas infecciones (17). Sin embargo, esta capsula también le confiere resistencia a la sequedad del medio ambiente y a otros factores adversos como los antimicrobianos (16). Hasta la fecha se han descrito más de 79 serotipos con base en la diversidad de los componentes polisacáridos catalogados como K-tipos, siendo los más prevalentes los de tipo K1 y K2 relacionadas con las cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* (hv-Kp) (17,18).

Klebsiella pneumoniae ha evolucionado muy rápidamente en los últimos años dando origen a cepas hipervirulentas (hv-Kp) que exhiben una cápsula resistente a la acción del sistema inmune y a los antibióticos y de manera simultánea la adquisición de genes que le proveen de resistencia a múltiples fármacos o multi-resistentes (MDR-Kp) causando infecciones graves adquiridas tanto en ambientes hospitalarios como en la comunidad (19), por lo que la OMS categoriza este patógeno como de atención

“Crítica” (1) instando a la búsqueda de soluciones eficaces que logren mitigar la dispersión de éstas y la aparición de cepas no tratables con los antibióticos disponibles (16).

A nivel mundial *K. pneumoniae* está asociado con altas tasas de morbilidad principalmente por cepas resistentes a carbapenémicos alcanzando tasas de mortalidad de hasta el 42% y de las cepas productoras de carbapenemasas hasta del 21,16% asociada principalmente a sepsis (54,3%) e infecciones del tracto urinario (13,2%), geográficamente la mortalidad asociada a este tipo de infecciones según los estudios reportados son de América del norte, Sur América, Europa y Asia con tasas del 33.24, 46.71, 50.06, y 44.82%, respectivamente (20).

En Colombia, según el informe de resultados de la vigilancia por laboratorio de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) del Instituto Nacional de Salud en el período comprendido entre 2012 y 2018 se reportaron *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas de tercera generación con una tasa del 47,3% en el servicio de UCI pediátrica, seguido del 34,7% en la UCI de adultos, del 33% en la UCI neonatal, y en relación a la resistencia a carbapenémicos el servicio de UCI pediátrica se presentó en un 16% de los aislamientos, seguidos por la UCI de adultos con un 15,6% y la UCI neonatal con un 4,9% (10).

Ocasionalmente, la resistencia a múltiples fármacos en *K. pneumoniae* surge de mutaciones espontáneas y por la transferencia horizontal de genes de virulencia principalmente de origen plasmídico. Hasta la fecha se han descrito más de 100 genes y plásmidos asociados a la resistencia en éste (21), y en las últimas décadas fueron expandiéndose con gran rapidez cepas resistentes a antibióticos

betalactámicos. La adquisición de genes que codifican para enzimas β -lactamasas, es decir que hidrolizan antibióticos β -lactámicos, es considerado el tipo de resistencia más frecuente en *K. pneumoniae* (22), mediada por el gen *bla_{SHV-1}* (23) que le proporciona resistencia a la ampicilina (AMP-Kp) (23). Poco después de la introducción a la práctica clínica de las cefalosporinas de tercera generación se detectaron cepas portadoras del gen CTM-X el cual codifica enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE-Kp) y luego las carbapenemasas (KPC), capaces de hidrolizar los antibióticos carbapenémicos (24) y más recientemente las Metallo- β -lactamasas (MBL-Kp) mediada por los genes *bla_{OXA-48}* y *bla_{NDM}* que difieren de las anteriores, por la presencia de dos iones de zinc en su sitio activo (25) necesarios para su actividad enzimática y que además le confiere resistencia a los inhibidores de β -lactamasas (21,22).

La mayoría de los aislados clínicos de MBL-Kp pertenecen a la subclase B1, entre las cuales se encuentran las familias de metalo- β -lactamasas de Nueva Delhi (NDM), imipenemasa de Verona (VIM) e imipenemasa (IMP) (25). Las cepas MBL-Kp representan un desafío para todos los servicios de salud a nivel mundial ya que permiten la resistencia a prácticamente todos los antibióticos β -lactámicos incluidos los carbapenémicos, considerados los más potentes β -lactámicos de amplio espectro disponibles, dejando sin alternativas farmacológicas a los clínicos.

En la búsqueda de una solución que permita el control de las cepas hv-Kp y MDR-Kp, las enzimas depolimerasas producidas por bacteriófagos específicos de especies de *Klebsiella* se han destacado en años recientes para el control de estas infecciones (26,27). Las depolimerasas actúan degradando la cápsula y de esta

forma disminuye considerablemente el potencial patológico de *K. pneumoniae* haciéndola susceptible al ataque del sistema del complemento y de terapias antibióticas (27).

Enzimas derivadas de bacteriófagos como herramientas antimicrobianas para *S. aureus* y *K. pneumoniae* resistentes.

Los bacteriófagos o fagos fueron descritos desde hace más de 100 años por Félix D'Herelle, éstos son virus de bacterias que tienen una alta especificidad por su huésped y tienen la capacidad de lisar la célula bacteriana (28). Sus características biológicas han permitido que recientemente se haya renovado el interés en su estudio ya que ofrecen una alternativa antimicrobiana para las cepas resistentes y multirresistentes a los antibióticos, entre muchos otros usos (29).

La fagoterapia o el uso de estos virus para el control de infecciones bacterianas datan antes de la era antibiótica (30,31). Los bacteriófagos fueron usados para el tratamiento de la disentería por D'Herelle y muchos otros casos de éxito se documentaron para el tratamiento de enfermedades infecciosas a lo largo del siglo XX (32). Hoy son usados en la industria alimentaria en forma de lisados para el biocontrol de *Listeria* en carnes frías y quesos empacados (33) y de *Salmonella* (34), entre otros, contando con la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por su sigla en inglés) (33,34) . Sin embargo, el uso de fagos en la práctica clínica no ha tenido el mismo avance a pesar de sus bondades.

La historia del desarrollo de la fagoterapia ha atravesado por varios períodos a lo largo del tiempo desde su descubrimiento, hace más de un siglo, teniendo una fase temprana catalogada como la fase del “*entusiasmo*” que abarcó el período entre 1920 y 1930, seguido de una etapa de “*escepticismo*” entre los años 30’s y mediados de los 40’s, que concluyó con el “*abandono*” de la investigación hasta mediados de los años 90’s y desde entonces hasta la fecha se ha evidenciado un “*Resurgimiento*” de la investigación con fagos en los países occidentales (35). Cabe resaltar que la fagoterapia continuó su desarrollo imparable en países pertenecientes principalmente a la antigua Unión Soviética y las repúblicas que surgieron posterior a su disolución, particularmente en Polonia y Georgia.

A pesar de los grandes adelantos en la investigación en la última década y los numerosos casos de éxito en la aplicación de fagos, la fagoterapia presenta aún muchos desafíos y limitaciones frente a los antibióticos. Sin embargo, estos virus parecen ser la alternativa más viable para contrarrestar las cada vez más resistentes bacterias. Algunas de las limitaciones de la fagoterapia son: 1. El bajo rango de acción de los virus, por ser altamente específicos a su bacteria hospedadora; 2. El modo de preparación de estos cocteles y las condiciones de mantenimiento de los mismo que encarecen aún más el tratamiento, lo que a su vez se traduce en dificultad para la adherencia a los tratamientos por parte de los pacientes con tratamiento en casa; 3. La posibilidad de generar resistencia a éstos y también la transferencia horizontal de genes de virulencia o resistencia mediada por fagos (35). Todas estas limitaciones han llevado a los investigadores a centrar su atención en las enzimas derivadas de los bacteriófagos, llamadas enzibióticos (36) que al ser de naturaleza

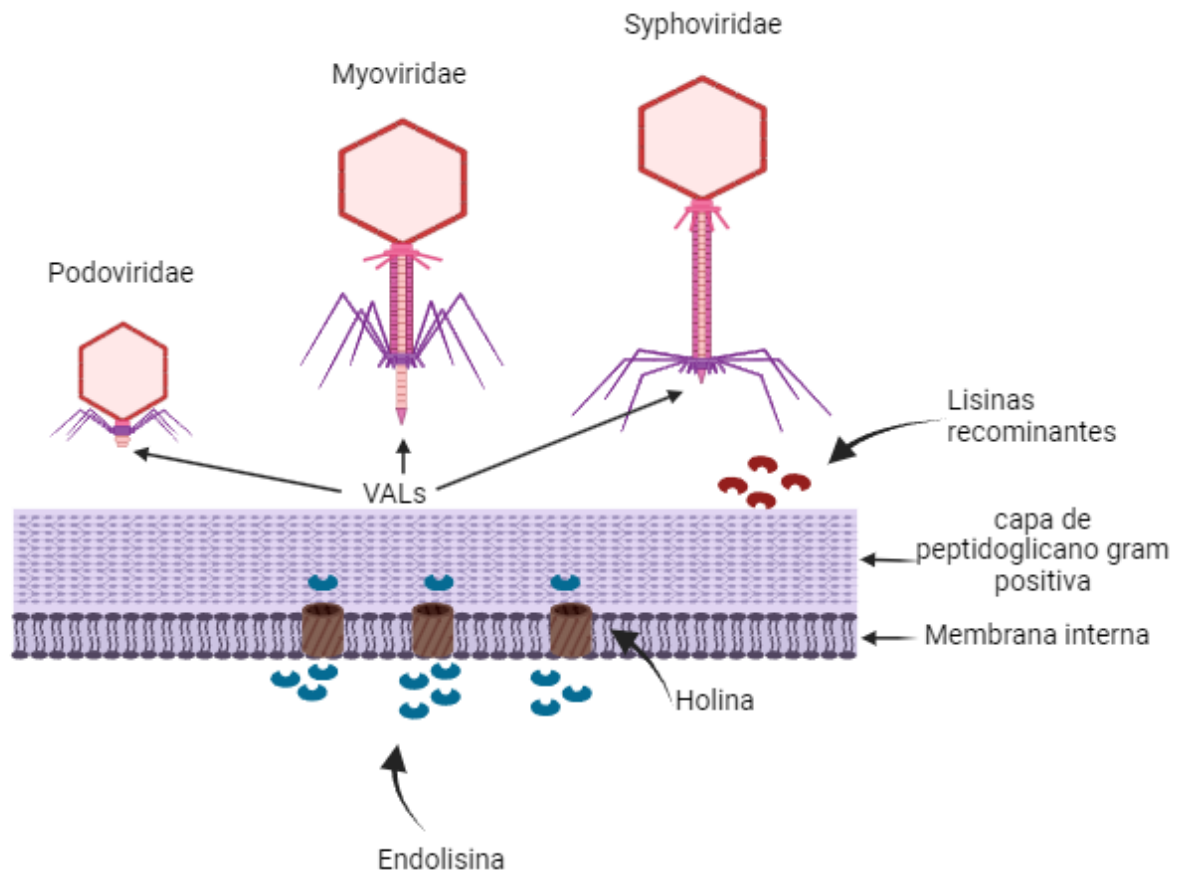
proteica facilitan su administración y producción y por su mecanismo de acción dirigida principalmente a la capa de peptidoglicano de la pared bacteriana se asocia a una baja o nula producción de resistencia.

Hasta la fecha se han descrito dos clases de enzimas derivadas de fago, las hidrolasas de peptidoglicano llamadas lisinas o endolisinas (37) principalmente asociadas al control de bacterias Gram positivas; y, por otra parte, las depolimerasas de polisacáridos capaces de descomponer los polisacáridos asociados a la superficie bacteriana como capsulares (CPS), lipopolisacáridos (LPS) y Exopolisacáridos (EPS) (26) demostrando ser eficaces en modelos animales contra bacterias gramnegativas encapsuladas y en biopelículas.

Lisinas de fagos de *Staphylococcus aureus*

La lisina es una enzima codificada por todos los bacteriófagos tanto líticos como lisógenos. Esta clase de enzimas son las responsables de degradar la pared bacteriana y permitir la salida de los nuevos viriones al final del ciclo lítico que junto con la proteína holina forman un casete lítico actuando en dúo (38). La última se encarga de formar poros en la pared citoplasmática y permitir el paso de la lisina hasta la capa de peptidoglicano (38). Por otra parte, se encuentran las lisinas asociadas al virión (VALs) que se encuentran en las puntas de los fagos con cola y que permiten el acceso de material genético durante la infección (36) como se muestra en la **Figura 1**.

Figura 1. Lisinas de peptidoglicano de fagos de bacterias gram positivas

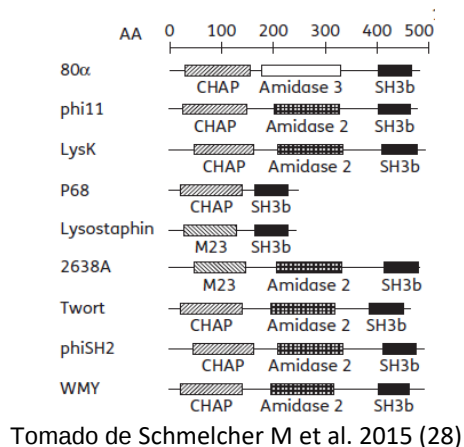


Creado en Biorender.com

Sin embargo, en el caso de las bacterias gram positivas se ha demostrado que endolisinas recombinantes pueden tener una acción directa desde el exterior de la bacteria, sin la mediación de la holina ya que la capa de peptidoglicano se encuentra disponible (37) utilizando un mecanismo de acción similar al de los antibióticos de la familia de los betalactámicos, ya que éstos últimos van dirigidos especialmente a los receptores de unión a la penicilina (PBP), mientras que las lisinas van dirigidas específicamente a la capa de peptidoglicano.

Todas las lisinas que codifican los fagos de *S. aureus* tanto las endolisinas como las asociadas al virión (VALs) tienen una organización modular compuesta por uno o más dominios de unión al sustrato tipo SH3, un dominio amidasa y un dominio catalítico CHAP conservado (39) (ver **Figura 2**). CHAP está presente en alrededor del 75% de los fagos de *S. aureus* (40,41). CHAP se caracteriza por poseer dos residuos de histidina y cisteína en su sitio activo del cual recibe su nombre (por su nombre en inglés cysteine - and histidine-dependent aminohidrolase/peptidase) y es capaz de hidrolizar el peptidoglicano bacteriano (40). Algunos autores han obtenido el dominio CHAP recombinante de fagos de *S. aureus* como LysK (40), LysRODI (42) y LysGH15 (43) y han demostrado su actividad bactericida usado de forma purificada desde el exterior de la célula, fenómeno conocido como “lysis from without” (44) sobre cepas de *S. aureus* incluyendo cepas SARM (42,43,45) por lo que en la actualidad constituye una alternativa viable como tratamiento enzibiótico para el control de las infecciones por éste patógeno.

Figura 2. Estructura modular del dominio conservado CHAP de bacteriófagos de *S. aureus*



Por otra parte, las lisinas de los fagos MV-L y MR1 demostraron ser efectivos en el control de cepas de SARM en fosas nasales en modelo murino (28) y LysGH15

demostró tener un amplio espectro lítico in-vitro con una única dosis de 50 µg post infección en modelo murino (46). Otras lisinas como LysK y Lysφ11 también demostraron su actividad contra cepas de *S. aureus* (43,47,48)

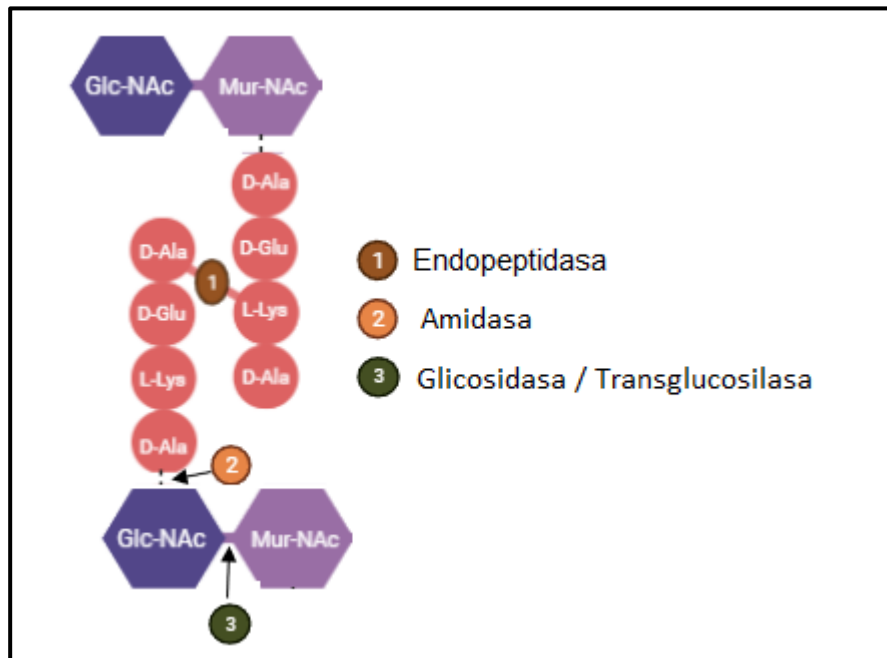
Las lisinas derivadas de bacteriófagos de *S. aureus* mejor caracterizados hasta la fecha son LysK derivada del bacteriófago K (49) y LysGH15 (50) derivada del bacteriófago GH15. Del primero se logró obtener su estructura cristalográfica del dominio catalítico CHAP (Pfam:PF05257), identificaron los residuos de histidina y cisteína en su sitio activo como característicos de éste y se determinó el bolsillo catalítico-tipo en forma de mano (Hand-like) incluyendo la presencia de iones de calcio y de zinc. El calcio interactúa durante la hidrólisis de peptidoglicano y el zinc es importante en la estabilización de la lisina completa (51) .

Por su parte, LysGH15 demostró un amplio espectro lítico sobre cepas de *S. aureus* resistentes a Meticilina (50), también en aislamientos de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. hominis* tanto *in vitro* como en *in vivo* en modelo animal, obteniendo una reducción significativa en el recuento bacteriano en tan solo 30 minutos de la aplicación de una dosis de 20 µg/ml. Asimismo, se ha demostrado la reducción de biopelículas con la aplicación de una dosis de 50 µg/ml de LysGH15 recombinante donde se evidenció el potencial para inducir a la resistencia es bajo, no obstante, puede inducir a la respuesta inmune celular (46,52), lo que se considera una desventaja. Por otro lado, a diferencia de LysK, no hay estudios que evidencien la obtención del dominio CHAP recombinante de la lisina LysGH15.

En términos generales, las endolisinas se clasifican según su sitio de corte en 3 grupos: 1. Endopeptidasas, que corta el puente interpeptídico que forma el péptido compuesto por el enlace L-lisina y D-alanina; 2. Amidasa, hidroliza el enlace amida que separa la cadena de glicano del péptido madre que se encuentra entre el ácido N-acetilmurámico y los residuos de L-alanina; y 3. Las glicosidasas, o transglicosidasas que cortan los enlaces inter glicosídicos ya sea el N-acetyl- β -D-glucosaminidasa o N-acetilmuramidasa. Todas éstas se conocen con el término hidrolasas de pared celular codificadas por fagos (53) (ver **Figura 3**).

Con base en esto, el mecanismo de acción entre la lisina intacta y el dominio CHAP como en el caso del bacteriófago K difieren en el sitio de corte, mientras LysK tiene función amidasa, CHAP-K tiene una acción endopeptidasa, esto es debido a la presencia de un dominio catalítico tipo amidasa SH3 en la lisina intacta. Sin embargo, se ha podido demostrar que el dominio CHAP por sí solo tiene mayor rango de acción que la lisina completa o de los constructos obtenidos de la unión de ambos dominios catalíticos (CHAPK+SH3) (47,54).

Figura 3. Mecanismos de acción de CHAP.



Monómero de peptidoglicano y tipos de acción de las lisinas de bacteriófagos conocidas. *S. aureus* tiene una pared celular gruesa de peptidoglicano compuesta por unidades repetidas de disacárido ácido N-acetil-murámico (MurNAc) y N-acetil-glucosamina (GlcNAc) están unidas por tetrapéptidos. 1. Acción endopeptidasa corta los puentes interpeptídicos (CHAPk), 2. Amidasa, corta las uniones glicopeptídicas (LysK) y 3. Glicosidasa/Trasnglucosilasa corta los enlaces glicosídicos (Lizosima).

Depolimerasas codificadas por bacteriófagos

Las depolimerasas son enzimas con función lítica capaces de degradar componentes de la pared celular bacteriana (27). Sin embargo, como vimos anteriormente, existe una marcada diferenciación entre las lisinas (endolisinas y VALs) y las depolimerasas, las primeras tienen una acción directa sobre la capa de peptidoglicano y son de gran utilidad contra bacterias gram positivas (52), ya que éstas tienen la capa de peptidoglicano de la pared disponible hacia el espacio extracelular, y las depolimerasas propiamente dichas, que por tener una acción principalmente dirigida a otros componentes de la pared celular como CPS, LPS o EPS son de mayor utilidad para su uso contra bacterias gram negativas (27).

Las depolimerasas han sido descritas como proteínas constitutivas de fagos de la familia *Podoviridae*, principalmente (26). Sin embargo, recientemente también se han descrito en algunos géneros de fagos pertenecientes a *Ackermanviridae*, *Myoviridae* y *Syphovidae*, incluso algunos fagos poseen más de una enzima de este tipo (55–66) (Ver **tabla 1**). Estas enzimas tienen la función de permitir la adsorción del virión en la pared bacteriana y la entrada del material genético a la bacteria.

La enzima depolimerasa fue descrita por primera vez por Tomlinson y Taylor en 1985 (67), como una enzima capaz de degradar cepas de *E. coli* que exhibían el tipo capsular K1 causante de importantes brotes de meningitis y septicemia en neonatos. El término depolimerasa hace referencia a enzimas con función de escindir y desintegrar las unidades que forman un polisacárido. Estas enzimas se dividen en dos grupos, hidrolasas y liasas. Las hidrolasas liberan moléculas de agua durante su reacción, a este grupo de enzimas pertenecen las endolisinas ampliamente descritas arriba. Por otro lado, encontramos las de tipo liasa, las cuales no tienen una reacción hidrolítica a diferencia de las anteriores. Éstas tienen gran diversidad en la especificidad de sus sustratos a diferentes tipos de polisacáridos. Estas enzimas en sí conforman el dominio catalítico de las proteínas estructurales llamadas TSP, por su sigla en inglés Tails Spike Protein, que están dirigidas a los lipopolisacáridos en general (ver **figura 4a**), mientras que las depolimerasas (Dpo) están principalmente dirigidas a polisacáridos capsulares CPS y EPS.

Tabla 1. Depolimerasa descritas en la literatura hasta la fecha.

Fago	Hopedor	Familia (Subfamilia)	Género	TSP	No. De Acceso.	Especificidad	Referencia
Fagos que codifican para una Depolimerasa							
K1F	E. coli	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Teseptimavirus (T7virus)	1 TSP	Q04830	CPS - K1	Stummeyer et al., 2006 (58)
L1	E. amylovora	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Teseptimavirus (T7virus)	1 TSP - DpoL1	YP_007005465	EPS	Born et al., 2014 (68)
PHB01	P. multocida	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Teseptimavirus (T7virus)	1 TSP	ASD51051	D	Chen et al., 2019 (69)
PHB02	P. multocida	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Teseptimavirus (T7virus)	1 TSP - Dep-ORF8	ARV77571	A	Chen et al., 2018 (70)
Petty	A. baumannii	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Phikmvvirus	1 TSP - Dpo1	YP_009006535	Nd	Hernandez-Morales et al., 2018 (71)
NTUH-K2044-K1-1	K. pneumoniae	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Phikmvvirus	1 TSP - ORF34	YP_009098385	CPS - K1	Lin et al., 2014 (72)
LKA1	P. aeruginosa	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Phikmvvirus	2 TSP - Gp48	YP_001522890	LPS	Olszak et al., 2017 (73)
P22	S. enterica	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Lederbergvirus	1 TSP - TSP	NP_059643	LPS - Typhimurium-Enteritidis	Steinbacher et al., 1996 (74)
Sf6	S. flexneri	<i>Podoviridae</i>	Lederbergvirus	1 TSP - TSP	NP_958189	LPS - Y-serotipo	Chua et al., 1999 (75)
HK620	E.coli	<i>Podoviridae</i>	Lederbergvirus	1 TSP - TSP	NP_112089	LPS	Barbirz et al., 2008 (76)
Fri1	A. baumannii	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP - TSP	YP_009203054	Nd	Popova et al., 2017 (77)
AS11	A. baumannii	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP - TSP	AQN32697		
AS12	A. baumannii	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP - TSP	APW79830		
AB6	A. baumannii	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP - TSP	ALA12264.1		Lai et al., 2017 (78)
IME200	A. baumannii	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP - Dpo48	ALJ97635		Liu et al., 2019 (79)
B3	A. baumannii	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP - Gp42	ASN73401	CPS - K2	Oliveira et al., 2019 (80)
P1	A. baumannii	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP - Gp43	ASN73504	Nd	Oliveira et al., 2017 (81)
P2	A. baumannii	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP - Gp48	ASN73558		
P3	A. baumannii	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP		Nd	
N1	A. baumannii	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP		CPS-K2	

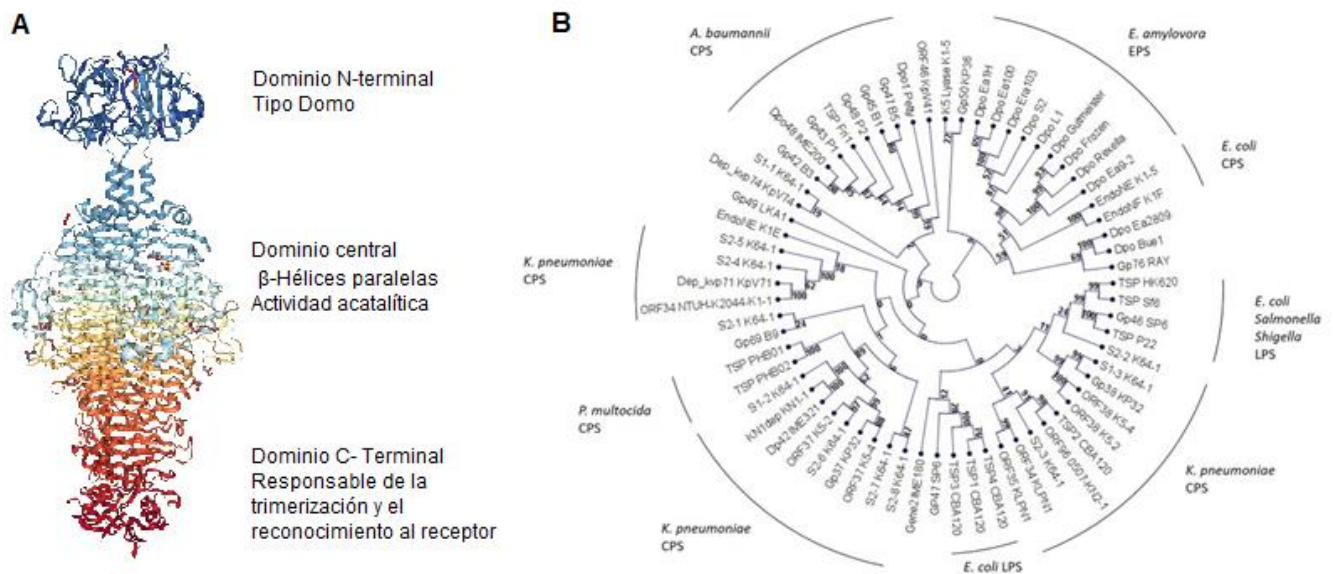
B1	A. baumannii	Podoviridae Autographivirinae	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP - Gp45	ASN73353	CPS-K9	
B2	A. baumannii	Podoviridae Autographivirinae	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP			
B4	A. baumannii	Podoviridae Autographivirinae	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP		Nd	
B5	A. baumannii	Podoviridae Autographivirinae	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP - Gp47	ASN73455	CPS-K2	
B6	A. baumannii	Podoviridae Autographivirinae	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP		Nd	
B7	A. baumannii	Podoviridae Autographivirinae	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP		Nd	
B8	A. baumannii	Podoviridae Autographivirinae	Friunasvirus (Fri1virus)	1 TSP		CPS K9	
IME180	P. aeruginosa	Podoviridae	nd	1 TSP - Gene2	ATG86239	CPS	Mi et al., 2019 (82)
KN1-1	K. pneumoniae	Podoviridae	nd	1 TSP - KN1dep	BBF66844	CPS KN1	Pan et al., 2019 (83)
KN4-1	K. pneumoniae	Podoviridae	nd	1 TSP - KN4dep	BBF66883	CPS KN4	
JA1	V. cholera	Podoviridae	nd	1 TSP	YP_009198604	LPS O139	Linnerborg et al., 2001 (84)
E15	S. enterica	Podoviridae	nd	1 TSP - (gp20)		Nd	Guichard et al., 2013 (85)
EcoO78	E. coli	Myoviridae	nd	1 TSP - Dpo42	WP_107001975	Nd	Guo et al., 2017 (86)
B9	A. baumannii	Myoviridae	nd	1 TSP Gp69	AWD93192	CPS K45/K30	Oliveira et al., 2019 (87)
0507-KN2-1	K. pneumoniae	Myoviridae	Viunavirus (Vilvirus)	1 TSP ORF96	YP_008532047	CPS KN2	Hsu et al., 2013 (88)
RAY	E. amylovora	Myoviridae	nd	1 TSP Gp76	ANH51857	EPS	Sharma et al., 2019 (89)
Fagos que codifican dos depolimerasas							
SP6	S. enterica	Podoviridae Autographivirinae	Zindervirus (SP6virus)	2 TSPs Gp46 Gp47	NP_853609 NP_853610	LPS - Typhimurium/ Enteritidis Newport /Kentucky	Gebhart et al., 2017 (55)
K1-5	E. coli	Podoviridae Autographivirinae	Zindervirus (SP6virus)	2 TSPs - EndoNE (ORF47) - K5 lyase (ORF46)	YP_654148 YP_654147	CPS K1 K5	Scholl et al., 2002(56); Leiman et al., 2007 (90)
K1E	E. coli	Podoviridae Autographivirinae	Zindervirus (SP6virus)	1 TSP - EndoNE (ORF47)	YP_425013	CPS K1 K5	Stummeyer et al., 2006 (58); Leiman et al., 2007 (90)
K5	E. coli	Podoviridae Autographivirinae	Zindervirus (SP6virus)	1 TSP - KfIA	CAA71133.2	CPS K5	Thompson et al., 2010 (60)
K5-2	K. pneumoniae	Podoviridae Autographivirinae	Przondovirs (KP32virus)	2 TSPs ORF37 ORF38	APZ82804 - APZ82805	CPS, K5 K30, K69	Hsieh et al., 2017 (59)
K5-4	K. pneumoniae (KP32virus)	Podoviridae Autographivirinae	Przondovirs (KP32virus)	2 TSPs ORF37 ORF38	APZ82847 - APZ82848	CPS K5	Hsieh et al., 2017 (59)

KP32	<i>K. pneumoniae</i> (KP32virus)	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Przondovirus (KP32virus)	2 TSPs KP32gp37 Kp32gp38	YP_003347555 YP_003347556	CPS K3 K21	Majkowska-Skrobek et al., 2018 (61)
IME321	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Przondovirus (KP32virus)	1 TSP Dp42	AXE28435	CPS - KN1	Wang et al., 2019 (62)
KN3-1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	nd	2 TSPs - KN3dep KN56dep	YP_009818027 - BBF66868	CPS KN3 KN56	Pan et al., 2019 (91)
KpV41	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Drulisvirus (KP34virus)	2 TSPs ORF46 ORF55	ALO80736 ALO80745	CPS K1 ND	Solovieva et al., 2018 (92)
KpV71	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Drulisvirus (KP34virus)	1 TSP Dep_kv71	AMQ66478	CPS - K1	
KpV74	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Podoviridae</i> <i>Autographivirinae</i>	Drulisvirus (KP34virus)	2 TSP Dep_kv74	APZ82768	CPS - K2	
KLPN1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Siphoviridae</i> <i>Tunaviridae</i>	Webervirus (T1virus)	2 TSPs ORF34 ORF35	YP_009195373 YP_009195375	CPS - K1	Hoyles et al., 2015 (65)
KP36	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Siphoviridae</i> <i>Tunaviridae</i>	Webervirus (T1virus)	1 TSP - Gp50	YP_009226010	CPS - K63	<u>Majkowska-Skrobek et al., 2016</u> (93)
Fagos que codifican para múltiples depolimerasas							
CBA120	<i>E. coli</i>	<i>Ackermannviridae</i> <i>Cvivirusinae</i>	Kutternvirus	4 TSPs TSP1	AEM91896	LPS	Plattner et al., 2019 (66)
	<i>S. enterica</i>			TSP2	AEM91897	<i>S. Minnesota</i>	
				TSP3	AEM91898	<i>E. coli</i> O157	
				TSP4	AEM91899	<i>E. coli</i> O77	
K64-1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Myoviridae</i>	Alcyoneusvirus	11 TSPs		CPS	Pan et al., 2017 (83)
				S1-1	BAW85694	K11	
				S1-2	BAW85692	KN4	
				S1-3	BAW85693	K21	
				S2-1	BAW85695	KN5	
				S2-2	BAW85696	K25	
				S2-3	BAW85697	K35	
				S2-4	BAW85698	K1	
				S2-5	BAQ02780	K64	
				S2-6	BAW85699	K30, K69	
				S2-7	BAW85700	Nd	
				S2-8	BAW85701	Nd	

Tomado de Knecht LE, Veljkovic M, Fieseler L. 2020 (26) y actualizado a la fecha TSP: Proteína de la punta de la cola; CPS: Polisacárido capsular, LPS: Lipopolisacárido; EPS: exopolisacárido; GP u ORF: Posición del CDS de que codifica para la proteína; K(#): sustrato capsular; nd; no registra datos.

En términos generales, las Dpo son enzimas muy estables a altas temperaturas y en condiciones de acidez debido a su estructura terciaria de homotrímero (ver Figura 4a), característica muy importante a la hora de evaluar estas enzimas para una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas (57,61,62,80). El análisis filogenético de las enzimas Dpo de múltiples fagos revela que éstos tienden a agruparse más por su afinidad por el sustrato, que por la familia del bacteriófago del cual derivan (ver **figura 4b**), demostrando que a pesar de la variedad de sustratos sobre los cuales éstas pueden actuar, cada Dpo mantiene su especificidad al sustrato más no a la bacteria hospedadora, lo que le da aún un mayor rango de aplicaciones biotecnológicas.

Figura 4. Modelamiento de la Gp28 de BaqKPR2 y análisis filogenético de las depolimerasas descritas



Tomado y modificado de Latka Et. al 2019 y Knecht et al. 2020 (26,57) respectivamente. **A.** Estructura modular de la proteína TSP del bacteriófago P22 de Salmonella (PDB ID 2XC1). **B.** Análisis filogenético de la proteína TSP codificado por bacteriófagos.

3. OBJETIVOS

General.

Determinar el mecanismo molecular de acción de las enzimas depolimerasas de los bacteriófagos vB_KpnP_BaqKPR2 de *K. pneumoniae* y vB_SauS_BaqSau1 de *S. aureus*.

Específicos:

1. Caracterizar microbiológicamente y molecular los bacteriófagos de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* aislados de aguas residuales.
2. Establecer modelos *in-silico* de las depolimerasas de BaqSau1 y BaqKPR2.
3. Determinar un mecanismo de acción de las depolimerasas mediante docking molecular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Aislamiento y caracterización de los bacteriófagos BaqSau1 de *Staphylococcus aureus* y BaqKPR2 de *Klebsiella Pneumoniae*.

4.1.1 Aislamiento de bacteriófagos de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

- **Cepas bacterianas y medios de cultivo**

Para todos los experimentos de aislamiento, purificación y propagación de los bacteriófagos se utilizó la cepa RN4220 como hospedador bacteriano de *S. aureus* descrita por Kumar G., et al. 2012 (94) como libre de profagos la cual fue donada por el laboratorio de microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico de la Universidad de Córdoba, y *K. pneumoniae* 033 la cual es un aislamiento clínico con perfil de resistencia BLEE (Betalactamasa de espectro extendido). Todos los ensayos se realizaron partiendo de un inóculo de 0.6_{OD600nm} en los medios de cultivo Tripticasa de Soya (TS) suplementado con 0.05 mM MgSO₄ para *S. aureus* y Luria Bertani (LB) suplementado con 10 mM CaCl₂.

- **Obtención y tratamiento de las muestras de aguas residuales**

Para el aislamiento de los bacteriófagos se tomaron 6 muestras de agua residuales (aproximadamente 250 ml) en varias localidades de los municipios de Barranquilla, Cartagena y Sahagún - Córdoba. De los cuales se obtuvieron 2 bacteriófagos para *S. aureus*, 1 para *K. pneumoniae*, 1 para *K. oxytoca* y dos para *E. coli*, los bacteriófagos fueron nombrados inicialmente con la inicial de Barranquilla y el hospedador de origen así, los fagos de *S. aureus* (BaqSau1 y BaqSau2), el de *K.*

pneumoniae (BaqKPR2); el de *K. oxytoca* (BaqKoxI) y los de *E. coli* (BaqEcoA y BaqEcoB).

Las muestras colectadas fueron filtradas de forma separada mediante una membrana PVDF de 0.22 μm (Opticap® XL4, Millipore) para remover células bacterianas y otros contaminantes. Cada muestra se cultivó con su hospedador para el aislamiento de los bacteriófagos, lo que se conoce como cultivo primario de bacteriófagos (CPB). El CPB se realizó mezclando 5 ml de la muestra de agua y 5 ml del subcultivo respectivo preparado a partir de un cultivo de 24 horas en una proporción 1:10 (0.5 ml de inóculo x 5 ml de caldo). El CPB se incubó por 24 horas en shaker a 180 RPM y 37°C. Pasado este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 12000 x g por 10 minutos a 4°C y se colectó el sobrenadante, nuevamente se filtró para eliminar células bacterianas y se procedió a la obtención de placas de lisis.

- **Obtención de placas de lisis y aislamiento de bacteriófagos**

La presencia de placas de lisis en los cultivos hospedadores indica la presencia de bacteriófagos en las muestras, para ello se realizaron cultivos por la técnica de doble capa agarizada (95) tomando 3 ml de top agar de TS o LB según el caso [0.6% de agar] suplementado con MgSO_4 o ClCa_2 mezclado con 100 μL de la muestra de agua y 100 μL de un inóculo ($0.6_{\text{OD}600\text{nm}}$) previa incubación antes de mezclar con el medio top agar y luego se incubó durante 24 horas a 37°C.

- **Propagación, titulación y concentración de bacteriófagos**

Las placas de lisis obtenidas fueron colectadas por separado con base en el análisis morfológico de éstas, picando el agar y se suspendieron en 200 μL de Buffer de

fagos (10 mM de TRIS-HCl pH 7.5, 10 mM MgSO₄, 5 mM CaCl₂). Se procedió a hacer la determinación del título de unidades formadoras de placas (UFP) para cada una de las placas de lisis colectada. Para ello se realizaron diluciones seriadas en el orden de 10 de la muestra colectada de las UFP y se procedió a la obtención de placas de lisis mediante el método descrito anteriormente con cada una de las diluciones.

El cálculo de las UFP obtenidas se hizo con base en la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/mL} = \frac{\text{Número de Placas de lisis}}{\text{Vol. Inóculo x dilución}}$$

Ya determinado el número de UFP por mililitro se procedió a hacer la propagación de los bacteriófagos y posterior concentración, esto con el fin de garantizar muestras con gran cantidad de partículas virales para ensayos de microscopía y extracción de ADN fágico. Para ellos, se tomó la muestra con el título más alto, de modo que en el cultivo se logre obtener una cantidad de placas de lisis confluentes, que semejen una telaraña. Para esto se utilizó el método de doble capa agarizada por triplicado y se cultivaron por 24 horas a 37°C. Al día siguiente las cajas de Petri fueron bañadas con 5 mL de buffer de fagos y se dejaron a 50 RPM por 30 minutos. Al cabo de este tiempo se realizó un raspado del top agar y se colectó el buffer y los restos del medio en un tubo Falcón de 50 mL, este se mezcló vigorosamente en vórtex por 1 minuto y se centrifuga a 5000 RPM con el fin de eliminar los restos de medio y bacteria y filtrado usando membranas de PVDF de 0.22 µm (Millipore).

El lisado de bacteriófagos obtenido se separó en alícuotas de 1 mL y se evaluó nuevamente el título viral. Las muestras con títulos superiores a 1×10^9 fueron seleccionadas para realizar la concentración de bacteriófagos para el análisis microscópico y de secuenciación.

La concentración de las partículas virales se realizó tomando aproximadamente 15 ml de lisado de fago fresco (menor de 24h) con un título aproximado de 1×10^{10} para los bacteriófagos aislados, a esta solución se le adicionó mix de nucleasas [0.08 mg/ml] y se colocó 30 minutos a 37°C, luego se centrifugó a 16.000 x g por 1 hora a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet al aire para luego ser resuspendido en 100 µL de Buffer TE.

- **Determinación del rango de infección**

El ensayo de rango de infección es una prueba que permite evaluar la capacidad del bacteriófago de infectar distintos hospedadores bacterianos y por ende ofrece información útil en la toma de decisiones para la selección de los mejores candidatos para su uso en la terapia de fagos o sus derivados, el cual es el principal objetivo del estudio.

Para evaluar el rango de infección de los bacteriófagos se utilizaron distintas cepas y aislados clínicos de *Staphylococcus spp* y de *Klebsiella spp*. tanto sensibles como resistentes a antibióticos, estas se describen en la **tabla 2**.

Tabla 2. Cepas utilizadas en el ensayo de Rango de huésped.

Cepa	Tipo	Fenotipo (Perfil de resistencia)	Característica destacada	Referencia
USA300	Aislamiento clínico	MRSA	Clon comunitario	Lozano-Solano D. Et. al 2010. (11)
Sccmec II	Aislamiento clínico	MRSA	Clon clínico	Mato R. Et. al. 1998 (96)
Clon Ibérico				
Clon Brasileiro	Aislamiento clínico	MRSA		Gómez AR. Et.al 2001. (97)
SCCMEC Iva				
Sccmec Ivb				
NCTC 8325	De referencia	MSSA		NCBI: txid 93061
ATCC ®29213™	De referencia	MSSA		NP (colección propia CICV Universidad Simón Bolívar).
<i>S. epidemidis</i>	Aislamiento clínico	Sensible		
<i>S. saprophyticus</i>	Aislamiento clínico	Sensible		
<i>K. pneumoniae 033</i>	Herida quirúrgica	CEP, CRO, CAZ, GEN (I), SAM, NIT (I), AMP, CXM	BLEE +	
<i>K. pneumoniae L</i>	Orina	AMK, CEP, CRO, MEM, CAZ, GM, CIP(I), SAM, NIT (I), AMP, CXM, SXT, ETP		
<i>K. pneumoniae 05B</i>	Orina	CEP, CRO, CAZ, GM, CIP, SAM, NIT, AMP, CXM, SXT		
<i>K. pneumoniae 074</i>	Orina	AMK, CEP, CRO, CAZ, GEN (I), SAM, AMP, CXM, SXT		
<i>K. pneumoniae 272</i>	Secreción de herida	Sensible		
<i>K. pneumoniae 1</i>	Orina	AMK, CEP, CRO, MEM, CAZ, CIP, SAM, NIT, AMP, CXM, SXT, ETP,	BLEE +, KPC +	
<i>K. oxytoca</i>	Orina	CEP, CRO, CAZ, GEN, SAM, AMP, CXM, SXT	BLEE +	

Siglas de los antibióticos según WHONET (98): AMK; Amikacina; AMP: Ampicilina; CAZ: Ceftazidima; CEP: Cefalotina; CIP: Ciprofloxacina; CRO: Ceftriaxona; CXM: Cefuroxima; ETP: Ertapenem; GEN: Gentamicina; MEM: Meropenem; NIT: Nitrofuratoína; SAM: Ampicilina-sulbactam; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazol; BLEE: Betalactamasa de espectro extendido; KPC: Carbapenemasas; (I): Resistencia intermedia; NP: No publicado

Este ensayo se realizó mediante la técnica de goteo o también conocida como spot test según Hyman P. 2019 (99). Para esto, se tomó un inóculo de 100 μ l de cada cepa a evaluar descritas en la **tabla 2**, en una concentración de 0.6_{OD600nm} y 3 ml de top agar y se realizó una siembra en doble capa agarizada y se realizó la inoculación con 5 μ l de cada uno de los bacteriófagos por separado en diluciones seriadas en el orden de 10 partiendo de la muestra concentrada de los bacteriófagos. Luego que el medio absorbiera el inóculo, se dejó incubando durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente, se verificó la ausencia o presencia de UFP en las zonas donde se realizó la inoculación de los fagos.

- **Análisis estadístico**

Para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las distintas temperaturas evaluadas se realizó una prueba de ANOVA de un solo factor para cada una de sus variables, tiempo y temperatura y un ANOVA de dos vías para ambas variables en conjunto, para evaluar si cumplen con un modelo aditivo o multiplicativo. En cuanto a los datos de pH y MOI se realizó una prueba de ANOVA de un solo factor para determinar diferencia significativa entre los resultados obtenidos. Todas las pruebas de ANOVA se realizaron con un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$) y con el programa R (100)

4.1.2 Caracterización morfológica.

Se tomaron 10 μ L de la muestra purificada para realizar el montaje para microscopía por tinción negativa con acetato de uranilo al 2% en celdillas de cobre. El montaje y la visualización fueron realizados en el Laboratorio de Microscopía Especializada de

la Universidad de Antioquia como lo describe Ackermann H. 2009 (95). La microscopía se realizó en un equipo Tecnai F20 Super Twin TMP de magnificación máxima 1.0 MX en TEM. El análisis se realizó mediante el Software Gatan Microscopy Suite por medio del cual se tomaron las medidas de la longitud de la cápside, de la longitud y ancho de la cola.

La determinación del morfotipo se determinó con base en las recomendaciones de Ackermann H. 2009 (95), las características de la cápside y de la cola, los criterios para la clasificación morfológica de los bacteriófago se muestran en la **tabla 3**.

Tabla 3. Criterios de clasificación de bacteriófagos de familia Caudovirales según Ackerman H. (101).

Criterio	Parámetro	Nivel Max. de discriminación	Myoviridae	Podoviridae	Siphoviridae
Morfológico	Tamaño de la cápside	Familia	110nm	60 nm	60 nm
	Simetría de la cápside	Familia	Ligeramente Alargada	Icosaédrica	Icosaédrica: B1 Alargada: B2
	Característica de la Cola	Género	Cola contráctil	Cola corta	Cola Larga no contráctil, flexible
	Virulento o temperado	Género y especies	Virulento	Temperado	Virulento/ Temperado
Genómico	DNA, RNA, ss, ds	Familia	dsDNA	dsDNA	dsDNA
	Linear, circular	Familia	Lineal	Lineal	Lineal
	Peso Molecular	Especies	33-244 kb	40-42 kb	~50 kb
	%G+C	Especies	~35%.	~50%	~52%
	# de genes promedio	Especies	~100	~55	~70
	Presencia de tRNA		Sí	No	Sí
	Circularización del ADN	Género	Sí	Sí	Sí

4.1.3 Determinación del Índice de Multiplicidad (MOI)

Se evaluaron 8 concentraciones fago/bacteria de 0,0001 a 1000. El protocolo y las diferentes MOI evaluadas en el presente trabajo se determinaron teniendo en cuenta los protocolos descritos por Zhang *et al.* 2017 (102) y Kwiatek *et al.* 2011 (103). Las concentraciones de fago y bacteria utilizadas para cada multiplicidad de infección se muestran en la **tabla 4**.

Tabla 4. Parámetros usados para la determinación de MOI óptima. Se muestran los títulos virales y la concentración bacteriana utilizada en cada MOI analizada.

M.O.I.	Título de fago (UFP)	Título bacteria (UFC)
0,0001	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^8$
0,001	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^8$
0,01	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^8$
0,1	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$
1	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
10	$1,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^8$
100	$1,0 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^8$
1000	$1,0 \times 10^{11}$	$1,0 \times 10^8$

De cada uno de los lisados fágicos con diferentes títulos se tomaron 100 μ L y se mezclaron con 100 μ L de bacteria hospedadora en fase exponencial en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C para permitir el proceso de adsorción. Inmediatamente, cada microtubo fue centrifugado a 10.000 x g durante 10 minutos para separar los fagos que no lograron adsorberse a las células bacterianas; las bacterias, con los fagos adheridos, quedaron en el pellet. De esta manera, el sobrenadante se descartó y el pellet fue resuspendido con 1 mL de caldo LB e incubados a 37 °C durante 4 horas. Después de la incubación, se realizó la titulación de cada tubo con el método ya descrito. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las MOI evaluadas.

4.1.4 Caracterización genómica de BaqSau1 y de BaqKPR2.

- **Extracción de ADN genómico**

La extracción de ADN se realizó utilizando Purelink™ Viral RNA/DNA Mini Kit de Invitrogen a partir de una alícuota de 200 µL con un título del fago concentrado de 3.8×10^8 y 1.5×10^{15} respectivamente, como se explicó previamente.

La muestra primero fue tratada con DNasa I [0.5 mg/ml] durante 30 minutos a 37°C para eliminar el ADN no encapsulado que podría contaminar la muestra. Al final se obtuvo alícuota de 50 µL de ADN a una concentración de 21.6 ng/µL para BaqSau1 y de 90.4 ng/µL para BaqKPR2. La determinación de la concentración se realizó en Nanodrop™ 2000 de Thermo Scientific®, las muestras fueron conservadas en buffer TE a -20°C.

- **Secuenciación de genoma completo**

Una alícuota de 50 µL fue enviada para su secuenciación al laboratorio ACGT, Inc. (USA). Posterior a la validación de la concentración de ADN mediante ensayo fluorométrico Qubit™ fluorometer de Life Technologies, la muestra de ADN fue fragmentada por ultrasonificación a un tamaño promedio de 550bp, con los cuales se construyó una librería de secuenciación usando el kit NEXTflex™ Rapid DNA Sequencing siguiendo las instrucciones del fabricante. Las librerías fueron evaluadas nuevamente mediante Qubit™ fluorometer de Life Technologies usando High Sensitivity kit DNA para Qubit™. También se evaluó mediante Agilent 2100 Bioanalyzer usando el Kit DNA Agilent High Sensitivity. Mediante el equipo BluePippin size selection de Sage Science se seleccionaron fragmentos de DNA

entre 500 y 750 pb de longitud y evaluados nuevamente mediante Qubit™ fluorometer y Agilent 2100 Bioanalyzer. Las librerías del tamaño seleccionado se colocaron en la celda de flujo MiSeq 600 cycle-PE v3 kit de Illumina, Inc., para generar al menos un millón de lecturas PE300 de la muestra usando PhiX Control v3 Kit de Illumina, Inc., con una cobertura final de 86,2X para BaqSau1 y 196.3X para BaqKPR2. Los archivos resultantes con las lecturas crudas fueron enviados por el laboratorio en formato Fastq para posteriores análisis.

- **Ensamblado *de novo***

Se ejecutaron dos pipelines por separado para el proceso de ensamblado *de novo*. En primer lugar, el laboratorio que prestó el servicio de secuenciación realizó un análisis bioinformático y al finalizar fue recibido un archivo en formato fasta con la secuencia del conting obtenido. Por otro lado, se realizó el proceso de ensamble y anotación en el laboratorio de Biología computacional y ecología microbiana de la Universidad de los Andes en la Ciudad de Bogotá, Colombia para obtener una secuencia del conting final, luego ambas secuencias fueron alineadas con el fin de obtener una secuencia consenso de alta confianza y por medio de un análisis de calidad de ambos ensambles se determinó la que representaba una mejor calidad. Ambos procesos implementaron las siguientes tareas en orden: **1.** Determinación del control de calidad, el cual debía ser $QC \geq 30$ mediante FasQC; **2.** Eliminación de adaptadores de secuenciación mediante Trimmomatic; **3.** Ensamblaje *de novo* mediante SPAdes con diferencias en los valores de $Kmers_{max}$, para la primera tubería fue de 77 y para la segunda de 127 y **4.** Validación del ensamble mediante BLASTn y QUASt, los pipelines empleados en cada una de las tuberías de trabajo por separado se enumeran en **tabla 5**.

Tabla 5. Pipelines de ensamble, validación y anotado de los genomas.

Proceso	Pipeline	Herramienta Bioinformática usada	Parámetros
QC	1. ACGT.Inc. Laboratory	Bcl2fastq 2.16	Average Quality Cutoff: 30
	2. BCEM – Uniandes	FastQC v0.11.5	
Eliminación de adaptadores	1. ACGT.Inc. Laboratory	Trim Galore v0.4.1 (104)	TruSeq2 (PE for MiSeq- HiSeq) Minimum Read Length: 50 ILLUMINACLIP: 2:30:10 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW: 4:20 MINLEN:20
	2. BCEM - Uniandes	Trimmomatic v0.36 (105)	Minimum Read Length: 50 ILLUMINACLIP: 2:30:10 TRAILING:5 SLIDINGWINDOW: 5:21 MINLEN:35
Ensamble	1. ACGT.Inc. Laboratory	SPAdes v. 3.9.0 (106)	Minimum Kmer Length: 21 Maximum Kmer Length: 77 Step size: 20 Minimum Contig Length: 200 Validation Aligner: Bowtie 3
	2. BCEM - Uniandes	SPAdes v3.11.1(106)	Minimum Kmer Length: 21 Maximum Kmer Length: 127 Step size: 20 Minimum Contig Length: 200 Validation Aligner: Bowtie 1
Validación de ensamblado		Galaxy-CPT Assembler (QUAST V. 5.0.2) (107)	MODE: default Threads: 1 Minimum contig length: 500 Minimum alignment length: 65 Ambiguity: one Threshold for extensive misassembly size: 1000

- **Determinación de los terminales genómicos y el tipo de empaquetamiento en BaqSau1 y BaqKPR2.**

La terminación del genoma y la estrategia de empaquetamiento se determinaron utilizando PhageTerm (108) mediante la plataforma Galaxy-CPT utilizando los

siguientes parámetros: Paired reads; Seed: 20; Peak: 20; Cov: 250. Esta herramienta identifica acumulaciones de lectura como indicador de extremos de fragmentos sobrerrepresentados tomando como input las lecturas de FastQ del genoma ensamblado.

PhageTerm utiliza la cobertura de posición inicial (SPC) y la cobertura en cada orientación (COV) para calcular $T = SPC/COV$ en cada dirección para cada nucleótido. Esta métrica se utiliza para determinar la ubicación de las terminaciones genómicas y clasificarlos como uno de los siguientes: 5' cos, 3' cos, de repetición terminal directa (DTR) (corta), DTR (larga), De cabeza llena o headfull, en inglés que puede ser con o sin sitio *pac* detectado, tipo Mu (similar al Fago Mu) o desconocido. En el caso en el que el programa no logre determinar el tipo de empaquetamiento y la terminación del genoma por la ausencia de una terminación biológica consistente, como en el caso de fagos permutados circularmente, el sitio de inicio se selecciona en función de la presencia y la orientación de los genes terminasa, como lo indican Philipson C. Et. al 2018 (109).

- **Anotación de los Genomas.**

Se utilizaron tres llamadores de genes comúnmente usados para la anotación de genomas de fagos RAST (Rapid Annotation Using Subsystem Technology) (110) el cual realiza una anotación con base en un genoma de referencia, en este trabajo se utilizó PhiETA2 (Tax. ID: 326036) que presenta una homología del 97% con BaqSau1 identificada mediante BLAST (111), Mientras que para BaqKPR2 se utilizó el bacteriófago *Klebsiella* phage F19 (Tax.ID 1416011) con una homología del 95%.

Por otro lado, mediante la plataforma Galaxy-CPT se realizó la anotación utilizando los programas PHANOTATE V. RC1 (112) y GLIMMER3 (V. 0.2) (113) para ambos fagos. Estos últimos por su parte programas realizan el anotado teniendo en cuenta bases de datos especializadas en bacteriófagos, GLIMMER utiliza modelos ocultos de Márkov, mientras que PHANOTATE no utiliza ninguna referencia, sino que realiza búsquedas de similitud de secuencias de gran volumen con base en las proteínas predichas utilizando el algoritmo de Bellman-Ford (112). Los parámetros específicos utilizados en cada programa se muestran en la **tabla 6**.

- **Validación de la anotación del genoma.**

Después de resolver los extremos y establecer la orientación del genoma, se validó la calidad de la anotación final, con el objetivo de garantizar que estuviera bien respaldada por los datos de secuenciación. La validación del ensamblaje se realizó en la plataforma Galaxy-CPT utilizando en programa PhageQC (V.1.9.0) (114) con la configuración predeterminada. Esta herramienta permite evaluar los siguientes aspectos: RBSs faltantes, características de genes perdidos, gaps excesivos, sobreposición excesiva, Morones y codones de inicio extraños. Para la validación de la anotación se consideraron tres métricas: un score de lecturas >85%, una cobertura promedio >90% y un índice de gaps y sobreposición bajos.

Tabla 6. Pipelines utilizados para la anotación de los genomas

Proceso	Herramienta bioinformática	Parámetros utilizados
Anotación	RASTtk (V.2.0)	Virus domain; código genético 11)

		PhiETA2 (taxonomy: 326036) Para BaqSau1 Klebsiella phage F19 (Tax.ID 1416011) para BaqKPR2b
	Galaxy-CPT (PHANOTATE V. RC1)	C.start = {ATG, GTG, TTG} C. stop = {TAA, TAG, TGA} minimum length ORF=90pb
	GIIMMER3 (V. 0.2)	Max. Overlap gen= 0 Min.Gene Length=110 Threshold Score for call=30

- **Determinación del ciclo de vida**

Los genomas completos se enviaron a PHAge Search Tool Enhanced Release (PHASTER) (115) de Alberta University para identificación de genes de integrasa y la compara con las secuencias de profagos reportados en el repositorio de virus de NCBI (National Center of Biotechnology Information). Este análisis produce una puntuación estadística que predice la probabilidad de que un fago sea propenso a un ciclo de vida templado o lítico. Una puntuación de 150 indica que corresponde a un profago.

- **Identificación de genes especiales.**

Se realizó un control para la identificación de genes especiales de factores de virulencia, genes de resistencia a antimicrobianos, islas de patogenicidad u otros genes implicados en la patogénesis de *S. aureus* y de *K. pneumoniae*, esto es importante determinarlo para definir la utilidad que pueda tener un bacteriófago o sus derivados para fagoterapia. Para esto se utilizaron los programas Resistance Gene Identifier (RGI) v3.1.1 (116), el cual realiza una búsqueda en la base de datos curada CARD (Curated Antimicrobial Resistance Database). Por su parte, también se realiza una búsqueda de elementos genéticos móviles e islas de patogenicidad mediante MobileElementFinder v.1.0.5 (117), este programa realiza una búsqueda

por homología de factores de virulencia de bacterias patógenas (VFDB). Por otro lado, las secuencias codificantes que no arrojaron ninguna función predicha fueron analizados mediante HHpred (118) que permite realizar una detección de proteínas homólogas, motivos o dominios de proteínas, mediante la predicción de la estructura secundaria. Para todas estas herramientas se utilizaron los parámetros predeterminados.

4.1.5 Análisis de genómica estructural y funcional.

Las predicciones de genes y la anotación funcional *de novo* se realizó mediante 3 enfoques distintos 1. RASTtk, 2. GLIMMER y 3. PHANOTATE, los dos últimos se realizaron a través de la plataforma Galaxy-CPT. Se realizaron comparaciones de las coordenadas de los sitios de inicio y finalización para cada gen teniendo en cuenta los resultados de los tres enfoques para hacer un consenso y realizar la anotación manual conforme a lo sugerido por Turner D. Et. al 2021 (119). La secuencia de cada uno de los genes establecidos se consultó mediante BLAST y se consideraron aquellos cuya identidad superara el 50% con otros ya predichos.

Las secuencias codificantes sin función definida se analizaron mediante el predictor de función proteica HHpred, el cual permite realizar una detección de proteínas homólogas, así como de los dominios o motivos de aminoácidos que permitan establecer una función hipotética de estas secuencias, ya que HHpred realiza la predicción de la estructura secundaria y un alineamiento con proteínas de la cual se tiene información cristalográfica.

Con la información de los genes predichos del consenso de los anotadores usados y el análisis por HHpred se construyó una matriz de anotación en Excel teniendo en cuenta las siguientes características: El número de cada secuencia codificante

(CDS), la posición de inicio y de parada, el codón de inicio y de parada, la hebra de posición de la secuencia codificante, el tamaño de los CDS en nucleótidos (pb), en aminoácidos (aa) y de la proteína codificada en kDa, la función predicha de la proteína y la hipotética, proteínas homólogas en otros organismos, el porcentaje de homología (aa) y el E-value.

Los genomas se visualizaron mediante el aplicativo Easyfig versión 2.1 (120), el cual permite observar las secuencias codificantes y la sinténia con otros bacteriófagos. Con base en la función de los CDS, el genoma se organizó en módulos y se le asignó un color para su visualización en el gráfico, como se describe a continuación:

- Módulo de genes estructurales y ensamblaje del Virión: Se distinguen en el gráfico con el color MORADO. En este módulo encontramos secuencias que codifican para componentes importantes en la formación del virión como terminasa, portal, cápside, proteínas de maduración, proteínas de empaquetamiento, proteína conectora de cabeza y cola y proteínas de la cola.
- Módulo de genes relacionado con la replicación del DNA: Se distinguen en el gráfico con el color AZUL e incluye DNA polimerasas, primasa, helicasas, entre otras.
- Módulo de genes relacionados con la regulación del ciclo de vida: Se distinguen en el gráfico con el color VERDE e incluye varios reguladores, represores y activadores de la integrasa y factores de recombinación direccional, etc.

- Módulo de genes relacionados con la lisis: Se distinguen en el gráfico con el color AMARILLO, incluye endolisinas y holinas.
- Genes especiales: Se distinguen en el gráfico con el color NARANJA, incluye algunas secuencias que codifican factores de virulencia o resistencia, como islas de patogenicidad, toxinas, peptidasas, etc., y que podrían estar implicados en la transferencia horizontal por transducción hacia la bacteria hospedadora.
- Genes con función no descrita o desconocida: Se distinguen en el gráfico con el color GRIS.

4.1.6 Análisis de genómica comparativa

Se realizó el análisis de genómica comparativa para ambos bacteriófagos mediante el cálculo de identidad de nucleótidos promedio (ANI) (121) tomando como base genomas representativos de cada una de las familias de bacteriófagos de hospedadores del género *Staphylococcus* para un total de 23 genomas y de *Klebsiella* 18 genomas, los cuales se encuentran depositados en la base de datos del International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) a fecha de diciembre de 2023 como se muestra en la **tabla 7**.

La identidad promedio de nucleótidos (ANI) es un poderoso criterio basado en el contenido nucleotídico del genoma, éste es sugerido como la mejor alternativa para la identificación de especies en virus procarióticos, este programa realiza el cálculo de la identidad media de todos los valores que muestran un promedio de identidad del 30% sobre una región alineada de al menos el 70% de la longitud. Este programa

genera dendogramas de agrupamiento jerárquico con base en la correlación de distancia de Pearson, los resultados de homología se muestran en color rojo cuando es superior al 75% y en azul cuando es inferior a 65%. El límite ANI sugerido para la delimitación de especies es del 95% según Yoon S, Ha S, 2017 (121).

Por otra parte, se construyeron los árboles filogenéticos con base en los genomas enlistados en la **tabla 7** mediante la plataforma Virus Classification and Tree Building Online Resource (VICTOR) (122) con base en la alineación múltiple realizada mediante ClustalW y los árboles filogenéticos se realizaron con el método Neighbor-Joining y un valor de Bootstrap de 100. Los genomas y sus características se muestran en la **tabla 7**.

Tabla 7. Genomas usados en el análisis de genómica comparativa.

Genero hospedador	Nombre Fago	RefSeq	Tamaño (Kb)	GC%	Genes	Tipo	Género	% Homo
<i>Staphylococcus</i>	Phi11	NC_004615.1	43.6	34.5	53	Sypho	Dubowvirus	96.17
	PhiETA2 *	NC_008798.1	43.27	34.3	69	Sypho		97.16
	phiNM1	NC_008583.1	43.13	34.2	64	Sypho		96.90
	Phi_69	NC_007048.1	42,73	34,3	69	Sypho		95.81
	Phi_53	NC_007049.1	43,88	34,1	74	Sypho		95.59
	Phi_85	NC_007050.1	44,28	34,6	71	Sypho		97.05
	CNPH82	NC_008722.1	43,42	34,7	65	Sypho		92.73
	Phi_IPLA5	NC_018281.1	43,58	34,7	67	Sypho		80.11
	Phi_IPLA88	NC_011614.1	42,53	34,9	61	Sypho		92.06
	Phi_PH15	NC_008723.1	44,04	34,9	68	Sypho		73.15
	phiMR25	NC_010808.1	44,34	34,3	70	Sypho		95.85
	PhiNM2	NC_028913.1	43,15	34,6	66	Sypho		96.39
	Phi_SAP26	NC_014460.1	41.21	34.0	63	Sypho		95.56
	SepS_SEP9	NC_023582.1	92.42	29.6	130	Sypho	Sextavirus	00.0
	Phi_6ec *	NC_024355.1	93.79	29.3	143	Sypho		00.0
	Phi_IPLA35	NC_011612.1	44.97	33.3	49	Sypho	Triavirus	86.49

	Phi_3A *	NC_007053.1	43.1	33.5	67	Sypho	Peeveelvirus	89.73
	Phi42e	NC_007052.1	45,86	33,7	79	Sypho		97.85
	Phi47	NC_007054.1	44,78	33,5	65	Sypho		93.06
	phi_12	NC_004616.1	44,97	33,3	49	Sypho		93.06
	Phi_SLT	NC_002661.2	42,94	33,3	61	Sypho		96.24
	108PVL	NC_008689.1	44.86	33.5	59	Sypho		96.35
	Phi_77	NC_005356.1	41.71	33.5	69	Sypho		89.99
	Phi_13	NC_004617.1	42.72	33.5	49	Sypho		83.37
<i>Klebsiella</i>	AltoGao	MF612071.1	43.01	53.9	53	Podo	Drulis	95.3
	F19	NC_023567.2	43.7	53.8	51	Podo		94.8
	KP34	NC_013649	43.8	54	57	Podo		90.4
	myPSH1235	MG972768.1	45.1	53.6	49	Podo		93.1
	KP2	NC_028664	43.96	52.7	58	Podo		93.7
	KpV41	NC_028670.1	44.2	53.9	55	Podo		90.2
	SU503	NC_028816.1	43.80	53.7	54	Podo		87.9
	SU552A	NC_028870.1	43.59	54.1	54	Podo		90.4
	KP-Rio2015	NC_047748.1	43.55	54.1	47	Podo	Przondovirus	87.9
	K5	NC_028800.1	41.69	52.5	46	Podo		0
	KP32	NC_013647.1	41.1	52.3	43	Podo	Slopekvirus	0
	JD001	NC_020204.1	48.8	48.5	68	Myo		0
	Matisse	NC_028750.1	176.08	41.7	280	Myo		0
	KP27	NC_020080.1	174.41	41.8	299	Myo		0
	kP15	NC_014036.1	174.43	41.8	234	Myo		0
	Miro	NC_041981.1	176.05	41.7	277	Myo		0

* Genomas tipo por géneros según el ICTV.

4.2. Caracterización *in silico* de las depolímerasas de los bacteriófagos BaqSau1 y BaqKPR2.

4.2.1 Determinación de la estructura primaria y secundaria de las depolimerasas de los bacteriófagos BaqSau1 y BaqKPR2

- **Identificación de la endolisina de BaqSau1 y el dominio catalítico CHAP**

Con base en la caracterización genómica se determinó que BaqSau1 presenta dos lisinas asociadas correspondiente a los CDS 23, la cual es una Lisina asociada al virión (VALs) y el CDS 27, la cual corresponde a la endolisina, la cual conforma el

casete lítico junto con la enzima holina correspondiente al CDS 26. Sin embargo, para el objeto de este trabajo se escogió continuar caracterizando la endolisina.

Tomando como input de partida la secuencia aminoacídica correspondiente al CDS 27, predicha por el anotador utilizado en la caracterización genómica como la endolisina de BaqSau1, se analizó mediante el software Phyre2 (123) el cual nos ayuda a predecir la estructura secundaria de la proteína y con base en ésta definir la proteína intacta. Los dominios se definieron mediante la herramienta Motif Finder (124).

- **Identificación del dominio depolimerasa de BaqKPR2**

Respecto a la depolimerasa de BaqKPR2, se tomaron tres CDS candidatos a poseer el dominio depolimerasa, los CDS 27, 28 y 29 que codifican para diferentes componentes de la cola del virus y se analizaron mediante Phyre2 (123) partiendo de la secuencia de aminoácidos de éstos. Se determinó que el CDS 28 es el que contiene el dominio depolimerasa y en adelante se continuó trabajando en base a éste.

4.2.3 Modelamiento de las depolimerasas de BaqSau1 y BaqKPR2

- **Modelamiento de la endolisina de BaqSau1 y el dominio catalítico CHAP (LysBaqSau1 y CHAP-BaqSau1)**

Se realizaron 2 tipos de modelamiento: 1. Modelamiento por homología mediante los softwares Swiss-Model (125,126) y Phyre2 (123) y 2. Modelamiento *de novo* mediante AlphaFold2Colab (V. 1.4) (127) El moldeamiento por homología permite obtener una representación 3D de las secuencias de proteínas con base en otras

proteínas ya descritas previamente de la cual se tengan datos de cristalografía. Para esto se utilizó la estructura cristalográfica de la Lisina del bacteriófago K descrita por Sanz-Gaitero M., Et. al 2014 (49), PDB: 4CSH como modelo para la predicción de la estructura secundaria de LysBaqSau1. Se utilizaron los parámetros usados por defecto por el programa para el modelamiento *de novo* mediante AlphaFold2.

- **Modelamiento de la proteína de la cola y determinación del dominio Depolimerasa (Dpo) de BaqKPR2 (DpoBaqKPR2)**

Se realizó el modelamiento por homología con base en la estructura cristalográfica descrita por Dunstan R. Et. al 2021 (128) código PDB: 7LZJ. Sin embargo, no se logró obtener resultados concluyentes debido a la alta variabilidad de esta proteína descrito por Kenecht L. Et. al 2020 (129). De modo que se procedió a realizar el modelamiento *de novo* mediante AlphaFold2Colab (V. 1.4) (127), como resultado se obtuvo la estructura monomérica de cada una de sus cadenas por separado, con base en ellas y siguiendo las coordenadas de la estructura cristalográfica antes mencionada, se procedió a realizar el armado del trímero final para los siguientes análisis mediante UCSF ChimeraX versión 1.6.1 (130).

Por su parte, el dominio depolimerasa hipotético se determinó mediante el análisis estructural con base en lo descrito por Latka A. Et. al 2019, Majkowska-Skrobek G. Et al. 2016; Hsieh P. Et al. 2017 y Pan Y. Et al. 2019 (57,59,91,93).

- **Validación de los modelos obtenidos.**

Se realizó la validación de los modelos obtenidos *in silico* mediante la herramienta Verify3D (131,132) y ERRAT (133) a través de la plataforma UCLA-DOE LAB — SAVES v6.0 (134), los cuales determinan la compatibilidad del modelo atómico (3D)

con su propia secuencia de aminoácidos (1D) y asigna una estructural basada en su ubicación y entorno intramolecular (Hélices- α , hojas- β , bucles, naturaleza de los aminoácidos, etc.) y comparando los resultados con otras estructuras de buena calidad. Los resultados son expresados en porcentaje mayor al 80%, es indicativo de un modelo de calidad según lo indicado por Colovos C y Yaetes T 1993 (133). De esta forma se realizó la validación de forma separada de cada modelo obtenido, tanto los modelos por homología como los *de novo*. Para LysBaqSau1 y CHAP-BaqSau1 y todos los modelos obtenidos se compararon entre sí, para escoger el modelo de mejor calidad. En cuanto a DpoBaqKPR2 se realizó la validación de la construcción del trímero.

- **Análisis estructural de las proteínas LysBaqSau1, el dominio catalítico CHAP-BaqSau1 y DpoBaqKPR2.**

El análisis de proteómica estructural se realizó mediante el Software UCSF ChimeraX versión 1.6.1 con base en los PDB de los modelos validados. Mediante este programa se logró la visualización y el análisis interactivo de las estructuras moleculares y la obtención de datos volumétricos y distancias atómicas, como la distancia entre residuos, la formación de puentes de hidrógeno inter e intracatenarias, la identificación de iones de importancia para el funcionamiento de las enzimas y la predicción de los residuos implicados con la catálisis de la enzima e identificar como lo describe Meng E. Et. al 2023 (130)

4.3 Determinación del mecanismo de acción de las depolimerasas de BaqSau1 y de BaqKPR2

4.3.1. Caracterización del mecanismo de acción de LysBaqSau1.

Para determinar el mecanismo de reacción *in silico* de LysBaqSau1 se realizaron dos ensayos por separado con distintos objetivos:

1. Evaluar interacción entre LysBaqSau1 y la transglicosilasa de membrana de *Staphylococcus aureus* (SaMGT), ésta última es una importante enzima implicada en la síntesis de la pared bacteriana por lo cual es considerada un importante blanco terapéutico a la hora de desarrollar nuevos antibióticos (135). Para la predicción del acoplamiento LysBaqSau1-SaMGT se realizó un docking proteína – proteína (DPP) mediante el servidor pyDockWEB (136). La visualización del complejo y el análisis de la interacción proteína-proteína se realizó mediante ChimeraX Vr. 1.6.1. (130).
2. Determinar el mecanismo de reacción de LysBaqSau1 sobre la cadena de peptidoglicano y la función del ión calcio en el dominio catalítico CHAP descrito previamente en el capítulo 2. Para ello se realizó un docking dirigido proteína-ligando (DdPL) mediante AutoDock vina (137).

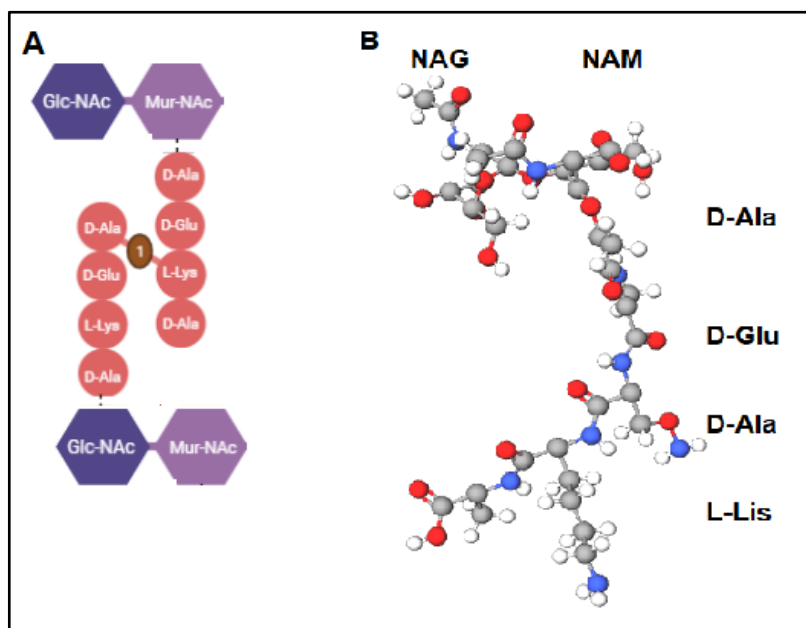
- **Estructuras de partida**

Receptor: Para todos los ensayos se tomó como receptor la estructura modelada mediante AlphaFold de la lisina abordada en el capítulo 2 (ver pag 69).

Ligando: Para la realización del docking Proteína- Proteína (DPP) se tomó como ligando fragmento de 263aa de la proteína transglicosidasa de *S. aureus* (SaMGT) con código PDB:3VMQ y para el docking proteína – ligando (DPL) se tomó la estructura de una unidad de peptidoglicano con base en la estructura

química clásica de una unidad de la cadena de peptidoglicano formado por *N*-acetil-glucosamina (NAG) y ácido *N*-acetilmurámico (NAM), unidos por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$, entre el C1 de NAM y el C4 de NAG, una cadena de tetrapéptidos unida a NAM formada por *L*-alanina, *D*-glutámico, *L*-lisina y *D*-alanina y el NAM unido a otro NAM vecino mediante un puente de pentaglicina en el caso de *S. aureus* como se muestra en la figura 5a, el cual fue editado y optimizado molecularmente por mecánica molecular a través del aplicativo MolView v2.4 (138) ver figura 5b.

Figura 5. Unidad de peptidoglicano de *S. aureus*.



A. Representación esquemática de la capa de peptidoglicano de bacterias gram positivas (1). Puente de Pentaglicina. B. Modelo de una subunidad de peptidoglicano obtenida como ligando para el análisis DPL

- **Cálculo de las energías de interacción molecular mediante docking de lysbaqsau1**

Para el primer ensayo se realizó un docking mediante el servidor pyDockWEB (139) tomando como base una amplitud de $3\text{\AA}$ de desplazamiento aleatorio tanto para el receptor como para el ligando para evitar la generación de conformaciones poco

útiles fuera del bolsillo de unión y generar modos de interacción alternativos del ligando con residuos vecinos del sitio de unión y así se llevó a cabo el refinamiento del sitio de unión para el modelo y para predecir de forma más exacta la orientación del ligando y las interacciones dentro del sitio de unión.

Para el segundo ensayo se realizó el cálculo de las energías de interacción molecular mediante docking dirigido proteína - ligando (DPL) entre el peptidoglicano y el sitio activo propuesto previamente para CHAP-BaqSau1 con base en los parámetros descritos en la tabla 8 mediante el software AutoDock Vina (137).

Tabla 8. Parámetros de las cajas de interacción para el docking mediante AutoDock Vina.

Método	Parámetros caja					
	center_x	center_y	center_z	size_x	size_y	size_z
DPL	-8.388	-13.218	4.242	9.0	13.5	9.0

- **Análisis y visualización**

La visualización de todos los complejos formados y el análisis de los contactos proteína-proteína y proteína-ligando se realizaron mediante ChimeraX Vr. 1.6.1. (130) mediante el cual se pudo determinar los sitios de unión por la identificación de hendiduras o bolsillos hidrofóbicos que indican actividad enzimática, también llamados puntos calientes (HotSpot) según Sumbalobva L. Et. al. 2018 (137).

4.3.2 Caracterización del mecanismo de reacción de la TSP de BaqKPR2

Para determinar el mecanismo de reacción *in silico* de la TSP de BaqKPR2 se realizaron dos ensayos por serado con distintos objetivos:

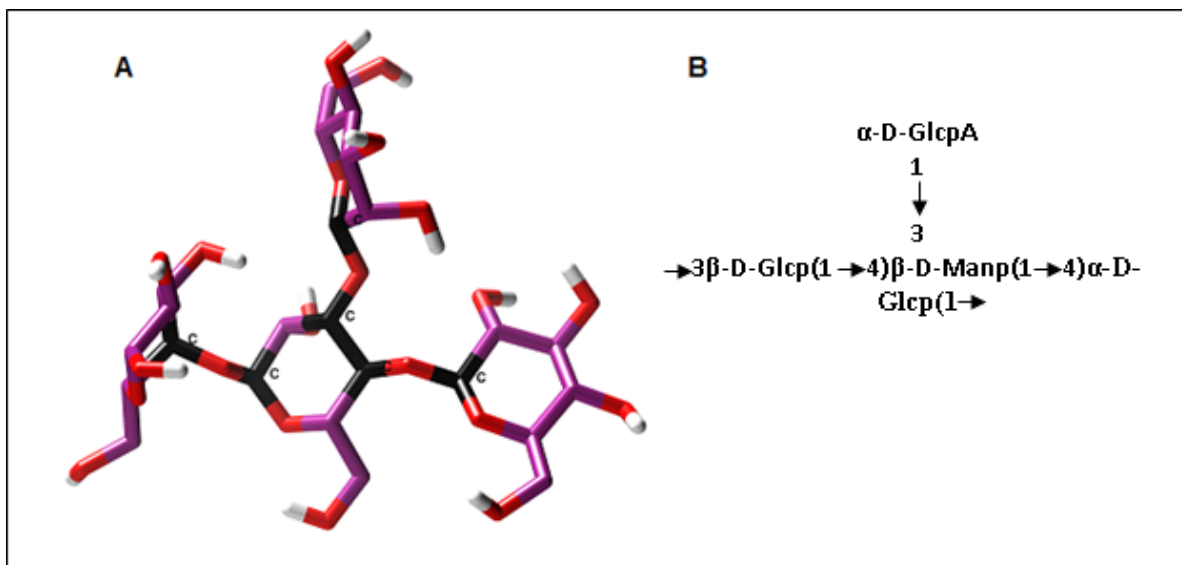
1. Evaluar la actividad depolimerasa de la TSP sobre los polisacáridos capsulares que envuelven a *K. pneumoniae*. Para este ensayo se tomó una molécula del polisacárido capsular de tipo K2 descrita por Pan Y. 2015 (140) ya que, con base en los resultados obtenidos mediante el análisis de sintenia tratado en el capítulo 2 (ver figura 28), la Dpo_BaqKPR2 muestra una alta homología con Dp32 del fago GH-K3 que según Dunstan R. 2023 (141) tiene actividad depolimerasa sobre el tipo capsular K2. Éste a su vez se realizó mediante dos métodos, **a.** un Docking dirigido (DdPL) hacia el sitio catalítico hipotético, propuesto en el capítulo anterior; y **b.** un Docking ciego (DcPL) con la proteína completa.
 2. Determinar si la TSP presenta algún tipo de interacción con la osmoporina OmpK36, ésta es una porina constitutiva de *K. pneumoniae* y otras bacterias gram negativas implicada en el transporte activo transmembranal, ensayos de mutagénesis dirigidas en esta proteína se ha observado que le confiere resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* (142), por lo que es considerada un importante blanco terapéutico, además esta proteína también ha sido descrita como un importante receptor de unión a los fagos GH-K3, KpNIH-2 y FC3-11 para la adsorción en *K. pneumoniae* (141).
- **Estructuras de partida.**

Receptor: Para todos los ensayos se tomó como proteína receptora el trímero modelado y analizado en el anterior capítulo correspondiente a la TSP para el análisis proteína-proteína se tomó la secuencia correspondiente al dominio C-terminal de la proteína que comprende la

secuencia de residuos del 673 al 772 para un total de 100 residuos modelado mediante AlphaFold.

Ligando: Para el ensayo 1, el Polisacárido tipo K2 fue editado y optimizado molecularmente por mecánica molecular a través del aplicativo MolView mediante el aplicativo MolView v2.4 (138) (ver figura 6a) con base a lo descrito por Pan Y. 2015 (140), el cual consta de unidades repetidas conformada por 4 glúcidos, dos unidades de β -D-glucopiranosido (β -D-Glcp) unidas a través de enlaces glucosídicos (1-4) a un α -D-mannopiranosido (α -Manp), que a su vez se une mediante enlace (1-3) al α -D-glucurónico (α -D-GlcA) como se muestra en la figura 6b. Luego fue optimizado mediante el software Gaussian 16 (143) utilizando los siguientes parámetros: Funcionales: B3LYP/6-311G; Dispersión empírica (GD3BJ); Geom (connectivity); Pop=MK; Op (6/33=2,6/41=10,6/42=17). Para el ensayo 2, se tomó como ligando la proteína OmpK36 PDB id.: 6RCP en su forma monomérica.

Figura 6. Estructura del polisacárido capsular tipo K2



a. Estructura modelada mediante MolView v2.4; b. Componentes glucósido del lipopolisacárido capsular tipo K2 tomado de (140)

- **Cálculo de las energías de interacción molecular mediante docking de la tsp de BaqKPR2**

Para el primer ensayo, en ambos métodos (DcPL y DdPL) se realizó mediante el software AutoDock Vina (137) con base en los parámetros descritos en la tabla 9.

Tabla 9. Parámetros de la caja de interacción para el docking mediante AutoDock Vina

Método	Parámetros caja					
	center_x	center_y	center_z	size_x	size_y	size_z
DdPL	61.592	141.364	70.544	64	64	64
DcPL	55.354	141.364	70.544	90	126	90

El segundo ensayo, por su parte, fue realizado mediante el servidor pyDockWEB (139) tomando como base una amplitud de 3Å de desplazamiento aleatorio tanto

para el receptor como para el ligando para evitar la generación de conformaciones poco útiles fuera del bolsillo de unión y generar modos de interacción alternativos del ligando con residuos vecinos del sitio de unión y así se llevó a cabo el refinamiento del sitio de unión para el modelo y para predecir de forma más exacta la orientación del ligando y las interacciones dentro del sitio de unión.

- **Análisis y visualización**

La visualización de todos los complejos formados y el análisis de los contactos proteína-proteína y proteína-ligando se realizaron mediante ChimeraX Vr. 1.6.1. (130) mediante el cual se pudo determinar los sitios de unión por la identificación de hendiduras o bolsillos hidrofóbicos que indican actividad enzimática, también llamados puntos calientes (HotSpot) según Sumbalobva L. Et. al. 2018 (137).

5. RESULTADOS

CAPÍTULO 1.

5.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA, MORFOLÓGICA Y GENÓMICA DE BaqSau1 y BaqKPR2

5.1.1 AISLAMIENTO DE BaqSau1 y BaqKPR2

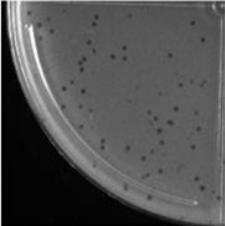
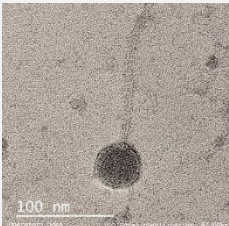
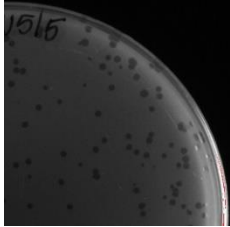
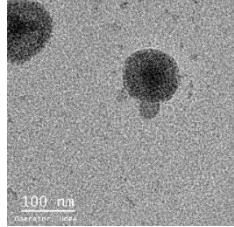
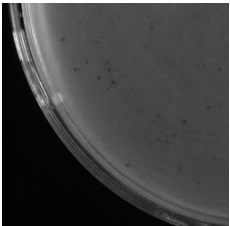
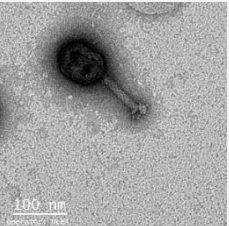
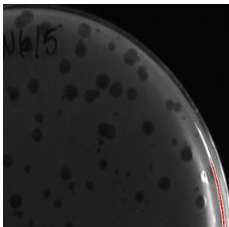
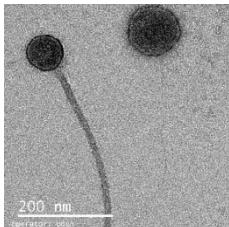
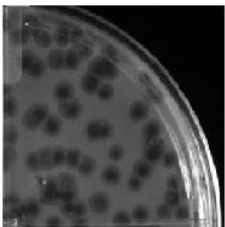
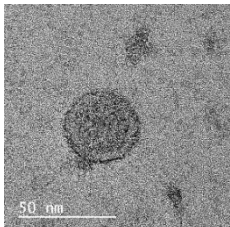
Aislamiento de bacteriófagos

De las 6 muestras de aguas residuales (aproximadamente 250ml) de varias localidades de los municipios de Barranquilla, Cartagena y Sahagún en el departamento de Córdoba, se aislaron en total 6 bacteriófagos, 2 de *S. aureus*, 1 de *K. pneumoniae*, 1 de *K. oxytoca* y dos de *E. coli*, los cuales fueron nombrados inicialmente con la inicial de Barranquilla y el hospedador de origen así: los fagos de *S. aureus*, BaqSau1 y BaqSau2; el de *K. pneumoniae*, BaqKPR2; el de *K. oxytoca*, BaqKoxl; y los de *E. coli*, BaqEcoA y BaqEcoB. las placas de lisis y la microfotografía obtenida de cada uno de los bacteriófagos aislados se muestran en la **tabla 10**.

Las muestras de agua recolectadas fueron tratadas conforme a lo descrito en la metodología, se realizó una siembra en doble capa agarizada para la obtención de placas de lisis para cada una de las muestras.

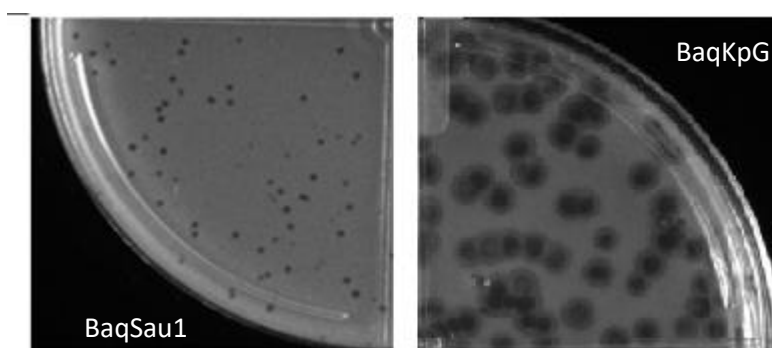
Sin embargo, conforme a los objetivos del presente estudio, sólo se tuvieron en cuenta los fagos de *S. aureus* BaqSau1 y de *K. pneumoniae* BaqKPR2 y a partir de las placas de lisis obtenidas se procedió al aislamiento y caracterización de estos dos fagos.

Tabla 10. Placas de lisis y microfotografías de los fagos aislados

Fago	Placas	TEM	Familia /morfología
BaqSau1			Syphoviridae
BaqEcoA			Podoviridae
BaqKoxi			Myoviridae
BaqEcoB			Syphoviridae
BaqKPR2			Podoviridae

En la **Figura 7** se pueden apreciar las placas de lisis obtenidas de BaqSau1 y de BaqKPR2, este último forma placas de lisis grandes, uniformes con un centro definido y a su alrededor se evidencia un halo turbio, de un tamaño promedio de $5,74 \text{ mm} \pm 0,83$. Por su parte las placas de lisis de BaqSau1 son pequeñas y puntiformes de fondo claro sin halos a su alrededor.

Figura 7. Placas de lisis de los bacteriófagos aislados



Se tomó una placa de lisis por cada uno de los fagos y se realizó su propagación tres veces, con el fin de obtener placas únicas para cada bacteriófago, obteniendo al final un stock de fagos con un título de 6.5×10^7 UFP/mL para BaqSau1 y de 2.4×10^5 UFP/mL para BaqKPR2.

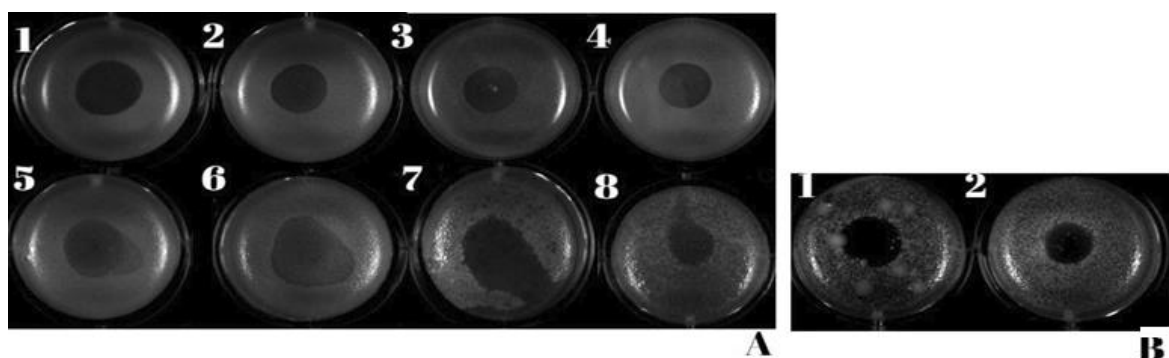
5.1.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE BaqSau1 y BaqKPR2

Rango de infección

Se evaluó el rango de infección tanto para BaqSau1 como para BaqKPR2 frente a cepas de importancia en salud pública de circulación en Colombia, los cuales se describen en la Tabla 2. Estos aislamientos fueron obtenidos en estudios previos del grupo de investigación y otras han sido donadas por otros laboratorios del país.

En la figura 8 se puede observar que BaqSau1 muestra una fuerte actividad lítica a una variedad de hospedadores bacterianos, tanto a cepas sensibles (SASM), como a resistentes (SARM), y a otras especies del género *Staphylococcus* como *epidermidis* y *saprophyticus*, por lo que se puede considerar a BaqSau1 como un bacteriófago polivalente

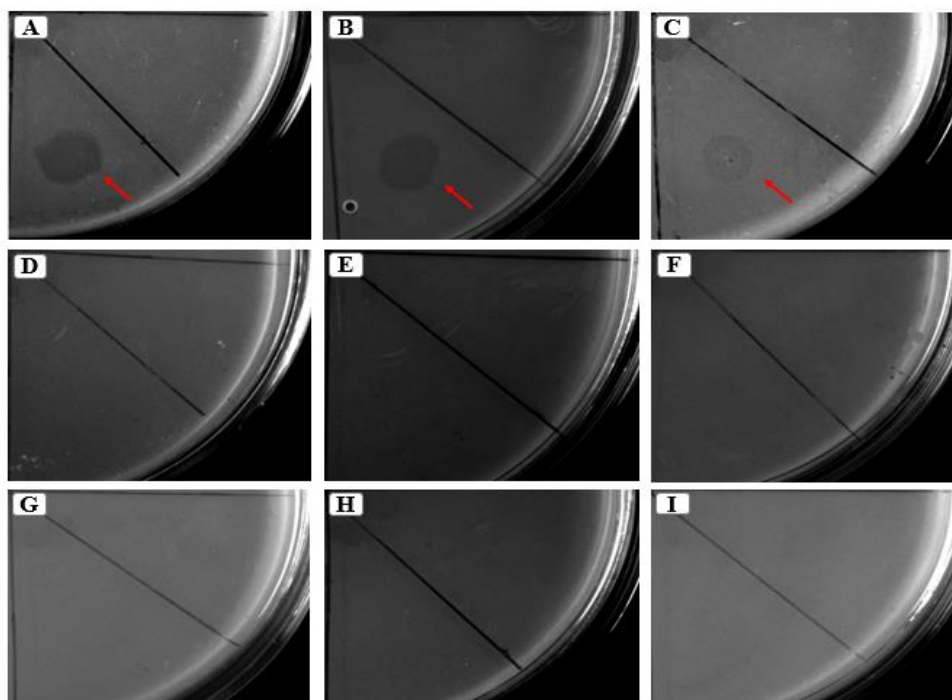
Figura 8. Rango de infección de BaqSau1.



A. 1. *S. aureus* cepa USA 300; 2. *S. aureus* Sccmec IVa; 3. *S. aureus* NCTC8325; 4. *S. aureus* clon Ibérico; 5. *S. aureus* Sccmec II; 6. *S. aureus* Sccmec IVb; 7. *S. aureus* RN4220; 8. *S. aureus* clon brasileiro. B. 1. *S. epidermidis*; 2. *S. saprofitico*.

Por su parte, BaqKPR2 presenta actividad frente a 3 cepas clínicas BLEE positivas, dos de ellas aisladas de infección urinaria y una de una herida quirúrgica como se muestra en la **figura 9**.

Figura 9. Espectro de actividad lítica de BaqKPR2



(A) *K. pneumoniae* 033, (B) *K. pneumoniae* L y (C) *K. pneumoniae* 05B. Las demás cepas fueron resistentes a la acción del fago (D) *K. pneumoniae* 074, (E) *K. pneumoniae* 272, (F) *K. pneumoniae* 283, (G) *K. pneumoniae* Cepa_1, (H) *K. oxytoca* y (I) *E. coli*.

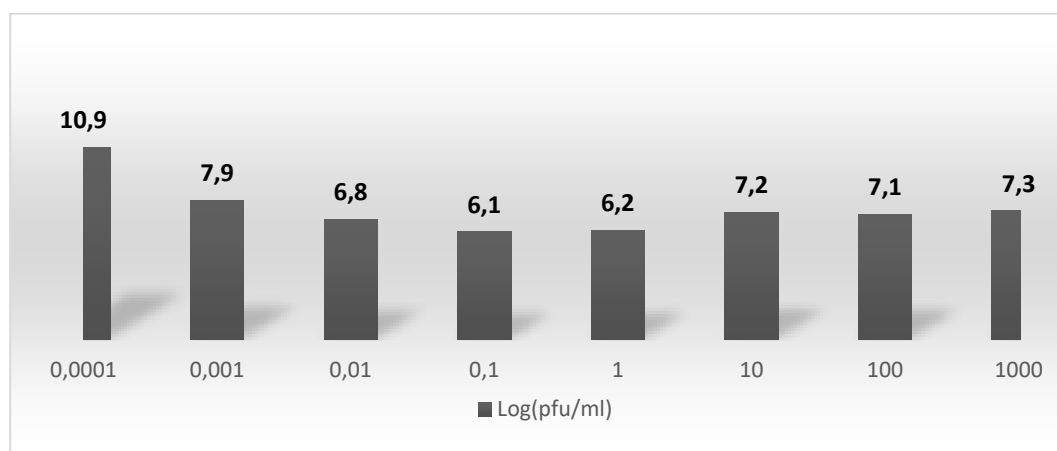
Multiplicidad Óptima de Infección (MOI)

Se evaluaron 8 concentraciones fago/bacteria de 0,0001 a 1000 para ambos bacteriófagos, siguiendo el protocolo descrito en la metodología, se modificó el tiempo de incubación fago-bacteria durante cuatro horas para permitir múltiples ciclos de infección y liberación de progenie viral.

Para BaqSau1 no se logró establecer una MOI ya que no fueron reproducibles los resultados al lisogenarse el fago de manera inmediata en cada ensayo. Por su parte, BaqKPR2 mostró altos títulos a una MOI de 0.0001 como se puede observar en la Figura 10, mientras que a MOI superiores los títulos descendieron de manera

significativa. La prueba de ANOVA mostró como resultado la existencia de diferencias significativas entre las MOI evaluadas ($p < 0,05$).

Figura 10. Multiplicidad de infección (MOI) para BaqKPR2



Se muestra el logaritmo del título final obtenido con cada una de las MOI testeadas.

Estabilidad térmica y de pH.

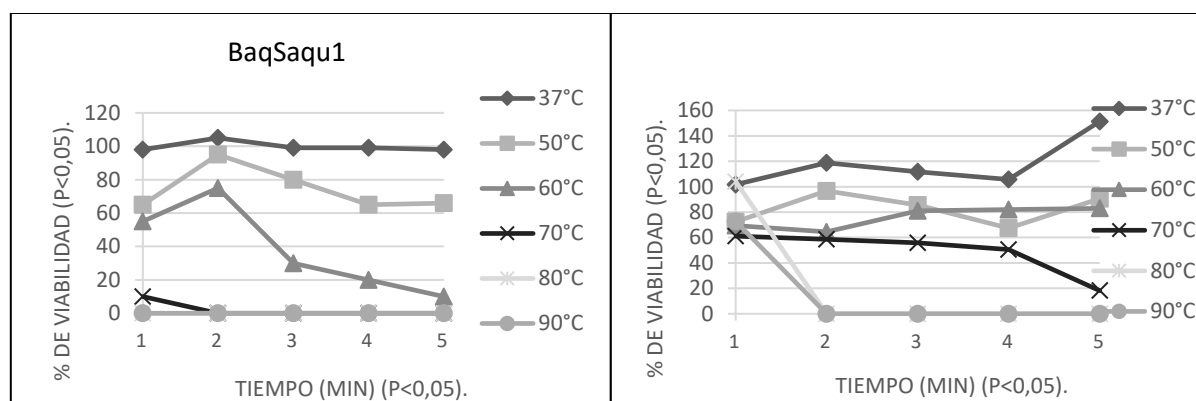
Se evaluó el efecto de la temperatura sobre el título de los bacteriófagos partiendo de un título inicial de 6.5×10^7 UFP/mL para BaqSau1 y de 2.4×10^5 UFP/mL para BaqKPR2, el resultado es expresado como el porcentaje de viabilidad teniendo en cuenta el grupo control el cual fue incubado a 4°C que es la temperatura de almacenamiento, estos resultados se pueden observar en el Figura 11.

Durante los ensayos, tanto BaqSauq como BaqKPR2 mostraron mejor crecimiento a 37°C, además, a esta temperatura los fagos se mostraron estables durante los primeros 60 minutos. Por otro lado, se observó a los 75 minutos de incubación un incremento de la viabilidad de BaqKPR2 de aproximadamente 50%. También podemos observar que BaqKPR2 presenta estabilidad a temperaturas entre 50 y 60°C durante todo el tiempo de incubación (75 minutos), disminuyendo tan sólo entre

el 10% y el 20 % comparado con el crecimiento a 37°C. A 70°C se reduce entre el 60% y 50% manteniéndose por 60 minutos, pero perdiendo estabilidad después. No obstante, respecto a BaqSau1, se evidencia una muy baja tolerancia a la temperatura mostrando que a partir de 60°C y luego de los primeros 30 minutos pierde considerablemente su capacidad infectiva evidenciado por la reducción del título, respecto al inicial en más del 60%. Por último, se evidencia que ambos fagos son sensibles a altas temperaturas (80 y 90°C) evidenciado por una pérdida casi total de la viabilidad. Sin embargo, BaqKPR2 mantuvo la viabilidad hasta en 30% durante los primeros 15 minutos de incubación a altas temperaturas.

Se evaluó también el efecto de las variables tiempo y temperatura sobre la viabilidad de los fagos encontrado diferencias estadísticamente significativas, mediante la prueba de ANOVA de dos vías. Se pudo establecer que tanto la temperatura como el tiempo de incubación tienen un efecto sobre la viabilidad de los fagos bajo un modelo multiplicativo, es decir que, las dos variables no actúan como factores independientes y sugiere que las condiciones óptimas para favorecer la viabilidad de ambos fagos son a 37°C durante un tiempo entre 60 y 75 minutos de incubación.

Figura 11. Viabilidad de los bacteriófagos BaqSau1 y BaqKPR2 a diferentes temperaturas y tiempo.



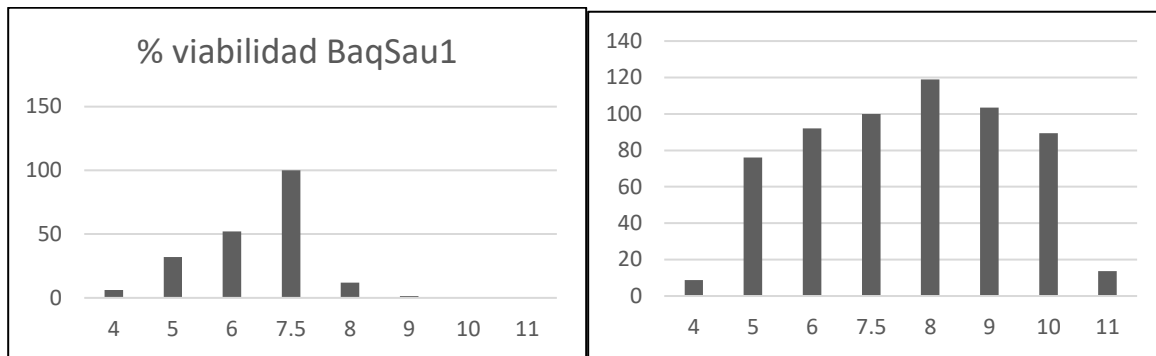
Efecto multiplicativo de la temperatura y el tiempo en la estabilidad de BaqSau1 y BaqKPR2. Se aplicó una prueba de ANOVA de dos vías con un nivel de significancia $p < 0.05$.

Por su parte, la estabilidad de los bacteriófagos a distintos pH se evaluó tomando alícuotas de fagos en buffer de almacenamiento a pH de 4, 6, 7.5, 8, 9, 10 y 11 iniciando con un título de fagos de 6.5×10^7 UFP/mL para BaqSau1 y de 2.4×10^5 UFP/mL para BaqKPR2 y se evaluó mediante la técnica de spot test evidenciando la reducción del título con respecto del inicial. Se observó que un pH de 7.5 no altera el título inicial, por lo que se considera el pH indicado para el almacenamiento de ambos fagos (Figura 11).

Sin embargo, valores de pH más alcalinos de 8 y hasta 9 favorecen de cierta forma la absorción y/o replicación de BaqKPR2 evidenciado por un aumento de hasta un 20% con respecto al título inicial y pH más ácidos como 6 y 5 que producen una reducción de hasta un 30% del título inicial (Figura 11). Por el contrario, valores de pH más extremos de 4 y 11, provocan una pérdida entre el 80 y el 90% de la viabilidad. El análisis estadístico ANOVA mostró que hubo diferencias significativas entre los distintos pH evaluados ($p < 0.05$). Respecto a BaqSau1 se evidenció viabilidad del virión solamente a pH neutros entre 7 y

7.5, concentración de pH superiores o inferiores afectan significativamente su viabilidad perdiendo en más de un 80% el título inicial. Los resultados se muestran en la Figura 12.

Figura 12. Resistencia de BaqSau1 y BaqKPR2 a distintos pH.



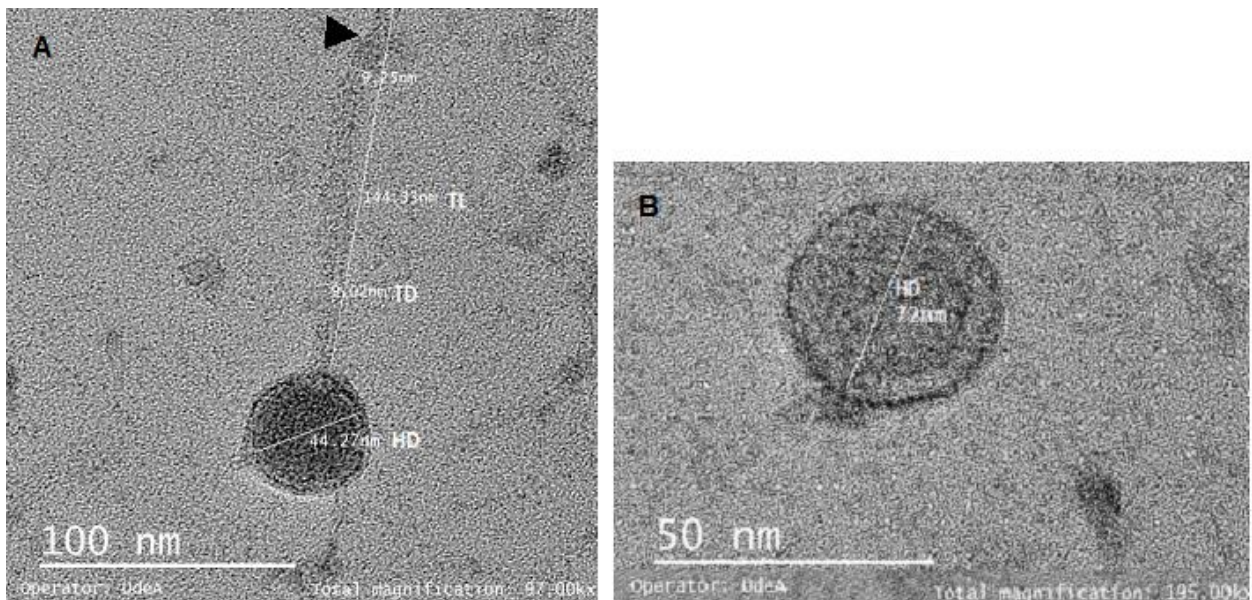
5.1.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRASMISIÓN DE BaqSau1 y BaqKPR2.

La propagación y concentración de las partículas virales se realizó a partir de las placas individuales por el método de doble capa en agar como se describió en la metodología obteniendo títulos finales de 6×10^6 UFP/mL para BaqSau1 y 4.6×10^7 UFP/mL para BaqKPR2. La clasificación morfológica se determinó mediante los siguientes parámetros: diámetro de la cápside, longitud de la cabeza tomado el largo desde el eje de la cola (hd y hl, respectivamente); largo y ancho perpendicular de la cola (tl y td, respectivamente) con base en estas mediciones se estableció el tipo de fago al cual pertenecen BaqSau1 y BaqKPR2 teniendo en cuenta que más del 96% de los bacteriófagos pertenecen al orden de fagos con cola Caudoviridae, los fagos con un tl <40nm se clasifican como Podoviridae y el valor td se utiliza para clasificar los virus con colas más largas como Myoviridae (td ≥ 16 nm) o Siphoviridae (td <16 nm) según (Ackermann 1998) (101).

BaqSau1 se clasifica como un miembro de la familia *Siphoviridae* morfotipo B1 según Gutiérrez D. Et al 2014 (144), ya que presenta una cápside icosaédrica no envuelta, de aproximadamente 44.27nm de diámetro y una cola larga, flexible y no contráctil de aproximadamente 144.3nm de largo y 9nm de diámetro, al extremo distal de la cola presenta la base y una espícula larga característica de esta familia de bacteriófagos como se puede apreciar en la figura 13a.

Por su parte, BaqKPR2 clasifica como un miembro de la familia Podoviridae, con una cápside de 72nm de diámetro (HD) y no se evidencia la presencia de una cola, ver la figura 13b.

Figura 13. Microfotografía de BaqSau1 y BaqKPR2



Microfotografía por microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa con acetato de uranilo al 2%; **A:** Escala 100nm, aumento de 97x: HD. Diámetro de la Cápside; TL. Largo de la Cola; TD. diámetro de la cola. Se señala la base y la espícula. **B:** Escala 50nm, aumento de 195x: HD. Diámetro de la Cápside.

5.1.4. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE BaqSau1 y BaqKPR2.

5.1.4.1 Secuenciación, ensamble y anotación *de novo*

- **Secuenciación**

Las librerías seleccionadas se mezclaron para hacer un pool compatible con PhiX como control de DNA, el análisis generó un millón de lecturas PE300 por cada muestra de DNA fágico y al final se obtuvieron las lecturas en archivo fastq con tamaño de lectura de 6.381.089pb para BaqSau1 y de 3.511.548pb para BaqKPR2 y una profundidad de 86.2X y 257.6X respectivamente. Las lecturas y otras estadísticas se resumen en la **Tabla 11**.

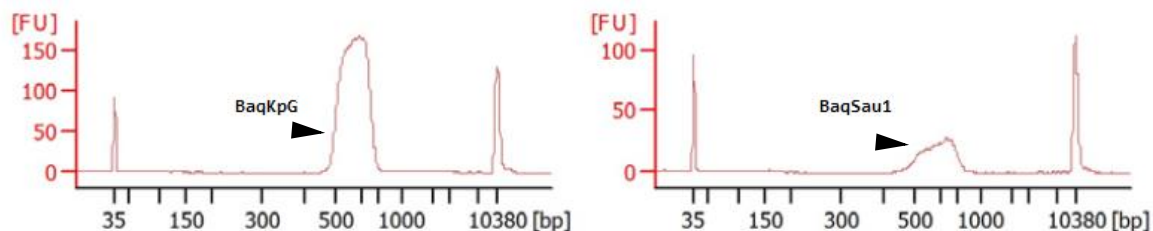
Los datos de calidad de las librerías obtenidas para la secuenciación de ambos fagos se pueden observar en la **tabla 11** y en la Figura 12, respectivamente

Tabla 11. Análisis de concentración y calidad de DNA para secuenciación.

DNA análisis	BaqSau1	BaqKPR2
DNA origen (ng/uL)	2.16	90,4
PCR (ng/uL)	2.5	*
Librería (ng/uL)	4.46	4,24
Tamaño de librería seleccionado (ng/uL)	0.73	0,588
Output raw reads (pb)	6.381.089	3.605.586
Output Trimmed Reads (pb)	5.871.793	3.511.548

*NA

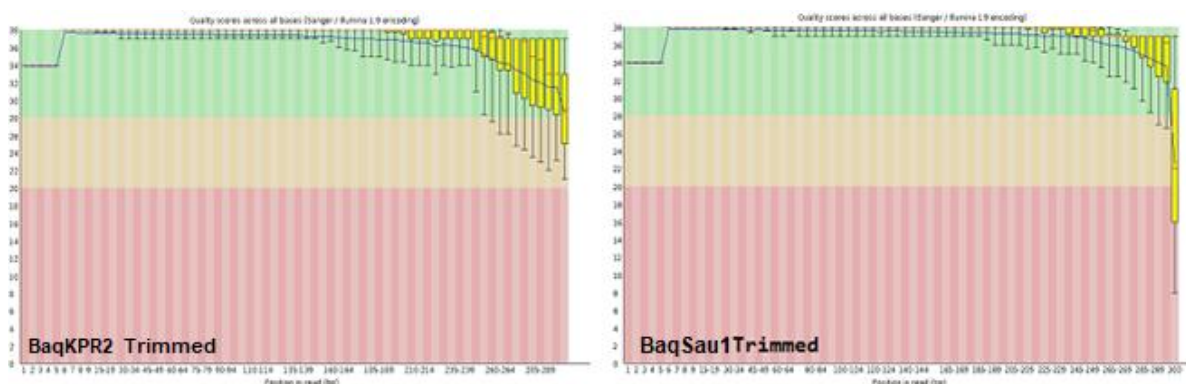
Figura 14. Electroferograma de las bibliotecas seleccionadas.



Electroferograma del bioanalizador Agilent 2100 que muestran las bibliotecas de DNA seleccionadas de entre 500 y 700pb.

Las gráficas de calidad se observan en la Figura 15, éstas muestran que las lecturas curadas mediante Trimming fueron óptimas para el ensamblado de los genomas.

Figura 15. Gráficas QC de las lecturas filtradas para ensamblaje de novo



- **Ensamblado de novo**

Éste se realizó a partir de las lecturas curadas mediante el software SPAdes siguiendo dos tipos de configuración como se describe en la metodología los resultados obtenidos se describen en la **tabla 12**.

Tabla 12. Contigs obtenidos mediante el ensamble *de novo*.

PIPELINE	MÉTODO	RESULTADO	
		BaqSau1	BaqKPR2
A	Uniandes Assembler SPAdes v. 3.9.0 Kmers _{max} =127	Cobertura: 2538.5 Tamaño: 45638pb	Cobertura: 10.5 Tamaño: 36966pb
B	ACGT.Inc. Laboratory SPAdes v3.11.1 Kmers _{max} =77	Cobertura. 337.2 tamaño: 44307pb	N/A
C	LSMB - Assembler SPAdes v. 3.12.0. Kmers _{max} =77	N/A	Cobertura: 11.1 Tamaño: 50521pb

LSMB: Laboratorio de simulación molecular y Bioinformática

- **Identificación de secuencias codificantes y anotación del genoma**

Para esto se utilizaron 3 programas para realizar el llamado de los ORFs por separado, para luego comparar los resultados obtenidos por los tres métodos y definir cuál de éstos representa un anotado más confiable. Como podemos observar en la **tabla 13**.

Tabla 13. Comparación datos de anotación del genoma de los tres anotadores usados

Fago	Anotador	TG (pb)	CDS-t	PFP (%)	CDS-c	CDS-m	CDS-M	%GC
BaqSau1	RAST-tk	44384	67	40 (59)	7	161	3467	34,5
	GLIMMER	43925	74	28 (37)	13	116	3503	34
	PHANOTATE	43499	75	NA	11	90	1902	NA
BaqKPR2	RAST-tk	50492	70	50 (52,6)	39	119	2627	52,6
	GLIMMER	50500	95	NA	44	113	2627	59,6
	PHANOTATE	50521	83	NA	51	89	2627	NA

TG: Tamaño del genoma; CDS-t: Secuencias codificantes totales; CDS-c: No. Secuencias codificantes de cadena complementaria; CDS-m: Secuencia codificante de menor tamaño; CDS-M: Secuencia codificante de mayor tamaño; PFP: Proteínas de función predichas; %GC: porcentaje de guaninas y citocina

5.1.4.2 Genómica estructural y funcional.

- **Genómica de BaqSau1**

BaqSau1 presenta un genoma de tipo DNA de doble cadena (dsDNA) de 44384pb con un porcentaje de G+C del 34.05% y 67 secuencias codificantes (CDS) de los cuales 60 (90%) se encuentra en la cadena positiva y 7 (10%) en la cadena negativa. De estos, 40 (59%) codifican para una proteína con función predicha, mientras que los restantes 27 (41%) son secuencias de las que no se conoce su función. Con estos últimos se realizó un análisis mediante el servidor HHpred útil para la predicción de su función con base en la identificación por homología de su estructura secundaria, la presencia de dominios conservados o motivos de proteínas que puedan sugerir su funcionalidad hipotética. Como resultado se logró establecer la función hipotética para los CDS 9, 11 y 36. Adicionalmente, no se identificaron CDS que codifiquen para RNA de transferencia, RNA mensajeros, lípidos o carbohidratos.

Todos los CDS identificados tiene un codón de inicio y un codón de parada, siendo ATG el codón de inicio más utilizado por BaqSau1 en 60 de sus 67 CDS. Sin embargo, en 3 CDS se identificó el uso del codón alternativo TTG. Todos los CDS fueron curados manualmente y se verificó la presencia de las secuencias Shine Dalgarno corriente arriba del codón de inicio de cada CDS. La longitud mínima de secuencia de DNA que codifica para una proteína en el genoma de BaqSau1 es de 147pb (49 aminoácidos) y la máxima de 3469pb (1156 aminoácidos) ambas en la hebra positiva. El genoma de BaqSau1 fue depositado en la base de datos de Genbank con el número de acceso MK658834 y la secuencia de ensamblado de NOVO fue depositada en el NCBI SRA bajo el número de acceso PRJNA610274.

Todas las características del genoma y la función predicha de cada uno de los CDS se encuentran enlistados en la **tabla 14** y fueron publicados en Lozano-Solano D, Et. al 2020, ver anexo 1.

Tabla 14. Caracterización genómica funcional de BaqSau1.

Secuencia codificante	Hebra	Posición		Longitud		Tamaño Proteína (KD)	Función predicha de la proteína	Sigla*	Homología con proteínas bases de datos	% Identid ad (aa)	E-value
Inicio	Fin	Gen	Proteína								
ORF1	+	1	882	882	294	34.7	Terminasa	TER 1	NP_803283.1	100	0
ORF2	+	893	2428	1536	512	59.4	Portal	TPA	WP_0317690	100	0
ORF3	+	2435	3430	996	332	38.4	Capside Menor	Cm	WP_0015566	100	0
ORF4	+	3503	3673	171	57	6.5					
ORF5	+	3808	4422	615	205	23.7					
ORF6	+	4436	5410	975	325	36.8	Capside Mayor	CM	WP_0159779	99.6	0
ORF7	+	5432	5719	288	96	10.9		PUF	WP_0317833	98.9	7E-62
ORF8	+	5728	6060	333	111	12.7	Conector Tallo/Cola	C-T/C	WP_0642761	99	7E-74
ORF9	+	6057	6359	303	101	11.8	**Conector Tallo/Cola	C-T/C	Head completion protein gp16_ BACILLUS PHAGE SPP1 NP_690677.1	98.17	1.8e-5
ORF10	+	6359	6706	348	116	13.4	Intermedio T/C	I-T/C	BAF67295.1	100	1E-80
ORF11	+	6718	7101	384	128	14.6	**Cuello Proteína Mayor	C	COMPL_BPSP P Tail completion protein gp17 - BACILLUS PHAGE SPP1 NP_690679.1	99.7	9.5e-17
ORF12	+	7120	7701	582	194	21.4	del Tallo Proteína de ensamble del	PMT	WP_0000025	99	1E-139
ORF13	+	7763	8128	366	122	13.1	tallo	PTA	WP_2157714	100	1E-78
ORF14	+	8158	8502	345	115	13.5					
ORF15	+	8519	11986	3468	1156	125.8	Proteína de Cinta métrica	PTM	WP_0317689	100	0
ORF16	+	11999	12946	948	316	37	Componente del tallo asociado a Syphoviridae	STC	WP_0641314	100	0
ORF17	+	12955	14856	1902	634	71	Proteína de unión al receptor_A	RBP-A	WP_0641314	99.8	0
ORF18	+	14871	16781	1911	637	73.6	Proteína de unión al receptor_B	RBP-B	MBS3352104 .1 YP_0063822	98.9	0

ORF19	+	16781	18604	1824	608	67.3	Proteína de unión al receptor_C	RBP-C	WP_1453261 24.1	99.3	0
ORF20	+	18604	18981	378	126	14	Proteína de Morfogénesis	PM	EWQ35472.1	100	2,00E-84
ORF21	+	18985	19158	174	58	6.9					
ORF22	+	19198	19497	300	100	12	Proteína de la aguja del tallo	PAT	EOR36239.1	100	7E-63
ORF23	+	19634	21532	1899	633	72.1	Lisina asociada al del tallo	TAL	WP_1601752 93.1	99.8	0
ORF24	+	21545	22783	1239	413	46.2	Proteína superior de la placa base	BppU	WP_0161704 67.1	100	0
ORF25	+	22789	23184	396	132	14.5	Proteína superior de la placa base	BppU	WP_0318852 90.1	98	3E-86
ORF26	+	23240	23515	276	92	9.9	Holina	Hol	EPX93583.1	100	6E-58
ORF27	+	23502	24914	1413	471	53.2	Lisina Isla de	Lys	YP_0092091 89.1	99.3	0
ORF28	-	24975	25532	558	186	20.2	patogenicidad	SaPI	WP_0725086 61.1	98.1	1E-122
ORF29	-	26278	27327	1050	350	41.7	Integrase	Int	WP_0317690 22.1	100	0
ORF30	+	27440	27619	180	60	7.2	Excisionase	Exc	WP_0860361 86.1	98.3	1E-31
ORF31	-	27599	28531	933	311	36.6					
ORF32	-	28563	29288	726	242	28					
ORF33	-	29316	29990	675	225	26.6	Regulador transcripcional	RT	WP_0509608 60.1	99	4E-162
ORF34	-	30007	30339	333	111	12.8	Regulador transcripcional	RT	WP_0319021 75.1	99	3E-75
ORF35	+	30602	30796	195	65	7.4	Represor	Rep	EJU82379.1	100	9E-37
ORF36	+	30796	31563	768	256	29.3	**Antirrepresor Homólogo de Cro/CI	Cro/CI	HAR4219702 .1	99.6	0
ORF37	+	31564	31788	225	75	8.8					
ORF38	+	31828	32277	450	150	17.3					
ORF39	+	32291	32512	222	74	8.46					
ORF40	+	32759	33076	318	106	12.8					
ORF41	+	33069	33371	303	101	11.1					
ORF42	+	33376	33636	261	87	10.1					
ORF43	+	33649	34185	537	179	20.6					
ORF44	+	34186	34836	651	217	25.1					
ORF45	+	34833	35276	444	148	16.3	Proteína de unión al DNA	PB-DNA	WP_0317836 36.1	99.3	3E-99
ORF46	+	35288	35962	675	225	26.1					
ORF47	-	36068	36925	858	286	32.5					
ORF48	+	36990	37760	771	257	29.6	Proteína de iniciación de replicación	PIR	WP_0317690 13.1	100	0
ORF49	+	37770	38543	774	258	30	Helicasa DNA	Hel	ADA80879.1	98	0
ORF50	+	38537	38698	162	54	6.3					
ORF51	+	38711	38932	222	74	8.5					
ORF52	+	38943	39347	405	135	16.3					
ORF53	+	39352	39537	186	62	7.2					

ORF54	+	39538	40155	618	206	23.9						
ORF55	+	40156	40412	258	86	9.7						
ORF56	+	40415	40615	201	67	7.7						
ORF57	+	40630	40872	243	81	9.6						
ORF58	+	40883	41134	252	84	9.3						
							Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase					
ORF59	+	41127	41654	528	176	19.3	DTNH	YP_918921.1	100	1E-126		
ORF60	+	41691	41927	237	79	9.1						
ORF61	+	41952	42188	237	79	9						
							Activador Transcripcioonal - RinB					
ORF62	+	42181	42354	174	58	6.5	RinB	ABQ48684.1	100	1E-32		
ORF63	+	42355	42717	363	121	14.3						
ORF64	+	42718	42864	147	49	5.7						
							Activador Transcripcioonal - RinA					
ORF65	+	42879	43298	420	140	16.1	RinA	WP_000058634.1	100	4E-97		
							Terminasa 2 - SSU					
ORF66	+	43485	43925	441	147	16.8	Ter2	EFB46687.1	100	4E-102		
ORF67	+	43912	44382	471	157	18.2	Terminasa 2 -LSU	EWR21791.1	99	5E-111		

* Siglas utilizadas para la identificación en el gráfico del genoma Easyfig.

** Función hipotética mediante el software HHpred.

Conforme a su función, se encontró que el genoma de BaqSau1 está organizado por 6 módulos como se muestra en la figura 16 y cada uno está representado en el esquema con flechas de colores. Las proteínas que corresponden a cada módulo funcional se describen en la **tabla 15**.

Figura 16. Mapa genómico de BaqSau1

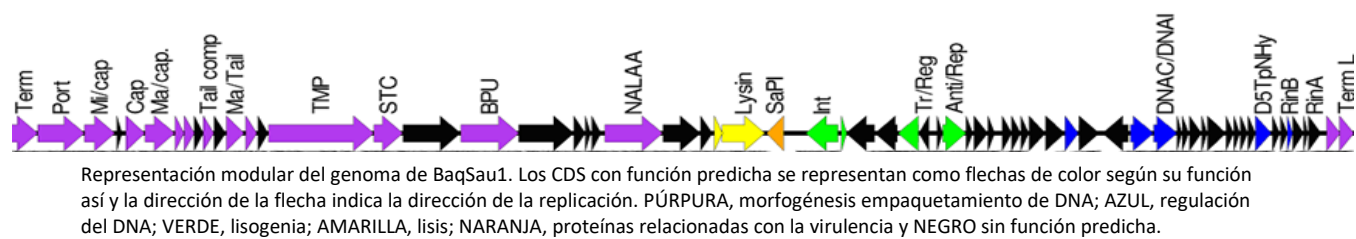


Tabla 15. Organización funcional del genoma de BaqSau1.

Morfogénesis	Lisis	Metabolismo del DNA	Empaquetamiento del DNA	Lisogenia	Virulencia
Terminasa – Portal - Capside Menor - Capside Mayor - Conector Tallo/Cola - Cuello - Proteína Mayor del Tallo - Proteína de ensamble del tallo - Proteína de Cinta métrica (TMP) - Proteína de unión al receptor (RBP) - Proteína de la aguja del tallo (DIT) - Lisina asociada al virión (VAL) - Proteína superior de la placa base (BppU)	Lisina - Holina	Proteína de unión al DNA - dUTP - Activador Transcripción - RinB Regulador de Transcripción – RinA	Terminasa S – terS Terminasa L - terL	Integrasa – Excisionasa - Regulador transcripcional - Regulador transcripcional - Represor – Anti-represor - Homólogo de Cro/Ci	Isla de patogenicidad,

El módulo correspondiente a la morfogénesis y lisina asociadas al virión están ubicados en la primera porción del genoma del CDS 1 al 25 y al final en el 67 con las proteínas encargadas del empaquetamiento del DNA. Estas secuencias codifican para proteínas estructurales importantes en la formación del virión y están

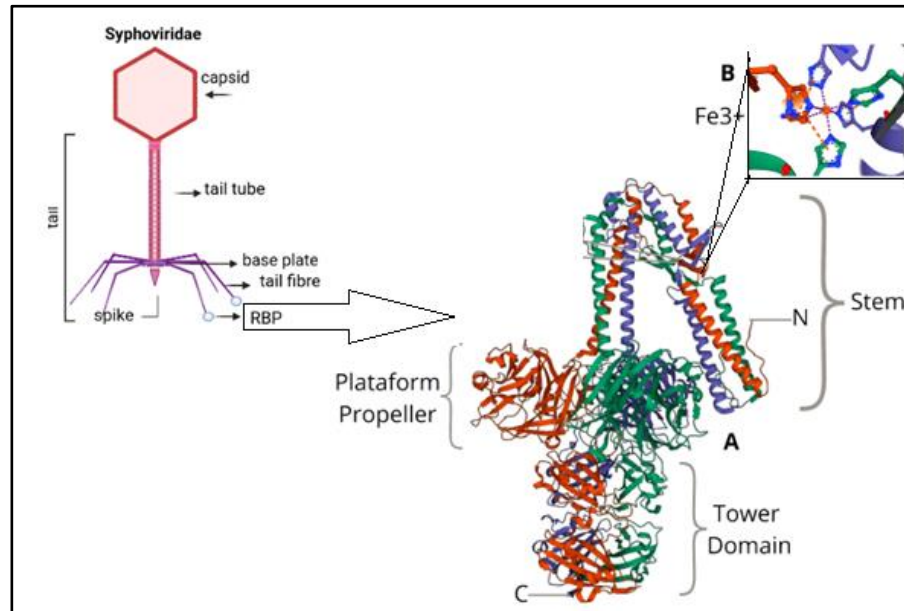
representadas con flechas color púrpura. De este módulo se destaca la proteína de unión al receptor (RBP).

Arquitectura de la RBP de BasqSau1

La RBP es una proteína constitutiva del virión del fago encargada de la unión al hospedador, la cual constituye un sofisticado dispositivo en el extremo distal del virión (ver Figura 15), éstas son especializadas en identificar receptores proteicos o carbohidratos de pared en el hospedador bacteriano, para permitir la entrada del material genético a su hospedador, por lo que es una proteína conservada en fagos de bacterias gram positivas principalmente.

La arquitectura de la RBP de BaqSau1 es similar a la de otros Syphovirus de *Staphylococcus* como $\phi 11$ and 80α (145). Consta de dos dominios unidos por un conector, en el extremo N-Terminal el Shoulder-Domain (Dominio de hombro) que se ancla a la placa base para completar la estructura del virión y el extremo C-terminal que se une al receptor de pared bacteriana. A su vez, RBP está conformado por un complejo trimérico, cada monómero consta de 608, 634 y 637aa constituido por los CDS 17, 18 y 19, respectivamente como se muestra en la figura 17 a y b.

Figura 17. Esquematzación de la RBP de BaqSau1.



Proteína de unión al receptor (RBP) correspondiente los CDS 17, 18 y 19 de BaqSau1. (A) Representación gráfica del complejo trimérico de RBP modelado con base en PDB ID: 5EFV. Cada monómero ha sido coloreado de forma individual, RBP1 de color rojo, RBP2 de color azul y RBP3 de color verde. (B) Representación gráfica de la unión al motivo de Fe³⁺. El modelamiento se realizó mediante ChimeraX, con base en el PDB obtenido por homología SwissModel.

Se encontró también un módulo de genes que codifican para proteínas encargadas la lisis del hospedador al final el ciclo replicativo y la liberación de la progenie viral, este incluye el caset Holina/Endolisina correspondiente a los CDS 26 y 27 y representados por el color amarillo. De este módulo se destaca la endolisina que se abordará en el capítulo 2. El módulo de genes relacionados con la regulación del ciclo de vida lisogénica, representados por el color verde, incluye los CDS 29 al 36, el módulo de genes relacionados con el metabolismo del DNA representado con el color azul, incluyen los CDS 45, 59, 66 y 67.

Por otro lado, se identificó el CDS 28 el cual codifica una isla de patogenicidad de super antígeno de *S. aureus*, ésta es una proteína relacionada con la virulencia y patogenicidad de la bacteria y representan genes transducibles por BaqSau1. Se

encuentra graficado de color naranja y, por último, en color negro los CDS a los cuales no se logró establecer una función hipotética.

- **Genómica de BaqKPR2**

BaqKPR2 posee un genoma DNA de doble cadena (dsDNA) de 50521pb, un contenido de G+C del 52.6% y 70 CDS de los cuales 19 (27%) se encuentra en la cadena positiva y 51 (73%) en la cadena negativa. De los CDS identificados 50 (71.4%) presentan una función predicha identificada mediante la plataforma Rast-tk y 20 no tienen una función identificada y no se logró asignar una función hipotética luego del análisis de mediante HHPred. También se identificó un CDS que codifica para RNA de transferencia (CDS 3), dos RNA ribosomales (CDS 4 y 5) un RNA mensajero (CDS 16), no se identificaron lípidos ni carbohidratos en su genoma.

Se logró asignar una función al 43% de los genes predichos de BaqKPR2. En cada uno se obtuvo una identidad significativa de secuencias ($E\text{-value} \leq 0$; con excepción del CDS 1) y el 92% de los CDS fueron encontrados en otros fagos de Klebsiella, todos los CDS identificados tiene un codón de inicio y un codón de parada, siendo ATG el codón de inicio más utilizado por BaqKPR2 en 57 de sus 70 CDS y como codones alternativos se identificaron el codón GTG en 12 CDS y TTG en uno. Todos los CDS fueron curados manualmente y se verificó la presencia de las secuencias Shine Dalgarno corriente arriba del codón de inicio de cada CDS.

La longitud mínima de secuencia de DNA que codifica para una proteína de BaqKPR2 es de 113pb (37aa) y la máxima de 2627pb (875aa) ambas en la hebra

negativa. Todas las características del genoma y la función predicha de cada uno de los CDS se encuentran enlistados en la **tabla 16**.

Tabla 16. Caracterización genómica funcional de BaqKPR2.

CDS	Hebra	Posición		Longitud		Tamaño Proteína (KD)	Función predicha de la proteína	Sigla*	E-value	% Identidad (aa)	Homología con proteínas bases de datos No. Acceso
		Inicio	Fin	Gen	Proteína						
1	-	469	8	461	154	16,8	Desconocida	Unk	2,00E-105	100.00%	WP_004206848.1
2	+	514	960	446	149	16,8	Desconocida	Unk	2,00E-103	100.00%	ALD05087.1
3	-	1743	976	767	256	28,4	tRNA (guanine (37)-N (1))-methyltransferase (EC 2.1.1.228)	tRNA (G-M-Trans)	0.0	100.00%	WP_002914147.1
4	-	2323	1775	548	183	20,5	16S rRNA processing protein RimM	rRNA-16s (RimM)	5,00E-131	100.00%	AHM78153.1
5	-	2590	2342	248	83	9,1	SSU ribosomal protein S16p	rRNA (SSU)	6,00E-52	100.00%	WP_265773788.1
6	-	4214	2850	1364	455	49,7	Signal recognition particle protein Ffh	Ffh	0.0	100.00%	AHM78150.1
7	+	4378	5169	791	264	29,2	Inner membrane protein YpjD	YpjD	0.0	100.00%	VGC04642.1
8	+	5189	6475	1286	429	48,1	Putative membrane protein YfjD	Unk	0.0	100.00%	WP_004149392.1
9	-	7185	6595	590	197	21,7	Heat shock protein GrpE	GrpE	4,00E-136	100.00%	WP_004174800.1
10	+	7310	8188	878	293	32,4	NAD kinase (EC 2.7.1.23)	NAD-Kin	0.0	100.00%	WP_002914158.1
11	+	8275	9936	1661	554	61,3	DNA repair protein RecN	DNA (RecN)	0.0	100.00%	WP_004206849.1
12	+	9962	10093	131	44	48	Desconocida	Unk	<u>1,00E-20</u>	96,70%	VTM52019.1
13	+	10083	10424	341	114	12,4	Outer membrane beta-barrel assembly protein BamE	BamE	2,00E-78	100.00%	WP_004206850.1
14	-	10784	10494	290	97	10,8	UPF0125 protein RatB	UFP0125	4,00E-61	100.00%	WP_004206851.1
15	-	11250	10774	476	159	17,4	Ribosome association toxin RatA	Ribosome (RatA)	5,00E-113	100.00%	ASV18949.1
16	+	11361	11843	482	161	18,2	tmRNA-binding protein SmpB	tmRNA (SmpB)	2,00E-114	100.00%	WP_002914164.1
17	+	11938	12057	119	40	4,2	Desconocida	Unk	5,00E-18	100.00%	DAM13872.1
18	+	12447	12818	371	124	13,8	Desconocida	Unk	4,00E-86	100.00%	WP_004206852.1
19	-	13094	12876	218	73	7,9	Desconocida	Unk	9,00E-47	100.00%	WP_004206853.1

20	-	14258	13161	1097	366	40,6	Phage tail formation protein GpD	Tail (GpD)	0.0	100.00%	WP_004206854.1
21	-	14740	14255	485	162	17,8	Phage tail protein GpU	Tail (GpU)	0.0	100.00%	WP_004206854.1
22	-	17364	14737	2627	876	93,8	Phage tail length tape-measure protein GpT	Tail (GpT)	0.0	100.00%	AMR17276.1
23	-	17476	17357	119	40	4,4	Phage P2 GpE family protein	Tail (GpE)	3,00E-19	100.00%	WP_002896220.1
24	-	17790	17491	299	100	10,6	Phage tail protein GpE	Tail (GpE)	8,00E-62	100.00%	WP_004206857.1
25	-	18358	17843	515	172	18,5	Phage major tail tube protein GpFII	Tail (GpFII)	8,00E-62	100.00%	WP_004206857.1
26	-	19540	18368	1172	391	42,3	Phage tail sheath monomer GpFI	Tail (GpFI)	5,00E-121	100.00%	MBD3702050.1
27	-	20880	19690	1190	397	42,6	Phage tail fiber protein GpH	Tail (GpH)	5,00E-121	100.00%	MBD3702050.1
28	-	21188	20892	296	99	10,7	Desconocida	Unk	0.0	100.00%	WP_004206858.1
29	-	23524	21200	2324	775	85,5	Desconocida	Unk	0.0	100.00%	WP_004206859.1
30	-	24135	23530	605	202	22,6	Phage tail formation protein GpI	Unk	3,00E-143	100.00%	WP_004206862.1
31	-	25027	24119	908	303	32,6	Phage baseplate assembly protein GpJ	Tail (GpJ)	0.0	100.00%	WP_004206863.1
32	-	25376	25014	362	121	13,2	Phage baseplate assembly protein GpW	Tail (GpW)	1,00E-79	100.00%	WP_004206864.1
33	-	25945	25373	572	191	20,6	Phage baseplate assembly protein GpV	Tail (GpV)	6,00E-137	100.00%	WP_004206865.1
34	+	26023	26913	890	297	34,5	Desconocida	Unk	0.0	100.00%	WP_050558933.1
35	-	27322	26876	446	149	17,2	Phage tail completion protein GpS	Tail (GpS)	3,00E-102	100.00%	WP_004206866.1
36	-	27746	27315	431	144	16,1	Phage tail completion protein GpR	Tail (GpR)	8,00E-100	100.00%	WP_004206867.1
37	-	28270	27842	428	143	15,7	Phage lysis regulatory protein, LysB	LysB	7,00E-95	100.00%	WP_004206869.1
38	-	28782	28267	515	172	18,6	Phage lysozyme R (EC 3.2.1.17)	LysR	5,00E-122	100.00%	WP_004206870.1
39	-	28978	28763	215	72	8	Phage holin	HOL	2,00E-42	100.00%	WP_014884902.1
40	-	29185	28982	203	68	7,5	Phage tail protein GpX	Tail (GpX)	4,00E-42	100.00%	WP_000868184.1
41	-	29652	29185	467	156	17,9	Phage head completion protein	Head	4,00E-109	100.00%	WP_004206872.1
42	-	30404	29751	653	218	24	Phage terminase, endonuclease subunit GpM	Term (GpM)	2,00E-158	100.00%	WP_004206873.1
43	-	31556	30408	1148	383	42	Phage major capsid protein GpN	Cap (GpN)	0.0	100.00%	WP_004206874.1

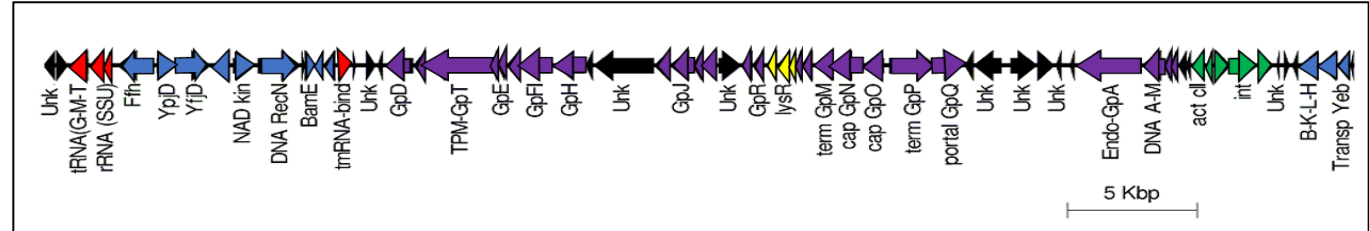
44	-	32399	31572	827	276	30,5	Phage capsid scaffolding protein GpO	Cap (GpO)	0.0	100.00%	WP_004206875.1
45	+	32600	34408	1808	603	68,3	Phage terminase, ATPase subunit GpP	Term (GpP)	0.0	100.00%	WP_061883686.1
46	+	34408	35460	1052	351	40	Phage portal vertex protein GpQ	Term (GpQ)	0.0	100.00%	WP_004206878.1
47	-	35843	35505	338	113	12,8	Desconocida	Unk	4,00E-74	100.00%	WP_004205801.1
48	-	36925	35843	1082	361	40,5	Desconocida	Unk	0.0	100.00%	DAL18836.1
49	+	37271	38311	1040	347	39,6	Desconocida	Unk	0.0	99.14%	WP_032426145.1
50	+	38308	38979	671	224	24,7	Desconocida	Unk	5,00E-163	100.00%	WP_131405007.1
51	-	39233	39018	215	72	8	Desconocida	Unk	3,00E-44	100.00%	WP_071592577.1
52	-	39739	39551	188	63	7,3	Desconocida	Unk	5,00E-36	100.00%	WP_004205798.1
53	-	42331	39923	2408	803	92,3	Phage replication protein GpA, endonuclease	Endo (GpA)	0.0	100.00%	WP_004205797.1
54	-	43199	42312	887	296	33,4	Phage DNA adenine methylase (EC 2.1.1.72)	DNA A-M (EC 2.1.1.72)	0.0	100.00%	WP_004205795.1
55	-	43423	43196	227	76	8,3	Phage TraR/Ybil family protein	TraR/Ybil	5,00E-47	100.00%	WP_004205794.1
56	-	43656	43423	233	78	8,7	Desconocida	Unk	2,00E-46	100.00%	WP_004205793.1
57	-	44062	43724	338	113	12,7	Desconocida	Unk	7,00E-76	100.00%	WP_004144796.1
58	-	44226	44026	200	67	7,4	FIL protein	FL	2,00E-39	100.00%	WP_004205792.1
59	-	44743	44234	509	170	18,2	Phage activator protein cII	Act (cII)	1,00E-121	100.00%	WP_004205791.1
60	-	45018	44845	173	58	6,5	Phage Cox (control of excision) protein	Ex (Cox)	6,00E-34	100.00%	MCV5918486.1
61	+	45195	45770	575	192	21,1	Phage repressor protein cI	Rep (cI)	3,00E-138	100.00%	MDU5049919.1
62	+	45773	46804	1031	344	38,6	Phage integrase	Int	0.0	100.00%	WP_004205789.1
63	+	46806	47429	623	208	24	Desconocida	Unk	1,00E-149	100.00%	AMR17315.1
64	-	47629	47516	113	38	4,5	Desconocida	Unk	4,00E-18	100.00%	PLF14415.1
65	+	47803	48018	215	72	82	Prophage CP4-57 integrase	INT- (CP4-57)	8,00E-44	100.00%	EMR17845.1
66	-	48353	48117	236	79	8,9	Mobile element protein	MEP	2,00E-51	100.00%	EMR17844.1
67	-	49118	48402	716	239	26,3	Beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase (EC 3.1.1.24)	B-K-L-H (EC 3.1.1.24)	3,00E-173	100.00%	AVF90704.1
68	-	49828	49142	686	229	23,9	Uncharacterized MFS-type transporter	Transp (MFS)	8,00E-158	100.00%	WP_085956548.1
69	-	50341	49832	509	170	18,6	Uncharacterized transporter YebQ, major facilitator superfamily (MFS)	Transp (YebQ)	4,00E-116	100.00%	WP_085956547.1

70	-	50492	50358	134	45	5,4	Desconocida	Unk	2,00E-21	97.73%	BBV59543.1
----	---	-------	-------	-----	----	-----	-------------	-----	----------	--------	------------

* Siglas utilizadas para la identificación en el gráfico del genoma Easyfig.

Conforme a su función, se encontró que el genoma de BaqKPR2 está organizado por 6 módulos como se muestra en la figura 18 y cada uno está representado en el esquema con unas flechas de colores.

Figura 18. Mapa genómico de BaqKPR2



Representación modular del genoma de BaqKPR2. Los CDS con función predicha se representan como flechas de color según su función y la dirección indica la cadena positiva a la derecha y negativa a la izquierda. PÚRPURA, morfogénesis y empaquetamiento de DNA; AZUL, regulación del DNA; VERDE, lisogenia; AMARILLA, lisis; ROJO, tRNA, mRNA, rRNA y NEGRO sin función predicha.

Las proteínas que corresponden a cada módulo funcional se describen en la **tabla**

17.

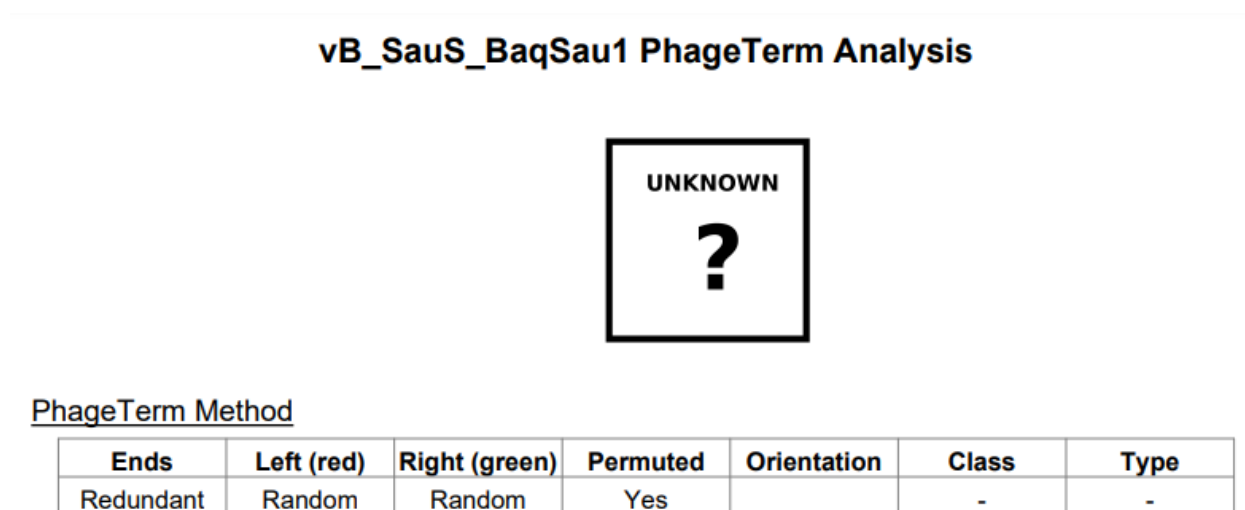
Tabla 17. Organización funcional del genoma de BaqKPR2

Morfogénesis y empaquetamiento del DNA (CDS)	Lisis (CDS)	Metabolismo del DNA (CDS)	Lisogenia (CDS)	RNA (CDS)
GpD (20); GpU (21); TMP GpT (22); GpE (23); GpE (24); GpFII (25); GpFI (26); GpH (27); GpI (30); GpJ (31); GpW (32); GpV (33); GpS (35); GpR (36); GpX (40); Head (41); GpM (42); GpN (43); GpO (44); Term GpP (45); Portal GpQ (46)	LysB (37); LysR (38); Hol (39)	Ffh (6); YpjD (7); YfjD (8); GrpE (9); NAD kin (10); DNA RecN (11); BamE (13); RatB (14); RatA (15); Endo GpA (53); DNA A-M (54); TraR/Ybil (55); FIL (58); Act cII (59); B-K-L-H (67); Trans MFS (68); Trans YebQ (69)	Act-cII (59); Exi Cox (60); Rep cI (61); Int (62); Int CP4-57 (65); EM (66)	tRNA (3); rRNA RimM (4); SSU rRNA (5)

Tipo de empaquetamiento del DNA fágico.

Con respecto al tipo de empaquetamiento del genoma de BaqSau1 no se pudo establecer mediante este análisis, el software PhageTerm no detectó ningún sitio de reconocimiento específico donde se inicie el empaquetamiento del DNA, ni se logró establecer la orientación de éste como se puede observar en la figura 19.

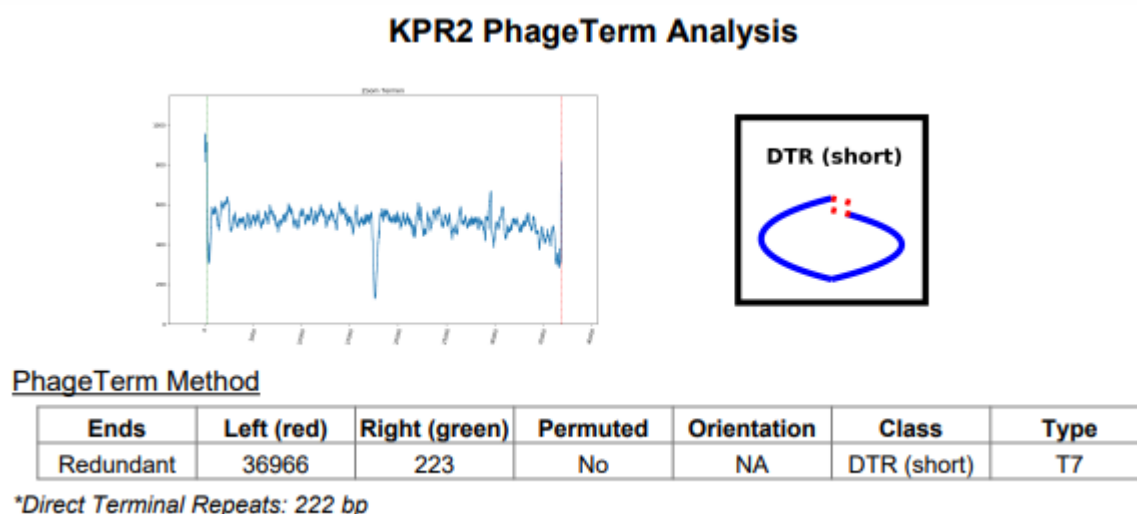
Figura 19. Reporte del análisis de PhageTerm de BaqSau1



Sin embargo, por la alta homología que presenta con el bacteriófago PhiETA2 se sugiere que BaqSau1 un genoma circular permutado con extremos redundantes y que también use un mecanismo *pac* para empaquetar el ADN como los otros fagos de la familia “Phietalikevirus.

Por su parte se pudo establecer mediante PhageTerm que el genoma de BaqKPR2 presentan un tipo de empaquetamiento DTR corto similar al de los bacteriófagos T7. Con extremos redundantes no permutados de 222pb, como se observa en la figura 20.

Figura 20. Reporte del análisis de PhageTerm de BaqKPR2



4.1.2.3 Genómica comparativa

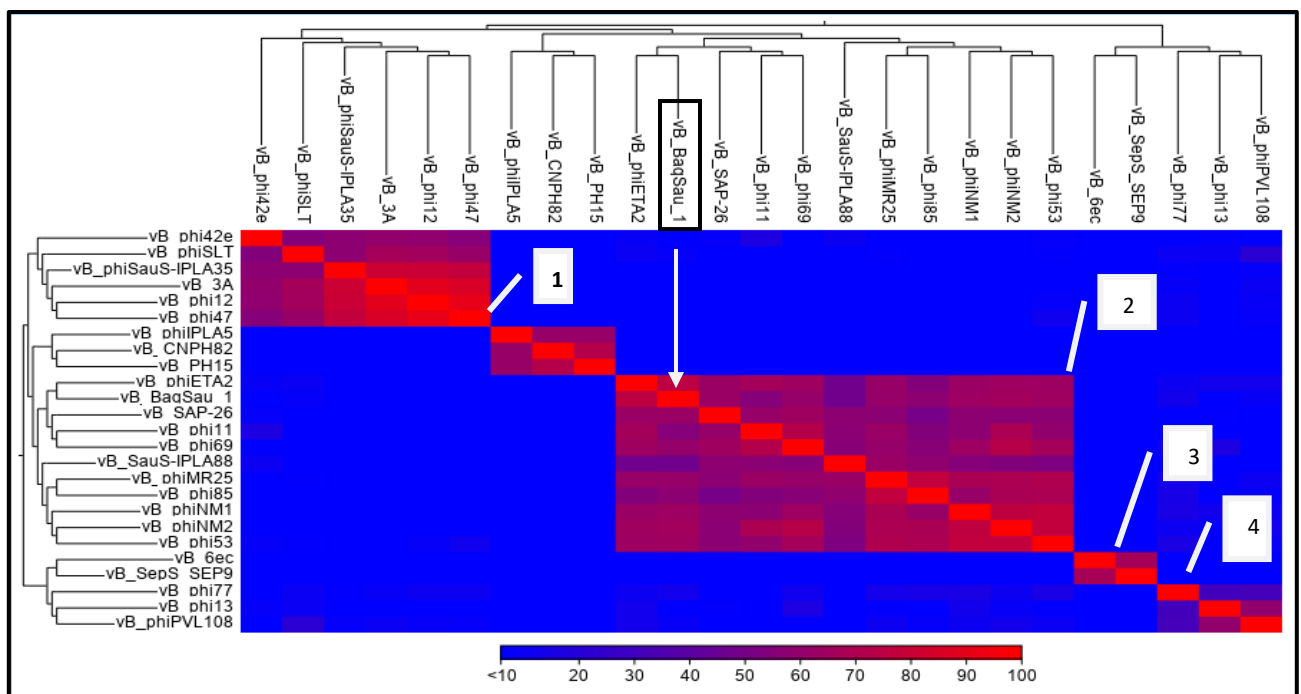
Se realizó el análisis de genómica comparativa para ambos bacteriófagos mediante el cálculo de identidad de nucleótidos promedio (ANI) tomando como base genomas representativos de cada una de las familias de bacteriófagos de hospedadores del género *Staphylococcus* para un total de 23 genomas y de *Klebsiella* 18 genomas, los cuales se encuentran depositados en la base de datos del International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) a fecha de diciembre de 2023 como se muestra en la **tabla 7**.

También se construyeron los árboles filogenéticos con base en los genomas antes enlistados en la **Tabla 7** mediante la plataforma Virus Classification and Tree Building Online Resource (VICTOR) (122).

- **Genómica comparativa de BaqSau1.**

Los genomas analizados se agruparon en 5 géneros principales: Triavirus, Dubowvirus, Sextavirus y Peeveelvirus. BaqSau1 por su parte, se agrupó con los miembros de la familia Dubowvirus con ANI del 90% como se muestra en la figura 21, lo que indica que BaqSau1 corresponde a un nuevo miembro de este género, ya que está por debajo del límite ANI del sugerido para la delimitación de especies que es del 95%.

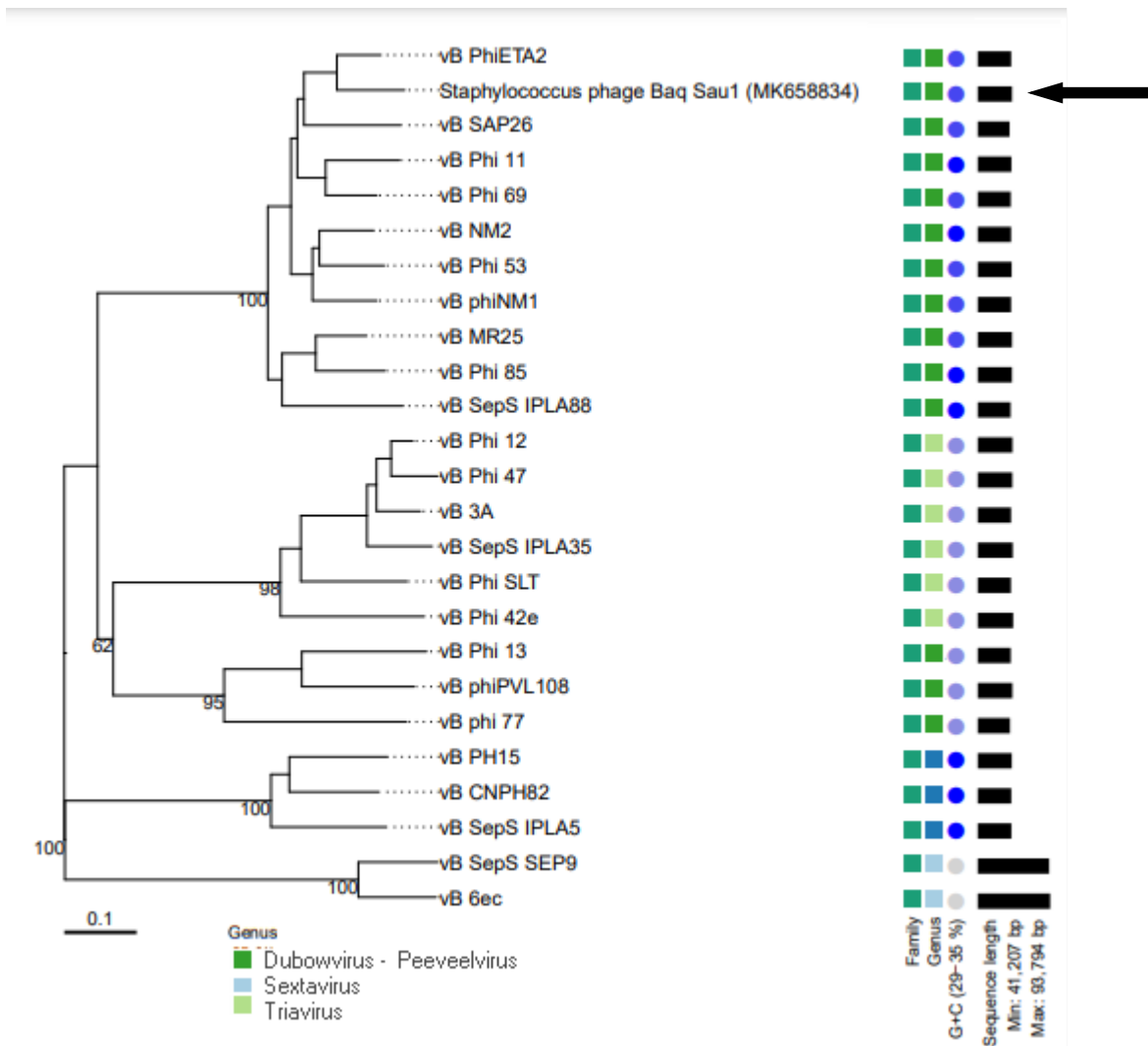
Figura 21. Agrupamiento de los géneros pertenecientes a Siphovirus de *Staphylococcus* spp.



Familias de Siphoviridae: 1. Triavirus; 2. Dubowvirus; 3. Sextavirus; 4. Peeveelvirus.

Por su parte, el análisis mediante VICTOR confirma este hallazgo, como se observa en la figura 22, donde observamos que BaqSau1 se ubica en el clado correspondiente a la familia Dubowvirus y cuyo genoma más cercano es PhiETA2 con el cual comparte una homología del 97.1%.

Figura 22. Árbol filogenético de bacteriófagos de la familia Siphoviridae que infectan *Staphylococcus* spp

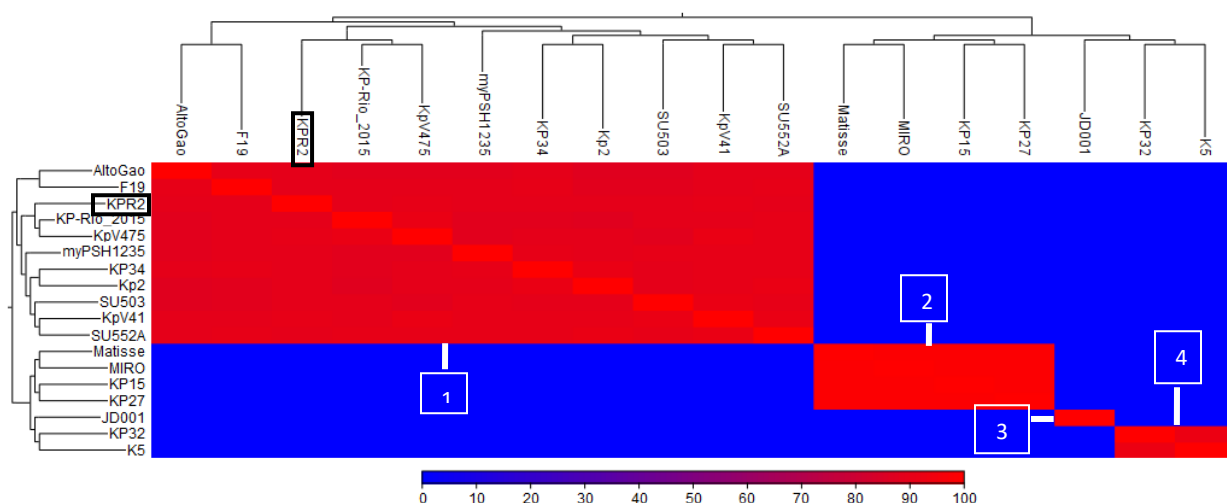


- **Genómica comparativa de BaqKPR2**

Los genomas de *Klebsiella* spp. por su parte, se agruparon en 4 géneros Drulis, Przondovirus, Jedunavirus y Slopekvirus, como se puede observar en la figura 23. Respecto a BaqKPR2 se observa que conformó un grupo monofilético constituido por los integrantes de la familia Podoviridae formando un clado consistente con los fagos pertenecientes al género Drulisvirus, mientras que otros bacteriófagos de

Klebsiella, también Podoviridae, se ubicaron en el mismo grupo del género Przondovirus conformado por Klebsiella phage KP32 y Klebsiella phage K5. Otros fagos pertenecientes a la familia Siphoviridae y Myoviridae formaron grupos separados bien definidos, sugiriendo que BaqKPR2 es un nuevo integrante del género Drulisvirus.

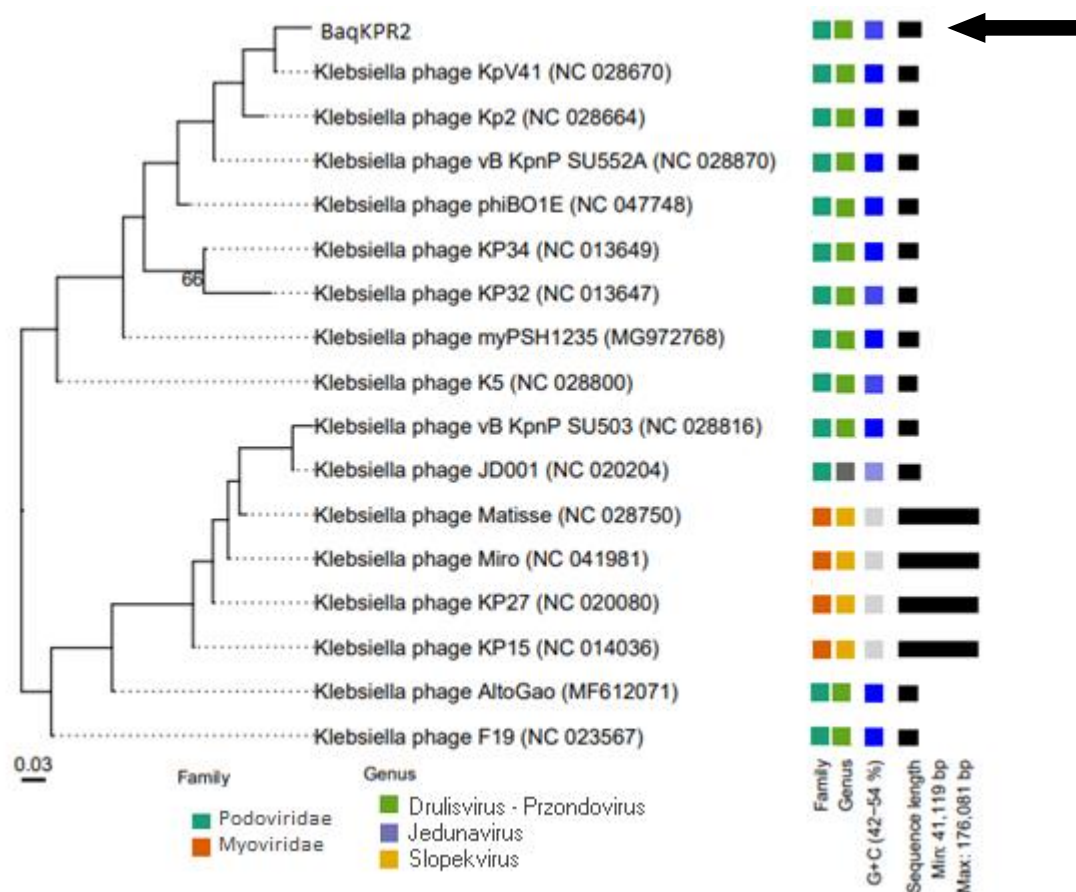
Figura 23. Agrupamiento de los bacteriófagos de *Klebsiella spp.*



1. Drulis (Podo); 2. Slopekvirus (Myo); 3. Przondovirus (Podo); 4. Jedunavirus (Myo)

Los resultados obtenidos mediante ANI fueron corroborados por la reconstrucción de árbol filogenético obtenido mediante VICTOR que se muestra en la figura 24, aquí se observa que BaqKPR2 se agrupa con otros fagos Podoviridae formando un clado con los fagos del género Drulisvirus.

Figura 24. Árbol filogenético de bacteriófagos de *Klebsiella* spp.



5.1.2 Discusión

La resistencia bacteriana a los antibióticos representa un gran desafío tanto para los médicos, las entidades de salud, del control y la prevención de brotes y para los científicos que trabajan en la ardua búsqueda de soluciones para esta problemática. Desde este contexto, en las últimas décadas, se ha hondado en el aislamiento de bacteriófagos que puedan brindar oportunidades de solución. Sin embargo, la naturaleza misma de los bacteriófagos los hace ser únicos y muy variables, aunque sean aislados a partir de un mismo hospedador. Hitchcock M. et al 2023 (146) describe la amplia variabilidad genética de los bacteriófagos incluso en aquellos que

son aislados de un mismo hospedador y expresa que es una línea de investigación aún en desarrollo, y que seguirá creciendo en la medida en que no se logre una solución detener la resistencia bacteriana. Por lo que, el aislamiento y la caracterización de nuevos bacteriófagos brinda información valiosa y útil para los científicos.

Los más de 44 mil genomas de bacteriófagos disponibles en GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (147) y la reciente reclasificación por parte el Subcomité de Virus Bacterianos del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), dan cuenta de la gran variabilidad de estos virus. Esta última actualización del ICTV, precisamente abolió la clasificación taxonómica basada en la morfología de los fagos, ya que ésta no reflejaba su historia evolutiva debido a su alta variabilidad genética (148). Por lo que se debe insistir en la búsqueda de nuevos bacteriófagos hasta encontrar el más indicado para la Fagoterapia.

En este contexto, este trabajo permitió el aporte de dos nuevos bacteriófagos aislados de hospedadores bacterianos ampliamente reconocidos como problemas de salud pública a nivel mundial, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*. De estos dos fagos llama la atención que BaqSau1 muestra una fuerte actividad lítica a una variedad de hospedadores bacterianos, tanto a cepas sensibles (MSSA), como a resistentes (MRSA), y a otras especies del género *Staphylococcus* como *epidermidis* y *saprophyticus*, por lo que se puede considerar a BaqSau1 como un bacteriófago polivalente, esta característica también fue descrita por Nakamura F. Et. al 2018 (149) en el bacteriófago phiSA012. Los bacteriófagos polivalentes tiene la capacidad de infectar diferentes cepas, especies o géneros de bacterias según Hyman P y Abedon S. 2010 (150) y Ross A, Ward S y Hyman P. 2016 (151). Por su

parte, BaqKPR2 tiene un rango de huésped limitado, lo cual es característico de los fagos lisógenos de *Klebsiella*, en un estudio realizado por Townsend E. 2021 (152) en el cual aisló 30 fagos de *Klebsiella* con miras a la fagoterapia, encontró que, de los fagos analizados, los líticos presentan un amplio rango de hospedadores a excepción de los pertenecientes a familia Drulivirus que, aun siendo líticos, presentan un rango de infección más limitado. Por su parte, los fagos lisógenos tienen un rango de infección limitado a su hospedador de aislamiento, lo que coincide con BaqKPR2.

El rango de huésped entonces describe la especificidad de un bacteriófago, este parámetro está determinado por la capacidad del virus de reconocer y unirse a receptores de la pared bacteriana, la cual está mediada por diferentes factores como la especificidad por las proteínas de unión al fago, interacciones bioquímicas durante la infección, la presencia de profagos o plásmidos, y los mecanismos de resistencia de la bacteria a la infección, entre otros (150,151,153).

Éste es un factor determinante para la aplicación que se le puede dar a un bacteriófago, un fago con un rango de infección limitado es más propicio para su aplicación en fago terapia, mientras un fago con un amplio rango de huéspedes suele ser de mayor utilidad para el desarrollo de técnicas de identificación, uso en prospección o biocontrol (151). Nilsson 2014 (154) explica que en promedio un fago es capaz de infectar 2 tipos de bacterias generalmente de diferentes cepas o serotipos de una misma especie, por lo que en fagoterapia es usual la utilización de un coctel de distintos fagos que identifiquen varios blancos para una misma cepa o especie.

Por otra parte, la determinación de la multiplicidad de infección es un parámetro crucial en la caracterización de nuevos fagos, Abedon S. 2016 (155) explica que este parámetro nos permite conocer cuántos fagos pueden infectar una misma célula huésped al mismo tiempo, es decir la dosis de fagos necesaria para infectar la célula huésped y que logre completar el ciclo de vida del fago y replicarse dentro de la célula huésped. Aunque muchos factores pueden influir en el estilo de vida de los fagos, Zhang W. Et. al 2021 (156) hace referencia de que comúnmente, se considera que una MOI alta favorece la lisis mientras una MOI baja favorece la lisogenia. Es decir que con base en este parámetro se puede decidir qué aplicabilidad puede tener el fago en estudio, mientras que para la fagoterapia y biocontrol, los fagos con MOI altas son más favorables, mientras que para el uso de fagos en ingeniería genética y en la producción de moléculas, fagos con una MOI baja son más convenientes porque permite la recombinación genética de los fagos y su lisogenia (150,155,156). A pesar de que BaqSau1 se puede considerar un fago polivalente, no se logró determinar su dosificación por su fuerte reacción lisógena, por el contrario, BaqKPR2, aunque tiene un rango de hospedadores limitados, presenta también una MOI baja (MOI de 0.0001).

Aunque la polivalencia de BaqSau1 es una característica muy importante, por parte de BaqKPR2 la presencia del halo turbio en la periferia de las placas de lisis durante el aislamiento y la caracterización de este bacteriófago, lo convierte en un importante candidato para la fagoterapia, por lo que esto se considera un sello distintivo de la actividad depolimerasa de los bacteriófagos de bacterias gram negativas y puede

utilizarse para identificar fagos dirigidos a la cápsula rápidamente según Knecht L. Et. al 2020 (26).

En este sentido, aunque BaqSau1 presenta un rango de infección mayor, no es tan propicio su uso para fagoterapia con viriones intactos y si tenemos en cuenta que no se logró la determinación de la dosificación de éste por su rápida lisogenación, podemos concluir que es más indicado para su uso en otras técnicas biotecnológicas como en ingeniería genética o para la detección, marcaje y seguimiento bacteriano. Por su parte BaqKPR2, aunque tiene un rango de huésped limitado, al presentar una dosificación baja (MOI de 0.0001) es más propicio para uso en fagoterapia principalmente por la alta actividad enzimática de la depolimerasa del virión sin necesidad de su obtención de forma recombinante.

De BaqSau1 también se destaca la proteína encargada de la unión al hospedador o RBP, la cual constituye un sofisticado dispositivo en el extremo distal de cola del virión, especializado en identificar receptores proteicos o carbohidratos de pared en el hospedador bacteriano y permitir la entrada del material genético a su hospedador, por lo que es una proteína conservada en fagos de bacterias gram positivas principalmente. Se evidencia que esta estructura está compuesta por tres cadenas muy similares denominadas Chain A, B y C, pero varían en su posición respectiva y la composición de los complejos, se encontró que ésta es muy similar a la descrita por Hrebik D. Et al. 2019 (157) perteneciente al bacteriófago P68. También se describe la estructura tower domain compuesta por dos subdominios similares, del mismo modo Koç Cengiz Et. al. 2016 (158) afirman que los subdominios de la tower

domain comparten esencialmente la misma hoja β antiparalela, pero difieren en su estado oligomérico y las características estructurales circundantes.

De las RBPs de fagos de *S. aureus*, la del fago $\phi 11$ es una de las mejor estudiadas, se encontró que estas proteínas constitutivas son muy conservadas en fagos con cola principalmente de bacterias gram positivas, presentan también dominios con acción hidrolasas de peptidoglicano, endosialidasas, alginato liasas y hialuronato liasas, que cumplen principalmente la función de degradación de la pared bacteriana y permitir la eyección del material genético según Leprince A., Nuyten M. y Mahillon J. 2022 (159) y Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., y Maciejewska, B. 2015 (160)

Con respecto a la estructura genómica, tanto de BaqSau1 como BaqKPR2 presentan la organización clásica de los bacteriófagos tipo DNA según lo descrito por Lima-Mendez G. Et. al 2011 (161). Algunos autores han establecido módulos funcionales con respecto a la ubicación de cada CDS, también lo compactado que están estos genomas permiten su estudio de forma modular ya que menos del 10% del genoma para ambos fagos se podrían considerar como secuencias intergénicas. De modo que se identificaron 6 módulos en cada uno de los fagos de este estudio.

De BaqKPR2, se destacan el CDS 42 y 53 que codifican para una endonucleasa putativa con un dominio conservado característico de la familia de Endonucleasas HNH (pfam13392) y tipo VII, respectivamente. Éstas son pequeñas proteínas de digestión y de unión al ADN capaces de transferir elementos genéticos de genomas

que contienen esta enzima a genomas que no las poseen, promoviendo así la recombinación de genes en los bacteriófagos (162). Ambos bacteriófagos presentan un módulo lítico el cual será ampliamente discutido en el capítulo 2.

Con respecto a la genómica comparativa de estos fagos, se pudo establecer que, si bien ambos guardan una alta homología con otros fagos ya descritos, ambos corresponden a nuevos miembros de cada una de las familias en las cuales fueron clasificadas según el ICTV para el año 2023. De modo que BaqSau1 es clasificado como un nuevo miembro de la familia Dubowvirus y BaqKPR2 como un nuevo miembro de la familia Drulivirus conforme a los resultados de ANI, que establece que un promedio de identidad menor al 95% corresponde con un nuevo miembro de la familia, un valor superior corresponde a uno de los miembros ya descritos según Yoon S. Et. al 2017 (121). Esto es posible debido a la alta variabilidad de los fagos descrita por Hyman P y Abedon S. 2010, según Ross A, Ward S y Hyman P. 2016 (150,151).

5.1.3 CONCLUSIONES

Este trabajo presenta el aporte de dos nuevos bacteriófagos, vB_KpnP_BaqKPR2 y vB_SauS_BaqSa1, aislados de hospedadores bacterianos ampliamente reconocidos como problemas de salud pública a nivel mundial. Los bacteriófagos vB_KpnP_BaqKPR2 de *K. pneumoniae* y vB_SauS_BaqSa1 de *S. aureus* se identificaron como nuevos miembros de las familias Drulivirus y Dubowvirus respectivamente, conforme a la última actualización del ICTV 2023.

Ambos bacteriófagos muestran características microbiológicas y genómicas que dan muestra de la múltiple utilidad biotecnológica que pueden tener, ya sea para su utilización como viriones intactos o sus proteínas derivadas. Mientras BaqSau1 muestra una gran polivalencia. Por su parte, BaqKPR2 muestra una fuerte actividad depolimerasa por lo que ambos podrían ser importantes candidatos para la fagoterapia o para uso biotecnológico.

A pesar de la polivalencia de BaqSau1, este no es tan propicio para fagoterapia con viriones intactos, por su actividad lisogénica, siendo más indicado para aplicar en otras técnicas biotecnológicas como en ingeniería genética o para la detección, marcaje y seguimiento bacteriano. BaqKPR2, aunque tiene un rango de huésped limitado, presenta una dosificación baja, lo que lo hace un candidato más propicio para fagoterapia, principalmente por la alta actividad depolimerasa del virión sin necesidad de su obtención de forma recombinante.

También se destacan otro tipo de proteínas derivadas de estos dos fagos como la proteína de unión al hospedador (RBP) de BaqSau1 especializado en identificar receptores proteicos o carbohidratos de pared en el hospedador bacteriano, que podrían tener gran utilidad para el desarrollo de técnicas de identificación bacteriana. De BaqKPR2 se destacan que codifican dos endonucleasas que pueden ser usadas en técnicas de recombinación genética.

CAPÍTULO 2.

5.2 Caracterización *in silico* de las depolimerasas de los bacteriófagos BaqSau1 y BaqKPR2.

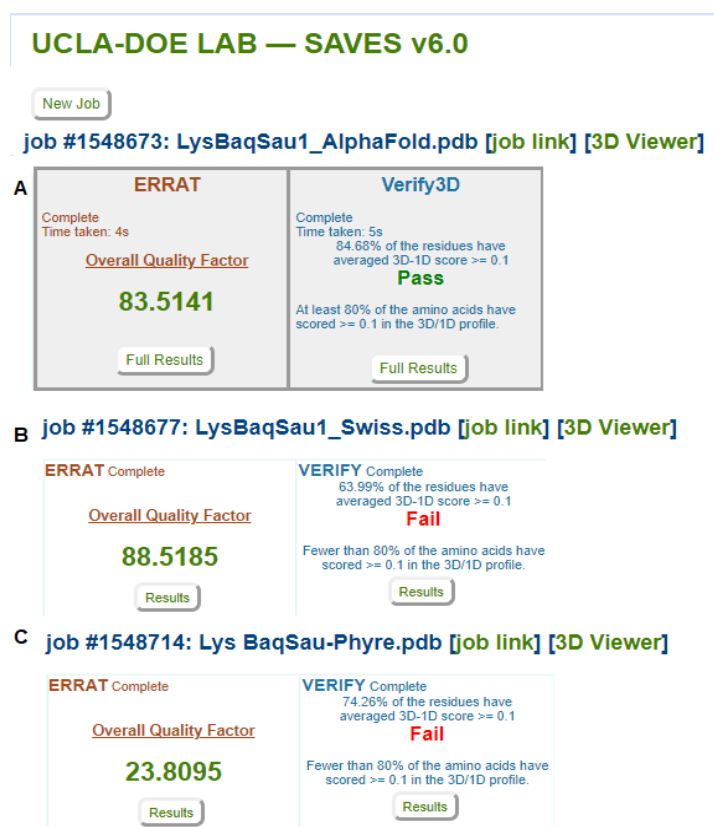
El término depolimerasa, como se abordó en el capítulo anterior, engloba una serie de enzimas líticas que poseen todos los bacteriófagos, las cuales tienen la capacidad de degradar componentes constitutivos de la pared bacteriana y que estos virus utilizan, ya sea para permitir la entrada de su material genético o para permitir la salida de los nuevos viriones desde el interior de la célula. El objetivo de este capítulo es ampliar las características mecanísticas de las enzimas depolimerasas de los bacteriófagos BaqSau1 y BaqKPR2.

5.2.1 Análisis estructural de la endolisina de BaqSau1 (LysBaqSau1) y el dominio catalítico CHAP (CHAP-BaqSau1).

Con base en la caracterización genómica y a la función predicha identificada por RAST-tk (110) utilizado para la anotación del genoma se determinó que el CDS 27 corresponde a la Lisina de BaqSau1 (LysBaqSau1). Esta proteína se encuentra en la cadena positiva del genoma y tiene un tamaño de 1413pb, 471 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 53.2 KDa y presenta una alta homología (99.3%) con la endolisina del bacteriófago B236 con No. de acceso YP_009209189.1.

Se realizaron tres modelamientos de la proteína como se explicó en la metodología y con base en los criterios de calidad, se aceptó el modelo obtenido mediante AlphaFold, los datos de calidad se muestran en la figura 25.

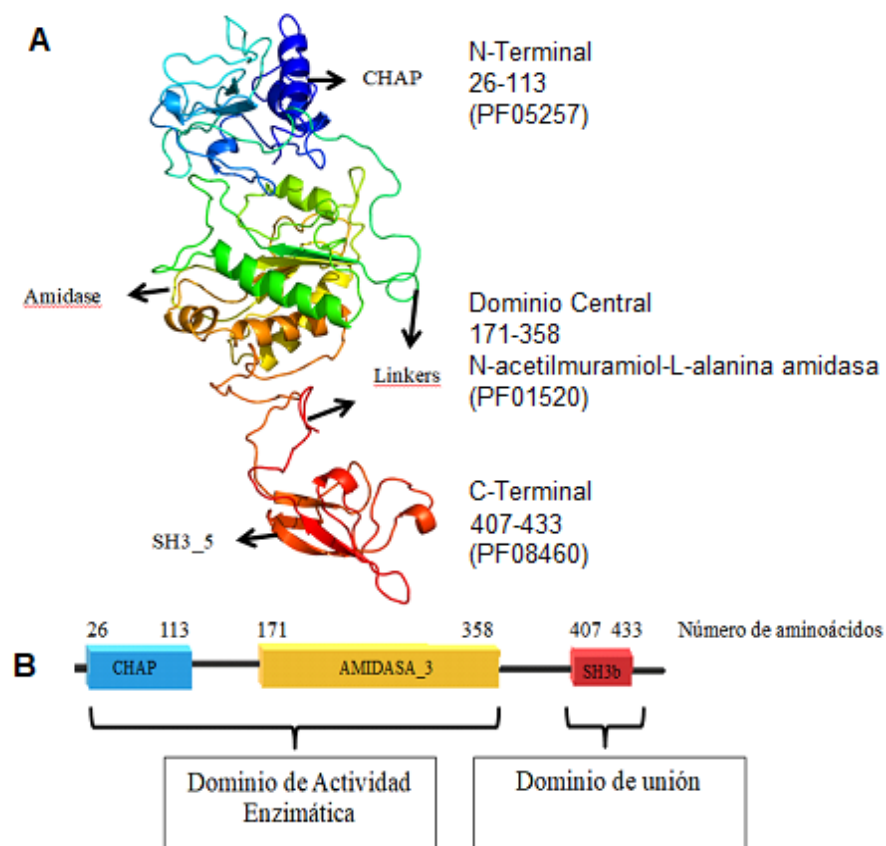
Figura 25. Evaluación de calidad de los modelos de LysBaqSau1 obtenidos mediante los tres enfoques aplicados.



Screen de los resultados de la validación de calidad mediante Errat y Verify3D: A. AlphaFold; B. SwissModel; C. Phyre2

El análisis estructural muestra que LysBaqSau1 está constituida por 3 dominios funcionales. En su extremo N-terminal, aproximadamente entre el aminoácido 26 y 113, se encuentra el dominio CHAP; en la parte intermedia de la proteína, entre los aminoácidos 171 y 358, se encuentra un dominio amidasa_3 de tipo N-acetylmuramiol-L-alanina, estos dos tienen la función catalítica; y por el último, en el extremo C-terminal se encuentra el dominio de reconocimiento y unión al sustrato tipo SH3-5 entre los aminoácidos 407 y 433 como se muestra en la figura 26.

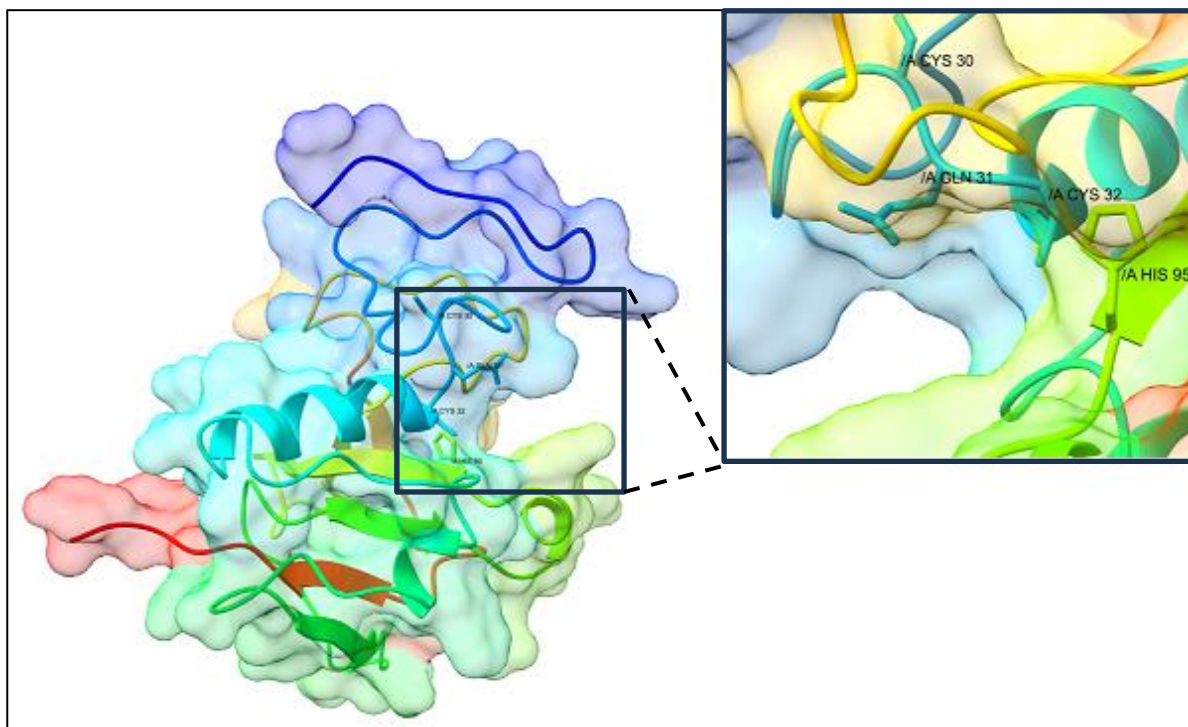
Figura 26. Estructura tridimensional de LysBaqSau1.



A. Estructura tridimensional de LysBaqSau1; B. Módulos funcionales

La estructura tridimensional del dominio catalítico CHAP se muestra en la figura 27. Aquí se observa el sitio activo característico de este dominio constituido por dos residuos de cisteína (Cys) en la posición 30 y 32, histidina (His) en la posición 95 y glutamina (Glu) en la posición 31 formando un dominio con la forma similar a una mano (Hand-Like) y en el fondo se encuentra su sitio activo.

Figura 27. Estructura tridimensional del dominio catalítico CHAP y su sitio activo



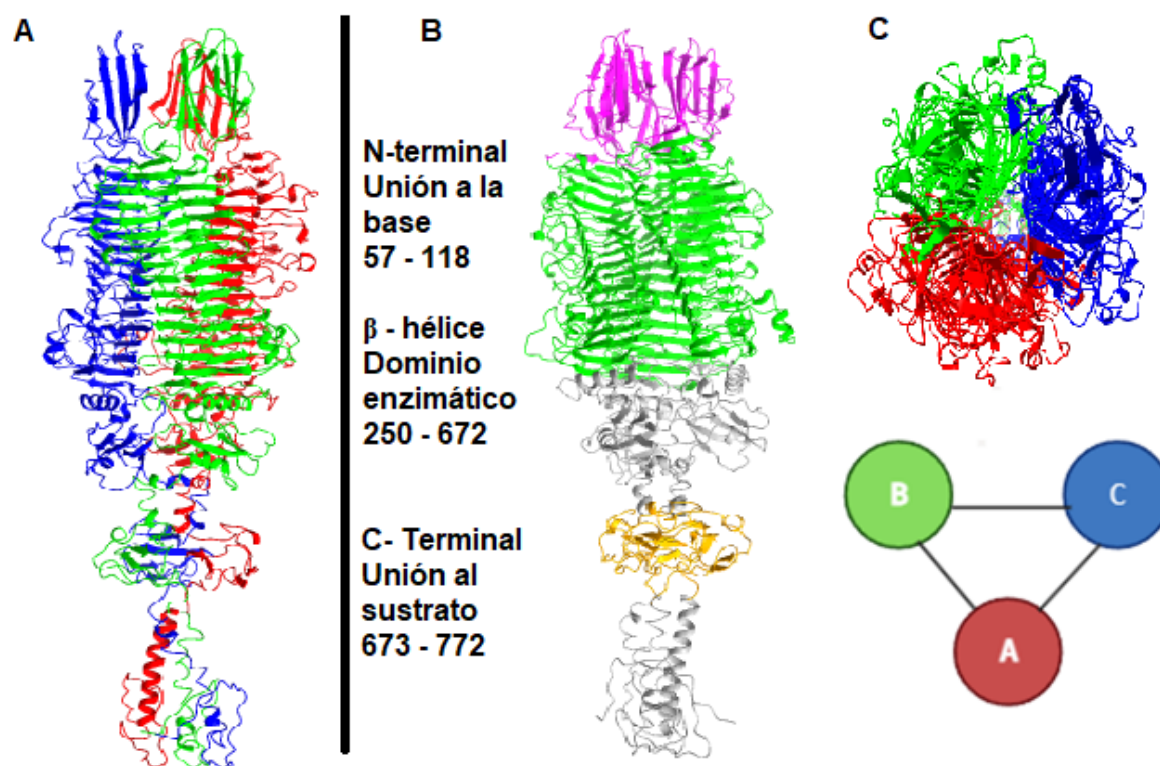
Dominio CHAP de la lisina del fago BaqSau1. Ampliado el sitio activo tipo Hand-like y los residuos de interacción Cys 30 y 32, Hys 95 y Glu 31.

5.2.2 Análisis estructural de la proteína de punta de cola (TSP) de BaqKPR2

Como se mencionó en el análisis genómico, se identificó el ORF 28 como la secuencia codificante de la proteína de la punta de la cola (TSP) de BaqKPR2, la cual tiene una estructura modular que consta de 3 unidades monoméricas idénticas de 772 residuos de aminoácidos por cadena y un peso molecular de 256 kDa aproximadamente en su forma homotrimérica. La TSP es una proteína modular compuesta por 3 dominios estructurales. El dominio N-terminal incluye los residuos 57 a 118 de cada monómero y contiene seis cadenas β -helicoidales, este dominio está separado del resto de la proteína y es el encargado de unirse a la base de la cápside del fago o a otras estructuras del virión, a la vez que está implicado en la

trimerización de la proteína. Un segundo dominio intermedio compuesto de un β -barril de catorce cadenas paralelas que comprende los residuos 250 a 672 y que contiene la actividad enzimática. Por último, el dominio C-terminal que implica los residuos 673 al 772 (figura 28).

Figura 28. Arquitectura de la TSP de BaqKPR2



A. cadena A: rojo; cadena B: verde; cadena C: azul. **B:** Dominios: Púrpura: dominio N-terminal; Verde: Dominio central β -Barril; Amarillo: C-terminal. **C.** Vista superior del extremo N-terminal, se contempla la estructura del domo con una cavidad intercatenaria y disposición de las cadenas.

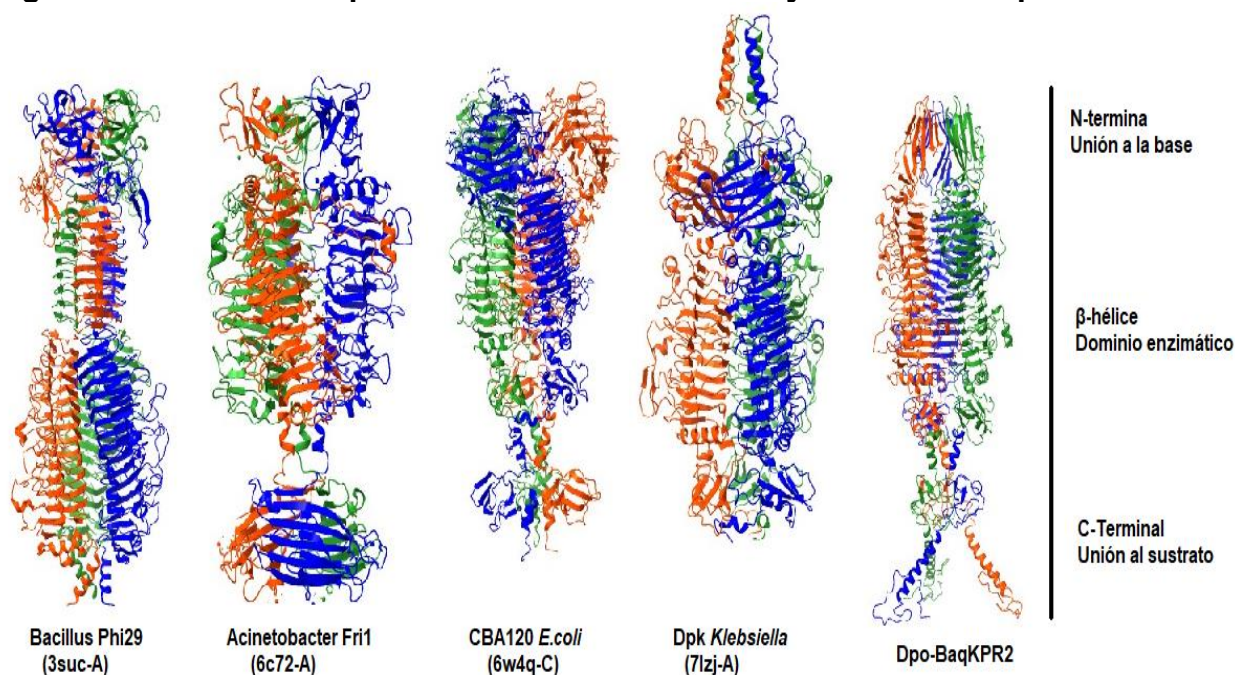
La TSP de BaqKPR2 presenta una alta homología con la del fago Kp9 descrito por Dunstan R. Et.al 2021 (128) con un 99.4% de probabilidad de identidad. Sin embargo, ambos fagos comparten sólo un 9% de homología. La figura 29 muestra un análisis comparativo de las estructuras de TSP clásicas descritas en la literatura

donde podemos evidenciar la gran variabilidad de esta proteína. La tabla 18 describe características de las TSP.

Tabla 18. TSP de estructura clásica descritas en la literatura.

PDB	%id	Descripción	Fago	Hospedador	Referencia
6w4q	13	TSP	CBA120	E. coli	Greenfield J., Et. al. 2021. (163)
3suc	10	Pre-cuello	Phi29	Bacillus	Xiang, Y. 2011 (164)
6c72	10	Partícula asociada de acción Glicosidasa/hidrolasa	Fri1	Acinetobacter	Lai M. Et. al 2018 (165)
7lzi	13	Depolimerasa	Dpk	Klebsiella	Dunstan 2021 (128)

Figura 29. Análisis comparativo de las TSP clásicas y la TSP de BaqKPR2

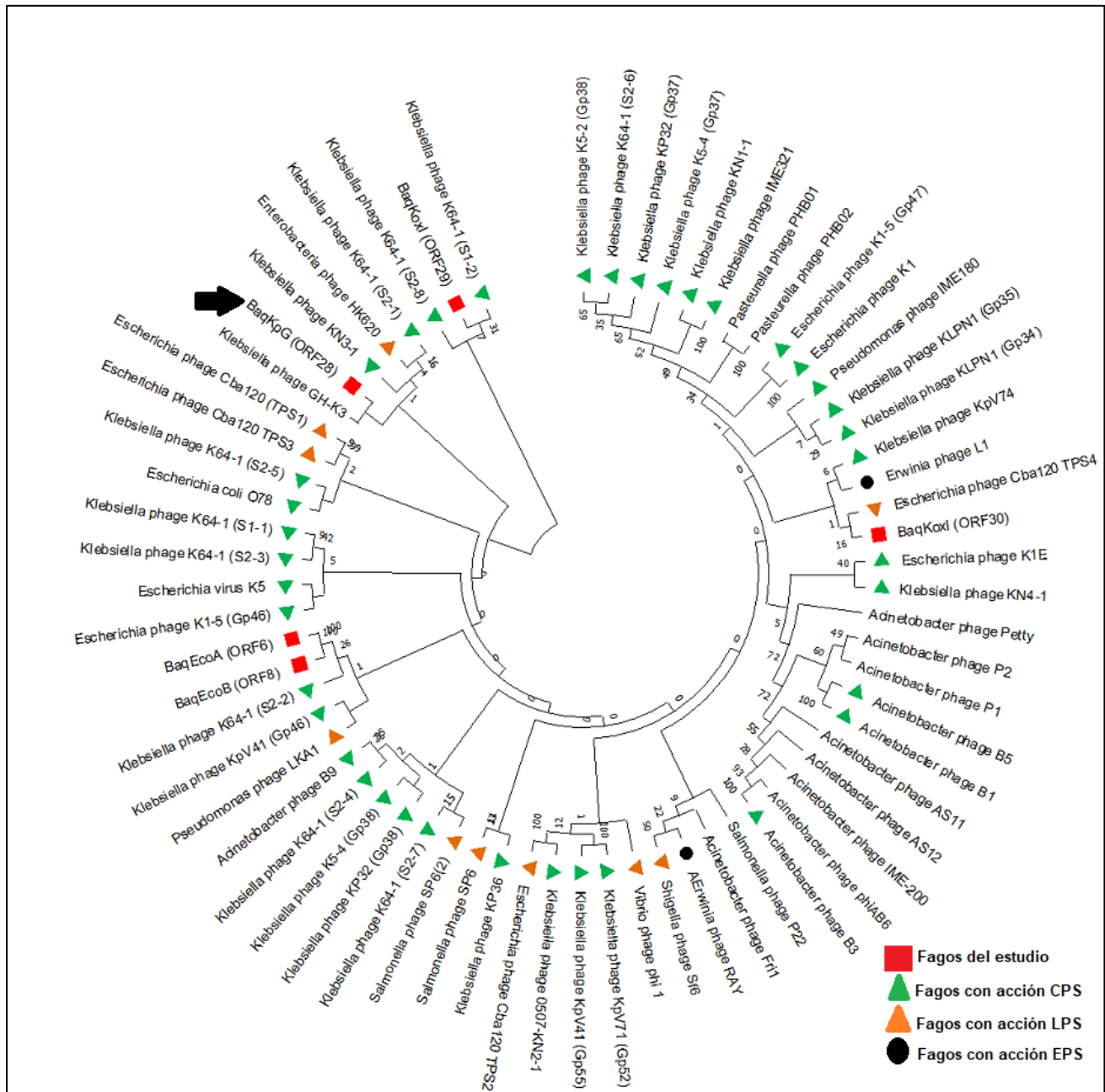


TSP de bacteriófagos descritos: (Código PDB). Se indican los dominios conservados

El análisis filogenético de la TSP también da muestra de la variabilidad genética de esta proteína. En el dendograma de la figura 30, se puede observar que estas proteínas se agrupan conforme a la afinidad por el sustrato, en lugar de tener una agrupación clásica relacionada con el género del fago. Mediante este análisis se

pudo determinar que La TSP de BaqKPR2 presenta una relación filogenética más cercana con la del bacteriófago GH-K3, mientras que mediante HHpred estas dos proteínas presentan una homología menor con respecto a la del bacteriófago Kp9. Este hallazgo sugiere que la depolimerasa recombinantes podrían tener una acción de amplio espectro sobre los polisacáridos capsulares independiente del hospedador bacteriano.

Figura 30. Análisis filogenético de las TSP con acción depolimerasa



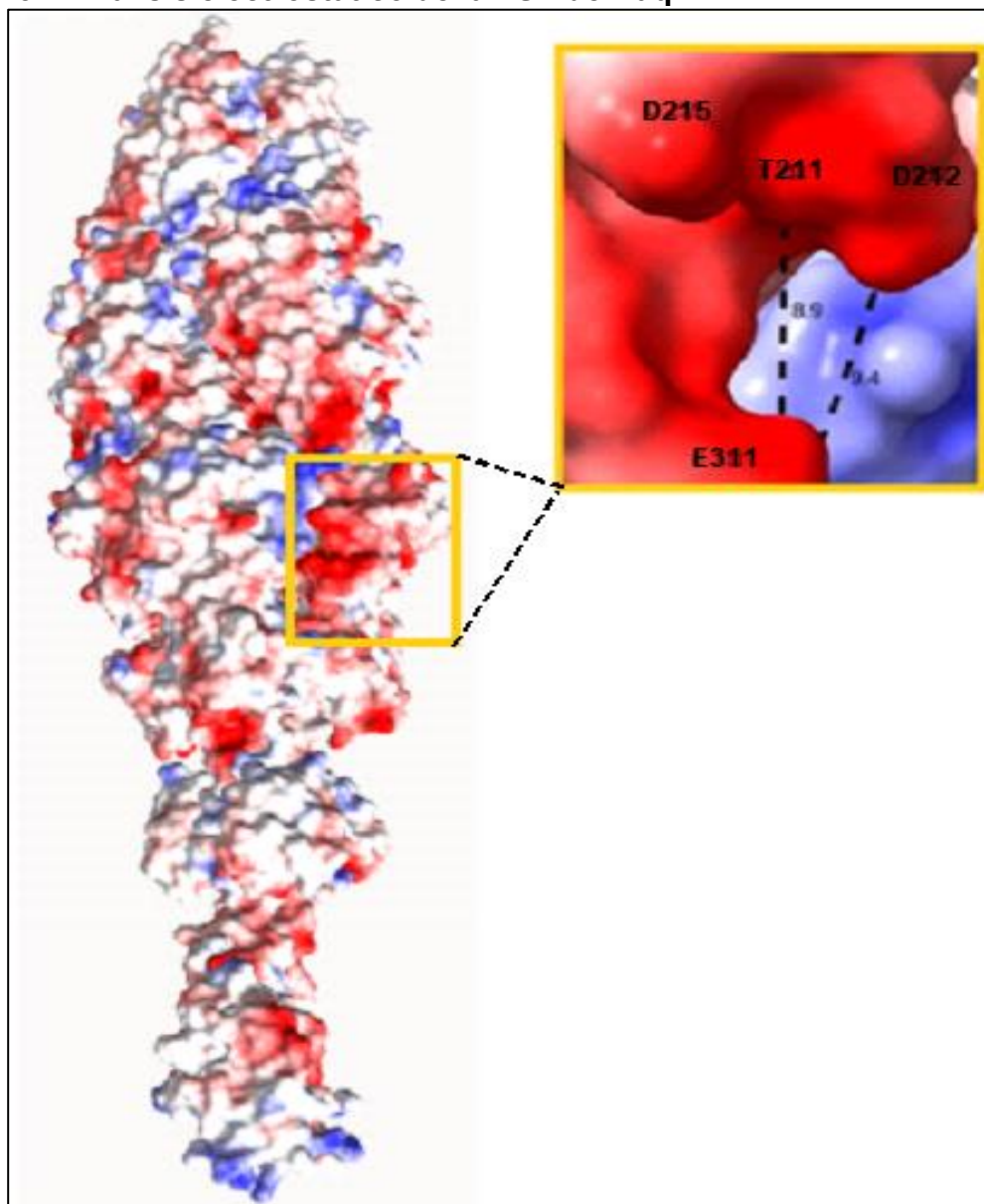
La filogenia de las TSP descritas: se realizó el cálculo mediante el análisis de máxima verosimilitud y con base en la matriz JTT. El árbol de consenso fue inferido con base en un bootstrap de 100 repeticiones. Los valores representativos de las ramas se observan en la gráfica con un valor de arranque del 50 %. Este análisis involucró 67 secuencias de aminoácidos y hubo un total de 1678 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11. Señalada en el cuadro rojo la TSP de BaqKPR2

Determinación del dominio Depolimerasa (Dpo) de BaqKPR2

La acción depolimerasa de BaqKPR2 fue evidente desde su aislamiento en cultivo de doble capa agarizada (ver figura 5). La placa de lisis muestra a su alrededor un halo turbio de fondo claro, esto se considera un sello distintivo de la actividad depolimerasa de los bacteriófagos y puede utilizarse para identificar fagos dirigidos a la cápsula rápidamente según Knecht L. Et. al 2020 (26). Esta característica se abordó en el capítulo anterior.

El análisis electrostático de la TSP de BaqKPR2 se muestra en la figura 31, en ésta se evidencia una región hendida con forma de bolsillo con carga negativa conformado por la triada de residuos ácidos, ácido aspártico en la posición 212 y 215, ácido glutámico en la posición 311 y treonina en la posición 211. Estos aminoácidos son característicos de los sitios activos de un sin número de enzimas que degradan componentes de la pared celular bacteriana (79,86), por lo que se propone como sitio activo.

Figura 31. Análisis electrostático de la TSP de BaqKPR2



Sitio activo propuesto. D: Ácido aspártico, T: Treonina; E: Ácido Glutámico. La interacción entre los residuos 212 y 311 está dada a una distancia de 9.4Å y de los residuos 211 y 311 es de 8.9Å

5.2.3 DISCUSIÓN

Como se mencionó en el capítulo 1, tanto *S. aureus* como *K. pneumoniae* son considerados un problema de salud pública a escala mundial y catalogadas por la OMS como patógenos prioritarios para la búsqueda de soluciones que permitan contener la emergencia de cepas multi-resistentes (1).

En este sentido los bacteriófagos y las proteínas derivadas de éstos representan una alternativa para esta problemática. En el capítulo 1 se abordó ampliamente sobre las características de los bacteriófagos BaqSau1 de *S. aureus* (166) y BaqKPR2 de *K. pneumoniae* aislados de aguas residuales. En este capítulo se abordaron las características de la LysBaqSau1 y su dominio catalítico CHAP, ya que a pesar de la polivalencia de BaqSau1, descrita en el capítulo anterior, por ser un fago crónico (lisógeno-profágico) no es un buen candidato para la fagoterapia. BaqKPR2 que mostró una fuerte acción depolimerasa durante su aislamiento, se fijó como objeto de estudio de este trabajo el análisis de su enzima depolimerasa.

Como se mencionó anteriormente el término depolimerasa engloba una serie de enzimas que tiene como sustrato componentes que constituyen la pared externa de las bacterias y según su mecanismo de acción se dividen en dos grupos, las lisinas con acción hidrolasa, y las depolimerasas; las primeras permiten la salida de los viriones al final del ciclo lítico, mientras que las segundas, permiten la adsorción del fago y la entrada del material genético a su hospedador (27).

El uso de las proteínas encargadas de la degradación del material constitutivo de la pared bacteriana representa una ventaja con respecto al uso del virión, ya que como es

conocido, los bacteriófagos están implicados en la transducción de genes de virulencia o resistencia de muchos géneros bacterianos incluido *S. aureus* (94) otra desventaja puede ser la dificultad para la distribución y dosificación de los viriones, entre otras (160).

Los polisacáridos que rodean la pared externa son producto de una larga historia evolutiva bacteriana, consideradas un importante factor de virulencia que protegen a la bacteria del sistema inmune y de los antibióticos, en este sentido el estudio de enzimas que degradan los polisacáridos bacterianos solas o combinadas con antibióticos representan una terapia antimicrobiana prometedora pero desafiante según Drusli-Kawa Z. Et. al 2015 (160), quien realizó una amplia revisión sobre los bacteriófagos y las proteínas derivadas de los fagos y los diferentes enfoques de aplicación de éstos. Por lo que cada nuevo bacteriófago aislado brinda una nueva esperanza de hallar una molécula con la suficiente actividad antimicrobiana en su forma recombinante, que pueda ser usada per se, como un antimicrobiano.

En los últimos años se ha explorado ampliamente la aplicabilidad biotecnológica de las lisinas (160) y el esclarecimiento de la arquitectura de LysBaqSau1 y de su dominio catalítico de CHAP (CHAP-BaqSau1) enriquece aún más la información disponible.

En este estudio se encontró que el dominio CHAP-BaqSau1 está determinado por la presencia de dos residuos conservados cisteína y uno de histidina y por la presencia de iones Ca^{+2} y Zn^{+} , coincidiendo con la estructura cristalográfica del dominio CHAPk (49), donde dichos residuos y los iones calcio y zinc, juegan un papel importante para su actividad enzimática. Sin embargo, el sitio activo de CHAP-BaqSau1 está determinado por la tétrada de residuos Cys30-Cys32-His95-Glu31, siendo distinto al descrito por Gu J. et

al 2014 (50) de LysGH15 el cual está conformado por la tétrada Cys-His-Glu-Asn y también difiere del descrito por Sanz-Gaitero et al. 2014 (49) de CHAPk que está formado por los residuos Asp, Asp, Tyr, His y Asp.

Con respecto a la presencia de los iones zinc y calcio en el sitio activo de CHAP, ensayos de mutagénesis dirigida realizados por Gu J. et al 2014 (50) con LysGH15 confirmaron que el calcio media la interacción entre los residuos del sitio activo, mientras que el zinc ayuda al mantenimiento de la estructura de la Lisina intacta, dándole estabilidad al dominio amidasa-2 y su unión al dominio CHAP. La dependencia al calcio de las lisinas también ha sido reportada en otras enzimas líticas estafilocócicas como phi11 (48) y estreptocócicas como B30 (167) y PlyC (168).

Con respecto a la forma del sitio activo, CHAPBaqSau1 presenta una estructura tipo mano o “hand-like”, estructura característica de las enzimas hidrolíticas y coincide con la reportada por Gu J. et al 2014 (50) de CHAP-GH15. Sin embargo, tanto CHAP-BaqSau1 como CHAP-GH15 aunque concuerdan en longitud con el sitio activo “hand-like” clásico caracterizado por contener 12 residuos y la presencia del ion calcio según lo descrito por Zhou Y., Et al. 2006 (169), CHAP-BaqSau1 difiere en que en su estructura secundaria ya que las regiones flanqueantes no poseen dos hélices como en la clásica si no que el sitio de unión de calcio posee una sola hélice, esto coincide con lo descrito por Zhou Y., Et al. 2006 (169) y observado también en otras enzimas tipo Hand-like como en la proteína periplásmica de unión a galactosa en *S. typhimurium* (169). Esta diferencia sugiere que el mecanismo de acción de CHAP-BaqSau1 está dirigido hacia la *N*-acetilgalactosamina (GalNac), un ácido teicoico presentes en algunas cepas de *staphylococcus* coagulasa

negativos (CoNS) como *S. lugdunensis* y el linaje ST395 de *S. aureus* descrito por Winstel (170), éste es un receptor utilizado por el bacteriófago Φ 187 para su adsorción y está implicado en la transferencia horizontal de islas de patogenicidad en *S. aureus*. Sin embargo, en otro estudio realizado por Winstel V. Et. al 2013 identificó que ST395 es resistente a los fagos Phi11 y Phi80 (171), es decir que no todos los fagos utilizan éste mismo receptor para su adsorción, por lo que se podría decir que el linaje ST395 de *S. aureus* sería sensible a la acción de CHAP-BaqSau1, esto también explica la polivalencia BaqSau1.

En cuanto a la identificación del dominio depolimerasa de BaqKPR2 se siguieron los criterios descritos por Latka A. Et. al 2019 (57) quien describe que para poder definir un dominio depolimerasa se deben cumplir con las siguientes condiciones 1. la proteína debe tener más de 200 residuos; 2. la proteína debe anotarse como una proteína de fibra de la cola en la base de datos del NCBI; 3 la proteína debe mostrar homología con los dominios anotados como liasa (hialuronidasas, pectina/pectato liasas, alginato liasas, K5 liasas) con una confianza de al menos al menos el 40 % en Phyre2; (4) la longitud de la homología con uno de estos dominios enzimáticos debe abarcar al menos 100 residuos; y 5. Phyre2 debe predecir una estructura típica de hélice β en la zona central de la proteína. En este sentido DpoBaqKPR2 cumple con todas estas condiciones, por lo que el CDS 28 fue propuesto como la TSP que contiene este dominio en el fago BaqKPR2.

Los resultados obtenidos mediante el estudio filogenético de la TSP de BaqKPR2 demuestran la gran variabilidad de esta proteína, como se explicó con anterioridad, aquí se encontró que la TSP de BaqKPR2 forma un nodo filogenético con la depolimerasa

Dep32 del fago GH-K3 descrito por Cai Et. al 2018 (172) a pesar de que estos dos bacteriófagos no tienen una relación filogenética cercana.

En el análisis filogenético las TSP de los fagos analizados formaron clados conforme al sustrato que degradan, es decir que se agruparon conforme a su mecanismo de acción si es dirigida a los polisacáridos capsulares (CPS) o si a lipopolisacáridos (LPS) o a expolisacáridos (CPS). Con base en esto, se puede deducir que la depolimerasa de BaqKPR tienen una acción dirigida sobre el tipo capsular 2 (K2) de *K. pneumoniae* y éste representa el sustrato para la depolimerasa del BaqKPR2, ya que la Dep32 del fago GH-K3 descrita por Cai et. al 2018 (172) tiene acción sobre ese tipo capsular en particular.

El tipo capsular 2 (K2) ha sido descrito previamente por Brisee Et. al 2004 (173) como uno de los tipos capsulares más virulentos de *K. pneumoniae*, éste también ha sido propuesto como un importante molécula prometedora que podría usarse como candidata a vacuna contra éste patógeno.

En cuanto al sitio activo del dominio depolimerasa de BaqKPR2 propuesto en este trabajo, se tomó como criterio para definirlo la presencia de una hendidura cargada negativamente ubicado en el segmento β -helicoidal de la proteína TSP (ver figura 31) según la metodología utilizada por Cai R. Et. al 2023 (174), de modo que se ha propuesto que el activo de la depolimerasa de BaqKPR2 presenta la tétrada de residuos compuesto Asp212-Glu311-Thr211-Asp215 lo que coincide con lo descrito por Cai R. Et. al 2023 (174) quien a través de ensayos de mutagénesis dirigida logró demostrar que el sitio activo de la Dpo32 estaba formado por la triada Glu, Asp y Glu. Sin embargo, el mismo autor también describió la presencia de otros residuos adyacentes a la triada anterior y

presentes en la hendidura en el centro β -helicoidal de la proteína, entre otros, describe dos residuos de treonina (Thr), por lo que no se descarta que la treonina que conforma la tétrada en el sitio activo de BaqKPR2 tenga alguna funcionalidad en su actividad depolimerasa, la treonina es un aminoácido apolar sin carga por lo que es propenso a formar interacciones con otras moléculas mediante puentes de hidrógeno, una gran variedad de enzimas.

Las depolimerasas comúnmente tienen un mecanismo de acción tipo liasa que producen la degradación de los enlaces glicosídicos sin provocar la liberación de oxígeno ni agua de esta reacción. Se han descritos varios tipos de liasas: alginato liasas, hialuronato liasa, pectin-liasa, K5-liasas y liasa específica del polisacárido O. En este estudio, mediante Phyre2, se determinó que la depolimerasa de BaqKPR2 presenta una alta homología con el tipo pectin-liasa y el mecanismo de acción se abordará en el siguiente capítulo.

5.2.4 CONCLUSIONES

En el capítulo 1 se abordó ampliamente las particularidades de cada fago y sus posibles aplicaciones con base en sus atributos, en este capítulo se hizo un abordaje desde la aplicación de sus proteínas depolimerasas de peptidoglicano.

La arquitectura de LysBaqSau1 muestra que ésta es una proteína modular y que tiene una alta actividad enzimática determinada por el dominio CHAP, su sitio activo está determinado por la presencia de los residuos conservados histidina y cisteína y también ácido glutámico (Cis30 y 32, Hys95 y Glu31) y la presencia de iones de Ca^{+2} y Zn^{+} . Esta

característica sugiere que LysBaqSau1 contiene una estructura tipo mano o “hand-like” particular de las enzimas hidrolíticas, muy conservada en otras lisinas de fagos de *S. aureus* (50). Los iones zinc y calcio por su parte, juegan un papel importante en su actividad enzimática, el calcio media la interacción entre los residuos del sitio activo, mientras que el zinc ayuda al mantenimiento de la estructura de la lisina intacta, dándole estabilidad al dominio amidasa-3 y su unión al dominio CHAP. CHAP-BaqSau1 difiere en que en la estructura secundaria propuesta comparada con otras antes descritas ya que las regiones flanqueantes no poseen dos hélices si no una, lo que sugiere que el mecanismo de acción de CHAP-BaqSau1 está dirigido hacia la *N*-acetilgalactosamina (GalNac), un ácido teicoico presente en algunas cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativos (CoNS) lo que explicaría su polivalencia.

Respecto a la depolimerasa de BaqKPR2 se pudo establecer, con base en los criterios de identificación que el CDS 28 corresponde a TSP y que éste contiene el dominio depolimerasa. El dominio depolimerasa de BaqKPR2 propuesto en este trabajo, presenta una alta homología con la depolimerasa Dep32 del fago GH-K3 (homología: 99.5%) a pesar de que estos dos bacteriófagos no tienen una relación filogenética cercana. Sin embargo, en el análisis filogenético de estos dos fagos, forman un clado monofilético demostrando que se agrupan con base en los sustratos sobre el cual actúan que en este caso es el polisacárido capsular K2 y no con base en su sinténia. El sitio activo propuesto para la depolimerasa de BaqKPR2 forma una hendidura cargada negativamente en el dominio β -hélices de la TSP, lo cual es un rasgo característico de las depolimerasas y que

ha sido ampliamente descrito y que en el caso de BaqKPR2 está compuesto por una tétrada con los residuos Asp212-Glu311-Thr211-Asp215, correspondiente a un tipo de enzima Pectin-liasa.

CAPÍTULO 3.

5.3 Determinación del mecanismo de acción de las depolimerasas de BaqSau1 y de BaqKPR2

Como se mencionó en los capítulos anteriores, el renovado interés en el estudio y aplicación de los bacteriófagos como agentes terapéuticos de los últimos años, ha generado prometedores avances en encontrar nuevas soluciones que conlleve a mitigar el problema de la resistencia antimicrobiana. Sin embargo, la selección de fagos para terapias y poder determinar qué fagos serán eficaces, depende de una gran variedad de factores en cualquiera de los ensayos de aplicabilidad descritos, ya sea de las características propias del virión, su vida útil y la aplicabilidad, como con las proteínas de derivadas de éstos, además de estos problemas, se suma la respuesta del individuo a quien se le aplica este tipo de terapia, este último, ya será objeto de estudio de otras investigaciones.

La gran variabilidad genética de estos virus hace que cada bacteriófago aislado sea una mina por descubrir, no importa si es uno o cien, cada fago tiene características que los hacen únicos e irrepetibles aun siendo aislados de un mismo hospedador, por lo que cada bacteriófago debe ser estudiado con detenimiento y se debe explorar cada una de sus características desde varios ensayos, siempre en la búsqueda de la mayor cantidad de

información posible que amplíen el abanico de opciones de la aplicación de cada fago aislado.

Desde esta perspectiva, el objeto de este capítulo es el abordaje *in silico* para el entendimiento del mecanismo de acción de las enzimas depolimerasas de BaqKPR2 y BaqSau1. Para explicar su mecanismo se analizó la interacción de ambas depolimerasa con importantes receptores de membrana bacteriana los cuales han sido descritos en otros bacteriófagos como receptores irreversibles para la adsorción de estos bacteriófagos.

Por parte de BaqSau1, se analizó tanto la interacción de la endolisina (LysBaqSau1) con la transglicosidasa de membrana de *Staphylococcus aureus* (SaMGT), la cual es una importante proteína implicada en la síntesis de la pared bacteriana y por tanto también es un blanco terapéutico a la hora de desarrollar nuevos antibióticos (135), como también la interacción de LysBaqSau1 con el peptidoglicano característico de *S.aureus* descrito en la página 60 en adelante se nombrará como NAG ,haciendo referencia al su contenido de N-Acetilglucosamina (138). Por otro lado, se realizó el mismo procedimiento con la TSP de BaqKPR2 que contiene el dominio depolimerasa, con éste se evaluó su interacción con la proteína OmpK36 la cual es una osmoporina constitutiva de la pared celular de *K. pneumoniae* y otras bacterias gram negativas, esta proteína está implicada en el transporte activo transmembranal y se ha descrito que mutaciones en esta proteína le confiere la resistencia a los carbapenémicos a *K. pneumoniae*, por lo que es también es considerada un importante blanco terapéutico (142), además esta proteína también ha sido descrita como un importante receptor de unión en otros fagos como GH-K3, KpNIH-

2 y FC3-11 para su adsorción en *K. pneumoniae* (141), de igual forma también se evaluó su interacción con el polisacárido capsular tipo 2, ya que con base en los resultados obtenidos mediante el análisis de sinténia tratado en el capítulo 2 (ver figura 28), la TSP de BaqKPR2 muestra una alta homología con Dep32 del fago GH-K3 que según Dunstan R. 2023 (141) tiene actividad depolimerasa sobre el tipo capsular K2

Dicho lo anterior, en este capítulo se abordará una aproximación atomística que sugiere que, aunque estas dos enzimas provienen de bacteriófagos distintos y de hospedadores de naturaleza distintas, uno gram positivo y el otro gram negativo, y aunque sus mecanismos de acción sean diferentes, éstos pudiesen ser complementarios si se piensa en futuras terapias antimicrobianas de amplio espectro. La comprensión molecular del mecanismo de acción de estas enzimas depolimerasas es fundamental para su aplicación en el control de infecciones causadas por *K. pneumoniae* y *S. aureus* resistentes a múltiples fármacos y representan una nueva estrategia prometedora para combatir estas infecciones.

5.3.1 Ensayos *in silico* de Lys_BaqSau1

Para obtener las conformaciones iniciales de los complejos, se efectuó un docking proteína-proteína mediante PyDockWEB como se explicó previamente. Éste genera 100 estructuras en formato .PDB de cada complejo y arroja también una tabla con los valores del cálculo de la energía electrostática, la energía de desolvatación, el componente de la energía de Van Der Waals y con base en la sumatoria de éstos, genera un cálculo de la energía de unión total el cual le asigna un rango a cada modelo.

Los resultados obtenidos para cada uno de los análisis realizados se muestran en la tabla suplementaria 1 del anexo 2. Para el análisis se tomaron los 5 modelos con la mejor puntuación total. Los posteriores análisis se basan en los complejos LysBaqSau1-SaMGT según PyDockWEB. Los datos se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Salida de puntuación de pyDockWEB del complejo LysBaqSau1-SaMGT

Complejo No.	Energía Electrostática	Desolvatación	Van Der Waals	Total	RANK
5072	-6.767	-33.773	75.338	-33.007	1
9546	1.425	-31.992	29.034	-27.664	2
6110	-11.087	-20.724	65.142	-25.297	3
7714	1.722	-33.164	66.855	-24.756	4
8291	-12.374	-13.320	55.958	-20.098	17

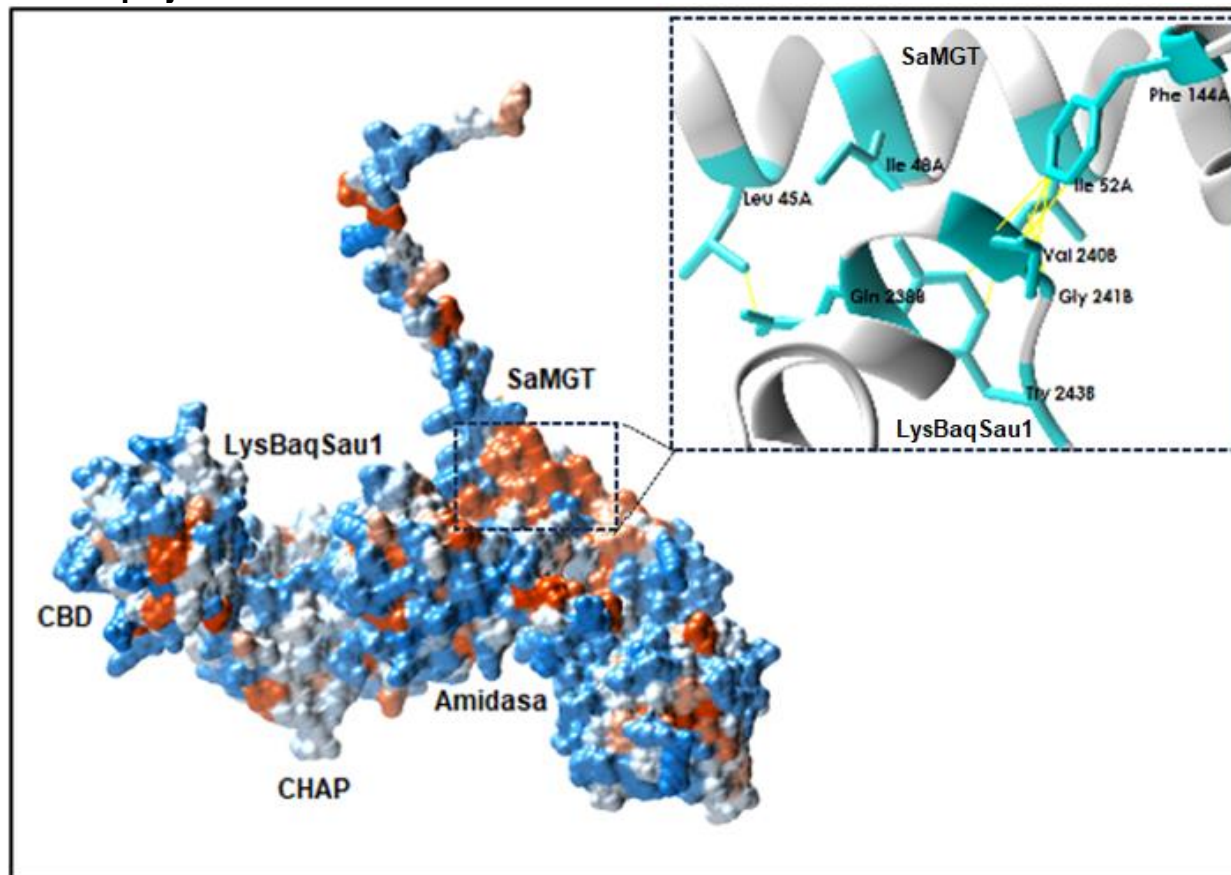
- LysBaqsau1-SaMGT:

Para este complejo se escogió el modelo No. 5072 por presentar la energía electrostática más favorable (-6.767). Según Gabb H, Jackson R. y Stemberg M 1997 (175) la interacción electrostática es un importante factor para discriminar entre varios modelos realizados mediante el análisis de interacción molecular mediante docking ya que es una de las fuerzas de mayor importancia e induce, por ejemplo, la unión de péptidos catiónicos a membranas de procariotas y la desestabilización de estas últimas.

Mediante el análisis de interacción molecular mediante docking molecular proteína – proteína se pudo identificar que el punto de interacción entre la lisina y SaMGT no se produce en el dominio CHAP si no corriente arriba de éste en el dominio amidasa de la lisina de BaqSau1, como se observa en la figura 32. La interacción está determinada por

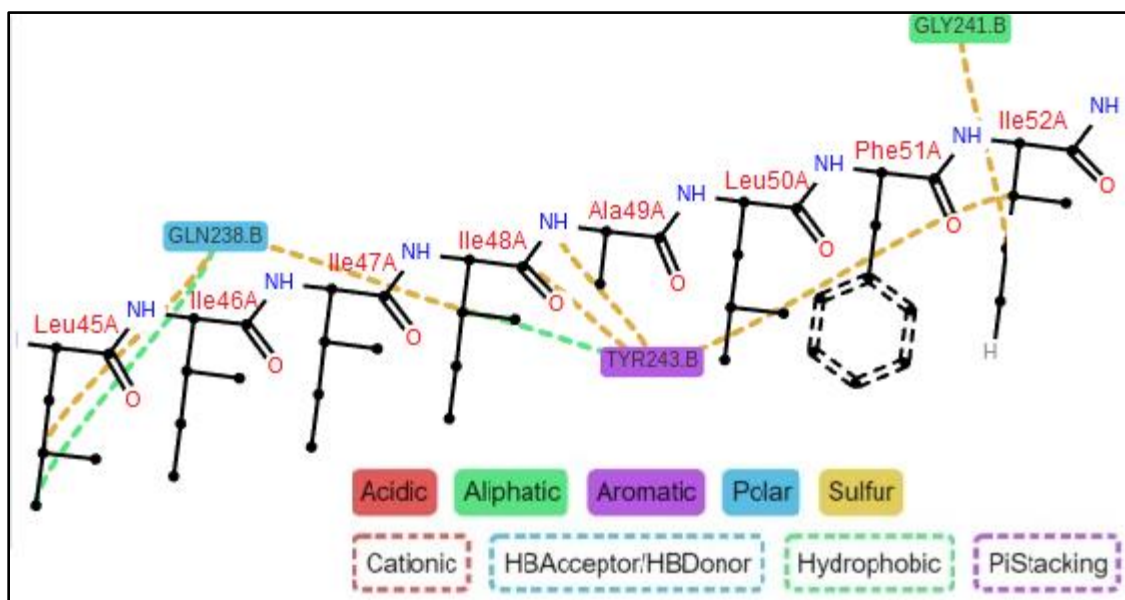
dos triadas de residuos que forman una hendidura hidrofóbica compuesta por isoleucina 52 y Leucina 45 de SaMGT y glutamina 238 de LysBaqSau1 y la segunda formada por tirosina 243 y glicina 241 de LysBaqSau1 que interaccionan con Isoleucina 52 de SaMGT esta se puede observar en detalle en la figura 33.

Figura 32. Modelo estructural LysBaqSau1-SaMGT y los puntos de interacción del complejo.



Análisis de interacción molecular mediante docking del modelo LysBaqSau1-SaMGT. Se indican los dominios de la Lisina (CBD: Dominio de unión; CHAP Y Amidasa: Dominios catalíticos). El recuadro amplía los residuos de Interacción entre SaMGT y LysBaqSau1(marcados los residuos como A y B, respectivamente)

Figura 33. Red de interacción del ligando en el complejo LysBaqSau1_SaMGT.



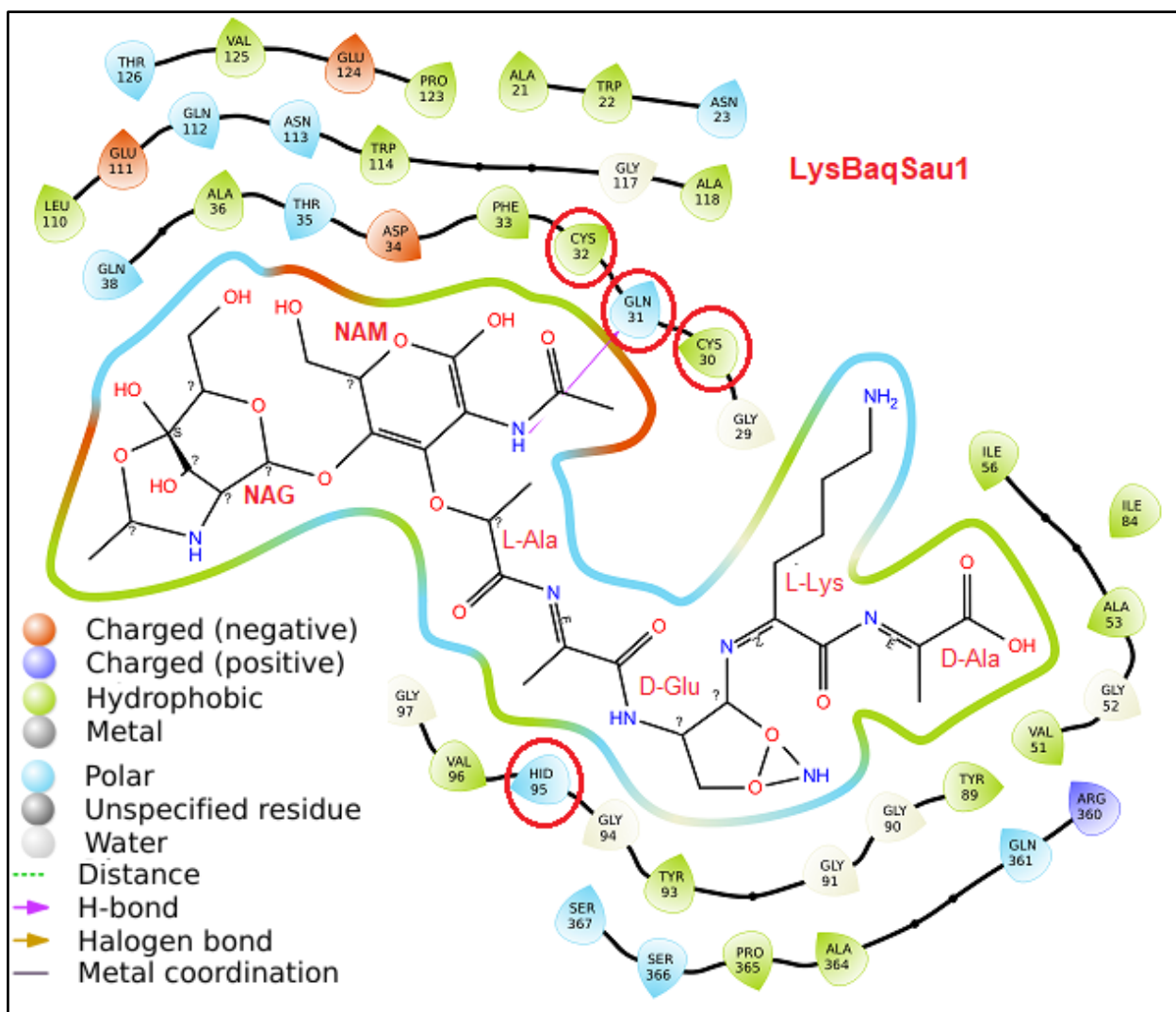
Red de interacción elaboradas mediante la librería de Python ProLIF (176). Las líneas negras representan SaMGT, se han marcado los residuos de ésta con los cuadros rojos y con la letra A. Los residuos marcados con B corresponden a LysBaqSau1. Las interacciones se muestran en líneas discontinuas, las líneas verdes representan uniones hidrofóbicas y las amarillas puentes de hidrógeno.

En la figura 33 podemos observar la red de interacciones intermoleculares que se forman en el complejo LysBaqSau1 y SaMGT elaboradas usando la librería de Python ProLif, en este se observa que estas interacciones se favorecen principalmente en un ambiente hidrofóbico propiciado por los residuos circundantes al sitio de unión, que, si bien no están implicados en la interacción entre ambas proteínas, la naturaleza hidrofóbica de éstos propicia este ambiente. Otro tipo de interacciones que se presentan, pero en menor medida, son puentes de hidrógeno y en menor medida por interacciones electrostáticas. Ahora bien, estas interacciones hidrofóbicas a su vez, puede favorecer las interacciones no polares que posiblemente sean las de mayor importancia para estabilizar el complejo formado.

- CHAP_BaqSau1-Peptidoglicano (NAG):

Por su parte, mediante el análisis de interacción molecular del complejo formado entre el dominio catalítico CHAP_BaqSau1 y el peptidoglicano característico de *S. aureus*, se identificó la interacción del peptidoglicano con el sitio activo como se muestra en la figura 34. Estos resultados confirman el dominio catalítico CHAP propuesto en el capítulo 2 conformado por los residuos Cys30 y 32, His95 y Gln31. De modo que los residuos de cisteína 30 y 32 forman una tétrada con el residuo ácido glutámico 31, los dos primeros presentan una naturaleza hidrofóbica lo cual es muy característico de los bolsillos catalíticos, sin embargo, se observa que la glutamina forma puentes de hidrógeno con el N-acetilmurámico lo que escinde el enlace amida entre el disacárido y el residuo de L-alanina en el N-terminal del pentapéptido, es decir que el mecanismo de acción de CHAP es de tipo amidasa de pared celular, la interacción entre el sitio activo de CHAP_BaqSau1 y el peptidoglicano de pared de *S. aureus* se puede observar en la figura 34.

Figura 34. Red de interacción mediante Docking dirigido Proteína – Ligando de LysBaqSau1 y NAG.



Análisis de interacción de los residuos del sitio activo propuesto para CHAP (Cys30 y 32, Hys95, Gln31) realizado mediante el software Maestro. El sustrato de peptidoglicano (NAG) está representado por su muestra en su nube eléctrica rodeado de los aminoácidos del dominio CHAP.

5.3.2 Ensayos *in silico* de TSP de BaqKPR2

Con base en la metodología aplicada se obtuvieron los resultados del docking proteína-ligando tanto ciego como dirigido (DcPL y DdPL). Los resultados de las confirmaciones se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Salida de puntuación del complejo TSP-Polisacárido obtenido mediante AutoDock Vina de los métodos DdPL y DcPL.

Model	Affinity (kcal/mol)	Dist from rmsd l.b.	Best mode rmsd u.b.
DdPL			
1	-7.4	0.000	0.000
2	-7.4	2.940	5.083
3	-7.4	14.926	19.197
4	-7.3	1.838	6.496
5	-7.2	2.376	4.191
6	-7.2	2.036	6.719
7	-7.2	2.477	7.179
8	-7.2	2.786	7.893
9	-7.1	2.482	6.668
DcPL			
*1	-8.3	0.000	0.000
2	-8.1	2.017	3.301
3	-7.9	1.919	6.568
4	-7.7	1.906	7.499
5	-7.6	4.170	8.326
6	-7.5	1.575	2.473
7	-7.5	1.747	2.854
8	-7.4	1.798	8.109
9	-7.3	5.642	12.787

*Modelo seleccionado

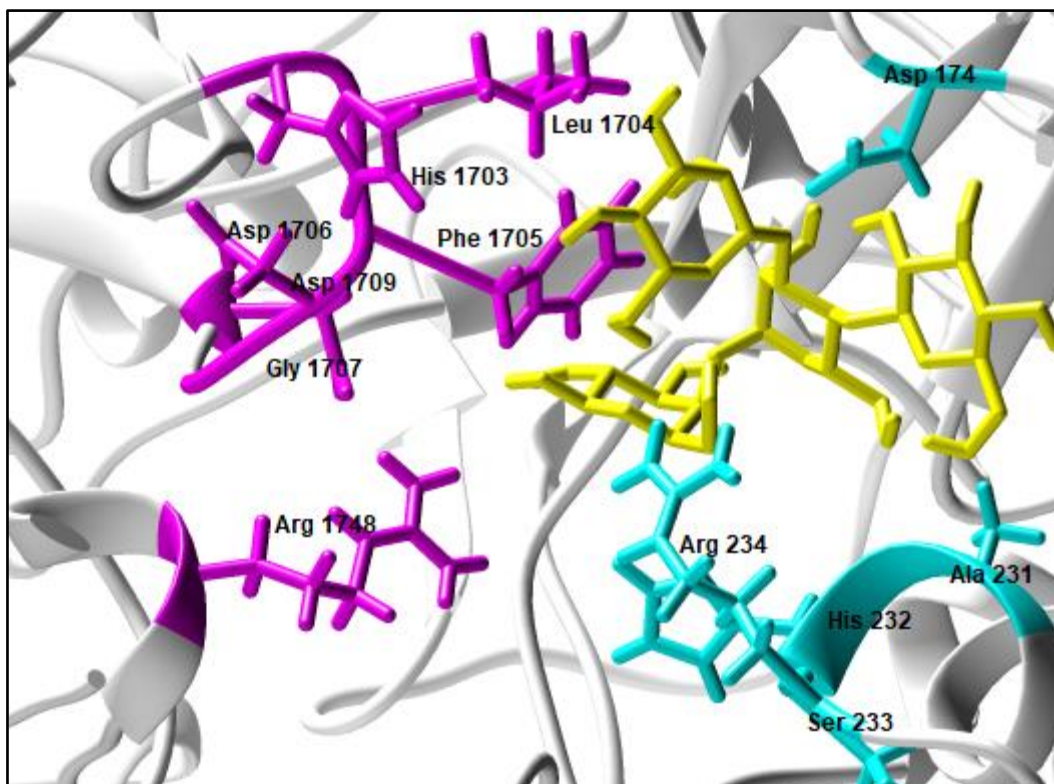
Con base en estos datos se escogieron los modelos con la mejor puntuación equivalente para ambos y se compararon entre sí, y al comparar los resultados de ambos modelos podemos evidenciar que se obtuvieron resultados muy similares en cuanto al sitio de interacción del ligando, sin embargo, los resultados obtenidos

mediante el método DcPL muestra un mayor score y una mayor energía de afinidad, por lo que al final se eligió este modelo para los siguientes análisis.

Con base en los datos obtenidos en este ensayo se pudo determinar con mayor precisión el sitio activo correspondiente al dominio depolimerasa de la proteína TSP de BaqKPR2, ya que en el capítulo anterior se trabajó con base en un sitio activo hipotético el cual se muestra en la página 114 (ver figura 31) el cual fue determinado con base en la identificación de puntos calientes (Hot Spot) mediante el análisis electrostático y con base en la homología con la Dpo32 del fago GH-K3, como se explicó con anterioridad (ver figura 35A).

Sin embargo, el sitio activo determinado mediante el cálculo de las energía de afinidad por Docking molecular permitió identificar con mayor claridad los residuos que están implicados en esta interacción y se muestran en la figura 35 y 36.

Figura 35. Modelo Docking Ciego Proteína – Ligando TSP_BaqKPR2 y el polisacárido capsular K2



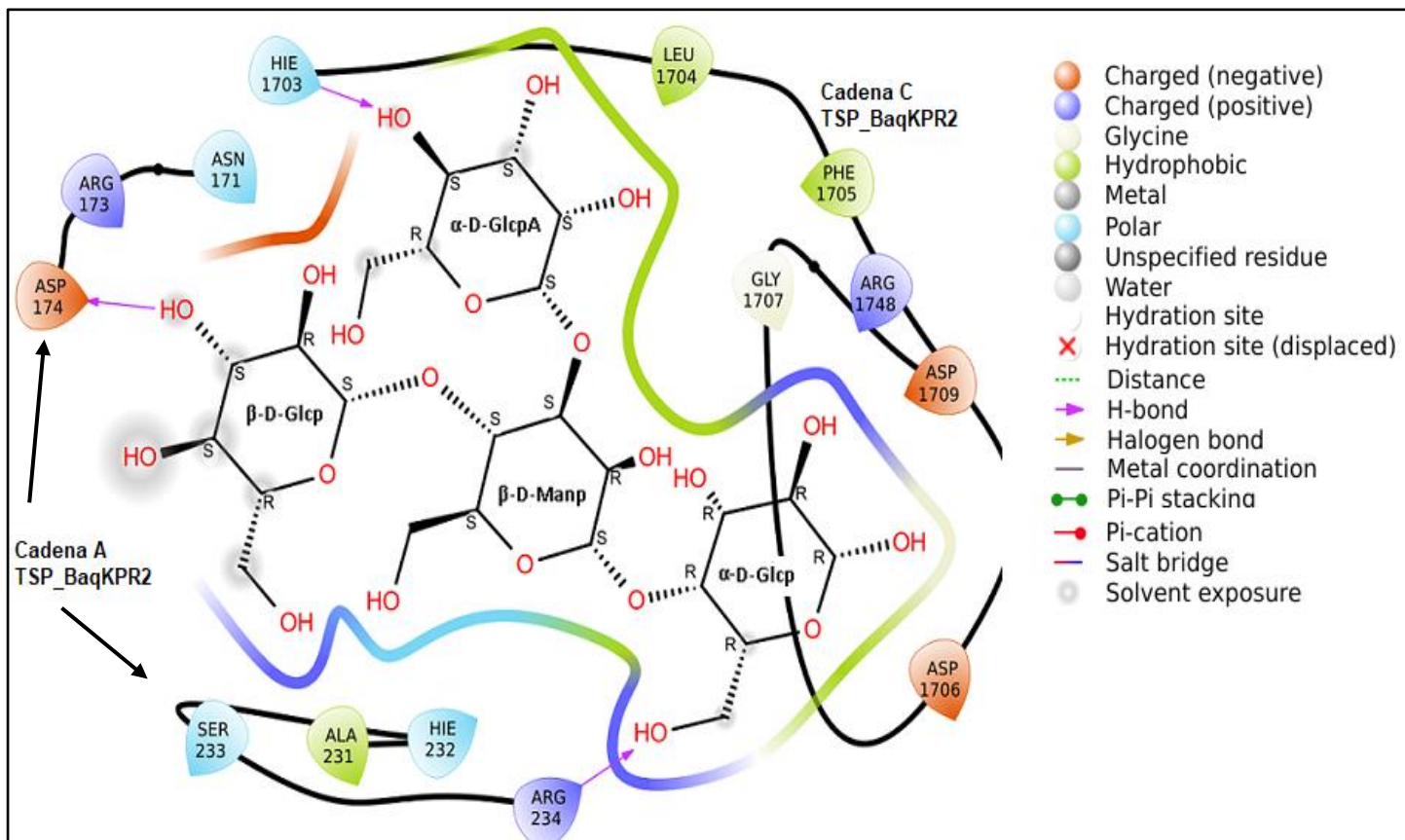
Sitio de interacción entre TSP de BaqKPR2 en forma trímica y el polisacárido capsular K2 (CPS-K2) (α -D-GlcpA (1-3) β -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 4)-Man (1 $\rightarrow$ 4) α -D-Glcp). En color cian la cadena A del trímero de TSP, en magenta la cadena C, en amarillo el CPS-K2).

Este resultado sugiere que efectivamente la proteína TSP, que contiene el dominio depolimerasa del fago BaqKPR2 corresponde al CDS 28 como se había propuesto en el capítulo anterior. Sin embargo, el sitio activo difiere del inicialmente propuesto (ver figura 31 del capítulo anterior).

Esta interacción implica la acción de dos de las tres cadenas que componen la TSP, cabe recordar que la forma activa de esta proteína se encuentra en estado trimérico, por ende, toda la estructura va a tener interacción con el sustrato. Se observa que de la cadena c del trímero, los residuos leucina1704, fenilalanina1705, ácido aspártico1706, glicina1709 y arginina1748, tienen una importante interacción con el sustrato, se observa cómo se

forma una región hidrófoba en esta región de aminoácidos que se destaca en la figura 36 como una nube verde alrededor del CPS determinado por los residuos leucina 1704 y fenilalanina 1705. Es probable que éstos sean los responsables de la unión de la TSP al sustrato CPS-K2, provocando el acomodamiento del sustrato al interior del bolsillo hidrofóbico y su atracción al sitio activo. Sin embargo, son los residuos alanina 231, histidina 232, serina 233, arginina 234 y ácido aspártico174 de la cadena a de la TSP e histidina1703 de la cadena c, los responsables de catalizar el sustrato. Se observa que el residuo de ácido aspártico174 forma un puente de hidrógeno con el monosacárido β -D-glucopiranosido (β -D-Glcp) en el cual el aminoácido es receptor del hidrógeno proveniente el del hidroxilo del monosacárido, mientras que la arginina 234 forma un puente de hidrógeno con la α -D-glucopiranosido (α -D-Glcp) siendo el primero el donador del hidrógeno. Por su parte, el residuo de histidina1703 forma un puente de hidrógeno con la α -D-glucurónico (α -D-GlcpA), sin embargo, éste es el aminoácido que se encuentra protonado en su grupo amino, dicha protonación conforma el puente de hidrógeno con el sustrato, como se muestra en la figura 36.

Figura 36. Vista del modelo de interacción mediante Docking dirigido Proteína – Ligando de TSP-CPS_K2



Por otro lado, Dunstan 2023 (141) menciona que no está bien definida la función del polisacárido capsular en la adsorción del fago, si éste actúa como bloqueador o receptor y Hao G. Et. al 2021 (177), por su parte, explica que CPS bloquea el receptor del fago y que el O-antígeno (OmpK36) es el receptor, con base en esta premisa, se optó por analizar la interacción de la TSP de BaqKPR2 y la proteína Osmoporina K36 (OmpK36).

La OmpK36 es una proteína de transmembrana tipo porina que es constitutiva de la pared celular de *K. pneumoniae* y otras bacterias gram negativas, esta proteína está implicada

en el transporte activo al interior de la célula por lo que es considerada un importante blanco terapéutico (178). Mutaciones en esta proteína ha sido descrito como la base genética de la resistencia a los carbapenémicos en *K. pneumoniae* (142), y también es considerada un importante receptor de unión a los fagos GH-K3, KpNIH-2 y FC3-11 para la adsorción en *K. pneumoniae* como lo describe Dustan et al 2023 (141).

Los resultados de las conformaciones iniciales del complejo proteína-proteína realizado mediante PyDockWEB generó 100 estructuras de salida en formato .PDB, éste también arroja una tabla con los cálculos de la energía de unión total y la energía libre y con base en este valor le asigna una puntuación a cada modelo los cuales se muestran en la tabla suplementaria 2 del anexo 2

Para el análisis de los resultados se tomaron los 5 modelos con la mejor puntuación total. Los posteriores análisis se basan en el complejo TSP-OmpK36 con la mejor puntuación en este caso el modelo N. 8264. Los datos se muestran en la tabla 21.

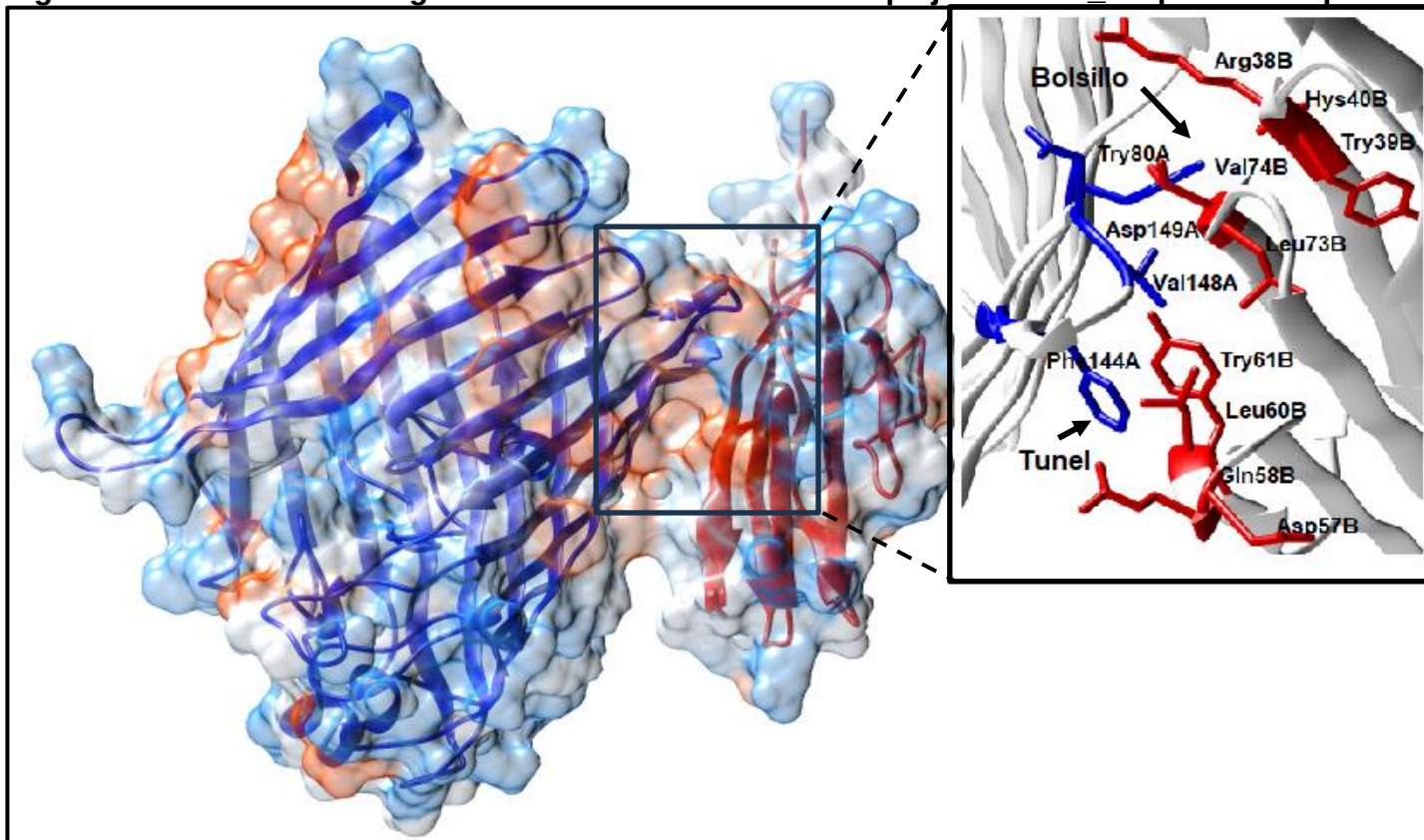
Tabla 21. Salida de puntuación de pyDockWEB del complejo TSP-OmpK36

Complejo No.	Energía Electrostática	Desolvatación	Van Der Waals	Total	RANK
8264	-15.853	-41.755	38.329	-53.775	1
662	-8.364	-51.979	68.600	-53.483	2
6796	-7.135	-45.161	-3.146	-52.611	3
4283	-3.150	-51.836	26.576	-52.328	4
4577	-6.164	-44.130	6.209	-49.674	5

Mediante el análisis del modelo obtenido se observó que prácticamente toda la estructura de la TSP de BaqKPR2 reconoce e interactúa con la Osmoporina. La figura 37 muestra la

interacción identificando a la TSP de BaqKPR2 como la cadena B coloreada de rojo y a la Osmoporina como la cadena A coloreada de azul.

Figura 37. Modelo Docking Proteína – Proteína del complejo de TSP_BaqKPR2+OmpK36



Análisis de HotSpots del complejo TSP-OMP36. B. Interacción intermolecular en rojo los residuos de la TSP y en azul los de la OmpK36.

Mediante el análisis de superficie electrostática se logró identificar los puntos calientes sugestivos de actividad enzimática, como se explica en la metodología. Se logró identificar que la interacción entre estas dos proteínas está formada por 10 residuos formado un túnel de acceso a lo que sería el sitio activo y un bolsillo catalítico que constituye en sí el sitio activo que cataliza a la OmpK36 y de esta forma permitir la adsorción del fago a la célula hospedadora. En la figura 37b, podemos observar los residuos implicados tanto en el canal como en el sitio activo, el primero está formado por los fenilalanina 144A y leucina

732B, valina 148A que a su vez forma una tétrada de interacción con fenilalanina 727B, valina 746B y ácido aspártico 149A, y el segundo está formado por la tétrada de residuos tirosina 180A, arginina 710B, ácido aspártico 744B e histidina 712B, ver figura 38.

5.3.3 Discusión.

La utilización de enzimas depolimerasas derivadas de bacteriófagos aparecen como una novedosa alternativa al tratamiento tradicional con antibióticos por su alta eficiencia en degradar componentes constitutivos de la pared celular bacteriana. Estas enzimas presentan ciertas ventajas frente a los antibióticos convencionales, como la baja probabilidad de generar resistencia y su fácil modificación por ingeniería genética (179). Sin embargo, a pesar de las numerosas ventajas que se han descrito de la utilización de estas enzimas sobre los antibióticos y de los múltiples esfuerzos de varios investigadores alrededor del mundo, es muy poca la información en cuanto al entendimiento molecular del mecanismo de acción de estas enzimas y el rol que puedan desempeñar los receptores de membrana durante la lisis bacteriana mediada por estas enzimas en su forma recombinante, a pesar de que son proteínas muy conservadas en los bacteriófagos tanto líticos como lisógenos (180).

Entender el mecanismo de acción de estas enzimas permitiría avanzar en el desarrollo de la terapia enzibiótica, en este respecto, el objetivo de este capítulo se centró en dilucidar el mecanismo de acción de las enzimas lisina y su dominio catalítico CHAP del bacteriófago BaqSau1 de *S. aureus* y la proteína TSP y que contiene el dominio depolimerasa del bacteriófago BaqKPR2 de *K. pneumoniae* desde dos aspectos, en primer lugar su acción sobre los receptores primarios y en segundo lugar su acción sobre los receptores de

membrana secundarios, en este caso SaMGT de *S. aureus* y la OmpK36 de *K. pneumoniae*, esto con el fin de obtener visión más completa de la interacción de cada fago con sus receptores de membrana respectivos, en el entendido que la infección fágica se produce en dos fases, iniciando con el reconocimiento de los receptores externos o secundarios que protegen la pared bacteriana y éste es un paso que puede ser reversible, estos receptores pueden incluir polisacáridos externos; la segunda fase, está determinada por el reconocimiento de los receptores en la pared celular propiamente, a los que se le consideran receptores primarios, esta última es irreversible y conlleva a la eyección del material genético del virus al interior de la bacteria. De modo que si un fago no puede reconocer y digerir el receptor reversible (secundario), no puede acceder al receptor irreversible (primario) en la superficie celular y por consiguiente no logra infectar a la célula (181). Una gran variedad de trabajos aborda el mecanismo de acción de estas enzimas principalmente para su uso *in vitro* en su forma recombinante como terapia enzimática (28,38,53,160), de modo que el entendimiento de la interacción fago-bacteria podría ser de gran utilidad a la hora de trabajar con este tipo de proteínas de forma recombinante.

MECANISMO DE ACCIÓN PROPUESTO PARA LysBaqSau1

Como se mencionó en el capítulo anterior la lisina de BaqSau1 es una enzima de tipo modular que presenta dos dominios catalíticos, CHAP y amidasa y un dominio SH3 de unión al sustrato, también se identificó que el dominio catalítico CHAP está formado por los residuos Cys30- Cys32-His95-Glu31 y difiere con otros dominios CHAP caracterizados previamente como LysGH15 (50) y de LysK (49). Sin embargo, concuerda con lo descrito

por Bateman A. et al. 2003 (41) y Fenton M. Et al 2011 (45), que este dominio se caracteriza por la presencia de los dos residuos de cisteína y uno de histidina en su sitio activo, este sitio tiene una estructura tipo mano o “hand-like” que es muy característica de enzimas hidrolíticas y que coincide con lo reportado por Gu J. et al 2014 (50) de CHAP-GH15, sin embargo, CHAP_BaqSau1 difieren en su estructura secundaria con las antes descritas, ya que no posee dos hélices como en la clásica descrita por Gu J. Et. al, si no que en el sitio activo y en la interacción con el ion calcio posee una sola hélice, esta característica también fue descrita por Zhou Y. Et al. 2006 (169) quien manifiesta que hay 4 clases de motivos similares tipo Hand-like y que uno de éstos los residuo de cisteína en la secuencia puede facilitar la orientación de las cadenas de la enzima y favorecer su unión al sustrato mediante la formación de enlaces disulfuro hacia el ion calcio. Este tipo de actividad calcio dependiente ha sido descrita también en otras enzimas tipo Hand-like como la proteína periplásmica de unión a galactosa en *S. typhimurium* (169), por lo que se pensó inicialmente que el mecanismo de acción de CHAP-BaqSau1 está dirigido hacia la *N*-acetilglucosamina (GalNac) del peptidoglicano. Para corroborar esta sugerencia, se realizó el análisis de interacción molecular mediante un docking flexible proteína-ligando y se encontró el residuo glutamina 31 forma puentes de hidrógeno con el N-acetilmurámico provocando la escisión del enlace amida entre el disacárido y el residuo de L-alanina en el N-terminal del pentapéptido, es decir que el mecanismo de acción de CHAP es de tipo amidasa de pared celular, esto coincide Bateman A y Rawlings N. 2003 (41) quienes describen que este tipo de enzimas puede tener dos efectos sobre el peptidoglicano, el

primero tiene actividad L-muramoil-L-alanina amidasa, similar al encontrado en el presente trabajo y el segundo d-alanil-glicil endopeptidasa.

También se identificó la presencia de iones calcio y zinc (Ca^{+2} y Zn^{+2}) que serían importantes para la actividad de la lisina Gu J. et al 2014 (50) explica que ambos iones juegan un papel importante para la actividad enzimática de la lisina, donde el calcio media la interacción entre los residuos del sitio activo de CHAP, mientras que el zinc ayuda al mantenimiento de la estructura de la lisina intacta, dándole estabilidad al dominio amidasa-2 y su unión al dominio CHAP, la presencia de estos dos iones ha sido descrito también en lisinas de otros fagos como por ejemplo en LysK (47) y phi11 (48) y en lisinas estreptocócicas como B30 (167) y PlyC (168). Los resultados obtenidos en el presente estudio corroboran la dependencia del calcio durante la actividad de CHAP. Por su parte, el ion zinc no es importante para la actividad *in silico* de CHAP, pero sí en la lisina completa, otras hidrolasas de zinc han sido descritas por ejemplo en fagos de *Micobacterium* (182), *Listeria* (183) y *Bacillus*, entre otros, está demostrado que éste cumple un importante papel en la acción catalítica del dominio amidasa y en la estabilización de la Lisina completa. Mesnage S y Foster S 2013 (184) describen que durante la catálisis mediada por la amidasa se requiere de la presencia de un átomo de zinc y un residuo conservado para el ataque nucleofílico y para la transferencia de protones, además de uno o varios residuos adicionales implicados en la estabilización del estado de transición generado durante la interacción. Con base en los resultados obtenidos por el cálculo por docking molecular de las energías de interacción molecular entre LysBaqSau1 y SaMGT donde se evidenció la presencia de un residuo de glutamina

en la posición 238 de la lisina y la presencia del ion zinc y otros residuos adyacentes que interaccionan con el receptor SaMGT que generan un ambiente hidrofóbico por su naturaleza química propiciando interacciones no polares que posiblemente sean las de mayor importancia para estabilizar el complejo formado.

Con base en estos resultados se puede inferir que en el caso de LysBaqSau1 parecen ser necesarias ambos dominios tanto CHAP como la amidasa para su actividad catalítica ya que durante la interacción lisina – SaMGT no se involucra el dominio catalítico CHAP, sino que implica residuos ubicados en el dominio amidasa y formando una hendidura hidrofóbica sugerente de ser el sitio activo del dominio amidasa (ver figura 32), por lo que se puede concluir que durante la lisis provocada por la lisina recombinante se esperaría que tanto el dominio amidasa y como el dominio CHAP no compitan por el sustrato, es decir mientras la amidasa ataca la transglicosidasa, CHAP por su parte ataca la capa externa de peptidoglicano, permitiendo que en conjunto la proteína intacta tenga un mejor desempeño que las quimeras producidas a partir de los dominios separados, Bateman A y Rawlings N. 2003 (41) describen que la mayoría de hidrolasas de peptidoglicano son multifuncionales y sugieren que éstas que podrían actuar de manera cooperativa para escindir sustratos especializados.

La amidasa es un dominio altamente conservado entre las lisinas codificada por fago y está estrechamente relacionada con la especificidad a su sustrato (184), por ejemplo, la lisina PlyPSA de *L. monocytogenes* se une unión específicamente a una cantidad limitada de serotipos (185), y otros estudios han demostrado que la amidasa reconoce otros

polímeros unidos covalentemente al peptidoglicano como los ácidos teicoicos como LytA de *S. pneumoniae* por ejemplo, este último se une a residuos de colina de los ácidos teicoicos y esto promueve la conversión alostérica de esta lisina para mejorar su actividad catalítica (186). Por lo que no se descarta que en LysBaqSau1 el dominio amidasa cumpla esta misma función alostérica para favorecer la lisis mediada por CHAP y así permitir la entrada del fago a la célula.

Esto podría explicar por qué en algunas investigaciones cuyo objetivo ha sido evaluar la actividad lítica in-vitro de las lisinas truncadas de forma recombinante, es decir que incluyen sólo uno de los dos dominios catalíticos y sin el dominio de unión, no ha demostrado ser más eficientes que la lisina completa ya que, si bien el dominio CHAP truncado mantiene la actividad lítica, la amidasa por el contrario, pierde completamente su actividad, demostrando que el último depende del primero para su actividad lítica, independiente de que difieran de sustrato, Horgan M Et al logró obtener el dominio CHAP del fago K de *S. aureus* truncado de forma recombinante y evaluó su actividad frente a cultivos puros de *S. aureus* resistentes a antibióticos y observó que la actividad de esta era muy similar a la actividad antimicrobiana de la lisina intacta (40). Por su parte, Zhang Et al 2016 (43) estudio la lisina del fago GH15 y observó una importante reducción de la infección en modelo animal por lisina intacta pero no obtuvo los mismos resultados usando sólo los dominios truncados.

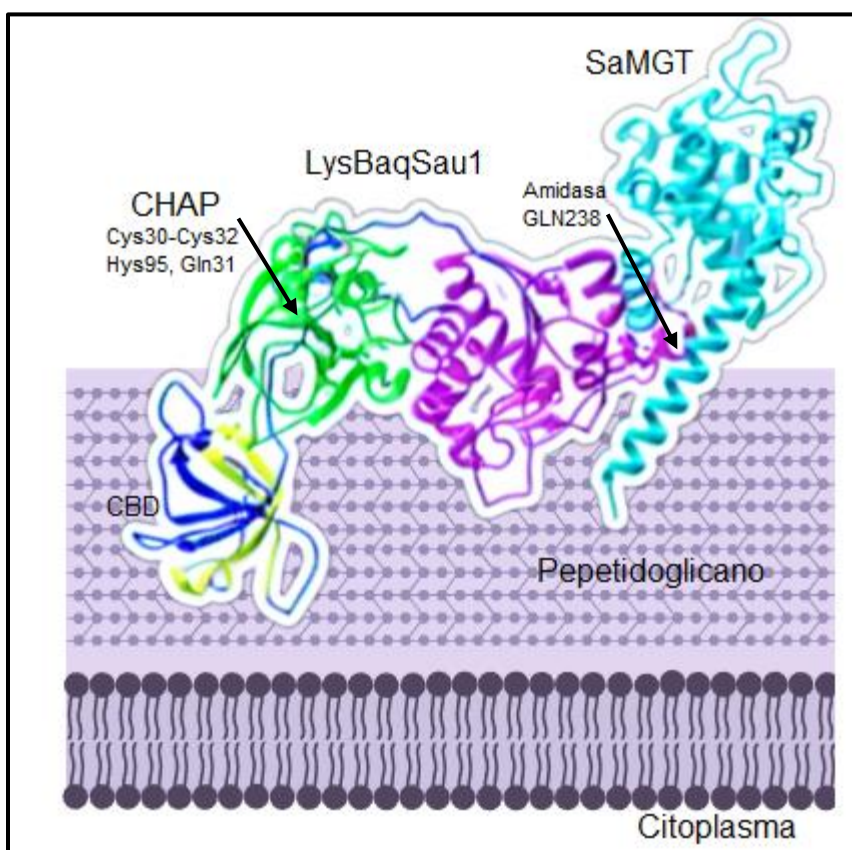
Desde el punto de vista mecanístico de la interacción fago-bacteria y su especificidad no se comprende completamente, Gutiérrez Et. al 2018 (180) menciona que no es claro qué

fragmento de la molécula determina la especificidad de las endolisinas, ya que la evaluación de proteínas quiméricas, producidas a partir de la fusión del dominio de unión al receptor (CBD) de la lisina de un fago y el dominio catalítico de otra lisina, como el caso de la endolisina quimérica realizada con el dominio catalítico de LysB30 derivado de un fago estreptocócico y el CBD derivado de un fago *S. aureus* resultó en la pérdida total de la actividad lítica sobre *S. aureus*, pero mantuvo su actividad contra otras bacterias del grupo ácido lácticas, además del fago del cual derivaba el CBD usado en la construcción de la quimera, lo que indica que la especificidad de las endolisina no está determinada por el dominio catalítico. Becker et al. 2009 demostró en cambio, que la actividad lítica se mantenía en proteínas quiméricas que incluían los dos dominio catalíticos (CHAP + amidasa), por lo que propuso que la especificidad de las endolisinas es el resultado de las interacciones combinadas de todos los dominios tanto catalíticos como de unión a los receptores de pared celular específicos de especies.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se propone que la amidasa provee en este caso la especificidad por el *S. aureus* reconociendo la transglicosidasa (SaMGT) como el receptor irreversible y posterior a esto se da la catálisis del peptidoglicano mediante la acción hidrolítica de CHAP. Cabe resaltar, que la SaMGT es una de las proteínas encargadas de la formación del peptidoglicano por su acción glicosiltransferasa o mureína sintasa, por lo que la mayoría de los antibióticos, como los β -lactámicos (p. ej., penicilina y meticilina), los glucopéptidos (p. ej., vancomicina y teicoplanina) y los glicolipopéptidos están dirigidos a la inhibir la actividad, en el caso de LysBaqSau1, la interacción con la transglicosidasa generan un ambiente hidrofóbico por la naturaleza

química de los residuos adyacentes al punto de interacción propiciando interacciones no polares que posiblemente sean las de mayor importancia para estabilizar el complejo formado, de este modo se produce el acoplamiento de la lisina al SaMGT y éste último serviría como receptor secundario durante la adsorción del fago a su bacteria hospedadora a la vez que CHAP degrada la capa de peptidoglicano como se muestra en la figura 38.

Figura 38. Modelo propuesto del mecanismo de interacción de LysBaqSau1 con la capa de peptidoglicano y la transglicosidasa SaMGT de *S. aureus*.



Los dominios que conforman a LysBaqSau1 están diferenciados así: Amidasa: Magenta, CHAP: Verde y CBD: Amarillo; SaMGT se muestra en color Cyan. Se indican la interacción de LysBaqSau1 con el peptidoglicano desde CHAP y con la SaMGT desde la Amidasa.

Mecanismo de reacción propuesto para la proteína TSP de BaqKPR2 que contiene un dominio depolimerasa tipo K2.

El capítulo 2 abordó la caracterización del CDS 28 que corresponde a la proteína de la punta de la cola (TSP) del bacteriófago BaqKPR2 el cual contiene el dominio depolimerasa, así mismo se mostró que el dominio depolimerasa de la TSP del fago BaqKPR2 presenta una alta homología con la Dep32 derivada del fago GH-K3 (Hom:95%) (174) por lo que se dedujo que tienen acción sobre el mismo tipo capsular K2 que, y como se mencionó antes, este tipo capsular uno de los principales identificado en *K. pneumoniae* invasiva según Oliveira H. Et. al 2019 (80). Sin embargo, no está bien definida la función de los polisacáridos capsulares (CPS) en la adsorción del fago en *K. pneumoniae*, si éste actúa como bloqueador o como receptor como lo expone Dunstan 2023 (141), por otra parte, Hao G. Et. al 2021 (177) explica que el CPS bloquea el receptor del fago y que por el contrario el O-antígeno (OmpK36) es el receptor, con base en esta premisa, se optó por analizar la interacción de la TSP de BaqKPR2 y la proteína Osmoporina K36 (OmpK36), ya que esta es proteína de transmembrana tipo porina que es constitutiva de la pared celular de *K. pneumoniae* y otras bacterias gram negativas y es considerada un importante blanco terapéutico (178) ya que mutaciones en esta proteína ha sido descrito como la base genética de la resistencia a los carbapenémicos en *K. pneumoniae* (142), el uso de la OmpK36 por otros fagos como GH-K3, KpNIH-2 y FC3-11 para la adsorción en *K. pneumoniae* fue descrito por Dustan at al 2023 (141). Los resultados obtenidos muestran que la interacción entre estas dos proteínas es predominantemente hidrofóbica, por lo que puede se pueden establecer interacciones no polares que posiblemente sean las de mayor

importancia para estabilizar el complejo formado, es decir, que el acoplamiento puede ser resultado de todas estas interacciones, pero sobre todo aquellas de tipo hidrofóbico y puentes de hidrógeno, esto es provocado por la zona circunvecina al residuo de leucina 732 y 745, fenilalanina727, valina746 que son de carácter apolar. Sin embargo, también se encuentran en este punto de interacción aminoácidos polares como la tirosina711, glutamina730, asparagina744, histidina712 y arginina710 que pueden incrementar la energía de interacción, generando un ambiente polar que puede estabilizar el complejo formado. Esto se puede traducir en que la TSP de BaqKPR2 la interacción con el receptor de membrana OmpK36, pero esta es una interacción hidrofóbica negativa por lo que, aunque este podría ser el receptor utilizado por el fago, la interacción con el mismo no determina la actividad de la depolimerasa sobre el polisacárido capsular, contrario a lo que observado con LysBaqSau1 y el receptor SaMGT en donde se observó una relación cooperativista entre los dominio de la lisina en su ataque a su hospedador bacteriano. Capparelli A. y Lodeiro A. 2016 (187) explica que las interacciones enzimáticas podrían no ser siempre positivas, pero esto no descarta su utilidad.

Este ambiente hidrofóbico también se observa durante la interacción de la TSP de BaqKPR2 con el CPS-K2, sin embargo, aquí se observa que existe una acción catalítica sobre el polisacárido provocado por la protonación de la histidina1703, por lo que no se descarta que mecanismo de acción pueda involucrar toda la TSP de modo el dominio depolimerasa le abra el camino al resto de la TSP para promover la interacción con los receptores de membrana de tipo Ompk36. Pertics B, Kovás T y Schneider G 2023 (188) explican que, si bien los receptores irreversibles para los bacteriófagos de bacterias gram

negativas generalmente son las proteínas de membrana externa OMP, cada fago se especializa en un receptor específico, por ejemplo, GH-K3 tiene como receptor la proteína C (OmpC) (172), mientras que el fago NJS1 emplea FepA (189) y en el caso de BaqKPR2 los resultados obtenidos sugieren que puede ser Ompk36.

Por otro lado, tenemos el dominio depolimerasa, definir con certeza la ubicación de este dominio es una tarea desafiante ya que, aunque es una proteína conservada de fagos gram negativos, la gran variabilidad de su sustrato, el polisacárido capsular, la hace ser muy variable entre un fago y otro, aún entre fagos aislados de un mismo hospedador como se ha observado en fagos que codifican para más de una depolimerasa (26). Por esta razón, es importante hacer estudios que aporten al entendimiento básico de los mecanismos de acción y determinar con precisión los residuos que componen la depolimerasa aportando a los conocimientos sobre la biología de los fagos. A la vista de la gran variabilidad de la capsula sería lógico pensar que una depolimerasa recombinante tendría acción catalítica para una limitada variedad de cepas bacterianas.

Con base en los resultados, se propone que el dominio depolimerasa por sí sólo, es decir de forma truncada podría tener casi el mismo efecto que la TSP intacta de forma experimental in-vitro, ya que, aunque la TSP reconoce e interactúa con la OmpK36 no se observa una relación de cooperación con la acción depolimerasa de la TSP, de modo que, aunque los receptores de la TSP reconocen la Ompk36 como su receptor irreversible, esto no provoca ningún efecto sobre la acción de la depolimerasa.

Los resultados del cálculo de las interacciones mediante docking molecular sugieren que el dominio depolimerasa está ubicado hacia la parte central de la proteína y está caracterizado por la presencia de una serie de hélices β paralelas coincidiendo con lo descrito por otros autores (57), el acoplamiento de la depolimerasa con el sustrato de CPS-K2 está determinado por los residuos alanina231, histidina1703, serina233, arginina234 y ácido aspártico174, sin embargo se observa que la catálisis muy probablemente sea provocada por los residuos histidina, arginina y ácido aspártico, el primero se protona cediendo el hidrógeno de su grupo amino al α -D-glucurónico (α -D-GlcpA) y los últimos favorecen esta la catálisis. Estos 3 aminoácidos que participan en la catálisis del polisacáridos capsular ya poseen características particulares que favorecen su participación en el complejo enzima-sustrato, por ejemplo, el ácido aspártico al ser un aminoácido dicarboxílico es común encontrarlo formando sitios activos de enzimas hidrolíticas como lo explica Capparelli A y Lodeiro A (187), a esto se le suma su carga negativa y por ende es un buen aceptor de electrones de átomos adyacentes. Por su parte la histidina y la arginina son aminoácidos con carga positiva, comúnmente participan en la catálisis por la protonación de sus grupos amino.

También se determinó esta depolimerasa como una enzima de tipo liasa, este tipo de enzimas se caracterizan por que en su catálisis no se desprenden moléculas de agua (190) y cataliza la escisión de los enlaces α -1,4-glucosídicos, Tu I., Et. al 2022 (191) describe que el fago NTUH-K2044, otro Podoviridae de la Familia KP34like, también presenta este tipo de acción como la responsable de la catálisis del CPS tipo K1 de *K. pneumoniae*, sin embargo, esta depolimerasa en particular, está formada por la triada

Tyr311, His373 y Arg397 a diferencia de la tétrada identificada en la depolimerasa de BaqKPR2 compuesta por Asp174, Arg204, Ala231 e Hys1703.

5.3.4 CONCLUSIONES

El entendimiento de la interacción fago-bacteria es muy importante a la hora de poder establecer qué tipo de aplicación biotecnológica se le puede dar a un fago o a las proteínas derivadas de éstos, ya sea para la industria o para el abordaje clínico. En este sentido, este estudio provee información sobre la interacción de una endolisina frente los receptores de membrana considerados importantes blancos terapéuticos en *S. aureus* y en *K. pneumoniae*, respectivamente.

Por un lado, se observó que en caso de realizar futuros ensayos *in-vitro* que involucren la endolisina de BaqSau1 recombinante, los resultados sugieren que la lisina completa tendría un desempeño más eficiente que el dominio CHAP truncado, ya que tanto el dominio amidasa como CHAP identifican e hidrolizan distintos sustratos, mientras la amidasa ataca la transglicosidasa de la pared bacteriana, CHAP ataca la capa externa de peptidoglicano, permitiendo que en conjunto la proteína intacta tenga un mejor desempeño que las quimeras producidas a partir de los dominios separados, ya que la amidasa provee la especificidad por el *S. aureus* mientras CHAP hidroliza el peptidoglicano.

La importancia del estudio de la depolimerasa de la TSP del fago BaqKPR2 radica en que, BaqKPR2 tiene una acción lítica sobre el tipo capsular K2, deducido por la alta homología con el fago GH-K3, lo que la convierte en una proteína de interés farmacológico, ya que éste es uno de los tipos capsulares más común en aislamientos de *K. pneumoniae*

invasiva. Se observó que el mecanismo de reacción involucra toda la TSP siendo la Ompk36 el receptor irreversible para BaqKPR2 la cual actuaría en conjunto con su dominio depolimerasa mediante acción pectato liasa catalizando la escisión de los enlaces α -1,4-glucosídicos de los lipopolisacáridos capsulares, Sin embargo, al contrario de lo que sucede con la lisina de BaqSau1, éstas no tiene una acción cooperativistas de modo que se esperaría que la depolimerasa truncada podría tener un efecto sostenido de forma recombinante en ensayos in-vitro. .

Si bien se puede considerar que éste es el primer estudio que brinde respuestas acerca de la interacción fago – bacteria, que analiza la endolisina nativa de BaqSau1 y su interacción hacia otros componentes importantes de la pared bacteriana en *S. aureus*, y que también analiza la TSP que contiene el dominio depolimerasa de BaqKPR2 hacia los receptores irreversibles en *K. pneumoniae*, siendo considerados estos receptores importantes dianas terapéuticas, se resalta que estos resultados deben ser evaluados mediante ensayos *in-vitro* mediante mutagénesis dirigida o comprobar los cálculos obtenidos mediante docking molecular a través de una dinámica computacional por ejemplo, que permita confirmar los hallazgos. Sin embargo, estas aproximaciones permiten direccionar próximas investigaciones que tenga por objeto la obtención y purificación de ambas enzimas de tipo recombinante.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. OPS. Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS. 2021 [cited 2024 Jan 5]. Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS. Available from: <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
2. Álvarez-Calderón CE, Botero-Murillo D. Guerra y pestilencia: impacto de epidemias y pandemias en la historia hasta el siglo XX. *Revista Científica General José María Córdova*. 2021 jul 1;19(35):573–97.
3. World Economic Forum. Foro Económico Mundial. 2020 [cited 2024 Jan 5]. La esperanza de vida global ha aumentado en los últimos 65 años. Available from: <https://es.weforum.org/agenda/2020/05/la-esperanza-de-vida-global-ha-aumentado-en-los-ultimos-65-anos-esta-animacion-lo-muestra-en-solo-13-segundos/>
4. Organización Panamericana de Salud OPS. La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial [Internet]. [cited 2024 Feb 1]. Available from: <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>
5. Organización mundial de Salud 2020. Resistencia a los antibióticos [Internet]. [cited 2024 Feb 1]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
6. Pivard M, Moreau K, Vandenesch F. Staphylococcus aureus Arsenal to Conquer the Lower Respiratory Tract. *mSphere* [Internet]. 2021 Jun 30 [cited 2024 Jan 5];6(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8265621/pdf/msphere.00059-21.pdf>
7. Tong SYC, Chen LF, Fowler VG. Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for Staphylococcus aureus: What is the clinical relevance? *Seminars in Immunopathology*. 2012.
8. Den Reijer PM, Haisma EM, Lemmens-Den Toom NA, Willemse J, Koning RA, Demmers JAA, et al. Detection of alpha-toxin and other virulence factors in biofilms of staphylococcus aureus on polystyrene and a human epidermal model. *PLoS One*. 2016 Jan 7;11(1).
9. Mlynarczyk-Bonikowska B, Kowalewski C, Krolak-Ulinska A, Marusza W. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Staphylococcus aureus. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
10. Ovalle M SSRM. INFORME DE RESULTADOS DE LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN EN SALUD (IAAS) 2018 [Internet]. 2019 [cited 2024 Jan 7]. p. 1–32. Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Informe-vigilancia-por-laboratorio-resistencia-antimicrobiana-y-whonet-IAAS-2018.pdf>

11. Lozano D, Díaz L, Echeverry M, Pineda S, Máttar S. PVL positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from healthy individuals in Montería, Córdoba. *Univ Sci (Bogota)*. 2010;15(2).
12. Hogan B, Rakotozandrindrainy R, Al-Emran H, Dekker D, Hahn A, Jaeger A, et al. Prevalence of nasal colonisation by methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthcare workers and students in Madagascar. *BMC Infect Dis [Internet]*. 2016;16(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1733-6>
13. Shariati A, Dadashi M, Moghadam MT, van Belkum A, Yaslianifard S, Darban-Sarokhalil D. Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1).
14. Kallberg C, Ardal C, Blix HS, Klein E, Martinez EM, Lindbæk M, et al. Introduction and geographic availability of new antibiotics approved between 1999 and 2014. *PLoS One*. 2018 Oct 1;13(10).
15. Debarbieux L, Pirnay JP, Verbeken G, De Vos D, Merabishvili M, Huys I, et al. A bacteriophage journey at the European Medicines Agency. *FEMS Microbiol Lett*. 2016 Jan;363(2): fnv225.
16. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences. Vol. 43, *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press; 2019. p. 123–44.
17. Gonzalez-Ferrer S, Peñaloza HF, Budnick JA, Bain WG, Nordstrom HR, Lee JS, et al. Finding order in the chaos: Outstanding questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. *Infect Immun*. 2021 Apr 1;89(4).
18. Zhu J, Wang T, Chen L, Du H. Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Vol. 12, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
19. Arcari G, Carattoli A. Global spread and evolutionary convergence of multidrug-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* high-risk clones. Vol. 117, *Pathogens and Global Health*. Taylor and Francis Ltd.; 2023. p. 328–41.
20. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017 Mar 29;16(1).
21. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2017 May 1;41(3):252–75.
22. Haruta S, Yamaguchi H, Yamamoto ET, Eriguchi Y, Nukaga M, O'Hara K, et al. Functional Analysis of the Active Site of a Metallo- β -Lactamase Proliferating in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Sep;44(9):2304–9.

23. Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanés C. SHV-1 β -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(10):2856–61.
24. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes [Internet]. Vol. 14, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000. Available from: www.ischemo.org
25. Hansen GT. Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among Enterobacterales and Other Gram-Negative Bacteria. Vol. 10, *Infectious Diseases and Therapy*. Adis; 2021. p. 75–92.
26. Knecht LE, Veljkovic M, Fieseler L. Diversity and Function of Phage Encoded Depolymerases. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
27. Pires DP, Oliveira H, Melo LDR, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. Vol. 100, *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag; 2016. p. 2141–51.
28. Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. Vol. 7, *Future Microbiology*. 2012. p. 1147–71.
29. Hyman P. Phages for phage therapy: Isolation, characterization, and host range breadth. Vol. 12, *Pharmaceuticals*. MDPI AG; 2019.
30. Abedon ST, Kuhl SJSSJSSJ, Blasdel BGBBG, Kutter EEME. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 2011.
31. Kutter EM, Kuhl SJ, Abedon ST. Re-establishing a place for phage therapy in western medicine. *Future Microbiol* [Internet]. 2015;10(5):685–8. Available from: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.15.28>
32. Housby JN, Mann NH. Phage therapy. Vol. 14, *Drug Discovery Today*. 2009. p. 536–40.
33. Hagens S, Loessner MJ. Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol. *Front Microbiol*. 2014;5(APR).
34. Almutairi M, Imam M, Alammari N, Hafiz R, Patel F, Alajel S. Using Phages to Reduce *Salmonella* Prevalence in Chicken Meat: A Systematic Review. Vol. 3, *PHAGE: Therapy, Applications, and Research*. Mary Ann Liebert Inc.; 2022. p. 15–27.
35. Fabijan AP, Iredell J, Danis-Włodarczyk K, Kebriaei R, Abedon ST. Translating phage therapy into the clinic: Recent accomplishments but continuing challenges. *PLoS Biol*. 2023 May 1;21(5).

36. Domingo-Calap P, Delgado-Martínez J. Bacteriophages: Protagonists of a post-antibiotic era. Vol. 7, Antibiotics. MDPI AG; 2018.
37. O'Flaherty S, Ross RP, Coffey A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria: Review article. Vol. 33, FEMS Microbiology Reviews. 2009. p. 801–19.
38. Maciejewska B, Olszak T, Drulis-Kawa Z. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and a realistic application? Vol. 102, Applied Microbiology and Biotechnology. Springer Verlag; 2018. p. 2563–81.
39. Oliveira H, Melo LDR, Santos SB, Nobrega FL, Ferreira EC, Cerca N, et al. Molecular Aspects and Comparative Genomics of Bacteriophage Endolysins. J Virol [Internet]. 2013;87(8):4558–70. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.03277-12>
40. Horgan M, O'Flynn G, Garry J, Cooney J, Coffey A, Fitzgerald GF, et al. Phage lysin LysK can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant staphylococci. Appl Environ Microbiol. 2009;75(3):872–4.
41. Bateman A, Rawlings ND. The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. Trends Biochem Sci. 2003 May;28(5):234–7.
42. Gutiérrez D, Garrido V, Fernández L, Portilla S, Rodríguez A, Grilló MJ, et al. Phage Lytic Protein LysRODI Prevents Staphylococcal Mastitis in Mice. Front Microbiol. 2020 Jan 23;11.
43. Zhang L, Li D, Li X, Hu L, Cheng M, Xia F, et al. LysGH15 kills Staphylococcus aureus without being affected by the humoral immune response or inducing inflammation. Sci Rep. 2016 Jul 7;6.
44. Schmelcher M, Korobova O, Schischkova N, Kiseleva N, Kopylov P, Pryamchuk S, et al. Staphylococcus haemolyticus prophage Φ SH2 endolysin relies on cysteine, histidine-dependent amidohydrolases/peptidases activity for lysis 'from without.' J Biotechnol. 2012 Dec 31;162(2–3):289–98.
45. Fenton M, Ross RP, McAuliffe O, O'Mahony J, Coffey A. Characterization of the staphylococcal bacteriophage lysin CHAP K. J Appl Microbiol. 2011;111(4):1025–35.
46. Zhang L, Li D, Li X, Hu L, Cheng M, Xia F, et al. LysGH15 kills Staphylococcus aureus without being affected by the humoral immune response or inducing inflammation. Sci Rep. 2016 Jul 7;6.
47. Becker SC, Dong S, Baker JR, Foster-Frey J, Pritchard DG, Donovan DM. LysK CHAP endopeptidase domain is required for lysis of live staphylococcal cells. FEMS Microbiol Lett. 2009 May;294(1):52–60.
48. Donovan DM, Lardeo M, Foster-Frey J. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. FEMS Microbiol Lett. 2006 Dec;265(1):133–9.

49. Sanz-Gaitero M, Keary R, Garcia-Doval C, Coffey A, Van Raaij MJ. Crystal structure of the lytic CHAP<inf>K</inf> domain of the endolysin LysK from *Staphylococcus aureus* bacteriophage K. *Virology*. 2014;11(1).
50. Gu J, Feng Y, Feng X, Sun C, Lei L, Ding W, et al. Structural and Biochemical Characterization Reveals LysGH15 as an Unprecedented “EF-Hand-Like” Calcium-Binding Phage Lysin. *PLoS Pathog*. 2014;10(5).
51. Fenton M, Cooney JC, Ross RP, Sleator RD, McAuliffe O, O’Mahony J, et al. In silico modeling of the staphylococcal bacteriophage-derived peptidase CHAP K. *Bacteriophage*. 2011 Jul;1(4):198–206.
52. Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C. The advantages and challenges of using endolysins in a clinical setting. Vol. 13, *Viruses*. MDPI AG; 2021.
53. Fenton M, Casey PG, Hill C, Gahan CGM, Ross RP, McAuliffe O, et al. The truncated phage lysin CHAPk eliminates *staphylococcus aureus* in the nares of mice. *Bioeng Bugs*. 2010;1(6):404–7.
54. Proença D, Velours C, Leandro C, Garcia M, Pimentel M, São-José C. A two-component, multimeric endolysin encoded by a single gene. *Mol Microbiol*. 2015 Mar 1;95(5):739–53.
55. Gebhart D, Williams SR, Scholl D. Bacteriophage SP6 encodes a second tailspike protein that recognizes *Salmonella enterica* serogroups C2 and C3. *Virology*. 2017 Jul; 507:263–6.
56. Scholl D, Adhya S, Merrill CR. Bacteriophage SP6 Is Closely Related to Phages K1-5, K5, and K1E but Encodes a Tail Protein Very Similar to That of the Distantly Related P22. *J Bacteriol*. 2002 May 15;184(10):2833–6.
57. Latka A, Leiman PG, Drulis-Kawa Z, Briers Y. Modeling the Architecture of Depolymerase-Containing Receptor Binding Proteins in *Klebsiella* Phages. *Front Microbiol*. 2019 Nov 15;10.
58. Stummeyer K, Schwarzer D, Claus H, Vogel U, Gerardy-Schahn R, Mühlenhoff M. Evolution of bacteriophages infecting encapsulated bacteria: Lessons from *Escherichia coli* K1-specific phages. *Mol Microbiol*. 2006 Jun;60(5):1123–35.
59. Hsieh PF, Lin HH, Lin TL, Chen YY, Wang JT. Two T7-like Bacteriophages, K5-2 and K5-4, Each Encodes Two Capsule Depolymerases: Isolation and Functional Characterization. *Sci Rep*. 2017 Jul 4;7(1):4624.
60. Thompson JE, Pourhossein M, Waterhouse A, Hudson T, Goldrick M, Derrick JP, et al. The K5 Lyase KfIA Combines a Viral Tail Spike Structure with a Bacterial Polysaccharide Lyase Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Jul;285(31):23963–9.

61. Majkowska-Skrobek G, Latka A, Berisio R, Squeglia F, Maciejewska B, Briers Y, et al. Phage-Borne Depolymerases Decrease *Klebsiella pneumoniae* Resistance to Innate Defense Mechanisms. *Front Microbiol.* 2018 Oct 23;9.
62. Wang C, Li P, Niu W, Yuan X, Liu H, Huang Y, et al. Protective and therapeutic application of the depolymerase derived from a novel KN1 genotype of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in mice. *Res Microbiol.* 2019 Apr;170(3):156–64.
63. Pan Y, Lin T, Chen Y, Lai P, Tsai Y, Hsu C, et al. Identification of three podoviruses infecting *Klebsiella* encoding capsule depolymerases that digest specific capsular types. *Microb Biotechnol.* 2019 May 31;12(3):472–86.
64. Solovieva E V., Myakinina VP, Kislichkina AA, Krasilnikova VM, Verevkin V V., Mochalov V V., et al. Comparative genome analysis of novel Podoviruses lytic for hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* of K1, K2, and K57 capsular types. *Virus Res.* 2018 Jan; 243:10–8.
65. Hoyles L, Murphy J, Neve H, Heller KJ, Turton JF, Mahony J, et al. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*-bacteriophage combination from the caecal effluent of a healthy woman. *PeerJ.* 2015;2015(7).
66. Plattner M, Shneider MM, Arbatsky NP, Shashkov AS, Chizhov AO, Nazarov S, et al. Structure and Function of the Branched Receptor-Binding Complex of Bacteriophage CBA120. *J Mol Biol.* 2019 Sep;431(19):3718–39.
67. Tomlinson' And S, Taylor12 PW. Neuraminidase Associated with Coliphage E That Specifically Depolymerizes the *Escherichia coli* K1 Capsular Polysaccharide. *JOURNAL OF VIROLOGY.* 1985.
68. Born Y, Fieseler L, Klumpp J, Eugster MR, Zurfluh K, Duffy B, et al. The tail-associated depolymerase of *Erwinia amylovora* phage L1 mediates host cell adsorption and enzymatic capsule removal, which can enhance infection by another phage. *Environ Microbiol.* 2014 Jul 15;16(7):2168–80.
69. Chen Y, Guo G, Sun E, Song J, Yang L, Zhu L, et al. Isolation of a T7-Like Lytic *Pasteurella* Bacteriophage vB_PmuP_PHB01 and Its Potential Use in Therapy against *Pasteurella multocida* Infections. *Viruses.* 2019 Jan 21;11(1):86.
70. Chang C, Yu X, Guo W, Guo C, Guo X, Li Q, et al. Bacteriophage-Mediated Control of Biofilm: A Promising New Dawn for the Future. Vol. 13, *Frontiers in Microbiology.* Frontiers Media S.A.; 2022.
71. Hernandez-Morales AC, Lessor LL, Wood TL, Migl D, Mijalis EM, Cahill J, et al. Genomic and Biochemical Characterization of *Acinetobacter* Podophage Petty Reveals a Novel Lysis Mechanism and Tail-Associated Depolymerase Activity. *J Virol.* 2018 Mar 15;92(6).

72. Lin TL, Hsieh PF, Huang YT, Lee WC, Tsai YT, Su PA, et al. Isolation of a Bacteriophage and Its Depolymerase Specific for K1 Capsule of *Klebsiella pneumoniae*: Implication in Typing and Treatment. *J Infect Dis*. 2014 Dec 1;210(11):1734–44.
73. Olszak T, Shneider MM, Latka A, Maciejewska B, Browning C, Sycheva L V., et al. The O-specific polysaccharide lyase from the phage LKA1 tailspike reduces *Pseudomonas* virulence. *Sci Rep*. 2017 Nov 24;7(1):16302.
74. Steinbacher S, Baxa U, Miller S, Weintraub A, Seckler R, Huber R. Crystal structure of phage P22 tailspike protein complexed with *Salmonella* sp. O-antigen receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996 Oct;93(20):10584–8.
75. Chua JEH, Manning PA, Morona R. The *Shigella flexneri* bacteriophage Sf6 tailspike protein (TSP)/endorhamnosidase is related to the bacteriophage P22 TSP and has a motif common to exo- and endoglycanases, and C-5 epimerases. *Microbiology (N Y)*. 1999 Jul 1;145(7):1649–59.
76. Barbirz S, Müller JJ, Uetrecht C, Clark AJ, Heinemann U, Seckler R. Crystal structure of *Escherichia coli* phage HK620 tailspike: podoviral tailspike endoglycosidase modules are evolutionarily related. *Mol Microbiol*. 2008 Jul 28;69(2):303–16.
77. Popova A, Lavysh D, Klimuk E, Edelstein M, Bogun A, Shneider M, et al. Novel Fri1-like Viruses Infecting *Acinetobacter baumannii*—vB_AbaP_AS11 and vB_AbaP_AS12—Characterization, Comparative Genomic Analysis, and Host-Recognition Strategy. *Viruses*. 2017 Jul 17;9(7):188.
78. Lai WCB, Chen X, Ho MKY, Xia J, Leung SSY. Bacteriophage-derived endolysins to target gram-negative bacteria. Vol. 589, *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V.; 2020.
79. Liu Y, Mi Z, Mi L, Huang Y, Li P, Liu H, et al. Identification and characterization of capsule depolymerase Dpo48 from *Acinetobacter baumannii* phage IME200. *PeerJ*. 2019 Jan 14;7: e6173.
80. Oliveira H, Mendes A, Fraga AG, Ferreira A, Pimenta AI, Mil-Homens D, et al. K2 Capsule Depolymerase Is Highly Stable, Is Refractory to Resistance, and Protects Larvae and Mice from *Acinetobacter baumannii* Sepsis. *Appl Environ Microbiol*. 2019 Sep;85(17).
81. Oliveira H, Costa AR, Konstantinides N, Ferreira A, Akturk E, Sillankorva S, et al. Ability of phages to infect *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species through acquisition of different pectate lyase depolymerase domains. *Environ Microbiol*. 2017 Dec 4;19(12):5060–77.
82. Mi L, Liu Y, Wang C, He T, Gao S, Xing S, et al. Identification of a lytic *Pseudomonas aeruginosa* phage depolymerase and its anti-biofilm effect and bactericidal contribution to serum. *Virus Genes*. 2019 Jun 1;55(3):394–405.
83. Pan YJ, Lin TL, Chen CC, Tsai YT, Cheng YH, Chen YY, et al. *Klebsiella* Phage ΦK64-1 Encodes Multiple Depolymerases for Multiple Host Capsular Types. *J Virol*. 2017 Mar 15;91(6).

84. Linnerborg M, Weintraub A, Albert MJ, Widmalm G. Depolymerization of the capsular polysaccharide from *Vibrio cholerae* O139 by a lyase associated with the bacteriophage JA1. *Carbohydr Res*. 2001 Jul;333(4):263–9.
85. Guichard JA, Middleton PC, McConnell MR. Genetic analysis of structural proteins in the adsorption apparatus of bacteriophage epsilon 15. *World J Virol*. 2013;2(4):152.
86. Guo Z, Huang J, Yan G, Lei L, Wang S, Yu L, et al. Identification and Characterization of Dpo42, a Novel Depolymerase Derived from the *Escherichia coli* Phage vB_EcoM_ECOO78. *Front Microbiol*. 2017 Aug 2;8.
87. Oliveira H, Costa AR, Ferreira A, Konstantinides N, Santos SB, Boon M, et al. Functional Analysis and Antivirulence Properties of a New Depolymerase from a Myovirus That Infects *Acinetobacter baumannii* Capsule K45. *J Virol*. 2019 Feb 15;93(4).
88. Hsu CR, Lin TL, Pan YJ, Hsieh PF, Wang JT. Isolation of a Bacteriophage Specific for a New Capsular Type of *Klebsiella pneumoniae* and Characterization of Its Polysaccharide Depolymerase. *PLoS One*. 2013 Aug 2;8(8): e70092.
89. Sharma R, Pielstick BA, Bell KA, Nieman TB, Stubbs OA, Yeates EL, et al. A Novel, Highly Related Jumbo Family of Bacteriophages That Were Isolated Against *Erwinia*. *Front Microbiol*. 2019 Jul 23;10.
90. Leiman PG, Battisti AJ, Bowman VD, Stummeyer K, Mühlenhoff M, Gerardy-Schahn R, et al. The Structures of Bacteriophages K1E and K1-5 Explain Processive Degradation of Polysaccharide Capsules and Evolution of New Host Specificities. *J Mol Biol*. 2007 Aug;371(3):836–49.
91. Pan Y, Lin T, Chen Y, Lai P, Tsai Y, Hsu C, et al. Identification of three podoviruses infecting *Klebsiella* encoding capsule depolymerases that digest specific capsular types. *Microb Biotechnol*. 2019 May 31;12(3):472–86.
92. Solovieva E V., Myakinina VP, Kislichkina AA, Krasilnikova VM, Verevkin V V., Mochalov V V., et al. Comparative genome analysis of novel Podoviruses lytic for hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* of K1, K2, and K57 capsular types. *Virus Res*. 2018 Jan; 243:10–8.
93. Majkowska-Skrobek G, Łątka A, Berisio R, Maciejewska B, Squeglia F, Romano M, et al. Capsule-Targeting Depolymerase, Derived from *Klebsiella* KP36 Phage, as a Tool for the Development of Anti-Virulent Strategy. *Viruses*. 2016 Dec 1;8(12):324.
94. Nirmal Kumar GP, Sundarrajan S, Paul VD, Nandini S, Saravanan RS, Hariharan S, et al. Use of prophage free host for achieving homogenous population of bacteriophages: new findings. *Virus Res*. 2012 Oct;169(1):182–7.

95. Martha R. J. Clokie AMK (eds.). Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. Chap:12. Pag:113-26. In 2009. p. 1–313. Available from: www.springer.com/series/7651
96. MATO R, SANCHES IS, VENDITTI M, PLATT DJ, BROWN A, CHUNG M, et al. Spread of the Multiresistant Iberian Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. Microbial Drug Resistance. 1998 Jan;4(2):107–12.
97. Gomes AR, Santos Sanches I, Aires de Sousa M, Castañeda E, de Lencastre H. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian Hospitals: Dominance of a Single Unique Multidrug-Resistant Clone. Microbial Drug Resistance. 2001 Mar;7(1):23–32.
98. OPS 2002. Antibióticos según WHONET. [cited 2024 Jan 13]; Available from: <https://www3.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/amr-santa-cruz-siglas.pdf>
99. Hyman P. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. Pharmaceuticals. 2019 Mar 11;12(1):35.
100. R Development Core Team (2008) R: A language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
101. Ackermann HW. Tailed Bacteriophages: The Order Caudovirales. In 1998. p. 135–201.
102. Zhang Q, Xing S, Sun Q, Pei G, Cheng S, Liu Y, et al. Characterization and complete genome sequence analysis of a novel virulent Siphoviridae phage against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Xinjiang, China. Virus Genes. 2017 Jun 15;53(3):464–76.
103. Kwiatek M, Parasion S, Mizak L, Gryko R, Bartoszcze M, Kocik J. Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis, that is lytic against *Staphylococcus aureus* strains. Arch Virol. 2012 Feb 2;157(2):225–34.
104. Krueger F. Trim Galore! http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/; 2015.
105. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014 Aug 1;30(15):2114–20.
106. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. Journal of Computational Biology. 2012 May;19(5):455–77.
107. Mikheenko A, Saveliev V, Gurevich A. MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. Bioinformatics. 2016 Apr 1;32(7):1088–90.

108. Garneau JR, Depardieu F, Fortier LC, Bikard D, Monot M. PhageTerm: a tool for fast and accurate determination of phage termini and packaging mechanism using next-generation sequencing data. *Sci Rep*. 2017 Aug 15;7(1):8292.
109. Philipson C, Voegtly L, Lueder M, Long K, Rice G, Frey K, et al. Characterizing Phage Genomes for Therapeutic Applications. *Viruses*. 2018 Apr 10;10(4):188.
110. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* [Internet]. 2008 Dec 8 [cited 2018 Feb 21];9(1):75. Available from: <http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>
111. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. *Journal of Molecular Biology*. 1990 [cited 2018 Feb 19]. p. 403–10 Basic local alignment search tool. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
112. McNair K, Zhou C, Dinsdale EA, Souza B, Edwards RA. PHANOTATE: a novel approach to gene identification in phage genomes. *Bioinformatics*. 2019 Nov 1;35(22):4537–42.
113. Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics*. 2007 Mar 15;23(6):673–9.
114. Ramsey J, Rasche H, Maughmer C, Criscione A, Mijalis E, Liu M, et al. Galaxy and Apollo as a biologist-friendly interface for high-quality cooperative phage genome annotation. *PLoS Comput Biol*. 2020 Nov 2;16(11): e1008214.
115. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jul 8;44(W1): W16–21.
116. Alcock BP, Huynh W, Chalil R, Smith KW, Raphenya AR, Wlodarski MA, et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res*. 2023 Jan 6;51(D1): D690–9.
117. Johansson MHK, Bortolaia V, Tansirichaiya S, Aarestrup FM, Roberts AP, Petersen TN. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2021 Jan 1;76(1):101–9.
118. Hildebrand A, Remmert M, Biegert A, Söding J. Fast and accurate automatic structure prediction with HHpred. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2009 Jan 22;77(S9):128–32.
119. Turner D, Adriaenssens EM, Tolstoy I, Kropinski AM. Phage Annotation Guide: Guidelines for Assembly and High-Quality Annotation. *PHAGE: Therapy, Applications, and Research*. 2021 Dec 1;2(4):170–82.

120. Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*. 2011 Apr 1;27(7):1009–10.
121. Yoon SH, Ha S min, Lim J, Kwon S, Chun J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2017 Oct 15;110(10):1281–6.
122. Meier-Kolthoff JP, Göker M. VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. *Bioinformatics*. 2017 Nov 1;33(21):3396–404.
123. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*. 2015 Jun 7;10(6):845–58.
124. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Motif Finder Tool [Internet]. [cited 2019 Sep 8]. Available from: <https://www.genome.jp/tools/motif/>
125. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jul 2;46(W1): W296–303.
126. Bienert S, Waterhouse A, de Beer TAP, Tauriello G, Studer G, Bordoli L, et al. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 4;45(D1): D313–9.
127. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods*. 2022 Jun 30;19(6):679–82.
128. Dunstan RA, Bamert RS, Belousoff MJ, Short FL, Barlow CK, Pickard DJ, et al. Mechanistic Insights into the Capsule-Targeting Depolymerase from a *Klebsiella pneumoniae* Bacteriophage. Goldberg JB, editor. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2021 Sep 3;9(1). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/Spectrum.01023-21>
129. Knecht LE, Veljkovic M, Fieseler L. Diversity and Function of Phage Encoded Depolymerases. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
130. Meng EC, Goddard TD, Pettersen EF, Couch GS, Pearson ZJ, Morris JH, et al. UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Science*. 2023 Nov 20;32(11).
131. Bowie JU, Lüthy R, Eisenberg D. A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure. *Science* (1979). 1991 Jul 12;253(5016):164–70.
132. Lüthy R, Bowie JU, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*. 1992 Mar;356(6364):83–5.
133. Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*. 1993 Sep 31;2(9):1511–9.

134. Institute for Genomics and Proteomics (IGP). UCLA-DOE LAB — SAVES v6.0 [Internet]. [cited 2023 Jan 15]. Available from: <https://www.doe-mpi.ucla.edu/verify3d/>
135. Fishovitz J, Rojas-Altuve A, Otero LH, Dawley M, Carrasco-López C, Chang M, et al. Disruption of Allosteric Response as an Unprecedented Mechanism of Resistance to Antibiotics. *J Am Chem Soc.* 2014 Jul 16;136(28):9814–7.
136. Jiménez-García B, Pons C, Fernández-Recio J. pyDockWEB: a web server for rigid-body protein–protein docking using electrostatics and desolvation scoring. *Bioinformatics.* 2013 Jul 1;29(13):1698–9.
137. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010 Jan 30;31(2):455–61.
138. Herman Bergwerf. MolView v2.4 [Internet]. [cited 2024 Jan 23]. Available from: <https://molview.org/>
139. Jimenez-Garcia B., Pons C, Fernandez-Recio J. “pyDockWEB: a web server for rigid-body protein-protein docking using electrostatics and desolvation scoring”. *Bioinformatics* (2013) 29(13). 2013 [cited 2021 Aug 9]. p. 1698–9 PyDockWEB. Available from: <https://life.bsc.es/pid/pydockweb#>
140. Pan YJ, Lin TL, Chen CT, Chen YY, Hsieh PF, Hsu CR, et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci Rep.* 2015 Oct 23;5.
141. Dunstan RA, Bamert RS, Tan KS, Imbulgoda U, Barlow CK, Taiaroa G, et al. Epitopes in the capsular polysaccharide and the porin OmpK36 receptors are required for bacteriophage infection of *Klebsiella pneumoniae*. *Cell Rep.* 2023 Jun 27;42(6).
142. Wong JLC, Romano M, Kerry LE, Kwong HS, Low WW, Brett SJ, et al. OmpK36-mediated Carbapenem resistance attenuates ST258 *Klebsiella pneumoniae* in vivo. *Nat Commun.* 2019 Dec 1;10(1).
143. M. J. Frisch Et al. Gaussian 16.
144. Gutiérrez D, Adriaenssens EM, Martínez B, Rodríguez A, Lavigne R, Kropinski AM, et al. Three proposed new bacteriophage genera of staphylococcal phages: “3alikevirus”, “77likevirus” and “Phietalikevirus.” *Arch Virol.* 2014 Feb;159(2):389–98.
145. Goulet A, Spinelli S, Mahony J, Cambillau C. Conserved and diverse traits of adhesion devices from siphoviridae recognizing proteinaceous or saccharidic receptors. Vol. 12, *Viruses*. MDPI AG; 2020.

146. Hitchcock NM, Devequi Gomes Nunes D, Shiach J, Valeria Saraiva Hodel K, Dantas Viana Barbosa J, Alencar Pereira Rodrigues L, et al. Current Clinical Landscape and Global Potential of Bacteriophage Therapy. *Viruses*. 2023 Apr 21;15(4):1020.
147. GenBank, Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information [Internet]. [cited 2023 Nov 22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>
148. Turner D, Shkoporov AN, Lood C, Millard AD, Dutilh BE, Alfenas-Zerbini P, et al. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Arch Virol*. 2023 Feb 23;168(2):74.
149. Fujiki J, Nakamura T, Furusawa T, Ohno H, Takahashi H, Kitana J, et al. Characterization of the lytic capability of a lysk-like endolysin, lys-phiSA012, derived from a polyvalent staphylococcus aureus bacteriophage. *Pharmaceuticals*. 2018 Mar 1;11(1).
150. Hyman P, Abedon ST. Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. In: *Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance, Advances in Applied Microbiology*. 2010. p. 217–48.
151. Ross A, Ward S, Hyman P. More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. *Front Microbiol*. 2016 Sep 8;7.
152. Townsend EM, Kelly L, Gannon L, Muscatt G, Dunstan R, Michniewski S, et al. Isolation and Characterization of *Klebsiella* Phages for Phage Therapy. *PHAGE*. 2021 Mar 1;2(1):26–42.
153. Díaz-Muñoz SL, Koskella B. Bacteria–Phage Interactions in Natural Environments. In 2014. p. 135–83.
154. Nilsson AS. Phage therapy—constraints and possibilities. *Ups J Med Sci*. 2014 May 30;119(2):192–8.
155. Abedon ST. Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI). *Bacteriophage* [Internet]. 2016 Jul 2;6(3):e1220348. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21597081.2016.1220348>
156. Zhang K, Pankratz K, Duong H, Theodore M, Guan J, Jiang A (Andrew), et al. Interactions between Viral Regulatory Proteins Ensure an MOI-Independent Probability of Lysogeny during Infection by Bacteriophage P1. *mBio*. 2021 Oct 26;12(5).
157. Hřebík D, Štveráková D, Škubník K, Füzik T, Pantůček R, Plevka P. Structure and genome ejection mechanism of *Staphylococcus aureus* phage P68. Vol. 5, *Sci. Adv*. 2019.
158. Koç C, Xia G, Kühner P, Spinelli S, Roussel A, Cambillau C, et al. Structure of the host-recognition device of *Staphylococcus aureus* phage ϕ 11. *Sci Rep*. 2016 Jun 10;6(1):27581.

159. Leprince A, Nuytten M, Mahillon J. Viral Proteins Involved in the Adsorption Process of Deep-Purple, a Siphovirus Infecting Members of the *Bacillus cereus* Group. *Appl Environ Microbiol*. 2022 May 24;88(10).
160. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B. Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches. *Curr Med Chem*. 2015 Apr 24;22(14):1757–73.
161. Lima-Mendez G, Toussaint A, Leprieux R. A modular view of the bacteriophage genomic space: identification of host and lifestyle marker modules. *Res Microbiol*. 2011 Oct;162(8):737–46.
162. Zhang L, Huang Y, Xu D, Yang L, Qian K, Chang G, et al. Biochemical characterization of a thermostable HNH endonuclease from deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Sep 30;100(18):8003–12.
163. Greenfield J, Shang X, Luo H, Zhou Y, Linden SB, Heselpoth RD, et al. Structure and function of bacteriophage CBA120 ORF211 (TSP2), the determinant of phage specificity towards *E. coli* O157:H7. *Sci Rep*. 2020 Sep 21;10(1):15402.
164. Xiang Y, Leiman PG, Li L, Grimes S, Anderson DL, Rossmann MG. Crystallographic Insights into the Autocatalytic Assembly Mechanism of a Bacteriophage Tail Spike. *Mol Cell*. 2009 May;34(3):375–86.
165. Lai MJ, Chang KC, Huang SW, Luo CH, Chiou PY, Wu CC, et al. The Tail Associated Protein of *Acinetobacter baumannii* Phage Φ AB6 Is the Host Specificity Determinant Possessing Exopolysaccharide Depolymerase Activity. *PLoS One*. 2016 Apr 14;11(4):e0153361.
166. Lozano-Solano D, Reales-González J, Catoe HW, Raya RR, Acosta-Hoyos AJ. Genome sequence of the siphoviridae *Staphylococcus aureus* phage vB_SauS_BaqSau1. *Microbiol Resour Announc*. 2020;9(15).
167. Baker JR, Liu C, Dong S, Pritchard DG. Endopeptidase and Glycosidase Activities of the Bacteriophage B30 Lysin. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Oct;72(10):6825–8.
168. McGowan S, Buckle AM, Mitchell MS, Hoopes JT, Gallagher DT, Heselpoth RD, et al. X-ray crystal structure of the streptococcal specific phage lysin PlyC. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Jul 31;109(31):12752–7.
169. Zhou Y, Yang W, Kirberger M, Lee H, Ayalasomayajula G, Yang JJ. Prediction of EF-hand calcium-binding proteins and analysis of bacterial EF-hand proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2006 Nov 15;65(3):643–55.
170. Winstel V, Sanchez-Carballo P, Holst O, Xia G, Peschel A. Biosynthesis of the Unique Wall Teichoic Acid of *Staphylococcus aureus* Lineage ST395. *mBio*. 2014 May;5(2).

171. Winstel V, Liang C, Sanchez-Carballo P, Steglich M, Munar M, Bröker BM, et al. Wall teichoic acid structure governs horizontal gene transfer between major bacterial pathogens. *Nat Commun*. 2013 Aug 22;4(1):2345.
172. Cai R, Wu M, Zhang H, Zhang Y, Cheng M, Guo Z, et al. A smooth-type, phage-resistant *Klebsiella pneumoniae* mutant strain reveals that OmpC is indispensable for infection by phage GH-K3. *Appl Environ Microbiol*. 2018 Nov 1;84(21).
173. Brisse S, Issenhuith-Jeanjean S, Grimont PAD. Molecular Serotyping of *Klebsiella* Species Isolates by Restriction of the Amplified Capsular Antigen Gene Cluster. *J Clin Microbiol*. 2004 Aug;42(8):3388–98.
174. Cai R, Ren Z, Zhao R, Lu Y, Wang X, Guo Z, et al. Structural biology and functional features of phage-derived depolymerase Depo32 on *Klebsiella pneumoniae* with K2 serotype capsular polysaccharides. *Microbiol Spectr*. 2023 Oct 17;11(5).
175. Gabb HA, Jackson RM, Sternberg MJE. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information 1 Edited by J. Thornton. *J Mol Biol*. 1997 Sep;272(1):106–20.
176. Bouysset C, Fiorucci S. ProLIF: a library to encode molecular interactions as fingerprints. *J Cheminform*. 2021 Dec 25;13(1):72.
177. Hao G, Yuan C, Shu R, Jia Y, Zhao S, Xie S, et al. O-antigen serves as a two-faced host factor for bacteriophage NJS1 infecting nonmucoid *Klebsiella pneumoniae*: O-antigen is a receptor for nonmucoid *Klebsiella pneumoniae* phage. *Microb Pathog*. 2021 Jun 1;155.
178. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, et al. *Klebsiella pneumoniae* Outer Membrane Porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in both Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Apr;55(4):1485–93.
179. Pastagia M, Schuch R, Fischetti VA, Huang DB. Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *J Med Microbiol*. 2013 Oct 1;62(10):1506–16.
180. Gutiérrez D, Fernández L, Rodríguez A, García P. Are Phage Lytic Proteins the Secret Weapon to Kill *Staphylococcus aureus*? *mBio*. 2018 Mar 7;9(1).
181. Dennehy JJ, Abedon ST. Adsorption: Phage Acquisition of Bacteria. In: *Bacteriophages*. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 1–25.
182. Piuri M, Hatfull GF. A peptidoglycan hydrolase motif within the mycobacteriophage TM4 tape measure protein promotes efficient infection of stationary phase cells. *Mol Microbiol*. 2006 Dec 2;62(6):1569–85.

183. Schmelcher M, Waldherr F, Loessner MJ. *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermoresistance and reveal increased activity after divalent metal cation substitution. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 Jan 1;93(2):633–43.
184. Mesnage S, Foster SJ. N-Acetylmuramoyl-L-alanine Amidase. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier; 2013. p. 1401–7.
185. Loessner MJ, Kramer K, Ebel F, Scherer S. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol Microbiol*. 2002 Apr 25;44(2):335–49.
186. Romero P, Loépez R, García E. Key Role of Amino Acid Residues in the Dimerization and Catalytic Activation of the Autolysin LytA, an Important Virulence Factor in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Jun;282(24):17729–37.
187. Capparelli A, Lodeiro A. Catálisis enzimática: fundamentos químicos de la vida. [cited 2024 Jan 30]; Available from: <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/690>
188. Pertics BZ, Kovács T, Schneider G. Characterization of a Lytic Bacteriophage and Demonstration of Its Combined Lytic Effect with a K2 Depolymerase on the Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strain 52145. *Microorganisms*. 2023 Mar 6;11(3):669.
189. Hao G, Yuan C, Shu R, Jia Y, Zhao S, Xie S, et al. O-antigen serves as a two-faced host factor for bacteriophage NJS1 infecting nonmucoid *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Pathog*. 2021 Jun; 155:104897.
190. Yadav K, Yadav S, Anand G, Yadav PK, Yadav D. Hydrolysis of complex pectin structures: Biocatalysis and bioproducts. In: *Polysaccharide-Degrading Biocatalysts*. Elsevier; 2023. p. 205–25.
191. Tu IF, Lin TL, Yang FL, Lee IM, Tu WL, Liao JH, et al. Structural and biological insights into *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharide degradation by a bacteriophage K1 lyase: implications for clinical use. *J Biomed Sci*. 2022 Feb 7;29(1):9.

Anexos

1. Artículo, Genome Sequence of the Siphoviridae Staphylococcus aureus Phage vB_SauS_BaqSau1
2. Tabla de resultados de cálculos de interacciones realizadas por Docking mediante PyDockWEB

▪