BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"ANÁLISIS ESTRUCTURAL *IN SILICO* DE LA ENOLASA DE *Klebsiella pneumoniae* Y SU POTENCIAL USO COMO UN INMUNÓGENO"

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

PATRICIA CRUZ MARTÍNEZ

ASESOR DE TESIS:

D.C. ALEJANDRO CARABARÍN LIMA

COASESORA DE TESIS:

D.C. MARÍA CRISTINA GONZÁLEZ VÁZQUEZ

MAYO DE 2022, PUEBLA, PUE.

AGRADECIMIENTOS

Hay varias personas a las que les quisiera agradecer por sus contribuciones a esta tesis. Primeramente, me gustaría agradecer a mi asesor de tesis, el Dr. Alejandro Carabarín Lima por aceptarme en su equipo y guiarme en la elaboración de este trabajo, gracias por su disposición y el tiempo brindado, por todos los conocimientos y experiencias que nos transmitió en cada clase impartida, los cuales sirvieron como una inspiración para mí. También quiero agradecerle a la Dra. María Cristina González Vázquez por brindarme su asesoría y tiempo, los cuales aprecio demasiado.

Quiero agradecerle a mi mamá, Silvia Martínez y a mi papá, Armando Cruz por apoyarme en cada paso de mi vida, en cada decisión que he tomado, no tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí, valoro todos los esfuerzos y sacrificios que han realizado, sin ustedes no me sería posible haber llegado a donde estoy. Gracias por dejarme conducir la bicicleta, pero siempre sostener el asiento.

También quiero agradecerles a mis hermanos, Laura y Pablo por cuidar de mí a su manera, por enseñarme cosas nuevas, por aconsejarme y apoyarme cuando lo necesitaba. A mi primo, Omar, por ser como un hermano y haber pasado conmigo la mayor parte de mi infancia, la cual recuerdo entrañablemente.

A mi novio, Francisco, por haber recorrido este camino conmigo, por sostener mi mano en cada momento, por compartir tus sueños y escuchar mis miedos. Gracias por aportarme tanto, te amo.

Finalmente quiero agradecer a cada profesor y amigos que compartieron una parte de ellos conmigo, gracias por su guía, su motivación y sus consejos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS II

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES III

LISTA DE ABREVIATURAS III

RESUMEN 1

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1 Klebsiella pneumoniae 1

Tabla 1. Categorías de Alimentos en donde se recuperó *Klebsiella.* 2

1.2 *Klebsiella pneumoniae* y sus factores de virulencia 4

Tabla 2. Estrategias de evasión inmune de *K. pneumoniae* 5

1.3 *Klebsiella pneumoniae* y la proteína enolasa 8

1.4 Enolasa y Plasminógeno 9

2. ANTECEDENTES 14

3. JUSTIFICACIÓN 17

4. HIPÓTESIS 17

5. OBJETIVO GENERAL 18

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18

6. MATERIALES Y MÉTODOS 18

6.1 Análisis *in silico* de la proteína enolasa de *Klebsiella pneumoniae* (KpEno). 18

6.2 Análisis estructural *in silico* de la KpEno. 19

6.3 Análisis de las propiedades inmunogénicas de KpEno *in silico*. 19

6.4 Identificación de los epítopos predichos en la estructura tridimensional de KpEno. 19

7. RESULTADOS 20

7.1 Características estructurales y funcionales de la KpEno 20

Tabla 3. Cepas seleccionadas con base en el % de identidad 20

Tabla 4. Porcentaje de identidad con relación a la enolasa de *Klebsiella pneumoniae* _____ 22

7.2 Identificación de las propiedades inmunogénicas de la KpEno _____ 24

Tabla 5. Epítopos activadores de linfocitos B encontrados en la secuencia de la enolasa de K. pneumoniae con el programa Bepiprep. _____ 24

Tabla 6. Epítopos activadores de linfocitos T encontrados en la secuencia de la enolasa de K. pneumoniae con el programa NetCTL. _____ 24

Tabla 7. Epítopos activadores de respuesta mediada por MHCI encontrados en la secuencia de la enolasa de *K. pneumoniae*._____ 25

Tabla 8. Epítopos activadores de respuesta mediada por MHCI y MHCII encontrados en la secuencia de la enolasa de *K. pneumoniae*._____ 25

7.3 Identificación de propiedades fisicoquímicas de la KpEno _____ 26

7.4 Identificación de epítopos predichos en la estructura tridimensional de KpEn_____ 30

8. DISCUSIÓN _____ 34

9. CONCLUSIÓN_____ 38

11. PERSPECTIVAS _____ 38

12. BIBLIOGRAFÍA _____ 39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	*Título*	*Página*
1	Categorías de *Klebsiella* que se recuperaron en los alimentos.	2
2	Estrategias de evasión inmune de *K. pneumoniae*	5
3	Cepas seleccionadas con base en el % de identidad	
4	Porcentaje de identidad con relación a la enolasa de *Klebsiella pneumoniae*	22
5	Epítopos activadores de linfocitos B encontrados en la secuencia de la enolasa de *K. pneumoniae* con el programa Bepiprep.	24
6	Epítopos activadores de linfocitos T encontrados en la secuencia de la enolasa de *K. pneumoniae* con el programa NetCTL.	24
7	Epítopos activadores de respuesta mediada por MHCI encontrados en la secuencia de la enolasa de *K. pneumoniae*.	25
8	Tabla 8. Epítopos activadores de respuesta mediada por MHCI y MHCII encontrados en la secuencia de la enolasa de K. pneumoniae.	25

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración	*Título*	*Página*
1	Estructura del plasminógeno	10
2	Mecanismos de activación del plasminógeno por bacterias	13
3	Árbol filogenético	21
4	Alineamiento múltiple de la enolasa de K. pneumoniae y las diferentes cepas	23
5	Sitios de procesamiento	25
6	Predicción de hélices transmembranales con el servidor DTMHMM	26
7	Predicción de hélices transmembranales	27
8	Predicción de péptidos de señalización	28
9	Predicción de péptidos de señalización, péptido de tránsito mitocondrial, péptido de tránsito de cloroplasto o péptido de tránsito luminal de tilacoides.	28
10	Predicción de la región TM con el servidor HMMTOP	29
11	Estructura tridimensional de la enolasa de *K. pneumoniae* en Chimera; región transmembranal, región citoplasmática o intracelular, región extracelular, sitios de unión a Mg^{+2}, Sitios de dimerización, Motivo de unión a plasminógeno.	30
12	Estructura tridimensional de la enolasa de *K. pneumoniae* en Chimera 1.16: región transmembranal, región citoplasmática o intracelular, región extracelular, epítopos linfocitos B, Epítopos linfocitos T.	32
13	Estructura tridimensional de la enolasa de *K. pneumoniae* en Chimera 1.16: región transmembranal, región citoplasmática o intracelular, región extracelular. Se muestran los péptidos de unión a moléculas MHC clase I, ligandos fuertes, ligandos débiles. Así como los epítopos activadores de respuesta mediada por el MHCI y MCHII, ligando fuerte, ligandos débiles.	33

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
K. pneumoniae	*Klebsiella pneumoniae*
B. anthracis	*Bacillus anthracis*
E. coli	*Escherichia coli*
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
Y. pestis	*Yersinia pestis*
A. fumigatus	*Aspergillus fumigatus*
ENO	Enolasa

ENO1	Alfa-enolasa
ENO2	Gama-enolasa
ENO3	Beta-enolasa
KpENO	Enolasa de *K. pneumoniae*
IAAS	Infecciones Oportunistas Asociadas a la Atención de la Salud
CAIs	Infecciones Graves Adquiridas en la Comunidad
AMR	Antimicrobianos
G	Guanina
C	Citosina
A	Adenina
T	Timina
H/His	Histidina
D/Asp	Aspartato
S/Ser	Serina
E/Glu	Ácido Glutámico
Plg	Plasminógeno
PlgRs	Receptores de plasminógeno
Pm	Plasmina
PA	Activadores de plasminógeno
DA	Dominio de activación
uPA	Activador de plasminógeno tipo uriquinasa
tPA	Activador de plasminógeno tipo tisular
uPAR	Receptor de uriquinasa
PPA	Péptido de preactivación
kDa	Kilodalton
C3b	Componente 3 del complemento
CPS	Polisacárido capsular
LPS	Lipopolisacárido
SP-A	Proteína surfactante A
SP-D	Proteína surfactante D
CAMP	Péptido antimicrobiano catelicidina
AcrAB	Sistema de expulsión activa
OmpK36	Porina trimérica de *K. pneumoniae*
TLR4	Receptor 4 tipo Toll
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
AKT	Proteína quinasa B
rab14	Gen encargado de modular la actividad de la GTPasa
TLR	Toll like receptor
OmpA	Proteína producida por *K. pneumoniae*
T2SS	Sistema de secreción tipo 2
CYLD	Gen CYLD lisina 63 deubiquitinasa
NOD1	Proteína 1 que contiene el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos

EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
IL-2	Interleucina-2
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
di-GMP	monofosfato dimérico cíclico de la guanosina
NK	Natural killers
PEP	Fosfoenolpiruvato
PGA	Fosfopiruvato hidratasa
Mg	Magnesio
ECM	Matriz extracelular
D	Dextrógira
MMP	Metaloproteinasas de matriz
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
a2AP	Alfa-2-antiplasmina
SK	Estreptoquinasa
SAK	Estafiloquinasa
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
MAbs	Anticuerpos monoclonales
IgM	Inmunoglobulina M
SDA	Agar dextrosa Sabourad
°C	Grados Celsius
M	Molar
DTT	Ditiotreitol
mM	Milimolar
BCA	Método del ácido bicinconínico
Sp2/O	Línea celular de mieloma de ratón
RPMI-1640	Medio Roswell Park Memorial Institute
CO2	Dióxido de Carbono
BALB/c	Cepa albina de laboratorio del ratón común
µg	Microgramo
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
Mab R-5	Anticuerpo monoclonal R-5
LCSCs	Células madre de Cáncer de pulmón
CSCs	Células madre cancerosas
LC	Cromatografía líquida
RNA	Ácido ribonucleico
RNAseq	Secuenciación del transcriptoma de alto rendimiento
tRNA	RNA de transferencia

tRNA (Lys)	tRNA que se une a lisina
spp	Especies
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pI	Punto isoeléctrico
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
MHCI	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
DeepTMHMM	Modelo de aprendizaje profundo para la predicción y clasificación de topologías transmembrana
CTL	Linfocitos T citotóxicos
h	Horas
MAC	Complejo de ataque de membrana
TM	Región transmembranal
SP	Péptido de señalización
mTP	Péptido de tránsito mitocondrial
cTP	Péptido de tránsito de cloroplasto
lTP	Péptido de tránsito luminal de tilacoides
2D	Dos dimensiones

RESUMEN

Klebsiella pneumoniae es una bacteria gramnegativa y se ha convertido en uno de los patógenos oportunistas de mayor importancia en el entorno hospitalario causando neumonía, infecciones en el tracto urinario y heridas, de las cuales se puede generar una bacteriemia. Debido a la alta resistencia a antibióticos que presenta es de gran importancia desarrollar nuevas estrategias de vacunación y tratamiento para este microorganismo. La enolasa (ENO) de *K. pneumoniae* es parte de las proteínas "moonlighting", las cuales tienen funciones diferentes con una sola cadena polipeptídica, entre estas funciones se encuentran las relacionadas con la patogenicidad. En este trabajo se realizaron diversos análisis *in silico* con el fin de analizar si ENO era capaz de desencadenar una respuesta inmune y así ser un blanco vacunal. Los análisis demostraron que la enolasa de *K. pneumoniae* tiene una similitud mayor al 94% con respecto a enolasas de otros organismos, en los cuales ya se ha demostrado que generan una respuesta inmune. Se identificaron posibles epítopos para la activación de linfocitos B y T, además se identificó una región transmembranal, la cual le permitiría anclarse a la membrana celular de *K. pneumoniae* donde quedaría expuesta un fragmento de la enolasa con los posibles epítopos. Con este trabajo, se abren las puertas a futuros ensayos que consideren a ENO como un candidato a antígeno con potencial a desarrollo de una vacuna.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Klebsiella pneumoniae

El manejo de enfermedades infecciosas causadas por la resistencia a diversos antibióticos ha desatado una crisis, afectando la salud pública e incrementando los costos médicos [1]. *Klebsiella pneumoniae* se ha convertido en los últimos años en uno de los patógenos oportunistas más comunes en infecciones nosocomiales. Sus nichos incluyen el agua, suelo, algunas especies de plantas, insectos, aves, reptiles y diversos mamíferos. Es considerada un patógeno oportunista, infectando en su mayoría a recién nacidos, ancianos e inmunodeprimidos; colonizando diversos sitios del cuerpo como el tracto respiratorio, intestinos, nasofaringe, orofaringe y piel [2]. La mayoría de las infecciones por *K. pneumoniae* son infecciones de tipo oportunista asociadas a la atención de la salud (IAAS),

las manifestaciones más comunes son neumonía, infecciones en el tracto urinario y heridas, y cualquiera de estas puede desarrollarse a una bacteriemia. *K. pneumoniae* también puede actuar como un patógeno "verdadero", causando infecciones graves adquiridas en la comunidad (community-acquired infections, CAIs). Las CAIs comunes incluyen endoftalmitis, neumonía, fascitis necrotizante, absceso no hepático, meningitis y absceso hepático piógeno en ausencia de enfermedad del tracto biliar [3]. La capacidad de causar infecciones en sitios inusuales se considera característica de las infecciones por *K. pneumoniae* hipervirulentas, que a menudo se acompañan de bacteriemia y/o metástasis [3]. *Klebsiella pneumoniae* es un bacilo no móvil, fermenta lactosa y forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, se encuentra asociado al grupo de bacterias denominado ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa y especies de Enterobacter*) y que, debido a su plasticidad genómica junto con su habilidad de intercambiar plásmidos con otras especies, hace de esta bacteria un reservorio importante de genes de virulencia y de resistencia a los antimicrobianos (AMR). Presenta una cápsula gruesa de polisacárido distintiva, esta característica complica su detección por el sistema inmunológico del hospedero, evitando ser fagocitada por los macrófagos [4].

Como fuentes de infección, además de IAAS y CAIs, se han confirmado brotes de transmisión alimentaria, en un número creciente en diferentes países (Tabla 1). Se ha encontrado en diferentes productos alimentarios como pavo, puerco, pastel, ganado, pollo, leche, productos cárnicos, hamburguesas, pescado, langostas y leche en polvo para infantes [4].

Tabla 1. Categorías de Alimentos en donde se recuperó *Klebsiella.*

Categorías de alimentos	Comida	Año	Región

Carne	Pavo	1990	
	Carnes	1981	Canadá
	Pavo	1991	
	Pavo, ternera y pollo	2005	Estados Unidos de América
	Carne al por menor	2010	Pakistán
	Carne de ternera y pollo	2011	Turquía
	Productos cárnicos al por menor	2015	Estados Unidos de América
	Carne de pollo cruda	2016	Turquía
	Carne de pollo al por menor	2017	India
	Carne al por menor	2018	China
	Carnes y pasteles	2018	Japón
	Carne al por menor	2018	China
	Cadáveres de pollo tipo broiler	2019	Alemania
	Res cruda	2019	Noroeste de Sudáfrica
	Piel de pollo al por menor	2019	Estados Unidos de América
Comida de Hospital	Comida en hospitales, cantinas y escuelas	1971	Reino Unido
	Comida preparada del hospital para los pacientes	1978	Reino Unido
	Comida de Hospital (Ensaladas y carne fría)	1980	Reino Unido
	Comida de Hospital		
	Leche hecha por licuadoras del hospital	1986	Canadá
		1987	Reino Unido
Animales para alimento	Pollo tipo Broiler	2012	Japón
	Hisopo fecal de cerdo	2016	Brasil
	Animal de comida (camello)	2019	Túnez
	animales productores de alimentos (cerdos)	2019	China
	Animales para alimento	2020	China
	Alimentos al por menor crudos y listos para comer	2020	Singapur
Vegetales y frutas	Verduras crudas	2012	Malasia
	Vegetales listos para consumo	2015	Corea del Sur
	Rábano, tomate, repollo, pimiento, plátano, dátiles, mango, papaya y sandia	2016	Omán
	Frutas al por menor	2019	China
Leche	Fórmula infantil en polvo	2011	China
	Leche bovina	2016	India
	Leche cruda	2017	-
	Leche cruda	2017	Líbano
Productos acuáticos	Peces marinos, peces de agua dulce y langostinos de agua dulce	1992	India
	Camarones importados de Tailandia		
	Pollo y mariscos crudos frescos, alimentos crudos congelados,	2012	Estados Unidos de América
	comida cocinada	2016	China

Comida sintética u otros.	Queso Pepino, guindilla, hojas de cilantro, baya, tomate, carne molida, carne picada y helado Alimentos minoristas 2018 China Alimentos crudos (carne de ave, carne de cordero, pescado, frutas y verduras).	2017 2009 2018 2019	Egipto India China India

Recuperado y modificado de Foodborne Pathogens and Disease. 2020. Hu, Y., Anes, J., Devineau, S., & Fanning, S. [4]

1.2 *Klebsiella pneumoniae* y sus factores de virulencia

Los factores de virulencia de *K. pneumoniae* están codificados en genes ubicados tanto en el genoma core (compuesto por ~ 2,000 genes) como en el genoma accesorio (genes que varían entre especies), estos factores incluyen la cápsula, lipopolisacáridos, sideróforos y pilis. Puesto que el genoma de *K. pneumoniae* es de 5,000 a 6,000 genes, significa que la mayoría del genoma se compone de genes accesorios [5]. Los elementos del genoma accesorio pueden identificarse usando diversas aplicaciones *in silico*, incluyendo el cálculo del contenido de GC y un análisis genómico comparativo [5]. Estos genes podrían determinar la virulencia de la cepa infectante, la capacidad de una cepa colonizadora de progresar a una infección, y definir el potencial patógeno de una cepa determinada.

Para generar una infección uno de los principales factores es la interacción entre el microorganismo y su hospedero, en donde se dará la primera respuesta inmune del sistema innato, incluyendo las barreras mecánicas, químicas y celulares. Sin embargo, *Klebsiella* utiliza estrategias para proteger sus patrones moleculares asociados a patógenos de la detección de los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) y evita la interacción con células hematopoyéticas y no hematopoyéticas para eludir la activación de las respuestas antimicrobianas del hospedero. También se ha demostrado que *Klebsiella* evade activamente las defensas del hospedero a través de diversas estrategias las cuales se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Estrategias de evasión inmune de *K. pneumoniae*

Estrategias de invasión inmune	Mecanismo	Factor Bacteriano	Referencias
(i) Patógeno sigiloso			
Prevención de la acción antimicrobiana de efectores inmunológicos innatos solubles.			
Prevención del efecto bactericida del complemento y opsonización	Limitar la deposición de C3b.	CPS, LPS O-polisacárido	Merino *et al.*1992; Alvarez *et al.*2000; de Astorza *et al.*2004
Limitar la actividad antimicrobina de colectinas	Interacción contundente con SP-A and SP-D	CPS	Kabha *et al.*1997; Ofek *et al.*2001; Kostina *et al.*2005
Contrarrestar la acción bactericida y polimixinas	Limitar la interacción con la superficie bacteriana. Eflujo de CAMP.	CPS, LPS lípido A, AcrAB	Campos *et al.*2004; Llobet *et al.*2011; Kidd *et al.*2017; Mills *et al.*2017; Padilla *et al.*2010
Atenuar la interacción con células inmunes.			
Atenuación del engullimiento por células epiteliales		CPS	Cortes *et al.*2002; Regueiro *et al.*2006
Evitar la fagocitosis por neutrófilos		CPS, OmpK36	Regueiro *et al.*2006; Pan *et al.*2011
Evitar la fagocitosis por macrófagos.		CPS, LPS decoraciones del lípido A, OmpA, OmpK36	March *et al.*2013

Estrategias de invasión inmune	Mecanismo	Factor Bacteriano	Referencias
Limitar la activación de PPRs	Limitar el reconocimiento de LPS por TLR4	LPS lípido A 2-hidroxilación	Llobet *et al.*2015
(ii) Alteración de las defensas del hospedero			
Atenuación de la inmunidad intrínseca de la célula			
Control de la maduración de las células dendríticas.		CPS, LPS O-polisacárido	Evrard *et al.*2010
Maduración del fagosoma de manipulación	Eje de activación PI3K-AKT-Rab14	Desconocido	Cano *et al.*2015
Control de la muerte celular	Citotoxicidad en células epiteliales. Desencadenamiento de la apoptosis en macrófagos.	CPS desconocido	Cano *et al.*2009; Leone *et al.*2016
Abrogar las respuestas inflamatorias controladas por TLR:			
Supresión de la señalización TLR		CPS, LPS O-polisacárido, OmpA, T2SS	March *et al.*2011; Frank *et al.*2013; Tomas *et al.*2015
Romo NF-κB señalización NF-κB	Regulación positiva de la deubiquitinasa CYLD dirigiéndose a NOD1 y EGFR. Regulación positiva de la deubiquitinasa	CPS, y otros factores desconocidos	Regueiro *et al.*2011; Frank *et al.*2013

Estrategias de invasión inmune	Mecanismo	Factor Bacteriano	Referencias
	CYLD al dirigirse a NOD1 y EGFR.		
Reducir MAPKs	Regulación positiva de la fosfatasa MAPKs, MKP-1 vía de activación NOD1	Desconocido	Regueiro *et al.*2011
Manipulación de la inmunidad mucosa	Inducción de IL10.	Desconocido	Greenberger *et al.*1995; Yoshida *et al.*2001
Contrarrestar la inmunidad nutricional	Secreción de diversos sideróforos	Yersinia-bactina, salmoquelina, aerobactina	Lawlor, O'connor and Miller 2007; Bachman *et al.*2011; Russo *et al.*2011

Recuperado y modificado de FEMS Microbiology Reviews. 2018. Bengoechea, J. A., & Pessoa, J. S. [6]

Debido a la importancia médica que tiene esta bacteria se ha renovado el interés en la creación de vacunas y otros tratamientos preventivos contra ella.

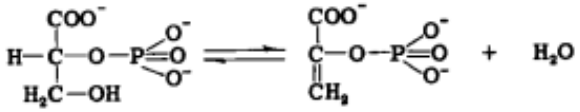
Para el tratamiento de la infección causadas por *Klebsilla* spp. se utilizan antibióticos como cefalosporinas de tercera y cuarta generación, quinolonas o carbapenémicos, sin embargo, las infecciones adquiridas en un nosocomio, el tratamiento se complica ya que estas bacterias suelen ser resistentes a diversos antimicrobianos, como es el caso de *K. pneumoniae* capaz de producir carbapenemasas. Estas beta-lactamasas son capaces de hidrolizar los carbapenémicos y conferir resistencia a un amplio espectro de antibióticos. Para el caso de infección de *K. pneumoniae* multirresistente, el tratamiento óptimo aún no está bien establecido. Las combinaciones de tratamientos incluyendo dosis altas de meropenem, colistina, fosfomicina, tigeciclina y aminoglucósidos, son utilizadas ampliamente con resultados subóptimos [7].

Debido a las complicaciones para tratar este tipo de infecciones, es necesario crear nuevas terapías, algunas de las cuales se ha sugerido su uso en conjunto con los antibióticos. Se ha propuesto un enfoque de terapia génica adenoviral recombinante, la cual consiste en inducir la sobreproducción de Interleucina-2 (IL-2), este tipo de terapia redujo la incidencia de neumonía en 12 veces [8]. También se han realizado ensayos utilizando el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), citocina proinflamatoria, los cuales tienen efectos benéficos para mejorar la inmunidad adquirida del hospedero y reducir la infección bacteriana [9]. En el 2007 se realizó otro enfoque, introduciendo el uso de di-GMP cíclico (c-di-GMP [c-diguanilato]), el cual es un agente inmuno-estimulador que aumenta la inmunidad innata. Si se administra por vía mucosa o dérmica 24-48 horas antes de la exposición a *K. pneumoniae* generalmente protege de la infección, ya que aumenta la acumulación de neutrófilos y activa a los linfocitos Natural Killers (NK) y linfocitos T [10]. Sin embargo, ninguno de estos ensayos ha podido entrar al mercado ya que su costo es muy elevado y son poco prácticos.

Por otro lado, se sabe que para una inmunización activa, se necesita que un epítopo microbiano se introduzca y sea reconocido por el sistema inmunológico, generando anticuerpos contra él. Al investigar los factores de virulencia de *Klebsiella*, se identificaron cinco clases principales de posibles antígenos: cápsula, LPS, sideróforos, adhesinas (pili y fimbrias) y exotoxinas [11].

1.3 ***Klebsiella pneumoniae*** **y la proteína enolasa**

Por otra parte, se han reportado las proteínas “moonlighting”, las cuales tienen funciones diferentes con una sola cadena polipeptídica, entre estas funciones se encuentran las relacionadas con la patogenicidad, y dentro de estas enzimas multifuncionales se encuentra a la enolasa. La enolasa o 2-fosfo-D-glicerato hidrolasa o fosfopiruvato hidratasa (EC 4.2.1.11), cataliza la deshidratación del D-glicerato 2-fosfato para dar Fosfoenolpiruvato (PEP). La reacción, que se da en la ecuación (1), es fácilmente reversible. Como una de las enzimas implicadas en la glucólisis y la fermentación, es probable que la enolasa sea casi ubicua en el mundo biológico [12].



(1)

En la reacción inversa (vía anabólica) que ocurre durante la gluconeogénesis, la misma enzima cataliza la hidratación de PEP a PGA (fosfopiruvato hidratasa). La enolasa requiere ciertos iones metálicos divalentes para su actividad. El magnesio es el cofactor natural, en presencia del cual, la enolasa presenta su mayor actividad [13].

Funcionalmente, las enolasas activas son proteínas diméricas y consisten en dímeros unidos no covalentemente de subunidades α, β o γ, que se encuentran codificadas en tres loci genéticos independientes. Estos genes no se consideran genes constitutivos porque su expresión es específica de tejido y varía durante las condiciones de desarrollo, metabólicas o fisiopatológicas del organismo [15]. La alfa-enolasa (ENO1) está presente en casi todos los tejidos adultos, la beta-enolasa (ENO3) se encuentra principalmente en el músculo y la gama-enolasa (ENO2) se encuentra en los tejidos neuronales y neuroendocrinos [16].

Se ha observado que la enolasa puede actuar como un receptor en lugar de enzima cuando se expresa en la superficie de diversas células eucariotas, incluyendo neutrófilos, monocitos, células T y B, células neuronales y endoteliales, así como en un amplio rango de bacterias, tanto Grampositivas como Gramnegativas.

1.4 Enolasa y Plasminógeno

ENO1 puede actuar como receptor para el plasminógeno jugando un papel importante en el proceso de infección. El plasminógeno (Plg) es un zimógeno precursor de la plasmina (Pm), la cual representa la enzima central del sistema fibrinolítico de la coagulación, esta es conocida por activar la procolagenasa en colagenasa, y degradar la fibrina y diversos componentes de la matriz extracelular (extracellular matrix, ECM) incluyendo laminina y fibronectina, las cuales pueden estar involucradas en la cicatrización, remodelación tisular, embriogénesis y la propagación de células normales y malignas. El plasminógeno está presente de manera abundante en el plasma, conformado por una cadena pesada responsable de mediar la unión del plasminógeno a la matriz celular (Ilustración 1), contiene cinco dominios “kringle” con sitios de unión a lisina que permiten la interacción con moléculas

diana y receptores del plasminógeno (PlgRs), y una cadena ligera que contiene la tríada catalítica His603, Asp643 y Ser741, que forma el sitio activo de la serina proteasa [17]. Mientras que en el dominio de activación (DA) se produce el corte proteolítico que activa la plasmina, mediado por los activadores fisiológicos del hospedero; activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) o activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA). Dicho sistema puede ser utilizado por patógenos para invadir tejidos y diseminarse a otras partes del cuerpo [18].

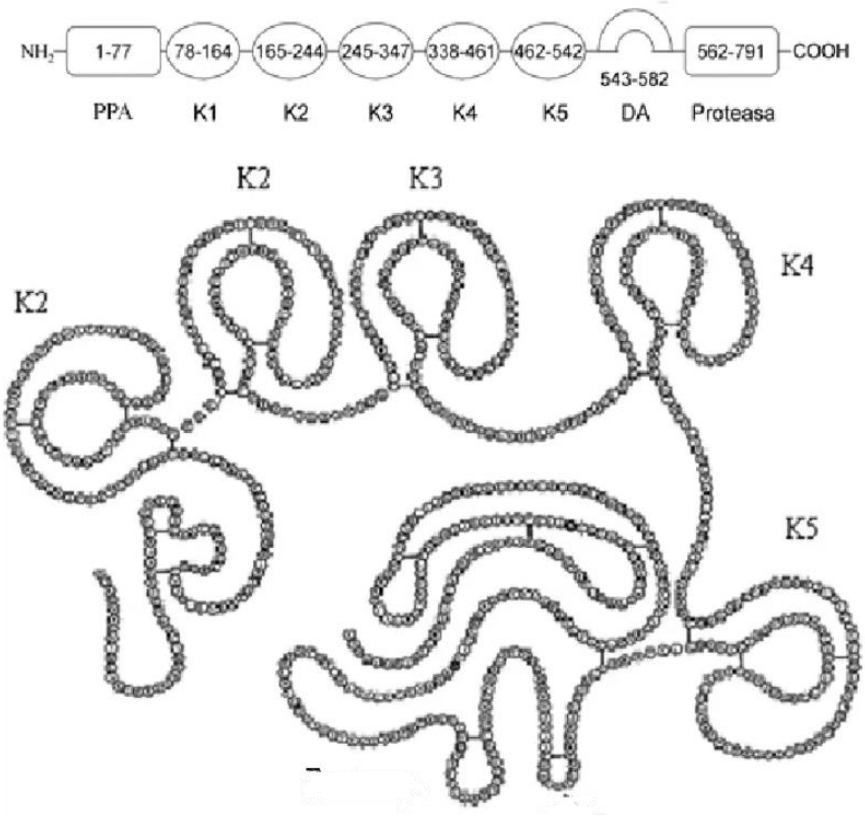


Ilustración 1. Estructura del plasminógeno. Estructura lineal y secundaria del plasminógeno formada por el péptido de preactivación PPA seguido de los 5 dominios kringle K1-K5 y el dominio de activación DA [17].

La fibrinolisis se inicia cuando el Plg es convertido a plasmina por los activadores del plasminógeno, los mamíferos tienen dos tipos de activadores, uPA y tPA que fueron identificados en extractos de orina y de tejido, respectivamente. Estos activadores reconocen y se adhieren al péptido de unión R560-V561 en el Plg generando la Pm activa [20]. El activador uPA se ha identificado como un desencadenante crítico para la generación de Pm

durante la migración e invasión celular bajo condiciones fisiológicas y patológicas, por lo tanto, se piensa que es el activador primario en el proceso de migración celular, mientras que el tPA es el activador principal en la fibrinolisis y el mantenimiento de permeabilidad vascular. Tanto uPA como tPA son serinas proteasas que se secretan como zimógenos monocatenarios de baja actividad y que la plasmina procesa proteolíticamente en moléculas de dos cadenas totalmente activas que se mantienen unidas por un solo enlace disulfuro [21]. El activador de tipo uroquinasa se expresa en diversos tejidos como una glicoproteína de 411 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 53 kDa. La generación de Pm dada por uPA da como resultado la activación proteolítica de metaloproteinasas de matriz (Matrix metalloproteinase, MMP), otras proteinasas de ECM y factores de crecimiento. uPA inicia una cascada proteolítica que conduce a la degradación de la ECM, lo que facilita la unión y desprendimiento de células, la remodelación de tejidos y la metástasis tumoral. uPA se une a un receptor especifico de uroquinasa (uPAR), el cual restringe la actividad de uPA a la superficie celular, donde Plg igualmente se une a sus sitios afines. Por esto Plg y PA se localizan en células y tejidos reforzando la proteólisis asociada a células. La unión de uPA-uPAR induce un cambio conformacional en el complejo activador de plasminógeno, lo que inicia cascadas de transducción de señales que afectan la proliferación y supervivencia celular, la dinámica del citoesqueleto y la adhesión celular. Las interacciones uPA-uPAR se consideran como proteólisis pericelular localizada, a diferencia de la actividad proteolítica extracelular y plasmática del tPA [22]. El activador del plasminógeno tipo tisular es una glicoproteína de 530 aminoácidos secretada primordialmente por células endoteliales vasculares como un prozimógeno con un nivel de actividad muy bajo hasta que es activado proteolíticamente por Pm. Existe un vasto número de estímulos que induce la liberación de t-PA desde las células endoteliales como la trombina, histamina, bradiquinina, adrenalina, acetilcolina, vasopresina, el ejercicio físico y la oclusión venosa. La región N-terminal de tPA contiene un dominio tipo dedo “fibronectina de tipo II”, un dominio EGF (factor de crecimiento epidérmico) y dos dominios” kringle”. El dominio en forma de dedo, junto con el segundo dominio “kringle”, proporciona al tPA una alta afinidad por la fibrina. El papel principal de tPA es degradar la fibrina en los vasos sanguíneos. La actividad de tPA es estimulada en gran medida por la fibrina que interactúa con el “kringle” 2 y los dominios tipo dedo y EGF. Además de su papel en la fibrinolisis, se ha demostrado que tPA tiene un papel

adicional que no está relacionado con su actividad proteolítica, ya que puede actuar como ligando de las proteínas de la superficie celular y desencadenar varias respuestas celulares [23].

La capacidad de las bacterias de interactuar con el sistema del plasminógeno está fuertemente asociado a su potencial patogénico, además de poder actuar como un activador del plasminógeno, también pueden activar directamente una cascada de coagulación, resultando en un depósito de fibrina. Los patógenos bacterianos, son capaces de interactuar y unir el Plg a su superficie celular, usando el sistema proteolítico del hospedero para su propio beneficio, facilitando la conversión a plasmina y protegiendo su actividad de la inactivación con α2-antiplasmina (Ilustración 2) que es el principal inhibidor de la plasmina, las infecciones bacterianas también pueden influir en la actividad del sistema Plg aumentando la expresión de activadores del plasminógeno por las células del hospedero. La α2-antiplasmina es una glicoproteína que forma un complejo con la plasmina uniéndose a los dominios "kringles" 1,2 y 3 de la plasmina. Debido a que el mismo sitio de unión a lisina en los "kringles" median la unión con los receptores del plasminógeno, la plasmina unida al receptor es resistente a la inhibición por α2-antiplasmina [19]. En bacterias Grampositivas el receptor de plasminógeno más importante es la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). De igual manera α-enolasa está implicada en la unión del plasminógeno a la superficie celular en estafilococos, estreptococos, tricomonas, micoplasma y *B. anthracis* [24].

Las bacterias Gramnegativas también han demostrado la capacidad de unirse al Plg y tener actividad pericelular proteolítica, involucrando estructuras de adhesión como fimbrias y flagelos. Las fimbrias *de E. coli* patogénica pueden actuar como receptores del plasminógeno, además de poder unirse a tPA y mediar su adhesión con componentes del ECM, para así localizar la maquinaria proteolítica al ECM [25]. También se ha encontrado en la superficie celular de bacterias Gramnegativas y espiroquetas la presencia de α-enolasa y GAPDH. En *E. coli* enteropatogénica y enterohemorrágica se reportó la secreción de GAPDH el cual se une al Plg humano y al fibrinógeno, lo que sugiere que tiene un papel en la patogénesis bacteriana.

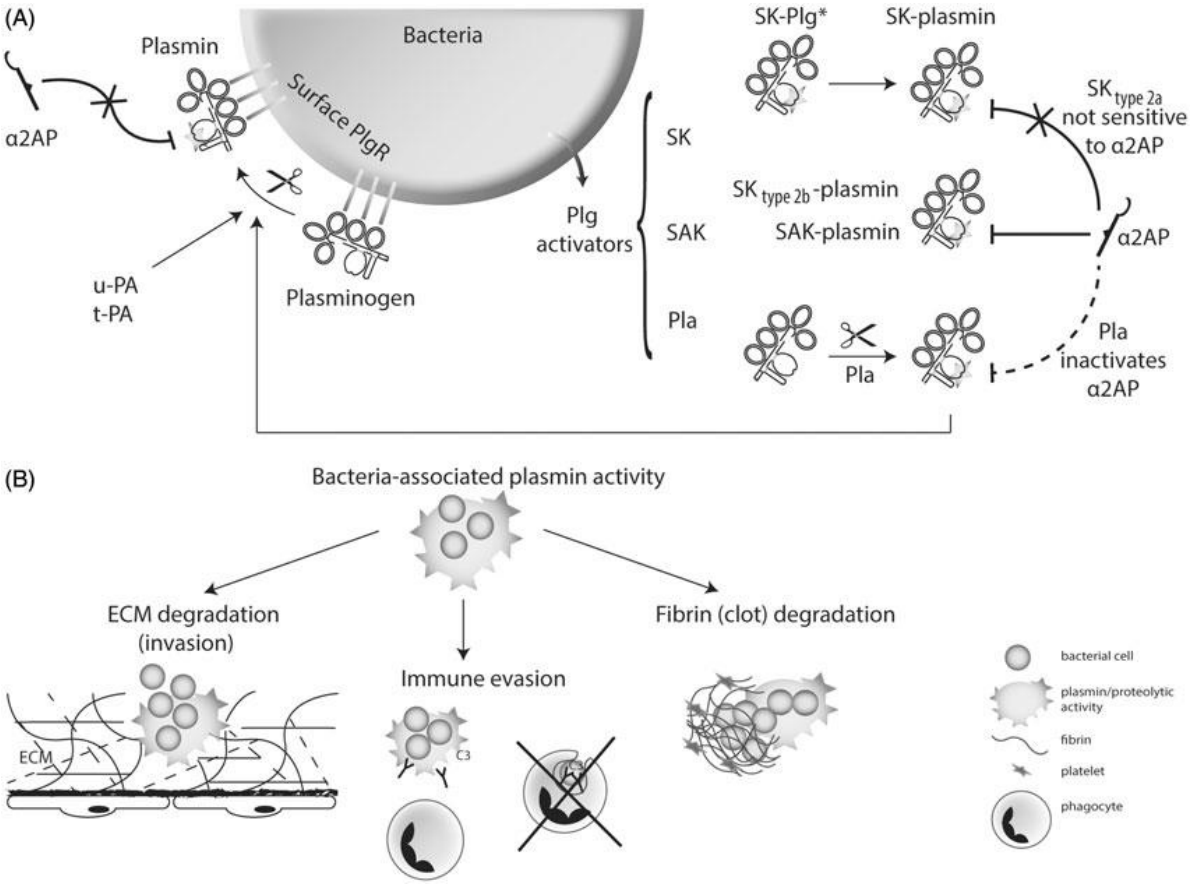


Ilustración 2. Mecanismos de activación del plasminógeno por bacterias. (A) La bacteria puede unir al Plg a su superficie, utilizando receptores específicos de plg en su superficie (PlgRs) los cuales interactúan con los dominios kringle del Plg. El Plg unido a la superficie puede ser fácilmente activado por los activadores de plasminógeno (t-PA o u-PA); la actividad resultante de la plasmina asociada a la superficie es protegida de la inhibición de alfa-2-antiplasmina (α2AP). Alternamente, algunas bacterias producen un PA específico, como la proteasa Pla de Y. pestis, así como los PA no proteolíticos de estreptoquinasa (SK de estreptococos de los grupos A, C y G) y estafiloquinasa (SAK de S. aureus). (B) La actividad de la plasmina generada por la bacteria está involucrada en la invasión bacteriana por la degradación de la matriz extracelular (ECM); en la evasión del sistema inmune, por ejemplo, mediante la eliminación de inmunoglobulinas y factores opsonizantes del complemento; y en la degradación de la fibrina que se forma alrededor de la colonia bacteriana. [18].

Los PlgRs bacterianos capturan Plg en la superficie celular bacteriana, provocando la activación de Pm por los PA del hospedero, por consiguiente, la bacteria se convierte en un organismo proteolítico, utilizando el sistema del hospedero, para facilitar la penetración bacteriana de las capas de células endoteliales y la degradación de la matriz extracelular.

La presencia de ENO1 en la superficie de *Klebsiella pneumoniae* como receptor de Plg puede tener el efecto de concentrar el plasminógeno en la superficie de las células y mejorar su capacidad de degradar el tejido fibroso, lo que permite la migración celular o invadir a través del estroma. A través de la activación de metaloproteasas, las bacterias cubiertas de plasmina pueden descomponer la matriz extracelular y las membranas basales. Además, la inmovilización de Pm la protege contra el inhibidor de la serina proteasa α2-antiplasmina, ENO1 se une a los "Kringles" del Plg de manera dependiente a lisina. en el caso de *S. aureus* se ha sugerido que la enolasa tiene un papel crítico en la patogénesis bacteriana al permitir la adherencia a la matriz extracelular que contiene laminina. Igualmente, en la infección de células epiteliales mamarias de bovinos con *S. aureus* y la adición de Plg al medio, promovió la diseminación e invasividad [26].

La proteólisis mediada por plasmina del hospedero puede ayudar a las bacterias a evadir la respuesta inmune innata del hospedero al degradar péptidos y proteínas implicados en los mecanismos de defensa de primera línea, incluyendo componentes del sistema del complemento y péptidos antimicrobianos como las defensinas. Una de las respuestas inmunes innatas es la activación de la coagulación y encapsulación de las bacterias con fibrina, la actividad de la plasmina inducida por bacterias puede degradar esta red de fibrina para promover la propagación bacteriana. En el ensayo de Degen *et. al*., se observó que la deficiencia de Plg redujo drásticamente la mortalidad por *Y. pestis* en ratones [27].

2. ANTECEDENTES

Las características no-glicolíticas de la ENO1, especialmente aquellas relacionadas con la expresión extracelular y la unión al plasminógeno nos indican que ENO1 tiene un papel en el inicio del proceso de infección, modulando el sistema pericelular y el sistema fibrinolítico intravascular. Estas enfermedades pueden ser, enfermedades fúngicas, sistémicas, cáncer, enfermedades dentales y desordenes autoinmunes.

ENO1 ha sido evaluada como un posible inmunógeno en diversos estudios y modelos, como en el caso de *Aspergillus fumigatus* que es de los hongos patógenos oportunistas más comunes, responsable de diversas enfermedades en el humano, desde la aspergilosis

broncopulmonar alérgica hasta la aspergilosis pulmonar crónica, principalmente en pacientes tratados con medicamentos inmunosupresores, pacientes con VIH, cáncer, y pacientes con tratamientos de quimioterapia o de esteroides, con cirugías mayores o trasplante de órganos. La baja cantidad de medicamentos fungicidas sumado a la resistencia de estos, requiere la creación de nuevas estrategias para su tratamiento. El desarrollo de anticuerpos monoclonales (MAbs) contra hongos patogénicos es una propuesta nueva para su diagnóstico y tratamiento, que muestra alta especificidad y baja toxicidad [28]. En el estudio de Yadav et al., se generó un anticuerpo monoclonal R-5 (IgM) de ratón contra la enolasa presente en la superficie celular de *A. fumigatus* por medio de tecnología convencional de hibridación. El efecto fungicida de MAb R-5 fue demostrado *in vitro* con la reducción del número de unidades formadoras de colonias (UFC) y ensayos MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). El efecto fungicida no se observó en otras especies clínicamente relevantes (*Candida albicans*, *Sporothrix schenckii*, y *Trichophyton mentagrophytes*), lo que significa que MAb R-5 es específico para las especies de *Aspergillus*. Con el anticuerpo MAb R-5 se logró reducir las UFC en el tejido renal de los ratones infectados, además de incrementar el tiempo de sobrevivencia en comparación con los animales de control. En conclusión, MAb R-5 se une específicamente a la enolasa en la superficie celular de las especies de *Aspergillus*, y tiene potencial para proteger al hospedero de una infección por *Aspergillus* e incrementar el tiempo de sobrevivencia al reducir la carga fúngica. Debido a esto se considera que MAb R-5 puede ofrecer nuevas oportunidades para el desarrollo de una nueva herramienta de diagnosis y tratamiento para un amplio rango de infecciones por *Aspergillus* [29].

Por otra parte, en el caso de algunos tipos de cáncer, se ha demostrado que ENO1 tiene un desempeño fundamental en la tumorogénesis y actúa como un buen indicador de pronóstico para controlar la progresión de la enfermedad. Por lo que ENO1 se está posicionando como un posible blanco para inmunoterapias. En el estudio de Xiong Shu, *et. al*., se propuso a ENO1 como antígeno para el anticuerpo monoclonal 12C7 el cual presentó actividad antitumoral en células madre de cáncer de pulmón (LCSCs – Lung Cancer Stem Cells). El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo, aproximadamente 1.8 millones de personas son diagnosticadas con cáncer de pulmón y 1.6 millones de personas mueren debido a este cada año. Las opciones

de tratamiento actuales son bajas teniendo tasas de supervivencia de 5 años, que van del 4 al 17% [30], por lo que son necesarias nuevas estrategias para su diagnóstico y tratamiento. Las células madre cancerosas (CSCs) son una subpoblación de células tumorales que poseen la capacidad de autorrenovarse y con alta tumorigenicidad, responsable de la progresión, diseminación, resistencia a los medicamentos y recurrencia del tumor, por lo que usarlas como diana terapéutica podría ayudar a mejorar el resultado clínico de los pacientes con cáncer de pulmón.

Xiong Shu, *et. al*., detectaron la localización de un posible antígeno reconocido por mAB12C7, este antígeno fue reconocido exitosamente por el anticuerpo 12C7 y mostró un patrón de expresión de antígeno de superficie, el cual concordaba con el patrón de expresión de antígeno típico de las CSCs. Posteriormente se demostró que dicho antígeno era ENO1. La expresión abundante de ENO1 en la membrana, el citoplasma, y núcleo en la célula fijada, demuestra su gran potencial como diana terapéutica. En este estudio Xiong Shu, *et. al*., se demostró que ENO1 se expresa en la membrana, siendo el antígeno objetivo de mAb12C7 en LCSCs, lo cual brinda un potencial para mejorar la actividad antitumoral de 12C7, además de revelar que ENO1 tiene un rol oncogénico en el cáncer pulmonar, al facilitar la autorrenovación, el crecimiento y la invasión de LCSCs [30].

Como se mencionó anteriormente, las proteínas en la superficie bacteriana tienen un papel importante en el proceso de infección, es el caso de algunas bacterias donde ENO actúa como un receptor de unión a plasminógeno. *Salmonella* spp. es una bacteria Gramnegativa que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. *Salmonella enteritidis* y *S. typhimurium* son bacterias patógenas, dos de los serotipos más comunes de agentes de salmonelosis aislados en todo el mundo. Las proteínas de la membrana externa como ENO juegan un papel importante en el proceso de infección y colonización, ya que participan en el contacto de la bacteria con los tejidos del hospedero, al iniciar el proceso de degradación de tejido y estimulando el desarrollo de la infección. P. Serek et al., aislaron la enolasa de *Salmonella.* La purificaron y usaron para obtener anticuerpos, lo cual facilitaría la identificación de la proteína similar a la enolasa en la membrana externa de *S*. Typhimurium. P. Serek et al., demostraron que las proteínas de membrana de *S*. Typhimurium con una masa molecular de 45 kDa mostraron reactividad con anticuerpos contra α- y β-enolasa humana,

lo que sugiere una similitud serológica entre epítopos. Se demostró que tanto las proteínas de membrana como las citosólicas reaccionaron con anticuerpos de suero de conejo inmunizado por enolasa, corroborando que ambas enolasas tienen propiedades antigénicas similares, además de que la enolasa de *Salmonella* también es reconocida por anticuerpos IgM, por lo que esta proteína podría ser utilizada como marcador para la fase temprana de infección.
Estas observaciones indican que las infecciones por Salmonella pueden hacer que el sistema inmunitario del huésped produzca anticuerpos contra la enolasa bacteriana y los epítopos de la enolasa del huésped, lo que da lugar al desarrollo de enfermedades autoagresivas [31].

Los ejemplos anteriores respaldan el punto de que ENO es capaz de actuar como un antígeno, además, de que el desarrollo de un anticuerpo específico para microorganismos que presenten la enolasa en su superficie celular puede ser útil para prevenir la infección de dicho microorganismo.

3. JUSTIFICACIÓN

Klebsiella pneumoniae es de los principales factores causales de neumonía adquirida en la comunidad, con un porcentaje del 15% de los casos en países en desarrollo, también es la segunda causa de infecciones del tracto urinario producidas por bacteriemia por bacterias Gramnegativas, aunado a esto, *K. pneumoniae* ha mostrado resistencia a diversos antibióticos, por lo que la investigación aplicada al tratamiento de la infección es de suma importancia. El conocimiento de las características y comportamiento inmunogénico de la enolasa de *K. pneumoniae* nos podría brindar nuevas oportunidades, como su aprovechamiento como agente vacunal, por lo tanto, es importante analizar a través de estudios *in silico* si la enolasa está presente en la membrana externa de *K. pneumoniae* y determinar si esta proteína podría actuar como un inmunógeno.

4. HIPÓTESIS

Se sugiere la presencia de la enolasa en la membrana externa de *K. pneumoniae*, pudiendo poseer características inmunogénicas.

5. OBJETIVO GENERAL

Comprobar mediante análisis bioinformáticos la presencia de la enolasa en la superficie de *K. pneumoniae* y evaluar sus propiedades inmunogénicas.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar mediante herramientas *in sílico* las características bioquímicas y estructurales de la enolasa de *Klebsiella pneumoniae*.
- Determinar la presencia de hélices transmembranales en la enolasa mediante bioinformática.
- Analizar las propiedades inmunogénicas de la enolasa a través de ensayos bioinformáticos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Análisis *in silico* de la proteína enolasa de *Klebsiella pneumoniae* (KpEno).

Se realizaron ensayos *in silico* utilizando diferentes programas bioinformáticos y bases de datos, de las cuales se obtuvieron la secuencias de diferentes enolasas, incluyendo la de *Klebsiella pneumoniae*, la cual tiene el número de acceso en GenBank: AHM83523.1 y que corresponde a la enolasa de la cepa *Klebsiella pneumoniae* 30660/NJST258_1, esta secuencia se utilizó para buscar e identificar 10 secuencias de enolasas correspondientes a bacterias que comparten un porcentaje de identidad mayor al 90%, por medio de la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST), una vez obtenidas se procedió a realizar un árbol filogenético mediante el algoritmo neighbor-joining, con un boostrap de 500 en el programa MEGA X.

Identificación de secuencias de enolasas con alto porcentaje de identidad con KpEno.

Utilizando el programa Clustal Omega, se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las enolasas relacionadas filogenéticamente con *K. pneumoniae*, obtenidas

de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology information) y se estableció el porcentaje de identidad de cada una, respecto con la enolasa de *K. pneumoniae*.

6.2 Análisis estructural *in silico* de la KpEno.

La secuencia de aminoacidos de *K. pneumoniae* se analizó con el fin de obtener peso molecular, pI, estabilidad y composición (http://ca.expasy.org/tools/protparam/html), solubilidad (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetSolP-1.0),
) localización celular y hélices transmembranales (http://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html) y CCTOP (http://cctop.enzim.ttk.mta.hu/?_=/jobs/submit), sitios de modificaciones postraduccionales (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0,
), presencia de péptido señal (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0 y https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0).

6.3 Análisis de las propiedades inmunogénicas de KpEno *in silico*.

Con la secuencia en aminoácidos de la KpEno, se realizó la identificación de posibles epítopos para la activación de linfocitos B (BepiPred-2.0 (dtu.dk)), posibles epítopos activadores de linfocitos T (NetCTL - 1.2 - Services - DTU Health Tech), identificación de sitios de procesamiento (NetChop - 3.1 - Services - DTU Health Tech), caracterización de los HLA (NetMHC - 4.0 - Services - DTU Health Tech) y la identificación de los epítopos activadores de respuesta mediada por el MHC I y MHC II (NetMHCII - 2.3 - Services - DTU Health Tech).

6.4 Identificación de los epítopos predichos en la estructura tridimensional de KpEno.

Para la construccion del modelo tridimensional de la KpEno se utilizó el programa Phyre2 y el modelamiento se realizó en el programa UCSF Chimera 2.0, identificando los residuos involucrados en la unión a Mg^{+2}, los aminoácidos involucrados en la dimerización, los motivos de unión a plasminógeno, los epítopos para la activación de linfocitos B y T.

7. RESULTADOS

7.1 Características estructurales y funcionales de la KpEno

A partir del BLAST realizado con la secuencia de la enolasa de *K. pneumoniae* se seleccionaron 10 secuencias de enolasa de diferentes bacterias, todas con un porcentaje de identidad mayor al 90%. Las cepas y su numero de acceso se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Cepas seleccionadas con base en el % de identidad

Cepa	Numero de acceso NCBI
Yersinia pestis	KZC7246.1
Serratia liquefaciens	SUI74316.1
Salmonella typhimurium	AQU53597.1
Shigella flexneri	QBB81718.1
Kosakonia sacchari	SEL15901.1
Citrobacter freundii	SYX26225.1
Cronobacter turicensis	CBA3329.1
Escherichia coli	CUU95059.1
Enterobacter timonensis	WP_061707359.1
Shimwellia blattae	VEC21339.1

Posteriormente se obtuvo un árbol filogenético (ilustración 3) usando el algoritmo neighbor-joining y un boostrap de 500 en el programa MEGA X, esto con la finalidad de identificar la evolución de la enolasa entre estas bacterias.

Para determinar la homología de las secuencias de las bacterias seleccionadas se realizó un alineamiento múltiple Clustal Omega (ilustracion 4), en las secuencias se resaltaron zonas de interés como el posible sitio de unión a plasminogeno (verde), la firma de la enolasa (morado) y los residuos involucrados en la unión a Mg^{+2}, los resultados del alineamiento en cuanto al porcentaje de identidad se enlistan en la tabla 4.

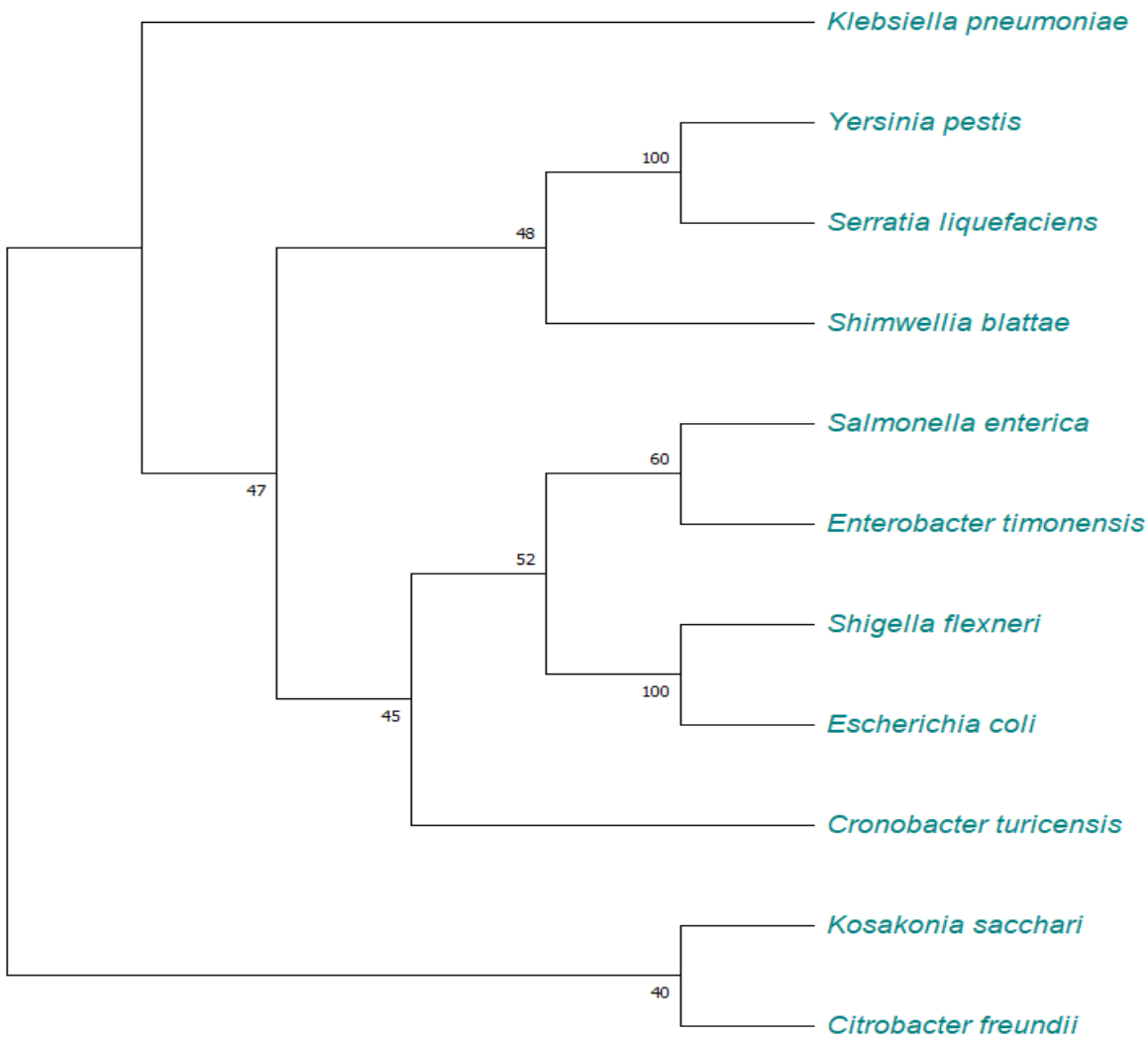


Ilustración 3. Árbol filogenético construido mediante el algoritmo neighbor-joining, en el programa MEGA X. En este árbol se muestran las 10 especies bacterianas; Yersinia pestis, Serratia liquefaciens, Salmonella typhimurium, Shigella flexneri, Kosakonia sacchari, Citrobacter freundii, Cronobacter turicensis, Escherichia coli, Enterobacter timonensis, Shimwellia blattae cuya enolasa presenta mayor relación con la enolasa de K. pneumoniae.

Tabla 4. Porcentaje de identidad con relación a la enolasa de *Klebsiella pneumoniae*

Cepa	Porcentaje de identidad
KZC7246.1	94.43
SUI74316.1	95.36
AQU53597.1	97.22
QBB81718.1	97.45
SEL15901.1	97.69
SYX26225.1	96.99
CBA3329.1	96.76
CUU95059.1	96.76
WP_061707359.1	97.45
VEC21339.1	97.92

```
KZC72461.1          MSKIVKVIGREIIDSRGNPTVEAEVHLEGGFVGLAAAPSGASTGSREALELRDGDKSRFL      60
SUI74316.1          MSKIVKVIGREIIDSRGNPTVEAEVHLEGGFVGLAAAPSGASTGSREALELRDGDKSRFL      60
VEC21339.1          MSKIVKIIGREIIDSRGNPTVEAEVHLEGGFVGMAAAPSGASTGSREALELRDGDKSRFL      60
SYX26225.1          MSKIVKIIGREIIDSRGNPTVEAEVHLEGGFVGMAAAPSGASTGSREALELRDGDKSRFM      60
SEL15901.1          MSKIVKVIGREIIDSRGNPTVEAEVHLEGGFVGLAAAPSGASTGSREALELRDGDKSRFL      60
CBA33293.1          MSKIVKVIGREIIDSRGNPTVEAEVHLEGGFVGMAAAPSGASTGSREALELRDGDKSRFL      60
Klebsiella          MSKIVKVIGREIIDSRGNPTVEAEVHLEGGFVGMAAAPSGASTGSREALELRDGDKSRFL      60
QBB81718.1          MSKIVKIIGREIIDSRGNPTVEAEVHLEGGFVGMAAAPSGASTGSREALELRDGDKSRFL      60
CUU95059.1          MSKIVKIIGREIIDSRGNPTVEAEVHLEGGFVGMAAAPSGASTGSREALELRDGDKSRFL      60
AQU53597.1          MSKIVKVIGREIIDSRGNPTVEAEVHLEGGFVGMAAAPSGASTGSREALELRDGDKSRFL      60
WP_061707359.1      MSKIVKVIGREIIDSRGNPTVEAEVHLEGGFVGMAAAPSGASTGSREALELRDGDKSRFL      60
                    ******:**************************:************************:

KZC72461.1          GKGVLKAVAAVNGPIAQAVIGKDAKDQANIDKIMIDLDGTENKSQFGANAILAVSLAAAK      120
SUI74316.1          GKGVLKAVAAVNGPIAQAVLGKDAKDQANIDKIMIDLDGTENKSQFGANAILAVSLAAAK      120
VEC21339.1          GKGVTKAVAAVNGPIAQALLGKDAKDQAGIDKIMIDLDGTENKSKFGANAILAVSLANAK      120
SYX26225.1          GKGVLKAVAAVNGPIAQALLGKDAKDQAGIDKIMIDLDGTENKSNFGANAILAVSLANAK      120
SEL15901.1          GKGVLKAVGAVNGPIAQAILGKDAKDQAGIDKIMIDLDGTENKSNFGANAILAVSLAVAK      120
CBA33293.1          GKGVTKAVGAVNGPIAQAIVGKDAKDQAGIDKIMIDLDGTENKSNFGANAILAVSLAAAK      120
Klebsiella          GKGVTKAVAAVNGPIAQAILGKDAKDQAGIDKIMIDLDGTENKSNFGANAILAVSLANAK      120
QBB81718.1          GKGVTKAVAAVNGPIAQALIGKDAKDQAGIDKIMIDLDGTENKSKFGANAILAVSLANAK      120
CUU95059.1          GKGVTKAVAAVNGPIAQALIGKDAKDQAGIDKIMIDLDGTENKSKFGANAILAVSLANAK      120
AQU53597.1          GKGVTKAVGAVNGPIAQAILGKDAKDQAGIDKIMIDLDGTENKSNFGANAILAVSLANAK      120
WP_061707359.1      GKGVTKAVAAVNGPIAQAILGKDAKDQAGIDKIMIDLDGTENKSNFGANAILAVSLANAK      120
                    **** ***.*********::********.***************:************ **

KZC72461.1          AAAASKGMPLYEHIAELNGTPGKFSMPLPMMNIINGGEHADNNVDIQEFMIQPVGAKTLK      180
SUI74316.1          AAAASKGMPLYEHIAELNGTPGKFSMPLPMMNIINGGEHADNNVDIQEFMIQPVGAKTLK      180
VEC21339.1          AAAASKGQPLFEHIAELNGTPGKYSMPVPMMNIINGGEHADNNVDIQEFMIQPVGAPTLK      180
SYX26225.1          AAAAAKGLPLYAHIAELNGTPGKYSMPVPMMNIINGGEHADNNVDIQEFMIQPVGAKTLK      180
SEL15901.1          AAAASKGLPLYAHIAELNGTPGKYSMPVPMMNIINGGEHADNNVDIQEFMIQPVGAKSLK      180
CBA33293.1          AAAASKGMPLYEHIAELNGTPGKFSMPVPMMNIINGGEHADNNVDIQEFMIQPVGASSVK      180
Klebsiella          AAAASKGLPLYAHIAELNGTPGKYSMPVPMMNIINGGEHADNNVDIQEFMIQPVGAPTLK      180
QBB81718.1          AAAAAKGMPLYEHIAELNGTPGKYSMPVPMMNIINGGEHADNNVDIQEFMIQPVGAKTVK      180
CUU95059.1          AAAAAKGMPLYEHIAELNGTPGKYSMPVPMMNIINGGEHADNNVDIQEFMIQPVGAKTVK      180
AQU53597.1          AAAAAKGMPLYEHIAELNGTPGKYSMPVPMMNIINGGEHADNNVDIQEFMIQPVGAKTVK      180
WP_061707359.1      AAAASKGQPLYEHIAELNGTPGKYSMPVPMMNIINGGEHADNNVDIQEFMIQPVGAKTVK      180
                    ****:** **: ***********:***:*************************** ::*

KZC72461.1          EAVRIGSEVFHHLAKVLKAKGLNTAVGDEGGYAPNLGSNAEALAVIAEAVKAAGYELGKD      240
SUI74316.1          EAVRIGSEVFHHLAKVLKAKGLNTAVGDEGGYAPNLGSNAEALAVIAEAVKAAGYELGKD      240
VEC21339.1          EAVRMGSEVFHHLAKVLKAKGMNTAVGDEGGYAPNLGSNAEALAVIAEAVKAAGYELGKD      240
SYX26225.1          EAVRMGSEVFHNLAKVLKAKGMNTAVGDEGGYAPNLGSNAEALAVIAEAVKAAGYELGKD      240
SEL15901.1          EAVRMGSEVFHNLAKVLKSKGMNTAVGDEGGYAPNLGSNAEALAVIAEAVKAAGYELGKD      240
CBA33293.1          EAIRMGSEVFHHLAKVLKSKGMNTAVGDEGGYAPNLGSNAEALAVIAEAVKAAGYELGKD      240
```

Ilustración 4. Alineamiento múltiple de la enolasa de K. pneumoniae y las diferentes cepas; Yersinia pestis, Serratia liquefaciens, Salmonella typhimurium, Shigella flexneri, Kosakonia sacchari, Citrobacter freundii, Cronobacter turicensis, Escherichia coli, Enterobacter timonensis, Shimwellia blattae. Regiones de identidad (*), regiones con alta similitud (:), regiones con baja similitud (.). Los residuos de unión a Mg^{+2} (D246, E290, D317) en color azul, la firma de la enolasa (339 ILIKFNQIGSLTET 352) en color morado y el posible motivo de unión a plasminógeno (252 FYKDGKYV 259) en color gris.

7.2 Identificación de las propiedades inmunogénicas de la KpEno

Para la identificación de epítopos que activan linfocitos B se utilizó la secuencia de la enolasa de *K. pneumoniae* y se analizó en el programa Bepipred, se utilizó un valor de 0.5 de threshold para la selección de los epítopes. En este análisis se identificaron 5 posibles epítopes activadores de linfocitos B. Los resultados se observan en la tabla 5.

Para la identificación de epítopos activadores de linfocitos T se utilizó el programa NetCTL-1.2, el valor utilizado de threshold fue de 0.7500 y fueron identificados 8 posibles epítopes activadores de linfocitos T citotóxicos (CTL), la identidad de los epítopes se observan en la tabla 6.

Cada epítopo activador de linfocitos T se revisó en el programa NetChop-3.1, con el fin de identificar sitios de procesamiento, los resultados de cada epítopo se visualizan en la ilustración 5.

Tabla 5. Epítopos activadores de linfocitos B encontrados en la secuencia de la enolasa de K. pneumoniae con el programa Bepiprep.

Secuencia péptido y posición	Probabilidad Epítopo B
ASTGSREALELRDGDKSRFLGKG (41-63)	0.55164251
LDGTENKSNFG (97-107)	0.54169697
SKGMNTAVGDEGGYAPNLGSN (199-219)	0.53307407
NKAFTSEEFTH (265-275)	0.52213131
EQAPFNGRKEIK (418-428)	0.55811111

Tabla 6. Epítopos activadores de linfocitos T encontrados en la secuencia de la enolasa de K. pneumoniae con el programa NetCTL.

Secuencia péptido y posición	Probabilidad Epítopo T
AASKGLPLY (123-131)	1.0644
ELNGTPGKY (136-144)	0.9384
AMDCAASEF (244-252)	1.4310
FTSEEFTHF (268-276)	1.7053
TSEEFTHFL (269-277)	1.4192
FLEELTKQY (276-284)	1.6067
ESDWEGFAY (295-303)	3.4002
LTETLAAIK (349-357)	0.8896

```
MSKIVKVIGREIIDSRGNPTVEAEVHLEGGFVGMAAAPSGASTGSREALELRDGDKSRFLGKGVTKAVAAVNGPIAQAIL
.....................S.S.S.S......S.............SS.S....S.SS......SSS..S......S.S
GKDAKDQAGIDKIMIDLDGTENKSNFGANAILAVSLANAKAAAASKGLPLYAHIAELNGTPGKYSMPVPMMNIINGGEHA
.S.........S...S.............S........S.........S..SS.S.....SS........SS......
DNNVDIQEFMIQPVGAPTLKEAVRMGSEVFHHLAKVLKSKGMNTAVGDEGGYAPNLGSNAEALAVIAEAVKAAGYELGKD
.....S..S.........SS...S........S.SS.........S.....S...S..............S...S.S...
ITLAMDCAASEFYKDGKYVLAGEGNKAFTSEEFTHFLEELTKQYPIVSIEDGLDESDWEGFAYQTKVLGDKIQLVGDDLF
..S.S......S.....S.S.....S.........SS..S.S.S..S.S...S.........S...S......SS.....
VTNTKILKEGIEKGIANSILIKFNQIGSLTETLAAIKMAKDAGYTAVISHRSGETEDATIADLAVGTAAGQIKTGSMSRS
....SSS...........S......S..S......S.S.......SSS..S...........S....S........S...
DRVAKYNQLIRIEEALGEQAPFNGRKEIKGQA
.....S..S..S.........S...S.S...S
```

Ilustración 5. Se muestran subrayados en color azul los sitios de procesamiento encontrados en la secuencia peptídica de K. pneumoniae.

Para la caracterización de los HLA se analizó la secuencia aminoacídica de la enolasa en el programa NetMHC-4.0, obteniendo 2 ligandos fuertes (Threshold de 0.500) y 4 ligandos débiles (threshold de 2.000) con en péptido de 8 aminoácidos (tabla 7). Con el alelo HLA-A0201, y en el programa NetMHCII-2.3 para identificar los epítopos activadores de respuesta mediada por el MHCI y MHCII con un threshold para el ligando fuerte de 2.00 y uno de 10.00 para el ligando débil, con un péptido de 15 aminoácidos (tabla 8).

Tabla 7. Epítopos activadores de respuesta mediada por MHCI encontrados en la secuencia de la enolasa de *K. pneumoniae*.

Ligando fuerte	Valor	Posición	Ligando débil	Valor	Posición
VLGDKIQLV	0.25	306	**FLGKGVTKA**	1.10	58
SLTETLAAI	0.40	347	**ILAVSLANA**	1.2	110
			ALAVIAEAV	1.0	221
			QLVGDDLFV	0.80	312

Tabla 8. Epítopos activadores de respuesta mediada por MHCI y MHCII encontrados en la secuencia de la enolasa de *K. pneumoniae*.

Ligando fuerte	Valor	Posición	Ligando débil	Valor	Posición
HLEGGFVGMAAAPSG	0.90	26	**MSKIVKVIGREIIDS**	8.0	1
LEGGFVGMAAAPSGA	0.40	27	**VHLEGGFVGMAAAPS**	3.5	25
EGGFVGMAAAPSGAS	0.20	28	**KSRFLGKGVTKAVAA**	5.5	56
GGFVGMAAAPSGAST	0.20	29	**ILAVSLANAKAAAAS**	2.0	111
GFVGMAAAPSGASTG	0.30	30	**SEVFHHLAKVLKSKG**	4.0	187
FVGMAAAPSGASTGS	1.40	31	**DAGYTAVISHRSGET**	2.0	361

7.3 Identificación de propiedades fisicoquímicas de la KpEno

Las propiedades fisicoquímicas de la proteína se evaluaron usando el programa ExPASy ProtParam tool; la proteína está compuesta de 432 aminoácidos, con un Peso Molecular aproximado de 45549.70 Da, el punto isoeléctrico teórico es de 5.18 la vida media estimada fue de 30 h y la proteína se clasificó como estable con un índice de estabilidad (II) de 27.08. Con el programa NetSolP-1.0, utilizado para predecir la solubilidad y usabilidad para la purificación de las proteínas expresadas en *E. coli*, obteniendo un valor de 0.832 en la solubilidad y un valor de 0.701 en usabilidad.

Con el programa DeepTMHMM (Un modelo de aprendizaje profundo para la predicción y clasificación de topologías transmembrana) se analizó la secuencia de KpEno con el propósito de predecir proteínas transmembranales, debido a que estas proteínas son relevantes en el desarrollo de fármacos. Los resultados no mostraron ningún sitio transmembranal y se clasificó a la proteína como citosólica, tal como se observa en la ilustración 6.

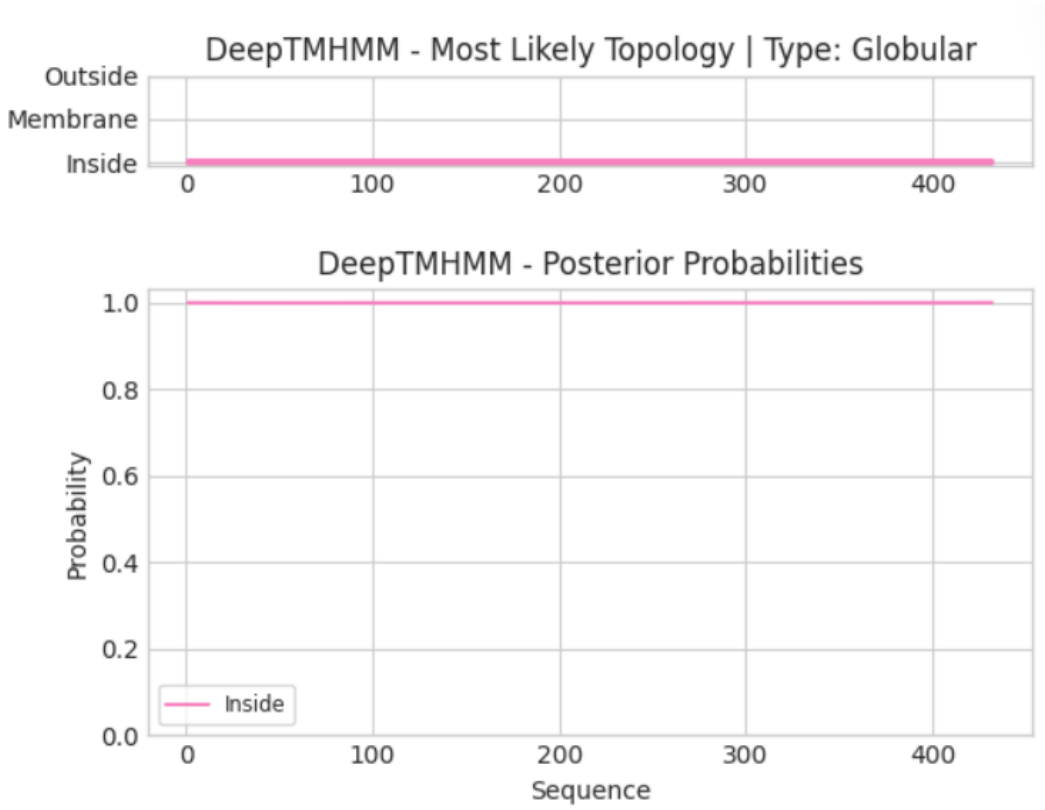


Ilustración 6. Predicción de hélices transmembranales con el servidor DTMHMM. Longitud de la secuencia 432 aa. Numero de regiones TM predichas: 0.

La secuencia de la enolasa de *K. pneumoniae* se analizó con el programa TMHMM-2.0 para la predicción de hélices transmembranales en la proteína y no se obtuvo ninguna región o hélice transmembranal, ya que la probabilidad de estas era menor a 0.06, se clasificó a la proteína como una proteína externa, los resultados se observan en la ilustración 7.

TMHMM result

```
# UAI99407.1 Length: 432
# UAI99407.1 Number of predicted TMHs:  0
# UAI99407.1 Exp number of AAs in TMHs: 0.05952
# UAI99407.1 Exp number, first 60 AAs:  0.00458
# UAI99407.1 Total prob of N-in:        0.01616
UAI99407.1      TMHMM2.0        outside      1   432
```

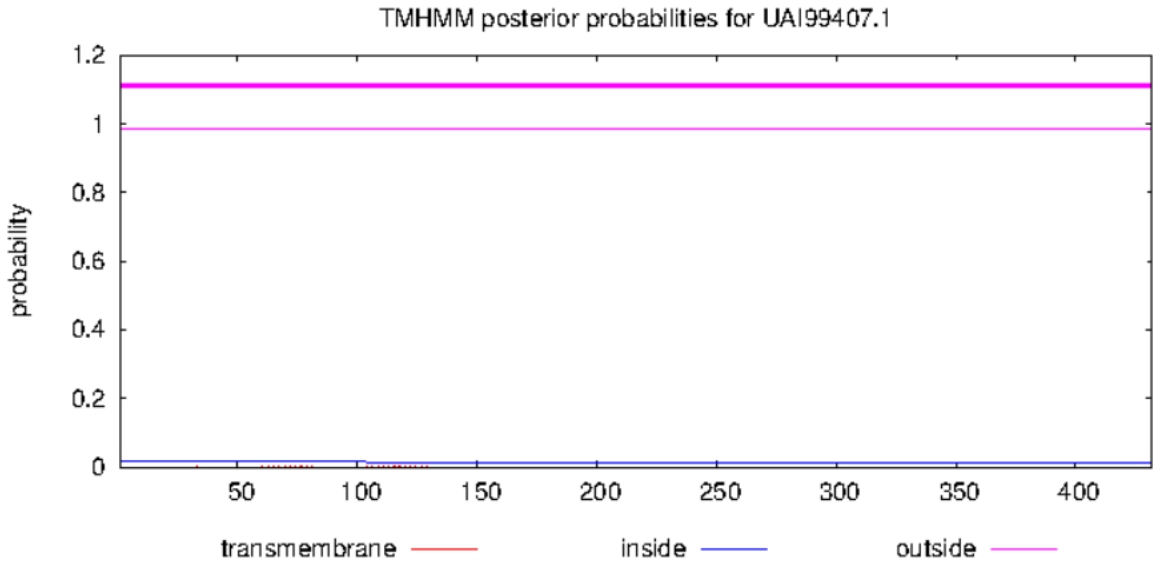


Ilustración 7. Predicción de hélices transmembranales de la secuencia de K. pneumoniae

Con el programa SignalP- 5.0 se analizó la secuencia para predecir la presencia de péptidos de señalización y la localización de los sitios de anclaje en la proteína, en los resultados no se observa ninguna señal relevante puesto que la probabilidad de estos es menor a 0.03 (ilustración 8).

Con el programa InterPro, el cual clasifica familias de proteínas, se analizó la secuencia de la enolasa de *K. pneumoniae* y se encontraron tres residuos de unión a Mg^{+2} ; Asp246 , Glu290 y Asp317.

Protein type	Signal peptide (Sec/SPI)	TAT signal peptide (Tat/SPI)	Lipoprotein signal peptide (Sec/SPII)	Other
Likelihood	0.0202	0.0146	0.0012	0.964

Download: PNG / EPS / Tabular

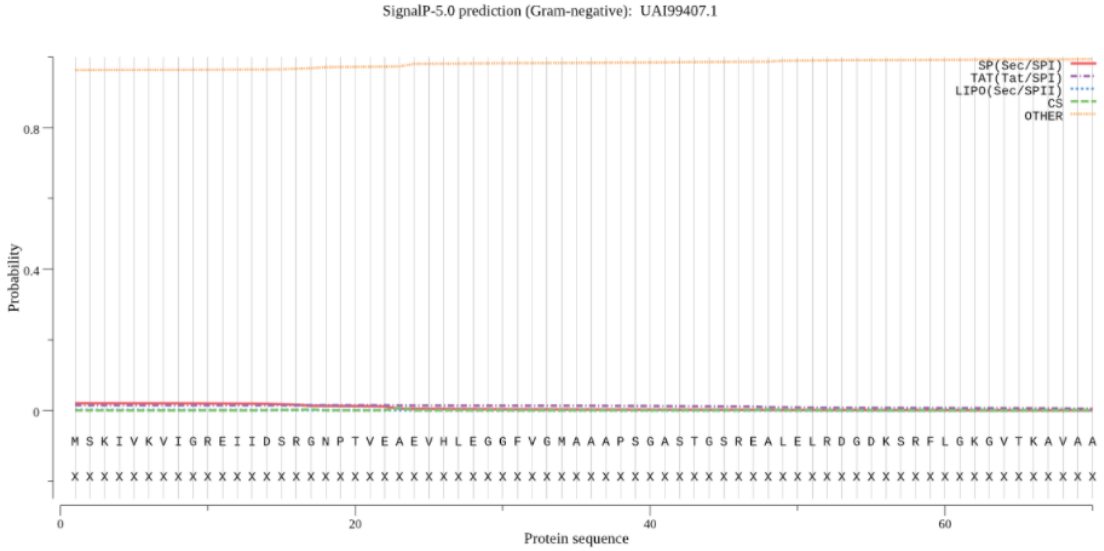


Ilustración 8. Predicción de péptidos de señalización. Sec/SPI: péptidos señal secretores "estándar" transportados por el translocón Sec y escindidos por la péptido señal I (Lep). Sec/SPII: péptidos señal de lipoproteínas transportados por el translocón Sec y escindidos por Signal Peptidase II (Lsp). Tat/SPI: Péptidos señal Tat transportados por el translocón Tat y escindidos por la péptido señal I (Lep).

Se utilizó el servidor TargetP-2.0. para predecir la presencia de presecuencias de N-terminal, como: péptidos de señalización (SP), péptido de tránsito mitocondrial (mTP), péptido de tránsito de cloroplasto (cTP) o péptido de tránsito luminal de tilacoides (lTP). Como se observa en la ilustración 9, no se obtuvo ningún resultado significativo ya que la probabilidad de la presencia de las presecuencias mencionadas anteriormente es menor a 0.0003.

Protein type	Other	Signal peptide	Mitochondrial transfer peptide
Likelihood	0.9997	0.0002	0.0001

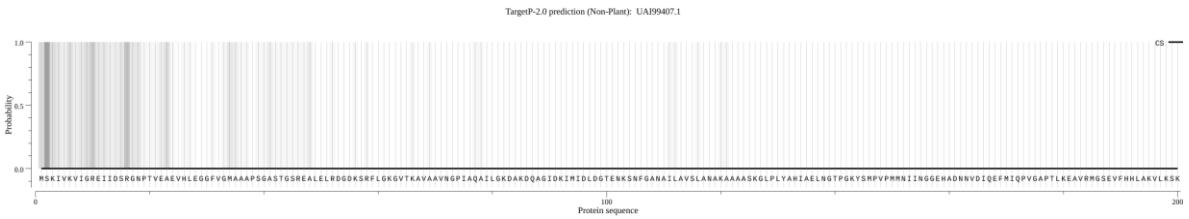


Ilustración 9. Predicción de péptidos de señalización, péptido de tránsito mitocondrial, péptido de tránsito de cloroplasto o péptido de tránsito luminal de tilacoides.

Se realizaron otros análisis *in silico* con el propósito de identificar la ubicación de la proteína enolasa, y su capacidad de desencadenar una respuesta inmune, así como la identificación de dominios transmembranales. Con el programa HMMTOP y CCTOP se predijo la región intracelular, una región o hélice transmembranal (TM) que va del aa 106-124 y la región externa (ilustración 10).

```
Length:  432
N-terminus:  IN
Number of transmembrane helices: 1
Transmembrane helices: 106-124

Total entropy of the model:  17.0138
Entropy of the best path:  17.0146

The best path:

     seq  MSKIVKVIGR EIIDSRGNPT VEAEVHLEGG FVGMAAAPSG ASTGSREALE    50
     pred IIIIIIIIII IIIIIIIIII IIIIIIIIII IIIIIIIIII IIIIIIIIII

     seq  LRDGDKSRFL GKGVTKAVAA VNGPIAQAIL GKDAKDQAGI DKIMIDLDGT   100
     pred IIIIIIIIII IIIIIIIIII IIIIIIIIII IIIIIIIIII iiiiiiiiii

     seq  ENKSNFGANA ILAVSLANAK AAAASKGLPL YAHIAELNGT PGKYSMPVPM   150
     pred iiiiiHHHHH HHHHHHHHHH HHHHooooo ooooooooo0 OOOOOOOOOO

     seq  MNIINGGEHA DNNVDIQEFM IQPVGAPTLK EAVRMGSEVF HHLAKVLKSK   200
     pred OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO

     seq  GMNTAVGDEG GYAPNLGSNA EALAVIAEAV KAAGYELGKD ITLAMDCAAS   250
     pred OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO

     seq  EFYKDGKYVL AGEGNKAFTS EEFTHFLEEL TKQYPIVSIE DGLDESDWEG   300
     pred OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO

     seq  FAYQTKVLGD KIQLVGDDLF VTNTKILKEG IEKGIANSIL IKFNQIGSLT   350
     pred OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO

     seq  ETLAAIKMAK DAGYTAVISH RSGETEDATI ADLAVGTAAG QIKTGSMSRS   400
     pred OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO

     seq  DRVAKYNQLI RIEEALGEQA PFNGRKEIKG QA  432
     pred OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OO
```

Ilustración 10. Predicción de la región TM con el servidor HMMTOP. Región transmembranal: 106 DKIMIDLDGTENKSN 124

7.4 Identificación de epítopos predichos en la estructura tridimensional de KpEn

Inicialmente la secuencia de la KpEno fue utilizada para realizar la construcción del modelo tridimensional utilizando el programa Phyre2, posteriormente se utilizó el programa UCSF Chimera para realizar la visualización del modelamiento de la proteína en la cual se identificaron diversas regiones de importancia bioquímica e inmunológica (ilustración 11-14).

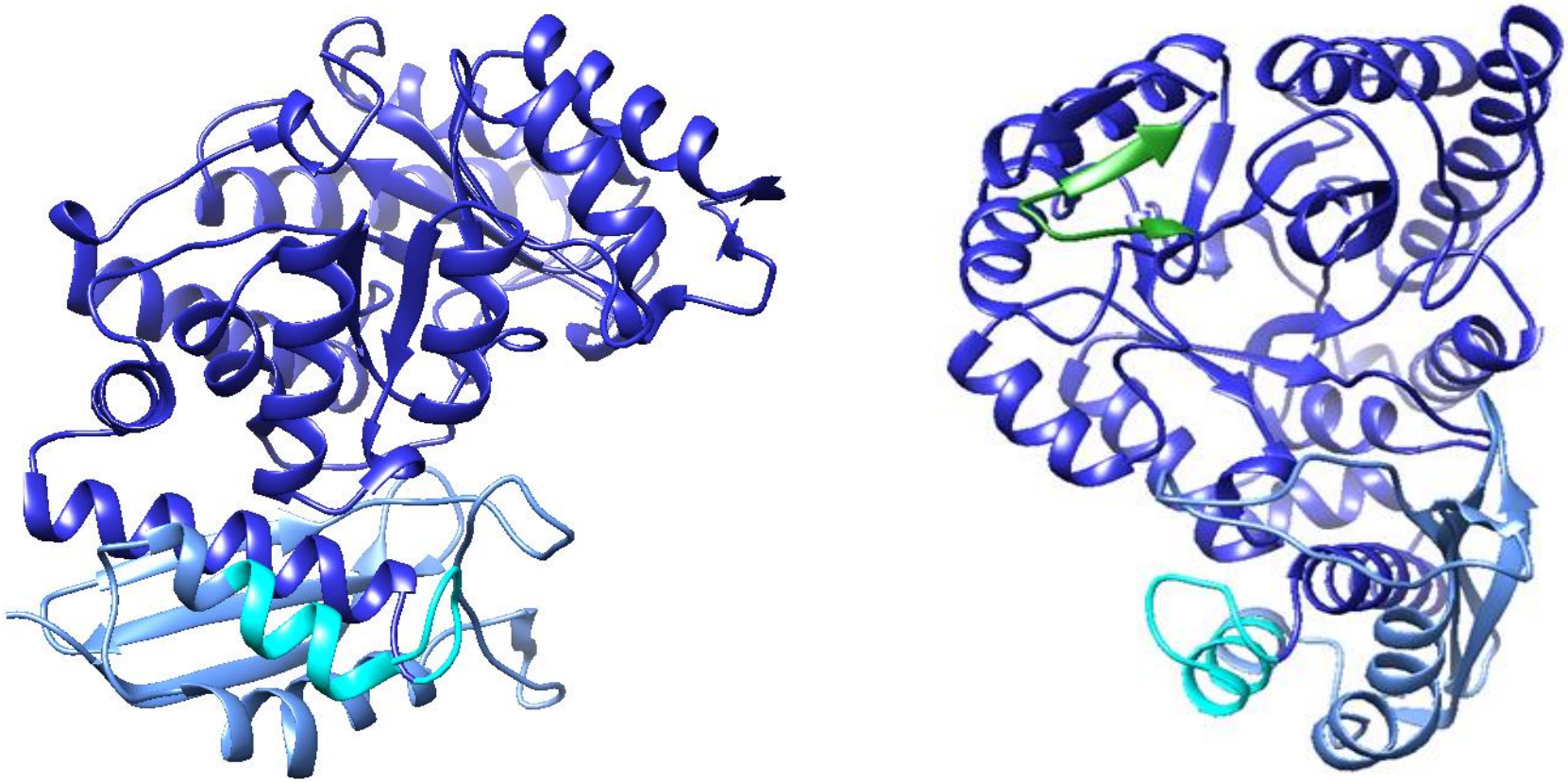


Ilustración 11. Estructura tridimensional de la enolasa de K. pneumoniae en Chimera 1.16: Región transmembranal , Región citoplasmática o intracelular, Región extracelular , Motivo de unión a plasminógeno .

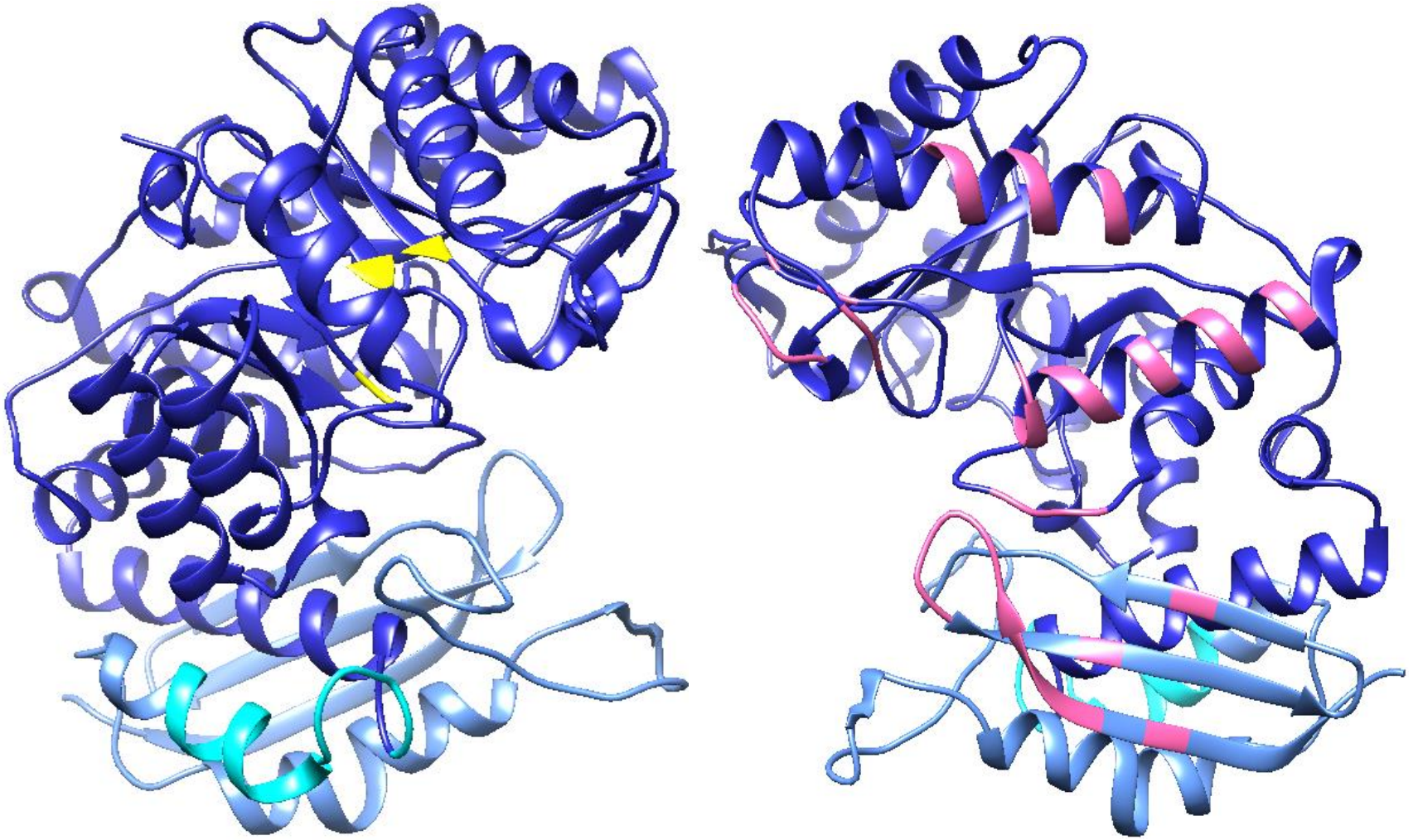


Ilustración 12. Estructura tridimensional de la enolasa de <u>K. pneumoniae</u> en Chimera 1.16: Región transmembranal , Región citoplasmática o intracelular, Región extracelular , Sitios de unión a Mg^{+2} , Sitios de dimerización .

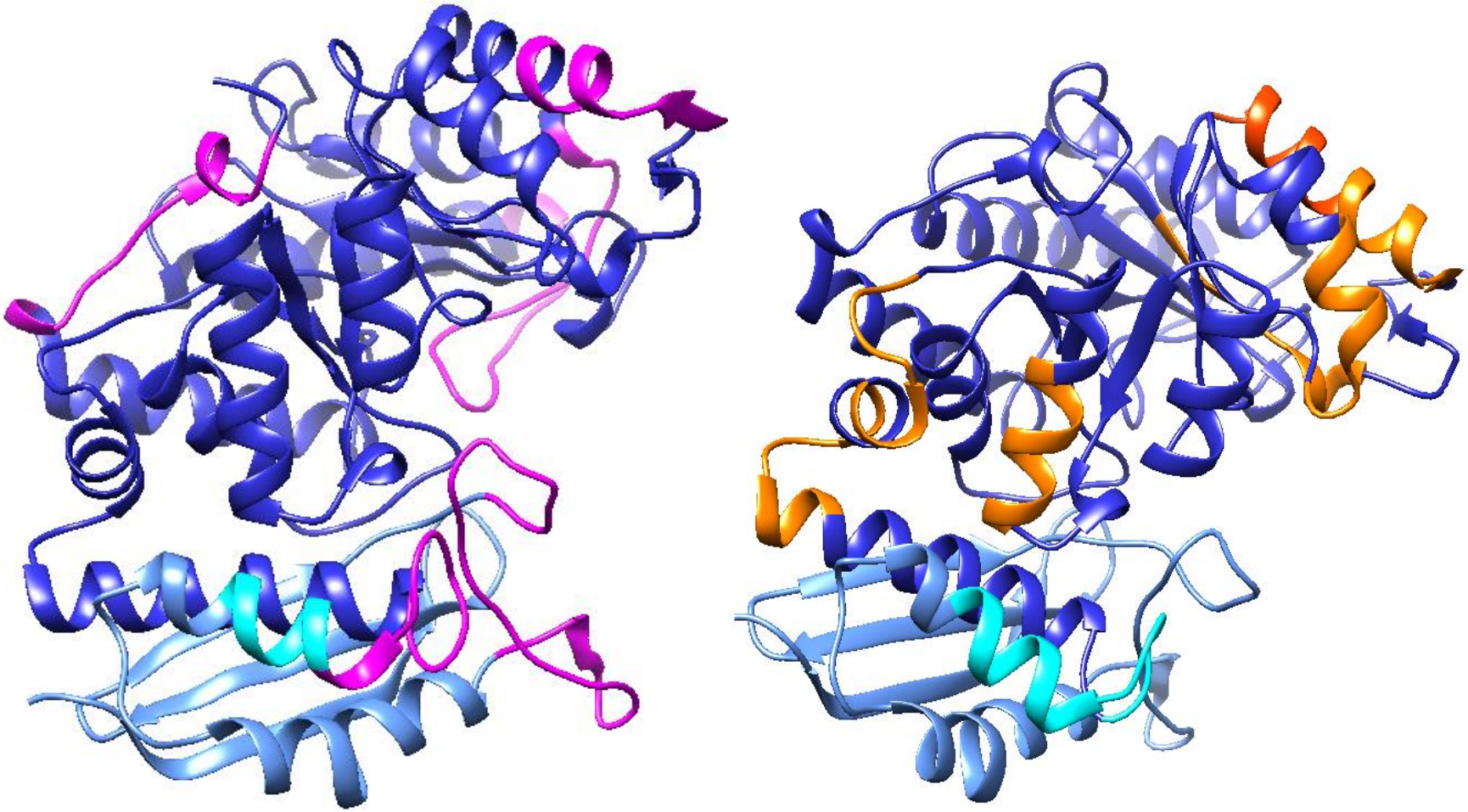


Ilustración 13. Estructura tridimensional de la enolasa de K. pneumoniae en Chimera 1.16: Región transmembranal , Región citoplasmática o intracelular , Región extracelular , Epítopos linfocitos B , Epítopos linfocitos T .

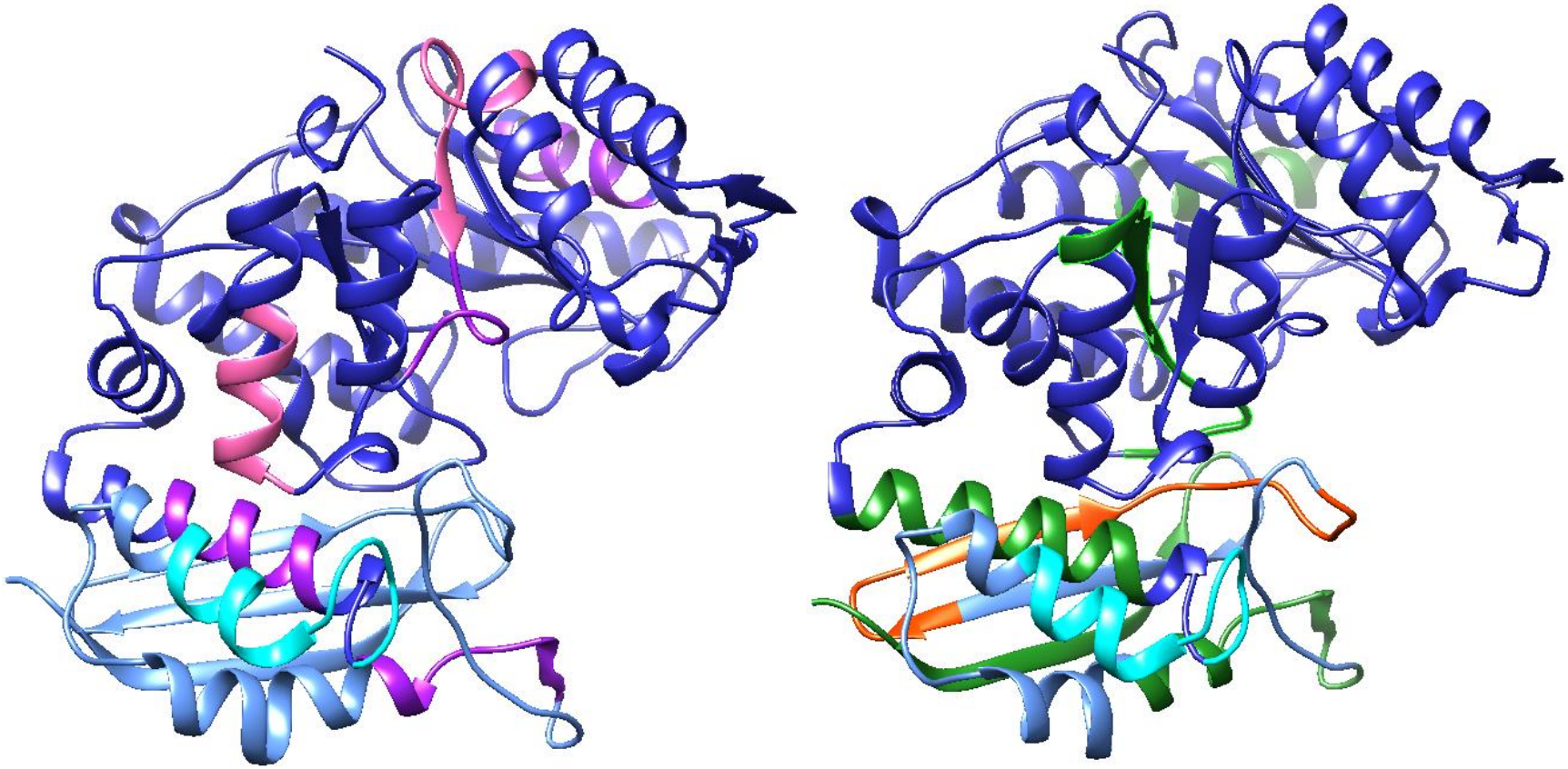


Ilustración 14. Estructura tridimensional de la enolasa de K. pneumoniae en Chimera 1.16: Región transmembranal , Región citoplasmática o intracelular , Región extracelular . Se muestran los péptidos de unión a moléculas MHC clase I, Ligandos fuertes , Ligandos débiles . Así como los epítopos activadores de respuesta mediada por el MHCI y MCHII, ligando fuerte , ligandos débiles .

8. DISCUSIÓN

Klebsiella pneumoniae es un patógeno de gran importancia para la salud pública y entorno hospitalario, debido a que es causante de infecciones como la bacteriemia o infección del torrente sanguíneo, neumonía, infección urinaria, enterocolitis, meningitis, absceso renal, endocarditis, entre otras [33]. Es considerada un patógeno oportunista, infectando mayormente a recién nacidos, ancianos e inmunodeprimidos, sin embargo, los patotipos hipervirulentos de *K. pneumoniae* son altamente invasivos, son capaces de afectar a personas sanas y causar infecciones adquiridas en la comunidad potencialmente mortales como el absceso hepático piógeno, fascitis necrosante, endoftalmitis y neumonía grave. *Klebsiella pneumoniae* utiliza una variedad de factores de virulencia, como los polisacáridos de la capsula, fimbrias, proteínas de la membrana externa, residuos específicos para la adquisición de hierro y la utilización de fuente de nitrógeno para la supervivencia y la evasión inmunitaria durante el proceso de infección [34].

Estudios recientes reportan que *K. pneumoniae* presenta fenotipos de resistencia a múltiples fármacos, comúnmente causados por la presencia de β-lactamasas de amplio espectro o carbapenemasas, lo cual dificulta la elección adecuada de antibióticos para su tratamiento. Debido a esto es de suma importancia el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento y la búsqueda de moléculas que puedan utilizarse como blancos terapéuticos. Una de las tecnologías propuestas es la vacunología reversa, la cual utiliza diferentes herramientas bioinformáticas para identificar estructuras en una célula que puedan funcionar como antígenos y ser considerados como candidatos vacunales, es mucho más efectiva que la vacunología convencional, debido a que es más rápida y económica. El procedimiento de la vacunología reversa comienza con la identificación *in silico* de los antígenos. El uso de programas bioinformáticos es de gran utilidad para predecir la localización de proteínas en la célula que puedan seleccionarse como antígenos, si bien estas proteínas en su mayoría son extracelulares o de membrana, estando expuestas al medio y a las células del sistema inmune del hospedero, sin embargo, se han identificado proteínas citoplasmáticas que pueden aparecer en la superficie bacteriana, a estas proteínas con más de una función se les ha identificado como proteínas “moonlighting” [35].

Estudios recientes han confirmado que la enolasa es una proteína "moonlighting" debido a las diversas funciones biológicas y su localización intracelular, esta enzima glicolítica cataliza la deshidratación de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, se ha descubierto que tiene un papel en la importación de tRNA(Lys) a la mitocondria [35], está implicada en funciones nucleares en protozoos, plantas y animales, está involucrada en la respuesta de estrés, funciona como chaperona molecular, actúa como un receptor de plasminógeno en la superficie celular de ciertos patógenos, entre otras funciones [36].

A causa de que la enolasa puede estar presente en la superficie celular, esta puede actuar como antígeno capaz de generar una respuesta inmune especifica, se han encontrado anticuerpos contra la α-enolasa en una gran variedad de enfermedades infecciosas y autoinmunes, además de su actividad como receptor de plasminógeno, lo cual aumenta la capacidad bacteriana de adhesión y penetración a los tejidos del hospedero, esto puede deberse a que existe una homología mayor al 50% entre enolasas de diferentes especies [13], la similitud estructural entre la enolasa humana y bacteriana puede conducir al mimetismo molecular. Tanto organismos Grampositivos como Gramnegativos han demostrado tener esta capacidad.

Debido a lo anterior, en este trabajo se realizaron una serie de análisis bioinformáticos para estudiar la posible presencia de la enolasa en la membrana de *K. pneumoniae* y su posible actividad inmunogénica. Se realizó un alineamiento múltiple de la enolasa con 10 especies bacterianas diferentes, en las cuales se ha reportado la expresión de la enolasa en la superficie celular y con actividad de receptor de plasminógeno (Ilustración 4) [17, 25, 26, 31, 38].

De las cepas seleccionadas se ha reportado el reconocimiento de la enolasa de *Salmonella typhimurium* por anticuerpos contra la enolasa humana, así como su interacción con Plg [31], presentando una homología del 97.22% con la enolasa de *K. pneumoniae*. En el caso de *Yersinia pestis* también se encontró que la α-enolasa era regulada positivamente a 37°C y que presentaba actividad de unión a plasminógeno tanto *in vitro* como in vivo, y que su expresión en la superficie de la membrana externa es para interactuar con el plasminógeno del hospedero, este complejo α-enolasa – plasminógeno ayuda a la diseminación del patógeno por medio de la degradación de fibrina, laminina y fibronectina [38], presenta una homología de 94.43% con la enolasa de *K. pneumoniae*. Las demás especies con las que se realizó el

alineamiento presentan arriba de 95% de identidad con respecto a la enolasa de *K. pneumoniae*. En el alineamiento se identificaron los aminoácidos necesarios para su actividad bioquímica, como los residuos de unión a magnesio, la firma de la enolasa y el posible motivo de unión a plasminógeno. Los resultados del alineamiento indican que la enolasa de *K. pneumoniae* se encuentra altamente conservada.

Los patógenos utilizan diferentes estrategias para invadir y atacar al organismo del hospedero, entre esas estrategias está la modulación de componentes del sistema inmune innato como las cascadas del complemento y el sistema fibrinolítico. En infecciones bacterianas, la actividad proteolítica del Plg puede utilizarse con el fin de facilitar el proceso de invasión cuando las bacterias tienen proteínas en su membrana externa que funjan como receptores de unión a Plg [39]. Esto es propiciado por la similitud tan alta entre los activadores de plasminógeno (tPa y uPA previamente mencionados) y las proteínas de la bacteria, al unirse al plasminógeno y formarse la plasmina, esta va a interaccionar con otras enzimas relacionadas con el proceso de degradación de la matriz celular, lo cual promueve la colonización y transmigración de las células bacterianas a través de las capas epiteliales de los pulmones o del endotelio en los vasos sanguíneos [40]. Además de que la plasmina impide la formación de uno de los mayores agentes líticos en las infecciones bacterianas, el Complejo de Ataque de Membrana (MAC,C5b-9), al degradar C5, lo cual inhibe la disposición de C5b, este complejo, montado a partir de proteínas del complemento, elimina directamente algunos agentes patógenos al crear poros en membranas microbianas, induciendo daño celular y necrosis. C5b-9 también puede amplificar la respuesta inflamatoria al promover la expresión de mediadores proinflamatorios. Adicionalmente, C5b-9 puede influenciar el reclutamiento de células inflamatorias y la adhesión de leucocitos al endotelio. Como resultado, MAC promueve la liberación de estimulantes celulares, incluyendo enzimas hidrolíticas, especies reactivas de oxígeno y citocinas [40], al inhibir este complejo, la defensa del hospedero hacía los patógenos se ve atenuada considerablemente.

El motivo de unión a Plg encontrado en este trabajo tiene la secuencia FYKDGKYV, teniendo un 25% de similitud con el motivo encontrado en la enolasa de estreptococos (FYDKERVY), el cual ha demostrado ser una secuencia clave para la unión a Plg, necesaria para la degradación de fibrina y laminina, permitiendo así la transmigración de la bacteria a

través de la matriz extracelular; después de modificar este motivo en la secuencia de la enolasa, *Streptoccus pneumoniae* resultó menos virulento [42]. Sin embargo, de acuerdo con otros estudios, la presencia del motivo completo no es necesario para la activación del Plg [43]. La enolasa de *Salmonella typhimurium* ha demostrado tener la capacidad de unirse al plasminógeno humano, además de tener una similitud de epítopos entre la enolasa de Salmonella y de la humana [31]. Otras bacterias gramnegativas que tienen enolasas capaces de unirse al plg son la de *Pseudomonas aeruginosa* [44] y *Vibrio parahaemolyticus* [45].

En el análisis *in silico* se determinaron las propiedades inmunogénicas de la enolasa de *K. pneumoniae*, se predijeron 13 epítopos en total y al realizar el análisis tridimensional de la proteína en Chimera, se observó que estos epítopos, en su mayoría, se encuentran en la parte expuesta de la enolasa (ilustración 13), por lo que, al estar expuestos en la superficie, estos epítopos pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico del hospedero.

Debido a que la enolasa es una enzima citosólica y es descrita como una proteína de exportación no clásica, lo cual se confirma con la carencia de péptido señal (Ilustración 8), se analizó su secuencia en búsqueda de posibles sitios o hélices transmembranales. Estas son estructuras que utilizan las proteínas de la membrana para anclarse a ella. Es importante que, al buscar un candidato antigénico, este no tenga un alto número de hélices transmembranales, ya que las vacunas de nueva generación emplean vectores de expresión que son distintos a los del microorganismo original, lo que puede generar cambios en la conformación tridimensional de la proteína y presentar epítopos distintos de los deseados [37].

En los resultados obtenidos con el programa DTMHMM no se encontró ningún sitio transmembranal, prediciendo que toda la proteína se encuentra en el interior de la bacteria, el programa TMHMM 2.0, también fue utilizado con el mismo fin y contrario al primer programa este predice que la proteína se encuentra en la parte exterior de la membrana, sin embargo, este programa no es útil para predecir la localización de la proteína, la gráfica que nos brinda las probabilidades de que sea interna/externa/hélice transmembranal. Aquí se pueden observar si hay alguna posibilidad débil de hélices transmembranales, además de la certeza del resultado de cada fragmento (Ilustración 7), en esta gráfica se pueden observar dos sitios con una baja probabilidad de ser transmembranales, el segundo sitio también fue predicho con el programa HMMTOP, el cual encontró una hélice transmembranal que va del

residuo 106-124 con la secuencia -FGANAILAVSLANAKAAAA- (Ilustración 10). El programa HMMTOP es la plataforma con mejores resultados para la predicción de proteínas transmembranales, ya que se basa en la máxima divergencia de la composición de los aminoácidos [46]. Estos resultados nos indican que posiblemente la enolasa de *Klebsiella pneumoniae* puede anclarse en la membrana externa con esta región, dejando expuesta la mayor parte de su secuencia, posiblemente atravesando la cápsula de *Klebsiella* y así interactuar con el plasminógeno.

Recientemente la enolasa de *K. pneumoniae* se estudió para conocer el tipo de interacción que podría tener con el Plg, en este ensayo se utilizó la cepa PCM 2713 la cual actúa como una típica representante de la especie. Utilizaron métodos como; microscopia de electrones, electroforesis 2D, inmunobloting y toma de huellas de fragmentación de péptidos, y se demostró que *Klebsiella pneumoniae* se une al plasminógeno humano, debido a la interacción plasminógeno-proteína similar a la enolasa bacteriana, que ocurre en la membrana externa de la bacteria [47].

9. CONCLUSIÓN

Por medio del alineamiento realizado se observó que la secuencia de la enolasa se encuentra altamente conservada, y al tener un gran porcentaje de identidad con otras enolasas que ya se han demostrado ser inmunogénicos, por lo que la enolasa de *Klebsiella pneumoniae* también podría ser un candidato inmunogénico.

Con el análisis *in silico* se propuso un sitio o hélice transmembranal, la cual dejaría expuestos los epítopos para ser reconocidos por linfocitos y desencadenar una respuesta inmune.

Finalmente, la posible interacción a plasminógeno a través del motivo putativo en la KpEno nos permitiria tener un mayor entendimiento del papel de la enolasa en el proceso de infección de *K. pneumoniae*.

11. PERSPECTIVAS

- Amplificar el gen de la enolasa por PCR, el producto obtenido se puede clonar en un vector de expresión y transformar células competentes.
- Sobreexpresar y purificar la enolasa de *Klebsiella pneumoniae* recombinante, desarrollar un protocolo de inmunización y obtener anticuerpos anti-enolasa.
- Utilizar los anticuerpos anti-enolasa para comprobar si la enolasa de *K. pneumoniae* se encuentra en la superficie celular.
- Comprobar por medio de análisis *in vitro* si la enolasa de *K. pneumoniae* tiene la habilidad de unirse al plasminógeno humano.
- Se necesita mayor investigación y experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* en el laboratorio para tener más información sobre el posible uso de la enolasa como un potencial inmunógeno.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bassetti, M., Giacobbe, D. R., Giamarellou, H., Viscoli, C., Daikos, G. L., Dimopoulos, G., & Poulakou, G. (2018). Management of KPC-producing Klebsiella pneumoniae infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(2), 133–144. doi:10.1016/j.cmi.2017.08.030
2. Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2016). *Klebsiella pneumoniae Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. Trends in Microbiology, 24(12), 944–956.* doi:10.1016/j.tim.2016.09.007
3. Wyres, K. L., Lam, M. M. C., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of Klebsiella pneumoniae. Nature Reviews Microbiology. doi:10.1038/s41579-019-0315-1
4. Hu, Y., Anes, J., Devineau, S., & Fanning, S. (2020). Klebsiella pneumoniae: Prevalence, Reservoirs, Antimicrobial Resistance, Pathogenicity, and Infection: A Hitherto Unrecognized Zoonotic Bacterium. Foodborne Pathogens and Disease. doi:10.1089/fpd.2020.2847
5. Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of Klebsiella pneumoniae. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8. doi:10.3389/fcimb.2018.00004
6. Bengoechea, J. A., & Pessoa, J. S. (2018). Klebsiella pneumoniae infection biology: living to counteract host defences. FEMS Microbiology Reviews. doi:10.1093/femsre/fuy043
7. Bassetti, M., Righi, E., Carnelutti, A., Graziano, E., & Russo, A. (2018). *Multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae: challenges for treatment, prevention and infection*

control. Expert Review of Anti-Infective Therapy. doi: 10.1080/14787210.2018.1522249

8. Greenberger MJ, Kunkel SL, Strieter RM, Lukacs NW, Bramson J, Gauldie J, et al. (1996). IL-12 gene therapy protects mice in lethal Klebsiella pneumonia. J Immunol. 157:3006–12.
9. Laichalk LL, Kunkel SL, Strieter RM, Danforth JM, Bailie MB, Standiford TJ. (1996). Tumor necrosis factor mediates lung antibacterial host defense in murine Klebsiella pneumonia. Infect Immun. 64:5211–8.
10. Karaolis, D. K. R., Newstead, M. W., Zeng, X., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Bhan, U., … Standiford, T. J. (2007). *Cyclic Di-GMP Stimulates Protective Innate Immunity in Bacterial Pneumonia. Infection and Immunity, 75(10), 4942–4950.* doi:10.1128/iai.01762-06
11. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998;11:589–603.
12. Wold, F. (1971). *18 Enolase. The Enzymes, 499–538.* doi:10.1016/s1874-6047(08)60101-8
13. Pancholi, V. (2001). Multifunctional α-enolase: its role in diseases. Cellular and Molecular Life Sciences, 58(7), 902–920. doi:10.1007/pl00000910
14. Ahmad, T. A., El-Sayed, L. H., Haroun, M., Hussein, A. A., & El Ashry, E. S. H. (2012). *Development of immunization trials against Klebsiella pneumoniae. Vaccine, 30(14), 2411–2420.* doi:10.1016/j.vaccine.2011.11.027
15. Cai-Ming Xu, Ya-Lan Luo, Shuai Li, Zhao-Xia Li, Liu Jiang, Gui-Xin Zhang, Lawrence Owusu, Hai-Long Chen; Multifunctional neuron-specific enolase: its role in lung diseases. *Biosci Rep* 29 November 2019; 39 (11): BSR20192732. doi: https://doi.org/10.1042/BSR20192732
16. Liu, Ko-Jiunn & Neng-Yao, Shih. (2007). The Role of Enolase in Tissue Invasion and Metastasis of Pathogens and Tumor Cells. Journal of Cancer Molecules. 3.
17. Aisina, R. B., & Mukhametova, L. I. (2014). Structure and function of plasminogen/plasmin system. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 40(6), 590–605. doi:10.1134/s1068162014060028
18. Peetermans, M., Vanassche, T., Liesenborghs, L., Lijnen, R. H., & Verhamme, P. (2015). Bacterial pathogens activate plasminogen to breach tissue barriers and escape from innate immunity. Critical Reviews in Microbiology, 42(6), 866–882. doi:10.3109/1040841x.2015.1080214
19. Bhattacharya, S., Ploplis, V. A., & Castellino, F. J. (2012). Bacterial Plasminogen Receptors Utilize Host Plasminogen System for Effective Invasion and Dissemination. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, 1–19. doi:10.1155/2012/482096
20. K. Danø, P. A. Andreasen, J. Grøndahl-Hansen, P. Kristensen, L. S. Nielsen, and L. Skriver, "Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer," *Advances in Cancer Research*, vol. 44, no. C, pp. 139–266, 1985.

21. D. C. Rijken, “Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects,” Bailliere’s Clinical Haematology, vol. 8, no. 2, pp. 291–312, 1995.
22. M. P. Crippa, “Urokinase-type plasminogen activator,” International Journal of Biochemistry and Cell Biology, vol. 39, no. 4, pp. 690–694, 2007.
23. X. Wang, S. R. Lee, K. Arai et al., “Lipoprotein receptormediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator,” Nature Medicine, vol. 9, no. 10, pp.1313–1317, 2003.
24. Chumchua V, Pornputtapong N, Thammarongtham C, Meksuriyen D. (2008). Homology modeling of Mycoplasma pneumoniae enolase and its molecular interaction with human plasminogen. Bioinformation 3:18–23.
25. Sjobring U, Pohl G, Olsen A. (1994). Plasminogen, absorbed by Escherichia coli expressing curli or by Salmonella enteritidis expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). Mol Microbiol 14:443–52.
26. B. Zavizion, J. H. White, and A. J. Bramley, “*Staphylococcus aureus* stimulates urokinase-type plasminogen activator expression by bovine mammary cells,” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 176, no. 6, pp. 1637–1640, 1997.
27. Degen JL, Bugge TH, Goguen JD. (2007). *Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense*. J Thromb Haemost 5:24–31.
28. Casadevall, A., & Pirofski, L. (2012). Immunoglobulins in Defense, Pathogenesis, and Therapy of Fungal Diseases. Cell Host & Microbe, 11(5), 447–456. doi: 10.1016/j.chom.2012.04.004
29. Yadav, R. K., & Shukla, P. K. (2019). A novel monoclonal antibody against enolase antigen of Aspergillus fumigatus protects experimental aspergillosis in mice. FEMS Microbiology Letters. doi:10.1093/femsle/fnz015
30. Shu, X., Cao, K.-Y., Liu, H.-Q., Yu, L., Sun, L.-X., Yang, Z.-H., … Ran, Y.-L. (2021). Alpha-enolase (ENO1), identified as an antigen to monoclonal antibody 12C7, promotes the self-renewal and malignant phenotype of lung cancer stem cells by AMPK/mTOR pathway. Stem Cell Research & Therapy, 12(1). doi:10.1186/s13287-021-02160-9
31. Serek P, Bednarz-Misa I, Pietkiewicz J, et al. (2020). Salmonella Typhimurium enolase-like membrane protein is recognized by antibodies against human enolase and interacts with plasminogen. Adv Clin Exp Med. 29(12):1433–1441. doi:10.17219/acem/128233
32. Jeppe Hallgren, Konstantinos D. Tsirigos, Mads D. Pedersen, José Juan Almagro Armenteros, Paolo Marcatili, Henrik Nielsen, Anders Krogh and Ole Winther (2021). DeepTMHMM. https://biolib.com/DTU/DeepTMHMM
33. Umeh O., & Berkowitz L. (2006), Klebsiella infections. E-medicine. Recuperado de: http://www.emedicine.com/Med/topic1237.htm
34. Shon A., Bajwa R., & Russo T. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) Klebsiella pneumoniae: a new and dangerous breed. Virulence 4(2), 107–118.

35. Jeffery, C. J. (2009). Moonlighting proteins—an update. Molecular BioSystems, 5(4), 345. doi:10.1039/b900658n
36. Pal-Bhowmick, I., Vora, H.K. & Jarori, G.K. (2007). Sub-cellular localization and post-translational modifications of the Plasmodium yoelii enolase suggest moonlighting functions. Malar J 6, 45 https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-45
37. Monterrubio, L. G., Delgadillo, G. K. (2021). Vacunología reversa: estrategia contra patógenos emergentes. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, vol. 59, núm. 3, pp. 233-241
38. Chromy, B. A., Choi, M. W., Murphy, G. A., Gonzales, A. D., Corzett, C. H., Chang, B. C., McCutchen-Maloney, S. L. (2005). *Proteomic Characterization of Yersinia pestis Virulence. Journal of Bacteriology, 187(23), 8172–8180.* doi:10.1128/jb.187.23.8172-8180.2005
39. Ayón-Núñez, D.A., Fragoso, G., Bobes, R.J., Laclette, J.P., (2018). Plasminogen-binding proteins as an evasion mechanism of the host's innate immunity in infectious diseases. Biosci. Rep. 38 (5) https://doi.org/10.1042/BSR20180705
40. Baramova, E.N., Bajou, K., Remacle, A., L'Hoir, C., Krell, H.W., Weidle, U.K., Noel, A., Foidart, J.M., (1997). Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro- MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. FEBS Lett. 405, 157–162. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00175-0.
41. Hansch GM, Seitz M, Betz M. (1987). Effect of the late complement components C5b-9 on human monocytes: release of prostanoids, oxygen radicals and of a factor inducing cell proliferation. Int Arch Allergy Appl Immunol. 82:317–320.
42. Bergmann, S., Preissner, K., Hammerschmidt, S., (2005). The nine residue plasminogen binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. Thromb. Haemostasis-Stuttgart 94, 304. https://doi.org/10.1160/TH05-05-0369.
43. tzek, A., Gillen, C.M., Fulde, M., Friedrichs, C., Rodloff, A.C., Chhatwal, G.S., Nitsche- Schmitz, D.P., (2010). Contribution of plasminogen activation towards the pathogenic potential of oral streptococci. PLoS One 5, e13826. https://doi.org/10.1371/journal. pone.0013826.
44. Ceremuga, I., Seweryn, E., Bednarz-Misa, I., Pietkiewicz, J., Jermakow, K., Bana´s, T., Gamian, A., (2014). Enolase-like protein present on the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa binds plasminogen. Folia Microbiol. (Praha) 59, 391–397.
45. Jiang, W., Han, X., Wang, Q., Li, X., Yi, L., Liu, Y., Ding, C., (2014). Vibrio parahaemolyticus enolase is an adhesion-related factor that binds plasminogen and functions as a protective antigen. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 4937–4948. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5471-z.
46. Tusnády G. E., Simon I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. Bioinformatics. 17(9):84950. doi: 10.1093/bioinformatics/17.9.849
47. Serek, P., Lewandowski, Ł., Dudek, B., Pietkiewicz, J., Jermakow, K., Kapczyńska, K. & Bednarz-Misa, I. (2021). *Klebsiella pneumoniae enolase-like membrane*

protein interacts with human plasminogen. International Journal of Medical Microbiology, 311(6), 151518. doi:10.1016/j.ijmm.2021.151518

48. Jeppe Hallgren, Konstantinos D. Tsirigos, Mads D. Pedersen, José Juan Almagro Armenteros, Paolo Marcatili, Henrik Nielsen, Anders Krogh and Ole Winther. (2021). DeepTMHMM. https://biolib.com/DTU/DeepTMHMM