



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**GENÓMICA ESTRUCTURAL PARA EL ANÁLISIS DE PÉPTIDOS
SINTETASAS NO RIBOSOMALES EN BACTERIAS SIMBIÓTICAS DE
ORGANISMOS PATÓGENOS**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A:
BIOL. BRANDON BUENO HERNÁNDEZ**

DIRECTOR

DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 18 de noviembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Edgar Dantán González (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. Patricia Mussali Galante (CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT UNAM)

Dr. Armando Hernández Mendoza (CIDC UAEM)

Tesis: **"Genómica estructural para el análisis de péptidos sintetasas no ribosomales en bacterias simbióticas de organismos patógenos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Brandon Bueno Hernández**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2020-12-10 10:28:48 | Firmante

hTBZM1zfcB7WwO3ioA38I6wBCW21AhzM02MKgy7Rg5iWIkRbT1Geg9HSG8gKgi6IFm+J1Pk3KvwJlmgHPRLPghcd7/LL/9T1dEPT5qm+bgVU9Rwds3fVKdGF9Um3cGTiaBJ6E/vGaYfeU2tIsuBYqZM/oxOAprS2N3W5m81Dyn2qs0DHawnatd5owabxa5NCQLuNhOXVIY/d0wcnrg87ncCayxJ/xG8UJXxCYzW/9SRkaYaCgKTFC2IJG9/3hENaUpokhISSGIwL1VRLJNVPPrEdr75+aw8EBDzoagT9zCj9gcXM5lGwsUBGTogpjb8J0tSHuOreAuhaV7oKMEq7A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



fBvKaz

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/6dObSzJQY3nyu7ISptdviksY4T3FBOjA>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 18 de noviembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Edgar Dantán González (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. Patricia Mussali Galante (CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT UNAM)

Dr. Armando Hernández Mendoza (CIDC UAEM)

Tesis: **"Genómica estructural para el análisis de péptidos sintetasas no ribosomales en bacterias simbióticas de organismos patógenos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Brandon Bueno Hernández**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

PATRICIA MUSSALI GALANTE | Fecha:2020-12-10 21:23:26 | Firmante

J1hdzJYE0a63/kv8kKyQru+nx6tGfDDav+wSzA3n70pkIctUi9wVzgCK7gizv9cAWCG9P1/cBVbVvXaOz+UJKktNsodmp3qRnxvzli3D3EKhUvtjWjsvcxOrz1Z9K/MeNZxJjxV55WGjN
NpN+kAmnCxkXQOJ/ZpHhSODc7K2TKTAW0XTorc9OKbc/LgOfk6lfMq5Es+y2zZcvjT0AqSxcNVIIdTSCLPIZQKrrYTsfsz1gJbNk1B1zyHlwemnhG+r/AWOi7vskfMEjOtr+yfOWaMA
EEIbiQJPI7Zjz1PQc04zDTx4/WchH+Tu9mHPLX7Afv6RsdHyoRb4B6fvjijn91IKg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[xuo6w](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3kNV0619fXiMcVIP75PEtM4JxZ6yIXj>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 18 de noviembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Edgar Dantán González (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. Patricia Mussali Galante (CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT UNAM)

Dr. Armando Hernández Mendoza (CIDC UAEM)

Tesis: **"Genómica estructural para el análisis de péptidos sintetasas no ribosomales en bacterias simbióticas de organismos patógenos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Brandon Bueno Hernández**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2020-12-07 18:07:42 | Firmante

ukZsG07x3ifc1JqUnAq4GXBYG6+tXwlg9pJOp6hZrO/UXsUCCBR17Wda4cK5rBA7TIUetpdyAJal48dtgiTSF7eFiHtZXgLiY6tlSTqLAquWpdgbPTPuWpQA0Q/qZoBi5cgg7q/ftCmH5DuVuFO4EJ6yRagwBWXMtqlcahwhUvbmKKVx5azTliit52STHF+KL6EZxIB7wKuzM1bGKStOVkm+GJwWsv2HFxsgyKrlpY4WrjyQEV/XKZfvsTQKvXeAVteENCnCffeVEbAw tFCF1JNjInOK3mKwjJWge/YvtrpdqTFMD+wOfWZ1Qg5x4lyBxMbHxWXiZpAqgDePBQQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



eViZ2f

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/1gNAIBcK16Rm9T52sAMIIFbuUmtA6u2O>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 18 de noviembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Edgar Dantán González (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. Patricia Mussali Galante (CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT UNAM)

Dr. Armando Hernández Mendoza (CIDC UAEM)

Tesis: **"Genómica estructural para el análisis de péptidos sintetasas no ribosomales en bacterias simbióticas de organismos patógenos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Brandon Bueno Hernández**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

Luis caspeta Guadarrama 16/dic/2020

DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 18 de noviembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Edgar Dantán González (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. Patricia Mussali Galante (CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT UNAM)

Dr. Armando Hernández Mendoza (CIDC UAEM)

Tesis: **"Genómica estructural para el análisis de péptidos sintetasas no ribosomales en bacterias simbióticas de organismos patógenos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Brandon Bueno Hernández**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2020-12-16 16:53:34 | Firmante

hguK0xOJc0H6vuwmBktH2oPqGxPVxuYWBosAKUTh2S8F3FEIucANRyg44I0jwd2OBWy3hBUvB2WpP/PKWuj4DwMeqQQNO9H/j66L9eCnReDs9uzVn48HTVihWUxpwNTx4hj
xl92IPN0RMEvI0wiBtZE3LWlgOfemP9fJb7h0DKOABojGR5Y9DR0kPro0BfIMEbkW//zzq0NF3EppqDX2o/iBARERp5Y3PyzroITISARFPFCacxVF9foYVPGINANPbEs63cW7Thwhte
nE5b9hxqHTBq1kdcyQ1PGUlldnD1S/DTj3YUVf5jqUlv/WGaCNd7XNMFsSsojryV9DYW1+03pA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



ZrYPmE

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QyrNbilbRnkktlc1ZLWPZNTg4iKqjZ7F>



Índice

Introducción.....	1
Photorhabdus y Xenorhabdus.....	2
Cicló de vida.....	2
Variación fenotípica en Photorhabdus y Xenorhabdus.....	4
Metabolismo secundario.....	6
Metabolitos secundarios involucrados en la simbiosis Bacteria-Nematodo...8	
Metabolitos secundarios involucrados en la patogenicidad.....	10
Péptidos no ribosomales.....	12
Actividad biológica de péptidos no ribosomales.....	15
Genómica estructural para la identificación de productos naturales.....	18
Justificación.....	21
Hipótesis.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos particulares.....	21
Materiales y Métodos.....	22
Determinación de grupos de genes biosintéticos.....	22
Análisis de redes (BiG-SCAPE).....	23
Análisis pangénomico	24
Mutagénesis.....	25
Resultados.....	29
Potencial biosintético de metabolitos secundarios en bacterias simbiotes de nematodos entomopatógenos.....	29
Análisis de redes por similitud de secuencia.....	31

Pangenoma de <i>Photorhabdus</i>.....	36
Mutagénesis del gen <i>kol</i> de <i>Photorhabdus</i>.....	39
Discusión	42
Conclusiones.....	47
Perspectivas.....	48
Referencias.....	49

Introducción

Como en todos los sistemas co-evolutivos, el aporte de los organismos simbioses resulta vital para diversas actividades del hospedero, en el caso del sistema nematodo/bacterias, eventos interesantes en el ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos (NEP) pueden requerir de aportes adicionales generados por dichas bacterias, como el caso de I) la etapa *dauer* de los nematodos, conocidos como juveniles infecciosos, en los cuales el nematodo no se alimenta; II) el proceso de infección, donde las bacterias son liberadas en la hemolinfa del insecto y producen factores que ayudan en la degradación de tejidos y protección frente al sistema inmune de los insectos; iii) la fuente de energía producida en el proceso de infección, que permite que el nematodo culmine su ciclo de vida. Adicionalmente, es importante mencionar que este tipo de bacterias presentan etapas donde se ha demostrado que su metabolismo se modifica y en algunas de estas etapas las péptidos sintetizadas no ribosomales juegan un factor fundamental.

Las péptidos sintetizadas no ribosomales o NRPS (NRPS, por sus siglas en inglés: non ribosomal peptide synthetases) son enzimas modulares que catalizan la síntesis de productos peptídicos importantes a partir de una variedad de sustratos de aminoácidos estándar y no proteogénicos. Estos péptidos son, a diferencia de las proteínas producidas por la síntesis ribosómica, productos peptídicos naturales pequeños que contienen no sólo los 20 aminoácidos comunes, sino también cientos de aminoácidos diferentes. Por otra parte, se considera que las bacterias del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* pueden ser una fuente con potencial interesante de metabolitos secundarios particularmente aquellos sintetizados por NRPS, esto probablemente relacionado al estilo de vida de estas bacterias, las cuales mantienen una relación simbiótica con NEP de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*.

Por lo tanto, en este proyecto se pretende realizar un análisis de genómica estructural de grupos de genes biosintéticos (BGC) que codifican NRPS en bacterias que establezcan una relación simbiótica con organismos patógenos en este caso nematodos.

2. *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*

Los géneros *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* son bacterias Gram-negativas anteriormente miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, las cuales presentan una asociación simbiótica en el intestino de nematodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* y *Steinernema*, respectivamente (Akhurst *et al.*, 1990), la mayor parte son patógenas de insectos, sin embargo, también existen cepas no simbióticas de *Photorhabdus* que se han identificado como patógenas oportunistas en humanos (Peel *et al.*, 1999). En un principio solo se reconocía al género *Xenorhabdus*, posteriormente mediante características particulares como homología del DNA se llegó a la conclusión de la existencia del género *Photorhabdus* (Suzuki *et al.*, 1990). Las cepas de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* pueden distinguirse claramente mediante las secuencias de 16S rDNA, *Xenorhabdus* presenta una secuencia de TTCG en las posiciones 208-211, mientras que *Photorhabdus* tiene una secuencia TGAAAG en las posiciones 208-213 (Szállás *et al.*, 1997). Además, existen argumentos biológicos para diferenciar a estos dos géneros, se han realizado estudios de ecología microbiana para estos dos grupos y nunca se han registrado un aislado de *Xenorhabdus* proveniente *Heterorhabditis* ni un aislado de *Photorhabdus* proveniente de *Steinernema* (Akhurst *et al.*, 1990).

3. Ciclo de vida

Photorhabdus y *Xenorhabdus*, presentan una etapa de vida libre, posteriormente colonizan el tracto intestinal del nematodo simbiote, a esta etapa de desarrollo del nematodo se conoce como juvenil infeccioso (IJ), al localizar y entrar a un huésped migran hacia la hemolinfa donde las bacterias (*Photorhabdus* o *Xenorhabdus*) son liberadas (Wang *et al.*, 1996), una vez en la hemolinfa las bacterias pueden evadir el sistema inmune y matar al insecto a través de una amplia variedad de mecanismos tóxicos o una septicemia, durante este periodo de tiempo los nematodos se someten a múltiples rondas de reproducción hasta que el suministro de alimentos disminuye, por lo que las bacterias recolonizan la progenie del nematodos y estos IJ y sus respectivas bacterias simbióticas emergen (Fig. 1), en

la mayoría de los casos más del 95% de los IJ están colonizados por la bacteria simbiote, debido a este ciclo de vida estas bacterias son potencialmente patógenas para una amplia variedad de insectos (Wang *et al.*, 1996; Goodrich-Blair *et al.*, 2007; Hinchliffe *et al.*, 2010)

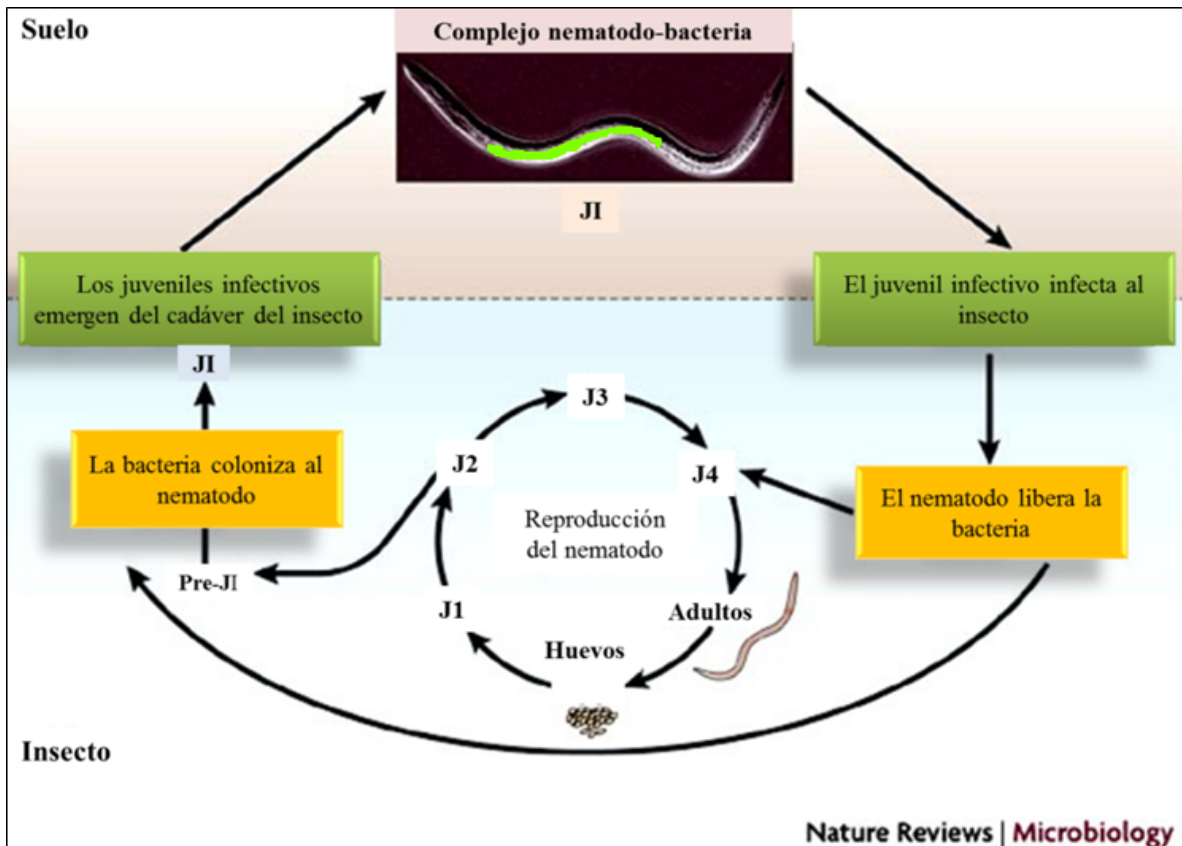


Figura 1. Ciclo de vida general para *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*. Tomado y modificado de Vallet *et al.*, (2008)

Por otra parte, una característica importante en los géneros *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* es una variación de fase que se produce durante un periodo estacionario del ciclo de desarrollo de estos organismos (fase I y II); la variación se detecta relativamente fácil por dos principales propiedades, la adsorción de colorantes y la producción de antibióticos (Akhurst *et al.*, 1980), sin embargo, solo la fase I ha sido detectada en la naturaleza y tanto el momento como la extensión del cambio de fase es en gran medida impredecible, a pesar de ello se sabe que la

tasa de cambio de la fase I a la fase II es generalmente mayor que la inversa (Boemare *et al.*, 2006).

4. Variación fenotípica en *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*

Aunque el papel de las dos variantes fenotípicas no se comprenden en su totalidad, se ha reportado que estas variantes no presentan diferencias significativas en cuanto a su actividad insecticida (Akhurst *et al.*, 1980), sin embargo la variante secundaria (fase II) no es capaz de soportar el desarrollo del nematodo y presenta ciertas características morfológicas (Tabla 1), en ese sentido se sugiere que la variante secundaria esta mejor adaptada para sobrevivir fuera del nematodo (Joyce *et al.*, 2011), esto a pesar de que en la naturaleza las bacterias entomopatógenas solo se han encontrado en sus respectivos hospederos. Esta doble estabilidad de formas se ha considerado como una gran estrategia de las bacterias que les permitiría sobrevivir a cambios en su entorno (Joyce *et al.*, 2011).

Las bacterias aisladas de nematodos en la etapa infectiva (Larvas *dauer* o IJ) se denominaron fase I, estas colonias son mucoides, producen moléculas antibióticas, adsorben colorantes cuando estos se colocan en el agar, mientras que la fase II aparece espontáneamente durante el periodo de crecimiento estacionario del cultivo *in vitro*, así como en el cultivo de nematodos con dieta artificial. Las colonias de la fase II no son mucoides, no adsorben colorante y no producen antibióticos. Existen también variaciones entre las fases, las variantes de la fase I suministran y protegen nutrientes esenciales para los nematodos al matar y metabolizar al insecto y producir una variedad de agentes antimicrobianos (Forst *et al.*, 1997). Las variantes de la fase II también son capaces de matar al insecto y colonizar a sus respectivos nematodos hospederos, pero son menos efectivas para proporcionar condiciones de crecimiento y nunca se han encontrado asociados con nematodos de origen natural, asimismo algunas variantes de la fase II de *Photorhabdus* pueden ser perjudiciales para *Heterorhabditis* (Akhurst *et al.*, 1980; Boemare *et al.*, 2006).

Además de las variantes mencionadas anteriormente, se han descrito otras formas particularmente en *P. luminescens*, la forma P (patógena) y M (mutualista), la forma P es patógena y es capaz de producir una gran cantidad de metabolitos secundarios, la forma M solo es capaz de colonizar a los nematodos en un periodo

denominado transmisión, estas formas son reversibles entre sí a través de una región promotora río arriba de un grupo de genes llamados *mad* (maternal adhesion fimbriae) (Somvanshi *et al.*, 2012).

Por otra parte, a pesar de las similitudes, las simbiosis *Photorhabdus-Heterorhabditis* y *Xenorhabdus-Steinernema* son en gran medida divergentes y se interpreta que estas simbiosis utilizan diferentes mecanismos para mantener asociaciones superficialmente similares, estas similitudes en sus patrones de infectividad, ciclo de vida y mutualismo con nematodos deben ser consideradas como el resultado de una convergencia evolutiva debido a que las características simbióticas, patógenas y de variación de fase no implican necesariamente los mismos mecanismos fisiológicos (Boemare *et al.*, 2006).

Debido a lo anterior se reconoce a estos dos géneros y se les da una importancia más allá de sus asociaciones con los nematodos debido a propiedades particulares entre ellas la actividad exo-enzimática y puntualmente a producción de metabolitos secundarios (Gaugler, 2002).

Tabla 1. Características de la variabilidad fenotípica en *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*.

Características de la colonia	Fase I	Fase II
Morfología	Mucoide	Liso
Mucosa	+	-
Pigmentación	+	- O diferente
Adsorción de colorantes		
Motilidad	+	-
Flagelos	+	-
Fimbria (o pili)	+	-
Aglutinación de hemocitos de insectos	+	-
Aglutinación de eritrocitos	+	-

<i>Actividad enzimática y metabolitos secundarios</i>	+	-
<i>Actividad enzimática respiratoria</i>	-	+
<i>Bioluminiscencia</i>	+	-
<i>Producción de antibióticos</i>	+	-
<i>Lectinasa</i>	+	-
<i>Proteasas</i>	+	-

5. Metabolismo secundario en *Photorhabdus*

Photorhabdus y *Xenorhabdus* muestran un extenso metabolismo secundario durante la fase post-exponencial del crecimiento, esto permite a las bacterias realizar una asociación simbiótica con el nematodo hospedero, proporcionándole condiciones para un crecimiento y desarrollo óptimo (Clarke, 2016), los productos de estos BGC (biosynthetic gene cluster) son moléculas pequeñas, frecuentemente policétidos (PK) o péptidos no ribosomales (NRP) además de bacteriocinas, sideróforos y ácidos grasos (Tobias *et al.*, 2016).

Por lo tanto, uno de los resultados de mayor interés que derivan de la investigación sobre la biología de la simbiosis de los nematodos entomopatógenos y sus bacterias asociadas es el descubrimiento de una gran diversidad de sustancias químicas producidas por estas bacterias simbiotas, particularmente metabolitos secundarios (Hinchliffe *et al.*, 2010). Un ejemplo de ello es la evasión del sistema inmune de los insectos, que le permite a *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* multiplicarse dentro del huésped y migrar a sus sitios específicos de colonización, siendo uno de los puntos más críticos en la etapa de infección y se logra mediante la liberación de una gran variedad de toxinas y metabolitos secundarios, cabe señalar que en el momento que se publicó el genoma de *P. luminescens* TT01 se determinó que codificaba para más toxinas que cualquier otro genoma bacteriano conocido hasta ese momento (Duchaud *et al.*, 2003), lo mismo ocurre en otras cepas tanto de *Photorhabdus* como

Xenorhabdus en donde se puede encontrar hasta el 6.5% de sus genomas dedicados exclusivamente a productos naturales (NP), esto es comparable a otros organismos productores de una gran cantidad de metabolitos secundarios como *Streptomyces* o *Myxobacteria*. En general podríamos mencionar que la producción de productos naturales puede agruparse en tres categorías principales: combatir y escapar del sistema inmune de insectos, protección del hospedero muerto contra competidores (bacterias, hongos, nematodos) y comunicación célula-célula (Shi *et al.*, 2018).

Un ejemplo de NP producidos por *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* son los RXPs (*Rhabdopéptido/Xenortido-péptidos*), que están compuestos de dos a ocho aminoácidos, estructuralmente la valina es el aminoácido más frecuente, seguido de fenilalanina y leucina (Reimer *et al.*, 2013). Los análisis de genómica comparativa sugieren que los RXPs-BGC solo se encuentran en estas dos bacterias y codifican de dos a tres NRPS (péptidos sintetasa no ribosomales) monomodulares, en donde cada módulo contiene un dominio de condensación, uno de adenilación, uno de metiltransferasa y un dominio de tiolación o PCP (Reimer *et al.*, 2014). Las RXPs se producen en gran medida durante la infección, mostrando actividad contra los hemocitos del insecto, sin embargo, aún no se sabe con exactitud la función específica, se sugiere que actúan inhibiendo cascadas de señalización importantes como la cascada de serina proteasas, repercutiendo en la vía de la profenoloxidasa y resultando en una inhibición del sistema inmune del insecto (Reimer *et al.*, 2014). Otro ejemplo importante de NP son los antibióticos, debido a que el cadáver de los insectos en el suelo es rico en nutrientes, estos se deben proteger de competidores para que los nematodos puedan completar su ciclo de vida, por lo que es normal que varios metabolitos se hayan identificado a partir de bacterias entomopatógenas que son activas contra hongos, protozoos y otras bacterias, todas muy abundantes en el suelo que rodea el cadáver del insecto (Tobias *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2018). Uno de los primeros antibióticos identificados a partir de *X. nematophila* son las xenocumacinas, derivadas de una vía híbrida de NRPS/PKS, actúan como inhibidores de la biosíntesis de proteínas bacterianas; presenta una biosíntesis bastante compleja en donde se producen pro-fármacos inactivos llamados

proxenocumacinas que son activadas por una peptidasa específica (XcnG) en el compuesto activo xenocumacina (Reimer *et al.*, 2009).

Otro producto natural con actividad antibiótica son las fabclavinas que presentan una biosíntesis combinada entre NRPS, PKS y una sintetasa de ácidos grasos poliinsaturados; todos los metabolitos de poliamina conocidos muestran una actividad antimicrobiana de amplio espectro, tanto en bacterias como en eucariotas (Fuchs *et al.*, 2014). Por lo tanto, los derivados de la poliamina podrían ser considerados como factores de virulencia y en *Xenorhabdus* como barrera de amplio espectro contra competidores de suministros alimenticios. Por otro lado, la familia de depsipéptidos (xenematidos) de *X. nematophilia* muestra una actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Lang *et al.*, 2008), la producción de este producto natural se sobreexpresa en un medio en donde se simula a la hemolinfa con un alto contenido de L-prolina (Crawford *et al.*, 2010). En cuanto a su biosíntesis la maquinaria de NRPS acepta tanto fenilalanina como triptófano, resultando en los cuatro posibles derivados de esta molécula y dando un ejemplo de producción de librerías peptídicas (Lang *et al.*, 2008). Por último, los péptidos antimicrobianos-xenorhabdus (PAX), se aislaron de *X. nematophilia* y su BGC se identificó en varias cepas de *Xenorhabdus* (Fuchs *et al.*, 2011). Sin embargo, varían en la presencia de arginina o lisina como segundo aminoácido, así como diferencias en las cadenas del grupo acilo. Muestran actividad contra hongos patógenos de humanos y plantas, por lo que se sugiere que protegen el cadáver del insecto contra estos competidores de recursos (Gualtieri *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2011).

5.1 Metabolitos secundarios involucrados en la simbiosis Bacteria-Nematodo

Al secuenciar el genoma de *Photorhabdus* se identificaron diferentes genes que codifican proteínas insecticidas, enzimas hidrolíticas (proteasas, lipasas y quitinasas, entre otras) derivadas principalmente de PKSs, NRPSs e híbridos de PKS-NRPS que podrían estar involucradas en procesos del complejo ciclo de vida que presenta esta bacteria con su hospedero entomopatógeno *Heterorhabditis*

(Bode, 2009). La interacción entre *Photorhabdus* y *Heterorhabditis* concuerda con la fase post-exponencial del desarrollo de la bacteria en el insecto, además esta interacción también coincide con la activación del metabolismo secundario de *Photorhabdus* (Hu *et al.*, 2000; Joyce *et al.*, 2011), por lo tanto, surge una interrogante acerca de ¿Qué tan importante es el metabolismo secundario en este tipo de interacciones? es probable que la manifestación más clara del rol del metabolismo secundario dentro de estas interacciones se de en la variación fenotípica de *Photorhabdus* (Akhurst, 1980). Dentro de estas dos variantes (I y II), la primaria presenta un metabolismo secundario normal siendo patógena para insectos y es capaz de favorecer el crecimiento y desarrollo del nematodo. La variante secundaria no produce antraquinona (AQ), ni estilbena (importantes para el desarrollo del nematodo) y aunque esta variante es patógena no es capaz de favorecer el crecimiento y desarrollo del nematodo, por lo que se ha propuesto que la variante primaria es importante para poder establecer la asociación simbiótica (Clarke, 2016). Sin embargo, solo se ha detectado un metabolito secundario que tiene un papel directo en la relación simbiótica, el estilbena (Joyce *et al.*, 2008). Mutantes incapaces de producir estilbena no son capaces de respaldar la recuperación de los IJ a adultos hermafroditas, esta molécula actúa como antibiótico y como inhibidor de la respuesta inmune del insecto a través de una inhibición de la fenoloxidasas (Eleftherianos *et al.*, 2007; Joyce *et al.*, 2008), lo que sugiere que funciona como una molécula señal que es requerida para el crecimiento y desarrollo normal del nematodo hospedero. Esto hace que el estilbena tenga un papel clave tanto en la relación simbiótica como en la patogenicidad (Joyce *et al.*, 2008).

Como sucede en *Photorhabdus*, en la fase primaria de *Xenorhabdus* se produce una importante variedad de metabolitos secundarios, algunos de ellos presentan actividad antimicrobiana. En *Xenorhabdus* se han caracterizado cuatro grupos químicos: derivados de indol, xenorhabdinas, xenorxidos y xenocoumacinas (XCNs) (Boemare *et al.*, 2006; Bode, 2009) siendo el último grupo producido por híbridos de PKS/NRPS. A pesar de que algunos de estos compuestos tienen estructuras simples, se ha descrito que presentan una gran diversidad en cuanto a su actividad biológica. Además, también se ha sugerido que los XCNs podrían ser de gran

importancia en *Xenorhabdus* debido a que presentan un complejo mecanismo de regulación que consiste en varias unidades transcripcionales, similar al que se presenta en la regulación de la biosíntesis de estilbeno en *Photorhabdus* (Bode, 2009).

5.2 Metabolitos secundarios involucrados en la patogenicidad

Durante la respuesta inmune en las células de insectos ocurre fagocitosis y nodulación (una forma de encapsulación de organismos patógenos que invaden la hemolinfa, incluyendo nematodos y bacterias), además también presentan una respuesta inmune humoral que involucra la producción de péptidos antimicrobianos y una cascada proteolítica que lleva a la activación de la vía de fenoloxidasa a través de la cascada de serina proteasas (Casanova & Goodrich, 2013) por lo que las bacterias y nematodos necesitan evadir estos mecanismos de alguna manera.

Los RXP (Rhabdopéptidos/Xenortidos) son una clase de péptidos lineales que están compuestos por 2-8 aminoácidos, en el C-terminal los residuos más comunes son feniletilamina, triptamina, triamina y agmatina, los análisis genómicos han revelado que los BGC de RXP solo se encuentran en *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* y codifican de dos a tres NRPS monomodulares y cada una presenta un dominio de condensación, un dominio de adenilación, un dominio metiltransferasa y un dominio de tiolación (Cai *et al.*, 2017). Hasta ahora se conocen cerca de 60 miembros de esta clase de NRPS, desde el punto de vista bioquímico la diversidad de estos péptidos es resultado de la promiscuidad de los dominios de adenilación que son capaces de incorporar a la cadena peptídica tanto valina como leucina, los dominios de metiltransferasa generan distintos patrones de n-metilación y los dominios de condensación que pueden aceptar aminas distintas a las cuatro mencionadas anteriormente, además de lo anterior la diversidad estructural puede aumentar aún más debido al entrecruzamiento de subunidades de NRPS codificados por BGC de RXP diferentes, debido a esto se considera que son la clase más grande de péptidos producidos por NRPS (Cai *et al.*, 2017). En cuanto a su actividad biológica, son principalmente producidos durante la infección del insecto y muestran actividad contra los hemocitos del insecto (Reimer *et al.*, 2013) y se ha sugerido que tienen

como blanco la cascada de serina proteasas, al frenar esta cascada impide que el sistema inmune del insecto pueda actuar de forma eficiente (Shi *et al.*, 2018).

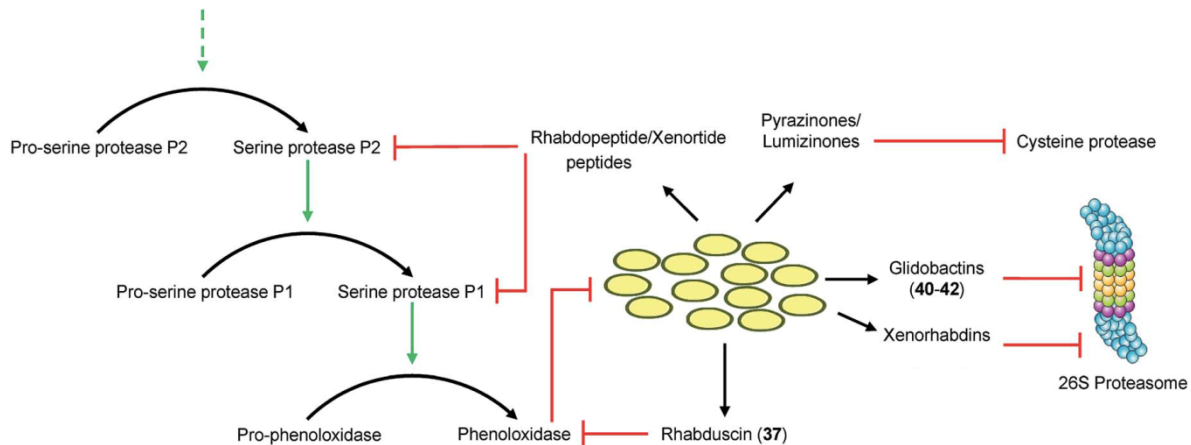


Figura 2. Esquema de la posible función de distintos metabolitos secundarios en la respuesta inmune de insectos. Las líneas rojas indican inhibición, mientras que las líneas verdes indican producción. Tomado y modificado de Shi y Bode, 2018. Otro de los metabolitos secundarios involucrados en la patogenicidad es la rhabduscina (Fig. 2), un inhibidor de la fenoloxidasas que se ha encontrado en la mayoría de las cepas de *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*, esta molécula se ha localizado en la superficie celular de la bacteria, lo anterior en conjunto con su actividad contra la fenoloxidasas sugieren que actúa como una molécula de defensa perimetral en contra del sistema inmune del insecto (Crawford *et al.*, 2012). Otras moléculas importantes en la patogenicidad, son las glidobactinas que son sintetizadas por un híbrido de NRPS-PKS, se conocen mejor de *Burkholderia* y *Pseudomonas*, sin embargo, el BGC también está conservado en cepas de *Photorhabdus* en donde podrían actuar como factores de virulencia ya que inhiben el proteosoma eucariótico (Stein *et al.*, 2012) que es importante en la degradación de proteínas, además de que participa en la degradación de represores de las cascadas de señalización de la respuesta inmune, otra clase de moléculas que tienen como blanco al proteosoma son las xenorhabdinas y sus derivados oxidados (xenoroxidos) (Shi *et al.*, 2018).

6. Péptidos no ribosomales

Los péptidos sintetetasas no ribosomales (NRPS, por sus siglas en inglés: *non ribosomal peptide synthetases*) son catalizadores multimodulares de un tamaño considerable, que utilizan reacciones región-específicas que ensamblan numerosos péptidos con una gran diversidad estructural y funcional (Finking *et al.*, 2004). Entre estos péptidos podemos incluir a más de 20 fármacos comerciales como antibióticos (penicilina, vancomicina), compuestos antitumorales (bleomicina) así como inmunosupresores (ciclosporina). Por lo que los péptidos no ribosomales representan una gran variedad de compuestos biológicamente activos. Esta actividad biológica tan diversa puede explicarse por la forma en que estas moléculas son sintetizadas, ya que estas moléculas se producen en el metabolismo secundario de bacterias y hongos por medio de la condensación consecutiva de aminoácidos, esto a través de enzimas multimodulares (NRPS) (Finking *et al.*, 2004).

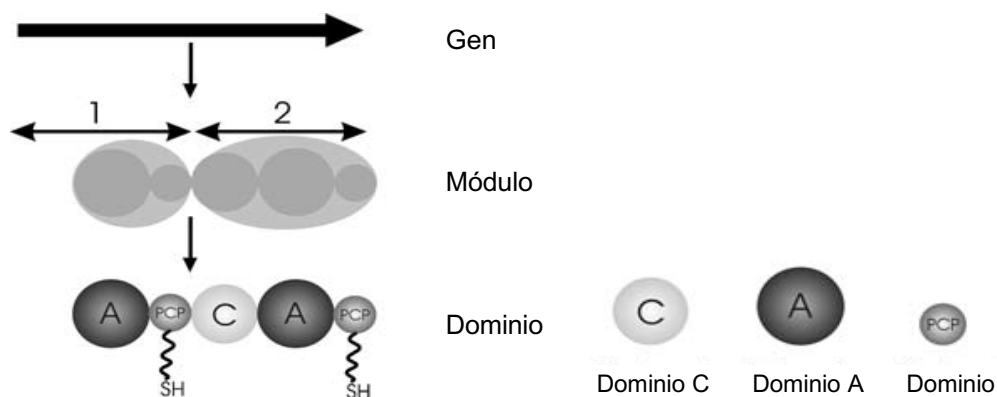


Figura 3. Esquema de módulos de NRPSs y dominios, C de condensación, A de adenilación y PCP de transporte. Tomado y modificado de Finking *et al.*, 2004.

Particularmente este proceso no se limita a los 20 aminoácidos comúnmente encontrados en las proteínas de origen ribosómico, en este caso se han identificado cerca de 500 monómeros diferentes, entre ellos aminoácidos que no están presentes en las proteínas (D-aminoácidos), ácidos grasos y alfa-hidroxiácidos como componentes principales de los péptidos no ribosomales, estos componentes no proteicos contribuyen a la versatilidad estructural de estas moléculas y sustancialmente a la actividad biológica observada (Schwarzer *et al.*, 2003; Finking *et al.*, 2004; Süssmuth *et al.*, 2017).

La versatilidad presente en las NRPS se da por una serie de secciones modulares distintas (Fig. 3) y cada uno de estos módulos es responsable de la incorporación de un monómero definido en el producto peptídico final; los módulos se dividen en dominios catalíticos de los cuales tres son los dominios ubicuos en la síntesis de péptidos no ribosomales que son esenciales para el alargamiento del péptido. Estos dominios son responsables de la activación de los aminoácidos (dominios de adenilación (A), los dominios PCP por sus siglas en inglés *Peptidyl Carrier Protein* que representan la unidad de transporte que acepta al aminoácido activado y los dominios C que representan la condensación de los aminoácidos; otra unidad catalítica esencial en la síntesis de estas moléculas es el dominio tioesterasa (TE) que cataliza la liberación de péptidos por hidrólisis (Süssmuth *et al.*, 2017).

La lógica química para el ensamble de péptidos no ribosomales es que un pequeño conjunto de unidades monoméricas se incorporan en un oligómero lineal mediante pasos de condensación química repetitiva; los monómeros son unidades de acilo, con el grupo carboxilo activado por nucleófilos. En el caso de los monómeros, estos son aminoácidos proteogénicos, aminoácidos no proteogénicos y otros ácidos carboxílicos (Fischbach *et al.*, 2006).

El paso inicial en la síntesis de péptidos no ribosomales ocurre en los dominios PCP (Fig. 4) que son modificados (activados) en un paso que se denomina “priming” (Schwarzer *et al.*, 2003), este dominio también llamado dominio de tiolación (Dominio T) representa la unidad de transporte permitiéndole a los aminoácidos activados y a los intermediarios de la elongación moverse entre los centros catalíticos, el prerequisite para la correcta funcionalidad de PCP es su modificación con el cofactor 4'-fosfopanteteína (4'PP) a través del reconocimiento de residuos de serina conservados, quedando la *holo*-forma activa como HS-4'PP-PCP (Finking *et al.*, 2004).

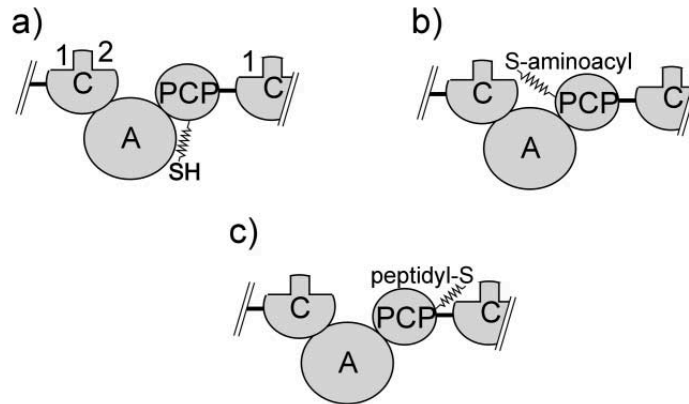


Figura 4. Mecanismo de síntesis de módulos de NRPSs y dominios A, C y PCP Tomada de Schwarzer *et al.*, 2003.

Posteriormente la holoenzima HS-4'PP-PCP se carga a través de los dominios de adenilación (A) que se encargan de la selección y activación de los aminoácidos que son utilizados como sustratos con consumo de ATP, los aminoácidos y péptidos se unen covalentemente al tiol libre del cofactor 4'PP, la formación del primer enlace peptídico entre el aminoácido unido al primer módulo y el módulo adyacente se denomina "iniciación". Debido a que las NRPSs no se restringen solo a aminoácidos, existen otras proteínas de transporte para la incorporación de compuestos, por ejemplo, de ácidos carboxílicos. La reacción análoga en la síntesis ribosomal se lleva a cabo mediante un aminoacil-tRNA sintetasa, sin embargo, estas enzimas no comparten relación a nivel estructural ni de secuencia (Fischbach *et al.*, 2006; Strieker *et al.*, 2010; Süßmuth *et al.*, 2017).

Por último, la formación del enlace peptídico en la biosíntesis de estas moléculas se lleva a través del dominio C (dominio de condensación), el aminoacil-S-4'PP-PCP y el peptidil-S-4'PP-PCP del módulo N-terminal adyacente sirven como sustratos. Debido a que la formación de enlaces peptídicos es la reacción central de la síntesis de péptidos no ribosomales los dominios C se encuentran en casi todos los módulos de alargamiento de NRPS. En todos los pasos adicionales de elongación la cadena creciente de aminoácidos se entrega a los módulos posteriores hasta que el producto lineal llega al PCP del último módulo que corresponde a la terminación, en este punto, en el intermedio lineal ocurre una

reacción de ciclación y liberación que es catalizada por el dominio Te, este paso final regenera al NRPS para una nueva ronda de síntesis mientras que el producto peptídico se puede modificar posteriormente mediante enzimas adicionales como las glicosil transferasas (Fischbach *et al.*, 2006; Strieker *et al.*, 2010).

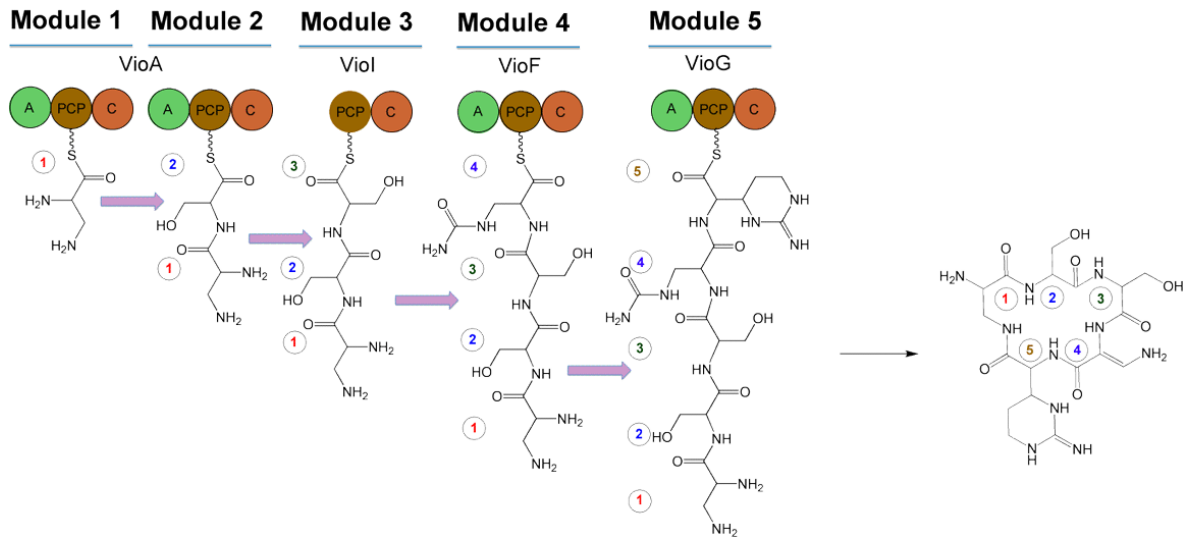


Figura 5. Biosíntesis de viomicina, presenta 5 módulos y 3 dominios A, C y PCP.

7. Actividad biológica de péptidos no ribosomales

- **Estilbenos:** los estilbenos son una clase de compuestos generalizados en plantas, sintetizados por policétido sintetasas (PKS) tipo III. El Isopropilstilbeno es el primer y único estilbeno conocido que es producido por bacterias, concretamente por *P. luminescens*. La biosíntesis del Isopropilstilbeno requiere de dos operones *stiABCDE* y *bkdABC*; se consideran compuestos multipotentes ya que presentan actividades antibacterianas, antifúngicas y nematocidas, además funcionan como moléculas de señalización necesarias para la recuperación de la etapa de juvenil infeccioso a etapas adultas en el desarrollo de *Heterorhabditis* (Joyce *et al.*, 2008).
- **Pepteridinas A y B:** Son metabolitos heterocíclicos que a menudo sirven como cofactores activadores redox, representan los primeros metabolitos

reportados en ser sintetizados por una vía híbrida de NRPS-pteridina. Algunos análisis indican que el represor transcripcional HexA regula la biosíntesis de pepteridines y a su vez estas moléculas pueden modular la producción de moléculas involucradas en quorum sensing, además estos compuestos solo se producen en la forma patogénica de las bacterias, por lo que podría estar relacionada en la regulación de la toxicidad de *P. luminescens* (Park *et al.*, 2017).

- Rhabdopéptido/Xenortido (RXPs): Son una clase de péptidos lineales producidos por NRPS y compuestos por dos a ocho aminoácidos, son exclusivos de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, a la fecha son la clase más grande de péptidos no ribosomales con más de 60 miembros identificados, desde el punto de vista bioquímico, la diversidad química se da por parte de la promiscuidad de los dominios de adenilación ya que son capaces de agregar tanto valina como leucina y los dominios metiltransferasa (MT) que generan diferentes patrones de metilación. Estas moléculas se producen principalmente durante la infección al insecto y muestran actividad contra los hemocitos de insectos, se sugiere que actúan inhibiendo la cascada de serina proteasa afectando directamente a la respuesta inmune del insecto, además muestran actividad en contra de *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma brucei* (Reimer *et al.*, 2013).
- Lumizinonas: se especula que las lumizinonas son compuestos inmunomoduladores en insectos, basados en la actividad contra la calpaína, una enzima que pertenece a la superfamilia de cisteína proteasas implicada en la activación de la vía de señalización inflamatoria dependiente de NFκB (Park *et al.*, 2016).
- Glidobactinas: son una clase de NRPS-PKS citotóxicos, se conocen en *Burkholderia* y *Pseudomonas* pero también se conservan en cepas de *Photorhabdus* donde se consideran factores de virulencia. Este compuesto inhibe el proteosoma eucariota, que es una parte importante de la maquinaria de control de calidad de proteínas y se requiere adicionalmente en la degradación de los represores de la cascada de la respuesta inmune de

insectos, actúa uniéndose de manera irreversible al sitio activo de la subunidad proteolítica (Bian *et al.*, 2012).

- Sideróforos: Recientemente se demostró que los sideróforos de la clase de mixoquelinas son inhibidores de la vía de lipoxigenasa, por lo que se tiene la hipótesis de que no solo actúan como sideróforos sino también como inhibidores de la vía antes mencionada en insectos, además de que se ha descrito que también presentan actividad antibacteriana (Schieferdecker *et al.*, 2015).
- Tilivallina: induce apoptosis e interrumpe la función de la barrera epitelial, es producida por *Klebsiella oxytoca*, pudiendo ser el causante de colitis, se ha identificado en *Xenorhabdus* y se especula que actúa de forma similar en el intestino del insecto (Schneditz *et al.*, 2014).
- Xenocoumacinas: es una de las primeras clases de antibióticos identificados a partir de *Xenorhabdus*, son derivados de una vía híbrida de NRPS-PKS, se tiene la hipótesis de que actúan inhibiendo la biosíntesis de proteínas bacterianas, su biosíntesis es considerablemente compleja debido a que se producen profármacos inactivos que posteriormente son activados y debido a que las xenocoumacinas también son activas contra *Xenorhabdus* se requiere transformarlas en compuestos menos activos (Reimer *et al.*, 2009).
- Fabclavinas: se aislaron y caracterizaron a partir de bacterias del género *Xenorhabdus*, se biosintetizan mediante módulos de NRPS y una sintetasa de ácidos grasos poliinsaturados, las moléculas relacionadas están involucradas con actividad contra bacterias y células eucariotas, incluyendo hongos, oomicetos, plantas y nematodos, esto podría darse debido a sus efectos generales sobre la integridad de membranas, por lo que son considerados protectores de amplio espectro contra todo tipo de competidores de alimento (Masschelein *et al.*, 2015).
- Nematofinas: A diferencia de las fabclavinas, estas moléculas son altamente selectivas contra *Staphylococcus aureus*, bioquímicamente deriva de una NRPS que está relacionada estrechamente con RXPs (Li *et al.*, 1997).

- Depsipéptidos: son una familia de compuestos producidos por *Xenorhabdus*, muestran actividad antibiótica contra bacterias Gram + y Gram – y su producción está regulada de forma positiva en presencia en medio imitador de hemolinfa (Lang *et al.*, 2008)
- Odilorhabdinas: son producidos por NRPS presentes en el genoma de *Xenorhabdus nematophila*, exhibe actividad antibacteriana de amplio espectro, actuando en contra de la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano, una vez en contacto interactúan con el RNAt y RNAr estimulando una codificación errónea en el sistema de traducción, son de los candidatos más prometedores para el desarrollo de nuevos fármacos debido a que han sido probados en infecciones en modelos animales (Pantel *et al.*, 2018).
- Surfactina: es un péptido producida por una NRPS de bacterias del género *Bacillus*, exhibe un amplio rango de interacciones con membranas celulares por lo que tiene un amplio potencial para distintas aplicaciones médicas, tiene efectos antifúngicos y antibacterianos, induce la formación de canales iónicos en membranas, además de actividades antivirales y antitumorales, se considera importante ya que es una molécula prometedora para el desarrollo de una nueva generación de antibióticos (Seydlová *et al.*, 2008)

8. Genómica estructural para la identificación de productos naturales

Los metabolitos secundarios, también llamados productos naturales son precursores de una gran cantidad tanto de medicamentos como moléculas de gran importancia en la agricultura, además de jugar un rol importante en la investigación científica relacionada con la biología celular y molecular (Weber, 2014).

Por lo tanto, el hecho de que en los genomas bacterianos existe una gran cantidad de grupos de genes que codifican la producción de estas moléculas ha generado un cambio de paradigma en cuanto a la investigación de estos metabolitos secundarios en los últimos diez años, debido a esto la minería genómica se ha vuelto una herramienta importante como complemento de los procesos de descubrimiento de nuevas moléculas (Medema *et al.*, 2011; Weber, 2014; Blin *et*

al., 2017). Este cambio fue fundamentalmente generado por el desarrollo y disponibilidad de varias herramientas bioinformáticas, como software enfocados en la minería de genomas que se basa en la información contenida en el genoma para la evaluación del potencial genético de los microorganismos para producir nuevos compuestos (metabolitos secundarios), este enfoque utiliza como pasos la identificación de hipotéticos grupos de genes en el genoma para posteriormente utilizar esta información en la predicción de productos sintetizados por las enzimas que codifican estos grupos de genes, para poder realizar estos pasos se necesitan herramientas especializadas, un ejemplo de ello es antiSMASH (antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell) (Medema *et al.*, 2011).

Tabla 2. Herramientas para la minería de genomas e identificación de metabolitos secundarios.

Herramienta	Sitio web
antiSMASH	http://antismash.secondarymetabolites.org
BEAGEL3	http://bagel2.molgenrug.nl/
CLUSEAN	https://bitbucket.org/antismash/clusean
MIDDAS-M	http://133.242.13.217/MIDDAS-M/
PKMiner	http://pks.kaist.ac.kr/pkminer/
SMURF	http://jcvi.org/smurf/index.php

Gracias a las herramientas mencionadas anteriormente se ha logrado analizar los genomas de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* que emplean una gran cantidad de recursos a la producción de metabolitos secundarios debido a que estas moléculas podrían ser una característica importante que ayudo al establecimiento del nicho actual de estas bacterias (Tobias *et al.*, 2016; Tobias *et al.*, 2017). Por otra parte, este tipo análisis genómicos también ha permitido determinar el enriquecimiento y pérdida de genes desde la separación de ambos géneros con respecto a otras enterobacterias, para el caso de *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* de manera general la mayor ganancia se da en genes que están involucrados en la biosíntesis de

metabolitos secundarios (NP), mientras que los genes relacionados con metabolismo de nitrógeno y metabolismo de metales pesados se perdieron (Tobias *et al.*, 2017).

Particularmente en *Photorhabdus* se dio un enriquecimiento de genes involucrados en bioluminiscencia, componentes de membrana, biosíntesis de pilis y adhesión. En *Xenorhabdus* el enriquecimiento se ha observado en genes relacionados con recombinación de ADN, integración de ADN, procesos metabólicos de ADN y actividad de transposasa, lo que sugiere una mayor frecuencia de reordenamientos genómicos en este género (Tobias *et al.*, 2017). En cuanto a la divergencia de linaje, (entre *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*) ésta coincide con la aparición de genes, sin embargo, también con la pérdida de genes ancestrales que es más marcada en *Xenorhabdus*, además de que en forma general tiene un genoma más reducido con respecto a *Photorhabdus*, por lo que se sugiere que la reducción en el tamaño de genoma en *Xenorhabdus* es una consecuencia de una adaptación a nichos ecológicos particulares. Por lo tanto, además de la importancia de estas moléculas en el ciclo de vida tripartita que presentan estas bacterias, son de gran interés debido a que pueden ser precursores de varios compuestos con efectos biológicos como antimicrobianos o citotóxicos y compuestos con aplicaciones importantes en agricultura (Tobias *et al.*, 2017).

9. Justificación

Las bacterias entomopatógenas del género *Photorhabdus* presentan un potencial considerable en cuanto a la producción de metabolitos secundarios principalmente aquellos derivados de péptidos sintetizados no ribosomales.

En ese sentido, los análisis de genómica comparativa, podrían proporcionar información sobre el posible papel de las NRPS en estilo de vida especializado de *Photorhabdus* y por otra parte sobre el potencial biotecnológico de estos metabolitos debido a su actividad biológica, como antimicrobianos, inmunosupresores, citotóxicos e insecticidas.

10. Hipótesis

La diversidad de metabolitos producidos por péptido sintetizados no ribosomales se encuentra enriquecida debido al complejo estilo de vida que presenta *Photorhabdus luminescens HIM3*.

11. Objetivos

11.1. Objetivo general

Determinar la posible relación entre las NRPS y el estilo de vida de *Photorhabdus luminescens HIM3*

11.2. Objetivos particulares

- Identificar los BGC que codifican para NRPS en los diferentes genomas del género *Photorhabdus*.
- Generar una red de los BGC basada en similitud de secuencia.
- Determinar los BGC de *Photorhabdus luminescens HIM3* que estén potencialmente involucrados en la producción de metabolitos relacionados con simbiosis, patogenicidad, producción de péptidos antimicrobianos y la regulación del metabolismo.

12. Materiales y Métodos

12.1. Determinación de grupos de genes biosintéticos

Para la detección de los BGC se utilizó la herramienta antiSMASH 5.0 que es un software para la identificación y análisis de agrupaciones de genes relacionados con la producción una amplia variedad de metabolitos secundarios (Fig. 6), esta herramienta se puede ejecutar desde un servidor web (Medema *et al.*, 2011)

The screenshot displays the antiSMASH web interface. At the top, the header reads "antiSMASH antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell". Below this, a "Select Gene Cluster:" section shows a row of 25 numbered buttons, with button 10 selected. The main content area is titled "Cluster 10 - Nrps" and includes a "Gene cluster description" section with a genomic map and a legend for biosynthetic, transport-related, regulatory, and other genes. The "Detailed annotation" section lists genes SCO3227 through SCO3249, each with a corresponding gene model diagram. On the right, the "Predicted core structure" section shows a chemical structure and a "Prediction details" section with monomers prediction and NRPSPredictor2 SVM results for ser, thr, and asp.

Figura 6. Captura de pantalla de antiSMASH. Los círculos con numeración muestran los diferentes grupos de genes identificados en el genoma, en la parte inferior se muestran los dominios de los productos genéticos.

(<https://antismash.secondarymetabolites.org>) o como una versión independiente en una computadora de escritorio, se puede realizar con el número de acceso de GeneBank o con un fichero en formato FASTA. La lógica que utiliza antiSMASH para identificar BGC es detectar los perfiles de modelos ocultos de Markov (pHMM)

en la secuencia de los genes y utilizar dominios conservados que son típicos de enzimas implicadas en la producción de metabolitos secundarios (Blin *et al.*, 2017).

12.2. Análisis de redes (BiG-SCAPE)

BiG-SCAPE es un software de código abierto escrito en python y está disponible en <https://git.wageningenur.nl/medema-group/BiG-SCAPE>. BiG-SCAPE utiliza los grupos de genes biosintéticos predichos por antiSMASH o anotados en la base de datos MIBiG (The Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster) como archivos de entrada para generar redes de similitud de secuencia que posteriormente agrupa como familias. Utiliza la combinación de tres índices, el índice de Jaccard para medir la similitud del contenido del dominio, un índice de adyacencia para medir cuantos pares de dominios contiguos se comparte entre BGC y finalmente un índice de similitud de secuencias.

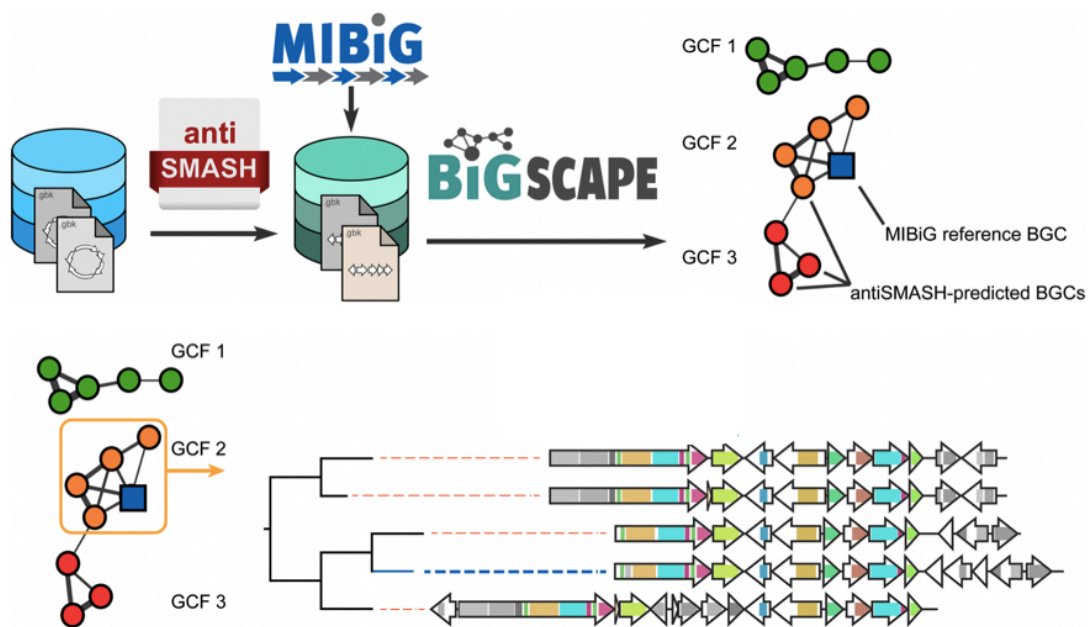


Figura 7. Flujo de trabajo (BiG-SCAPE), antiSMASH utiliza los genomas como archivos de entrada, posteriormente identifica los BGC que son los archivos que BiG-SCAPE utiliza para generar una red basada en similitud de secuencias.

Índice de Jaccard: es un coeficiente de todos los tipos de dominios compartidos dividido por el número total de tipos de dominios distintos:

$$JI_{AB} = \frac{N'_A \cap N'_B}{N'_A \cup N'_B}$$

Donde $N_{A(B)}$ es el número total de dominios en el BGC A (B) y $N'_{A(B)}$ es el número total de dominios distintos en el BGC A (B).

Índice de adyacencia: es un coeficiente de todos los distintos pares de dominios compartidos dividido por el número total de distintos tipos de dominios

$$AI_{AB} = \frac{P'_A \cap P'_B}{P'_A \cup P'_B}$$

Donde $P'_{A(B)}$ son todos los diferentes tipos de pares de dominios adyacentes en BGC A (B), e.g.:

$$P'_A = \{(D_A[n], D_A[n + 1]) \mid n \in \{0, 1, 2, \dots, |D_A| - 1\}\}$$

Similitud de secuencia: es la puntuación que considera las similitudes de secuencia para cada tipo de dominio.

$$DSS = 1 - DSS_d$$

Donde DSS_d es la disimilitud de secuencia de dominio. Esto se divide en dos subcomponentes $DSS_d = c_1 DSS_a + c_2 DSS_{na}$. El primer componente es para los dominios “ancla” que son una lista de dominios a los que se les puede dar un peso especial (contiene dominios conocidos “ancla”, por ejemplo NRPS o PKS), mientras que el segundo componente, representa el resto de dominios *na*. Cada componente se calcula de la misma forma:

$$DSS_\alpha = \frac{1}{S_\alpha} sd(d_A, d_B), \quad DSS_{na} = \frac{1}{S_{na}} sd(d_A, d_B)$$

Donde $S_\alpha = \sum_{d \in \{\alpha\}} \max(N_A^d, N_B^d)$, d son todos los tipos de dominio distintos en el par que pertenecen a la lista de dominios ancla y $N_{A(B)}^d$ es el número de copias del dominio d en el BGC $A(B)$, sd es una función que toma todas las copias del dominio d en A y B y devuelve la suma del complemento de la similitud de secuencia ($1 - ss$, este último calculado con secuencias de dominio alineadas contra su perfil de hmm usando `hmmalign`) de las mejores copias coincidentes del mismo tipo de dominio. Para copias extra que no tienen coincidencia o dominios no compartidos, la función devuelve 1 (una diferencia completa). Finalmente, si existen dominios de cada tipo en el par, ambos subcomponentes se ponderan primero proporcionalmente al número total de dominios de cada tipo (incluidas las copias):

$$w_a = \frac{S_a}{S_a + S_{na}}, \quad w_{na} = \frac{S_{na}}{S_a + S_{na}}$$

12.3 Análisis pangenómico

Con el fin de determinar si las NRPS corresponden al genoma núcleo o genoma accesorio dentro del género *Photorhabdus*, se realizó un análisis pangenómico utilizando los mismos genomas que anteriormente se usaron para el análisis de redes. Para ello se utilizó el programa `get_homologues` que utiliza tres métodos de agrupamiento, OMCL, COG y BDBH.

12.4 Mutagénesis

Para realizar la mutagénesis se utilizó un método de recombinación publicado por Datsenko & Wanner, 2000, este método se basa en recombinación dada por la homología de oligonucleótidos que flanquean el gen a mutar y es mediada por los genes de recombinación del fago λ (*exo*, *bet*, *gam*). En primer lugar, se generó mediante PCR el fragmento (gen de resistencia a kanamicina) que se introducirá en el genoma en lugar del gen a mutar, esto se realizó utilizando como molde el

plásmido pKD4 y utilizando los oligonucleótidos Phnrp-H1P1 y Phnrp-H2P2, que flanquean el gen blanco (Figura 18), en este caso el gen B5C26_RS18645.

Posteriormente se transformó a las células de *P. luminescens* HIM3 con el plásmido pKD119 el cual contiene los genes “Red” de recombinación del fago λ (*exo*, *bet*, *gam*) los cuales inducen la recombinación (**Figura 8**), después las células transformadas con el plásmido pKD119 se incuban con arabinosa para inducir la expresión de los genes de recombinación y finalmente las células se electroporan con el fragmento amplificado que contiene el gen de resistencia a kanamicina y gracias a los oligonucleótidos diseñados previamente que presentan homología con el gen blanco se logra generar la mutación introduciendo un marcador fenotípico como lo es la resistencia a kanamicina. Finalmente, con el fin de verificar que la mutación fue exitosa se verifica mediante una caracterización por PCR utilizando oligonucleótidos que amplifican regiones que corresponden al cromosoma y al gen insertado.

12.4.1 Preparación del producto de PCR

Para generar el fragmento de PCR se utilizaron los oligonucleótidos H1P1/H2P2 y DNA del plásmido pKD4 como molde (para el gen de resistencia a Kanamicina).

Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR:

Tabla 3. condiciones de PCR

5' a 95 °C	1 ciclo
1' a 95 °C	
1' a 56 °C	35 ciclos
2' a 72 °C	
10' a 72 °C	1 ciclo

Se prepararon 10 reacciones de 100 μ L c/u.

Se mezcló el contenido de los 10 tubos de PCR en 2 tubos de 1.5 mL, y posteriormente se realizó una extracción con 250 μ L de fenol y 250 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico, se recuperó la fase acuosa y se realizó una segunda extracción con 500 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico, se recuperó la fase acuosa y se agregó 1000 μ L de etanol absoluto y 0,3 M de acetato de potasio, posteriormente el ADN se dejó precipitando toda la noche a -20°C . Finalmente se lavó el pellet de ADN con 1000 μ L de etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 12 μ L de agua.

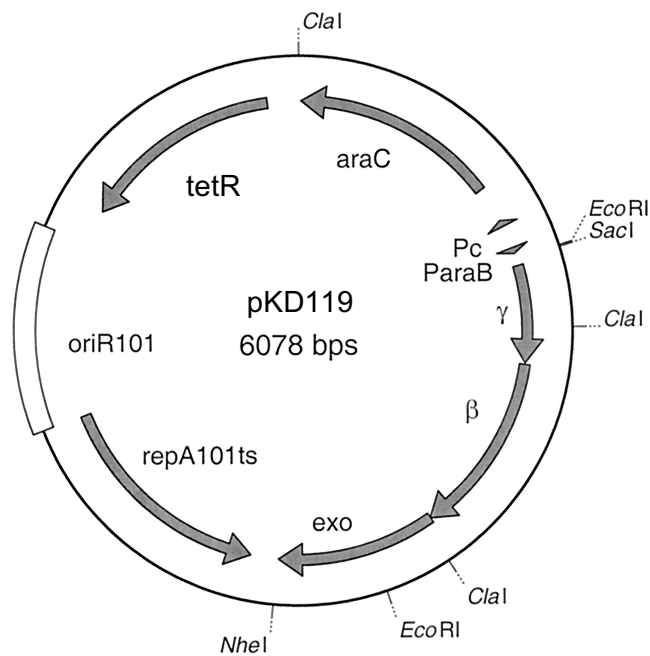


Figura 8. Plásmido pKD119 que contiene los genes *bet*, *exo*, *gam*, que son exonucleasas que inducen la recombinación.

12.5.2 Preparación de células competentes

Para preparar las células competentes, la cepa que se va a mutar se estiró con dos días de anticipación (la cual contiene el plásmido pKD119 que es el plásmido de expresión de la recombinasa Red), en placas de LB agar con ampicilina (50mg/mL) /tetraciclina (12mg/mL) ON a 30°C (Es importante comenzar con colonias frescas).

Después se inoculó una colonia en 5 ml de LB con ampicilina (50mg/mL) y se incubó ON a 30°C.

Posteriormente se inoculó 500 µL del pre-inoculó en 100 mL de medio SOB + 50 mg/ml de ampicilina + 12 mg/mL de tetraciclina + 7.5 mL de L-arabinosa 1M, se incubó a 30°C hasta una DO600 entre 0.6-0.7, después las células se centrifugaron 10 min a 8,000 rpm a 4°C y se lavaron 3 veces con 10 mL de glicerol al 10% frío, después del tercer lavado, se re-suspendió el pellet en 1000 µL de glicerol al 10% frío y se transfirió a un tubo de 1.5 mL, finalmente se centrifugó 3 min a 13,000 rpm y se re-suspendió en un volumen final de 360 µL.

12.4.3 Electroporación

Se electroporarán 60 µL de células competentes con 15 µL del fragmento de PCR previamente concentrado, se adicionó 1 mL de medio SOC y se dejó en recuperación a las células ON a 30°C, posteriormente se concentró a las células y plaquéó todas las células en cajas de LB/kanamicina (20 mg/mL) + ampicilina (50mg/mL) y se incubó a 30°C.

Después se seleccionó y estrió a las colonias que crecieron en placas de LB/kanamicina (30-40 g/mL) y se dieron dos pases más. Para perder el plásmido pKD119 es suficiente quitando la presión de selección (tetraciclina) o se puede incubar a 42 °C.

12.4.4 Caracterización por PCR

Para realizar la caracterización y determinar si la mutagénesis fue exitosa se colocó 1.5 mL de cultivo ON, tanto de las candidatas como de la cepa *wt*, en un tubo Eppendorff, se centrifugó 2 min a 13,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100 µL de agua, se incubó 20 min a 95°C y centrifugó 15 min a 13,000 rpm.

Posteriormente se realizaron reacciones de PCR, para verificar la localización del “caset”, en un volumen final de 25 a 50 µL utilizando como molde 2 µL del sobrenadante de las células, tanto de las candidatas como de la cepa *wt* y los juegos de oligos:

1. F/R
2. F/K1
3. K2/R

13. Resultados

13.1. Potencial biosintético de metabolitos secundarios en bacterias simbiotes de nematodos entomopatógenos

Para determinar el potencial biosintético de *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* se utilizó antiSMASH, que es una herramienta para identificar grupos de genes biosintéticos relacionados con una amplia variedad de metabolitos secundarios. Se analizaron 51 genomas (Tabla 3 y Fig. 8) correspondientes a bacterias con diferentes estilos de vida: simbiotes de plantas, vida libre, endófitos, simbiotes de nematodos, patógenos de insectos, patógenos de humanos, simbiotes de insectos, patógenos de plantas y marinas. El análisis se realizó con los archivos genbank (gbk) que fueron obtenidos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), posteriormente se utilizó la plataforma antiSMASH, que detectó 1396 grupos de genes biosintéticos organizados en diferentes clases de los cuales 223 corresponden a péptido sintetasas no ribosomales.

Los organismos que tuvieron el mayor potencial en la producción de metabolitos secundarios fueron las cepas de *Streptomyces*, que durante mucho tiempo han sido estudiadas por ser una fuente importante de moléculas de interés médico como antibióticos, antitumorales, inmunosupresores, entre otras. Las cepas de *Streptomyces* incluidas en el análisis tienen un estilo de vida libre, simbiotes de plantas, endófitos y marinos, además la mayor parte de BGC fueron clasificados como putativos seguido de policetido sintetasas.

A pesar de lo anterior el género *Streptomyces* no fue el que mostró el mayor potencial biosintético en cuanto a péptido sintetasas no ribosomales, los géneros *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* son los que tienen un mayor potencial de producción de estos complejos multienzimáticos (NRPS). Esto podría ser un indicio de la importancia que tienen en estos organismos. De los BCG detectados en cepas de

Tabla 4. Lista de organismos utilizados para comparar el potencial

Organismo	Estilo de vida	Organismo	Estilo de vida
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Simbionte de plantas	<i>Xenorhabdus vietnamensis</i> strain DSM 22392	Simbionte de nematodos
<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	Simbionte de plantas	<i>Xenorhabdus szentirmai</i> strain US123	Simbionte de nematodos
<i>Streptomyces alboflavus</i> MDJK44	Simbionte de plantas	<i>Xenorhabdus poinarii</i> G6	Simbionte de nematodos
<i>Streptomyces albireticuli</i> strain MDJK11	Simbionte de plantas	<i>Xenorhabdus nematophila</i> ATCC 19061	Simbionte de nematodos
<i>Streptomyces albus</i> CCRC 11814	Vida libre/suelo	<i>Xenorhabdus beddingii</i> 4764	Simbionte de nematodos
<i>Streptomyces coelicolor</i> A32	Vida libre/suelo	<i>Xenorhabdus japonica</i> DSM 16522	Simbionte de nematodos
<i>Streptomyces chartreusis</i> NRRL 12338	Vida libre/suelo	<i>Xenorhabdus ehlersii</i> DSM 16337	Simbionte de nematodos
<i>Streptomyces tsukubensis</i> NRRL 18488	Vida libre/suelo	<i>Xenorhabdus bovienii</i> SS-2004	Simbionte de nematodos
<i>Streptomyces lividans</i> 1326	Vida libre/suelo	<i>Xenorhabdus szentirmai</i> DSM 16338	Simbionte de nematodos
<i>Streptomyces cavourensis</i> TJ430	Vida libre/suelo	<i>Photobacterium temperata</i> J3	Simbionte de nematodos
<i>Streptomyces scabrisporus</i> DSM 41855	Endofito	<i>Chromobacterium subtsugae</i> MWU3525	Patógenos de insectos
<i>Streptomyces scabrisporus</i> NF3	Endofito	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	Patógenos de insectos
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Endofito	<i>Brevibacillus laterosporus</i> LMG 15441	Patógenos de insectos
<i>Microvirga</i> sp.	Endofito	<i>Salmonella enterica</i> CT18	Patógenos de humanos
<i>Photobacterium temperata</i> Meg1	Simbionte de nematodos	<i>Klebsiella pneumoniae</i> HS11286	Patógenos de humanos
<i>Photobacterium luminiscens</i> HIM3*	Simbionte de nematodos	<i>Yersinia pestis</i> CO92	Patógenos de humanos
<i>Photobacterium temperata</i> subsp. <i>thracensis</i> DSM 15199	Simbionte de nematodos	<i>Photobacterium asymbiotica</i> ATCC43949	Patógenos de humanos
<i>Photobacterium heterorhabditis</i> VMG	Simbionte de nematodos	<i>Serratia symbiotica</i> str. <i>Tucson</i>	Simbiontes de insectos
<i>Photobacterium temperata</i> strain <i>Hm</i>	Simbionte de nematodos	<i>Regiella insecticola</i> LSR1	Simbiontes de insectos
<i>Photobacterium australis</i> DSM 17609	Simbionte de nematodos	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCR11043	Patógenos de plantas
<i>Photobacterium temperata</i> subsp. <i>temperata</i> M1021	Simbionte de nematodos	<i>Streptomyces abyssalis</i> SCSIO 10390	Marino
<i>L9 mayor 500</i>	Simbionte de nematodos	<i>Streptomyces nanshensis</i> strain SCSIO 01066	Marino
<i>Alcaligenes faecalis</i> MOR02	Simbionte de nematodos	<i>Streptomyces nanshensis</i> SCSIO M10372	Marino
<i>L4 mayor 500</i>	Simbionte de nematodos	<i>Streptomyces oceani</i> 02100	Marino
<i>xn mayor 500</i>	Simbionte de nematodos	<i>Streptomyces abyssalis</i> SCSIO 10389	Marino
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain NA04*	Simbionte de nematodos		

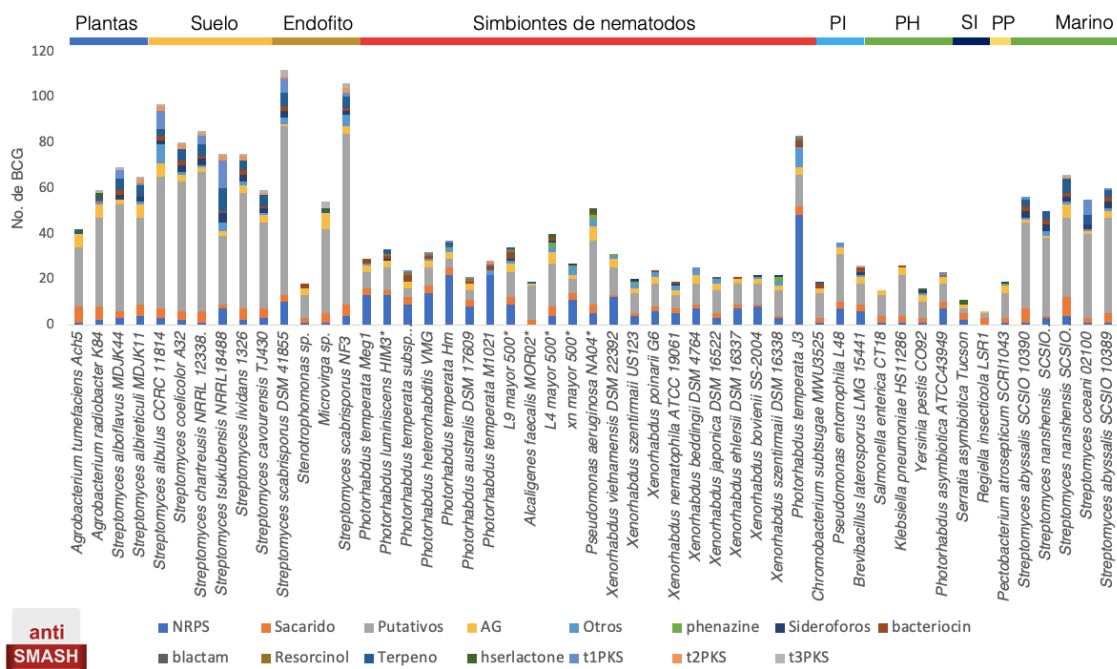


Figura 9. Diversidad de metabolitos secundarios y potencial metabólico de los 51 organismos analizados. Simbiontes de planta, suelo/vida libre, endófito, simbiontes de nematodos, patógenos de insectos (PI), patógenos de humanos (PH), simbiontes de insectos (SI), patógenos de plantas (PP) y marino.

Xenorhabdus se identificaron algunos que ya han sido reportados, por ejemplo, péptidos de la familia de las xenocoumacinas, que son antimicrobianos solubles en agua, son activos contra bacterias Gram –, Gram + y varias especies de hongos, estos péptidos están compuestos por un residuo de arginina, un residuo de leucina y cuatro unidades de acetato las cuales forman un anillo (Park *et al.*, 2009).

Por otra parte, también se identificó una de las familias más diversas de péptidos no ribosomales, los rhabdopéptidos que son una clase de péptidos lineales que están compuestos por dos a ocho aminoácidos, estructuralmente la valina es el aminoácido más abundante seguido de fenilalanina y leucina, además presenta varios patrones de N-metilación, se conocen más de 60 miembros pertenecientes a 51 cepas distintas (Cai *et al.*, 2017).

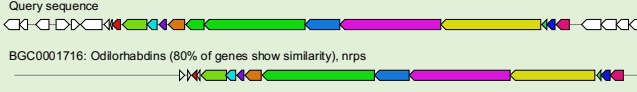
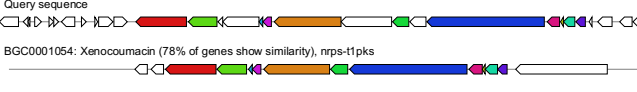
Region	Type	From	To	Most similar known cluster		Similarity
Region 2.1	NRPS	9,276	68,838	Taxillaid	NRPS	4%
Region 3.1	bacteriocin	127,513	138,436			
Region 4.1	terpene	6,156	29,788	Carotenoid	terpene	66%
Region 5.1	NRPS	34,828	95,841			
Region 6.1	CDPS	73,044	103,849			
Region 7.1	terpene	57,227	78,321			
Region 11.1	NRPS, T1PKS	153,302	210,229	Luminmycin	nrps-t1pks	100%
Region 11.2	thiopeptide	419,658	445,758	O-antigen	saccharide	14%
Region 18.1	NRPS	1	39,953	Bicornutin	NRPS	100%
Region 22.1	NRPS	130	46,796	Luminmide	NRPS	100%
Region 22.2	NRPS	148,282	227,019	Odilorhabdins	NRPS	80%
Region 22.3	betalactone	328,182	353,682			
Region 27.1	NRPS	1	32,066	Tolaasin	NRPS	66%
Region 31.1	NRPS	1	25,052	Rhizomide A / rhizomide B / rhizomide C	NRPS	100%
Region 33.1	NRPS, T1PKS	12,387	73,964	Yersiniabactin	nrps-t1pks	4%
Region 33.2	NRPS, transAT-PKS	111,188	187,388			
Region 33.3	resorcinol	235,049	276,197	Isopropylstilbene	other	100%
Region 43.1	NRPS	1	5,473	Xenotetrapeptide	NRPS	100%
Region 44.1	T1PKS, NRPS	231,460	307,189	Xenocoumacin	nrps-t1pks	78%
Region 53.1	NRPS	1	2,788	Bicornutin	NRPS	100%
Region 55.1	NRPS	9,543	59,120	Turnerbactin	NRPS	23%
Region 55.2	NRPS	78,657	167,715	Colicin V	ripp	2%
Region 63.1	NRPS	1	1,330	Luminmide	NRPS	100%
Region 66.1	siderophore	69,464	93,928	Desferrioxamine E	other	75%

Figura 10. Potencial metabólico de *Photorhabdus luminescens* HIM3, se muestra la clase de metabolito y el porcentaje de similitud a otros BGC que ya han sido elucidados experimentalmente.

Otro péptido no ribosomal que se identificó fue la tilivalina que se ha encontrado en genomas de *Xenorhabdus*, la biosíntesis la lleva a cabo una NRPS que en un principio se detectó en *Klebsiella oxytoca* (Schneditz *et al.*, 2014). También se identificó un derivado de glidobactinas, la luminmicina que está involucrada en la inhibición del proteosoma eucariota que es una parte fundamental de la degradación de proteínas y también participa en la degradación de represores de la cascada de respuesta inmune en insectos (Kleino *et al.*, 2014). Por otra parte, también se identificaron péptidos no ribosomales en *Pseudomonas aeruginosa NA04*, uno de ellos es la pioquelina, un sideróforo que en *Pseudomonas* es considerado como factor de virulencia (Brandel *et al.*, 2012). Finalmente, el L-2-amino-4-methoxy-trans-3- ácido butenoico que es un potente antibiótico y toxina (Lee *et al.*, 2010). Particularmente para la cepa *Photorhabdus luminiscens HIM3* se identificaron 24 metabolitos que pertenecen a nueve distintas clases: NRPS, bacteriocinas, tiopéptidos, betalactonas, resorcinoles, policétidos, terpenos, sideróforos e híbridos NRPS-PKS, cabe destacar que 12 de ellos corresponden a NRPS de las cuales cuatro presentaban porcentajes altos de similitud con respecto a otros BGC que ya han sido caracterizados (Tabla 5).

Tabla 5. BGC identificados en *Photorhabdus luminiscens HIM3* que han sido caracterizados experimentalmente.

Nombre	Funciones	BGC de HIM3 vs BGC de MiBIG	% de Similitud (antiSMASH)
Luminmycina	Inhibidor de proteosoma (Servatius <i>et al.</i> , 2019)	<p>Query sequence</p> <p>BGC0000383: Luminmycin (100% of genes show similarity), nrps-t1pks</p>	100%
Luminmida	Desconocido	<p>Query sequence</p> <p>BGC0001128: Luminmide (100% of genes show similarity), nrps</p>	100%

Odilorhabdinas	Actividad antibacteriana (Pantel <i>et al.</i> , 2018)	<p>Query sequence</p>  <p>BGC0001716: Odilorhabdins (80% of genes show similarity), nrps</p>	80%
xenocoumacina	Antimicrobiano (Park <i>et al.</i> , 2009)	<p>Query sequence</p>  <p>BGC0001054: Xenocoumachin (78% of genes show similarity), nrps-11 pks</p>	78%

13.2. Análisis de redes por similitud de secuencia

Para el análisis de redes se utilizó el software de código abierto BiG-SCAPE (disponible en: <https://git.wageningenur.nl/medema-group/BiG-SCAPE/>) que utiliza los genomas secuenciados como archivos de entrada para posteriormente clasificarlos en grupos de genes biosintéticos. Se ocupan tres algoritmos combinados, el índice de Jaccard para determinar la similitud del contenido de los dominios, un índice de adyacencia que mide los pares de dominios vecinos que se comparten, y un índice de similitud de secuencia. Para el análisis se utilizaron BGC obtenidos a partir de los resultados del análisis de antiSMASH, además se compararon con la base de datos de MIBiG (<https://mibig.secondarymetabolites.org>) para determinar si existen similitudes con BGC que han sido caracterizados experimentalmente, finalmente el resultado es una red de similitud de secuencia y un árbol de las familias de BGC (Fig. 9,10,11) basado en la matriz de presencia/ausencia de diferentes familias de BGC. En la figura 11 se observa el resultado del análisis de redes, se muestran los BGC de interés que son dos familias de BGC la primera es un BGC cuyo “core” codifica una

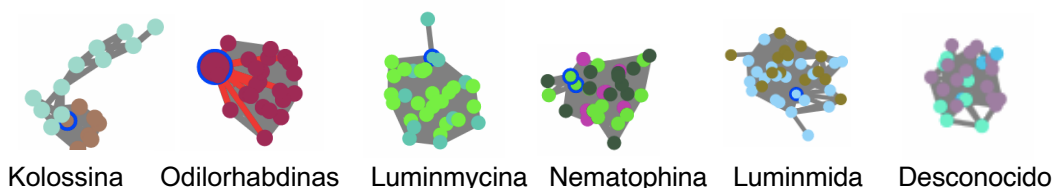


Figura 11. Análisis de redes basado en similitud de secuencia con BiG-SCAPE. Los BGC se agrupan en familias, se muestran las algunas familias de BGC que esta presentes en *Photorhabdus*.

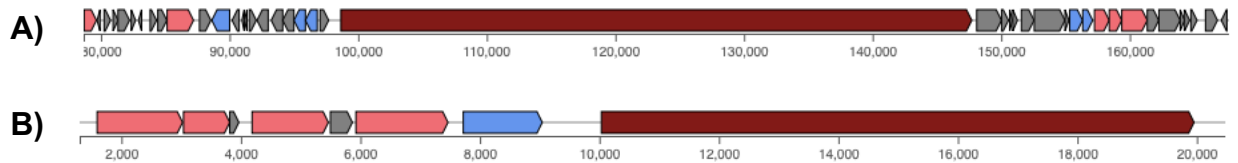


Figura 12. BGC propuestos para análisis posteriores. A) BGC que tiene una identidad de secuencia de 87% con el gen que codifica para kolosina. B) BGC que pertenece a una Familia desconocida presente en 15 cepas de *Photorhabdus*.

NRPS de quince módulos, con una longitud de 49 kb que corresponde al 1% del genoma de *P. luminescens* HIM3. Los análisis de similitud de secuencias demostraron que este gen tiene una identidad de secuencias de 87% con el gen *kol* reportado en *P. luminescens* TTO1, de acuerdo con los datos de MIBiG el producto de esta NRPS es una molécula llamada kolossina (Bode *et al.*, 2015).

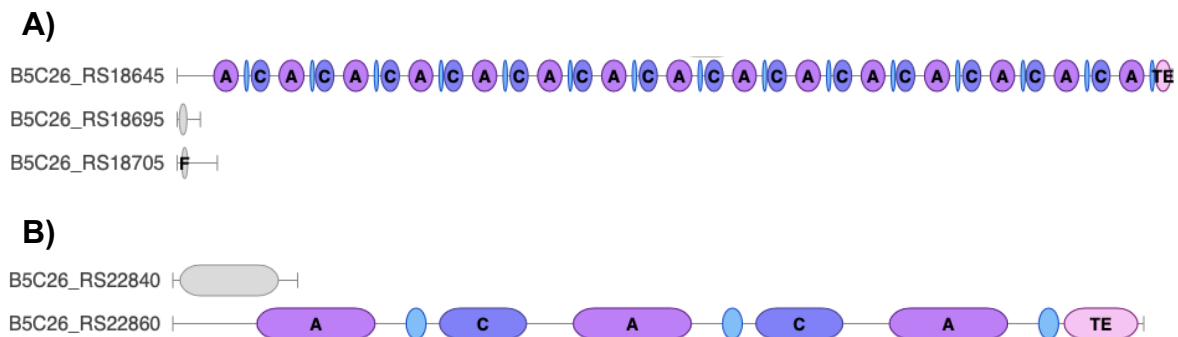
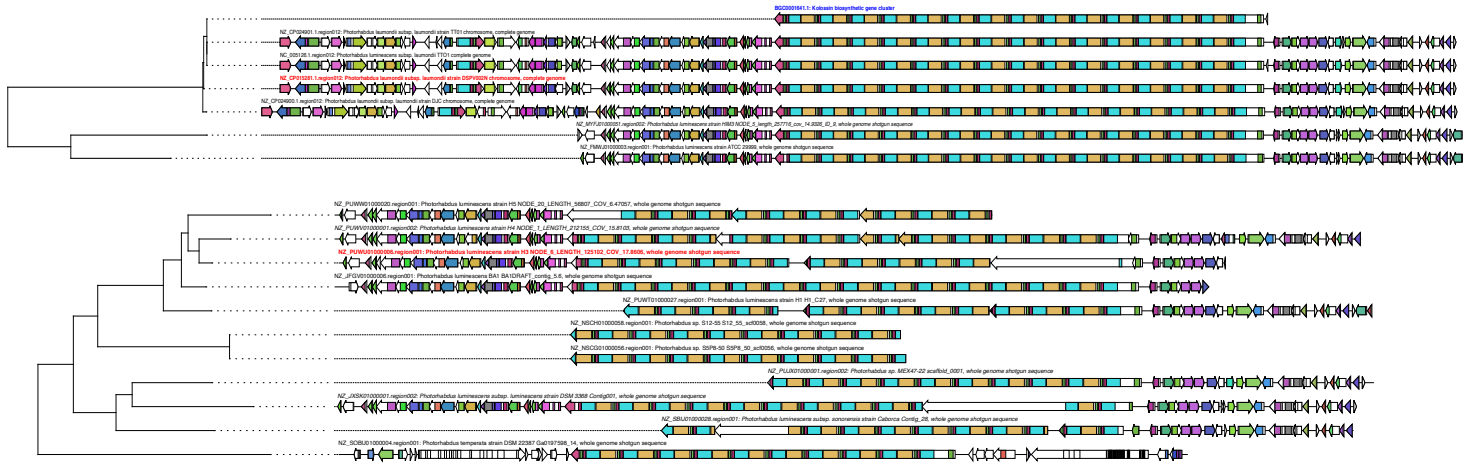


Figura 13. A) Organización de dominios del BGC (kolossin) en *Photorhabdus luminescens* HIM3. El gen B5C26_RS18645 codifica una NRPS que está conformada por 15 módulos. B) Organización de dominios del BGG (B5C26_RS22860) codifica una NRPS que está conformada por 3 módulos.

Por otro lado, se identificó a través de BiG-SCAPE que este BGC corresponde a una familia que está presente en al menos diecisiete cepas del género *Photorhabdus* sin embargo, solo siete de las diecisiete cepas presentan el BGC completo, en las otras diez cepas el gen que codifica a la NRPS está fragmentado, además este gen corresponde a la NRPS más grande reportada hasta la fecha.

Por otra parte, también se identificó otra familia de BGC que está presente en 15 cepas de *Photorhabdus* que corresponde a una NRPS de 9.9 kb, esta familia de BGC no presenta ninguna similitud con algún otro BGC caracterizado experimentalmente, sin embargo, al estar conservado en una cantidad considerable de cepas (15) existe la posibilidad de que juegue un papel importante.

A)



B)

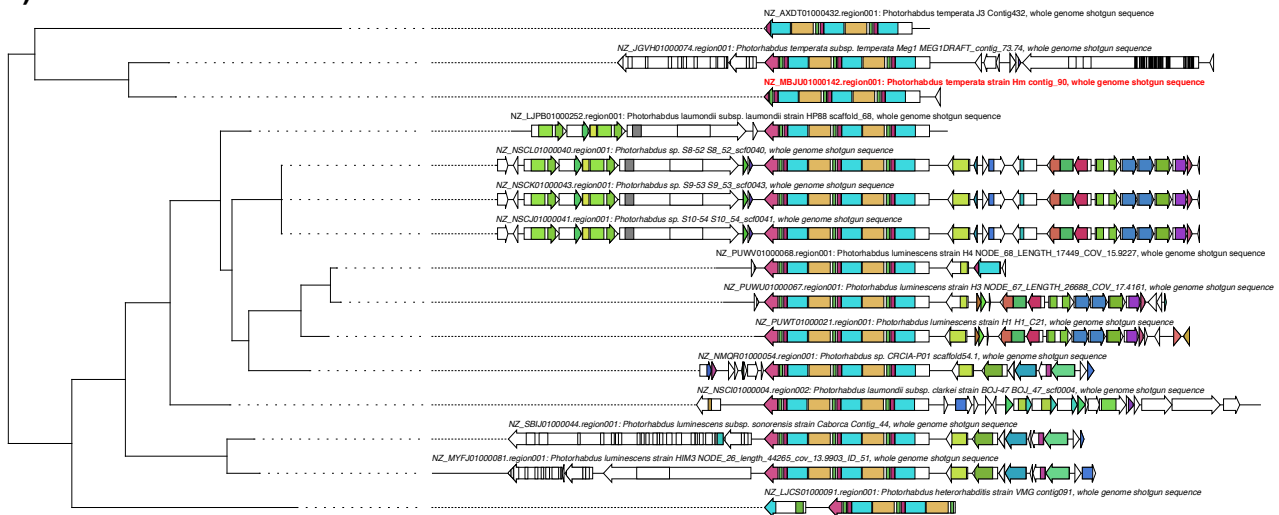


Figura 14. Árbol de los BGC propuestos para análisis experimental, se muestran en A) BGC que corresponde a “kolossin”. En B) se muestra una familia de BGC que no tiene relación con algún BGC conocido.

Finalmente, también se identificaron BGC que ya han sido caracterizados, algunos de ellos son odorhabinas, que se unen a la subunidad pequeña del ribosoma y ocasionan codificación errónea (Pantel *et al.*, 2018), luminmycina, que inhibe al proteosoma a través de una unión covalente en el sitio activo de la subunidad 20S (Yi *et al.*, 2018), nematophina, un antimicrobiano (Li *et al.*, 1997) y luminmida (actividad desconocida).

13.3 Pangenoma de *Photorhabdus*

Con el fin de determinar si las NRPS forman parte del genoma núcleo o el genoma accesorio se realizó un análisis pangenómico de 43 cepas del género *Photorhabdus* con el software `get_homologues` (Vinuesa *et al.*, 2013) disponible en: https://github.com/eead-csic-compbio/get_homologues. Se obtuvo el tamaño del genoma núcleo o genoma core (genes presentes en todas las cepas analizadas) y genoma accesorio, para ello se utilizó una cobertura mínima de alineación del 75%.

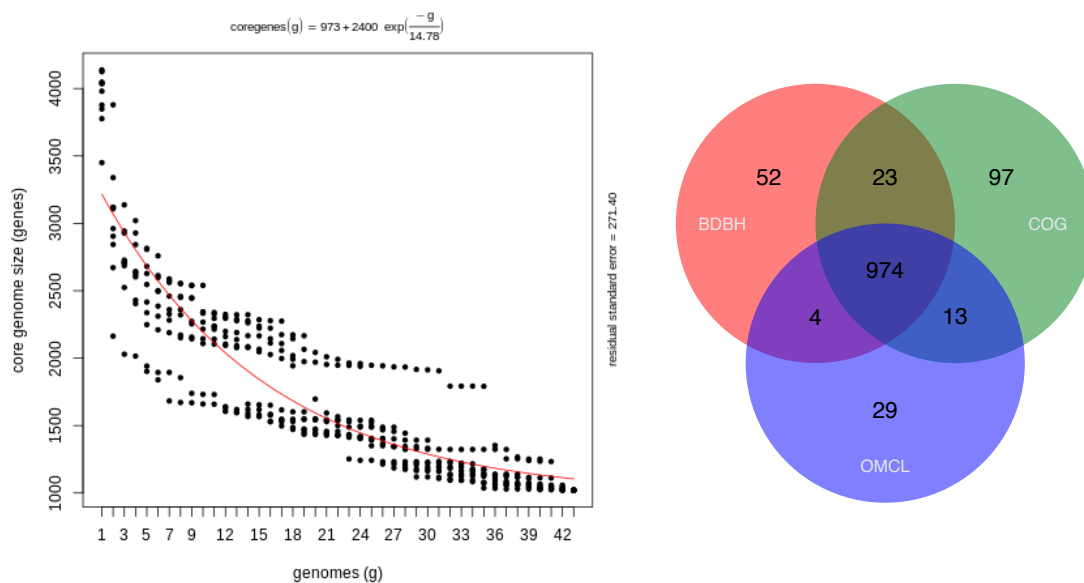


Figura 15. A) Estimación del tamaño del genoma núcleo ajustado al modelo de Tettelin *et al.*, 2008. B) Diagrama de Venn que muestra el consenso de ortólogos agrupados por los algoritmos BDBH, COG y OMCL para estimar el tamaño del genoma núcleo.

Esto se realizó con tres algoritmos diferentes de agrupamiento de genes ortólogos (BDBH, OMCL y COG) usando estos parámetros y empleando el script auxiliar *compare_clusters.pl* (permite al usuario trabajar con grupos consenso de los tres algoritmos) se determinó el tamaño del genoma núcleo que corresponde a 974 genes, el pangenoma fue calculado con dos algoritmos (COG y OMCL) y el consenso de ambos algoritmos fue 12676 genes que conforman el pangenoma de las 43 cepas de *Photorhabdus*. Posteriormente al estimar el tamaño del pangenoma y genoma núcleo se trazaron los modelos exponenciales de Tettelin *et al.*, 2008 (Figura 15 y 16).

Tabla 6. Distribución de NRPS dentro del pangenoma de *Photorhabdus*

	# NRPS	# PKS
Core	0	1
Soft-core	0	0
Shell	27	8
Cloud	58	3

De acuerdo con el modelo exponencial de Tettelin *et al.*, 2008 el pangenoma de las cepas analizadas de *Photorhabdus* es un pangenoma abierto, esto quiere decir que a medida que se agregan más genomas al análisis la cantidad de genes nuevos sigue aumentando. (Pangenoma: todos los genes presentes en un determinado grupo de organismos, genoma nube: genes únicos de cada especie, genoma núcleo: genes presentes en todos los organismos analizados)

Por otro lado, dentro del genoma nube se identificaron 58 NRPS, dentro del genoma shell se identificaron 27 NRPS y tanto en el genoma núcleo como en el soft-core no se identificaron NRPS, por otra parte, también se identificaron los PKs, en el genoma nube se identificaron 3 PKs, en el Shell se identificaron 8 PKs, en el Soft-Core se identificó 1 PKs y en el genoma núcleo se identificó 1 PKs.

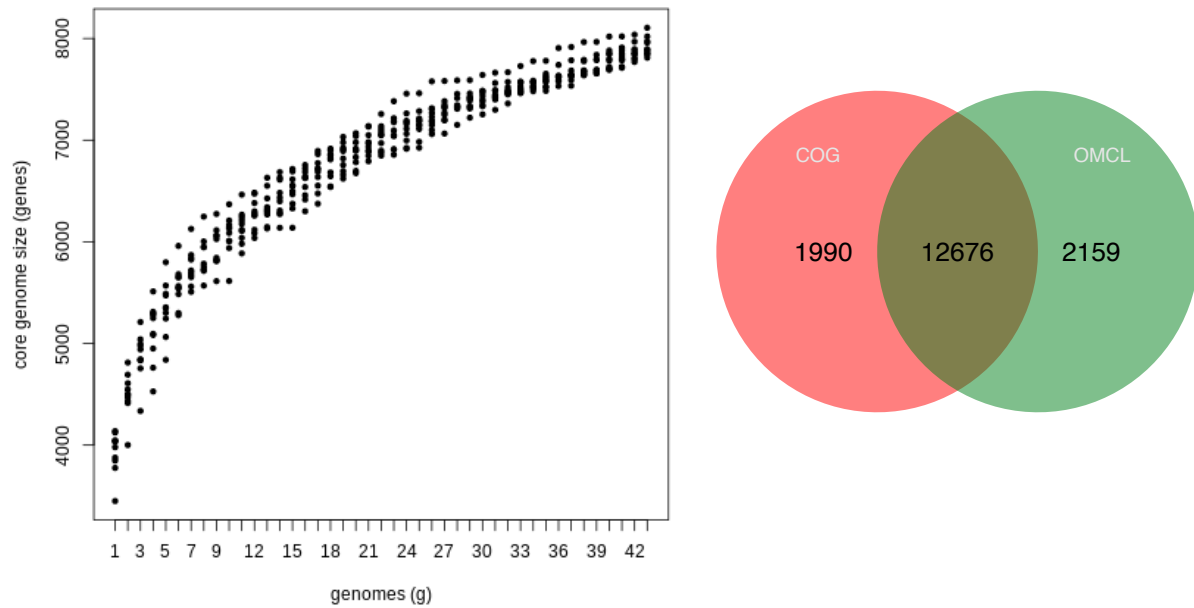


Figura 16. A) Estimación del tamaño del pangenoma ajustado al modelo de Tettelin *et al.*, 2008. B) Diagrama de Venn que muestra el consenso de ortólogos agrupados por los algoritmos COG y OMCL para estimar el tamaño del pangenoma.

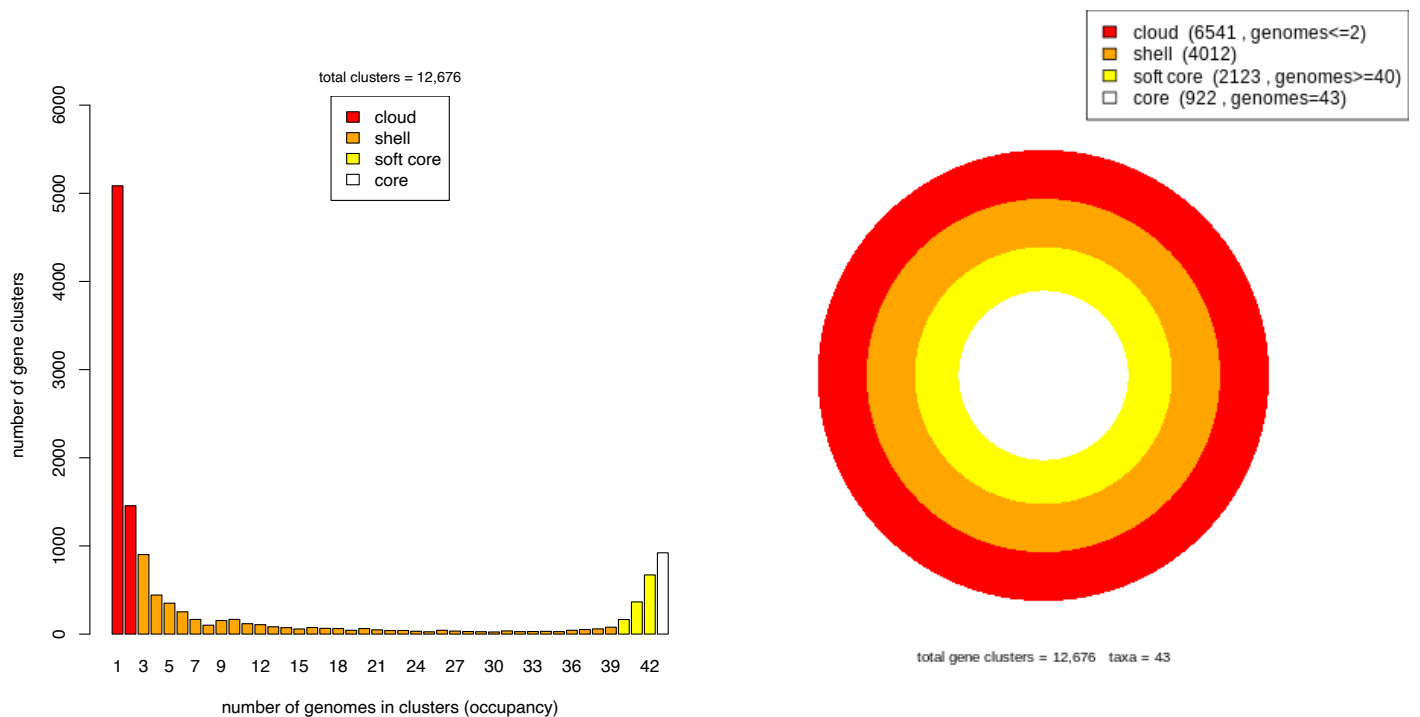


Figura 17. Estimación del tamaño del genoma “cloud” (genes únicos de cada especie) y “core” (genes que están presentes en todos los organismos incluidos en el análisis).

13.4 Delección del gen *Kol* en *P. luminescens HIM3*

13.4 Mutagénesis del gen *kol* de *Photorhabdus*

De acuerdo con los resultados anteriores se determinó que el gen B5C26_RS18645 (que presenta una identidad de secuencia de nucleótidos de 87% con el gen *kol*) de *P. luminescens HIM3* es uno de los candidatos para realizar mutagénesis y determinar si existe una relación entre esta NRPS y el establecimiento del complejo nematodo-bacteria.

Oligonucleótidos

Phnrp-H1P1 (80amero)

CTC TCA ATA GTT AAT CCG ATT ATC CTG CCT **ATG** TCG CTG ATT
GGG CAG ATT CGC AAC GGC **TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG**

Phnrp-H2P2 (80amero)

TGC CGG ATT ATC ATA CGG ATA TCA GAT CGT TTA GTC TCT TTG
AAC CTC CTC GTC ACA ACT **CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG**

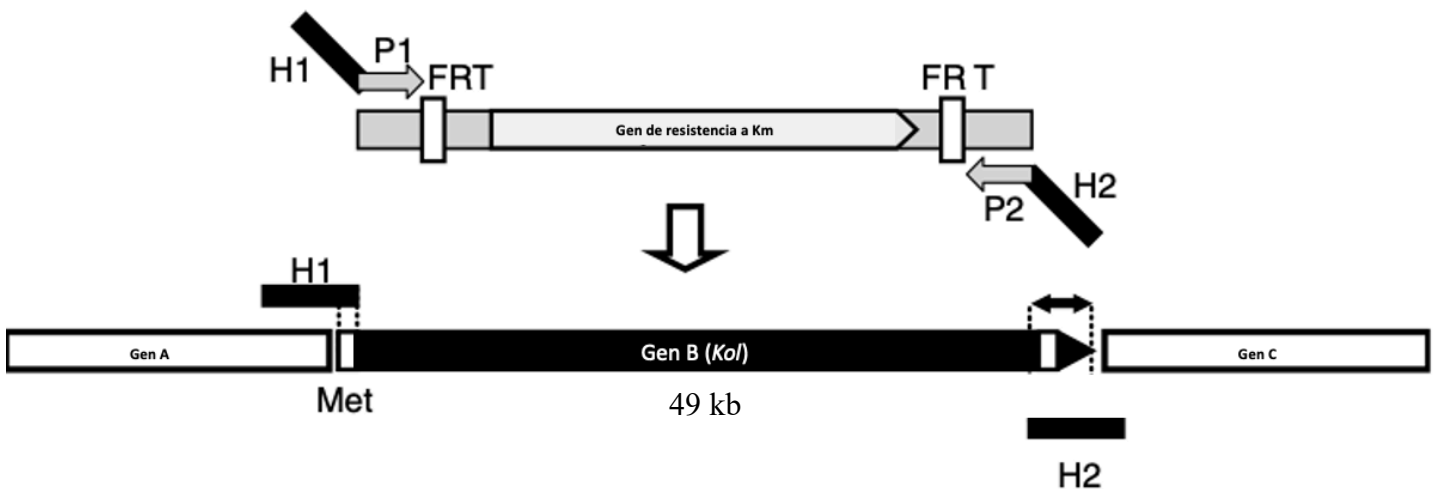


Figura 18. Oligonucleótidos utilizados para generar el producto de PCR utilizado para mutar el gen B5C26_RS18645 y regiones de homología.

Oligos	Tamaño del producto (Pb)
F/R	2,170
F/K1	870
F/Kt	1436
F/PS2	1850
K2/R	1200
PS1/R	1800

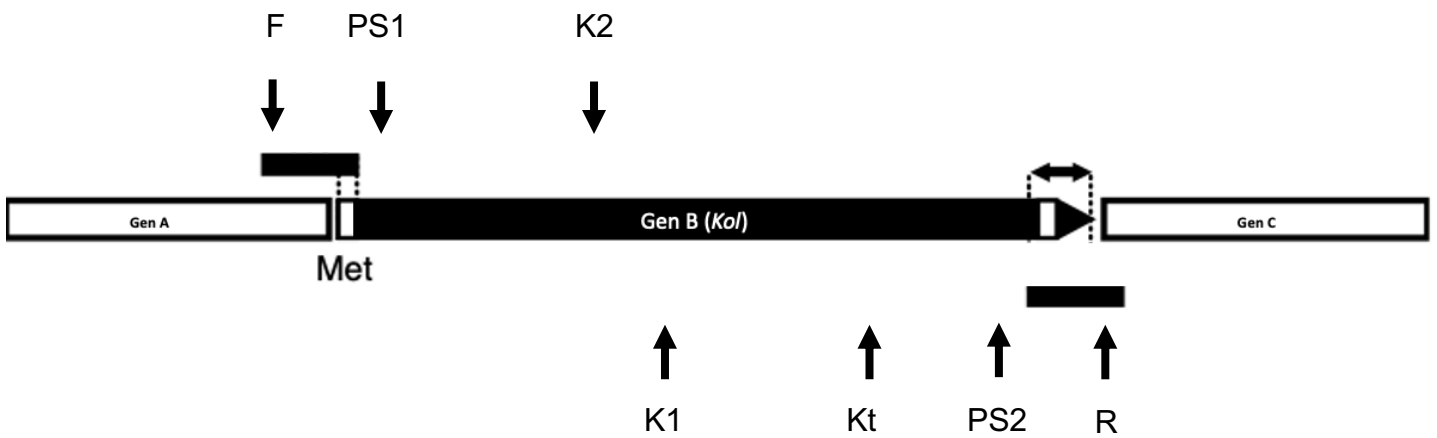


Figura 19. Esquema de la posición de los oligonucleótidos y el tamaño de fragmentos esperados para confirmar la mutante de *P. luminescens* *HIM3* Δ *nrp::Km*.

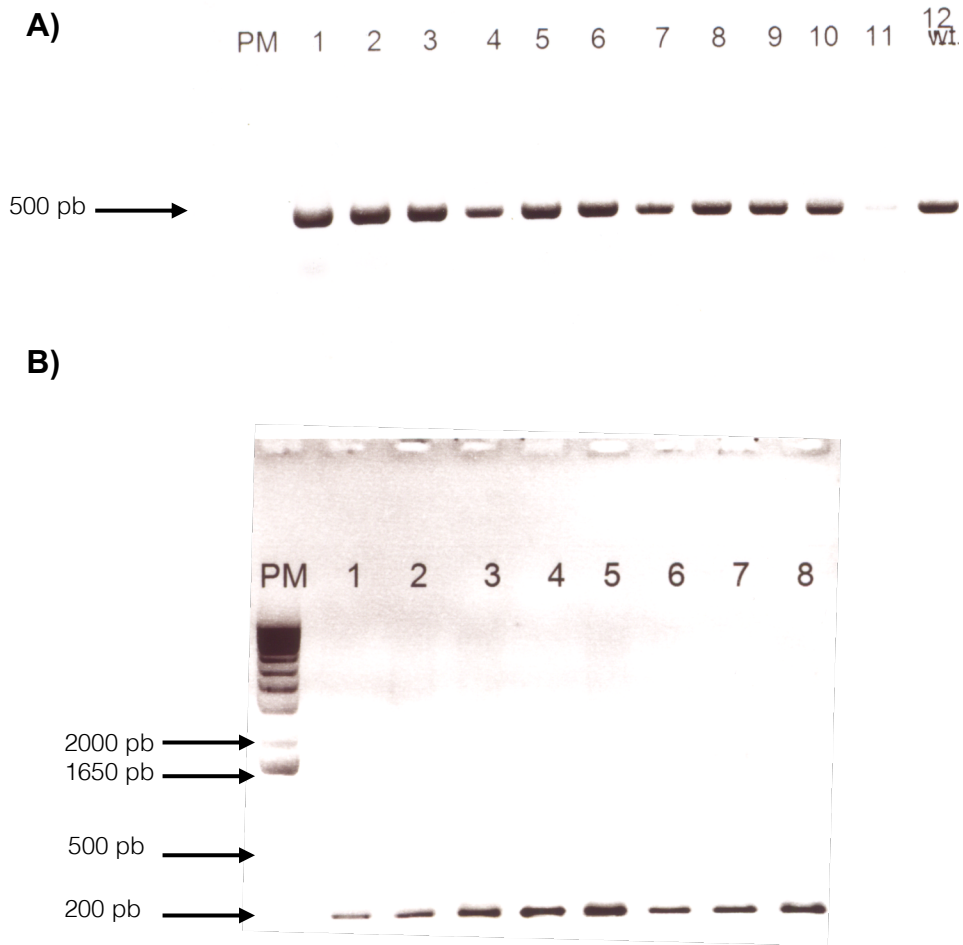


Figura 20. A) Oligos pKD46-F/pKD46-R Carriles 1 al 10 – colonias de *P. luminescens HIM3* transformadas con pKD119 Carril 12 – Plasmido pKD119 **B)** Oligos de *P. luminescens HIM3* – gyrA-F/gyrA-R Carriles 1,2,3,5,6,7 y 8 - colonias transformadas Carril 4 – *P. luminescens HIM3*

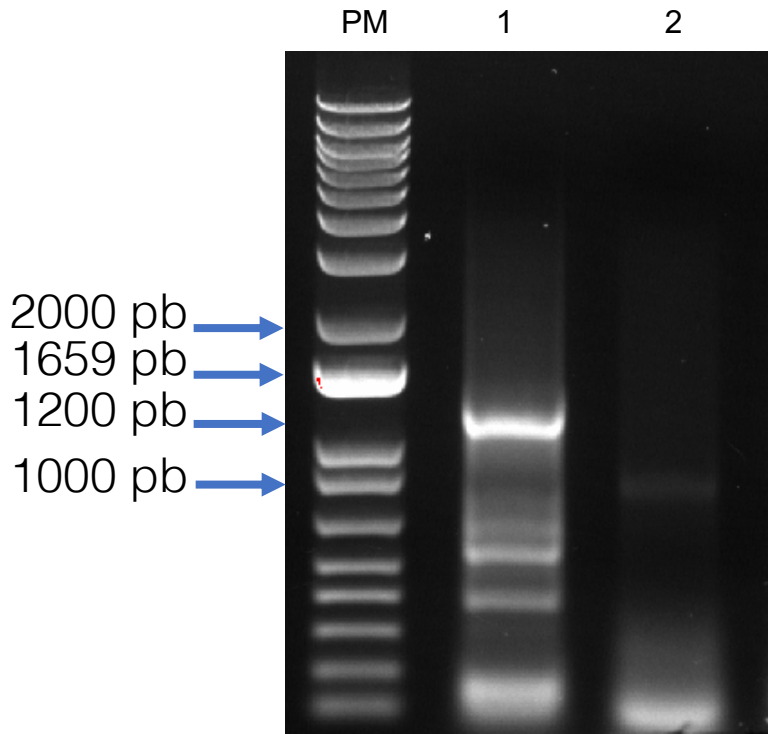


Figura 21.

Oligos K2/R

Carril 1 *Photobacterium luminescens* HIM3 Δ nrp::Km. Carril 2 *Photobacterium luminescens* HIM3 wt. Gel de agarosa al 1% en donde se muestra la el fragmento amplificado por los oligonucleótidos K2/R (carril 1), mientras que en el carril 2 se utilizó como templado el DNA de las células wt por lo que no se puede observar la banda.

Se transformó a *P. luminescens* HIM3 con el plásmido pKD119 (que confiere resistencia a tetraciclina y alberga el sistema de recombinación), posteriormente para verificar que la transformación fue exitosa se amplificó una región del plásmido de 500 pb. (Figura 20). Después de que *P. luminescens* HIM3 fue transformada, se indujo la recombinación para mutar el gen de interés e insertar en su lugar un gen de resistencia a antibióticos en este caso resistencia a kanamicina, para confirmar la mutación se realizó una caracterización por PCR en donde se diseñaron oligonucleótidos para amplificar regiones que corresponden a los genes adyacentes al gen mutado y a regiones del gen de resistencia a kanamicina como se observa

en las figuras 19 y 21. Finalmente se obtuvo resultados preliminares de la cepa de *P. luminescens HIM3* mutada en el gen que codifica una NRPS de 49 kb, en donde se intentó determinar la virulencia de la cepa mutante, la actividad quelante y la capacidad de soportar el desarrollo del nematodo. Con respecto a la virulencia se observó una disminución de actividad de la cepa mutante de *P. luminescens HIM3* hacia larvas de *Galleria mellonella*, la actividad quelante igualmente se vio disminuida en la cepa mutante y finalmente se determinó que la cepa mutante no es capaz de soportar el desarrollo del nematodo, esto es importante ya que para que el nematodo logre reproducirse requiere de la presencia de *P. luminescens HIM3* así como de elementos particulares de su metabolismo secundario. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con cautela debido a que se debe confirmar que los efectos de la cepa mutante de *P. luminescens HIM3* son debido a la mutante y no a que la bacteria presentó un cambio de fase, por lo que estos resultados preliminares deben corroborarse con más experimentos.

14. Discusión

En las últimas dos décadas se ha resaltado de manera importante la diversidad de metabolitos secundarios que están codificados en los genomas de los géneros *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* (Bode, 2009, Chaston *et al.*, 2011, Challinor & Bode, 2015), esto debido al potencial biotecnológico (actividad insecticida y actividad antibiótica). Además, también se ha logrado identificar que el metabolismo secundario de *Photorhabdus* juega un papel esencial en la relación simbiótica del complejo nematodo-bacteria, sin embargo, aún se desconoce el papel de una gran cantidad de metabolitos secundarios (Tobias *et al.*, 2017).

En ese sentido, con el presente trabajo se pretende contribuir a determinar el papel de las NRPS en la relación simbiótica nematodo-bacteria y su potencial biotecnológico, esto debido a que, en cuanto a número de genes los péptidos no ribosomales son la mayor clase de metabolitos secundarios presentes en el género *Photorhabdus* (Figura 9). Con el fin de determinar el potencial metabólico de *Photorhabdus luminescens HIM3*, se realizó un análisis con la plataforma antiSMASH (Blin *et al.*, 2019). Se identificó que dentro del genoma de *P.*

luminescens HIM3 están presentes 13 grupos de genes biosintéticos que corresponden a NRPS (Figura 10), siendo la clase más abundante de metabolitos secundarios y una de las cepas de *Photorhabdus* con mayor número de genes relacionados con NRPS. De los 13 BGC identificados cuatro mostraron similitud con algún BGC que ya ha sido caracterizado experimentalmente (Tabla 5) como la luminmycina, que muestra actividad de inhibición de proteosoma (Servatius *et al.*, 2019), la luminmida, que aún no se determina su posible actividad, odilorhabdinas que muestran actividad antibacteriana (Pantel *et al.*, 2018) y xenocoumacina que también muestra actividad antibacteriana (Park *et al.*, 2009), por lo que es posible que los genes de *Photorhabdus luminescens HIM3* que tienen similitud con estos BGC (que han sido caracterizados anteriormente) tengan una actividad similar, que podría estar directamente relacionada con la relación simbiótica nematodo-bacteria, en donde utilizan moléculas con actividad de inhibición de proteosoma como parte de la inhibición del sistema inmune del insecto presa, que es fundamental en el proceso de infección y por otra parte la actividad antibacteriana que protege al cadáver del insecto contra posibles competidores. Desde el punto de vista biotecnológico es interesante mencionar que se identificó una posible variante de odilorhabdinas, que es uno de los antibióticos más prometedores de los últimos años debido a que su mecanismo de acción no se ha observado en otros antibióticos y además presenta bajos niveles de toxicidad en modelos murinos (Pantel *et al.*, 2018; Witzky *et al.*, 2019).

Por otra parte, también se comparó el potencial metabólico contra cepas del género *Streptomyces* (que son una fuente muy importante de productos naturales desde el punto de vista biotecnológico), para realizar el análisis se seleccionaron genomas de *Streptomyces* con distintos estilos de vida. De acuerdo con los resultados, a pesar de que las bacterias del género *Streptomyces* presentaban un mayor potencial metabólico de acuerdo con el número de BGC en el genoma, el género *Photorhabdus* presentó un mayor número de BGC que codifican para NRPS.

En ese sentido, reportes anteriores han demostrado que el metabolismo de *Photorhabdus* juega un papel importante en el establecimiento de la simbiosis y por lo tanto en la fase infectiva de la interacción simbiótica (Tobias *et al.*, 2016). Por lo

que es interesante la presencia de NRPS como la clase de metabolitos más abundante en *Photorhabdus*, este hecho nos da indicios de que las NRPS podrían jugar un papel importante como parte del metabolismo secundario.

Por otro lado, con el fin de identificar los BGC que se conservan entre las diferentes especies del género *Photorhabdus* y aquellos que ya han sido caracterizados experimentalmente, se realizó un análisis de redes basado en similitud de secuencia mediante el software BiG-SCAPE (Navarro-Muñoz *et al.*, 2020) este análisis toma en cuenta tres índices distintos, el índice de Jaccard, que mide el porcentaje de tipos de dominios compartidos en el BGC, el índice de adyacencia, que mide el porcentaje de pares de dominios adyacentes y un índice de similitud de secuencia de dominios, en conjunto estos índices generan familias de BGC. Los resultados del análisis identificaron cuatro familias de BGC caracterizados anteriormente dentro de los genomas del género *Photorhabdus* (de acuerdo a los BGC reportados en la base de datos de MIBiG) que codifican para NRPS como: luminmycina (Servatius *et al.*, 2019), luminmida, odilorhabdinas (Pantel *et al.*, 2018) y xenocoumacinas (Park *et al.*, 2009), (estas similitudes también se identificaron en el análisis de antiSMASH) es interesante mencionar que estos péptidos no ribosomales presentan actividad antimicrobiana y de inhibición del sistema inmune de insectos y que estos BGC se mantienen conservados en distintas especies dentro del género, esto es algo que ya se ha observado en el género *Xenorhabdus* (Tobias *et al.*, 2017), por lo tanto es probable que estos BGC sean importantes en el establecimiento de la infección de los nematodos al insecto debido a que inhiben el sistema inmune a través de la vía fenoloxidasasa.

Además también se identificaron dos familias de BGC que no han sido caracterizadas experimentalmente (Figura 14) que al igual que los BGC mencionados anteriormente se conservan en al menos 15 cepas dentro del género *Photorhabdus*, uno de ellos corresponde a un gen de 49 kb y representa aproximadamente el 1% del genoma completo de la bacteria, además presenta una identidad de secuencia de nucleótidos de 87% con el gen *kol* (Figura 12) presente en *P. luminescens* TT01 (Bode *et al.*, 2015), por lo que podrían tener una relación en cuanto a la función. Algo interesante es que el producto del gen *kol* de *P.*

luminescens TT01 ya se ha caracterizado mediante espectrometría de masas, sin embargo, todavía no se han identificado las condiciones específicas de fermentación y/o cultivo en las que el gen se expresa, por lo que se desconoce la función (Tobias *et al.*, 2018). Debido a lo anterior se tiene la hipótesis de que *kol* es un gen que debido a su tamaño de 49 kb tendría que estar regulado de manera estricta en algún momento particular del desarrollo de la bacteria. Además, también se identificó otra familia de BGC que está presente en 15 cepas de *Photorhabdus* que corresponde a una NRPS de 9.9 kb, esta familia de BGC no presenta similitud con algún BGC presente en la base de datos de MIBiG experimentalmente. Sin embargo, al estar conservado en un número importante de cepas de *Photorhabdus* podría tener un papel importante.

Por otro lado, se realizó un pangenoma (totalidad de genes presentes en un determinado grupo de organismos) con el fin de identificar si las NRPS forman parte del genoma núcleo o genoma nube (Figura 16 y 17). Desde el punto de vista ecológico los pangenomas nos pueden dar algunos indicios relacionados al estilo de vida (Tettelin *et al.*, 2020), de acuerdo con características como los genes únicos de cada especie (genoma nube) o los genes que están presentes en todos los organismos analizados (genoma núcleo). De acuerdo con los resultados, el tamaño del pangenoma en el género *Photorhabdus* es de 12,676 genes de acuerdo a la convergencia de dos algoritmos de agrupamiento (OMCL y COG) y un genoma núcleo de 922 genes de acuerdo a la convergencia de tres algoritmos de agrupamiento (BDBH, COG y OMCL), dentro del genoma nube se identificó que 58 genes corresponden a NRPS y de acuerdo con el análisis solo dos son NRPS únicos de *P. luminescens* HIM3, uno de ellos es el gen B5C26_RS18645 que presenta una identidad de secuencia del 87% con el gen *kol*.

Por otro lado, de acuerdo con el modelo exponencial de Tettelin *et al.*, 2008 el pangenoma de *Photorhabdus* es un pangenoma abierto (solo considerando los genomas analizados), esto quiere decir que a medida que se adicionan genomas al análisis el número de genes aumenta. Algo interesante es que los pangenomas abiertos se suelen relacionar con organismos de vida libre, ya que requieren un amplio repertorio de genes debido a las condiciones tan variables en las que se

desarrollan (Tettelin *et al.*, 2020). En ese sentido el genoma núcleo corresponde a genes que podríamos considerar esenciales (housekeeping) para la supervivencia del grupo de organismos analizados y el genoma nube es el repertorio de genes que les facilitan colonizar un determinado nicho y es algo que puede cambiar a través del tiempo (Tettelin *et al.*, 2008, Tettelin *et al.*, 2020). Por lo que debido a que las NRPS forman parte del genoma nube, se podría considerar que no son esenciales para la supervivencia de la bacteria (como podrían ser los genes housekeeping), sin embargo, es probable que le confieran una ventaja en el establecimiento de un nicho en particular (Tettelin *et al.*, 2020). En este caso la mayoría de las NRPS que se identificaron y que han sido caracterizadas anteriormente corresponden a inhibidores del sistema inmune en insectos, evidenciando que las NRPS de *P. luminescens HIM3* juegan un papel importante en el proceso de infección hacia insectos.

De acuerdo con los resultados anteriores, en donde se determinó que el gen B5C26_RS18645 de *P. luminescens HIM3* que presenta identidad de secuencia del 87% con el gen *kol* de *P. luminescens TT01*, tanto en el análisis de antiSMASH como en BiG-SCAPE y que representa el 1% del genoma de la bacteria, se seleccionó para realizar mutagénesis mediada por recombinación, esto con el fin de determinar el posible papel de este gen de 49 kb en procesos como, infección y desarrollo del nematodo; para ello se utilizó el método de Datsenko & Wanner, 2000. Sin embargo, anteriormente se reportó la complejidad para mutar el gen *kol* de *P. luminescens TT01*, Atribuido a que presenta múltiples repeticiones largas, por lo que este gen no se ha logrado mutar en la cepa *TT01* (Wang *et al.*, 2019). Otro aspecto importante que se tiene que resaltar es el hecho de que la cepa mutante *P. luminescens HIM3 Δnrp::Km* presenta un cambio de fase, de variante I a variante II lo que significa que su metabolismo y algunos aspectos fenotípicos se vieron modificados (datos no publicados) como por ejemplo: la capacidad de quelante se vio disminuida en comparación a la cepa *wt*, la capacidad de infección se vio disminuida y la capacidad de soportar el desarrollo del nematodo también fue afectada, sin embargo no es claro que esto haya ocurrido por la mutación del gen B5C26_RS18645 de *P. luminescens HIM3* debido a que es necesario monitorear la

fase en la cual se encuentra la bacteria durante todo el proceso para realizar la mutagénesis.

De manera general estos resultados sugieren que, las NRPS están ampliamente distribuidas en el género *Photorhabdus* principalmente teniendo actividad de inhibición del sistema inmune de insectos por lo que es evidente su participación en la relación simbiótica, sin embargo los resultados del análisis del pangenoma muestran que las NRPS forman parte del genoma nube por lo que no se consideran genes esenciales para la supervivencia de la bacteria, más bien, los genes presentes en el genoma nube están relacionados a proporcionar rasgos que confieran ventajas para establecerse en un determinado nicho.

15. Conclusiones

- Se confirma una amplia distribución de NRPS que inhiben del sistema inmune de insectos en bacterias del género *Photorhabdus* por lo que es probable que tengan un papel importante en el proceso de infección del complejo nematodo-bacteria y por lo tanto en el éxito de la relación simbiótica.
- Por otra parte, en *P.luminescens HIM3* se identificaron NRPS como luminmida, odilorhabdinas, xenocumacinas, luminmycina y nematophina, relacionados con actividad antibacteriana e inhibición del sistema inmune de insectos por lo que se relacionan directamente con aspectos importantes de la interacción simbiótica.
- Los resultados del análisis pangenómico mostraron que las NRPS de las cepas de *Photorhabdus* que fueron analizadas, forman parte del genoma accesorio en donde comúnmente encontramos genes que confieren ventajas bajo presiones de selección (Ej. Genes de resistencia a antibióticos), por lo que probablemente tengan un papel importante y confieran ventajas para establecerse en un determinado nicho.
- Finalmente, las NRPS de *P. luminescens HIM3* en conjunto podrían estar facilitando procesos como la infección a través de la producción de péptidos que inhiben la respuesta inmune del insecto como Luminmycina y Luminmida

y protección del cadáver a través de la producción de antimicrobianos como Odilorhabdinas, Xenocoumacina y Nematophina.

16. Perspectivas

- Caracterizar la mutante *P. luminescens HIM3 Δnrp::Km* con el fin de determinar aspectos importantes en la relación simbiótica:
- Comprobar mediante reproducción *in vitro* del nematodo si la mutante es capaz de soportar el desarrollo del nematodo.
- Determinar si existe diferencia entre la cepa *wt* y la mutada con respecto a la virulencia hacia un modelo de *Galleria mellonella*.
- Identificar una posible actividad de interés biotecnológico a través de una sobre-expresión del gen B5C26_RS18645 mediante un intercambio de promotor.

16. Referencias

- Akhurst**, R. J. (1980) Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.* 121:303–309.
- Akhurst**, R. J., and N. E. Boemare. (1990). Biology and taxonomy of *Xenorhabdus* Entomopathogenic nematodes in biological control. In: R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press. Boca Raton, FL. 75–90.
- Bian**, X., Plaza, A., Zhang, Y., & Müller, R. (2012). Luminmycins A–C, cryptic natural products from *Photorhabdus luminescens* identified by heterologous expression in *Escherichia coli*. *Journal of natural products*, 75(9), 1652-1655.
- Blin**, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., ... & Weber, T. (2019). antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic acids research*, 47(W1), W81-W87.
- Blin**, K., Wolf, T., Chevrette, M. G., Lu, X., Schwalen, C. J., Kautsar, S. A., ... & Dickschat, J. S. (2017). antiSMASH 4.0—improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic acids research*, 45(W1), W36-W41.
- Bode**, H. B. (2009). Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Current opinion in chemical biology*, 13(2), 224-230.
- Bode**, H. B., Brachmann, A. O., Jadhav, K. B., Seyfarth, L., Dauth, C., Fuchs, S. W., ... & Arndt, H. D. (2015). Structure Elucidation and Activity of Kolossin A, the D-/L-Pentadecapeptide Product of a Giant Nonribosomal Peptide Synthetase. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(35), 10352-10355.
- Boemare**, N., & Akhurst, R. (2006). The genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In *The prokaryotes* Springer, New York, NY. (pp. 451-494).
- Brandel**, J., Humbert, N., Elhabiri, M., Schalk, I. J., Mislin, G. L., & Albrecht-Gary, A. M. (2012). Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: physicochemical characterization of the iron (III), copper (II) and zinc (II) complexes. *Dalton transactions*, 41(9), 2820-2834.

- Cai, X.,** Nowak, S., Wesche, F., Bischoff, I., Kaiser, M., Fürst, R., & Bode, H. B. (2017). Entomopathogenic bacteria use multiple mechanisms for bioactive peptide library design. *Nature Chemistry*, 9(4), 379-386.
- Casanova-Torres, Á. M.,** & Goodrich-Blair, H. (2013). Immune signaling and antimicrobial peptide expression in Lepidoptera. *Insects*, 4(3), 320-338.
- Challinor, V. L.,** & Bode, H. B. (2015). Bioactive natural products from novel microbial sources. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354(1), 82-97.
- Chaston, J. M.,** Suen, G., Tucker, S. L., Andersen, A. W., Bhasin, A., Bode, E., ... & Darby, C. (2011). The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: convergent lifestyles from divergent genomes. *PloS one*, 6(11), e27909.
- Clarke, D. J.** (2016). The regulation of secondary metabolism in *Photorhabdus*. In *The Molecular Biology of Photorhabdus Bacteria* (pp. 81-102). Springer, Cham.
- Crawford, J. M.,** Kontnik, R., & Clardy, J. (2010). Regulating alternative lifestyles in entomopathogenic bacteria. *Current Biology*, 20(1), 69-74.
- Crawford, J. M.,** Portmann, C., Zhang, X., Roeffaers, M. B., & Clardy, J. (2012). Small molecule perimeter defense in entomopathogenic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27), 10821-10826.
- Datsenko, K. A.,** & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640-6645.
- Duchaud, E.,** Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., & Dassa, E. (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature biotechnology*, 21(11), 1307.
- Eleftherianos, I.,** Boundy, S., Joyce, S. A., Aslam, S., Marshall, J. W., Cox, R. J., & Reynolds, S. E. (2007). An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), 2419-2424.

- Finking**, R., & Marahiel, M. A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58, 453-488.
- Fischbach**, M. A., & Walsh, C. T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chemical reviews*, 106(8), 3468-3496.
- Forst**, S., B. Dowds, N. Boemare, and E. Stackebrandt. (1997) *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp.: Bugs that kill bugs. *Ann. Rev. Microbiol.* 51:47–72.
- Fuchs**, S. W., Grundmann, F., Kurz, M., Kaiser, M., & Bode, H. B. (2014). Fabclavines: Bioactive Peptide–Polyketide–Polyamino Hybrids from *Xenorhabdus*. *ChemBioChem*, 15(4), 512-516.
- Fuchs**, S. W., Proschak, A., Jaskolla, T. W., Karas, M., & Bode, H. B. (2011). Structure elucidation and biosynthesis of lysine-rich cyclic peptides in *Xenorhabdus nematophila*. *Organic & biomolecular chemistry*, 9(9), 3130-3132.
- Gaugler**, R. (Ed.). (2002). *Entomopathogenic nematology*. CABI.
- Goodrich-Blair**, H., & Clarke, D. J. (2007). Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Molecular microbiology*, 64(2), 260-268.
- Gualtieri**, M., Aumelas, A., & Thaler, J. O. (2009). Identification of a new antimicrobial lysine-rich cyclolipopeptide family from *Xenorhabdus nematophila*. *The Journal of antibiotics*, 62(6), 295
- Hinchliffe**, S. J., Hares, M. C., & Dowling, A. J. (2010). Insecticidal toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria. *The Open Toxinology Journal*, 3(1).
- Hu**, K., & Webster, J. M. (2000). Antibiotic production in relation to bacterial growth and nematode development in *Photorhabdus*–*Heterorhabditis* infected *Galleria mellonella* larvae. *FEMS microbiology letters*, 189(2), 219-223.
- Joyce**, S. A., Brachmann, A. O., Glazer, I., Lango, L., Schwär, G., Clarke, D. J., & Bode, H. B. (2008). Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(10), 1942-1945.

- Joyce**, S. A., Lango, L. & Clarke, D. J. (2011). The regulation of secondary metabolism and mutualism in the insect pathogenic bacterium *Photobacterium luminescens*. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 76, pp. 1-25). Academic Press.
- Kleino**, A., & Silverman, N. (2014). The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Developmental & Comparative Immunology*, 42(1), 25-35.
- Lang**, G., Kalvelage, T., Peters, A., Wiese, J., & Imhoff, J. F. (2008). Linear and Cyclic Peptides from the Entomopathogenic Bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. *Notes*, 71(6), 1075.
- Lee**, X., Fox, Á., Sufrin, J., Henry, H., Majcherczyk, P., Haas, D., & Reimann, C. (2010). Identification of the biosynthetic gene cluster for the *Pseudomonas aeruginosa* antimetabolite L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid. *Journal of bacteriology*, 192(16), 4251-4255.
- Li**, J., Chen, G., & Webster, J. M. (1997). Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *Canadian journal of microbiology*, 43(8), 770-773.
- Li**, J., Chen, G., & Webster, J. M. (1997). Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *Canadian journal of microbiology*, 43(8), 770-773.
- Masschelein**, J., Clauwers, C., Awodi, U. R., Stalmans, K., Vermaelen, W., Lescrinier, E., & Lavigne, R. (2015). A combination of polyunsaturated fatty acid, nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic machinery is used to assemble the zeamine antibiotics. *Chemical science*, 6(2), 923-929.
- Medema**, M. H., Blin, K., Cimermanic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., & Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids research*
- Navarro-Muñoz**, J. C., Selem-Mojica, N., Mallowney, M. W., Kautsar, S. A., Tryon, J. H., Parkinson, E. I. & Roeters, A. (2020). A computational framework to

- explore large-scale biosynthetic diversity. *Nature chemical biology*, 16(1), 60-68.
- Pantel**, L., Florin, T., Dobosz-Bartoszek, M., Racine, E., Sarciaux, M., Serri, M., & Gaudriault, S. (2018). Odilorhabdins, antibacterial agents that cause miscoding by binding at a new ribosomal site. *Molecular cell*, 70(1), 83-94.
- Park**, D., Ciezki, K., Van Der Hoeven, R., Singh, S., Reimer, D., Bode, H. B., & Forst, S. (2009). Genetic analysis of xenocoumacin antibiotic production in the mutualistic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *Molecular microbiology*, 73(5), 938-949.
- Park**, H. B., & Crawford, J. M. (2016). Pyrazinone protease inhibitor metabolites from *Photorhabdus luminescens*. *The Journal of antibiotics*, 69(8), 616
- Park**, H. B., Perez, C. E., Barber, K. W., Rinehart, J., & Crawford, J. M. (2017). Genome mining unearths a hybrid nonribosomal peptide synthetase-like-pteridine synthase biosynthetic gene cluster. *elife*, 6.
- Peel**, M. M., D. A. Alfredson, J. G. Gerrard, J. M. Davis, J. M. Robson, R. J. McDougall, B. L. Scullie, and R. J. Akhurst. (1999) Isolation, identification, and molecular characterization of strains of *Photorhabdus luminescens* from infected humans in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 37:3647–3653.
- Posada**, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, 25(7), 1253-1256.
- Reimer**, D., Cowles, K. N., Proschak, A., Nollmann, F. I., Dowling, A. J., Kaiser, M., & Bode, H. B. (2013). Rhabdopeptides as insect-specific virulence factors from entomopathogenic bacteria. *ChemBioChem*, 14(15)
- Reimer**, D., Luxenburger, E., Brachmann, A. O., & Bode, H. B. (2009). A new type of pyrrolidine biosynthesis is involved in the late steps of xenocoumacin production in *Xenorhabdus nematophila*. *ChemBioChem*, 10(12), 1997-2001.
- Reimer**, D., Nollmann, F. I., Schultz, K., Kaiser, M., & Bode, H. B. (2014). Xenortide biosynthesis by entomopathogenic *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of natural products*, 77(8), 1976-1980.

- Schieferdecker**, S., König, S., Koeberle, A., Dahse, H. M., Werz, O., & Nett, M. (2015). Myxochelins target human 5-lipoxygenase. *Journal of natural products*, 78(2), 335-338.
- Schneditz**, G., Rentner, J., Roier, S., Pletz, J., Herzog, K. A., Bücken, R., ... & Gorkiewicz, G. (2014). Enterotoxicity of a nonribosomal peptide causes antibiotic-associated colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(36), 13181-13186.
- Schwarzer**, D., Finking, R., & Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Natural product reports*, 20(3), 275-287.
- Servatius**, P., Stach, T., & Kazmaier, U. (2019). Total synthesis of luminmycin A, a cryptic natural product from *Photobacterium luminescens*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2019(20), 3163-3168.
- Seydlová**, G., & Svobodová, J. (2008). Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Central European Journal of Medicine*, 3(2), 123-133
- Shi**, Y. M., & Bode, H. B. (2018). Chemical language and warfare of bacterial natural products in bacteria–nematode–insect interactions. *Natural product reports*, 35(4), 309-335.
- Somvanshi**, V. S., Sloup, R. E., Crawford, J. M., Martin, A. R., Heidt, A. J., Kim, K. S. & Ciche, T. A. (2012). A single promoter inversion switches *Photobacterium* between pathogenic and mutualistic states. *Science*, 337(6090), 88-93.
- Stein**, M. L., Beck, P., Kaiser, M., Dudler, R., Becker, C. F., & Groll, M. (2012). One-shot NMR analysis of microbial secretions identifies highly potent proteasome inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201211423.
- Strieker**, M., Tanović, A., & Marahiel, M. A. (2010). Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current opinion in structural biology*, 20(2), 234-240.
- Süssmuth**, R. D., & Mainz, A. (2017). Nonribosomal peptide synthesis—principles and prospects. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(14), 3770-3821.
- Suzuki**, T., Yamanaka, S., & Nishimura, Y. (1990). Chemotaxonomic study of *Xenorhabdus* species-cellular fatty acids, ubiquinone and DNA-DNA

- hybridization. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 36(6), 393-401.
- Szállás**, E. M. I. L. I. A., Koch, C., Fodor, A., Burghardt, J., Buss, O., Szentirmai, A. & Stackebrandt, E. (1997). Phylogenetic evidence for the taxonomic heterogeneity of *Photobacterium luminescens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 402-407.
- Tettelin**, H., Riley, D., Cattuto, C., & Medini, D. (2008). Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Current opinion in microbiology*, 11(5), 472-477.
- Tobias**, N. J., Heinrich, A. K., Eresmann, H., Wright, P. R., Neubacher, N., Backofen, R., & Bode, H. B. (2017). *Photobacterium*-nematode symbiosis is dependent on hfq-mediated regulation of secondary metabolites. *Environmental microbiology*, 19(1), 119-129.
- Tobias**, N. J., Linck, A., & Bode, H. B. (2018). Natural product diversification mediated by alternative transcriptional starting. *Angewandte Chemie*, 130(20), 5801-5804.
- Tobias**, N. J., Mishra, B., Gupta, D. K., Sharma, R., Thines, M., Stinear, T. P., & Bode, H. B. (2016). Genome comparisons provide insights into the role of secondary metabolites in the pathogenic phase of the *Photobacterium* life cycle. *BMC genomics*, 17(1), 537.
- Tobias**, N. J., Wolff, H., Djahanschiri, B., Grundmann, F., Kronenwerth, M., Shi, Y. M., & Stinear, T. P. (2017). Natural product diversity associated with the nematode symbionts *Photobacterium* and *Xenorhabdus*. *Nature microbiology*, 2(12), 1676.
- Vallet-Gely**, I., Lemaitre, B., & Bocard, F. (2008). Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 302-313.
- Wang**, J., & Bedding, R. A. (1996). Population development of *Heterorhabditis* bacteriophora and *Steinernema carpocapsae* in the larvae of *Galleria mellonella*. *Fundamental and Applied Nematology*, 19(4), 363-367
- Weber**, T. (2014). In silico tools for the analysis of antibiotic biosynthetic pathways. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(3-4), 230-235.

Witzky, A., Tollerson, R., & Ibba, M. (2019). Translational control of antibiotic resistance. *Open biology*, 9(7), 190051.