



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

GENÓMICA ESTRUCTURAL PARA EL ANÁLISIS DE PÉPTIDO SINTETASAS NO RIBOSOMALES EN *Xenorhabdus nematophila* SC0516, UNA BACTERIA SIMBIÓTICA DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS

**TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A:
BIÓL. LUIS ENRIQUE ROJAS ESPINOZA**

DIRECTOR

DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 23 de mayo del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

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

Dra. Rosalba Salgado Morales (CeIB/UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CeIB/UAEM)

Dr. Armando Hernández Mendoza (CIDC/UAEM)

Dra. Claudia Díaz Camino (IBT/UNAM)

Tesis: **"Genómica estructural para el análisis de péptido sintetasas no ribosomales en *Xenorhabdus nematophila* SC0516, una bacteria simbiótica de nematodos entomopatógenos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Luis Enrique Rojas Espinoza**

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:2022-06-10 11:25:09 | Firmante

G+xZ981q/ZHV/CrgHcUc7rljwDcde2+Siz4uAu4iFtUB6eAU1jm2uiMUgRcjPywk6KTS0T7O3FnwXBHxy7bdW7v2JjS7RvbFPgXTsKDBtS/YN15Ogg0L+T7wnCLTOp9f+O+TLv2rLAlvjghixiFzflAIQnYr+/e1oJIJHqdTMTObd0z1ccQKalyHvKxwKDJUJFw5shz3PsBSSuNIRLeyJYUGlgplu6/2DRPU663QjV+1rKqoDqSscYdHe6e6twIZ61/xoGjWWy1mBYHgcCV/ISZcXqh8++J5LmbVRVcebYrsVksns6rwUZBCZrgsMAH+KPAYeGc6U5ikA3g0GKOEZg==

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



TZfN9Ctq5

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/U1LBLxEpjQYJRnctWjdL6XJTKTVMVQn>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 23 de mayo del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

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

Dra. Rosalba Salgado Morales (CeIB/UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CeIB/UAEM)

Dr. Armando Hernández Mendoza (CIDC/UAEM)

Dra. Claudia Díaz Camino (IBT/UNAM)

Tesis: **“Genómica estructural para el análisis de péptido sintetasas no ribosomales en *Xenorhabdus nematophila* SC0516, una bacteria simbiótica de nematodos entomopatógenos”**

Alumno que lo presenta a revisión: **Luis Enrique Rojas Espinoza**

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. ROSALBA SALGADO MORALES



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

ROSALBA SALGADO MORALES | Fecha:2022-06-08 10:49:22 | Firmante

xcMI5+HHPQSZAImCGdDXGHu08mq1JZ8K1qla6HdmpUVx32Jv8+cRUIBvNGEor+/a+ToxNrQc4ZvJWEPR8dp/OXrLGtDbVWLM+uPSZI3gwzHvtkPt8N0DTMLcyZGjqgK0gUYfh
QZ0ruST/wHtbpmgGh6xQX+ZR/e6hJM3Ux4K7g00Os3o6fpkBaSvWn+WL3u0UpN3D2/pxYveyEp351HHeLXyOOofftBkLNrl8GFXa72sY1qxc6J/eq2AoCF9oWWbrYNhCIT/GvS
9UcrxGfSjL3dBsfhyPwOBouWzz/WpVTleFoPflk4dtRpsU16wOOPPurBuoV6e1rXbNQ8Dg==

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



[o0cAn4Q6z](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/eEG5Bz1sNOMfJGbE8QROK2b5o3iuV6>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 23 de mayo del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

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

Dra. Rosalba Salgado Morales (CeIB/UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CeIB/UAEM)

Dr. Armando Hernández Mendoza (CIDC/UAEM)

Dra. Claudia Díaz Camino (IBT/UNAM)

Tesis: **“Genómica estructural para el análisis de péptido sintetasas no ribosomales en *Xenorhabdus nematophila* SC0516, una bacteria simbiótica de nematodos entomopatógenos”**

Alumno que lo presenta a revisión: **Luis Enrique Rojas Espinoza**

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. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO



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

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2022-06-10 13:18:03 | Firmante

xlwiNzBEiv+zukEMc/5K2Tqjc25Y/lv27oJncknS+NYEAR73NGjk3OXppqRD6TxJ6ClolUswKUW9fLEbmsgmIM/mVUMSnGYG5WxiQUHM6EtMsbDk9CEaXrLRsVP7Uq1LW5gcWk
LUOvXT1FKhimlnrM0EPQdlL5HWLacksCobJHtkchVwP/fay2Bhf5yHZEoAGORL8FEGkE+1m9yaDrtNRcsqwNb0VQ7hkRwftl+ieym+Lltqsxe3V3FMM+mj4pY1/1xuvQxCTSOmMn
/Dui7QQkLc80XVfeFnZqvvaVK/uEJT0TDJdHCa0+Fu4kp/+1M2nU7jcXHHkylRLoG/WHHzg==

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



[IVSdnGTpO](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/42rDckCz1BL87FXFLDdLzImVoliU6EWc>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 23 de mayo del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

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

Dra. Rosalba Salgado Morales (CeIB/UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CeIB/UAEM)

Dr. Armando Hernández Mendoza (CIDC/UAEM)

Dra. Claudia Díaz Camino (IBT/UNAM)

Tesis: **"Genómica estructural para el análisis de péptido sintetasas no ribosomales en *Xenorhabdus nematophila* SC0516, una bacteria simbiótica de nematodos entomopatógenos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Luis Enrique Rojas Espinoza**

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:2022-06-10 10:33:00 | Firmante

ahhhNLq33LCu5zW9NNG9cCgf6Ssa5V0HMnakW5FcN5kGLZA96RF1Y3uVUu4Th9ihzv3gNI1ZzL62EmS7Eikf+thhe7dXZY4cx6zWNzQgybH/5CknTK2ydrE+GsaFUWFtOU7OE7R2mBI+fujrfr8QoTxz9rlg6P4HEXMoJ3eFBmRAKb3/KQmy0hPOPmzBxndkV6VsvyqTbvd78rSlwwt6LCsS7JYdTeYFwAbyyDVaizgSeE7iNiKGLu6Tv/rr911wQh1vQbU4h2II2vvYG0I9K4ByL+SM2MZjuaWmfT+zYITVX861hWKWql+zfF6XWqNCHWRB5Eo6revLXM4bUhhDSQ==

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



8ORctdQmN

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/TndRVWj3nipTZPWQkKNejMg1VzPbc1N3>



AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo en cada momento de mi vida, siempre alentándome y apoyándome en cada decisión que tomé hasta llegar aquí.

Al Dr. Edgar Dantán González, por su infinita paciencia durante todo este proceso, por sus enseñanzas, tanto académicas como personales, por la confianza que siempre me brindó y por ser un ejemplo, tanto como persona como académico.

A la Dra. Rosalba Salgado Morales, por siempre tener tiempo para escuchar mis dudas, por siempre resolverlas con mucha paciencia y darme consejos que me hicieron un mejor estudiante y persona.

A mis sinodales, que me apoyaron en mis dudas, corrigieron mis errores y guiaron en el camino para hacer un mejor trabajo gracias a su amplia experiencia.

A mis compañeros del Laboratorio de Estudios Ecogenómicos, por sus consejos y su apoyo en todo momento, sin ellos todo esto hubiera sido mucho más complicado.

Al CONACYT, por la beca de maestría que me fue otorgada y por la cuál me fue posible seguir en este proyecto.

Pero sobre todo quiero agradecer a mi tía Carmen y mi abuela Margarita, que siempre dieron todo por mí desde que era pequeño, porque siempre, sin importar qué, me apoyaron en todas las decisiones que tomé, además siempre me dieron los mejores consejos y por los cuales ahora estoy aquí. Nunca tendré las palabras suficientes para expresar lo que ellas hicieron por mí y aunque el día de hoy ya no están conmigo sé que desde algún lugar están viendo los frutos de su esfuerzo y que siempre estarán orgullosas de la persona que criaron.

Índice

Introducción	4
1. Los géneros <i>Xenorhabdus</i> y <i>Photorhabdus</i>	5
1.1 Ciclo de vida de bacterias <i>Xenorhabdus</i> y <i>Photorhabdus</i>	6
1.2 Variación de fase en bacterias <i>Xenorhabdus</i> y <i>Photorhabdus</i>	8
1.3 Productos metabólicos producidos por bacterias simbiotes de nemátodos	9
1.4 Péptido Sintetas No Ribosomales (NRPSs)	11
1.5 Identificación de potenciales metabolitos secundarios de interés potencial mediante herramientas de la bioinformática	16
2. Justificación	17
3. Hipótesis	17
4. Objetivos	18
4.1 Objetivo general	18
4.2 Objetivos particulares	18
5. Materiales y métodos	18
5.1 Detección de grupos de genes biosintéticos	18
5.2 Generación de redes de similitud de secuencia de NRPSs	20
5.3 Análisis pangénomico	20
6. Resultados	22
6.1 Potencial biosintético de metabolitos secundarios de <i>Xenorhabdus nematophila</i> SC 0516	22
6.2 Análisis de redes por similitud de secuencia	25
6.3 Pangenoma de <i>Xenorhabdus</i>	28
6.4 Análisis de regiones promotoras	31
7. Discusión	36
8. Conclusiones	39
9. Perspectivas	39
10. Bibliografía	40
11. Anexo	49
11.1 Material suplementario	49

Introducción

Los insectos patógenos representan una fuente importante de novedosos productos naturales, ya que producen una gran diversidad de moléculas con el fin de dominar a sus presas y a los competidores de alimento. Para lograr dichos fines, incluso algunos patógenos establecen alianzas con diversas bacterias (Bode, 2009). Eventos similares ocurren en los nemátodos entomopatógenos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis*, que han establecido una relación simbiótica con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente. Se ha demostrado que estas bacterias producen metabolitos secundarios muy variados, que pudiera estar relacionado con su patogenicidad a insectos (Shi y Bode, 2018). La mayoría de estos metabolitos secundarios se sintetizan mediante péptido sintetetasas no ribosomales (o NRPSs, por *Non Ribosomal Peptide Synthetase*), que son complejos multienzimáticos organizados de forma modular.

Los péptidos sintetizados por las NRPSs se caracterizan, a diferencia de los péptidos sintetizados por el ribosoma, por contener componentes no proteicos que se presume contribuyen a la versatilidad de su actividad biológica (Süssmuth y Mainz, 2017). Entre los péptidos que sintetizan las NRPSs se encuentran antibióticos, compuestos anti-tumorales, inmunopresores, entre otros. Por esta razón, el estudio de las NRPSs es de gran relevancia en la agricultura, en la medicina y en la investigación en general (Martin y Gil, 1984).

Para encontrar nuevos péptidos y entender cuál es el papel de las NRPSs en la relación bacteria–nemátodo, se han utilizado diversas herramientas informáticas que permiten el análisis de los genomas, el estudio de los genes potencialmente involucrados en el proceso simbiótico, y la asignación de posibles funciones biológicas, todo ello encaminado a adquirir una comprensión cada vez más completa de cómo las NRPSs sintetizan estos compuestos bioactivos (Weber, 2014).

1. Los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*

La mayoría de las bacterias pertenecientes a los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* reportadas a la fecha se han encontrado en asociación con nematodos entomopatógenos y, en casos aislados, como patógenas oportunistas de humanos (por ejemplo, *Photorhabdus asymbiotica*). Sin embargo, estas bacterias no se han encontrado en formas de vida libre en el suelo o agua (Farmer *et al.*, 1989; Peel *et al.*, 1999; Gerrard *et al.*, 2003). Este hecho sugiere que la asociación simbiótica con nemátodos es esencial para la sobrevivencia de la bacteria (Forst *et al.*, 1997).

En principio, el género *Xenorhabdus* incluía a todos los simbiositos de los nemátodos entomopatógenos. Tiempo después, observando las diferencias de secuencia en el 16S rDNA, se descubrió que *Xenorhabdus* presenta la secuencia TTCG en la posición 208-211 mientras que otras bacterias (ahora incluídas en el género *Photorhabdus*) contienen la secuencia TGAAG en la misma posición (Boemare *et al.*, 1993., Szállás *et al.*, 1997). Ambos géneros tienen una estrecha relación filogenética (Rainey *et al.*, 1995). El *Ribosomal Dataset Project* generó un árbol filogenético que muestra cómo estos géneros se ramifican en la familia *Enterobacteriaceae*: Son vecinos filogenéticos de *Proteus vulgaris*, *Salmonella* y *Erwinia*, entre otros (Figura 1).

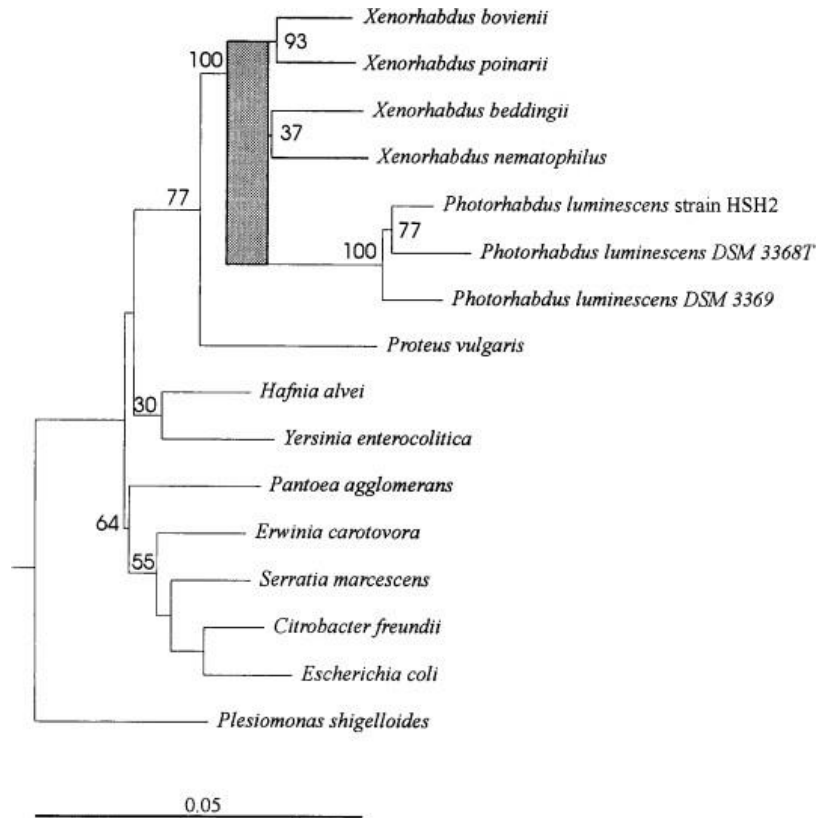


Figura 1. Árbol neighbor-joining que muestra las relaciones filogenéticas entre los miembros de los géneros *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

1.1 Ciclo de vida de bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*

Se ha caracterizado el ciclo de vida de diversas bacterias pertenecientes a los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* identificadas en nemátodos entomopatógenos, y se sabe que éstas viven en dos hábitats diferentes durante su ciclo de vida; colonizan el intestino de los nemátodos juveniles infectivos (la llamada fase de vida libre), e infectan y se multiplican en el hemocele de los insectos, lo que genera un cultivo monoxénico puro. Por lo tanto, el ciclo de vida de este tipo de bacterias es único, porque involucra tanto a su simbiosis con nemátodos como a su salto patogénico a insectos.

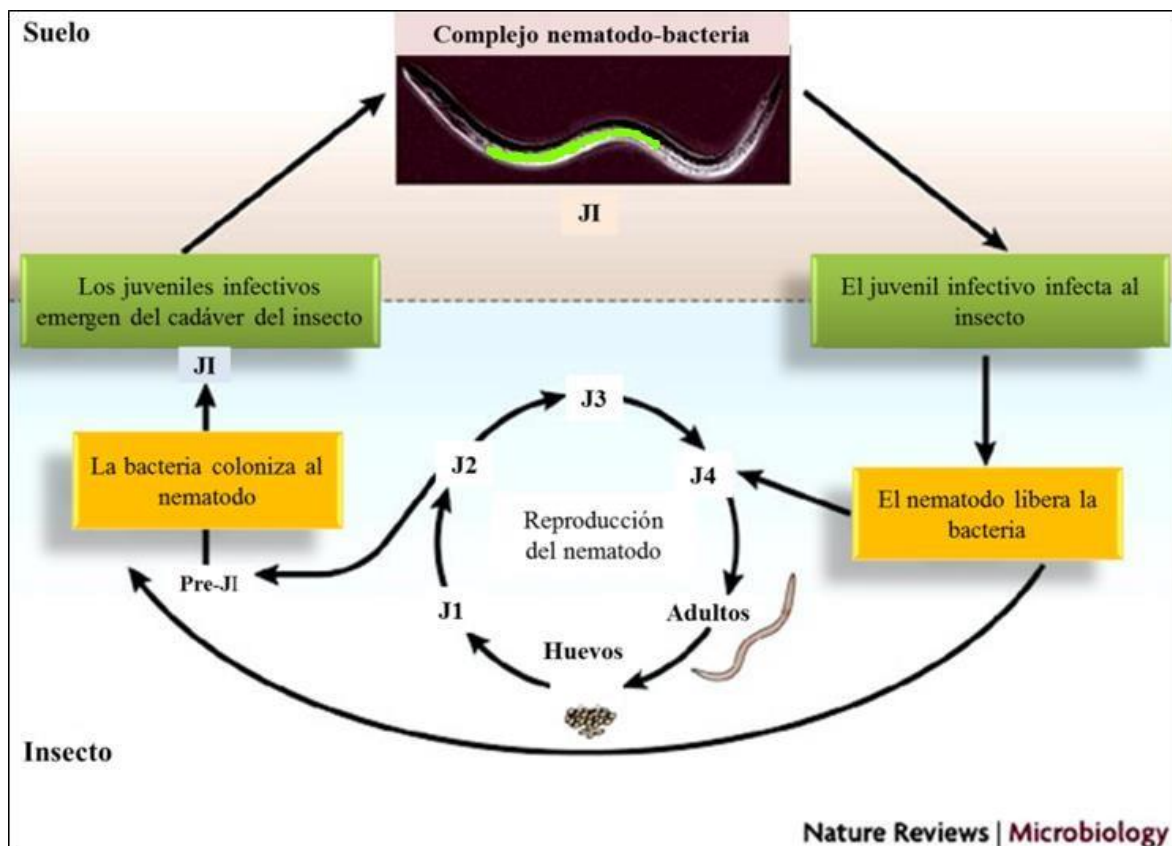


Figura 2. Ciclo de vida de *Xenorhabdus* (Modificado de Herbert y Goodrich-Blair, 2007).

Los juveniles infectivos (JI) que se encuentran en el suelo, buscan (especies crucero) o esperan (especies acechadoras) a una presa insecto. Al encontrar al insecto objetivo, el nemátodo lo penetra atravesando sus aberturas naturales (boca, ano, o espiráculos) o bien, a través del tegumento. Durante la penetración, los nemátodos expulsan la cutícula que los protege, la cual proviene de su periodo de vida en el suelo (J2). Posteriormente, los J3 se transforman en las etapas cuarta (J4) y adulta; durante este tiempo inducen una toxicogénesis (Boemare *et al.*, 1982) mediante la liberación de un factor inmunodepresivo activo dirigido a los péptidos antimicrobianos producidos por los insectos infectados (Götz *et al.*, 1981). Este factor inmunodepresivo probablemente es una proteasa que facilita la liberación de la bacteria simbiote del nemátodo (Goodrich-Blair *et al.*, 2007; Hinchliffe *et al.*, 2010). Posteriormente, la bacteria se multiplica en el hemocele del insecto lo que provoca su muerte por septicemia. Al final de la multiplicación de las bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* en el insecto éstas sintetizan distintas sustancias antimicrobianas para evitar la contaminación generalizada del cadáver. Así, el nemátodo aprovecha los suministros que la bacteria

le dá al metabolizar el tejido del insecto, para reproducirse durante una, dos o tres generaciones. Los nemátodos pueden heredar las bacterias verticalmente para preservar la simbiosis con *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* a través de las generaciones (Forst *et al.*, 1997).

1.2 Variación de fase en bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*

Algunas bacterias tienen la capacidad de responder a cambios ambientales mediante un tipo de inestabilidad genética llamada variación de fase, y tanto *Xenorhabdus* como *Photorhabdus* poseen esta característica. La variación de fase ocurre durante el periodo estacionario de su ciclo de vida (Akhurst, 1980). Existen dos variaciones posibles en *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*; la primera ocurre en la etapa J3 del nemátodo, el infectivo juvenil, y ha sido nombrada fase 1 (o primaria). La fase 1 puede ser fácilmente detectada por la producción de antibióticos, la adsorción de colorante, y la producción de lipasas, fosfolipasas y proteasas (Boemare y Akhurst, 1988). La fase 2 (o secundaria) aparece solamente durante el periodo estacionario en cultivos *in vitro* o durante la crianza de nemátodos con una dieta artificial. Los cultivos bacterianos de esta fase carecen de las propiedades que tiene la fase 1. Los cambios de fase son impredecibles en el tiempo, y aunque puede ser reversible, generalmente es más común el cambio de la fase 1 a la fase 2. Las bacterias que se encuentran en fase 2 parecen proveer de condiciones nutrimentales menos adecuadas para el nemátodo. Este hecho se ha observado en la asociación simbiótica establecida entre *Photorhabdus* con *Heterorhabditis* en donde las variantes de tipo 2 son capaces de matar al insecto y colonizar nemátodos, pero son menos efectivos para proporcionar condiciones de crecimiento y nunca se han encontrado asociados con nemátodos de origen natural, además de que algunas variantes de la fase 2 de *Photorhabdus* puede ser perjudiciales para *Heterorhabditis* (Akhurst *et al.*, 1980; Boemare y Akhurst, 2006).

	FASE 1	FASE 2
Morfología	Mucoide	Lisa
Adsorción de colorantes	✓	x
Motilidad	✓	x
Producción de metabolitos secundarios	✓	x
Producción de antibióticos	✓	x
Actividad respiratoria enzimática	x	✓
Proteasas	✓	x
Flagelo	✓	x
Fimbrias	✓	x

Tabla 1. Características de las variaciones de fases en *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*. Imágen modificada de Boemare y Akhurst, 2006.

Las simbiosis entre *Xenorhabdus–Steinernema* y *Photorhabdus–Heterorhabditis* son divergentes, es decir que han evolucionado estrechamente. Las similitudes en la relación simbiótica, patógena y de variación de fase, deben considerarse como parte de una convergencia evolutiva debido a que las características simbióticas, patógenas y de variación de fase no implican necesariamente los mismos mecanismos fisiológicos (Boemare y Akhurst, 2006).

1.3 Productos metabólicos producidos por bacterias simbiotas de nemátodos

El análisis de la asociación bacteria–nemátodo tiene un potencial importante ya que, durante la fase post-exponencial de crecimiento, la bacteria secreta una variedad de productos metabólicos con diferentes funciones, como la de apoyar el desarrollo del nemátodo (Joyce *et al.*, 2008), favorecer la comunicación célula–célula (Brachmann *et al.*, 2013), o el combate contra el sistema inmune del insecto (Crawford *et al.*, 2012), así como la protección del cadáver contra otros microorganismos que pudieran competir por este alimento (Hu *et al.*, 2002). Al respecto, en el hemocele del insecto existen una gran variedad de competidores y se presume que, para combatirlos, la bacteria produce numerosas clases de compuestos, entre ellos, metabolitos secundarios (Shi y Bode, 2018). Cuando el genoma de *Pseudomonas luminescens* fue secuenciado

en 2003 se observó que éste presenta un alto número de genes de toxinas y de genes biosintéticos (BGC, por *Biosynthetic Gene Clusters*) para la producción de metabolitos. Lo mismo sucede en otras cepas de *Xenorhabdus*, en donde al menos el 6.5% de su genoma está dedicado a la producción de metabolitos secundarios, lo que es comparable con otras bacterias conocidas por ser grandes productoras de metabolitos secundarios, como *Streptomyces* o *Myxobacteria* (Herrman, *et al.*, 2012).

En la fase estacionaria de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* se producen proteínas intracelulares que se ha sugerido forman parte de la contribución que la bacteria aporta al nemátodo para su nutrición. *Photorhabdus* produce dos distintas pequeñas proteínas hidrófobas codificadas por los genes *cipA* y *cipB* (Bintrim y Ensign, 1998), por otra parte, *Xenorhabdus nematophila* también produce dos proteínas, IP1 e IP2, pero sólo se ha identificado al gen que codifica IP1, llamado *pixA*. (Goetsch *et al.*, 2006). Otro metabolito secundario importante en el desarrollo del nemátodo es el isopropilestilbeno, un estilbeno que requiere de dos operones, *stIABCDE* y *bkdABC*. Este metabolito también actúa como inhibidor de la enzima epóxido hidrolasa, y es una señal importante requerida para la recuperación de J1 y completar el ciclo de simbiosis en *Photorhabdus* (Crawford *et al.*, 2012), por lo que se usa como gen biomarcador para estas cepas.

Los rhabdopéptidos de xenortida (RXPs) son péptidos lineales compuestos de 2 a 8 aminoácidos, con extremos amino y carboxilo que se han encontrado exclusivamente en *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* (Reimer *et al.*, 2014). En este tipo de péptidos, valina es el aminoácido (aa) más frecuente, seguido por fenilalanina y leucina. Por otro lado, el análisis genómico de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* reveló que los grupos de genes biosintéticos RXPs codifican de dos a tres NRPSs mono-modulares, similares a las encontradas en hongos y en otras especies bacterianas, y que con respecto a otros péptidos sintetizados por NRPSs, los RXPs son los más abundantes (Reimer *et al.*, 2014). Los RXPs se acumulan durante la infección a los insectos presa y han mostrado actividad sobre la respuesta inmunológica de los insectos, específicamente

sobre los hemocitos (Reimer *et al.*, 2013). Se ha sugerido que los RXPs actúan sobre la cascada de serin-proteasa, lo que conduce a la escisión de la profenoloxidasa y a la consecuente inactivación de las defensas celulares del insecto. También se ha encontrado que este tipo de péptidos presentan actividad contra algunos parásitos, por ejemplo, contra *Trypanosoma brucei rhodesiense*, por lo que es posible que in vivo, los RXP sean usados como un arma que permite *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* controlen a otras bacterias que habitan al insecto presa (Reimer *et al.*, 2014).

Los genomas de *X. nematophila* y *Xenorhabdus bovienii* incluyen a varios genes BGC involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, en su mayoría compuestos por pequeñas moléculas como fenetilamidas, iodinina, bencilideneacetona y derivados del indol, pero también otras moléculas más complejas como xenorhabdinas, xenorxides (Li *et al.*, 1998), y xenocoumacinas (XCNs) (McInerney *et al.*, 1991) derivadas del sistema híbrido policétido sintasa/péptido sintetasa no ribosomal (Figura 3).

1.4 Péptido Sintetas No Ribosomales (RNPSs)

Los péptidos no ribosomales son una clase de productos naturales que tiene una importancia farmacológica extraordinaria; la gama de actividad de estos péptidos va desde los antibióticos a los inmunosupresores, citostáticos y tóxicos. Todos ellos son sintetizados por péptido sintetas no ribosomales (RNPSs), que son complejos multi-enzimáticos organizados de manera modular (Scharwarzer *et al.*, 2003).

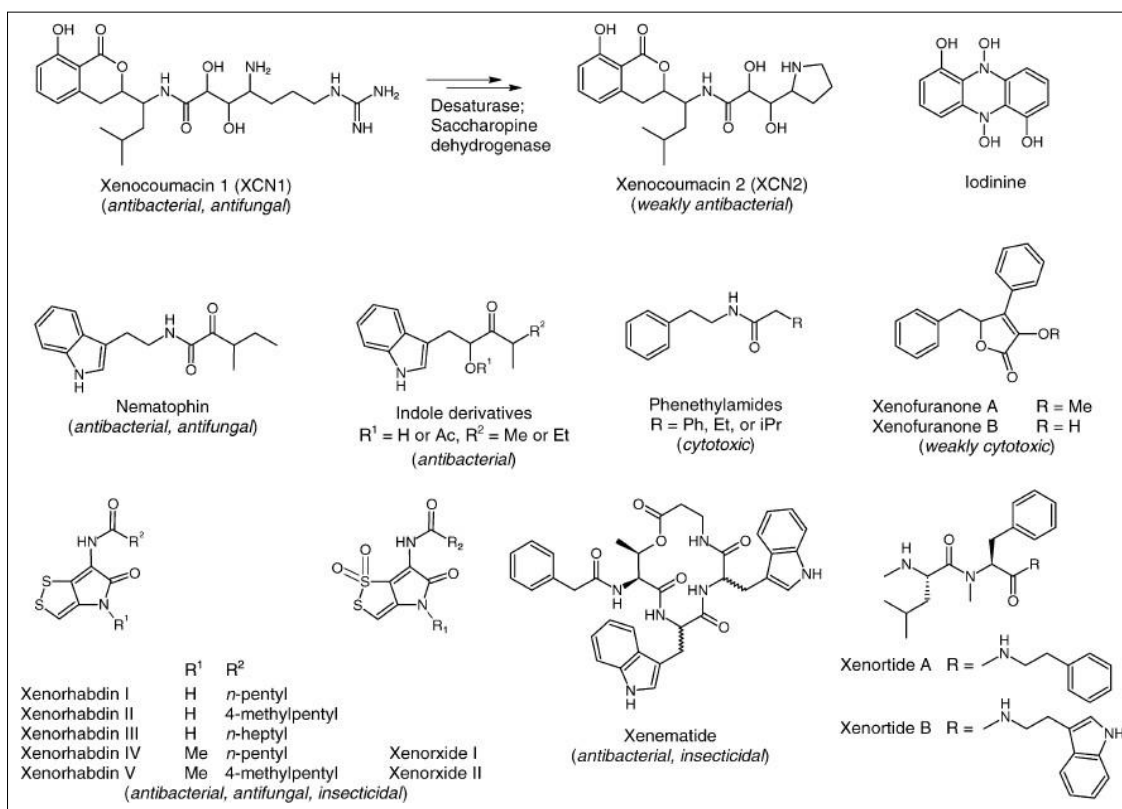


Figura 3. Compuestos derivados de *Xenorhabdus*. La figura también muestra la transformación de xenocoumacin 1 a xenocoumacin 2 (Bode, 2009).

Uno de los módulos corresponde a una sección del polipéptido NRPSs que es responsable de la incorporación de un aa en el producto final. Los módulos pueden estar divididos en dominios, que son las unidades enzimáticas que catalizan los distintos pasos necesarios para la síntesis de un péptido no ribosomal (Figura 4) (Stachelhaus y Marahiel, 2001). Los dominios de las NRPSs contienen secuencias de aa altamente conservadas llamadas “motivos centrales”, en donde es posible verificar la participación de cada aa en la función del dominio. Cabe mencionar que la síntesis no ribosomal tiene la especialidad de incorporar aa no proteinógenos, como D-aminoácidos, ácidos grasos y alfa-hidroxiácidos, lo cual se ha planteado que contribuye a la versatilidad de estas moléculas y su diversa actividad biológica (Süssmuth y Mainz, 2017).

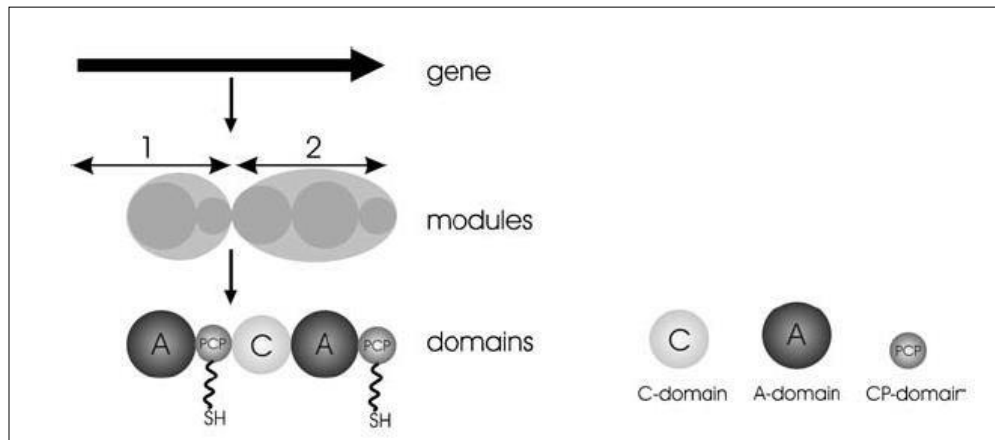


Figura 4. Organización modular de las NRPSs (Finking, 2004).

Cada módulo de las NRPSs se compone por tres dominios, cuya función es a) el reconocimiento y la activación del sustrato, b) el transporte del sustrato a los centros catalíticos de la enzima, y c) la formación del enlace peptídico, por lo que todos los dominios son esenciales para la síntesis del esqueleto peptídico. El nombre que reciben, respectivamente, es el dominio de adenilación (A), la proteína portadora de peptidilo (PCP) o dominio de tiolación (T) y el dominio de condensación (c) (Finking y Marahiel, 2004).

- El dominio A (de ± 550 aa) controla la entrada de sustratos a la síntesis mediante la selección de sustratos para los aa que compondrán al péptido, este mismo proceso ocurre en la síntesis ribosomal y es llevada a cabo por la aminoacil tRNA sintetasa, pero estas dos enzimas no comparten estructura o relación alguna.
- La PCP o Dominio T (de ± 80 a 100 aa) representa a la unidad transportadora que acepta al aminoácido activado unido covalentemente a su cofactor 4 fosfopanteteinil (4' PP) como tioéster. Este cofactor se transfiere postraduccionalmente a un residuo de serina conservado en la proteína transportadora (PCP), y actúa como un brazo flexible que permite que el sustrato aminoacilo-peptidilo viaje entre diferentes centros catalíticos.

- El Dominio C (de \pm 450 aa) es el encargado de la formación del enlace peptídico, por lo que es la entidad central de la síntesis peptídica no ribosomal. La enzima cataliza un ataque nucleofílico del grupo amino del aa activado unido al módulo río abajo (con respecto al Dominio C) sobre el grupo acilo del aminoácido atado al módulo río arriba.

El primer dominio que actúa dentro de cada módulo es el dominio de adenilación, que activa a un aa específico por adenilación y luego lo ata al sulfhidrilo libre del brazo flexible de dominio T. De manera sincronizada, empezando con el primer módulo de alargamiento, los dominios de condensación se unen al sustrato donado río arriba con el sustrato aceptor río abajo. Esta reacción rompe el enlace tioéster río arriba, y produce un peptidilo intermedio unido al dominio T del módulo río abajo. El intermediario sirve también como sustrato donante para el dominio C del siguiente módulo en esta línea de ensamblaje (Figura 5). Así, la cadena de péptidos en crecimiento pasa de un módulo a otro. Después de la adición de un monómero final por el dominio de terminación, el producto peptídico es liberado por un dominio tioesterasa (TE) (Dore *et al.*, 2016).

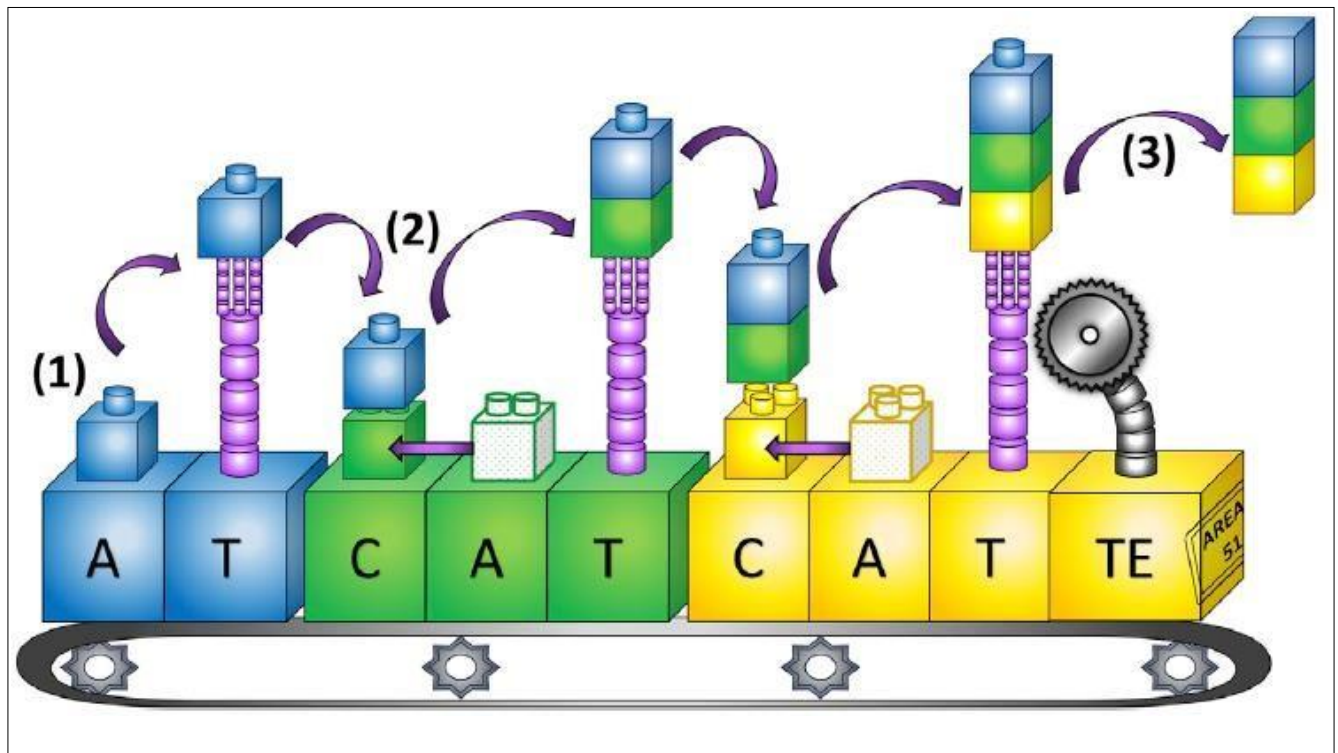


Figura 5. Esquema de la línea de ensamblaje NRPS de 3 módulos. El módulo de iniciación (en azul), el módulo de elongación (en verde) y el módulo de terminación (en amarillo). También se muestran los dominios de adenilación (A), condensación (C), tiolación (T) y tioesterasa (TE). En morado se muestra el brazo flexible (Modificado de Ackerley, 2016).

Los péptidos sintetizados por NRPSs tienen una gran importancia biotecnológica, ya que abarcan funciones que van desde la actividad antibiótica contra hongos, oomicetos, plantas y nemátodos, así como interacciones con membranas celulares, inhibidores, cofactores, activadores (Tabla 2), entre otros, por lo que es de vital importancia conocer la relación que tienen con el estilo de vida de algunas bacterias, como *Xenorhabdus*, ya que presentan un potencial enorme para la producción de diferentes metabolitos secundarios.

Tabla 2. Algunos de los péptidos no ribosomales y sus funciones reportadas.

Péptido no ribosomal	Actividad
Xenocumacinas	Antibiótica, profármacos que tras su síntesis son activados, ya que puede dañar a la bacteria que las produjo (Reimer <i>et al.</i> , 2009).
Fabclavinas	Actividad antibacterial contra <i>E. faecalis</i> (Donmez <i>et al.</i> , 2019), y algunos hongos, oomicetos, plantas y nemátodos (Masschelein <i>et al.</i> , 2015).
Rhabdopéptidos	Actividad contra hemocitos del insecto durante la infección; actúan inhibiendo la cascada de serin proteasas, anulando la respuesta inmune del insecto (Reimer <i>et al.</i> , 2013).
Estilbenos	Molécula de señalización para la recuperación de los JI en el desarrollo de <i>Heterorhabditis</i> (Joyce <i>et al.</i> , 2008).

1.5 Identificación de potenciales metabolitos secundarios de interés potencial mediante herramientas de la bioinformática

Los productos naturales, también conocidos como metabolitos secundarios, son producidos por una gran variedad de organismos. Muchos de estos productos son de importancia clínica para el tratamiento de enfermedades humanas, como la rapamicina, que es un inmunosupresor que impide que los glóbulos blancos rechacen tejidos y órganos en transplantes, o la acarbosa, que desacelera la acción de ciertos productos químicos que descomponen los alimentos para liberar glucosa en la sangre, por lo que se utiliza para tratar la diabetes tipo 2. En la actualidad, los mejores productores de metabolitos secundarios de aplicación médica son las bacterias y los hongos, y en casi todos ellos, los genes de biosíntesis están agrupados en el genoma o en los plásmidos (Martin y Gil, 1984). Esto nos es muy útil, ya que podemos encontrar a un grupo de genes biosintéticos identificando la posición de solo uno de ellos en el genoma, por ejemplo, un gen de resistencia, y después analizar la secuencia de los genes que se encuentran alrededor de este.

Los avances en las tecnologías de secuenciación han permitido desarrollar herramientas como la minería genómica (Tabla 3), que permite encontrar nuevos compuestos de manera más rápida. La minería de genomas utiliza información genética/genómica para determinar el potencial que tienen los organismos para producir

nuevos compuestos. El primer paso es identificar supuestos genes BGC en el genoma de interés, y esta información se usa para predecir los productos sintetizados por las enzimas codificadas en los grupos BGC mediante su comparación con genes de otras especies ya caracterizados (Weber, 2014).

Tabla 3. Herramientas para minería de grupos de genes de metabolitos secundarios

Herramienta	Sitio web
AntiSMASH 2	http://antismash.secondarymetabolites.org
BAGEL3	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

Este tipo de herramientas ha permitido analizar el genoma de diferentes cepas de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, y en algunas de ellas se han encontrado entre 24 y 41 BGC que pertenecen a varias clases biosintéticas, pero la gran mayoría a NRPSs (Tobias, *et al.*, 2017). En *Xenorhabdus nematophila* ATCC 19061, por ejemplo, se reveló que el 7.5% de los genes codifican proteínas implicadas en el metabolismo secundario (Bisch *et al.*, 2016), sin embargo, la mayoría de estas moléculas son crípticas, es decir que aún se desconoce su funcionamiento con precisión. Hoy en día se sabe que *X. nematophila* produce varios metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana como las xenocoumacinas, derivados del indol y nematofinas, metabolitos que tienen una amplia diversidad de actividades y de estructuras químicas.

2. Justificación

Las bacterias del género *Xenorhabdus* producen una gran gama de metabolitos secundarios, desde antimicrobianos hasta insecticidas, la mayoría de estas moléculas son producto de péptido sintetizadas no ribosomales (NPRSs). Dada su relevancia biotecnológica, es importante determinar el papel que tienen estas enzimas en el ciclo de vida de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516.

3. Hipótesis

La relación simbiótica entre nemátodos y bacterias del género *Xenorhabdus* exige la producción oportuna de moléculas que facilitan la coordinación y operación de diversos procesos biológicos. En este sentido, los metabolitos secundarios sintetizados por péptido sintetasas no ribosomales (NPRSs) de *Xenorhabdus* pudieran participar de manera importante en algunos de estos eventos, por lo que su producción debe de ser abundante y diversa en *Xenorhabdus nematophila* SC 0516.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Establecer la probable relación que existe entre las NRPSs y la gran variedad de mecanismos que muestra *Xenorhabdus nematophila* SC 0516 en la relación simbiótica nemátodo – bacteria.

4.2 Objetivos particulares

1. Detectar los BGC que potencialmente sintetiza NRPSs en el genoma de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516
2. Generar una red de similitud entre estos metabolitos.
3. Proponer los genes biosintéticos que estén implicados en la producción de metabolitos secundarios relacionados con la patogenicidad del nemátodo, sus productos antimicrobianos, el desarrollo del nemátodo y la protección del cadáver en *Xenorhabdus nematophila* SC 0516.

5. Materiales y métodos

5.1 Detección de grupos de genes biosintéticos

Para el análisis de grupos de genes biosintéticos (BGC) NRPSs se utilizó la herramienta antiSMASH, un *software* capaz de ejecutarse desde un servidor web (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>) o como una versión independiente instalada en una computadora de escritorio. Dicha herramienta se usó para la identifica-

ción, anotación y análisis de potenciales grupos de genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios. El uso de esta herramienta permite detectar rápidamente todas las clases conocidas de BGC de metabolitos secundarios, proporcionar anotaciones funcionales detalladas y predecir la estructura química de sus productos con mayor precisión que otros métodos (ClustScan, SMURF o CLUSEAN, por mencionar algunos) (Medema *et al.*, 2011).

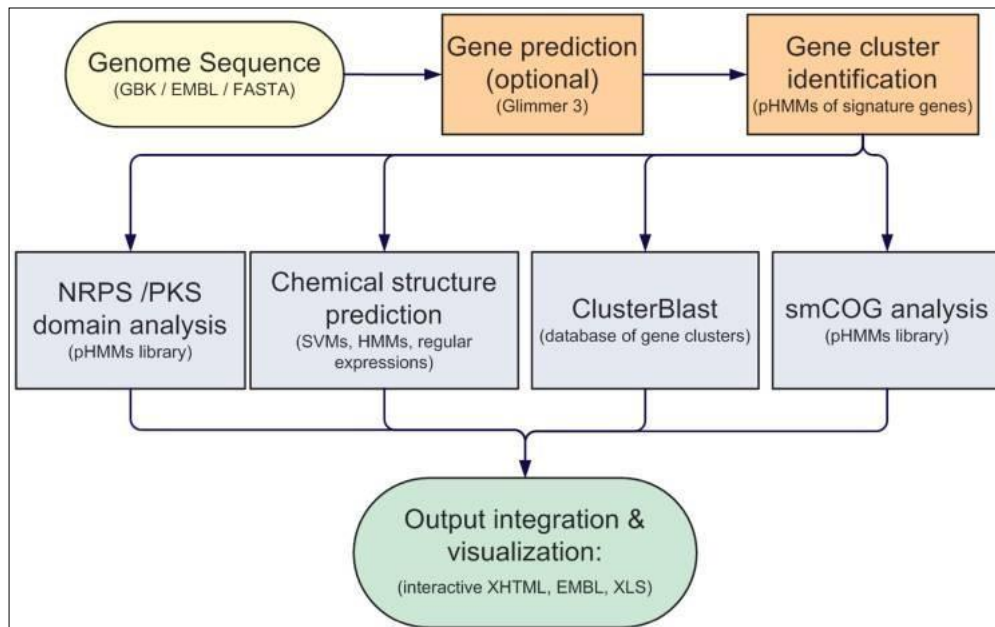


Figura 6. Esquema del flujo de trabajo para el análisis genómico de metabolitos secundarios.

AntiSMASH permite la entrada de archivos de diferente tipo (FASTA, GBK o EMBL) y también puede proporcionar un número de acceso a *GenBank/RefSeq*, que es utilizado por el servidor web para obtener el archivo asociado de *GenBank*. Si se elige la opción de archivo FASTA, el programa realiza una predicción de genes utilizando su herramienta de marcos abiertos de lectura largos (ORFs largos) para construir un modelo del gen basado en la secuencia proporcionada.

5.2 Generación de redes de similitud de secuencia de NRPSs

Para la generación de redes de similitud se utilizó el programa *BIG-SCAPE* (*Biosynthetic Gene Similarity Clustering and Prspecting Engine*), disponible en <https://git.wageningenur.nl/medema-group/BiG-SCAPE>. *BIG-SCAPE* es una herramienta bioinformática que calcula las distancias filogenéticas que existen entre los BGC de NRPSs para mapear su diversidad en redes de similitud de secuencia, que se procesan para la reconstrucción automática de grupos de genes que codifican la biosíntesis de moléculas altamente similares o idénticas. *BIG-SCAPE* usa la información contenida en los archivos de *GenBank* que fueron procesados con la herramienta antiSMASH para medir la similitud que existe a nivel de secuencia entre NRPSs mediante la combinación de tres índices: el índice de Jaccard, que mide el grado de similitud que presentan los dominios; el índice de adyacencia, que compara los dominios contiguos que se comparten y el índice de similitud de secuencia. Al finalizar se generan dos tipos de archivos de salida, un archivo de texto que incluye archivos de red que pueden usarse para análisis utilizando otras herramientas bioinformáticas y un archivo de visualización interactiva.

5.3 Análisis pangenómico

Para determinar si las NRPS corresponden al genoma núcleo (familias de genes que se han encontrado presentes en todos los miembros de una especie en particular) o al genoma accesorio (familias de genes encontrados sólo en algunas genomas de una especie en particular) dentro del genoma de *Xenorhabdus*, se realizó un análisis pangenómico con el programa GET_HOMOLOGUES (disponible en https://github.com/ead-csic-compbio/get_homologues/releases) que utiliza tres métodos de agrupamiento: OrthoMCL (OMLC), COGtriangles (COG) y BDBH.

La información que proporciona GET_HOMOLOGUES es el perfil genético (contenido) de un pangenoma, el cual se divide en dos grupos: los genes esenciales (genoma core y genoma soft core) y los genes accesorios (genoma cloud y genoma shell). Las

nuevas tecnologías de secuenciación y la metagenómica han proporcionado un cambio de paradigma en la genómica microbiana, anteriormente había pocas comparaciones genómicas y hoy en día existen estudios pangenómicos masivos con diferentes escalas de resolución filogenética (Tettelin *et al.*, 2005).

5.4 Análisis de regiones promotoras

Se realizó un análisis *in silico* de las regiones promotoras de 3 genes que posiblemente codifiquen para una proteína que esté relacionada con una NRPS, los cuáles consideramos que son de mayor interés, esto para observar qué elementos se encuentran dentro de estas regiones y qué papel podrían estar desempeñando en la regulación de la transcripción. Con la herramienta antiSMASH se descargaron en formato FASTA las secuencias, separadas por clústers, en donde se encuentran cada uno de estos genes. En estas secuencias se encontraron las regiones codificantes para cada uno de los genes propuestos y se tomaron 600 bases río arriba del inicio de la transcripción.

Estas secuencias se procesaron con ayuda de BROM (disponible en <http://www.softberry.com/berry.phtml>), un programa de reconocimiento del promotor sigma70. BROM proporciona la posición aproximada de las regiones -10 y -35 del promotor y los posibles sitios de unión a factores de transcripción conocidos para cada uno de los promotores predichos.

6. Resultados

6.1 Potencial biosintético de metabolitos secundarios de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516

Para establecer el potencial biosintético del genoma de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516 se utilizó el programa antiSMASH versión 5.0. Se incluyeron en el análisis los genomas de 50 organismos con diferentes estilos de vida: simbioses de plantas, endófitos, de vida libre/suelo, simbioses de nemátodos, patógenos de insectos, patógenos de humanos, patógenos de plantas, simbioses de insectos y organismos marinos (Tabla 4). Los datos de los genomas se obtuvieron a partir de *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

En este estudio detectamos 1082 grupos de genes biosintéticos de diferentes clases, de donde 417 pertenecen a péptido sintetasas no ribosomales. En la Figura 7 se muestran los organismos y su potencial biosintético, que fueron las cepas de *Streptomyces*. Estas bacterias han sido estudiadas porque han mostrado tener una capacidad importante en la producción de varios tipos de moléculas de interés en medicina como antibióticos, inmunosupresores, etcétera. A pesar de que las cepas de género *Streptomyces* mostraron un potencial biosintético importante, no fueron las cepas que tuvieron un mayor potencial en lo que a péptido sintetasas no ribosomales se refiere. Tanto las cepas de *Xenorhabdus* como de *Photorhabdus* mostraron un mayor potencial en la producción de los complejos NRPSs, lo cual nos habla del papel tan importante que posiblemente tienen en su ciclo de vida y por ende en el establecimiento de la simbiosis bacteria-nemátodo.

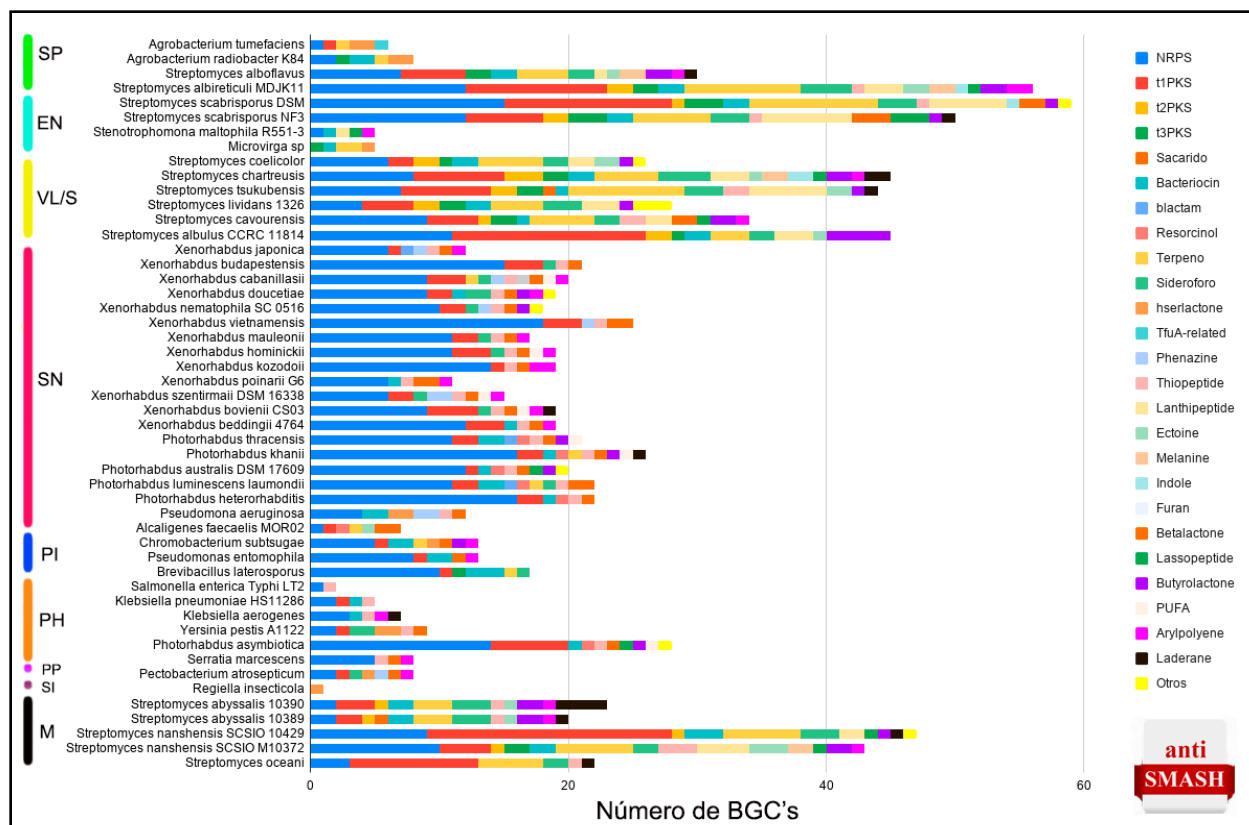


Figura 7. Gráfica en la que se muestra la diversidad de metabolitos producidos por distintos microorganismos y su potencial biosintético predicho con antiSMASH. Simbionte de planta (SP), endófito (EN), vida libre/suelo (VL/S), simbionte de nemátodos (SN), patógeno de insectos (PI), patógeno de humanos (PH), patógeno de plantas (PP), simbionte de insecto (SI), marino (M).

Xenorhabdus nematophila SC 0516 presenta distintos BGC ya reportados previamente para algunas cepas de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*. Uno de ellos fue la nematofina, un compuesto bioactivo que ha mostrado tener capacidad antibacterial contra algunas cepas de *Bacillus* y *Staphylococcus* resistentes a muchos antibióticos (Li, 1997). Además, la nematofina ha exhibido una potente capacidad antimicrobiana contra patógenos de plantas *in vitro* e *in vivo* (Zhang *et al.*, 2018), y se ha observado que esta molécula posee una actividad antifúngica eficaz contra *Exserohilum turcicum*, un agente causal del tizón foliar del maíz (Zhang *et al.*, 2019).

Otro BGC que se detectó en el genoma de *X. nematophila* fue el que posiblemente codifica para dos variables de la xenocoumacina: Xcn 1 y Xcn 2. Se ha reportado que estos compuestos exhiben una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas y una fuerte actividad antifúngica, además, estas moléculas tienen un importante potencial agrícola. También se ha demostrado que una mutante de *X. nematophila*, la mutante $\Delta cpxR$, la cual consistió en modificar los efectos sobre CPXR, un regulador de respuesta global asociado con el mutualismo y la patogénesis de *X. nematophila*, tuvo un aumento en su actividad antimicrobiana, por el aumento de la producción de Xcn1, 3.04 veces mayor que la del tipo salvaje *in vitro* e *in vivo* (Zhang et al., 2019).

Se detectó un grupo de genes que podrían estar relacionados con una o varias proteínas responsables de la síntesis del antibiótico odilorhabdina (ODL), las ODL han mostrado actividad contra patógenos gram positivos y gram negativos, incluyendo algunos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* que mostraban resistencia a carba-penémicos. Se demostró que las ODL interfieren con la síntesis de proteínas y se unen a la subunidad ribosomal pequeña en un sitio no explotado por algunos antibióticos actuales. Las ODL inducen una codificación errónea y promueven la lectura de codones hambrientos, la incorporación incorrecta de aminoácidos y la omisión prematura del codón de paro de la traducción (Pantel et al., 2018).

Por otra parte, también se identificó un BGC que pudiera estar relacionado con la producción del depsipéptido xenemátida, que ha sido reportado por mostrar una actividad antibacterial contra un panel de bacterias patogénicas. La xenemátida F mostró una potente actividad contra *P. aeruginosa*, mientras que la xenemátida G tuvo una actividad similar contra *B. subtilis* (Xi et al., 2019)

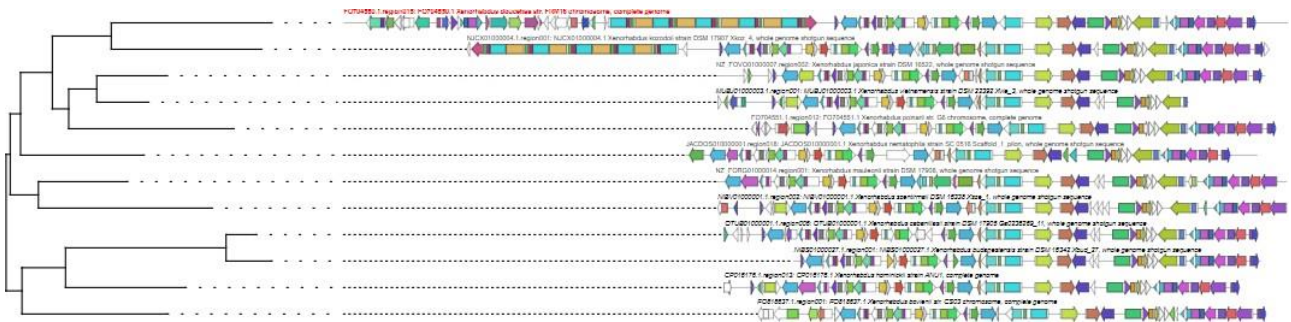
6.2 Análisis de redes por similitud de secuencia

Se utilizó el software de código abierto BIG-SCAPE (disponible en: <https://git.wageningenur.nl/medema-group/BiG-SCAPE/>) para el análisis de redes, esta herramienta utiliza genomas secuenciados como archivos de entrada para posteriormente clasificarlos en grupos de genes biosintéticos. Para ello se utilizaron los BGC que se obtuvieron del análisis de antiSMASH y se buscó en la base de datos MIBIG, en donde se encuentran todos los genes biosintéticos, para determinar si existen similitudes con BGC que han sido caracterizados. El resultado es una red de similitud de secuencia y un árbol de las familias de BGC, el cual muestra la similitud entre diferentes BGC, los árboles de las familias de BGC de interés se muestran a continuación (Figura 8).

FAM_00541



FAM_00475



FAM_00537

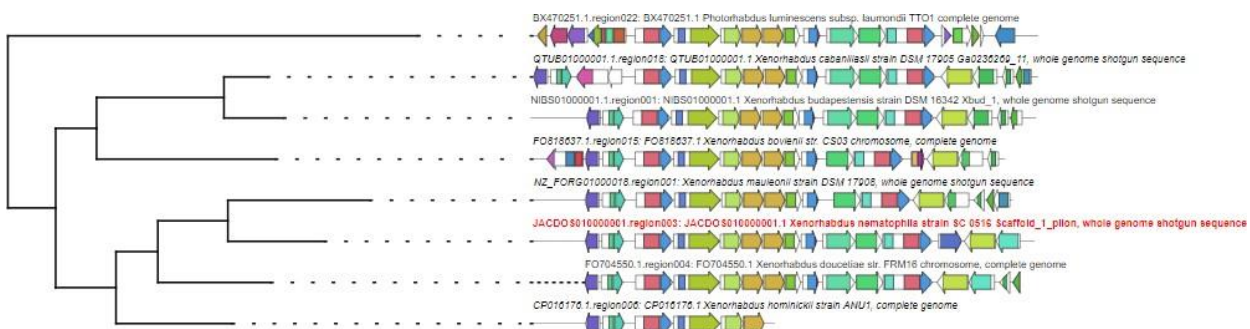


Figura 8. Árboles de los BGC propuestos para futuros análisis experimentales.

Se seleccionaron las familias FAM_00541, FAM_00475 Y FAM_00537 debido a que se conservan en algunos géneros de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, esto podría sugerir que estos genes se han conservado porque tienen alguna actividad importante dentro del ciclo de vida de estas bacterias. También se eligieron estas tres familias (Figura 9) ya que tienen un alto grado de similitud con otros grupos de genes y estos grupos de genes codifican proteínas que sintetizan componentes importantes en la relación simbiótica y que tienen un potencial importante en la biotecnología, ya que contribuyen a la venta de miles de millones de dólares en la industria química y farmacéutica. Es destacable mencionar que aproximadamente el 50% de los fármacos de uso clínico pertenecen al grupo de los péptidos no ribosomales o híbridos derivados de las NRPS/PKS, y la mayoría se han aislado de bacterias marinas, cianobacterias y hongos (Tobias *et al.*, 2017).

FAM_00541 (NRPS) (Odilorhabdina)



FAM_00475 (NRPS like) (Safracina A) (Livipeptina)



FAM_00537 (Sideróforo) (Putrebactin/avaroferrin)



Región 1.5 (NRPS) (Xenematida)



Figura 9. BGC seleccionados para análisis posteriores, entre paréntesis se muestra el tipo de metabolito secundario que el grupo de genes sintetiza y el metabolito secundario específico que mostró mayor similitud comparando con la base de datos MIBIG.

De acuerdo con los resultados de antiSMASH y el análisis de redes (BIG-SCAPE) se determinaron algunos BGC para análisis posteriores, a continuación, se mencionan los que se consideraron de mayor importancia tanto para entender su función en la

simbiosis nemátodo-bacteria como para su aprovechamiento de manera biotecnológica.

Se seleccionó un BGC de la FAM_00541 debido a que este cluster de genes sintetizan proteínas que están relacionadas con una péptido sintetasa no ribosomal llamada odilorhabdina, antes reportado también con el programa antiSMASH, presenta un porcentaje de identidad de 100% comparando con las bases de datos de MiBIG, esta base de datos tiene alojados los BGC que han sido elucidados experimentalmente hasta la fecha. De acuerdo con lo reportado (Pantel *et al.*, 2018; Racine, E. & Gualtieri, M., 2019) las odilorhabdinas muestran un alto potencial como una nueva clase de antibiótico, esto es de gran importancia ante la creciente resistencia de las bacterias patógenas y la escasez de plataformas de descubrimiento de antibióticos

De la misma manera se seleccionó un BGC de la FAM_00475 que presenta un grupo de genes que codifican algunas proteínas que podrían estar relacionada con dos posibles NRPS, por un lado comparando con la base de datos de MiBIG obtenemos un porcentaje de identidad del 40% con la safracina, un antibiótico con actividad anti-tumoral producido por *Pseudomonas fluorescens* (Velasco *et al.*, 2005) y por otra parte encontramos un porcentaje de identidad del 32% con una livipeptina, un aldehído de péptidos pequeños (SPAs) con actividad inhibidora de proteasas, identificada en *Streptomyces lividans*, se cree que esta molécula podría, junto con otras inhibidoras de proteasas, ser el centro de la biología de *Streptomyces* (Aguilar *et al.*, 2020, Chater *et al.*, 2010)

Dentro de la FAM_00537 se encontró un BGC que contiene algunos genes posiblemente relaciones con la producción de sideróforos, compuestos de bajo peso molecular con alta afinidad por el hierro férrico, la adquisición de hierro y su almacenamiento intracelular son requisitos previos para una invasión exitosa del huésped por un patógeno. Este BGC tuvo un 63% de identidad, comparado con la base de datos MiBIG, con un clúster de genes de *Xenorhabdus budapestensis*, en donde se identificaron 4

sideróforos (aerobactina, putrebactina, avaroferrina y orobactina C) que anteriormente sólo se habían encontrado en bacterias marinas (Hirschmann *et al.*, 2017).

Por otra parte, se eligió un BGC debido a que presenta un gen que codifica a una proteína encargada de la síntesis de una NRPS, la xenematida y aunque este BGC no se agrupó en ninguna familia, el gen presenta un porcentaje de identidad de secuencia del 99% comparando con la base de datos de MIBIG. Este compuesto ha sido altamente eficaz contra bacterias gram positivas y contra patógenos fúngicos y oomicetos.

6.3 Pangenoma de *Xenorhabdus*

Usando el software GET_HOMOLOGUES (Vinuesa *et al.*, 2013), para determinar si las NRPS forman parte del genoma núcleo o genoma accesorio, se obtuvo el tamaño del genoma núcleo (genoma core) y el genoma accesorio. Esto se realizó usando tres algoritmos de agrupamiento de genes ortólogos (BDBH, OMCL y COG), se determinó el tamaño del genoma núcleo que corresponde a 507 genes, el pangenoma (todas las familias de genes presentes en un determinado grupo de organismos) se calculó con dos algoritmos (COG y OMCL) y el consenso de los dos algoritmos fue de 13, 667 genes que conforman el pangenoma de 45 cepas de *Xenorhabdus*.

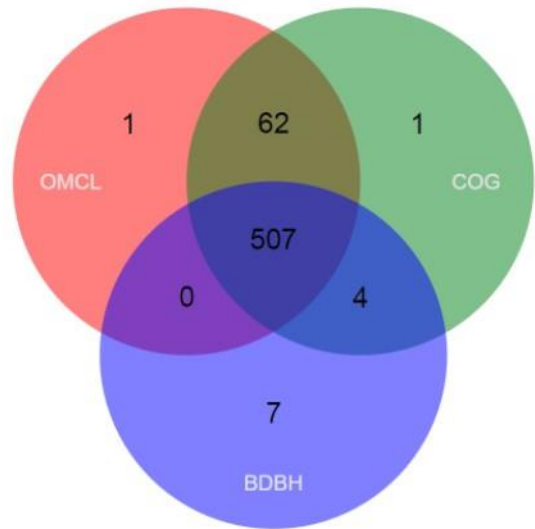
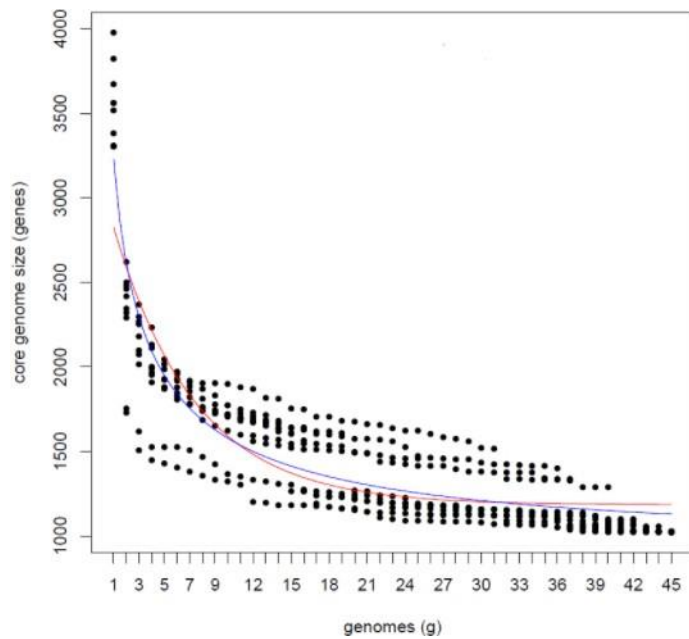


Figura 10. Estimación del tamaño del genoma núcleo ajustado al modelo de Tettelin *et al.*, 2008. B) Diagrama de Venn que muestra el consenso de ortólogos agrupados por los algoritmos BDBH, COG y OMCL para estimar el tamaño del genoma núcleo.

Después de estimar el tamaño del pangenoma y genoma núcleo se trazaron los modelos exponenciales de Tettelin *et al.*, 2008. De acuerdo con este modelo, el pangenoma de las cepas analizadas de *Xenorhabdus* es un pangenoma abierto, a medida que se agregan más genomas al análisis la cantidad de genes nuevos sigue aumentando.

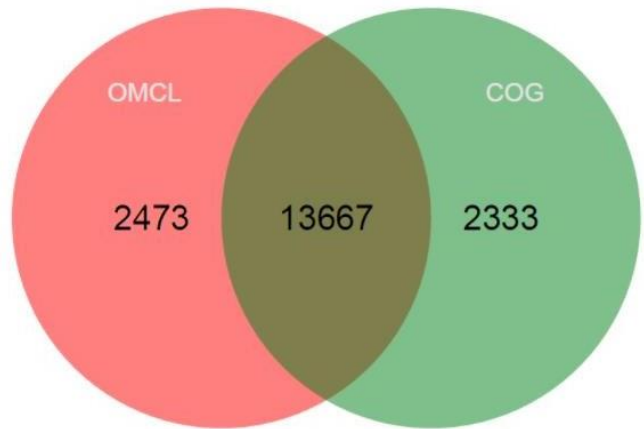
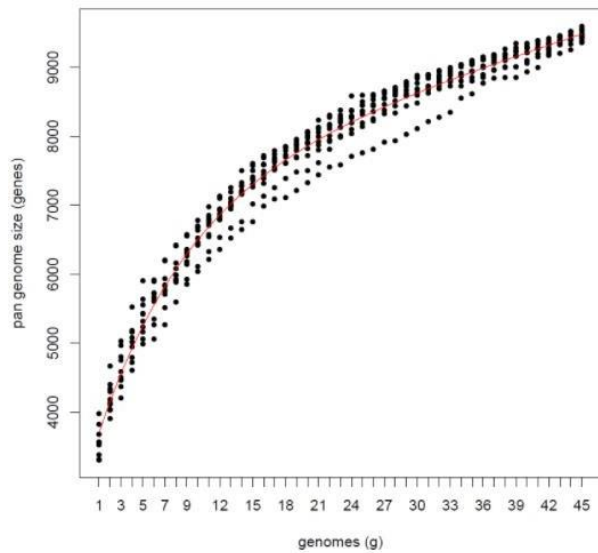


Figura 11. Estimación del tamaño del pangenoma ajustado al modelo de Tettelin *et al.*, 2008. B) Diagrama de Venn que muestra el consenso de ortólogos agrupados por los algoritmos COG y OMCL para estimar el tamaño del pangenoma.

Por otra parte, se determinó el tamaño del genoma cloud o nube (genes que se encuentran sólo en algunas especies del análisis) y el genoma core o núcleo (genes que están presentes en todos los organismos incluidos en el análisis). Se identificaron un total de 13,667 genes; 8260 en el genoma cloud, 3577 en el genoma shell, 1830 en el soft-core y 1134 en el genoma core.

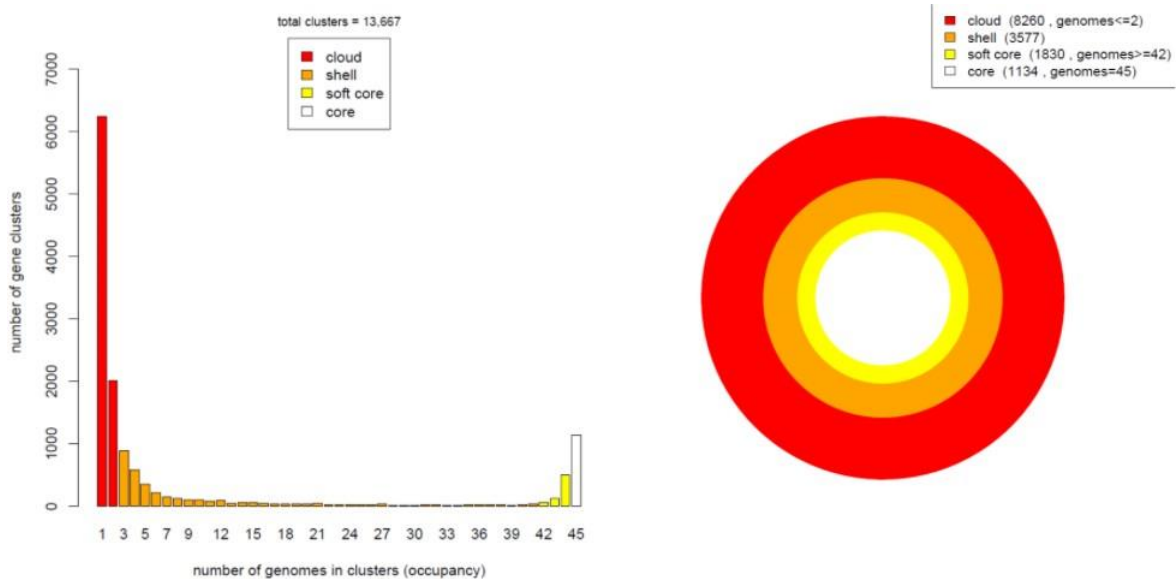


Figura 12. Estimación del tamaño del genoma cloud y genoma core.

También se realizó la búsqueda de NRPS en el pangenoma de *Xenorhabdus* y se encontró que dentro del genoma cloud/nube se identificaron 12 NRPS, dentro del genoma shell 5 NRPS y tanto en el genoma core/núcleo como en el soft-core no se identificaron NRPS.

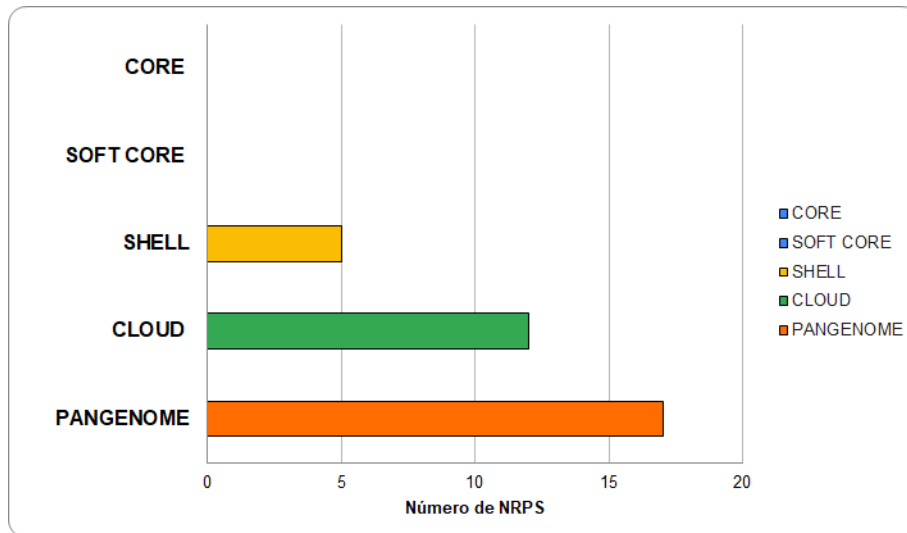


Figura 13. Distribución de NRPS dentro del pangenoma de *Xenorhabdus*.

6.4 Análisis de regiones promotoras

Utilizando el programa BPROM (disponible en <http://www.softberry.com/berry.phtml>), que reconoce el promotor sigma70, se obtuvieron las posibles regiones promotoras de tres genes de interés que participan en la síntesis de NRPS. También se obtuvieron las regiones de la zona promotora en donde estarían interactuando factores de transcripción para la regulación de ésta.

A continuación, se mencionan las tres regiones que se analizaron, con sus posibles sitios de unión a factores de transcripción.

Región 1

La primera región promotora que se analizó fue de la secuencia que posiblemente codifica para una policétido sintasa envuelta en la síntesis de una xenocoumacina, un péptido no ribosomal con actividad antimicrobiana y de inhibición del sistema inmune

de insectos que se mantiene conservados en distintas especies dentro del género *Xenorhabdus*. En esta región el programa BPROM predijo solamente un promotor, tanto su secuencia como las cajas -10 y -35 se muestra en la **tabla 5**. BROM también mostró sitios de unión a factores transcripcionales y el elemento que interactúa con esta zona, en este caso el algoritmo predijo dos elementos para el promotor predicho: la proteína represora de metionina, MetJ, que controla la expresión de genes involucrados en la biosíntesis y el transporte de metionina en *E. coli* (Augustus, A., Sage, H. y Spicer, L., 2010) ; y el factor de integración de huésped (IHF), una proteína de unión y flexión del ADN con funciones en la organización estructural del ADN local y en la regulación transcripcional de bacterias gran-negativas (Mangan *et al.*, 2006).

Por otra parte, también se analizó esta región con la herramienta fgenesB (disponible en <http://www.softberry.com/berry.phtml>), un conjunto de programas de predicción de genes y operones bacterianos basado en patrones/cadenas de Markov. fgenesB proporciona el número de genes predichos para la secuencia analizada, el inicio y final del posible gen en la secuencia y la secuencia en aminoácidos. Después, esta secuencia se analizó mediante la herramienta SmartBLAST (disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y mostro que posiblemente se trata de una betalactamasa que se encuentra unas 500 bases arriba del inicio de transcripción. Las betalactamasas son enzimas que inactivan antibióticos tales como la penicilina, cefalosporina, carbapenémicos, entre otros.

Región 2

La segunda región promotora que se analizó fue la secuencia que posiblemente codifica para una proteína relacionada en la síntesis de una odilorhabdina, antibiótico que ha mostrado afectividad contra patógenos gram positivos y gram negativos, las odilorhabdinas se unen a la subunidad pequeña ribosomal e inducen errores en la codificación promoviendo la incorporación incorrecta de aminoácidos y la omisión de codones de parada (Patel *et al.*, 2018), esto es importante ya que es un sitio que los antibióticos actuales no han explotado aún. En esta región el programa BPROM predijo

solamente un promotor, tanto su secuencia como las cajas -10 y -35 se muestra en la **tabla 5**. En este caso BPRM predijo 5 posibles sitios de unión a factores transcripcionales para el promotor predicho:

- **fnr**: sitio de unión a la proteína reguladora de la reducción de fumaratos y nitratos, factor de transcripción global que controla la expresión de más de 100 genes en respuesta a la anoxia (disminución del aporte de oxígeno) y que en *E. coli* regulan la respuesta global a la transición entre el crecimiento aeróbico y anaeróbico (Scott **et al.**, 2003).
- **arcA**: miembro de un sistema regulador compuesto por arcA y arcB, estos reprimen una amplia variedad de enzimas aeróbicas en condiciones anaeróbicas (Sawers **et al.**, 1997) participa en la resistencia a los colorantes en *E. coli*, indispensable para la expresión de genes de la fosfatasa alcalina y del factor sexual F (Drury, L., and Buxton, R., 1985).
- **purR**: el factor de transcripción PurR juega un papel fundamental en la regulación transcripcional del metabolismo de las purinas en las enterobacterias. Una cepa de *e. coli* que carece del gen de PurR mostró que un total de 56 genes se vieron afectados por su eliminación. Se mostró que el 73% de los genes regulados directamente por PurR estaban enriquecidos en la biosíntesis, utilización y transporte de nucleótidos de purina y pirimidina, y el 20% de ellos eran funcionalmente desconocidos (Cho **et al.**, 2011).
- **cpxR**: proteína reguladora cpxR parece controlar al menos 100 operones (De Wulf **et al.**, 1999), algunos de ellos están involucrados en funciones celulares como el sistema de respuesta al estrés de la envoltura, ensamblaje de pilus, la secreción, motilidad, quimiotaxis, desarrollo de biopelículas, resistencia a fármacos, entre otros (Dorel **et al.**, 2006). En las bacterias patógenas controla genes implicados en la invasión de las células huésped (Raivio, 2005). A veces actúa para modular la acción de los principales activadores o represores de algunos promotores (Dorel **et al.**, 2006).

- **hipB**: una proteína de unión al DNA en *E. coli*, regula negativamente su propio promotor al unirse a secuencias palindrómicas en el promotor hipBA. Componente antitoxina de un sistema toxina-antitoxina de tipo II, neutraliza el efecto tóxico de la toxina afín HipA (Lin *et al.*, 2013).

Esta región también se analizó con la herramienta fgenesB. Después, esta secuencia se analizó mediante la herramienta SmartBLAST y mostró que posiblemente se trata de un gen que posiblemente sintetice una enzima perteneciente a una súper familia de dominio cupin rmlC-like, estas enzimas están implicadas en la síntesis de L-ramnosa, un sacárido necesario para la virulencia de algunas bacterias patógenas (Giraud *et al.*, 2000)

Región 3

La última región promotora que se analizó fue la secuencia que posiblemente codifica para una proteína relacionada en la síntesis de un sideróforo (putrebactin/avoferrin), estas proteínas son importantes en la adquisición de hierro y su almacenamiento ya que son requisitos importantes previos a una invasión exitosa de un huésped por un patógeno. En esta región el programa BPRM predijo solamente un promotor, tanto su secuencia como las cajas -10 y -35 se muestra en la **tabla 5**. En este caso BPRM predijo varios sitios de unión a factores transcripcionales para el promotor predicho, entre los que destacan:

- **argR2**: junto con argR1 y ahrC regulan el metabolismo de la arginina, argR2 regula la vía de biosíntesis de L-arginina, que forma parte de la biosíntesis de aminoácidos (Schulz *et al.*, 2014).
- **rpoD16**: factor sigma, factor de iniciación que promueve la unión de la ARN polimerasa a sitios de iniciación específicos y luego se liberan. Este factor sigma es el factor principal durante el crecimiento exponencial, preferentemente transcribe genes asociados con un crecimiento rápido, como operones ribosomales,

otros genes relacionados con la síntesis de proteínas, genes que codifican rRNA, tRNA y prfB (Maciag *et al.*, 2011).

- **tyrR**: factor de transcripción regula genes implicados en la captación y biosíntesis de aminoácidos aromáticos en enterobacterias. Los genes pueden regularse positiva o negativamente dependiendo de la presencia o ausencia de cada aminoácido aromático, los tres funcionan como cofactores para TyrR (Coulson, T. and Patten, C., 2015).

Tabla 5. Genes de interés que el programa BPROM predijo para tres regiones promotoras de *Xenorhabdus nematophila* SC0516, se muestran las secuencias de los promotores, sus cajas de regulación y los posibles factores de transcripción que se unirían.

Gen de interés	Secuencia del promotor	Caja -10	Caja -35	Factores de transcripción
Xenocoumacina	TATTGGCTTATGACTGAATGAATCTATTGAG CTAAAATAAACTGAA	ATGACT	AGCTAAAAT	<ul style="list-style-type: none"> • metJ • thf
Odilorhabdina	AACTTGAAAGAAGAAAGGTATATCAATAAT AAAAAGATAA	TTGAAA	ATCAATAAT	<ul style="list-style-type: none"> • fnr • arcA • purR • cpxR • hipB
Putrebactin/Avoferrin	TTATTGTCACAATGAAAATATTTATTAATTA AATAAAAACAATTGTTATATTTCA	TTATT	TGTTATTAT	<ul style="list-style-type: none"> • argR2 • nagC • phoB • hns • tyrR • ihf • arcA • lexA • soxs • rpoD16

7. Discusión

El presente trabajo pretende contribuir en la determinación del papel que tienen las NRPS en la relación simbiótica nematodo-bacteria, ya que en los últimos años se ha determinado de manera importante la diversidad de metabolitos secundarios que están codificados en los genomas del género *Xenorhodus*, esto debido a su potencial biotecnológico (actividad insecticida y antibiótica).

Las péptido sintetetasas no ribosomales, complejos multienzimáticos, producen la mayoría de los metabolitos secundarios presentes en el género *Xenorhabdus*, por ello se realizó un análisis con la plataforma antiSMASH, para determinar el potencial metabólico que tiene la cepa *Xenorhabdus nematophila* SC 0516.

Se identificaron 12 grupos de genes biosintéticos presentes dentro del genoma de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516 que corresponden a NRPS. Dentro de los 12 grupos de genes se encontraron algunos que mostraron similitud con BGC que ya habían sido caracterizado experimentalmente como la nematofina, un compuesto con capacidad antibacterial, sobre todo en cepas resistentes a algunos antibióticos, y actividad antifúngica contra el agente causal del tizón foliar del maíz. También se encontró un grupo de genes que posiblemente codifican para una xenocoumacina, la cual ha mostrado tener una amplia actividad antimicrobiana y antifúngica, además se ha probado que tienen un papel importante en la patogénesis de *X. nematophila*. Además, se detectó un grupo de genes posiblemente relacionados con la síntesis de la odilorhabdina, un potente antibiótico que interfiere con la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad ribosomal pequeña, sitio que no se ha explotado por los antibióticos actuales, desde el punto de vista de la biotecnología es interesante haber identificado una posible odilorhabdina o variante de la misma ya que es uno de los antibióticos más prometedores en los últimos años (Pantel *et al.*, 2018; Witzky *et al.*, 2019).

Es posible que los genes de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516, que tienen similitud con los BGC (ya caracterizados experimentalmente), tengan actividad similar. Esta actividad o actividades podrían estar relacionadas con el complejo nematodo-bacteria en el cual se utilizan diferentes moléculas con diversas actividades: actividad bacteriana para proteger al cadáver del insecto de competidores, actividad de inhibición del sistema inmune del insecto presa, por mencionar algunas.

Para determinar los BGC que se conservan entre las especies del género *Xenorhabdus*, y que ya han sido caracterizados experimentalmente, se utilizó el BIG-SCAPE para hacer un análisis de redes basados en similitud de secuencia.

Los resultados de este análisis se identificaron 3 familias de BGC (Figura 8) que ya habían sido caracterizados anteriormente (reportados en la base de datos MIBiG) dentro del genoma de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516, estas familias posiblemente codifican para NRPS como: odilorhabdina o (Pantel *et al.*, 2018; Racine, E. & Gualtieri, M., 2019), safracina (Velasco *et al.*, 2005), livipeptina (Aguilar *et al.*, 2020, Chater *et al.*, 2010) y aerobactina/putrebactina (Hirschmann *et al.*, 2017).

Además de las familias y clúster de genes propuestos también sería interesante hacer más análisis sobre otros compuestos dentro de *Xenorhabdus nematophila* SC05, como por ejemplo la tilivalina, se encontró un grupo de genes que presentan un porcentaje de identidad del 51% con una tilivalina en la Región 1.17 del análisis hecho por antiSMASH, este compuesto fue descrito en *Klebsiella oxytoca* y supuestamente está involucrado en la ruptura de la barrera epitelial (Altenhoff *et al.*, 2015), de manera similar puede estar involucrado en la alteración de la barrera epitelial del intestino del insecto, lo que proporcionaría un mecanismo de entrada al hemocele para el nemátodo durante el proceso de infección. Cabe resaltar que la tilivalina ya ha sido descrita en otras especies de *Xenorhabdus*, pero no en *X. nematophila* (Tobias *et al.*, 2017).

De la misma manera, se realizó un análisis pangenómico de *Xenorhabdus* para obtener información del pangenoma (todas las familias de genes presentes en un determinado grupo de organismos) e identificar si las NRPS forman parte del genoma núcleo (genes que están presentes en todos los organismos incluidos en el análisis) o en el genoma nube (genes presentes sólo en algunos organismos). Los resultados del análisis mostraron que el tamaño del pangenoma es de 13, 667 genes, esto con el consenso de dos algoritmos (COG y OMCL) y un genoma núcleo de 507 genes, usando tres algoritmos (BDBH, MOCL y COG) (Figuras 10 y 11).

Por otra parte se trazaron los modelos exponenciales de Tettelin *et al.*, 2008, en los estimados del pangenoma, y de acuerdo a dicho modelo el pangenoma de las cepas analizadas es un pangenoma abierto, es decir que a medida que se agregan más genomas al análisis la cantidad de genes nuevos sigue aumentando (Figura 11). Algo interesante de estos resultados es que los pangenomas abiertos se suelen relacionar con organismos de vida libre, porque requieren un amplio repertorio de genes debido a las condiciones tan variables en las que se desarrollan, y como se ha observado las bacterias del género *Xenorhabdus* no se han encontrado en vida libre en el suelo o en el agua.

Dentro del genoma cloud se identificaron 12 genes correspondientes a NRPS, en el genoma shell 5 y tanto en el genoma core como en el soft core no se identificó ningún gen correspondiente a NRPS. En este sentido el genoma core/núcleo corresponde a genes que podríamos considerar esenciales para la supervivencia de estos organismos y el genoma cloud/nube es el repertorio de genes que les facilitan colonizar nuevos nichos. Por lo que debido a que las NRPS forman parte del genoma nube, se podría decir que no son esenciales para la supervivencia de la bacteria, sin embargo, es probable que tengan un papel importante y confieran ventajas para establecerse en un determinado nicho.

8. Conclusiones

- La bacteria *Xenorhabdus nematophila* SC 0516 tiene un potencial importante para la producción de metabolitos secundarios, en especial para las péptido sintetetasas no ribosomales.
- El análisis tanto con antiSMASH como con BIG-SCAPE nos mostró la presencia de diferentes tipos de NRPSs en *Xenorhabdus nematophila* SC0516, pero las que se eligieron para futuros análisis fueron las presentes en las familias FAM_00541, FAM_00475 Y FAM_00537, como potencialmente importantes en el ciclo nemátodo-bacteria y por su posible importancia biotecnológica.
- Los resultados del análisis pangenómico mostraron que las NRPS de las cepas de *Xenorhabdus* que fueron analizadas, forman parte del genoma accesorio en donde, normalmente, encontramos genes que confieren ventajas bajo presión de selección, por lo que probablemente tengan un papel importante para el establecimiento en un determinado nicho.
- Este tipo de análisis son importantes y necesarios para comprender la ecología química tan diversa de estos organismos y ello puede conducir al descubrimiento de otros compuestos importantes con aplicaciones en la agricultura o la medicina, como se ha sugerido en otros estudios.

9. Perspectivas

- Generar mutantes de los BGC propuestos en *Xenorhabdus nematophila* SC 0516 para determinar la importancia que tienen en la relación simbiótica nematodo-bacteria.
- Comprobar si hay una diferencia entre la cepa SC 0516 y la mutada con respecto a la virulencia en el modelo de *Galleria mellonella*.

10. Bibliografía

Aguilar, C., Verdel-Aranda, K., Ramos-Aboites, H., Morales, M., Licon-Cassani, C., Barona-Gómez, F. (2020) Convergent evolution of *Streptomyces* protease inhibitors involving a tRNA-mediated condensation-minus NRPS. bioRxiv 2020.10.26.356543; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.26.356543>

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.

Altenhoff A., Škunca N, Glover N, Train CM, Sueki A, Piližota I, Gori K, Tomiczek B, Müller S, Redestig H, Gonnet GH, Dessimoz C. The OMA orthology database in 2015: function predictions, better plant support, synteny view and other improvements. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(Database issue):D240-9. doi: 10.1093/nar/gku1158. Epub 2014 Nov 15. PMID: 25399418; PMCID: PMC4383958.

Augustus, A., Sage, H., and Spiceí, L. (2010). Binding of MetJ íepíessoí to specific and nonspecific DNA and effect of S-adenosylmethionine on these inteíac-tions. *Biochemistíy*, 49(15), 3289–3295. <https://doi.oíg/10.1021/bi902011f>

Bintrim, S.B., and Ensign, J.C. (1998). Insertional inactivation of genes encoding the crystalline inclusion proteins of *Photorhabdus luminescens* results in mutants with pleiotropic phenotypes. *J Bacteriol* 180: 1261– 1269.

Bode, HB. (2009) Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Curr Opin Chem Biol.* 2009;13(2):224-230. doi:10.1016/j.cbpa.2009.02.037

Boemare, N. E., C. Laumond, and J. Luciani. (1982). Mise en évidence d'une toxic gènèse provoquée par le nématode entomophage *Neoaplectana carpocapsae* Weiser chez l'insecte *Galleria mellonella* L. C. R. Acad. Sci. Paris, Sér. III 295:543–546.

Boemare, N. E., R. J. Akhurst, and R. G. Mourant. (1993). DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43:249–255.

Boemare, N., & Akhurst, R. (2006). The genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In The prokaryotes Springer, New York, NY. (pp. 451-494).

Brachmann, A. O., Brameyer, S., Kresovic, D., Hitkova, I., Kopp, Y., C. Manske, K. Schubert, H. B. Bode and R. Heermann, Nat. (2013). Chem. Biol., 2013, 9, 573–578.

Cho, B., Federowicz, S., Embree, M., Park, Y., Kim, D., & Palsson, B. (2011). The PurR regulon in Escherichia coli K-12 MG1655. *Nucleic acids research*, 39(15), 6456–6464. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr307>

Cole, JR., Wang, Q., Fish, JA. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D633-D642. doi:10.1093/nar/gkt1244

Coulson, T. and Patten, C. (2015). The TyrR transcription factor regulates the divergent akr-ipdC operons of Enterobacter cloacae UW5. *PLoS One.* 2015 Mar 26;10(3):e0121241. doi: 10.1371/journal.pone.0121241. PMID: 25811953; PMCID: PMC4374768.

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 KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6;97(12):6640-5. doi: 10.1073/pnas.120163297. PMID: 10829079; PMCID: PMC18686.

De Wulf, P., Kwon, O., Lin, EC. (1999). The CpxRA signal transduction system of *Escherichia coli*: growth-related autoactivation and control of unanticipated target operons., *J Bacteriol* 181(21):6772-8.

Donmez Ozkan, H., Cimen H., Ulug D., Wenski S., Yigit Ozer S., Telli M., Aydin N., Bode, HB. and Hazir, S. (2019). Nematode-Associated Bacteria: Production of Antimicrobial Agent as a Presumptive Nominee for Curing Endodontic Infections Caused by *Enterococcus faecalis*. *Front. Microbiol.* 10:2672. doi: 10.3389/fmicb.2019.02672

Dorel, C., Lejeune, P., Rodriguez, A. (2006). The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities?, *Res Microbiol* 157(4):306-14.

Drury, L., and Buxton, R. (1985). DNA sequence analysis of the dye gene of *Escherichia coli* reveals amino acid homology between the dye and OmpR proteins. *J Biol Chem*. 1985 Apr 10;260(7):4236-42. PMID: 2984198.

Farmer, J. J., J. H. Jorgensen, P. A. D. Grimont, R. J. Akhurst, G. O. J. Poinar, E. Ageron, G. V. Pierce, J. A. Smith, G. P. Carter, K. L. Wilson, and F. W. Hickman-Brenner. (1989). *Xenorhabdus luminescens* (DNA hybridization group 5) from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 27:1594–1600.

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.

Giraud, M., Leonard, G., Field, R., Berlind, C., Naismith, J. (2000). RmlC, the third enzyme of dTDP-L-rhamnose pathway, is a new class of epimerase. *Nature Structural Biology.* 2000 May;7(5):398-402. DOI: 10.1038/75178. PMID: 10802738.

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.

Goetsch, M., Owen, H., Goldman, B., & Forst, S. (2006). Analysis of the PixA inclusion body protein of *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of bacteriology*, 188(7), 2706-2710. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2706-2710.2006>

Götz, P., A. Boman, and H. G. Boman. (1981). Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 212:3337–3350.

Herbert EE, Goodrich-Blair H. Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. (2007). *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(8):634-646. doi:10.1038/nrmicro1706

Herrmann, J., Fayad, A. A. and Muller, R. (2017) . *Nat. Prod. Rep.*, 2017, 34, 135–160.

Hinchliffe, S. J., Hares, M. C., & Dowling, A. J. (2010). Insecticidal toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria. *The Open Toxinology Journal*, 3(1).

Hirschmann M, Grundmann F, Bode HB. Identification and occurrence of the hydroxamate siderophores aerobactin, putrebactin, avaroferrin and ochrobactin C as virulence factors from entomopathogenic bacteria. *Environ Microbiol.* 2017

Oct;19(10):4080-4090. doi: 10.1111/1462-2920.13845. Epub 2017 Jul 21. PMID: 28654175

Joyce, S. A., Brachmann, A. O., Glazer, I., Lango, L. , Schwar, G., Clarke, D. J. and Bode, H. B. (2008). *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 2008, 47, 1942–1945.

Li J, Chen G, Webster JM. (1997) Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *Can J Microbiol.* Aug;43(8):770-3. doi: 10.1139/m97-110. PMID: 9304787

Li J, Hu K, Webster JM: Antibiotics from *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). (1998). *Chem Heterocycl Comp* 1998, 34:1331-1339.

Lin, C., Awano, N., Masuda, H., Park J., Inouye, M. (2013). Transcriptional repressor HipB regulates the multiple promoters in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2013;23(6):440-7. doi: 10.1159/000354311. Epub 2013 Sep 27. PMID: 24089053.

Maciag, A., Peano, C., Pietrelli, A., Egli, T., De Bellis, G., Landini, P. (2011) In vitro transcription profiling of the σ_S subunit of bacterial RNA polymerase: re-definition of the σ_S regulon and identification of σ_S -specific promoter sequence elements. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jul;39(13):5338-55. doi: 10.1093/nar/gkr129. Epub 2011 Mar 11. PMID: 21398637; PMCID: PMC3141248.

Mangan, M., Lucchini, S., Danino, V., Cróinín, TO., Hinton, JC., and Dorman, CJ. (2006). The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol.* 2006 Mar;59(6):1831-47. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05062.x. PMID: 16553887.

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., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E., & Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids research*, 39(Web Server issue), W339–W346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>

McInerney BV, Taylor WC, Lacey MJ, Akhurst RJ, Gregson RP: Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastr protective activity. (1991). *J Nat Prod* 1991, 54:785-795.

Pantel L., Florin T., Dobosz-Bartoszek M., Racine E., Sarciaux M., Serri M. (2018). Odilorhabdins, antibacterial agents that cause miscoding by binding at a new ribosomal site. *Mol Cell* 70 83–94. 10.1016/j.molcel.2018.03.001

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.

Racine, E., & Gualtieri, M. (2019). From Worms to Drug Candidate: The Story of Odilorhabdins, a New Class of Antimicrobial Agents. *Frontiers in microbiology*, 10, 2893. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02893>

Rainey, F. A., R.-U. Ehlers, and E. Stackebrandt. (1995). Inability of the polyphasic approach to systematics to determine the relatedness of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:379–381.

Raivio, T. (2005) Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis., *Mol Microbiol*, 56(5):1119 10.1111/j.1365-2958.2005.04625.x

Reimer, D., Cowles, K. N., Proschak, A., Nollmann, F. I., Dowling, A. J., Kaiser, M., Goodrich-Blair, H. and Bode, H. B. (2013). *ChemBioChem*, 2013, 14, 1991–1997.

Reimer, D., Nollmann, F. I., Schultz, K., Kaiser, M. and Bode, H. B. (2014). *J. Nat. Prod.*, 2014, 77, 1976–1980.

Sawers G., Kaiser, M., Sirko, A., Freundlich, M. (1997). Transcriptional activation by FNR and CRP: reciprocity of binding-site recognition. *Mol Microbiol.* 1997 Feb;23(4):835-45. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.2811637.x. PMID: 9157253.

Scott, C., Partridge, J., Stephenson, J., Green, J. (2003). DNA target sequence and FNR-dependent gene expression. *FEBS Letters*, Volume 541, Issues 1-3, 97-101. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00312-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00312-0).

Schulz, C., Gierok, P., Petruschka, L., Lalk, M., Mäder, U., Hammerschmidt, S. (2014). Regulation of the arginine deiminase system by ArgR2 interferes with arginine metabolism and fitness of *Streptococcus pneumoniae*. *mBio*. 2014 Dec 23;5(6):e01858-14. doi: 10.1128/mBio.01858-14. PMID: 25538192; PMCID: PMC4278536.

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.

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 *Photorhabdus luminescens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 402-407.

Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., ... & DeBoy, R. T. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 13950-13955.

Tettelin H., Riley D., Cattuto C. & Medini, D. (2008) Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr Opin Microbiol.* 2008 Oct;11(5):472-7. doi: 10.1016/j.mib.2008.09.006. PMID: 19086349

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 *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *Nature microbiology*, 2(12), 1676.

Velasco, A., Acebo, P., Gomez, A., Schleissner, C., Rodríguez, P., Aparicio, T., Conde, S., Muñoz, R., De La Calle, F., Garcia, J.L. and Sánchez-Puelles, J.M. (2005), Molecular characterization of the safracin biosynthetic pathway from *Pseudomonas fluorescens* A2-2: designing new cytotoxic compounds. *Molecular Microbiology*, 56: 144-154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04433.x>

Vinuesa, P. & Contreras-Moreira, B., (2013). GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Applied and environmental microbiology*, 79(24), 7696–7701. <https://doi.org/10.1128/AEM.02411-13>

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.

Xi, X., Lu, X., Zhang, X., Yuhui, B., Xiaochun, L. & Zhiguo, Y. (2019). Two novel cyclic depsipeptides Xenematides F and G from the entomopathogenic bacterium

Xenorhabdus budapestensis. *J Antibiot*72, 736–743 (2019).
<https://doi.org/10.1038/s41429-019-0203-y>

Zhang, S., Fang, X., Tang, Q., Ge, J., Wang, Y., & Zhang, X. (2019). CpxR negatively regulates the production of xenocoumacin 1, a dihydroisocoumarin derivative produced by *Xenorhabdus nematophila*. *MicrobiologyOpen*, 8(2), e00674.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.674>

Zhang, S., Liu, Q., Han, Y., Han, J., Yan, Z., Wang, Y., & Zhang, X. (2019). Nematophin, an Antimicrobial Dipeptide Compound From *Xenorhabdus nematophila* YL001 as a Potent Biopesticide for *Rhizoctonia solani* Control. *Frontiers in microbiology*, 10, 1765. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01765>

Zhou, X., Kaya, H. K., Heungens, K. And Goodrich-Blair, H. (2002). *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 6202–6209.

11. Anexo

11.1 Material suplementario

Tabla 4. Lista de organismos empleados en el estudio para establecer el potencial biosintético de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516

Organismo	Estilo de vida	Organismo	Estilo de vida
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Simbionte de plantas	<i>Xenorhabdus bovienii</i> CS03	Simbionte de nemátodos
<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	Simbionte de plantas	<i>Xenorhabdus beddingii</i> 4764	Simbionte de nemátodos
<i>Streptomyces alboflavus</i>	Simbionte de plantas	<i>Photorhabdus thracensis</i>	Simbionte de nemátodos
<i>Streptomyces albireticuli</i> MDJK11	Simbionte de plantas	<i>Photorhabdus kharii</i>	Simbionte de nemátodos
<i>Streptomyces scabrisporus</i> DSM	Endófito	<i>Photorhabdus australis</i> DSM 17609	Simbionte de nemátodos
<i>Streptomyces scabrisporus</i> NF3	Endófito	<i>Photorhabdus luminescens laumondii</i>	Simbionte de nemátodos
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	Endófito	<i>Photorhabdus heterorhabditis</i>	Simbionte de nemátodos
<i>Microvirga</i> sp	Endófito	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Simbionte de nemátodos
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Vida libre/suelo	<i>Alcaligenes faecalis</i> MOR02	Simbionte de nemátodos
<i>Streptomyces chartreusis</i>	Vida libre/suelo	<i>Chromobacterium subtsugae</i>	Patógeno de insecto
<i>Streptomyces tsukubensis</i>	Vida libre/suelo	<i>Pseudomonas entomophila</i>	Patógeno de insecto
<i>Streptomyces lividans</i> 1326	Vida libre/suelo	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Patógeno de insecto
<i>Streptomyces cavourensis</i>	Vida libre/suelo	<i>Salmonella enterica</i> Typhi LT2	Patógeno de humanos
<i>Streptomyces albulus</i> CCRC 11814	Vida libre/suelo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> HS11286	Patógeno de humanos
<i>Xenorhabdus japonica</i>	Simbionte de nemátodos	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Patógeno de humanos
<i>Xenorhabdus budapestensis</i>	Simbionte de nemátodos	<i>Yersinia pestis</i> A1122	Patógeno de humanos
<i>Xenorhabdus cabanillasii</i>	Simbionte de nemátodos	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	Patógeno de humanos
<i>Xenorhabdus doucetiae</i>	Simbionte de nemátodos	<i>Serratia marcescens</i>	Patógeno de humanos
<i>Xenorhabdus nematophila</i> SC0516	Simbionte de nemátodos	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Patógeno de plantas
<i>Xenorhabdus vietnamensis</i>	Simbionte de nemátodos	<i>Regiella insecticola</i>	Simbionte de insectos
<i>Xenorhabdus mauleonii</i>	Simbionte de nemátodos	<i>Streptomyces abyssalis</i> 10390	Marino
<i>Xenorhabdus hominickii</i>	Simbionte de nemátodos	<i>Streptomyces abyssalis</i> 10389	Marino
<i>Xenorhabdus kozodoii</i>	Simbionte de nemátodos	<i>Streptomyces nanshensis</i> 10429	Marino
<i>Xenorhabdus poinarii</i> G6	Simbionte de nemátodos	<i>Streptomyces nanshensis</i> M10372	Marino
<i>Xenorhabdus szentirmaii</i> DSM 16338	Simbionte de nemátodos	<i>Streptomyces oceani</i>	Marino

Figura 13. Análisis de 3 regiones promotoras de *Xenorhabdus nematophila* SC0516 con la herramienta informática BPROM.

a)

```
> test sequence
Length of sequence-      250
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      1
Promoter Pos:      227 LDF- 5.82
-10 box at pos.      212 agctaaaat Score      76
-35 box at pos.      191 atgact      Score      31

Oligonucleotides from known TF binding sites:
For promoter at      227:
    metJ: GCTAAAAT at position      213 Score - 7
    ihf: AAATAAAA at position      217 Score - 13
```

b)

```
> test sequence
Length of sequence-      190
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      1
Promoter Pos:      167 LDF- 5.82
-10 box at pos.      152 atcaataat Score      40
-35 box at pos.      134 ttgaaa      Score      60

Oligonucleotides from known TF binding sites:
For promoter at      167:
    fnr: ATCAATAA at position      152 Score - 5
    arcA: AATAAAAA at position      158 Score - 12
    purR: ATAAAAAG at position      159 Score - 11
    cpxR: TAAAAAGA at position      160 Score - 9
    hipB: CCTTTTTA at position      172 Score - 11
```

c)

```
> test sequence
Length of sequence-      190
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      1
Promoter Pos:      167 LDF- 5.82
-10 box at pos.      152 atcaataat Score      40
-35 box at pos.      134 ttgaaa      Score      60

Oligonucleotides from known TF binding sites:
For promoter at      167:
    fnr: ATCAATAA at position      152 Score - 5
    arcA: AATAAAAA at position      158 Score - 12
    purR: ATAAAAAG at position      159 Score - 11
    cpxR: TAAAAAGA at position      160 Score - 9
    hipB: CCTTTTTA at position      172 Score - 11
```