



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSGRADO**

“Caracterización bioinformática de la vía de Sintetasa de péptidos no ribosomales encontrada en el genoma de *Pseudomonas koreensis* I1 que muestra similitud con vías de producción de pioverdinas”

JORGE LUIS GENEY HIGUITA

**ACTIVIDAD FORMATIVA EQUIVALENTE A TESIS (AFE) PARA
OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA**

Director de AFE

Prof. Dr. Víctor Antonio García Angulo

2021

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN TESIS/AFE DE MAGÍSTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato.

JORGE LUIS GENEY HIGUITA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Microbiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 30 de diciembre de 2021.

**Prof. Dr. Víctor Antonio García
Angulo**

Director de Tesis/AFE

**Programa de Microbiología y Micología
ICBM**

**Facultad de Medicina, Universidad de
Chile**

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS/AFE

Prof. Dra. Inmaculada Vaca

Prof. Dr. Ulises Urzúa

Prof. Dra. Beatriz Cámara

Prof. Dr. Juan Carlos Salazar

Presidente Comisión

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco primeramente a Dios, a la Universidad de Chile y a todos los docentes de la institución por permitirme continuar con el desarrollo de mi proyecto de vida.

Agradezco al Dr. Víctor Antonio García y a sus colaboradores por todo el apoyo, enseñanzas y consejos durante todo este tiempo, por guiarme por este camino para que pudiera cumplir todos los objetivos profesionales y personales que me trace.

Agradezco a toda mi familia por los valores, las enseñanzas que me permitieron estar hoy donde estoy y por siempre apoyarme en todos mis proyectos por más difíciles que parecieran. Sin ellos muy pocas cosas serían posibles.

Agradezco a mis amigos porque siempre tuvieron las palabras exactas cuando eran necesarias y porque me ayudaron a recordar cuales son las razones y sueños que me llevan a estar hoy donde estoy.

Finalmente, agradezco a la persona más importante para mí, a mi madre quien nunca ha dejado de luchar por nosotros para que cumplamos todos nuestros sueños. Ella es la que me ha impulsado siempre cuando he querido rendirme y siempre ha estado hay para guiarme en la vida. No hay palabras suficientes para expresarle mi amor y gratitud, pero, sé que la dedicación puesta en este trabajo es un reflejo de todas las enseñanzas que me dio y sin ella nada de esto sería posible.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Interacciones microbianas en la naturaleza.	13
1.2 Metabolismo especializado.	14
1.3 Secuenciación de genomas de microorganismos y minería genómica.	14
1.4 Microbiota del Río Mapocho con actividad antagonica.	16
1.5 Generalidades y taxonomía de <i>Pseudomonas</i> spp.....	18
1.6 <i>Clusters</i> de Genes Biosintéticos en el genoma de <i>P. koreensis</i> I1.....	19
1.7 Sintetasas de Péptidos No Ribosomales (NRPS).	20
1.8 Sideróforos del tipo pioverdinas.	22
1.9 Biosíntesis y variabilidad de las pioverdinas.	24
1.10 Receptores proteicos para las pioverdinas.	26
1.11 <i>Cluster</i> de biosíntesis de pioverdinas en el genoma de <i>Pseudomonas koreensis</i> I1.	27
1.12 Diferencias respecto al <i>cluster</i> biosintético más parecido.	29
2 PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA.	32
3 HIPÓTESIS.....	32
4 OBJETIVO GENERAL.	32
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	32
5 MATERIALES Y MÉTODOS.	33
5.1 Caracterización bioinformática del producto hipotético de las NRPSs para biosíntesis de pioverdinas.....	33
5.2 Determinación de la distribución de la vía de biosíntesis de Pioverdina de <i>P. koreensis</i> I1 en otros genomas bacterianos.....	35
5.3 Análisis filogenéticos de cepas que poseen vías de biosíntesis de pioverdinas similares a la de <i>P. koreensis</i> I1.....	36
6 RESULTADOS.	38
6.1 Predicción de la secuencia aminoacídica de la cadena peptídica lateral de la variante de ferribactina de <i>P. koreensis</i> I1.....	38

6.2	Distribución del CGB de biosíntesis de pioverdinas de <i>P. koreensis</i> I1 en otros genomas bacterianos.	49
6.3	Análisis filogenéticos de cepas que poseen vías de biosíntesis de pioverdinas similares a la de <i>P. koreensis</i> I1.....	56
7	DISCUSIÓN.	62
8	CONCLUSIONES.	68
9	BIBLIOGRAFIA.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Antagonismo contra bacterias patógenas por parte de aislados del Río Mapocho.....	17
Figura 2. Esquema del proceso de biosíntesis de péptidos mediado por NRPS...22	
Figura 3. Esquema de biosíntesis de pioverdinas.....25	
Figura 4. Representación esquemática de los <i>clusters</i> de biosíntesis de pioverdinas	28
Figura 5. Representación de la posición relativa de los <i>clusters</i>29	
Figura 6. Diferencias entre las NRPSs variables del CGB de <i>P. koreensis</i> I1 y las NRPSs del CGB más parecido.	31
Figura 7. Cladogramas en visualización circular de las filogenias inferidas a partir de los 571 dominios A para sustratos caracterizados y los dominios A de las NRPS de <i>P. koreensis</i> I1.....	41-42
Figura 8. Agrupamiento del control interno de las filogenias inferidas para los dominios A de sustrato conocido.....	44
Figura 9. Agrupamiento de los dominios A de las NRPS de <i>P. koreensis</i> I1 con dominios A caracterizados experimentalmente.....	47
Figura 10. Red de similitud de secuencias (RSS) para los 85 homólogos del gen específico que codifica para una alfa/beta hidrolasa.....	51
Figura 11. Contextos genómicos para homólogos del gen que codifica la alfa/beta hidrolasa.....	53-54
Figura 12. Árbol filogenómico inferido a partir del concatenado de 100 proteínas conservadas.....	58-59
Figura 13. Árbol filogenético inferido a partir de la secuencia aminoacídica del receptor de sideróforos tipo pioverdinas.....	60-61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Clusters</i> de producción de metabolitos especializados hipotéticos detectados por la plataforma antiSMASH.....	20
Tabla 2. Predicción bioinformática de la especificidad de sustratos para los dominios A de cada una de las NRPS detectadas en los <i>clusters</i> de biosíntesis de pioverdinas en el genoma de <i>P. koreensis</i> I1.....	39
Tabla 3. Predicción filogenética de la especificidad de sustratos para los dominios A de cada una de las NRPS detectadas en los <i>clusters</i> de biosíntesis de pioverdinas en el genoma de <i>P. koreensis</i> I1.....	48
Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos para cada análisis de predicción de la especificidad de sustratos para los dominios A de cada una de las NRPS detectadas en los <i>clusters</i> de biosíntesis de pioverdinas en el genoma de <i>P. koreensis</i> I1.....	49
Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos para la búsqueda de vías de biosíntesis de pioverdinas similares a la de <i>P. koreensis</i> I1 en otros genomas bacterianos.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
CGB	<i>Cluster</i> de genes biosintéticos
DomA	Dominio de adenilación
EFI	<i>Enzyme Function Initiative</i>
EST	<i>Enzyme similarity tool</i>
GNT	<i>Genome neighborhood tool</i>
MIBiG	<i>Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster</i>
MV	Máxima Verosimilitud
NJ	<i>Neighbor-Joining</i>
NRPS	Sintetasa de péptidos no ribosomales
RSS	Red de similitud de secuencias
VIS	Vías inicialmente similares

RESUMEN

El antagonismo bacteriano es una fuente importante de productos naturales de relevancia biotecnológica. Las moléculas caracterizadas involucradas en este fenómeno son metabolitos especializados o secundarios y se han utilizado como inmunomoduladores, antitumorales, agentes de biocontrol y antimicrobianos. Los avances en las tecnologías de secuenciación de genomas y la aplicación de técnicas de minería genómica han mejorado el análisis de genomas bacterianos para la búsqueda de vías de biosíntesis con potencial para producción de compuestos naturales bioactivos. Estudios previos realizados con muestras de aguas del Río Mapocho permitieron el aislamiento de dos cepas bacterianas con efecto inhibitorio sobre diferentes patógenos bacterianos. Mediante análisis filogenómicos la cepa inhibitoria I1 se asignó a la especie *Pseudomonas koreensis*. La aplicación de un análisis de minería genómica mediante el programa antiSMASH en la secuencia del genoma obtenido de este aislado detectó la presencia de 3 *clusters* de genes biosintéticos que codifican para sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPSs). Dos de estos *clusters* muestran similitud con una vía de biosíntesis de un sideróforo de la familia de las pioverdinas en el genoma de *Pseudomonas protegens* Pf-5, pero, diferencias en genes esenciales entre ambos *clusters* biosintéticos sugieren que *P. koreensis* I1 sintetiza una variante nueva no descrita de pioverdina. Las pioverdinas están constituidas por un motivo estructural invariable (cromóforo) y un motivo estructural variable (cadena peptídica lateral), ambos sintetizados por NRPSs que producen el precursor peptídico denominado ferribactina. El objetivo de este trabajo fue la caracterización bioinformática de la vía

de Sintetasa de péptidos no ribosomales en el genoma de *Pseudomonas koreensis* I1 que muestra similitud con vías de producción de pioverdina. Se determinó mediante predicciones bioinformáticas y análisis filogenéticos la secuencia aminoacídica hipotética de la ferribactina sintetizada por las NRPSs de la vía de biosíntesis de *P. koreensis* I1, consistente en lisina, D-ácido aspártico, alanina, D-treonina, alanina y D- 5 hidroxiornitina. La variante predicha, no ha sido descrita ni caracterizada en bibliografía. Posteriormente, se determinó la presencia de la vía de biosíntesis de pioverdinas detectada en *P. koreensis* I1 en otros genomas bacterianos, encontrándose genomas con *clusters* de biosíntesis similares a los de *P. koreensis* I1 asignados a diferentes especies dentro del género *Pseudomonas* además de *P. koreensis*. Finalmente, estos resultados se complementaron con análisis filogenéticos adicionales para establecer relaciones filogenéticas entre las especies que poseen un *cluster* de genes biosintéticos de pioverdinas similar al de *P. koreensis* I1. Este análisis confirmó que estas vías de biosíntesis similares se detectan solo en genomas asignados al género *Pseudomonas*, en especies y subgrupos adicionales a *P. koreensis*. Además, los resultados con una reconstrucción filogenética del receptor de pioverdinas, apoyan que estas cepas sintetizarían hipotéticamente las mismas variantes de pioverdinas que *P. koreensis* I1. En general, los resultados sugieren que la variante sintetizada por *P. koreensis* I1 es novedosa y, además, contrario a lo que se ha establecido en la literatura, algunas de las variantes de pioverdinas no serían exclusivas de la especie productora, sino que diferentes especies podrían sintetizar la misma variante.

ABSTRACT

Bacterial antagonism is an important source of natural products with a myriad of biotechnological applications. Molecules involved in this natural process are part of specialized metabolites or secondary metabolites. These molecules may have different potential uses such as immunomodulators, antitumoral products and antimicrobial agents. Advances in sequencing technologies and genome mining techniques have facilitated the analysis of bacterial genomes to search for hypothetical biosynthetic pathways for bioactive natural products. Previous studies conducted with water samples of the Mapocho river allowed the isolation of two bacterial strains with an inhibitory effect on different bacterial pathogens. One of the bacterial isolates was assigned to the species *Pseudomonas koreensis* (*P. koreensis* I1) by phylogenomic analysis. Genomic mining using the antiSMASH software detected 3 clusters of biosynthetic genes that code for non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs). Two of these clusters showed similarity to a biosynthetic pathway for a siderophore of the pyoverdine family present in the genome of *P. protegens* Pf-5. Nonetheless, differences in essential genes between the two biosynthetic clusters suggest that *P. koreensis* I1 synthesizes a new undescribed pyoverdine variant. Pyoverdine siderophores are composed of an invariable structural motif (chromophore) and a variable structural motif (side peptide chain), both synthesized as a peptide precursor named ferribactin by NRPSs. The aim of this project was to bioinformatically characterize the non-ribosomal peptide synthetase pathway in the *Pseudomonas koreensis* I1 genome that shows similarity to the pyoverdine biosynthetic pathways. For this, the hypothetical amino acid

sequence of ferribactin synthesized by *P. koreensis* I1 was determined by bioinformatic predictions and phylogenetic analysis. The resulting prediction determined that this ferribactin sequence has not been described before. Then, the presence of the pyoverdine biosynthesis pathway of *P. koreensis* I1 in other bacterial genomes was assessed. The findings indicate that genomes with clusters of biosynthetic genes similar to those of *P. koreensis* I1 are assigned to different species within the genus *Pseudomonas* including but not restricted to *P. koreensis*. Finally, these results were complemented with additional phylogenetic analyzes to establish phylogenetic relationships between species that have a similar cluster of biosynthetic genes for pyoverdine found in *P. koreensis* I1. These analyzes confirm that similar pathways are detected only in genomes assigned to the genus *Pseudomonas*, including species and subgroups different from *P. koreensis*. A further phylogenetic analysis performed with the pyoverdine receptors also suggested that these species would hypothetically synthesize the same pyoverdine variants as *P. koreensis* I1.

1 INTRODUCCIÓN

Las bacterias son organismos sociales y en la naturaleza forman comunidades muy diversas y ampliamente distribuidas que desempeñan importantes roles en la ecología global. Ejemplos importantes de dichos roles son la contribución de las bacterias en el mantenimiento del equilibrio en la biosfera mediante su participación en diferentes ciclos biogeoquímicos y su contribución al desarrollo de organismos multicelulares, promoviendo el crecimiento de plantas o inhibiendo el desarrollo de patógenos (1,2).

1.1 Interacciones microbianas en la naturaleza.

El suelo, la rizosfera y los cuerpos de agua son nichos ecológicos que se caracterizan por poseer una alta densidad y diversidad de microorganismos. Dentro de estas comunidades se producen diferentes interacciones microbianas, siendo las interacciones interespecíficas (interacciones entre diferentes especies) muy comunes, las cuales están mediadas principalmente por productos del metabolismo y en particular por el metabolismo especializado o secundario (3,4). Las interacciones interespecíficas pueden ser entre otras, cooperativas, cuando los metabolitos producidos por una especie microbiana son usados por otra u otras especies, o competitivas, cuando dos especies compiten por las fuentes de recursos. Un ejemplo claro dentro de las interacciones competitivas es el antagonismo bacteriano, donde las bacterias por medio de la liberación de moléculas antagonistas que inhiben el desarrollo de otras especies como un mecanismo de supervivencia (5,6,7).

1.2 Metabolismo especializado.

A menudo, las moléculas mediadoras de antagonismo microbiano pertenecen al metabolismo especializado o secundario (8). Los metabolitos especializados son un grupo muy diverso de compuestos sintetizados por bacterias y otros organismos que no necesariamente se consideran vitales pero que desempeñan un papel importante durante la colonización de un nicho en particular y que favorecen la adaptación bacteriana (9,10). Entre los metabolitos especializados más comunes se encuentran los péptidos no ribosomales, policétidos, terpenos, betalactonas y aminoglucósidos. Estos compuestos poseen diversas funciones como agentes de defensa competitiva, mediadores de simbiosis entre microorganismos, moléculas de señalización bacteriana, antibióticos y transportadores de metales, entre otras. Los productos del metabolismo especializado microbiano representan una fuente importante de compuestos bioactivos con aplicaciones biotecnológicas ya que pueden poseer actividades inmunomoduladoras, supresoras de tumores y sobre todo actividades antimicrobianas. (11, 12).

1.3 Secuenciación de genomas de microorganismos y minería genómica.

El potencial biotecnológico de los metabolitos especializados los convierte en moléculas de interés investigativo, es así como, la detección y caracterización de vías de biosíntesis en los genomas de los microorganismos se han convertido en una necesidad importante. Además, aprovechando el desarrollo y avance de tecnologías que permiten secuenciar los genomas con gran rapidez y cada vez a menor costo se ha incrementado la cantidad de información disponible respecto a

los genomas bacterianos (13). Sin embargo, se requiere de personal altamente calificado para interpretar los resultados y aportar información relevante. En este contexto, el desarrollo de las técnicas de minería genómica ha desempeñado un papel importante en la obtención de información y en el descubrimiento de nuevos compuestos naturales con potencial biotecnológico (14).

Generalmente, los genomas bacterianos poseen regiones con genes agrupados formando *clusters* para las proteínas requeridas para la producción de un metabolito especializado dado (15). La minería genómica consiste básicamente en la utilización de plataformas bioinformáticas para detectar vías biosintéticas para productos bioactivos nuevos o conocidos por medio de la predicción de *clusters* de genes biosintéticos (CGBs) codificados en los genomas de diferentes organismos, los cuales pueden ser posteriormente caracterizados experimentalmente (16). Dentro de los algoritmos más comunes desarrollados para realizar minería genómica se incluye antiSMASH (17,18). Éste es un programa con interfase en línea que permite detectar CGBs en los genomas bacterianos con base en su similitud con genes conocidos para producción de metabolitos especializados. Sobre los genomas bacterianos anotados, la plataforma realiza una búsqueda de genes centrales y accesorios de vías de producción de metabolitos especializados ya caracterizados y compilados en la base de datos MIBiG. Una vez identificados los probables *clusters*, antiSMASH realiza una reconstrucción esquemática de los CGBs hipotéticos presentes en el genoma y una comparación con los CGBs caracterizados en la base de datos (19).

1.4 Microbiota del Río Mapocho con actividad antagónica.

El Río Mapocho es el principal curso de agua de la ciudad de Santiago (Chile), y ha servido para evacuar aguas residuales domésticas e industriales para permitir su tratamiento (20,21). Trabajos previos realizados por el grupo de Metabolismo bacteriano de la Universidad de Chile, sobre la capacidad de sobrevivencia ambiental de la bacteria patógena *Vibrio cholerae* en agua del Río Mapocho, dieron como resultado el aislamiento de dos cepas bacterianas de la microbiota nativa del río con actividad antagónica contra éste y otros patógenos microbianos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Enterococcus* sp. y cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* con fenotipos de multirresistencia a los antibióticos, entre otras (Fig. 1).

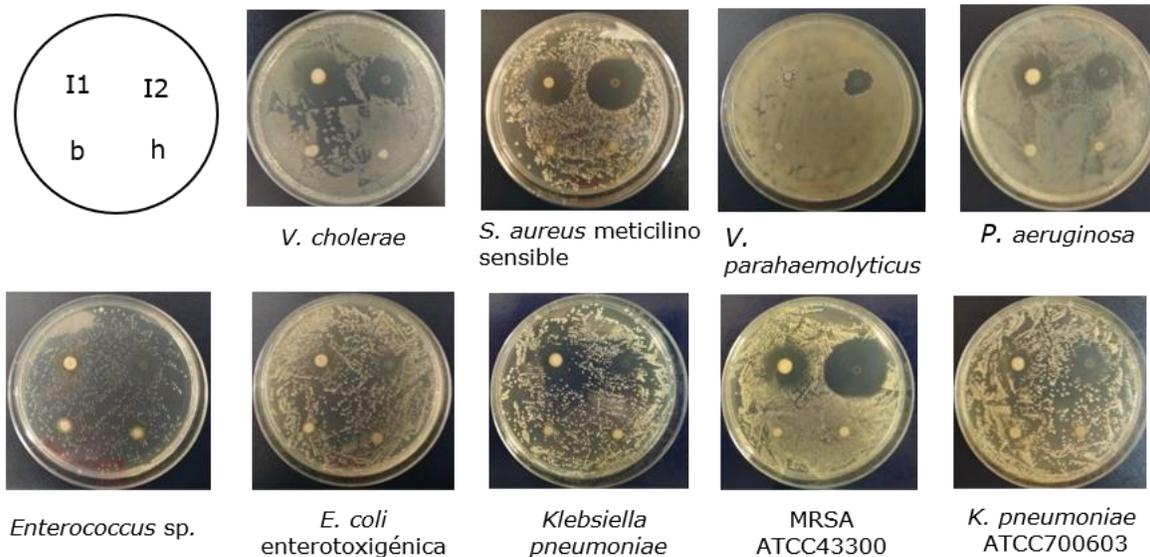


Figura 1. Antagonismo contra bacterias patógenas por parte de aislados del Río Mapocho. Fotografías de los resultados de los experimentos de inhibición en placa. Se sembró un césped con los patógenos indicados en cada placa y en cada punto señalado se sembró 1 μ l de un cultivo de los aislados del río. Las placas se incubaron por 24 h. El efecto inhibitorio se observa como la formación de un halo de inhibición alrededor de los sitios de inoculación de los aislados. En el esquema en la esquina superior izquierda I1 e I2 representa los sitios de inoculación de los aislados bacterianos con actividad antagónica, mientras que *b* y *h* representan los sitios de inoculación de dos aislados bacterianos de la microbiota nativa del Río Mapocho que no presentan actividad antagónica usados como controles.

Luego de detectar esta actividad antagónica, se secuenció el genoma de estos aislados. El genoma del inhibidor I1 se encuentra ensamblado en 79 contigs de diferentes longitudes (301 pb – 823.227 pb), con un tamaño total de 6.43 Mpb. Un análisis de calidad del ensamblaje mediante la plataforma CheckM (22), determinó un porcentaje de integridad del 100% y un porcentaje de contaminación de 0.15% para este ensamblado del genoma. Mediante análisis filogenómico de los genomas parciales, se determinó que el genoma del inhibidor I1 pertenece al género *Pseudomonas*, en donde se agrupa dentro del clado de *Pseudomonas koreensis*, y se le denominó *Pseudomonas koreensis* I1. Los ensayos iniciales indican que esta cepa tendría actividad inhibitoria de amplio espectro, sin embargo, no se conocen sus mecanismos de inhibición.

1.5 Generalidades y taxonomía de *Pseudomonas* spp.

Desde que se hicieron las primeras descripciones morfológicas del género *Pseudomonas* en 1894 y a medida que la bacteriología avanzaba fue posible determinar la relevancia de varias especies pertenecientes a este género bacteriano (23). El género *Pseudomonas* contiene más de 220 especies bacterianas descritas y se caracteriza por la amplia variabilidad metabólica y fisiológica (24), por lo que es posible encontrar miembros del género en una amplia variedad de entornos naturales como aguas, suelos y cultivos (25). Además, esta misma variabilidad permite que el género tenga un importante impacto biotecnológico como productor de metabolitos especializados con diversas aplicaciones como la degradación de plásticos, biodegradación de petróleo y productos de desecho industriales y también como antibióticos y agentes de control biológico en diferentes tipos de cultivos (26, 27, 28, 29).

Antes del acceso a las tecnologías de secuenciación genómica, la taxonomía de este gran género bacteriano se estudió mediante técnicas bioquímicas, fenotípicas y moleculares laboriosas que requerían gran experiencia para su interpretación (30, 31, 32). La implementación masiva de tecnologías de secuenciación genómica ha permitido realizar nuevas aproximaciones taxonómicas, dividiendo el género *Pseudomonas* inicialmente en dos grandes *clusters* intragenéricos basándose en el análisis de genes conservados (33, 34). Un estudio posterior basado también en el análisis de genes conservados determinó que el género *Pseudomonas* está dividido en tres linajes principales, el linaje *P. aeruginosa* que incluye cuatro grupos filogenéticos, el linaje *P. pertucinogena* que incluye un grupo filogenético y el linaje

P. fluorescens que incluye 6 grupos filogenéticos. Éste último es el linaje más grande dentro del género e incluye al complejo *Pseudomonas fluorescens* (35). En este complejo se encuentran agrupados en subgrupos diferentes especies filogenéticamente relacionadas entre sí. Los análisis filogenéticos moleculares más recientes incluyen 9 subgrupos dentro del complejo *P. fluorescens*, los cuales corresponden a los subgrupos *P. fragi*, *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. mandelii*, *P. jessenii*, *P. corrugata*, *P. chlororaphis*, *P. protegens* y *P. koreensis*. Cada uno de estos subgrupos incluye varias especies de *Pseudomonas* con estrecha relación filogenética. Por ejemplo, el subgrupo *P. koreensis* incluye a las especies *P. kribbensis*, *P. moraviensis*, *P. baetica* y *P. koreensis* (36).

1.6 Clusters de Genes Biosintéticos en el genoma de *P. koreensis* I1.

Para iniciar la caracterización del aislado I1, se aplicaron diferentes técnicas de minería genómica para identificar posibles vías de producción de metabolitos especializados (37). En este caso, un análisis del genoma de *P. koreensis* I1 con antiSMASH detectó la presencia de cuatro *clusters* de producción de metabolitos especializados hipotéticos, entre las cuales se encuentran tres vías metabólicas que codifican para sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS). Tabla 1.

Tabla 1. *Clusters* de producción de metabolitos especializados hipotéticos detectados por la plataforma antiSMASH.

Cepa	Programa	Tipo de Clústers de Genes Biosintéticos	Producto hipotético
<i>P. koreensis</i> I1	antiSMASH	Betalactona	Betalactona
		Sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS)	Lokisina
			Pioverdinas
			Pioverdinas

En antiSMASH también se realizó el análisis complementario ClusterBlast, que consiste en realizar un alineamiento entre el CGB detectado en el genoma problema y los *clusters* contenidos en la base de datos MIBiG para identificar el CGB más parecido (19, 38). Dos de los *clusters* de NRPS tienen similitud a nivel de secuencia y sintenia con el *cluster* de biosíntesis de un sideróforo de la familia de las pioverdinas de la cepa *Pseudomonas protegens* Pf-5, el cual corresponde a la vía de biosíntesis más parecida en la base de datos MIBiG y se denominó como vía modelo. El tercer *cluster* tipo NRPS compone una vía de biosíntesis para lokisina, un compuesto con actividad antifúngica (37, 39). El *cluster* restante identificado por antiSMASH en este genoma posee similitud con un CGB de producción de betalactona según el resultado de ClusterBlast.

1.7 Sintetasas de Péptidos No Ribosomales (NRPS).

Las NRPS son enzimas multimodulares de gran tamaño que producen péptidos pequeños con una cadena específica de aminoácidos usualmente involucrados en el metabolismo especializado. Cada módulo de las NRPS se encarga de la

incorporación de un aminoácido específico de la cadena peptídica sintetizada por la NRPS (40). Por lo tanto, una NRPS está compuesta por tantos módulos como aminoácidos posee su producto final. Un módulo a su vez consiste en varios dominios catalíticos con diferentes funciones. Existen tres dominios básicos conservados en las diferentes NRPS, los cuales llevan a cabo las funciones claves del proceso de síntesis peptídica. Estos dominios básicos son el dominio de adenilación (A), el cual selectivamente activa un aminoácido específico a incorporar en la cadena; el dominio de condensación (C), encargado de realizar el enlace peptídico entre los aminoácidos incorporados y el dominio de tiolación o proteína peptidil transportadora (T o PCPs), que se encarga de transportar el péptido a lo largo de toda la NRPS. Adicionalmente, las NRPS pueden incluir un dominio tioesterasa (TE) o funcionar de manera acoplada con una proteína con dominio TE, que se encarga de liberar el producto de síntesis de la NRPS en el último módulo (Fig. 2) (41, 42). Algunos módulos pueden incluir dominios adicionales accesorios, los cuales catalizan modificaciones tales como epimerización, metilación o reducción en los aminoácidos intermediarios de la biosíntesis (43, 44).

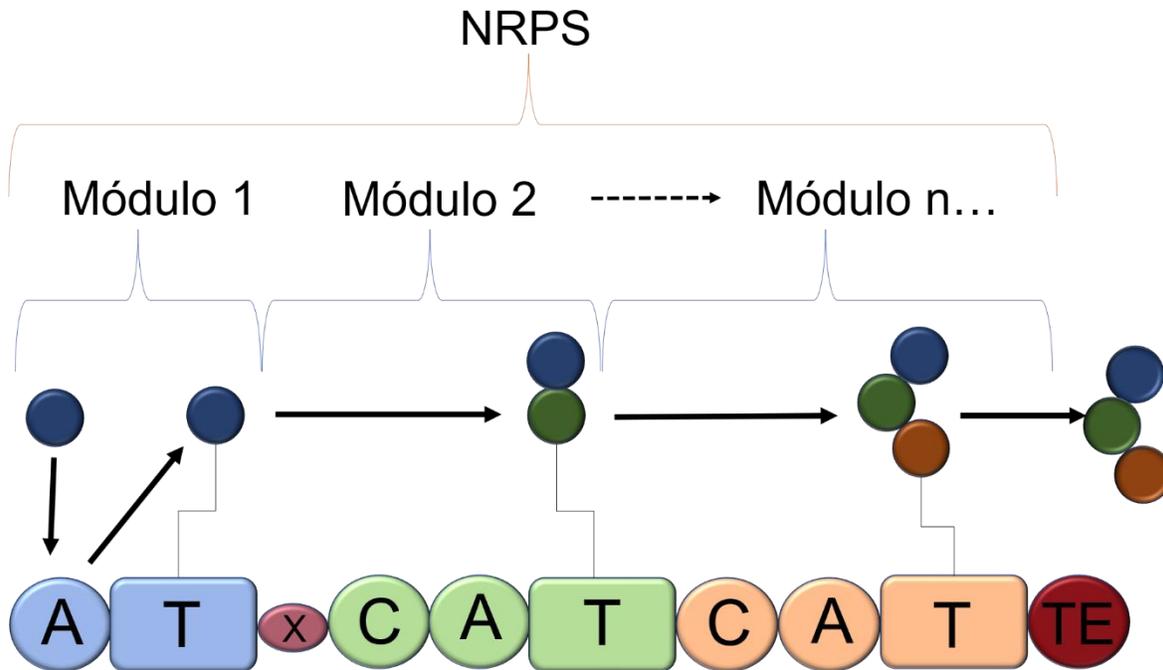


Figura 2. Esquema del proceso de biosíntesis de péptidos mediado por NRPS. Se esquematiza como ejemplo una NRPS de tres módulos. Los módulos se representan por colores y los dominios dentro de cada módulo se indican con letras. El proceso inicia en el módulo 1 donde el primer aminoácido de la cadena peptídica es activado por el dominio de Adenilación (A) y transportado por el dominio de Tiolación (T) hacia el módulo 2 y siguientes. En el dominio de condensación (C) se genera el enlace peptídico entre los aminoácidos activados. El proceso se repite de forma secuencial hasta el final de la NRPS donde el dominio Tioesterasa (TE) presente en el último módulo o aportado por una proteína externa se encarga de liberar el péptido sintetizado. *Esquema adaptado de Gao et al., 2018 (44).*

1.8 Sideróforos del tipo pioverdinas.

Los sideróforos son un grupo de compuestos químicamente muy diversos, de bajo peso molecular y alta afinidad por el ión férrico (Fe^{+3}). Generalmente, la biosíntesis de sideróforos está regulada por la disponibilidad de hierro para suplir las necesidades de la célula (45). Se distinguen cuatro grupos de sideróforos con base en los motivos funcionales que determinan la afinidad por el hierro, catecolatos, fenolatos, hidroxamatos y carboxilatos, además, existen también algunos sideróforos cuya estructura es una mezcla de estos motivos funcionales (46).

Las pioverdinas son compuestos fluorescentes producidos por especies del género *Pseudomonas* que confieren una pigmentación amarilla-verdosa a las colonias. Éstas son sintetizadas por un complejo enzimático multimodular de tipo NRPS (47, 48) y su biosíntesis aumenta cuando las bacterias crecen en condiciones limitadas de hierro. Estos metabolitos poseen un papel importante en diferentes aspectos de la fisiología de *Pseudomonas* spp. Las pioverdinas son sideróforos de alta afinidad, siendo capaces de disociar el hierro de ferroproteínas como transferrina y lactoferrina, por lo que se consideran un factor de virulencia (49). Además, en *P. aeruginosa* se ha reportado que las pioverdinas promueven la formación de biopelículas y participan en la regulación indirecta de la expresión de potentes toxinas como la Exotoxina A y la proteasa PrpL con efectos citotóxicos y apoptóticos (50). Las especies productoras de pioverdinas poseen receptores proteicos específicos para la variante de pioverdina producida por la cepa. Esta característica, junto con la alta afinidad, limita la biodisponibilidad del hierro para las demás especies bacterianas dentro de la comunidad. Por lo tanto, se ha descrito que los sideróforos tienen un papel importante como mediadores de las interacciones entre las diferentes especies en el contexto de las comunidades microbianas en la naturaleza. Estos compuestos representan actores de competencia cruciales entre comunidades bacterianas (51, 52). Diferentes estudios han descrito el efecto inhibitorio de las pioverdinas, donde se determina el papel que desempeñan genes de las vías de biosíntesis de pioverdinas como necesarios para conferir el efecto antagónico (53, 54), no solo en comunidades bacterianas sino también sobre otros microorganismos como hongos (55, 56). Así mismo, hay estudios que describen cómo la molécula de pioverdina purificada posee actividad tóxica y antagónica

contra otras especies (57, 58). Estos estudios subrayan la importancia de las pioverdinas en la virulencia y las interacciones ecológicas microbianas de *Pseudomonas* spp (59).

1.9 Biosíntesis y variabilidad de las pioverdinas.

Se ha planteado la existencia de al menos 100 variantes de pioverdinas, las cuales se propone que son específicas de cada especie productora (60, 62). Sin embargo, dentro de esta amplia variabilidad las pioverdinas en general están constituidas por dos motivos estructurales. El primer motivo corresponde al cromóforo (dihidroxiquinolina), el cual es un motivo estructural invariable conservado en todas las moléculas de pioverdinas conocidas y que confiere la característica fluorescente típica de las pioverdinas. El cromóforo se encuentra unido al segundo motivo, una cadena peptídica lateral específica de cada variante que completa la estructura final de la pioverdina (48, 61). La biosíntesis de pioverdina inicia en el citoplasma con un complejo de NRPSs que sintetiza un péptido denominado ferribactina, el cual es el precursor de las pioverdinas. Este precursor está constituido por un grupo derivado de los ácidos grasos que permite anclar las moléculas en formación a la membrana interna bacteriana durante el proceso de formación de la ferribactina. El siguiente componente es una fracción de tres aminoácidos constante que es sintetizada por la enzima NRPS llamada PvdL. Esta fracción de tres aminoácidos está formada por L-ácido glutámico, D-tirosina y L-2,4 ácido diaminobutírico (L-Glu, D-Tyr, L-Dab) y conforma la base de la estructura que derivará en el cromóforo. Posteriormente, otro grupo de NRPSs se encargan de agregar la cadena peptídica lateral. Esta cadena lateral de la ferribactina es variable entre cepas de *Pseudomonas* y depende de las

NRPSs que la sintetizan. La ferribactina es translocada al espacio periplásmico mediante el transportador PvdE, donde varios procesos enzimáticos (acilación, ciclación y oxidación, entre otros) dan como resultado una molécula de pioverdina madura la cual es finalmente secretada al espacio extracelular (47), tal como se grafica en la figura 3.

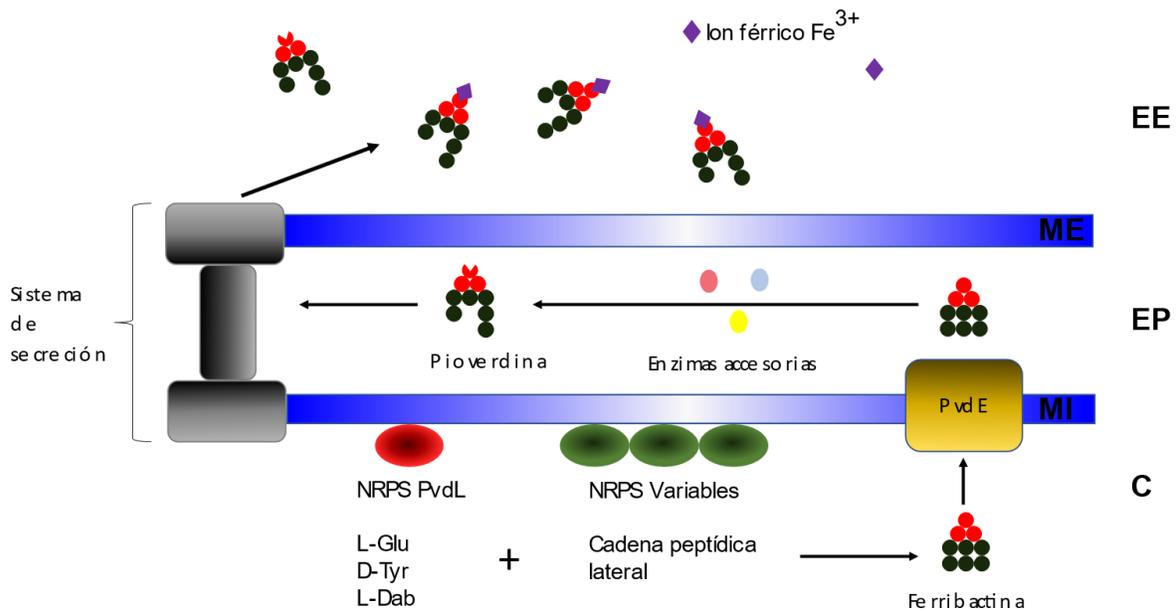


Figura 3. Esquema de biosíntesis de pioverdinas. El proceso inicia en el citoplasma con la biosíntesis de la ferribactina (precursor peptídico) por dos tipos de NRPS, el cual es translocado al espacio periplásmico por PvdE donde enzimas accesorias realizan procesos de modificación en los aminoácidos para producir una molécula de pioverdina madura. Esta es secretada al espacio extracelular donde puede interactuar con los iones férricos (Fe³⁺). C: Citoplasma, MI: Membrana interna, EP: Espacio periplásmico, ME: Membrana externa, EE: Espacio extracelular. *Esquema adaptado de Ringel et al., 2018 (47).*

De acuerdo al proceso de biosíntesis descrito, la principal variación entre las distintas pioverdinas está determinada por el número y la identidad de los aminoácidos en la cadena peptídica lateral de la ferribactina precursora. Además, las pioverdinas pueden también exhibir variaciones debido a la presencia/ausencia de proteínas codificadas por genes accesorios de la vía de biosíntesis. La existencia de la gran variabilidad en moléculas de pioverdina producidas por las especies de

Pseudomonas puede deberse a varios factores como la evolución, polimorfismos del receptor del complejo hierro-pioverdina y fenómenos de selección positiva (48, 61).

1.10 Receptores proteicos para las pioverdinas.

Como se mencionó anteriormente, el cromóforo es un motivo invariable, presente en todas las pioverdinas descritas. Este es el motivo de la molécula con la función quelante de hierro y clasifica a las pioverdinas como sideróforos del tipo catecolatos (63). El receptor de la pioverdina está compuesto por la proteína FpvA localizada en la membrana externa. Los receptores para algunas pioverdinas han sido bien caracterizados experimentalmente. Si bien los receptores de diferentes especies presentan variaciones en la secuencia aminoacídica que determinan la especificidad, todos comparten dominios estructurales entre sí. Todos contienen un dominio barril β que forma un canal transmembranal, unido a un pequeño dominio *plug* que bloquea dicho canal (64, 65, 66, 67). Una vez que los iones férricos interactúan con el cromóforo de las pioverdinas se forman complejos denominados ferripioverdinas que interactúan con residuos aminoacídicos en estos dos dominios del receptor (68, 69). Esta interacción induce cambios conformacionales en el receptor que permiten la apertura del canal y el paso de los complejos al espacio periplásmico donde procesos enzimáticos de oxidoreducción liberan el hierro del complejo para ser transportado hacia el citoplasma. Por otro lado, las moléculas de pioverdina libres son nuevamente secretadas en un proceso de reciclaje para la captación de nuevos iones férricos (47).

1.11 **Cluster de biosíntesis de pioverdinas en el genoma de *Pseudomonas koreensis* I1.**

De acuerdo a los resultados de estudios previos de minería genómica para el aislado *P. koreensis* I1 con antiSMASH, existen dos *clusters* de tipo NRPS para la biosíntesis de pioverdina en el genoma de *P. koreensis* I1, ambos con similitud al *cluster* de biosíntesis de pioverdina de *P. protegens* Pf-5 de la base de datos MIBiG (Fig. 4A). En este caso, se evidencia que el *cluster* completo de biosíntesis de la variante de pioverdinas de *P. protegens* Pf-5 muestra similitud con los dos *cluster* de *P. koreensis* (Fig. 4B). Por lo tanto, los genes cuyos productos son requeridos para la biosíntesis de la variante de las pioverdinas en *P. koreensis* I1, se encuentran en dos loci separados, incluidos en el contig 02 y contig 06 del ensamblado (37). El CGB identificado en el contig 02 tiene una longitud de 29,746 pb. En este CGB se detectó un gen de 12,999 pb cuyo producto de expresión es una proteína de 4,332 aa que corresponde hipotéticamente a la NRPS PvdL al conservar el 84,48% de identidad, así como, la organización de los módulos y los dominios respecto a la NRPS PvdL de la vía de biosíntesis de *P. protegens* Pf-5. Por otro lado, en el CGB identificado en el contig 06 y cuya longitud es de 44,244 pb, se detectaron 3 genes con longitudes de 3,402 pb para el primero, 7,830 pb para el segundo y 12,321 pb para el tercer gen, que codifican proteínas hipotéticas de 1,133 aa, 2,609 aa y 4,106 aa respectivamente. Estas proteínas corresponden a las NRPS variables encargadas de la biosíntesis de la cadena peptídica lateral de la ferribactina en *P. koreensis* I1. Además, un análisis de los dos *clusters* en el genoma de *P. koreensis* I1 sugiere que además de las NRPS, éstos contienen los genes para las proteínas que participan en los procesos esenciales de biosíntesis,

transporte y utilización de pioverdina, como el gen *pvdE*, el cual codifica para el transportador de membrana interna y los genes *pvdM* (parte del operón *pvdMNO*) y *pvdP* que participan en la maduración de las ferribactinas (70, 71, 72) (Fig. 4C).

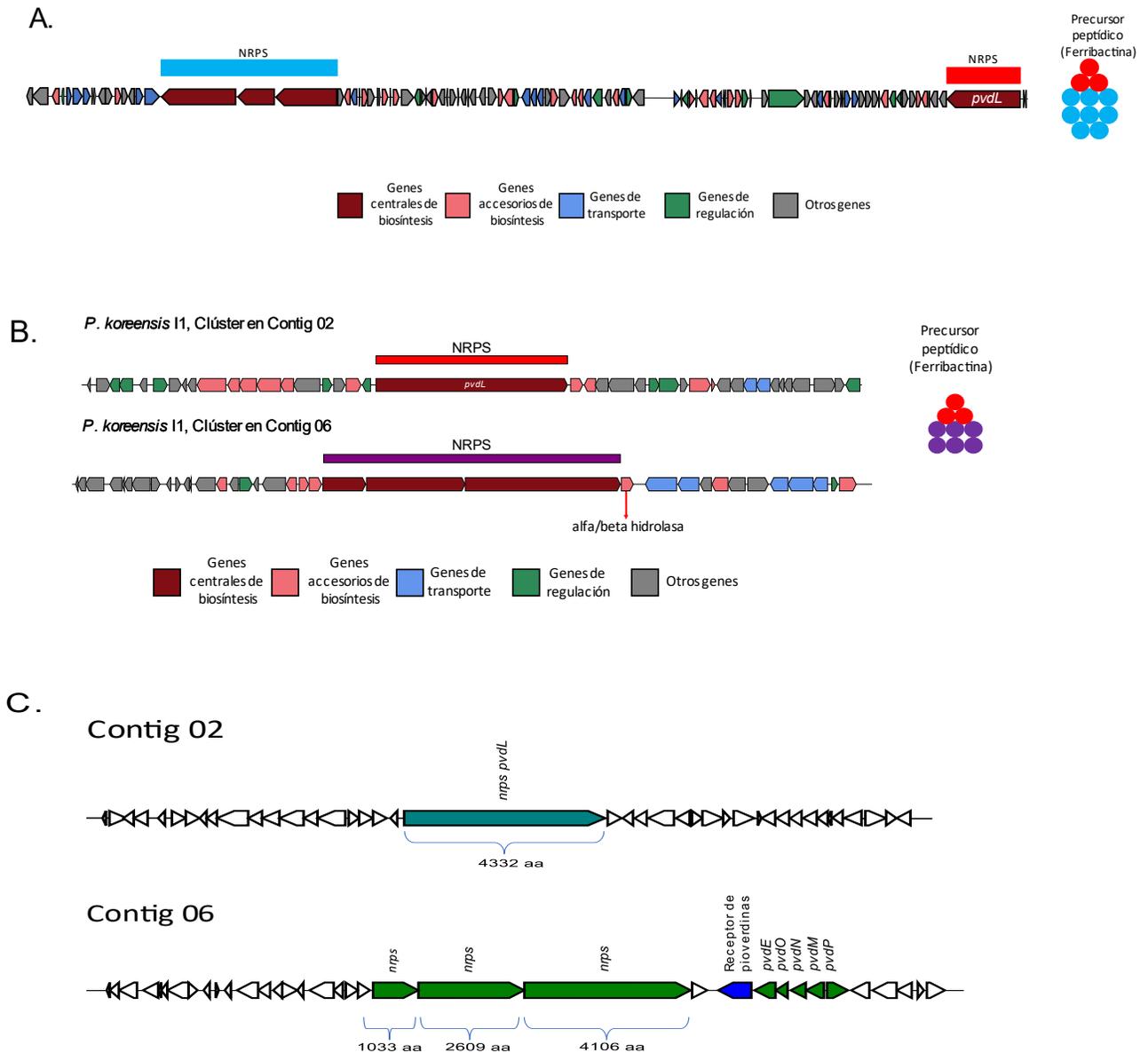


Figura 4. Representación esquemática de los *clusters* de biosíntesis de pioverdina contenidos en los genomas de *P. protegens* Pf-5 como vía modelo (**A**) y en los contigs 02 y 06 del ensamblaje del genoma de *P. koreensis* I1 (**B**). Adicionalmente, se esquematiza el tamaño del precursor peptídico hipotético (ferribactina) sintetizado en cada caso. En (**B**) se destaca además con flecha roja el gen que codifica para una alfa/beta hidrolasa presente en el *cluster* de *P. koreensis* I1. En la parte inferior con código de colores se observan la función hipotética para cada gen presente en los *clusters*. (**C**) Esquema de los *clusters* de biosíntesis de pioverdinas en el genoma de *P. koreensis* I1, se destacan los genes esenciales para la biosíntesis y los tamaños de las NRPSs codificadas por cada gen *nrps*.

Mediante la determinación del tamaño total del contig 02 y el contig 06 y la posición de los *clusters* de pioverdina en ellos, se observó que entre ambos *clusters* existe al menos una distancia de 134,254 pb en el genoma de *P. koreensis* I1 (Fig. 5). En *P. koreensis* BS3658, la cepa con el genoma ensamblado en un solo contig más cercana a *P. koreensis* I1 en la base de datos de PATRIC, se observan arreglos similares de separación de la vía de biosíntesis de pioverdina. Además, se ha reportado la separación de los genes de biosíntesis de pioverdinas en dos o más *clusters* en otros genomas de *Pseudomonas* spp (62, 73, 74).

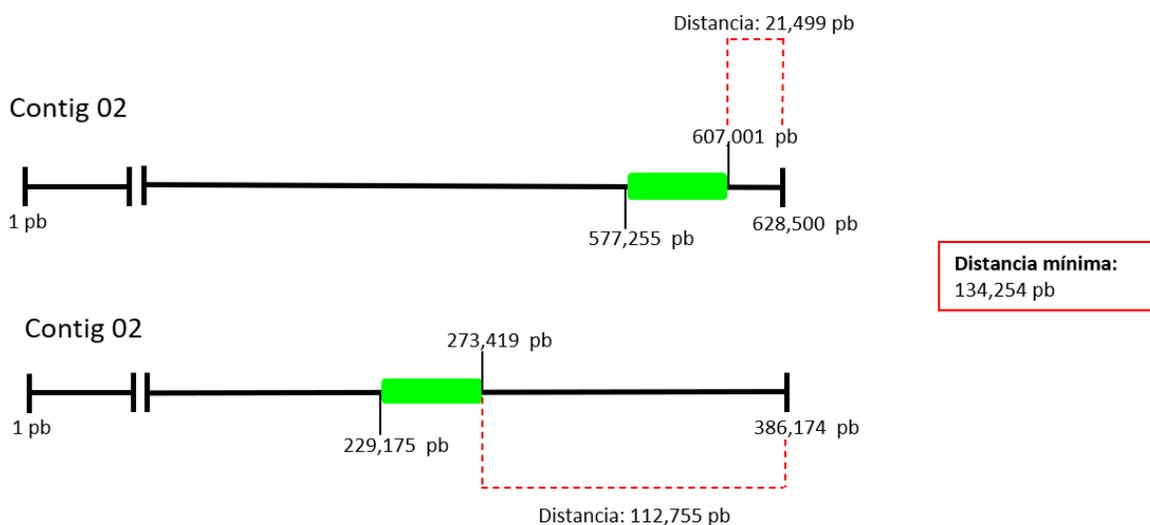


Figura 5. Representación de la posición relativa de los *clusters* (segmentos verdes) relacionados con la biosíntesis de pioverdina en los contigs 02 y 06 del ensamblado del genoma de *P. koreensis* I1. Distancia mínima determinada entre los *clusters* de biosíntesis de pioverdina contenidos en los contigs 02 y 06.

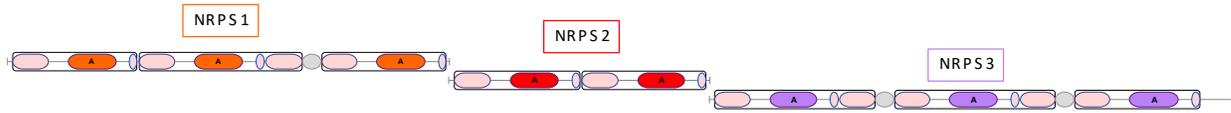
1.12 Diferencias respecto al *cluster* biosintético más parecido.

Los estudios previos de minería genómica (37), muestran que la vía modelo de biosíntesis de la pioverdina de *P. protegens* Pf-5 está compuesta por 4 genes que codifican para NRPS y genes accesorios en un *cluster* de biosíntesis de pioverdinas de 170,396 pb. Sin embargo, los genes *pvd* para las NRPS que sintetizan la cadena

lateral de la ferribactina poseen diferente tamaño con respecto a los del *cluster* de *P. koreensis* I1. Mientras que las NRPSs variables en la vía modelo poseen 8 módulos A en total, una predicción de módulos y dominios en los productos de los genes para las NRPSs de la cadena lateral de la cepa *P. koreensis* I1 revela que en total suman 6 módulos A (Fig. 6).

Esto sugiere variabilidad en la estructura final de la pioverdina con respecto a la producida por el *cluster* más parecido en la base de datos. Aunado a esto, es posible que la naturaleza de los aminoácidos en la cadena lateral también sea variable con respecto a los incorporados por las NRPS de *P. protegens* Pf-5. Dado que se ha reportado que las pioverdinas son un factor de competencia bacteriano y en general realizan un papel fundamental en la ecofisiología de *Pseudomonas* spp, es importante estudiar la composición hipotética de la ferribactina producida por el inhibidor *P. koreensis* I1 y determinar si representaría un precursor novedoso para una nueva variante dentro de la familia de las pioverdinas.

NRPSs variables vía modelo de *P. protegens* Pf-5



NRPSs variables CGB de *P. koreensis* I1

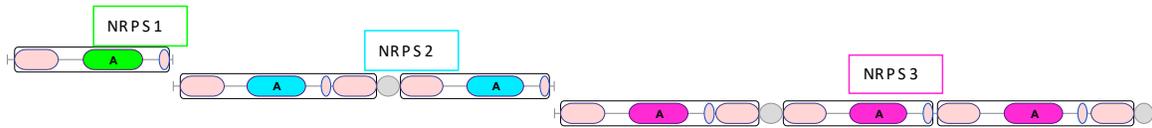


Figura 6. Diferencias entre las NRPSs variables del CGB de *P. koreensis* I1 y las NRPSs del CGB más parecido. Esquema de los 8 dominios A en las NRPSs de la vía modelo de *P. protegens* Pf-5 y los 6 dominios A en las NRPSs del CGB para la biosíntesis de pioverdinas de *P. koreensis* I1 (37).

2 PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA.

El genoma de *Pseudomonas koreensis* I1 posee una vía de biosíntesis de pioverdina. Sin embargo, esta vía no está caracterizada y las NRPSs para la incorporación de la cadena peptídica lateral poseen variaciones con respecto a las del *cluster* más cercano en la base de datos de antiSMASH, por lo tanto, no se conoce la variante de las pioverdinas resultante de esta vía de biosíntesis.

3 HIPÓTESIS.

El genoma del aislado inhibidor *Pseudomonas koreensis* I1 posee una vía de biosíntesis para una variante nueva de pioverdinas conservada en otras cepas de *Pseudomonas koreensis*.

4 OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar bioinformáticamente la vía de sintetasa de péptidos no ribosomales en el genoma de *Pseudomonas koreensis* I1 que muestra similitud con vías de producción de pioverdinas.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar la cadena aminoacídica de la ferribactina producida hipotéticamente por la vía tipo NRPS para biosíntesis de pioverdinas en el genoma de *Pseudomonas koreensis* I1 mediante predicciones bioinformáticas.
- Determinar la distribución de la vía de biosíntesis de pioverdinas de *P. koreensis* I1 en genomas bacterianos.

5 MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Caracterización bioinformática del producto hipotético de las NRPSs para biosíntesis de pioverdinas.

Los productos de los genes correspondientes a las enzimas NRPS de la vía (PvdL y las tres enzimas del segundo *cluster*) fueron analizados por programas que permiten predecir la especificidad de los dominios de adenilación de las NRPS. Inicialmente se utilizó la función *NRPS/PKS domains* de antiSMASH (38), (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>) que permite hacer una determinación de la presencia de los diferentes tipos de dominios presentes usualmente en las enzimas NRPS, así como también predecir el aminoácido incorporado por cada uno de los módulos de la enzima. Posteriormente, se usó el programa NRSPredictor2 (75), (<https://abi-services.informatik.uni-tuebingen.de/nrps2/Controller?cmd=SubmitJob>), el cual hace una predicción del sustrato de los dominios A de las NRPSs con base en los residuos aminoacídicos que se encuentran en el sitio de unión del aminoácido de cada módulo de las NRPSs. Además, se realizó otra predicción mediante la plataforma PKS/NRPS (76), (<http://nrps.igs.umaryland.edu/>), donde de manera similar a la plataforma anterior se busca en bases de datos coincidencias de los residuos críticos de unión a sustrato de los dominios de adenilación en las NRPS. Los resultados de todas las predicciones independientes se compararon y la secuencia aminoacídica hipotética fue determinada según el criterio de consenso. Se consideró el aminoácido predicho con mayor frecuencia por las plataformas bioinformáticas como el candidato para cada una de las posiciones del péptido de la ferribactina.

NRPSpredictor2 y PKS/NRPS han sido utilizadas previamente para predecir exitosamente productos hipotéticos de vías de NRPS (77, 78, 79). Aun así, se han descrito algunas dificultades con las plataformas, como la baja precisión que se obtiene para aminoácidos poco convencionales o derivados de otros aminoácidos, o la existencia de dominios para aminoácidos no caracterizados experimentalmente y que conducen a discrepancias entre las plataformas para la misma secuencia a analizar (12, 80). Para dirimir estas discrepancias, el producto hipotético predicho por las plataformas se comparó con una predicción adicional basada en un análisis filogenético de los dominios A de cada módulo en las NRPS, según la metodología propuesta por Khayatt et al., 2013 (81). En dicho procedimiento, se realizó un análisis filogenético para cada dominio A de las NRPSs de *P. koreensis* I1 utilizando una base de datos de 571 secuencias de dominios A con sustrato confirmado experimentalmente. Primero, se determinó la secuencia de aminoácidos reducida de cada dominio A presente en las NRPS de la vía de biosíntesis de pioverdinas en *P. koreensis* I1 mediante alineamientos con las secuencias de la base de datos mencionada usando el programa Bioedit. Estas secuencias, junto con las de la base de datos de secuencias con sustrato caracterizado, se utilizaron para inferir un árbol filogenético mediante el método Neighbor-Joining (NJ), con el modelo de sustitución *number of differences* y un análisis de Bootstrap con 1000 réplicas en la plataforma MEGA X (82). Adicionalmente, se construyó un árbol filogenético con el método de Máxima Verosimilitud (MV), con el modelo de sustitución *equal input* y un análisis de Bootstrap con 350 réplicas, ya que este método es computacionalmente más exigente no se realizó utilizando las 1000 réplicas empleadas usualmente. Para el método de MV, se extrajo la firma de los 8 residuos aminoacídicos de cada dominio

A en las NRPS que interactúan con los aminoácidos y que determinan la especificidad de cada dominio (código que confiere especificidad), según lo describe Khayatt et al., 2020 (83). La predicción de la especificidad de sustrato de cada dominio A de las NRPSs de *P. koreensis* I1 se realizó observando los dominios con sustratos caracterizados agrupados con cada uno de ellos.

5.2 Determinación de la distribución de la vía de biosíntesis de Pioverdina de *P. koreensis* I1 en otros genomas bacterianos.

El análisis de la distribución de los *clusters* de biosíntesis de pioverdina similares a los de *P. koreensis* I1 se llevó a cabo en la plataforma *Enzyme Function Initiative* (EFI) (<https://efi.igb.illinois.edu/>) (84). Las herramientas de EFI permiten explorar los contextos genómicos de un gen determinado en diferentes bacterias. Para identificar vías de biosíntesis de pioverdinas similares se analizó el contexto genómico de un gen específico en el *cluster* de biosíntesis de *P. koreensis*, que no estuviera en esa misma posición en el *cluster* de *P. protegens* Pf-5 y que permitiera fácilmente analizar la organización genómica del CGB. Se utilizó la secuencia de la alfa/beta hidrolasa (Fig. 4B) codificada corriente abajo de los tres genes para las NRPS variables de la vía. Se utilizó la herramienta EFI *Enzyme similarity tool* (EST) para hacer una búsqueda de homólogos de esta hidrolasa en bases de datos y construir una red de similitud de secuencias (RSS) con dichos homólogos. La RSS se analizó con la herramienta EFI *Genome neighborhood tool* (GNT) para obtener y visualizar los contextos genómicos de cada homólogo en la RSS. Dado que la identidad de las pioverdinas está dada en gran medida por el número y la naturaleza de los aminoácidos en la cadena variable, inicialmente se consideraron vías

similares aquellas que poseen los genes de la NRPS variables corriente arriba de la hidrolasa similares en tamaño y organización a las de la vía de *P. koreensis* I1. Posteriormente, las secuencias de las NRPS variables de estas vías inicialmente similares (VIS) se analizaron para predecir el número de dominios A y los aminoácidos hipotéticamente incorporados por ellos mediante los programas de predicción de especificidad de los dominios A utilizados en la sección anterior. Con esta información se determinaron las cepas que producen hipotéticamente una ferribactina similar a la de la cepa *P. koreensis* I1.

5.3 Análisis filogenéticos de cepas que poseen vías de biosíntesis de pioverdinas similares a la de *P. koreensis* I1.

Con la finalidad de establecer si existía relación filogenética entre las especies que poseen un *cluster* con la vía de biosíntesis de pioverdinas similar al que se encontró en el genoma de *P. koreensis* I1, se construyó un árbol filogenético inicial en la plataforma PATRIC utilizando el método MV que por defecto utiliza dicha plataforma. Para este análisis inicial se empleó un conjunto de genomas de cepas de interés que incluye las especies donde se identificaron vías de biosíntesis de pioverdinas inicialmente similar a la encontrada en el genoma de *P. koreensis* I1. También se incluyeron los genomas de las cepas tipo de cada especie incluida en el grupo anterior. Por último, se agregaron los genomas de todas las cepas asignadas a la especie *P. koreensis* en la plataforma PATRIC. De este análisis se obtuvo la secuencia aminoacídica concatenada de 100 proteínas conservadas en todas las cepas y que fueron empleadas para la construcción del árbol filogenético. Posteriormente, en la plataforma MEGA X, se infirió la filogenia a partir de la

secuencia de proteínas concatenadas mediante el método de NJ, con el modelo de sustitución *number of differences* y una prueba de Bootstrap con 1000 réplicas. Este análisis fue complementado con la construcción de un árbol filogenético a partir de la secuencia aminoacídica del receptor de sideróforos de tipo pioverdinas de las cepas de interés también mediante el método NJ y con los mismos parámetros empleados anteriormente. En ambos casos, para cada una de las cepas en las filogenias se determinó la secuencia aminoacídica de los precursores peptídicos (ferribactinas) empleando la metodología descrita en la primera parte. Posteriormente, se asignó un color a cada una de las variantes determinadas para los precursores peptídicos para representarlas en los árboles.

6 RESULTADOS.

6.1 Predicción de la secuencia aminoacídica de la cadena peptídica lateral de la variante de ferribactina de *P. koreensis* I1.

La variabilidad en la secuencia de aminoácidos de la cadena peptídica es una característica entre las pioverdinas descritas de *Pseudomonas* spp (41). Determinar esta secuencia permite comparar con las secuencias reportadas en bibliografía. Como se mencionó anteriormente, uno de los antecedentes presentados a este estudio, indicó que el *cluster* de biosíntesis de la cadena peptídica lateral en el genoma de *P. koreensis* I1 incluye 3 enzimas NRPS. La primera NRPS del *cluster* posee 1 dominio A, la segunda posee 2 dominios A y la tercera posee 3 dominios A. Por lo tanto, la cadena peptídica lateral de la ferribactina para *P. koreensis* I1 tendría 6 aminoácidos de longitud. Posteriormente, en este trabajo la secuencia aminoacídica de la cadena peptídica lateral sintetizada por estas 3 enzimas NRPS se predijo inicialmente mediante las plataformas bioinformáticas *NRPS/PKS domains* de antiSMASH, *NRSPredictor2* y *PKS/NRPS Analysis* (Tabla 2).

Tabla 2. Predicción bioinformática de la especificidad de sustratos para los dominios A de cada una de las NRPS detectadas en los *clusters* de biosíntesis de pioverdinas en el genoma de *P. koreensis* I1. En rojo se indican las discrepancias en las predicciones aminoacídicas.

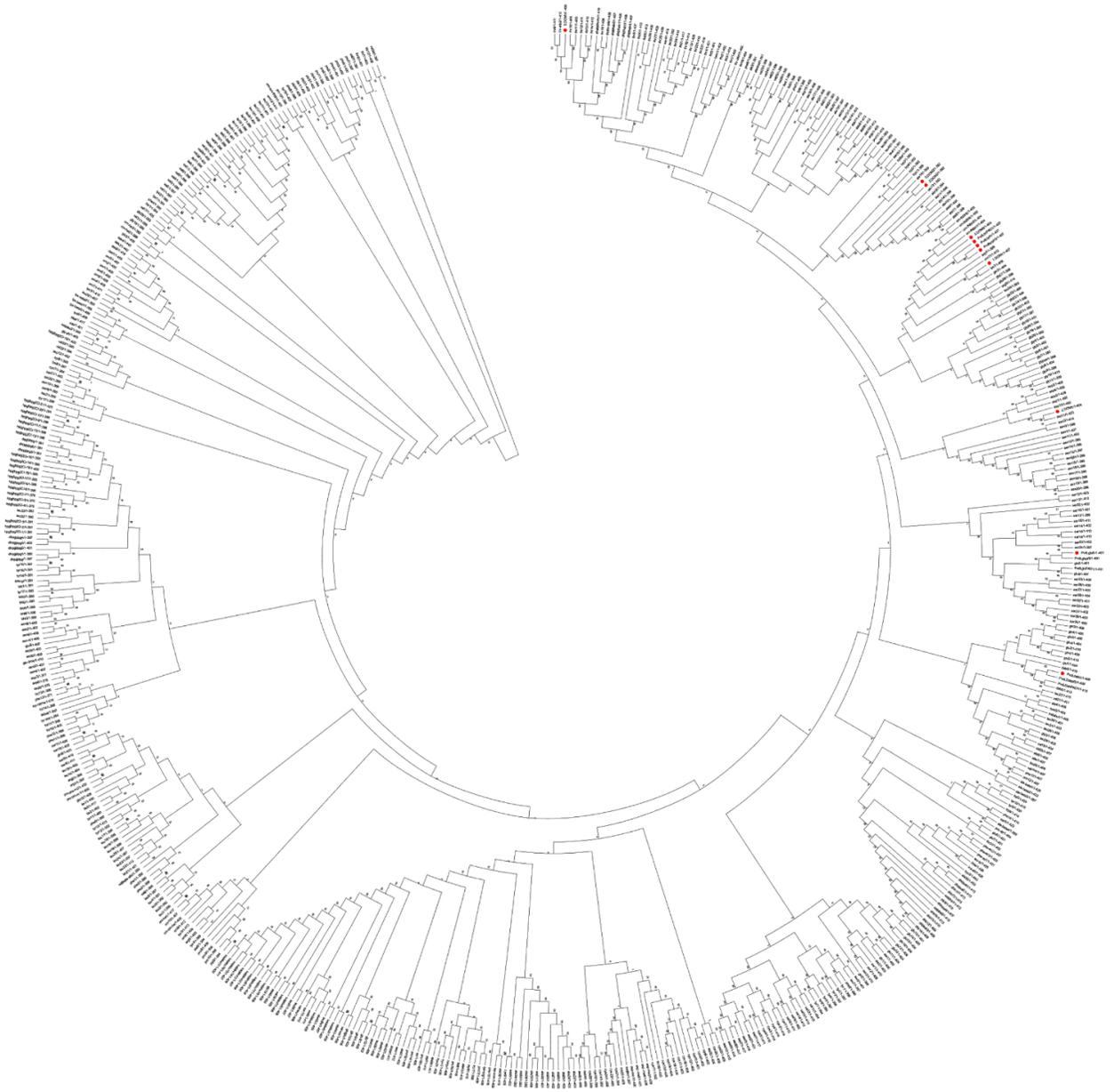
NRPS	antiSMASH	NRSPredictor2	PKS/NRPS	Consenso plataforma
NRPS 1 DOM1	X	Lys	Leu	Lys/Leu
NRPS 2 DOM1	D-Asn	D-Asn	D-Asp	D-Asn
NRPS 2 DOM2	Ala	Gly	Ala	Ala
NRPS 3 DOM1	D-Thr	D-Thr	D-Thr	D-Thr
NRPS 3 DOM2	Ala	Gly	Ala	Ala
NRPS 3 DOM3	D-X	D-5Horn	D-Leu	D-5Horn/ D-Leu

Con estos datos se determinó una secuencia aminoacídica preliminar denominada “consenso plataforma” a partir del criterio de consenso. En este caso la identidad de cada uno de los 6 aminoácidos que forman la cadena peptídica lateral fue asignada al aminoácido más frecuentemente predicho por las plataformas bioinformáticas. En los resultados se observa una discrepancia para la identidad del primer y último aminoácido del péptido debido a que cada una de las plataformas hace una predicción diferente para estas posiciones.

Para resolver esta discrepancia y complementar la predicción de la identidad de los demás aminoácidos se empleó una metodología alternativa basada en análisis filogenéticos. Se hicieron reconstrucciones filogenéticas mediante la metodología

Neighbor-Joining (NJ) y Máxima verosimilitud (MV) (Fig. 7). Para la primera metodología (Fig. 7A) se utilizaron 571 secuencias aminoacídicas de dominios A para sustratos conocidos (80) junto a los dominios A de las NRPS de *P. koreensis* I1. Para la reconstrucción filogenética mediante MV (Fig. 7B), se empleó la firma de 8 aminoácidos que confiere especificidad en los dominios A, obtenida desde las plataformas bioinformáticas de predicción utilizadas previamente, de todos los dominios incluidos en la filogenia anterior. En dichos análisis se realizó el agrupamiento de los dominios de las NRPS de *P. koreensis* I1 con los dominios de sustrato conocido para realizar predicciones de especificidad.

A.



B.

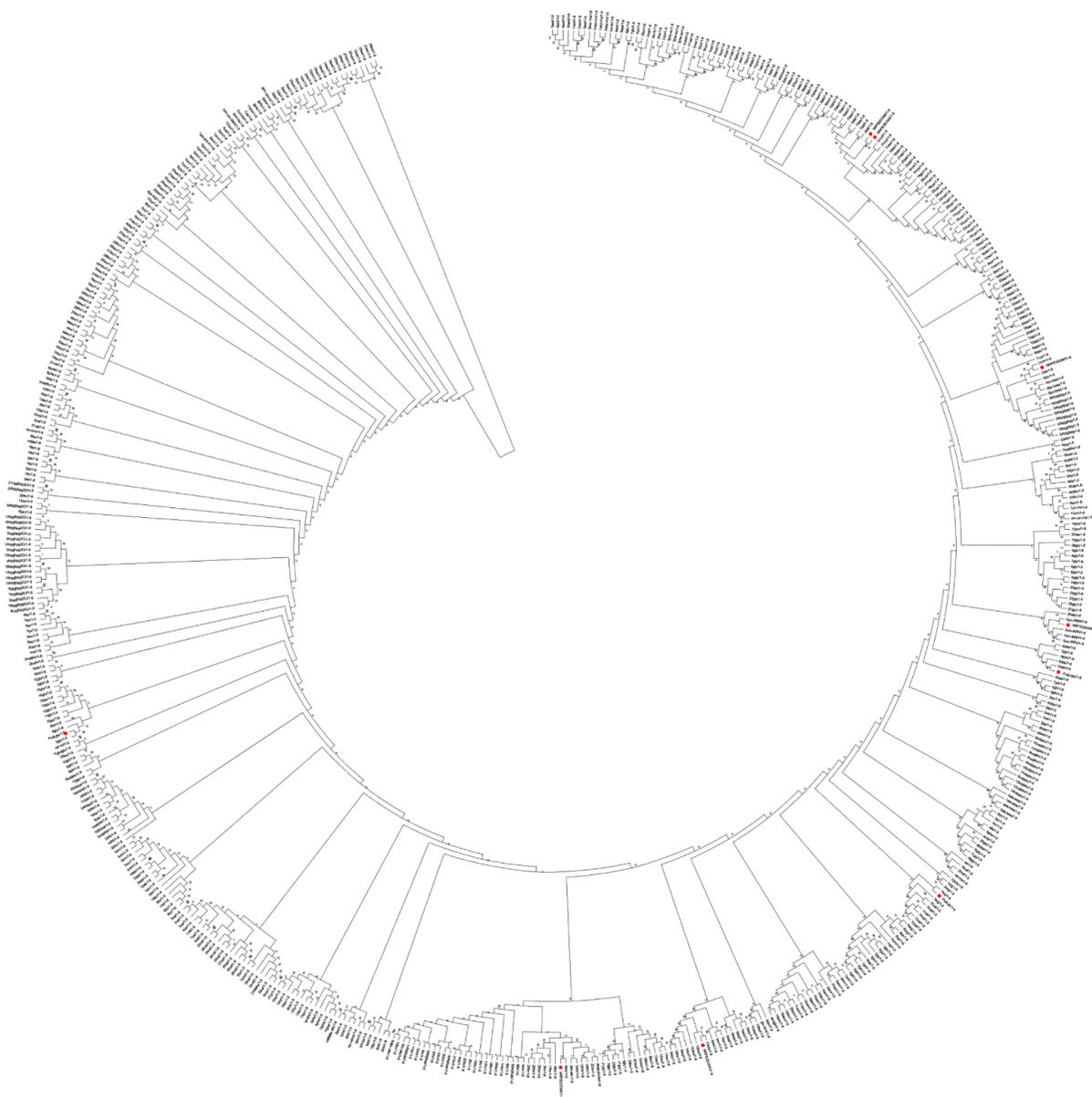
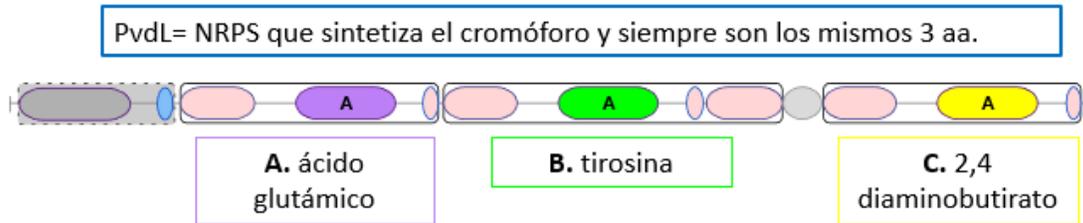


Figura 7. Cladogramas en visualización circular de las filogenias inferidas a partir de los 571 dominios A para sustratos caracterizados y los dominios A de las NRPS de *P. koreensis* I1. **A.** Cladograma que corresponde a la inferencia mediante la metodología de NJ para las secuencias aminoacídicas de los dominios A de las NRPS. **B.** Cladograma que corresponde a la inferencia mediante la metodología de MV para la firma de 8 aminoácidos que confiere especificidad en los dominios A de las NRPS. En ambos casos, con círculos rojos se muestran las posiciones de los dominios A de las NRPS de *P. koreensis* I1. Estas imágenes son referenciales para los árboles completos. Las ramas de interés se muestran amplificadas más adelante en este texto.

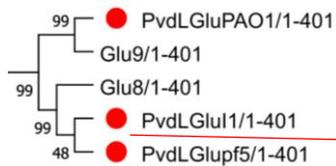
La utilidad de las filogenias inferidas se determinó, primero, según la topología de los árboles filogenéticos donde se esperaba que los dominios A que incorporan el mismo aminoácido se agruparan entre sí. Al observar la topología general de los árboles, se observa que los dominios A con sustrato similar forman *clusters*. Segundo, empleando un control interno (Fig. 8), que consistió en la ubicación de los dominios A de la enzima PvdL (NRPS con tres dominios A de sustratos invariables ácido glutámico, tirosina y ácido diaminobutírico Fig. 8A) tanto de *P. koreensis* I1 como de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. protegens* Pf-5, ya que al incorporar los mismos aminoácidos se esperaba que se agruparan entre sí. Al analizar el árbol filogenético resultante con NJ y MV, se observó la agrupación esperada para los dominios A de PvdL (Fig 8B, 8C y 8D). Finalmente, la confianza del árbol está dada por el valor de Bootstrap de cada nodo.

A.



B.

DomA Glu



C.

DomA Tyr



D.

DomA Dab



Figura 8. Agrupamiento del control interno de las filogenias inferidas para los dominios A de sustrato conocido. **A.** Esquema de la NRPS PvdL con los 3 dominios A y el aminoácido incorporado en cada caso. **B.** *Cluster* de dominios A que incorporan ácido glutámico (Glu). **C.** *Cluster* de dominios A que incorporan tirosina (Tyr). **D.** *Cluster* de dominios A que incorporan 2,4 ácido diaminobutírico (Dab). En círculos rojos se muestran los dominios A de las PvdL de diferentes *Pseudomonas* spp. En todos los casos, los dominios A de la PvdL de *P. koreensis* I1 (subrayados en rojo) se agrupan con los dominios de especificidad esperada para generar el cromóforo.

Como se observa en la figura 9, en las filogenias inferidas tanto por NJ (Fig. 9A) como por MV (Fig. 9B), los dominios A de las NRPS variables de los *clusters* de biosíntesis de pioverdinas de *P. koreensis* I1 se agrupan con dominios A caracterizados formando *clusters* diferenciados lo que permite complementar la predicción inicial hecha por las plataformas bioinformáticas. El dominio A de la primera NRPS se agrupó con un dominio caracterizado para la incorporación de lisina. El primer dominio A de la segunda NRPS se agrupó con dominios caracterizados para la incorporación de ácido aspártico mientras que el segundo

dominio A de esta misma NRPS se agrupó con dominios caracterizados para la incorporación de alanina. Finalmente, el primer dominio A de la tercera NRPS se agrupó con dominios caracterizados para la incorporación de treonina, el segundo dominio A se agrupó con dominios que incorporan alanina y el último dominio A de esta tercera NRPS se agrupó con los dominios A caracterizados para la incorporación de 5 hidroxiornitina.

A. Neighbor-Joining

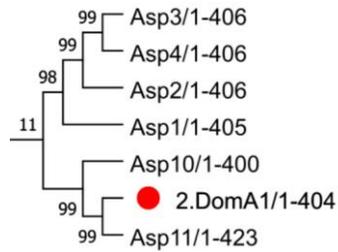
NRPS 1 variable

DomA1

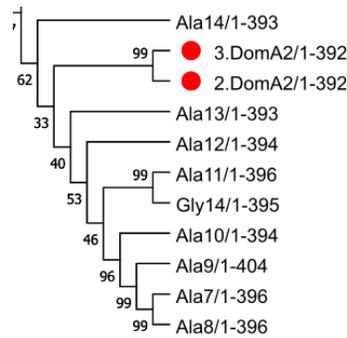


NRPS 2 variable

DomA1

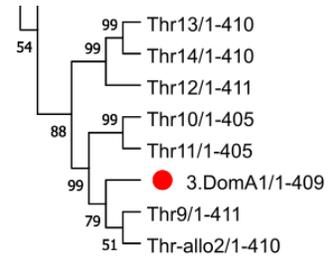


DomA2

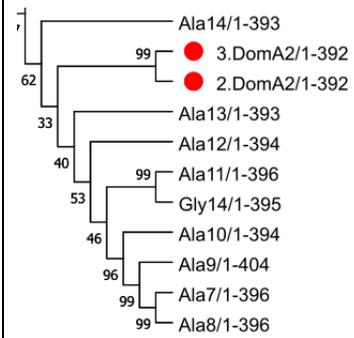


NRPS 3 variable

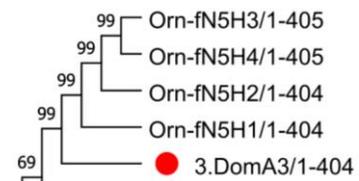
DomA1



DomA2



DomA3



B. Máxima Verosimilitud

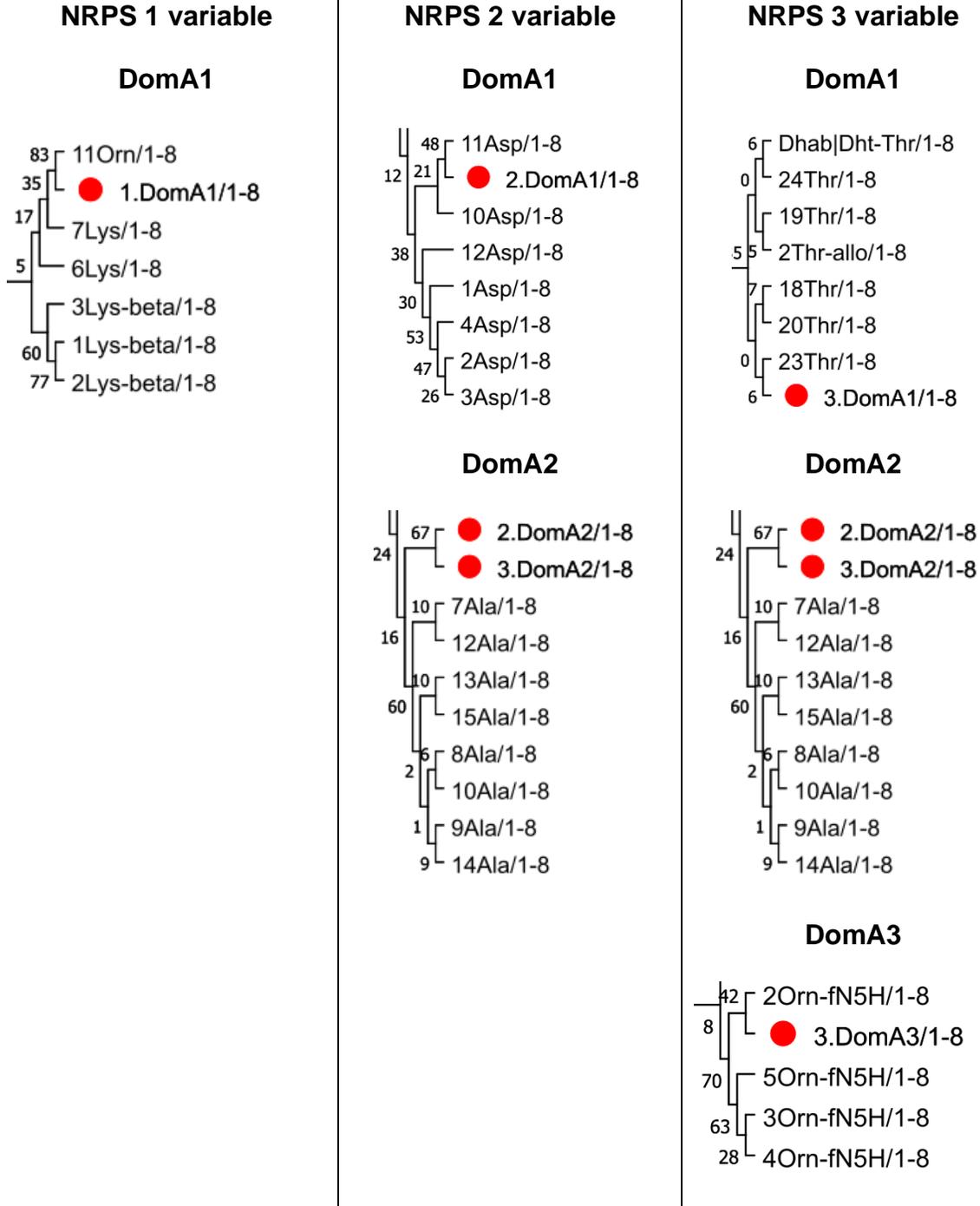


Figura 9. Agrupamiento de los dominios A de las NRPS de *P. koreensis* I1 (Círculos rojos) con dominios A caracterizados experimentalmente. (A). Metodología de inferencia Neighbor-Joining. (B). Metodología de inferencia Máxima Verosimilitud. Para cada caso se muestra solo la rama donde se ubica cada dominio A de interés. Primera NRPS (1 dominio A). Segunda NRPS (2 dominios A). Tercera NRPS (3 dominios A).

En la Tabla 3 se muestra la secuencia aminoacídica obtenida mediante los análisis filogenéticos y denominada consenso filogenias. En este caso también se tuvo en cuenta el criterio de consenso para asignar la identidad a los aminoácidos de la cadena peptídica. Para el primer aminoácido no fue posible determinar una única identidad mediante esta metodología alterna ya que en ambos árboles la rama donde se ubica el dominio A de la primera NRPS contiene dominios A caracterizados para la incorporación de dos aminoácidos diferentes, ornitina y lisina.

Tabla 3. Predicción filogenética de la especificidad de sustratos para los dominios A de cada una de las NRPS detectadas en los *clusters* de biosíntesis de pioverdinas en el genoma de *P. koreensis* I1.

NRPS	Neighbor-Joining	Máx. verosimilitud	Consenso filogenias
NRPS 1 DOM1	Lys/Orn	Lys/Orn	Lys/Orn
NRPS 2 DOM1	D-Asp	D-Asp	D-Asp
NRPS 2 DOM2	Ala	Ala	Ala
NRPS 3 DOM1	D-Thr	D-Thr	D-Thr
NRPS 3 DOM2	Ala	Ala	Ala
NRPS 3 DOM3	D-fN5HOrn	D-fN5HOrn	D-fN5HOrn

En la Tabla 4 se integran los resultados obtenidos mediante los programas de predicción y la metodología basada en análisis filogenético. Aplicando de nuevo el criterio de consenso se determinó una secuencia aminoacídica hipotética para la

cadena lateral de la ferribactina producida por *P. koreensis* I1, la cual correspondería a lisina, D-ácido aspártico, alanina, D-treonina, alanina y D-5 hidroxiornitina. De manera importante, esta secuencia es novedosa ya que no existe literatura que describa una secuencia igual o similar en las cadenas de ferribactina reportadas.

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos para cada análisis de predicción de la especificidad de sustratos para los dominios A de cada una de las NRPS detectadas en los *clusters* de biosíntesis de pioverdinas en el genoma de *P. koreensis* I1.

NRPS	antiSMASH	NRSPredictor2	PKS/NRPS	Neighbor-Joining	Máx. verosimilitud	Consenso final
NRPS 1 DOM1	X	Lys	Leu	Lys/Orn	Lys/Orn	Lys
NRPS 2 DOM1	D-Asn	D-Asn	D-Asp	D-Asp	D-Asp	D-Asp
NRPS 2 DOM2	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala
NRPS 3 DOM1	D-Thr	D-Thr	D-Thr	D-Thr	D-Thr	D-Thr
NRPS 3 DOM2	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala
NRPS 3 DOM3	D-X	D-5Horn	D-Leu	D-fN5HOrn	D-fN5HOrn	D-fN5HOrn

6.2 Distribución del CGB de biosíntesis de pioverdinas de *P. koreensis* I1 en otros genomas bacterianos.

Las pioverdinas se consideran moléculas específicas de cada especie, por lo tanto, se evaluó si existen en otros genomas bacterianos, vías que sinteticen precursores peptídicos predichos iguales al precursor de la cepa de *P. koreensis* I1. Esto es relevante ya que los estudios que existen relacionados a la biosíntesis de variantes de pioverdinas están limitados a una o pocas especies específicas dentro del género *Pseudomonas* (49, 85) y no se han hecho caracterizaciones extensivas en otros

genomas bacterianos. Este análisis se basó en la visualización y análisis del contexto genómico de las NRPS variables para identificar los genomas bacterianos que poseen genes para NRPS similares en organización y tamaño a los de *P. koreensis* I1.

Este análisis inició con la selección de un gen específico del *cluster* de biosíntesis de pioverdinas en el genoma de *P. koreensis* I1 que pudiera servir como punto de referencia para localizar las NRPS similares a las de *P. koreensis* I1 presentes en otros genomas. Este gen debe cumplir la condición de tener una ubicación específica en el CGB de *P. koreensis* I1 no conservada en la vía modelo. Además, su visualización debe permitir analizar fácilmente la organización genética del *cluster*. El gen específico seleccionado fue el que codifica para una alfa/beta hidrolasa corriente abajo de las NRPS que sintetizan la cadena peptídica lateral de la ferribactina de *P. koreensis* I1 (Fig. 4B). Primero se realizó un alineamiento inicial entre la secuencia aminoacídica de la alfa/beta hidrolasa y las proteínas de la base de datos InterPro desde la plataforma EFI, empleando un valor de $10e^{-100}$ como valor umbral a partir del cual se consideran homólogos relevantes. Con esto se obtuvieron 85 homólogos de la alfa/beta hidrolasa. Posteriormente, se construyó una red de similitud de secuencias (RSS) entre los 85 homólogos empleando un valor de $10e^{-125}$ como umbral para agrupar homólogos entre sí. Dicha RSS agrupó los homólogos en 3 *clusters* claramente diferenciados y 2 *singletons* (Fig. 10).

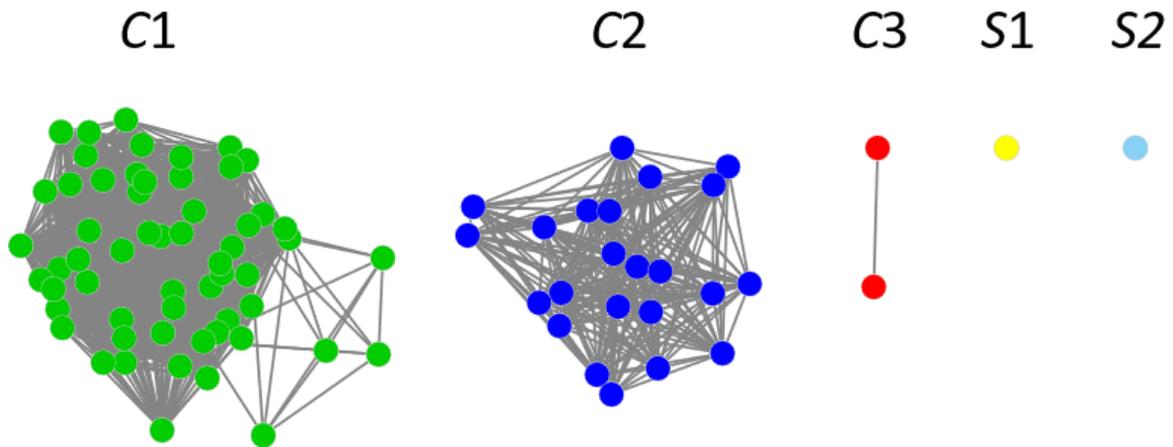
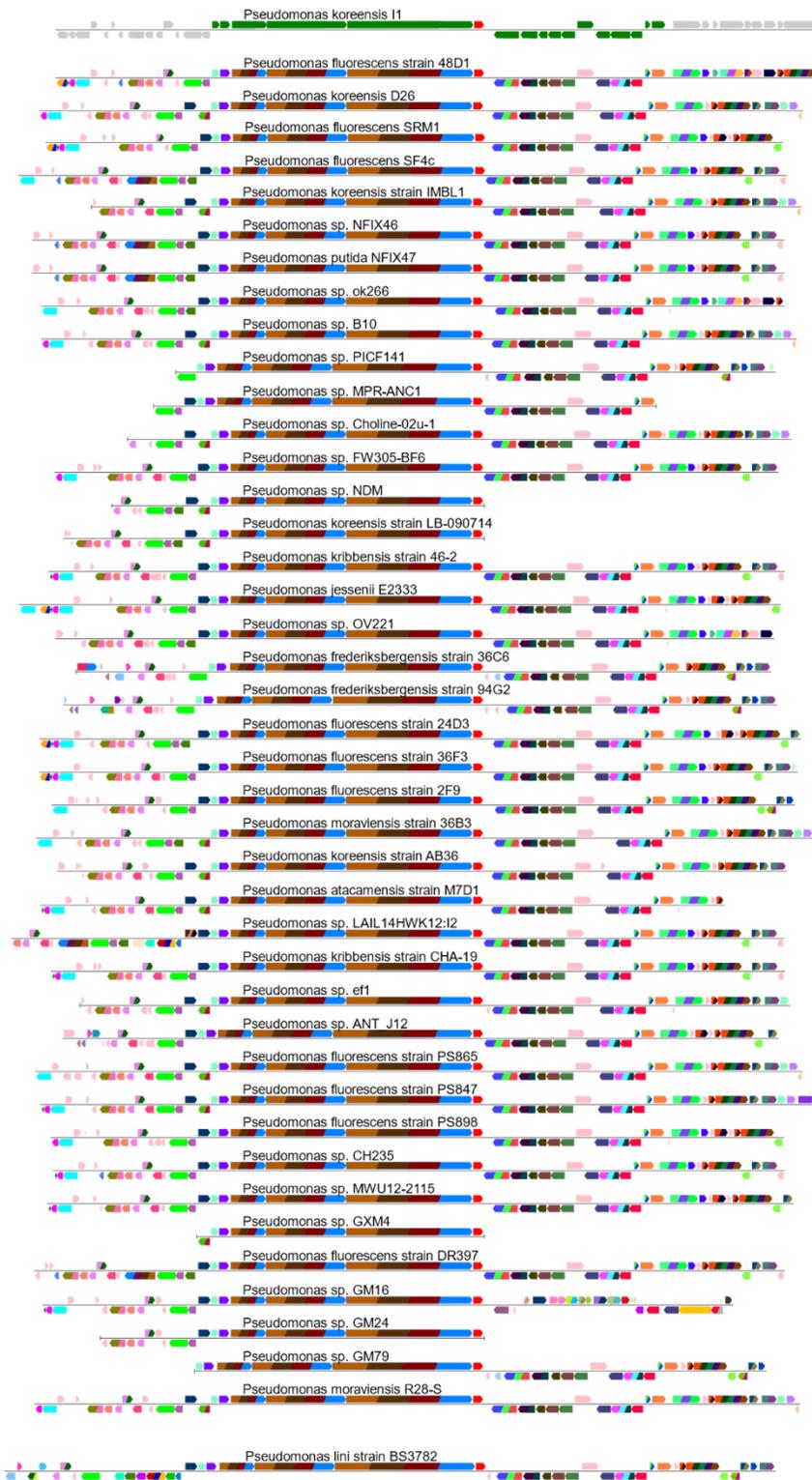


Figura 10. Red de similitud de secuencias (RSS) para los 85 homólogos del gen específico que codifica para una alfa/beta hidrolasa en la vía de biosíntesis de pioverdinas de *P. koreensis* I1. La RSS está formada por, C1: *cluster* 1 (verde), C2: *cluster* 2 (azul) y C3: *cluster* 3 (rojo) con 58, 23 y 2 homólogos respectivamente, junto con los S1: *singleton* 1 (amarillo) y S2: *singleton*2 (celeste).

Se analizó el contexto genómico de cada homólogo en cada *cluster* de la RSS para seleccionar los contextos que tuvieran una organización genómica similar a la encontrada en la vía de biosíntesis de pioverdinas de *P. koreensis* I1, los cuales se denominaron vías inicialmente similares (VIS), es decir, tres genes de longitud similar que codifiquen para NRPS y que estén adyacentes corriente abajo de un homólogo de alfa/beta hidrolasa. Se encontraron 47 contextos genómicos en el *cluster* 1, 1 contexto genómico en el *cluster* 3 y 1 contexto genómico en el *singleton* 1 que cumplían estas características. En total se identificaron 49 *clusters* con contextos genómicos inicialmente similares, de los cuales solo 48 *clusters* fueron analizados ya que uno de ellos se encontraba en un genoma retirado de la base de datos que correspondía a una cepa de *Pseudomonas putida*.

Para cada uno de los 48 *clusters* identificados se determinó la secuencia aminoacídica hipotética del péptido sintetizado por las NRPSs empleando la

metodología presentada anteriormente. Se encontró que en 41 *clusters* las NRPSs sintetizan hipotéticamente un péptido con la misma secuencia aminoacídica que la secuencia del precursor de *P. koreensis* I1. Además, 1 *cluster* en el genoma de una cepa de *Pseudomonas lini* posee NRPSs que sintetizan un péptido con los mismos aminoácidos de la ferribactina de *P. koreensis* I1, pero con una modificación isomérica en uno de los dos aminoácidos. Esto se determinó a partir de la predicción bioinformática con la plataforma PKS/NRPS donde se detectó la presencia de un dominio de epimerización adicional respecto a las NRPSs variables en *P. koreensis* I1. Finalmente, se encontraron 6 contextos que a pesar de ser inicialmente similares en cuanto a cumplir con las características de los genes para las NRPSs, sintetizarían hipotéticamente péptidos con algunos aminoácidos diferentes con respecto a los de la ferribactina de *P. koreensis* I1 (Fig. 11).



Lys, D-Asp, Ala, D-Thr, Ala, D-5hOm

Lys, D-Asp, Ala, D-Thr, Ala, D-5hOm

Lys, D-Asp, Ala, D-Thr, **D-Ala**, D-5hOm

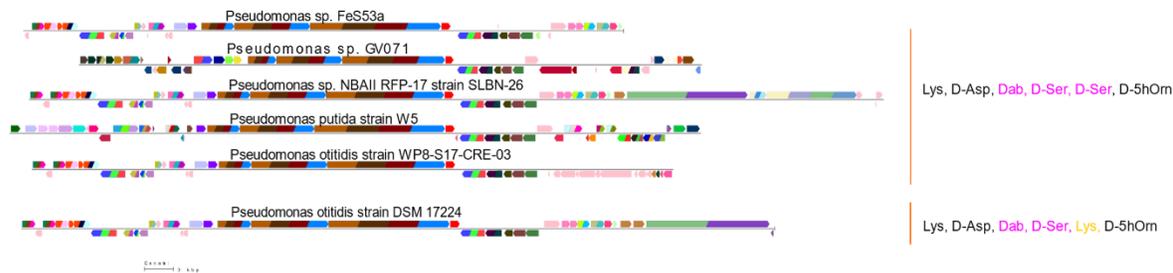


Figura 11. Contextos genómicos para homólogos del gen que codifica la alfa/beta hidrolasa (gen rojo al centro). En la parte superior (verde) se observa el contexto genómico en el genoma de *P. koreensis* I1. Hacia abajo se muestran contextos genéticos de genomas con NRPSs con una organización y tamaño similar a las de *P. koreensis* I1. A la derecha se indican las secuencias aminoacídicas hipotéticas de los péptidos sintetizados por las NRPSs según la predicción realizada. En colores se muestran las variaciones aminoacídicas respecto a la secuencia de *P. koreensis* I1. Las líneas verticales agrupan los contextos genómicos según el péptido sintetizado.

En la Tabla 5, se resume el resultado del análisis de este objetivo. Se determinó primero, que todas los *clusters* con VIS se encontraron en genomas asignados solamente a especies del género *Pseudomonas*. De los 41 *clusters* con un producto hipotético similar al de *P. koreensis* I1, 4 están en especies asignadas a *P. koreensis*, mientras 37 *clusters* están asignados a otras especies o especies no identificadas, incluyendo 18 a *Pseudomonas* sp, 10 a *P. fluorescens*, las especies *P. frederiksbergensis*, *P. kribbensis*, *P. moraviensis* con 2 *clusters* asignados cada una y finalmente, a las especies *P. atacamensis*, *P. jessenni* y *P. putida* se les asignó 1 *cluster* a cada una. Por lo tanto, según estos resultados, esta vía de biosíntesis de pioverdinas se encontraría en otras cepas asignadas a *P. koreensis* en la base de datos, pero no sería exclusiva de ésta, sino que estaría también conservada en otras especies del género *Pseudomonas*.

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos para la búsqueda de vías de biosíntesis de pioverdinas similares a la de *P. koreensis* I1 en otros genomas bacterianos. La segunda columna (VIS) son el total de *clusters* que muestran una organización similar a la de *P. koreensis* I1. La tercera columna corresponde a las vías que tras determinar la secuencia aminoacídica hipotética muestran ser iguales respecto a *P. koreensis* I1.

Especie	Vías inicialmente similares (VIS)	Vías similares confirmadas por predicción de péptido
<i>Pseudomonas</i> sp.	21	18
<i>P. atacamensis</i>	1	1
<i>P. fluorescens</i>	10	10
<i>P. frederiksbergensis</i>	2	2
<i>P. jessenii</i>	1	1
<i>P. koreensis</i>	4	4
<i>P. kribbensis</i>	2	2
<i>P. lini</i> *	1	0
<i>P. moraviensis</i>	2	2
<i>P. otitidis</i>	2	0
<i>P. putida</i>	2	1
TOTAL	48**	41

*La secuencia aminoacídica de *P. lini* es igual a la de *P. koreensis* I1 con una variación isomérica en el quinto aminoácido del péptido (Fig. 11).

** Del total de 49 contextos seleccionados inicialmente, solamente se incluyeron 48, puesto que se excluye el contexto detectado en el genoma retirado de la base de datos y que pertenecía a una cepa de *P. putida*.

6.3 Análisis filogenéticos de cepas que poseen vías de biosíntesis de pioverdinas similares a la de *P. koreensis* I1.

Como se observa en la Tabla 5, los 48 contextos inicialmente similares se detectaron en genomas de especies del género *Pseudomonas*. Además, la gran mayoría de las vías inicialmente similares contienen NRPSs que sintetizarían un péptido igual al de *P. koreensis* 1. Estos resultados son relevantes debido a que contradicen la característica descrita para las pioverdinas de ser específicas de especie. Por lo tanto, y con la finalidad de establecer las relaciones filogenéticas entre las especies con esta versión de ferribactina se complementó el análisis con inferencias filogenéticas.

El análisis consistió en obtener una reconstrucción del árbol filogenético de las cepas que poseen los *clusters* para la ferribactina similar a la de *P. koreensis* I1 mediante el método de NJ. Para este árbol filogenético también se incluyeron las cepas tipo de cada especie incluida en este grupo, además de todas las cepas asignadas a la especie *P. koreensis* de la base de datos en PATRIC. Esta reconstrucción se realizó a partir de la secuencia aminoacídica concatenada de 100 proteínas conservadas en los genomas que fueron empleadas para la construcción del árbol filogenético en la plataforma PATRIC. Como se observa en la figura 12, las cepas que producirían una ferribactina igual a la de *P. koreensis* I1 se agrupan dentro del complejo *P. fluorescens* determinado por la ubicación de cepas tipo del complejo, mientras que las 6 cepas cuyos genomas poseen CGB con organización genómica similar a *P. koreensis* I1, pero precursor peptídico diferente, se ubicaron por fuera del complejo. En primera instancia se puede determinar que existe una relación filogenética entre las cepas que contienen vías con organización genómica

similar a la de *P. koreensis*. Cuando se complementa este análisis con la visualización de las variantes de ferribactinas sintetizadas hipotéticamente se observa que varias cepas sintetizan hipotéticamente la misma variante de ferribactina. En este punto es importante destacar que, al parecer al menos la vía de biosíntesis del precursor peptídico estaría restringida al complejo *P. fluorescens*, pero se puede encontrar en otras especies, incluyendo no solo las más estrechamente relacionadas con *P. koreensis* I1.

Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos de un segundo análisis filogenético inferido a partir de la secuencia aminoacídica del receptor de pioverdinas (Fig. 13), observamos que el receptor forma *clusters* claramente diferenciados. Además, cuando visualizamos las variantes de ferribactinas sintetizadas hipotéticamente se observa que el receptor agrupa las cepas según la variante sintetizada. Este último resultado es una aproximación indirecta que provee apoyo a las predicciones de secuencia de las pioverdinas ya que como se mencionó anteriormente, los receptores son específicos para el tipo de pioverdinas. Teniendo en cuenta las distancias evolutivas en cada *cluster* en esta última filogenia se sugiere que entonces son varias las especies que podrían sintetizar las mismas pioverdinas.

Cadena peptídica ferribactina

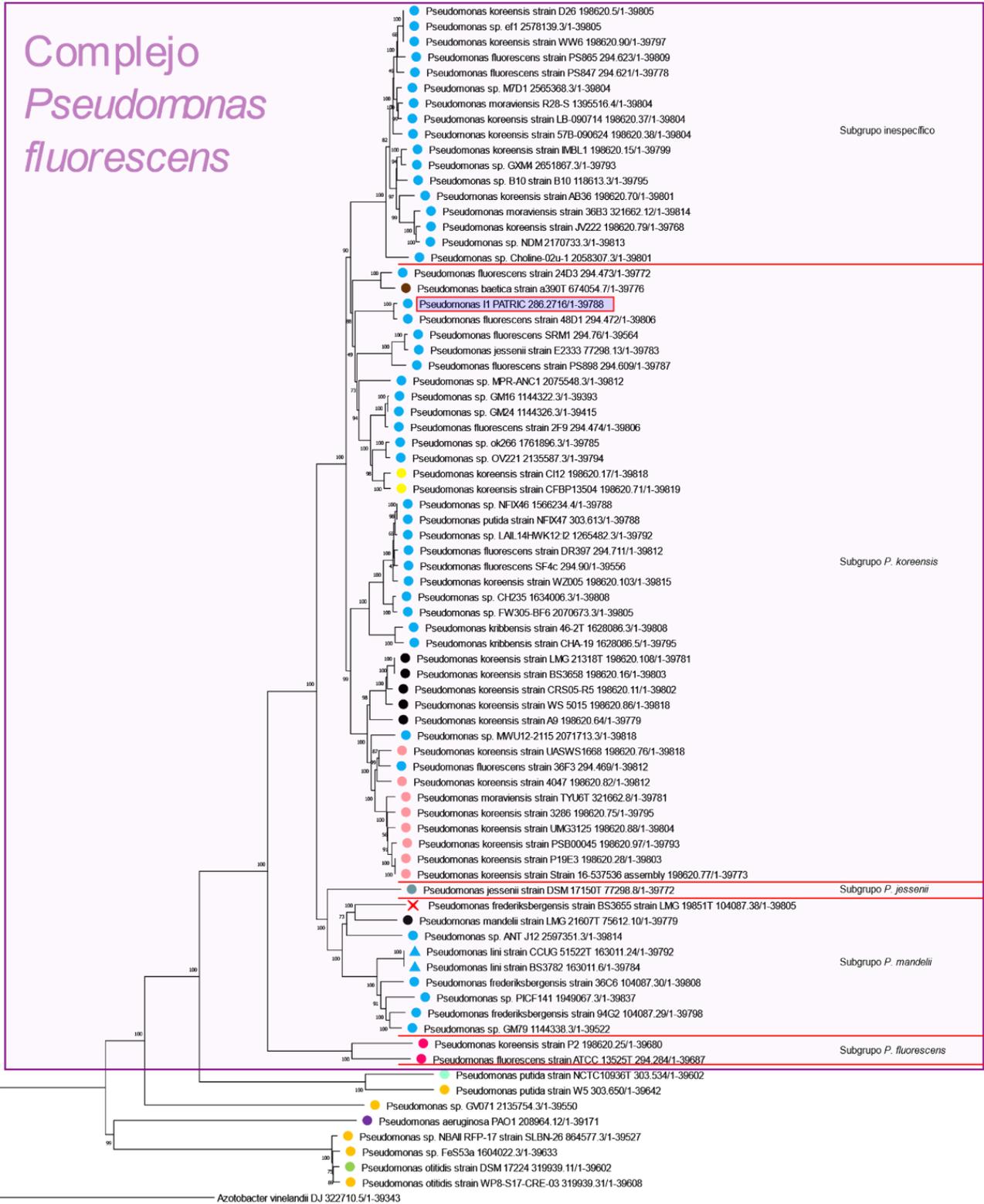




Figura 12. Árbol filogenómico inferido a partir del concatenado de 100 proteínas conservadas en los 78 genomas bacterianos, mediante metodología NJ, con el modelo de sustitución *number of differences* y un análisis de Bootstrap con 1000 réplicas. El recuadro morado muestra el complejo *P. fluorescens* y las líneas rojas delimitan los subgrupos del complejo. El recuadro rojo destaca la posición de *P. koreensis* I1 en la filogenia. Para cada cepa se determinó la secuencia aminoacídica de la cadena lateral de las ferribactinas sintetizadas hipotéticamente. Los colores de los círculos representan las variantes de ferribactina y en la parte inferior se muestra la secuencia aminoacídica para cada caso. Lys= lisina, Asp=ácido aspártico, Ala= alanina, Thr= treonina, 5 hOrn= 5 hidroxiornitina, Ser= serina, Gly= glicina, Gln= glutamina, Dab= 2,4 ácido diaminobutírico, His= histidina, Arg= arginina, X= aminoácido indeterminado.

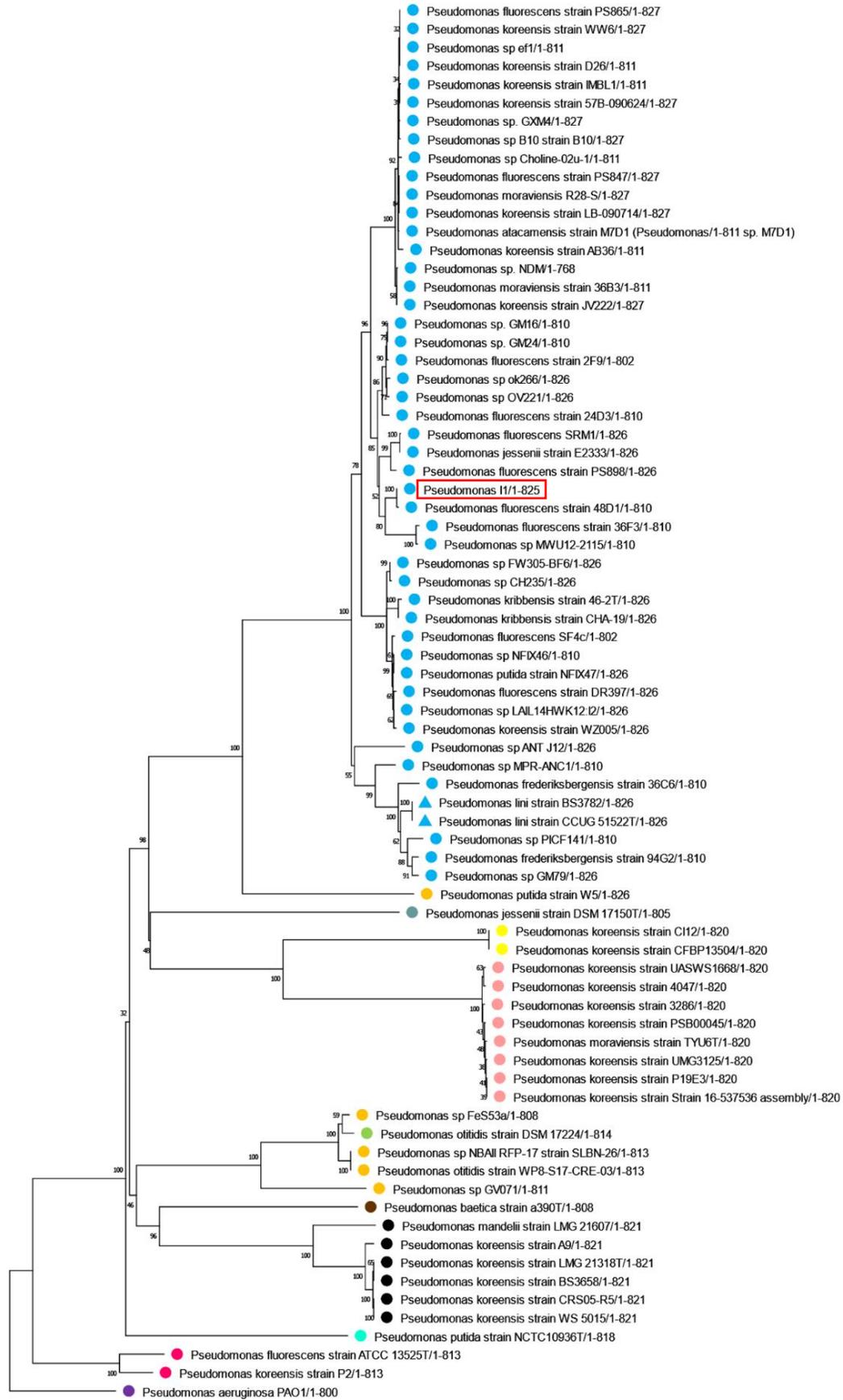


Figura 13. Árbol filogenético inferido a partir de la secuencia aminoacídica del receptor de sideróforos tipo pioverdinas en 76 genomas bacterianos, mediante la metodología NJ, con el modelo de sustitución *number of differences* y un análisis de Bootstrap con 1000 réplicas. El recuadro rojo destaca la posición de *P. koreensis* I1 en la filogenia. Cada color diferente representa una variante de ferribactina. Para cada cepa se determinó la secuencia aminoacídica de la cadena lateral de las ferribactinas sintetizadas hipotéticamente. Los colores de los círculos representan las variantes de ferribactina como en la figura 12.

7 DISCUSIÓN.

Desde los primeros estudios de caracterización de pioverdinas se empezó a demostrar la variabilidad que existe en la estructura de esta familia de compuestos. Posterior a esto, varios autores han estudiados pioverdinas provenientes de diferentes especies del género *Pseudomonas* (86, 87, 88). De estos estudios y por mucho tiempo se consideró a las pioverdinas moléculas específicas de las especies productoras, tanto así, que durante algunos años se empleó el siderotipificado como metodología para establecer identidades de especies de *Pseudomonas* aisladas de diferentes nichos ecológicos (89, 90). Esta metodología fue reemplazada rápidamente por el desarrollo de técnicas genéticas mucho más sencillas y precisas para establecer la identidad de los aislados bacterianos (91).

Actualmente, existe literatura que analiza la variabilidad de las pioverdinas centrándose principalmente en las cadenas peptídicas que son las que muestran la mayor variación. Esta característica está asociada a la especificidad propia del receptor de sideróforos presente en la membrana externa de las bacterias productoras (92, 93). A pesar de contar con literatura no fue posible encontrar una secuencia aminoacídica similar o igual a la determinada hipotéticamente para *P. koreensis* I1. A la fecha solo existe un reporte en donde se menciona la cadena de pioverdina para una cepa de *P. koreensis*. Esta corresponde a la secuencia de la pioverdina producida por la cepa tipo de la especie, *P. koreensis* LMG 21318 (94). La secuencia reportada en dicho trabajo fue inferida de manera indirecta mediante comparación con otras pioverdinas conocidas. Sin embargo, la secuencia reportada no coincide con la predicha para *P. koreensis* I1, lo que coincide con el hecho de

que en las predicciones esta cepa produce una variante diferente a la de la cepa tipo y apoya la hipótesis de que constituye una variante novedosa.

Como se mencionó anteriormente, durante mucho tiempo se consideró que las pioverdinas eran específicas de cada especie productora por lo cual cada especie tendría una variante propia. Un estudio previo mostró que en *P. aeruginosa* existen al menos 3 variantes diferentes de pioverdinas tanto en secuencia aminoacídica como en estructura (95). También, para *P. putida* se han descrito al menos 5 variantes del *cluster* para la biosíntesis de pioverdinas, las cuales están restringidas a la especie, ya que en este caso se determinó que especies estrechamente relacionadas a *P. putida* presentan *clusters* biosintéticos diferentes a estos 5 (96). Con este antecedente, se podría hipotetizar que este patrón existe en otras especies. Lo más relevante en este punto es que para el complejo *P. fluorescens* si bien existen estudios que mencionan las variantes de pioverdinas, en su mayoría solo se centran en algunas cepas caracterizadas (97, 98, 99). A diferencia de lo descrito para *P. putida*, según los resultados encontrados en este trabajo, la vía de biosíntesis de la ferribactina detectada inicialmente en el genoma de *P. koreensis* I1 podría encontrarse en genomas de otras especies diferentes. Un punto que destacar es la presencia hipotética de la variante de pioverdinas de *P. koreensis* I1 en el genoma de *Pseudomonas kribbensis* cepa 46-2, la cual corresponde a la cepa tipo para la especie, lo que refuerza la idea de que las variantes de pioverdinas no están completamente restringidas a una sola especie. Mas aún, esta variante se encontró en otros subgrupos del complejo *P. fluorescens* diferentes al subgrupo *P. koreensis*, como el subgrupo *P. mandelii* y un subgrupo al cual no fue posible

asignarle un nombre dada la ausencia de cepas tipo para alguna especie como se observa en la figura 12.

Las vías de biosíntesis de pioverdinas han sido ampliamente estudiadas a lo largo de los años lo que ha permitido caracterizar gran parte del proceso de biosíntesis y conocer los genes involucrados (100, 101, 102). Varios estudios muestran que una característica común en los genomas de *Pseudomonas* spp. es la presencia de vías de biosíntesis de pioverdinas, pero prácticamente se limitan solo a mencionar la presencia hipotética de las vías basándose en el mapeo de algunos genes caracterizados (103, 104, 107). Adicional a esto, se han descrito en algunas especies denominadas *Pseudomonas* no fluorescentes como *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas plecoglossicida* y *Pseudomonas frederiksbergensis* la ausencia de vías de biosíntesis para esta familia de sideróforos (105, 106). Esto coincide con los resultados presentados, ya que, en el genoma de *Pseudomonas frederiksbergensis* cepa BS3655, la cual corresponde a la cepa tipo para la especie, no se detectaron algunos de los genes esenciales para la biosíntesis de pioverdinas. Es importante mencionar que los estudios existentes no incluyen una amplia variedad de *Pseudomonas* spp. (104, 107, 108, 109), razón por la cual es difícil establecer si las vías de biosíntesis para pioverdinas con una organización genómica específica se pueden encontrar en otras especies del género.

Pocos estudios incluyen análisis a profundidad de la organización genómica de los CGB o de los sistemas NRPS y son todavía menos aquellos que describen las secuencias aminoacídicas para las pioverdinas sintetizadas (92, 93). Esto es

importante mencionar, ya que el desarrollo superficial de diferentes aspectos puede dejar de lado características que son interesantes y que aportan información, por ejemplo, en nuestro análisis, se detectó en el genoma de *Pseudomonas lini* un *cluster* biosintético para pioverdinas con NRPSs variables que bioinformáticamente son iguales a las NRPSs variables de *P. koreensis* I1 excepto por un dominio de epimerización adicional en la tercera NRPS lo que hipotéticamente generaría un cambio isomérico en uno de los aminoácido incorporado por esa NRPS. Se ha descrito que mediante análisis bioinformáticos se pueden identificar dominios accesorios dentro de los módulos de las NRPSs pero que tras caracterización experimental son dominios no funcionales (110, 111). Por lo tanto, queda la interrogante de si este dominio de epimerización adicional detectado en las NRPSs de *P. lini* es funcional, lo que destaca una de las limitaciones de las plataformas bioinformáticas en cuanto a que se requiere análisis experimentales para confirmar los resultados.

El desarrollo de técnicas que permiten caracterizar experimentalmente metabolitos especializados como pioverdinas han permitido tener un buen entendimiento de los aspectos mecanísticos del proceso de biosíntesis, pero actualmente uno de los mayores vacíos que existen en el estudio de las pioverdinas es el relacionado con estudios de tipo evolutivo (112, 113). Si bien hay estudios generales que incluyen diferentes especies del género *Pseudomonas* e incluso estudios que se centran en el complejo *P. fluorescens* (114), no pudimos encontrar alguno que haya incluido las vías de biosíntesis de pioverdinas como parte de los parámetros para determinar relaciones evolutivas entre las especies del género *Pseudomonas*. Esto limita la

información disponible que se tiene sobre la evolución de las vías de biosíntesis de pioverdinas. Este trabajo permite tener un punto de referencia en cuanto a la evolución de las vías de biosíntesis de pioverdinas en el complejo *Pseudomonas fluorescens*. Como se mencionó anteriormente, se detectó la presencia hipotética de la variante de pioverdinas de *P. koreensis* I1 en otros subgrupos y especies dentro del complejo *P. fluorescens*, esto de por sí ya es relevante, pero cuando se analizó la filogenia inferida a partir del gen de receptor de pioverdinas se obtuvieron resultados que coinciden con algunas características reportadas para este sistema (65, 66). Inicialmente se observa que el receptor agrupa las cepas según la ferribactina sintetizada hipotéticamente. Dado que se ha reportado que el receptor es específico para la variante de pioverdina sintetizada, se sugiere que el receptor codificado puede reconocer las pioverdinas sintetizadas no solo por las especies filogenéticamente más cercanas sino también aquellas moléculas sintetizadas por cualquier especie que posea el mismo *cluster* de biosíntesis de pioverdinas actuando entonces como receptores de xenosideróforos, característica ya descrita en la literatura (94, 115).

Una limitante importante del presente estudio es que los resultados presentados en este trabajo consideraron a las pioverdinas a partir de una aproximación desde los precursores peptídicos ferribactinas. Ya que la estructura final de una pioverdina está determinada también por las enzimas accesorias y las reacciones que dan a lugar a la maduración de ferribactinas hacia pioverdinas (72, 116), estos análisis deberían además complementarse con análisis experimentales o contemplar la presencia y conservación de enzimas accesorias entre los *clusters*. Aun así, la

aproximación a partir del precursor y según los objetivos y metodología planteada en este trabajo permitió el aporte de información de gran relevancia y que generó un panorama inicial para la vía de biosíntesis de pioverdinas en el aislado *P. koreensis* I1.

8 CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten sugerir que la secuencia aminoacídica lisina, D-ácido aspártico, alanina, D-treonina, alanina y D-5 hidroxiornitina constituye la cadena peptídica lateral del precursor peptídico de la pioverdina de *P. koreensis* I1, el cual representa una nueva variante de las pioverdinas no descrita en la literatura.

Los resultados bioinformáticos obtenidos sugieren que la vía de biosíntesis de pioverdinas descrita en *P. koreensis* I1, se encuentra presente en otros genomas de cepas asignadas a la especie *P. koreensis*, así como en genomas de varias especies filogenéticamente separadas dentro del complejo *P. fluorescens*, no siendo exclusiva de *P. koreensis* I1.

9 BIBLIOGRAFIA

1. Stubbendieck RM, Vargas-Bautista C, Straight PD. Bacterial communities: Interactions to scale. (2016). *Front Microbiol.* 7, 1234. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01234>
2. Hermans SM, Buckley HL, Case BS, Curran-Cournane F, Taylor M, Lear G. Using soil bacterial communities to predict physico-chemical variables and soil quality. (2020). *Microbiome.* 8(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00858-1>
3. Youssef NH, Couger MB, McCully AL, Criado AE, Elshahed MS. Assessing the global phylum level diversity within the bacterial domain: A review. (2015). *J Adv Res.* 6(3), 269–282. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.10.005>
4. Walters KE, Martiny JBH. Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. (2020). *PLoS ONE.* 15(9), 0233872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233872>
5. Sexton DJ, Schuster M. Nutrient limitation determines the fitness of cheaters in bacterial siderophore cooperation. (2017). *Nature commun.* 8(1), 230. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00222-2>
6. Wood K. Microbial ecology: complex bacterial communities reduce selection for antibiotic resistance. (2019). *Current biology.* 29(21), 1143-1145. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.017>
7. Gorter FA, Manhart M, Ackermann M. Understanding the evolution of interspecies interactions in microbial communities. (2020). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 375(1798), 20190256. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0256>
8. Davies J. Specialized microbial metabolites: functions and origins. (2013). *J Antibiot.* 66(7), 361-364. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.61>
9. Suárez-Medina K, Coy-Barrera E. Diversidad de los compuestos orgánicos bioactivos de origen natural: una singularidad manifestada por la plasticidad en el metabolismo secundario. (2016). *Revista Facultad De Ciencias Básicas.* 12(2), 252-269. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2031>
10. Demain AL, Fang A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. En: Fiechter A. (eds). *History of Modern Biotechnology I. Advances in biochemical engineering/biotechnology*, vol 69, 1-39. Springer, Berlín, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1
11. Jakubiec-Krzesniak K, Rajnisz-Mateusiak A, Guspiel A, Ziemska J, Solecka J. Secondary metabolites of Actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. (2018). *Pol J Microbiol.* 67(3), 259-272. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-048>
12. Roongsawang N, Lim SP, Washio K, Takano K, Kanaya S, Morikawa M. Phylogenetic analysis of condensation domains in the nonribosomal peptide synthetases. (2005). *FEMS Microbiol Lett.* 252(1), 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.041>

13. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. (2016). *Nat Rev Genet*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
14. Tracanna V, de Jong A, Medema MH, Kuipers OP. Mining prokaryotes for antimicrobial compounds: from diversity to function. (2017). *FEMS Microbiol Lett.* 41(3), 417-429. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux014>
15. Puri AW. Specialized metabolites from methylotrophic Proteobacteria. (2019). *Curr Issues Mol Biol.* 33, 211-224. <https://doi.org/10.21775/cimb.033.211>
16. Albarano L, Esposito R, Ruocco N, Costantini M. Genome mining as new challenge in natural products discovery. (2020). *Mar Drugs.* 18(4), 199. <https://doi.org/10.3390/md18040199>
17. Williams AN, Sorout N, Cameron AJ, Stavrinides J. The integration of genome mining, comparative genomics, and functional genetics for biosynthetic gene cluster identification. (2020). *Front Genet.* 11, 1543. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.600116>
18. Lebedeva J, Juknevičiūtė G, Čepaitė R, Vickackaitė V, Pranckutė R, Kuisiėnė N. Genome mining and characterization of biosynthetic gene clusters in two cave strains of *Paenibacillus* sp. (2021). *Front Microbiol*, 11, 612483. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612483>
19. Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E, Breitling R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. (2011). *Nucleic Acids Res.* 39, 339-346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>
20. Ledermann Dehnhardt W. De cómo se gestó el alcantarillado de Santiago de Chile [About how was gestated the sewerage in Santiago de Chile]. (2021). *Rev Chilena Infectol.* 38(1), 102-105. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000100102>
21. Navarro-Ortega A, Acuña V, Bellin A, Burek P, Cassiani G, Choukr-Allah R, Dolédec S, Elosegi A, Ferrari F, Ginebreda A, Grathwohl P, Jones C, Rault, PK, Kok K, Koundouri P, Ludwig RP, Merz R, Milacic R, Muñoz I, Nikulin G, Barceló D. Managing the effects of multiple stressors on aquatic ecosystems under water scarcity. The GLOBAQUA project. (2015). *Sci Total Environ.* 503-504. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.08>
22. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. (2015). *Genome Res.* 25(7), 1043-1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
23. Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. (2009). *Infect Genet Evol.* 9(6). 1132-1147. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.08.001>

24. Lalucat J, Mulet M, Gomila M, García-Valdés E. Genomics in bacterial taxonomy: Impact on the genus *Pseudomonas*. (2020). *Genes*. 11(2), 139. <https://doi.org/10.3390/genes11020139>
25. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. (2011). *FEMS Microbiol Rev.*35(4), 652-680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
26. Narváez-Flórez SL, Gómez M, Martínez MM. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano. (2008). *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*, 37(1), 61-75. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-97612008000100004&lng=en&tlng=es.
27. Nikel PI, Chavarría M, Danchin A, de Lorenzo V. From dirt to industrial applications: *Pseudomonas putida* as a synthetic biology chassis for hosting harsh biochemical reactions. (2016). *Curr Opin Chem Biol*. 34, 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.05.011>
28. Khoshnood S, Heidary M, Asadi A, Soleimani S, Motahar M, Savari M, Saki M, Abdi M. A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of mupirocin against *Staphylococcus aureus*. (2019). *Biomed Pharmacother*. 109, 1809-1818. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.131>
29. Weimer A, Kohlstedt M, Volke DC, Nikel PI, Wittmann C. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. (2020). *Appl Microbiol Biotechnol*. 104(18), 7745–7766. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10811-9>
30. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. (1992). *Microbiol Immunol*. 36(12), 1251-1275. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1992.tb02129.x>
31. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(6), 3140-3145. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>
32. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. (2007). *Int J Syst Evol Microbiol*. 57(1), 81-91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>
33. Moore ERB, Mau M, Arnscheidt A, Böttger EC, Hutson RA, Collins MD, Van de Peer Y, De Wachter R, Timmis KN. The determination and comparison of the 16S rRNA gene sequence of species of the genus *Pseudomonas* (sensu

- stricto) and estimation of the natural intrageneric relationships. (1996). *Syst Appl Microbiol.* 19, 478-492. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80021-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80021-X)
34. Yamamoto S, Kasai H, Arnold DL, Jackson RW, Vivian A, Harayama S. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. (2000). *Microbiology (Reading)*. 146 (10), 2385-2394. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2385>
 35. Girard L, Lood C, Höfte M, Vandamme P, Rokni-Zadeh H, van Noort V, Lavigne R, De Mot R. The ever-expanding *Pseudomonas* Genus: Description of 43 new species and partition of the *Pseudomonas putida* group. (2021). *Microorganisms*. 9(8), 1766. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081766>
 36. Dillon MM, Ruiz-Bedoya T, Bundalovic-Torma C, Guttman KM, Kwak H, Middleton MA, Wang PW, Horuz S, Aysan Y, Guttman DS. Comparative genomic insights into the epidemiology and virulence of plant pathogenic *pseudomonads* from Turkey. (2021). *Microbial genomics*. 7(7). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000585>
 37. Guaya Íñiguez DE. Tesis de Magíster en Microbiología “Identificación y caracterización de genes para la síntesis de metabolitos especializados y bacteriocines de *Pseudomonas* sp. I1 involucrados en la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos microbianos”. (2021). *Repositorio académico de la Universidad de Chile*.
 38. Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, Medema MH, Weber T. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. (2019). *Nucleic Acids Res.* 47(1), 81-87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>
 39. Gu Y, Ma YN, Wang J, Xia Z, Wei HL. Genomic insights into a plant growth-promoting *Pseudomonas koreensis* strain with cyclic lipopeptide-mediated antifungal activity. (2020). *MicrobiologyOpen*. 9(9), 1092. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1092>
 40. Martínez-Núñez MA, López VEL. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. (2016). *Sustain Chem Process*. 4(13). <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0057-6>
 41. Miller BR, Gulick AM. Structural biology of nonribosomal peptide synthetases. (2016). *Methods mol biol.* 1401, 3-29. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3375-4_1
 42. Chen Y, McClure RA, Kelleher NL. Screening for expressed nonribosomal peptide synthetases and polyketide synthases using LC-MS/MS-based proteomics. (2016). *Methods mol biol.* 1401, 135-147. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3375-4_9
 43. Chen WJ, Kuo TY, Hsieh FC, Chen PY, Wang CS, Shin YL, Lai YM, Liu JR, Yang YL, Shih MC. Involvement of type VI secretion system in secretion of

- iron chelator pyoverdine in *Pseudomonas taiwanensis*. (2016). *Scientific reports*. (6), 32950. <https://doi.org/10.1038/srep32950>
44. Gao L, Guo J, Fan Y, Ma Z, Lu Z, Zhang C, Zhao H, Bie X. Module and individual domain deletions of NRPS to produce plipastatin derivatives in *Bacillus subtilis*. (2018). *Microb Cell Fact*. 17(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0929-4>
 45. Hider RC, Kong X. Chemistry and biology of siderophores. (2010). *Nat Prod Rep*. 27(5), 637-657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>
 46. Kramer J, Özkaya Ö, Kümmerli R. Bacterial siderophores in community and host interactions. (2020). *Nat Rev Microbiol*. 18(3), 152–163. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>
 47. Ringel MT, Brüser T. The biosynthesis of pyoverdines. (2018). *Microb Cell*. 5(10), 424-437. <https://doi.org/10.15698/mic2018.10.649>
 48. Owen JG, Ackerley DF. Characterization of pyoverdine and achromobactin in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448a. (2011). *BMC microbiol*. 11 (218). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-218>
 49. Bruce JB, Cooper GA, Chabas H, West SA, Griffin AS. Cheating and resistance to cheating in natural populations of the bacterium *Pseudomonas fluorescens*. (2017). *Evolution*. 71(10), 2484-2495. <https://doi.org/10.1111/evo.13328>
 50. Kang D, Kirienko NV. An in vitro cell culture model for pyoverdine-mediated virulence. (2020). *Pathogens*. 10(1), 9. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010009>
 51. Ellermann M, Arthur JC. Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions. (2017). *Free Radic Biol Med*. 105, 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.489>
 52. Wilson BR, Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y. Siderophores in iron metabolism: From mechanism to therapy potential. (2016). *Trends Mol Med*. 22(12), 1077-1090. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.005>
 53. Butaitė E, Kramer J, Wyder S, Kümmerli R. (2018). Environmental determinants of pyoverdine production, exploitation and competition in natural *Pseudomonas* communities. *Environ Microbiol*. 20(10), 3629-3642. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14355>
 54. Basalla J, Chatterjee P, Burgess E, Khan M, Verbrugge E, Wiegmann DD, LiPuma JJ, Wildschutte H. Loci encoding compounds potentially active against drug-resistant pathogens amidst a decreasing pool of novel antibiotics. (2019). *Appl Environ Microbiol*. 85(23), 01438-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01438-19>
 55. Zhang W, Liang W, Li C. Inhibition of marine *Vibrio* sp. by pyoverdine from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. (2016). *J Hazard Mater*. 302, 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.10.003>
 56. Sass G, Nazik H, Penner J, Shah H, Ansari SR, Clemons KV, Groleau MC, Dietl AM, Visca P, Haas H, Déziel E, Stevens DA. Studies of *Pseudomonas*

- aeruginosa* mutants indicate pyoverdine as the central factor in inhibition of *Aspergillus fumigatus* biofilm. (2017). *J Bacteriol.* 200(1), 00345-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00345-17>
57. Kang D, Kirienko DR, Webster P, Fisher AL, Kirienko NV. Pyoverdine, a siderophore from *Pseudomonas aeruginosa*, translocates into *C. elegans*, removes iron, and activates a distinct host response. (2018). *Virulence.* 9(1), 804-817. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1449508>
 58. Liu Y, Dai C, Zhou Y, Qiao J, Tang B, Yu W, Zhang R, Liu Y, Lu SE. Pyoverdines are essential for the antibacterial activity of *Pseudomonas chlororaphis* YL-1 under low-iron conditions. (2021). *Appl environ microbiol.* 87(7), 02840-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02840-20>
 59. Butaitė E, Kramer J, Kümmerli R. Local adaptation, geographical distance and phylogenetic relatedness: Assessing the drivers of siderophore-mediated social interactions in natural bacterial communities. (2021). *J evol biol.* 34(8), 1266-1278. <https://doi.org/10.1111/jeb.13883>
 60. Kirienko DR, Kang D, Kirienko NV. Novel Pyoverdine inhibitors mitigate *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. (2019). *Front microbiol.* 9, 3317. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03317>
 61. Cézard C, Sonnet P, Bouvier B. Ironing out pyoverdine's chromophore structure: serendipity or design? (2019). *J Biol Inorg Chem.* 24(5), 659–673. <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01678-x>
 62. Moon CD, Zhang XX, Matthijs S, Schäfer M, Budzikiewicz H, Rainey PB. Genomic, genetic and structural analysis of pyoverdine-mediated iron acquisition in the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25. (2008). *BMC microbiol.* 8(7). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-7>
 63. Aguado-Santacruz GA, Moreno-Gómez B, Jiménez FB, García-Moya E, Preciado-Ortiz RE. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. (2012). *Revista fitotecnica mexicana.* 35(1), 9-21. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018773802012000100004&lng=es&tlng=
 64. Shen J, Meldrum A, Poole K. FpvA receptor involvement in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. (2002). *J bacterial.* 184(12), 3268-3275. <https://doi.org/10.1128/JB.184.12.3268-3275.2002>
 65. Cobessi D, Celia H, Folschweiller N, Schalk IJ, Abdallah MA, Pattus F. The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 angstroms resolution. (2005). *J mol biol.* 347(1), 121-134. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.01.021>
 66. Nader M, Dobbelaere W, Vincent M, Journet L, Adams H, Cobessi D, Gally J, Schalk IJ. Identification of residues of FpvA involved in the different steps

- of Pvd-Fe uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. (2007). *Biochemistry*. 46(42), 11707–11717. <https://doi.org/10.1021/bi700997w>
67. Greenwald J, Hoegy F, Nader M, Journet L, Mislin GL, Graumann PL, Schalk, IJ. Real time fluorescent resonance energy transfer visualization of ferric pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. A role for ferrous iron. (2007). *J biol chem*. 282(5), 2987-2995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609238200>
 68. Ghysels B, Dieu B, Beatson SA, Pirnay JP, Ochsner UA, Vasil ML, Cornelis P. FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. (2004). *Microbiology (Reading)*. 150(6), 1671-1680. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27035-0>
 69. Bodilis J, Ghysels B, Osayande J, Matthijs S, Pirnay JP, Denayer S, De Vos D, Cornelis P. Distribution and evolution of ferripyoverdine receptors in *Pseudomonas aeruginosa*. (2009). *Environ microbiol*. 11(8), 2123-2135. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01932.x>
 70. McMorran BJ, Merriman ME, Rombel IT, Lamont IL. Characterisation of the *pvdE* gene which is required for pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. (1996). *Gene*. 176(1-2), 55-59. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)00209-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00209-0)
 71. Poppe J, Reichelt J, Blankenfeldt W. *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine maturation enzyme PvdP has a noncanonical domain architecture and affords insight into a new subclass of tyrosinases. (2018). *J biol chem*. 293(38), 14926-14936. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002560>
 72. Lamont IL, Martin LW. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. (2003). *Microbiology (Reading)*. 149(4), 833-842. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26085-0>
 73. Ravel J, Cornelis P. Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in *Pseudomonads*. (2003). *Trends microbiol*. 11(5), 195-200. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(03\)00076-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00076-3)
 74. Smith EE, Sims EH, Spencer DH, Kaul R, Olson MV. Evidence for diversifying selection at the pyoverdine locus of *Pseudomonas aeruginosa*. (2005). *J bacteriol*. 187(6), 2138-2147. <https://doi.org/10.1128/JB.187.6.2138-2147.2005>
 75. Röttig M, Medema MH, Blin K, Weber T, Rausch C, Kohlbacher O. NRPSpredictor2--a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. (2011). *Nucleic Acids Res*. 39, 362-367. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr323>
 76. Bachmann BO, Ravel J. Chapter 8. Methods for in silico prediction of microbial polyketide and nonribosomal peptide biosynthetic pathways from DNA sequence data. (2009). *Methods enzymol*. 458, 181-217. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04808-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04808-3)
 77. Perrin RM, Fedorova ND, Bok JW, Cramer RA, Wortman JR, Kim HS, Nierman WC, Keller NP. Transcriptional regulation of chemical diversity in

- Aspergillus fumigatus* by LaeA. (2007). *PLoS Pathog.* 3(4), 50. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030050>
78. Kaniusaite M, Kittilä T, Goode R, Schittenhelm RB, Cryle MJ. Redesign of substrate selection in glycopeptide antibiotic biosynthesis enables effective formation of alternate peptide backbones. (2020). *ACS chem Biol.* 15(9), 2444-2455. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00435>
79. Le Govic Y, Papon N, Le Gal S, Bouchara JP, Vandeputte P. Non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the human pathogenic fungus *Scedosporium apiospermum*. (2019). *Front Microbiol.* 10, 2062. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02062>
80. Rausch C, Hoof I, Weber T, Wohlleben W, Huson DH. Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. (2007). *BMC Evol Biol.* 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-78>
81. Khayatt BI, Overmars L, Siezen RJ, Francke C. Classification of the adenylation and acyl-transferase activity of NRPS and PKS systems using ensembles of substrate specific hidden Markov models. (2013). *PloS one.* 8(4), 62136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062136>
82. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. (2018). *Mol Biol Evol.* 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
83. Khayatt BI, van Noort V, Siezen RJ. The Genome of the plant-associated lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* KF147 harbors a hybrid NRPS-PKS system conserved in strains of the dental cariogenic *Streptococcus mutans*. (2020). *Curr Microbiol.* 77(1), 136-145. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01799-1>
84. Zallot R, Oberg N, Gerlt JA. The EFI web resource for genomic enzymology tools: Leveraging protein, genome, and metagenome databases to discover novel enzymes and metabolic pathways. (2019). *Biochem.* 58(41), 4169–4182. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00735>
85. Schalk IJ, Guillon L. Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. (2013). *Environ Microbiol.* 15(6), 1661-1673. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12013>
86. Mossialos D, Ochsner U, Baysse C, Chablain P, Pirnay JP, Koedam N, Budzikiewicz H, Fernández DU, Schäfer M, Ravel J, Cornelis P. Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent *pseudomonads* involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. (2002). *Mol Microbiol.* 45(6), 1673-1685. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03120.x>
87. Meyer JM. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. (2000). *Arch Microbiol.* 174(3), 135-142. <https://doi.org/10.1007/s002030000188>

88. Cornelis P, Matthijs S. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent *pseudomonads*: not only pyoverdines. (2002). *Environ microbiol.* 4(12), 787-798. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00369.x>
89. Munsch P, Geoffroy VA, Alatossava T, Meyer JM. Application of siderotyping for characterization of *Pseudomonas tolaasii* and "*Pseudomonas reactans*" isolates associated with brown blotch disease of cultivated mushrooms. (2000). *Appl environ microbiol.* 66(11), 4834-4841. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4834-4841.2000>
90. Fuchs R, Schäfer M, Geoffroy V, Meyer JM. Siderotyping a powerful tool for the characterization of pyoverdines. (2001). *Curr Top Med Chem.*1(1), 31-57. <https://doi.org/10.2174/1568026013395542>
91. Singh P, Khan A, Kumar R, Kumar R, Singh VK, Srivastava A. Recent developments in siderotyping: procedure and application. (2020). *World J Microbiol Biotechnol.* 36(12). <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02955-7>
92. Hartney SL, Mazurier S, Girard MK, Mehnaz S, Davis EW, Gross H, Lemanceau P, Loper JE. Ferric-pyoverdine recognition by Fpv outer membrane proteins of *Pseudomonas protegens* Pf-5. (2013). *J bacteriol.* 195(4), 765-776. <https://doi.org/10.1128/JB.01639-12>
93. Wei H, Aristilde L. Structural characterization of multiple pyoverdines secreted by two *Pseudomonas* strains using liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry with varying dissociation energies. (2015). *Anal Bioanal Chem.* 407(16), 4629–4638. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8659-5>
94. Matthijs S, Brandt N, Ongena M, Achouak W, Meyer JM, Budzikiewicz H. Pyoverdine and histocorrugatin-mediated iron acquisition in *Pseudomonas thivervalensis*. (2016). *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine.* 29(3), 467-485. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9929-1>
95. Schalk IJ, Guillon L. Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. (2013). *Environ microbiol.* 15(6), 1661-1673. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12013>
96. Molina L, Geoffroy VA, Segura A, Udaondo Z, Ramos JL. Iron Uptake Analysis in a Set of Clinical Isolates of *Pseudomonas putida*. (2016). *Front microbiol.* 7, 2100. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02100>
97. Barelmann I, Fernández DU, Budzikiewicz H, Meyer JM. The pyoverdine from *Pseudomonas chlororaphis* D-TR133 showing mutual acceptance with the pyoverdine of *Pseudomonas fluorescens* CHAO. (2003). *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine.* 16(2), 263-270. <https://doi.org/10.1023/a:1020615830765>
98. Edberg F, Kalinowski BE, Holmström SJ, Holm K. Mobilization of metals from uranium mine waste: the role of pyoverdines produced by *Pseudomonas fluorescens*. (2010). *Geobiol.* 8(4), 278-292. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2010.00241.x>

99. Schalk IJ, Rigouin C, Godet J. An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent *Pseudomonads* and new insights into their complex cellular organization. (2020). *Environ microbiol.* 22(4), 1447-1466. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14937>
100. Drake EJ, Gulick AM. 1.2 Å resolution crystal structure of the periplasmic aminotransferase PvdN from *Pseudomonas aeruginosa*. (2016). *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 72(5), 403-408. <https://doi.org/10.1107/S2053230X16006257>
101. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. (2017). *Front Cell Infect Microbiol.* 7, 39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
102. Visca P, Ciervo A, Orsi N. Cloning and nucleotide sequence of the pvdA gene encoding the pyoverdine biosynthetic enzyme L-ornithine N5-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. (1994). *J bacteriol.* 176(4), 1128-1140. <https://doi.org/10.1128/jb.176.4.1128-1140.1994>
103. Meyer JM, Stintzi A, Coulanges V, Shivaji S, Voss JA, Taraz K, Budzikiewicz H. Siderotyping of fluorescent *pseudomonads*: characterization of pyoverdines of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* strains from Antarctica. (1998). *Microbiology (Reading).* 144(11), 3119-3126. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3119>
104. Garrido-Sanz D, Meier-Kolthoff JP, Göker M, Martín M, Rivilla R, Redondo-Nieto M. Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. (2016). *PLoS one.* 11(2), 0150183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150183>
105. Andersen SM, Johnsen K, Sørensen J, Nielsen P, Jacobsen CS. *Pseudomonas frederiksbergensis* sp. nov., isolated from soil at a coal gasification site. (2000). *Int J Syst Evol Microbiol.* 50(6), 1957-1964. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-6-1957>
106. Meyer JM, Geoffroy VA, Baida N, Gardan L, Izard D, Lemanceau P, Achouak W, Palleroni NJ. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent *Pseudomonads*. (2002). *Appl Environ Microbiol.* 68(6), 2745-2753. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2745-2753.2002>
107. Clevenger KD, Mascarenhas R, Catlin D, Wu R, Kelleher NL, Drake EJ, Gulick AM, Liu D, Fast W. Substrate trapping in the siderophore tailoring enzyme PvdQ. (2017). *ACS chem Biol.* 12(3), 643-647. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00031>
108. Shen X, Hu H, Peng H, Wang W, Zhang X. Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. (2013). *BMC genomics.* 14(271). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-271>

109. Cézard C, Farvacques N, Sonnet P. Chemistry and biology of pyoverdines, *Pseudomonas* primary siderophores. (2015). *Curr med chem.* 22(2), 165-186. <https://doi.org/10.2174/0929867321666141011194624>
110. Calcott MJ, Owen JG, Ackerley DF. Efficient rational modification of non-ribosomal peptides by adenylation domain substitution. (2020). *Nature commun.* 11(1), 4554. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18365-0>
111. Wheadon MJ, Townsend CA. Evolutionary and functional analysis of an NRPS condensation domain integrates β -lactam, D-amino acid, and dehydroamino acid synthesis. (2021). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 118(17). <https://doi.org/10.1073/pnas.2026017118>
112. Gacek-Matthews A, Chromiková Z, Sulyok M, Lücking G, Barák I, Ehling-Schulz M. Beyond toxin transport: Novel role of ABC transporter for enzymatic machinery of cereulide NRPS assembly line. (2020). *mBio.* 11(5), 01577-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01577-20>
113. Baunach M, Chowdhury S, Stallforth P, Dittmann E. The landscape of recombination events that create nonribosomal peptide diversity. (2021). *Mol biol evol.* 38(5), 2116–2130. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab015>
114. Lopes LD, Davis EW, Pereira E, Silva MC, Weisberg AJ, Bresciani L, Chang JH, Loper JE, Andreote FD. Tropical soils are a reservoir for fluorescent *Pseudomonas* spp. biodiversity. (2018). *Environ microbiol.* 20(1), 62-74. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13957>
115. Llamas MA, Imperi F, Visca P, Lamont IL. Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport, and pathogenicity. (2014). *FEMS microbiol rev.* 38(4), 569–597. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12078>
116. Baune M, Qi Y, Scholz K, Volmer DA, Hayen H. Structural characterization of pyoverdines produced by *Pseudomonas putida* KT2440 and *Pseudomonas taiwanensis* VLB120. (2017). *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine.* 30(4), 589–597. <https://doi.org/10.1007/s10534-017-0029-7>