



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE
PROTEÍNAS GroEL CON ACTIVIDAD INSECTICIDA
PROVENIENTES DE BACTERIAS SIMBIONTES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

ABRAHAM OMAR RIVERA RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ

Co-DIRECTOR

DRA. BLANCA INÉS GARCÍA GÓMEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias



**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE PROTEÍNAS GroEL CON ACTIVIDAD INSECTICIDA PROVENIENTES DE BACTERIAS SIMBIOTES**, que presenta el alumno **Abraham Omar Rivera Ramírez (4420130909)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Armando Hernández Mendoza CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Blanca Inés García Gómez IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. Mario Soberón Chávez IBT-UNAM	APROBADO	
Dra. María Eugenia Núñez Valdez CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Sonia Dávila Ramos CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Edgar Dantán González CEIB-UAEM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

MARIO SOBERON CHAVEZ | Fecha:2022-05-11 16:36:15 | Firmante

te3z/jkMEqs8Palh5owUCsvmwwb35N9ehJo3wCiuFdvrfKONWYPBTYlkoGvPHE/8cLVfZ2uzl1M354FYdG0dxj9muFTnjugLutoYYDRR4006PN011XNUPt6Fu95jDLW0EDUJhEgdP7/aXaU1oPpxkn9W5Yv58Zg3uVOqrla/L0kKJmlo/mVOInkQAw79C4Iah6bYn5S9yYIE7ELhCs9QcYy3K10VKRy1TmvPSf6vWOj6186meSyjnRUbuePJou0DLqv7O5i3mLJUul.8TTTFuh0dXSEKjZlwn+q12WzFZ6sl9glY+YvmO86ypcpMZPmCiJ3f0bzhK6YRs+LITNzQ==

EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2022-05-12 00:20:03 | Firmante

ic5PqZ6TxbwAqiYK1P2bp9/nk9pvlbJWA+zjTeAiPYLkk2qm+Xx4vQbKHnrophlqcsIPAFIAG7qIM3IGawfEwsspOyCalUeiSpQOdguySPxS4T/tkMTF3WKczPadjKTy9xIYBYMWDCNn4I2MWPtL7W3sftILP1VDSKv+oRLO1oXl/JVJwhvQgMeoW76LhgwPYCNTpyCFazyYuavCGprlSazCdi1XFf6m/e6ETn5UvvtOXok58klpORIZGLY4JmfbHIWexuRC5bd7Xl/5U+ZLZcPpmYcsiT4cPPu0leydo7bsZXARWc39lkAhRsDADSkZdRBkkNQiv1J9bpXJQoQ==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2022-05-12 08:47:51 | Firmante

KbBxBm9brRB0XYAQuN7baSG6tXVIne5BTJM/bxfq28qEsdK4nDKHgBshXCF3d6N1RMzS3oW6+OZe9z+YRRK27+e/+VnQryb6M6S5ZWJi07Cmbtas/kyddklk/wOxA1dS5ZiHgG40wkoKCj2CRMPjEAq2Z4uX8vWJL6zFXooZFWdNF5mQWMceRQ1ZUwzVECz0NipBsE+POBjwJWkaCqgm3zTX7LYs+q0SykM/3klnPia1LUho3ie6XsREmXXzURwtMX4mVpPFdvq4ruN2OeJT9rLhK0vt4Cgpy+FQSOSolu1W59x+eupF/NLsnAuFyN8IP9Geel1Jpjs7a5qNDw==

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2022-05-12 11:56:16 | Firmante

ujeNli359yfFq6/MU+UT1C/wufVAU9eFAzxx5Ij7BG9kqpUP0lfM8CdLmYeltjroiKCP7+fQaYpZiR3Ah3jyFmpuGGxS2BB+pTf+46Jzrns82rO/lkDBICn49DSrDW8SpkY7gvOio0gY45J e9qqDGCeSfvtZGkf35oEa8QdBiAP6eB0zbR+AZDlo2854WzWR3BZ/fJooj44CgaC/bs+F0RHMjr8gXUa6ypFf4uYoZbTnpjUMGccF9woU6ODpVlET5UQ9EBXc74zO2+AiFmZDF +hfS98vArSjaH6pLGRKjrzazc8VmcWQmu6C4fSGtNpFmUh8oKpPFwKQn0k43hbA==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2022-05-12 12:02:32 | Firmante

S8qPNU8uR747ECPsgHuOtCjZBU8SDkU4cx0es1mg2jfrIvOqrldS2NH+4clyVqzIqN+Tkco1YOqjWXcfSYWwFhVlqCMVL2BSJGbvOehRHrYGwg4VYWMRYvDg0etT3jCiz9fgyFoLSqpeaNQSK0E0HhJxxfUD1RyH4Gi7NN3OriLmv5IPTIHJ+VfkSOB2TAGzyaedu720366EWQyWV17V4cbHmRpJ5XnjGT9UORPBYu1NfdRZKZAcubAIXJ5cyOTdtRezmjrjrg9P9 b3SwQ3/JufGqC/jSAm6OLJmIsR29Ws8O5B589pVN64QN0HctL1qOwHvOeZkBppj1nr1R3YJQ==

BLANCA INES GARCIA GOMEZ | Fecha:2022-05-12 12:08:32 | Firmante

hiJO8aDZoH0UfERvf60gTjY5uUjPr+EBR7EoGTiZ51epJlbAxXTNgFqyBfc9olfq6JXFqP85+dt4Q0iEfxuOHESPUE+ArtnCIR3lmvEaliiBf+Eq8AsRV8KGiJcTS1r7G633wGXSR VcSfC0nctig25jGEZvPuaRJ7RvYHO4TD3ZsOtmHKHVU1/eq2cavrxY0nRaXNK8frure8CoaJoZ7v00lCpMtwUCekSuZUjHYtEBECjLcxsf7i/qwuhJAbTLPCX8Ap+68okVny11oq5V ijrVh8V6NFyB8dQZw0NX3uUSe60hb8Wly4HEWj/fil0tGB3E8FA37F1VlnQ==

MARIA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ | Fecha:2022-05-19 12:34:17 | Firmante

hoH+ESTpUYTSQvQZS9KUXJL0PW7KWF+hvmnl5J7K6I7gB51L5zkr4h2gFdiYJA5nyXiUuPCgnTOOHba3W62f2miAZGfDLMrfLS3bXyF8uOS2+BzFPPbHZ/FLKQ0I83uQve6ul sFKEvouz/ILWEWAQRILBLacp9TZcgQYNVLTVRh/eDku1dG6xyD2wxTxcaGQGPFaG+9biJ66cchcoNlg/GU9DxdipJHFaFRwgfULEf46U39J4710091MMMMEGAJ6zH6XpDhpKZ9 ycUSXueeAEc1bgkS6luyfn4gwzguQoUEfh+BcVK6dODF9HaQWGsw+t5UrbwF85+j3fhmTLQ==

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



R4ipZQLJH

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/WtphEiZ2VRleHO66MFHCAt3i3WX74im



El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Estudios Ecogenómicos (LEE) en el Centro de Investigación en Biotecnología (CeIB) pertenecientes a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). El proyecto contó con el financiamiento beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de apoyo 442935 y por el financiamiento con número de proyecto CONACyT A1-S-22034.

*“Esta mañana, tras haber oído a un astrónomo
hablar de miles de millones de soles,
he renunciado a asearme:
¿para qué seguir lavándose?”*
Ese maldito yo
E. M. Cioran

*“El mantenimiento de esta confrontación desesperada
entre la interrogación humana
y el silencio del mundo”*
El hombre rebelde
Albert Camus

A Sebastián Rivera
mi pequeña lamparita de inagotable aceite

A Rosalba Salgado
¿Qué puedo decir sobre una mujer que sabe cómo pienso,
y todavía duerme a mi lado cada día con las luces apagadas?

Con mucho amor para mis padres
Santa Ramírez Guerrero e Iván Rivera Sedeño

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del comité tutorial que durante más de cuatro años hicieron las observaciones oportunas y las sugerencias precisas para que éste trabajo se cumpliera de la mejor manera, a todos ellos gracias: Dra. Carmen Nina Pastor Colón, Dra. Blanca Inés García Gómez, Dr. Carlos Daniel Amero Tello y Dr. Edgar Dantán González.

A los miembros del Jurado Revisor de Tesis, por el tiempo dedicado al texto y todas las correcciones oportunas al mismo, Gracias.

Una agradecimiento muy especial y con mucho cariño al Dr. Edgar Dantán González, por darme la oportunidad de pertenecer al Laboratorio de Estudios Ecogenómicos, pero sobre todo por su calidad como ser humano. Algún te lo dije Edgar, hoy lo reitero y me lo llevo como enseñanza de vida: “Te debemos el despertar en nosotros el espíritu crítico”. ¡Muchas gracias por todo Edgar!

A la Dra. Blanca Ines García Gomez por todo el tiempo dedicado a enseñarme cuestiones técnicas y la revisión de cada uno de los escritos, por estar al pendiente en todo momento, ¡Gracias!

Innumerables personas que escapan en este espacio, pero que de alguna manera u otra y aún sin saberlo, contribuyeron a la realización de este trabajo, compañeros, amigos, familiares.

JURADO REVISOR DE TESIS

Dra. Carmen Nina Pastor Colón
Dra. María Eugenia Nuñez Valdéz
Dra. Blanca Inés García Gómez
Dra. Sonia Dávila Ramos
Dr. Mario Soberón Chávez
Dr. Armando Hernández Mendoza
Dr. Edgar Dantán González

ÍNDICE TEMÁTICO

	Pág
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	14
1. CHAPERONAS MOLECULARES	14
1.1. Chaperoninas	16
1.2. Múltiples genes Chaperonina/ <i>groEL</i> en bacterias	18
2. PROTEÍNAS “MOONLIGHTING”	23
2.1. Actividades moonlighting en Chaperonina 60/GroEL	26
2.2. Actividad Moonlighting en GroEL provenientes de bacterias Simbiontes	34
2.3. Modos de acción propuestos a través de los cuales GroEL actúa como toxina	37
3. ANTECEDENTES	41
4. JUSTIFICACIÓN	42
5. HIPÓTESIS	43
6. OBJETIVO GENERAL	43
6.1. Objetivos Particulares	43
7. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	44
8. MATERIALES Y MÉTODOS	45
8.1. Mantenimiento de las Cepas	45
8.2. Extracción de ADN y amplificación de los genes GroEL	45
8.3. Transformación de <i>E.coli</i> XL1-Blue	45
8.4. Expresión y purificación de las proteínas GroEL	46
8.5. Ensayos de toxicidad por inyección en <i>G.mellonella</i>	46
8.6. Alineamiento múltiple de secuencias	47
8.7. Modelamiento de las estructuras de GroEL	47
8.8. Evaluación de la actividad bioquímica de chaperonina GroEL	47
8.9. Evaluación de la toxicidad en dieta sobre <i>Spodoptera frugiperda</i>	47
8.10. Secuenciación y anotación del genoma	48
8.11. Análisis filogenómico	48
8.12. Ensayo de la actividad profenoloxidasa (PPO)	49
8.13. Tripsinización de las proteínas GroEL	50
8.14. Análisis estadístico	50
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
9.1. Evaluación de la actividad insecticida de las diferentes cepas provenientes de nemátodos entomopatógenos y sus extractos proteicos	51
9.2. Expresión y purificación de las diferentes proteínas GroEL	55
9.3. Evaluación de la actividad insecticida de las proteínas GroEL	56
9.4. Toxicidad de las proteínas GroEL por vía oral sobre <i>S. frugiperda</i>	59
9.5. Evaluación de la actividad chaperonina de las diferentes GroEL	61

9.6.	Evaluación de la actividad insecticida de las proteínas GroEL tripsinizadas	62
9.7.	Evaluación <i>in vitro</i> de la activación del sistema profenol-oxidasa (PPO) por proteínas GroEL	64
9.8.	Alineamiento múltiple de secuencias GroEL	66
10.	CONCLUSIONES	68
11.	DATOS ADICIONALES	69
11.1.	Características genómicas y métricas de ensamblaje de la cepa SC 0516	69
11.2.	Análisis del pangenoma y filogenético de <i>X. nematophila</i> SC 0516	69
11.3.	Evaluación y comparación de la patogenicidad de las cepas <i>X.nematophila</i> SC0516 y <i>P.luminescens</i> HIM3 en <i>G.mellonella</i> .	75
12.	REFERENCIAS	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de múltiples genes Cpn60 (chaperonina) en genomas bacterianos completamente secuenciados.

Tabla 2. Géneros bacterianos con proteínas Cpn60 de superficie celular y sus ligandos conocidos.

Tabla 3. Resumen de actividades moonlighting en chaperoninas 60/GroEL de bacterias

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las chaperonas moleculares promueven el plegamiento por un mecanismo de partición cinética.

Figura 2. Arquitectura molecular y mecanismo de acción del sistema GroEL-GroES.

Figura 3. Una toxina de insecto producida por un endosimbionte salival de las larvas de la hormiga león es un homólogo de GroEL

Figura 4. Actividad insecticida de XnGroEL sobre las larvas de *H. armigera*.

Figura 5. Detección de la unión de XnGroEL a la membrana epitelial del intestino mediante inmunohistoquímica y constantes de unión de XnGroEL a la -quitina.

Figura 6. Resumen esquemático de los sistemas de activación de la profenoloxidasa en los artrópodos.

Figura 7. Análisis de la actividad de la PPO en la hemolinfa de las larvas de *G. mellonella*

Figura 8. Evaluación de la patogenicidad de las diferentes cepas bacterianas a las 48 horas post inyección.

Figura 9. Evaluación de la toxicidad del extracto proteico del sobrenadante de las diferentes cepas bacterianas a las 48 horas post inyección.

Figura 10. Evaluación de la toxicidad del extracto proteico intracelular de las diferentes cepas bacterianas a las 48 horas post inyección.

Figura 11. Purificación y rendimiento de las proteínas GroEL recombinantes.

Figura 12. Evaluación de la actividad insecticida de las proteínas GroEL a las 48 horas post inyección.

Figura 13. Análisis de la supervivencia de *Spodoptera frugiperda* expuestas a diferentes concentraciones de GroEL en dieta artificial.

Figura 14. Evaluación de la actividad chaperonina de las proteínas GroEL.

Figura 15. Comparativa de proteínas GroEL intactas contra proteínas tratadas con tripsina.

Figura 16. Evaluación de la actividad insecticida de los fragmentos proteolíticos provenientes de proteínas GroEL tripsinizadas.

Figura 17. Análisis *in vitro* de la actividad profenoloxidasa con hemolinfa de *G.mellonella*.

Figura 18. Alineamiento múltiple de secuencias y estructuras 3D de las proteínas GroEL.

Figura 19. Análisis del pangenoma

Figura 20. Clasificación funcional COG de los genes pertenecientes al genoma central de Xenorhabdus-Photorhabdus.

Figura 21. Filogenia del genoma central de máxima verosimilitud (ML).

Figura 22. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de larvas de *G. mellonella* tras la inyección directa con *X. nematophila* SC 0516.

Figura 23. Fenotipos de las larvas de *G. mellonella* tras la inyección de *X. nematophila* SC 0516.

Figura 24. Genes únicos y compartidos entre *X. nematophila* SC 0516 y *P. luminescens* HIM3.

LISTAS DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADP - adenosín difosfato	min - minutos
ATP - adenosín trifosfato	ml - mililitros
BSA - albúmina de suero bovino	mM - milimolar
°C - grados Celsius	µg - microgramos
CL50 - concentración letal cincuenta	µl - microlitros
Cpn - chaperonina	NADH - dinucleótido de nicotinamida y adenina
DL50 - dosis letal cincuenta	ng - nanogramos
DNA - ácido desoxirribonucleico	nm - nanómetros
Fw - oligonucleótido forward	O.D - densidad óptica
Fw- oligonucleótido forwardGroEL - Chaperonina 60	OMVs - vesículas de membrana externa
g - gramos	PAGE - electroforesis en gel de poliacrilamida
GroES - Co-Chaperonina	PBS - buffer de fosfatos
HCl - ácido clorhídrico	PCR - reacción en cadena de la polimerasa
HIP57 - proteína GroEL proveniente de <i>Xenorhabdus budapestensis</i>	pET28 - plásmido de expresión
Hsp - Proteínas de choque térmico (por su siglas en inglés "Heat shock proteins")	pH - potencial de hidrógeno
IPTG - isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	pJET - plásmido de clonación
ITS - espaciador transcrito interno	RNA - ácido ribonucleico
K_{agg} - constante de velocidad para agregación	rpm - revoluciones por minuto
KDa - kilodaltons	rRNA - ácido ribonucleico ribosomal
K_{fold} - constante de velocidad de plegamiento	rRNA - ácido ribonucleico ribosomal
K_{on} - constante de velocidad para unión	Rv - oligonucleótido reverse
LDH - lactato deshidrogenasa	s - segundos
LB - caldo de cultivo Luria Bertani	SDS - dodecilsulfato de sodio
mg - miligramos	XnGroEL - proteína GroEL proveniente de <i>Xenorhabdus</i>
Mg⁺ - ión magnesio	16S - RNA ribosomal en procariontes
	18S - RNA ribosomal en eucariontes

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL TRABAJO DE TESIS



microorganisms

an Open Access Journal by MDPI



Comparative Genomics and Pathogenicity Analysis of Two Bacterial Symbionts of Entomopathogenic Nematodes: The Role of the GroEL Protein in Virulence

Abraham Rivera-Ramírez; Rosalba Salgado-Morales; Alfredo Jiménez-Pérez; Rebeca Pérez-Martínez; Blanca Inés García-Gómez; Edgar Dantán-González

Microorganisms **2022**, Volume 10, Issue 3, 486

RESUMEN

Las chaperonas moleculares o proteínas de choque térmico, son una amplia familia de proteínas sin relación que han sido caracterizadas principalmente por sus funciones vitales para la célula como son: asistencia del plegado proteico, mantenimiento de la integridad del proteoma y la proteostasis (homeostasis proteica). Una de la subfamilia mejor caracterizada han sido las proteínas Hsp60 o también referidas a ellas como chaperoninas 60 (GroEL en el caso de bacterias). Estas proteínas forman un complejo en forma de doble anillo que se encargan principalmente de asistir el plegamiento de proteínas mal plegadas o que no han alcanzado su estado nativo, estas chaperonas requieren también la asistencia de una co-chaperonina Hsp10 (GroES) para su correcto funcionamiento. Genes que codifican para estas proteínas han sido identificados en todos los genomas bacterianos secuenciados hasta la fecha, existiendo diferencias en cuanto al número de copias entre los diferentes grupos que existen, así como entre miembros del mismo grupo.

Un hallazgo hecho varias décadas atrás fue el descubrimiento de funciones alternativas para estas proteínas, consideradas hoy en día como proteínas “moonlighting”. Aunque ya han sido caracterizadas varias funciones alternativas para estas proteínas como son activadores de la respuesta inmune en mamíferos (activación de monocitos y macrófagos), formación del biofilm en bacterias, función como adhesina, función como tirosin-cinasa entre otras. Quizá, una de las actividades más sorprendentes y recientemente descubiertas de los miembros de esta familia ha sido la de ejercer actividad tóxica en contra de eucariontes. Tal es el caso de una proteína proveniente de *Enterobacter aerogenes*, que es una bacteria que muestra una asociación simbiótica con insectos del género *Myrmeleon*, esta proteína mostró actividad tóxica sobre cucarachas del género *Blattella germanica* al ser inyectada en el hemocele, y que al ser caracterizada fue identificada como una proteína GroEL. Estudios aún más recientes demuestran la actividad insecticida de estas proteínas identificadas como GroEL provenientes de bacterias simbiotas del género *Xenorhabdus*, asociadas específicamente a nemátodos entomopatógenos del género *Steinernema*, y cuando fueron evaluadas mostraron ser tóxicas contra larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Galleria mellonella*. Algo que resulta interesante es el hecho que todas estas proteínas son provenientes de microorganismos con algún tipo de asociación simbiótica. En nuestro laboratorio se han aislado diversas bacterias provenientes de nemátodos entomopatógenos, y donde el estudio de éstas proteínas no ha sido reportado hasta ahora.

Con base en lo expuesto anteriormente, este trabajo tuvo como objetivo analizar y caracterizar bioquímica y molecularmente la actividad tóxica de estas proteínas en contra de insectos y si esta actividad se encuentra estrechamente relacionada con el estilo de vida de estas bacterias. Además, otro punto a evaluar es si estas proteínas pueden ser consideradas como moonlighting, es decir conservar su actividad canónica como chaperona y a su vez ejercer la función de toxina. Primeramente, nuestros resultados mostraron que sólo tres bacterias fueron patógenas y altamente virulentas *Pseudomonas aeruginosa* NA04, *Photorhabdus luminescens* HIM3 y *Xenorhabdus nematophila* SC 0516 cuando fueron evaluadas células completas, extracto proteico del

sobrenadante y el extracto proteico intracelular ejerciendo un efecto dosis dependientes en todos los casos . Sin embargo, cuando fue evaluada la actividad insecticida de las proteínas GroEL de las diferentes cepas sobre larvas de *G.mellonella*, únicamente aquella proveniente de *X.nematophila* llamada GroELXn mostró una actividad estadísticamente significativa en comparación con sus ortólogos, la DL50 para esta proteína fue de 102.35 ng/larva. Así mismo, la proteína GroELXn mostró la mayor actividad tóxica cuando las proteínas fueron evaluadas por vía oral en dieta artificial sobre larvas neonatas de *S.frugiperda*, obteniendo una DL50 de 17.56 µg/g de dieta. Cuando se evaluó la actividad chaperonina de las proteínas mediante el ensayo de replegamiento de la enzima LDH, no se detectaron diferencias significativas entre las proteínas GroEL, indicando que todas pueden llevar a cabo la función canónica de chaperona molecular. Los resultados sugieren que GroELXn es capaz de llevar a cabo ambas funciones, pudiendo ser considerada una proteína moonlighting. Como parte de las observaciones en el cambio del fenotipo de las larvas al ser inyectadas con la proteína GroELXn, decidimos evaluar la actividad profenoloxidasa, lo cual arrojó que GroELXn es capaz de activar fuertemente este sistema cuando es inyectada en el hemocele de los insectos, en comparación con GroELAf, con la menor actividad insecticida presentando diferencias altamente significativas. Por último, el análisis de las secuencias proteicas arrojó que las diferencias puntuales entre una u otra proteína se encuentran dispersas a lo largo de la cadena polipeptídica y no en un dominio particular. También el análisis mostró que la secuencia con una relación más estrecha a GroELXn fue la proveniente de *P.luminescens* HIM3 denominada GroELPI difiriendo en 35 aminoácidos, mientras que la que muestra un mayor grado de divergencia es GroELAf con 155 sustituciones diferentes.

ABSTRACT

Molecular chaperones, or heat shock proteins, are a large family of unrelated proteins that have been characterized primarily for their vital cellular functions such as assisting protein folding, maintaining proteome integrity and proteostasis (protein homeostasis). One of the best characterized subfamily has been the Hsp60 proteins or also referred to as chaperonins 60 (GroEL in the case of bacteria). These proteins form a complex in the form of a double ring that is mainly responsible for assisting the folding of misfolded proteins or proteins that have not reached their native state, these chaperones also require the assistance of an Hsp10 co-chaperonin (GroES) for proper function. Genes encoding for these proteins have been identified in all bacterial genomes sequenced to date, with differences in copy number among the different groups that exist, as well as among members of the same group.

A finding made several decades ago was the discovery of alternative functions for these proteins, considered today as "moonlighting" proteins. Although several alternative functions for these proteins have already been characterized, such as activators of the immune response in mammals (activation of monocytes and macrophages), biofilm formation in bacteria, function as adhesin, function as tyrosine kinase, among others. Perhaps one of the most surprising and recently discovered activities of the members of this family has been that of exerting toxic activity against eukaryotes. Such is the case of a protein from *Enterobacter aerogenes*, which is a bacterium that shows a symbiotic association with insects of the genus *Myrmeleon*, this protein showed toxic activity on cockroaches of the genus *Blattella germanica* when injected into the hemocoel, and when characterized it was identified as a GroEL protein. Even more recent studies demonstrate the insecticidal activity of these proteins identified as GroEL from symbiont bacteria of the genus *Xenorhabdus*, specifically associated with entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema*, and when evaluated were shown to be toxic against larvae of *Spodoptera frugiperda* and *Galleria mellonella*. Interestingly, all these proteins are from microorganisms with some kind of symbiotic association. In our laboratory, several bacteria have been isolated from entomopathogenic nematodes, and the study of these proteins has not been reported so far.

Based on the above, the objective of this work was to analyze and characterize biochemically and molecularly the toxic activity of these proteins against insects and whether this activity is closely related to the lifestyle of these bacteria. In addition, another point to evaluate is whether these proteins can be considered as moonlighting, i.e. retain their canonical chaperone activity and at the same time exert the toxin function.

Firstly, our results showed that only three bacteria were pathogenic and highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* NA04, *Photorhabdus luminescens* HIM3 and *Xenorhabdus nematophila* SC 0516 when whole cells, supernatant protein extract and intracellular protein extract were evaluated exerting a dose-dependent effect in all cases. However, when the insecticidal activity of the GroEL proteins of the different strains on *G. mellonella* larvae was evaluated, only the one from *X. nematophila* called

GroELXn showed a statistically significant activity in comparison with its orthologues, the LD50 for this protein was 102.35 ng/larva. Likewise, the GroELXn protein showed the highest toxic activity when the proteins were evaluated orally in artificial diet on neonate larvae of *S.frugiperda*, obtaining a LD50 of 17.56 µg/g diet. When the chaperonin activity of the proteins was evaluated by LDH enzyme refolding assay, no significant differences were detected among the GroEL proteins, indicating that all can perform the canonical molecular chaperone function. The results suggest that GroELXn is capable of carrying out both functions and can be considered a moonlighting protein. As part of the observations on the change in the phenotype of larvae when injected with GroELXn protein, we decided to evaluate the prophenoloxidase activity, which showed that GroELXn is able to strongly activate this system when injected into the hemocoel of insects, compared to GroELAf, with the lowest insecticidal activity presenting highly significant differences. Finally, the analysis of the protein sequences showed that the point differences between one or the other protein are dispersed along the polypeptide chain and not in a particular domain. The analysis also showed that the sequence with the closest relationship to GroELXn was the one from *P.luminescens* HIM3 called GroELPl differing by 35 amino acids, while the one showing the highest degree of divergence was GroELAf with 155 different substitutions.

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1. CHAPERONAS MOLECULARES

A finales de los 70, Roy Laskey introdujo el término "chaperonas moleculares" para describir el papel de una proteína de unión al DNA, la nucleoplasmina, que facilita la adecuada estructura terciaria del nucleosoma y evita la agregación de estas partículas en una solución de baja fuerza iónica (Laskey *et al.*, 1978). Esta definición se extendió más tarde, siguiendo estudios muy elegantes en el Grupo de Hugh Pelham sobre la interacción de Hsp70 con la proteína BiP en células B del sistema inmune (Munro & Pelham, 1986). Treinta años después, se acumularon una gran cantidad de conocimientos y evidencia sobre la activación, mecanismo de acción y la conservación de las chaperonas moleculares.

Podemos definir a una chaperona molecular como cualquier proteína que es capaz de interactuar, estabilizar y/o ayudar a otra proteína a adquirir su conformación tridimensional funcionalmente activa, sin formar parte de su estructura final. Las chaperonas son clasificadas en grupos tomando en cuenta diferentes aspectos como son, localización celular, modo de acción (foldasas, holdasas y disgregasas), tamaño, especificidad a sustratos entre otros (Richter *et al.* 2010; Kim *et al.* 2013). Muchas de estas son proteínas de estrés o proteínas de choque térmico (-heat shock proteins- Hsp por sus siglas en inglés), ya que su síntesis se ve inducida bajo condiciones desfavorables para la célula como puede ser temperaturas elevadas o estrés oxidativo, los cuales causan la desnaturalización de un conjunto clave de proteínas celulares. Las chaperonas no actúan de manera independiente, sino que forman redes complejas y dinámicas de chaperonas y co-chaperonas. Esta red es altamente dinámica y su composición se adapta fácilmente a los cambios ambientales y endógenos (Taipale *et al.*, 2014). Miembros de varios grupos de chaperonas fueron inicialmente nombradas tomando como base su peso molecular: Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 y Hsp pequeñas. Además de su papel fundamental en el plegamiento de proteínas *de novo*, las chaperonas están involucradas en otros aspectos de vital importancia como son el mantenimiento del proteoma celular, que incluye asistencia en el ensamble de complejos macromoleculares, transporte y degradación de proteínas, disociación de agregados proteicos y renaturalización de proteínas dañadas por estrés.

Las chaperonas que participan enteramente en el plegado *de novo* y renaturalización de proteínas son las Hsp60 o chaperoninas (denominadas GroEL en bacterias), Hsp70 y Hsp90, que funcionan como pequeños barriles moleculares compuestas por múltiples subunidades idénticas y donde su actividad se encuentra regulada alostéricamente por ATP. Además, estas proteínas son capaces de reconocer segmentos de residuos hidrofóbicos que se encuentran expuestos al medio acuoso de los sustratos proteicos sintetizados *de novo* o que no han alcanzado el plegamiento correcto y que más tarde se internalizarán en la proteína nativa. La unión a estos segmentos les permite reconocer los estados no nativos de una gran cantidad de proteínas. El plegamiento es después llevado a cabo durante ciclos regulados por la unión y liberación de ATP y por proteínas auxiliares llamadas co-chaperonas (GroES). Esto se logra mediante un mecanismo de partición cinética, donde las repetidas uniones de los sustratos proteicos a las chaperonas bloquean la agregación y reducen la concentración de intermediarios del plegamiento libres, mientras que la liberación transitoria de regiones hidrofóbicas en las proteínas es un proceso necesario para avanzar en el fenómeno de plegamiento (**Figura 1**).

Algunas chaperonas independientes de ATP, como las Hsp pequeñas, pueden funcionar previniendo y amortiguando los fenómenos de agregación. Alternativamente, estas proteínas agregadas pueden ser transferidas al proteosoma encargado de la degradación, para no comprometer la homeostasia celular.

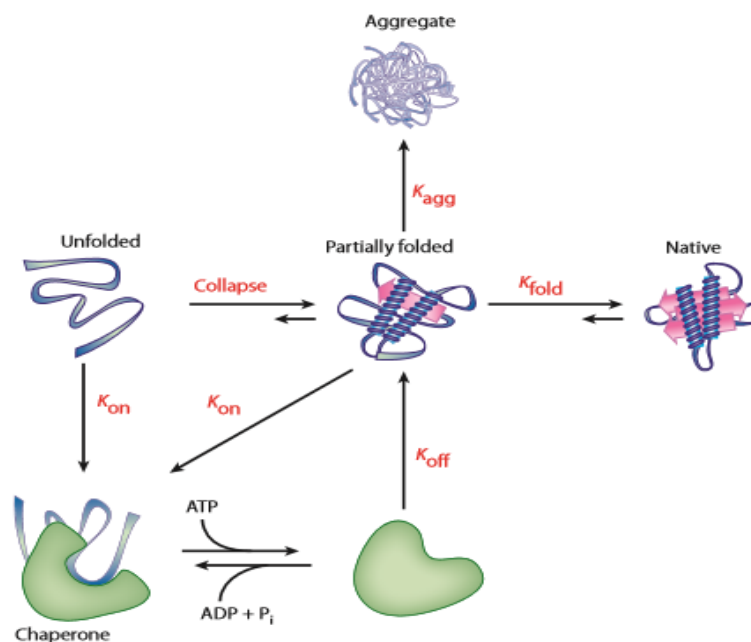


Figura 1.- Las chaperonas moleculares promueven el plegamiento por un mecanismo de partición cinética. Bajo condiciones fisiológicas, el estado desplegado de una proteína sufre un colapso rápido que da lugar a un intermediario compacto parcialmente plegado. Aunque el colapso de la cadena restringe el espacio conformacional que debe ser explorado en la ruta hacia el estado nativo, los intermediarios del plegamiento colapsados son a menudo estados propensos a la agregación o cinéticamente atrapados. Muchas chaperonas moleculares alternan entre estados de alta y baja afinidad hacia proteínas desplegadas y parcialmente plegadas, de una manera que se encuentra regulada por la unión e hidrólisis de ATP. El plegado se efectúa eficazmente cuando la constante de velocidad de plegamiento (**Kfold**) es mayor que la constante de velocidad para la unión de chaperonas (**Kon**) y la de agregación (**Kagg**). La unión o re-unión de la proteína no nativa a la chaperona da lugar a la partición cinética, evitando la agregación y favoreciendo el plegado. Cuando **Kon** es mayor que **Kfold**, el sistema chaperona funciona como una “holdasa”, estabilizando la proteína en un estado que evita la agregación para su posterior transferencia a otros sistemas de chaperonas o para su degradación. Durante la exposición a estrés conformacional, **Kagg** se hace mayor que **Kon**, dando como resultado la agregación. La célula contiente con esto sobrerregulando o potenciando su capacidad chaperona a través de las vías de respuesta al estrés. **Koff** es la constante de velocidad para la liberación de proteínas de chaperona y **Pi** es fosfato inorgánico. Figura tomada de Kim *et al.*, 2013 que fue adaptada y modificada a su vez de la Hartl & Hayer-Hartl, 2009.

2.1 Chaperoninas

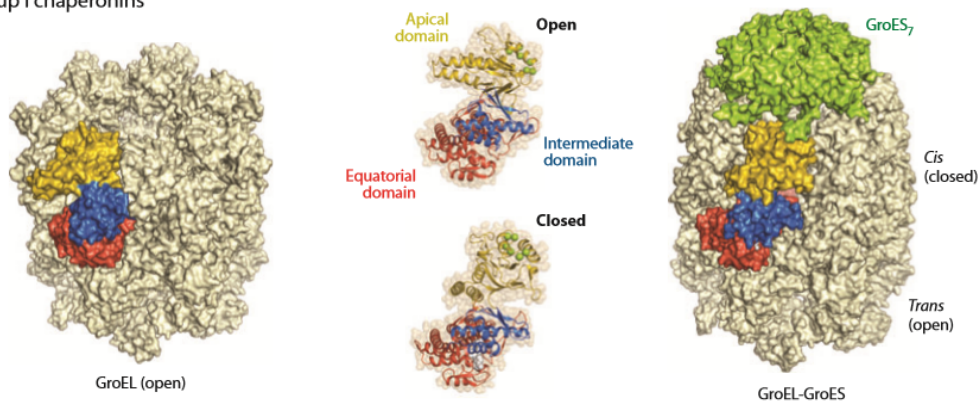
Las chaperoninas, son las chaperonas moleculares dependientes de ATP universalmente presentes en todas las formas de vida y una de las proteínas más conservadas. Estas se encuentran formadas por subunidades de 60 kDa que posteriormente oligomerizan, formando complejos de siete subunidades cada uno en forma de doble anillo con un peso molecular de 800 – 900 kDa, donde su principal función es la de secuestrar globalmente los sustratos proteicos para su posterior plegamiento. Dos grupos de chaperoninas filogenéticamente distantes se pueden distinguir como se muestra en la **Figura 2a**:

El grupo I de las chaperoninas se caracteriza por su distribución filogenética dentro del citosol bacteriano (GroEL) y en organelos que comparten un origen endosimbiótico, como son la matriz mitocondrial y el estroma de los cloroplastos. Estas proteínas presentan siete subunidades en forma de doble anillo y son caracterizadas por cooperar con una proteína co-chaperonina llamada Hsp 10 en eucariontes o GroES en bacterias y que es de suma importancia para el correcto funcionamiento, formando una tapa que sella la “cavidad de plegamiento” en el complejo GroEL (Horwich *et al.*, 2007).

El sistema GroEL – GroES de *Escherichia coli* ha sido por antonomasia, el sistema más ampliamente estudiado, se sabe que este sistema interactúa con un mínimo de 250 proteínas citosólicas diferentes. Muchas de éstas, tiene un tamaño de entre 20 y 50 kDa, además poseen dominios con topologías complejas como α/β o $\alpha+\beta$ (Kerner *et al.*, 2005; Fujiwara *et al.*, 2010). Estructuralmente GroEL presenta tres dominios diferentes funcionalmente: apical, intermedio y ecuatorial. La región central del polipéptido que abarca de los residuos 191 al 376 constituye el dominio apical. Este dominio es rico en residuos hidrofóbicos, y es el encargado del

reconocimiento de GroES y los sustratos proteicos sin plegar. El dominio ecuatorial por su parte abarca los dos extremos de la cadena polipeptídica, siendo los residuos 1 al 133 y 409 al 523 parte de su estructura, este es el encargado de llevar a cabo la actividad ATPasa, así como de las interacciones inter e intra subunidades dentro del complejo de doble anillo. El dominio intermedio por su parte, se encuentra formando una estructura altamente dinámica que tiene la función de bisagra, se extiende por dos regiones dentro de la cadena polipeptídica que abarca los residuos 134 al 190 y 377 al 408 respectivamente. Este dominio es encargado de transmitir señales entre el dominio apical y ecuatorial debido a la unión del ATP y los sustratos proteínicos que regulan alostericamente los estados conformacionales cis y trans del complejo. GroEL y GroES experimentan un complejo ciclo de asociación y disociación que se encuentra regulado alostericamente por la unión e hidrólisis del ATP en las siete subunidades GroEL que conforman el anillo, lo que desencadena cambios conformacionales que permiten la reorientación y agrupamiento de aminoácidos altamente hidrofílicos y con carga negativa que originan una pared interna dentro del complejo proteico con propiedades muy particulares que propiciarán el plegado de los sustratos proteicos desnaturalizados (Horwich & Fenton, 2009; Xu *et al.*, 1997).

a Group I chaperonins



b

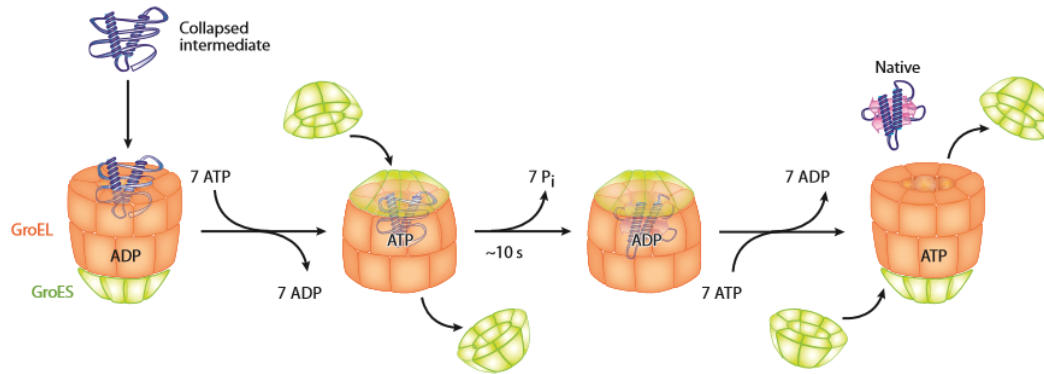


Figura 2. Arquitectura molecular y mecanismo de acción del sistema GroEL-GroES

(a) La estructura cristalina de GroEL (PDB:1SS8) de lado izquierdo y el complejo asimétrico de GroEL+7ADP+GroES (PDB:1PF9) en el lado derecho. GroES es mostrado en verde y un monómero de GroEL es coloreado para mostrar sus dominios (dominio ecuatorial en rojo, dominio intermedio en azul y el dominio apical aparece en amarillo). Las diferencias conformacionales entre las subunidades de GroEL en el estado abierto y en el estado cerrado aparecen en las representaciones de listón de la parte media de la figura. (b) Ciclo de reacción GroEL-GroES. El sustrato proteico como un intermediario colapsado se encuentra unido al anillo GroEL abierto del complejo asimétrico. La unión de ATP a cada una de las siete subunidades provoca un cambio conformacional en el dominio apical, lo que da lugar a la exposición de los residuos clave para el reconocimiento de GroES, permitiendo la encapsulación del sustrato en el complejo *cis*. El ADP y GroES se disocian del anillo opuesto (*trans*) junto con el sustrato previamente unido. El sustrato recién encapsulado es libre de plegarse durante 10 seg, que es el tiempo necesario para hidrolizar los 7 ATP unidos al anillo *cis* (Kim *et al.*, 2013).

Las proteínas encapsuladas, son libres de plegarse en este ambiente provisto por GroEL y poseen un tiempo aproximado de 10 s - el tiempo necesario para la hidrólisis de ATP en el anillo unido a GroES (anillo en *cis*)- para alcanzar su conformación nativa. La cavidad formada tiene un volumen aproximado de entre 85 000 a 175 000 Å³, que forma un ambiente totalmente aislado del exterior. El sustrato proteico abandona la cavidad después de la disociación de GroES del complejo causado por la unión de ATP al anillo opuesto (anillo en *trans*) **Figura 2b**.

Si el sustrato no ha sido plegado correctamente, este se une nuevamente a GroEL para ciclos repetidos de plegamiento hasta alcanzar su estado nativo. Aunque las chaperoninas funcionan como un mecanismo pasivo de prevención de la agregación para algunas proteínas, el encapsulamiento puede acelerar el plegamiento sustancialmente (Brinker *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2006; Chakraborty *et al.*, 2010). Esta aceleración en la velocidad de plegamiento puede deberse principalmente a que esta cavidad provee un confinamiento estérico, o a la desestabilización entrópica de los intermediarios del plegamiento colapsados o, en última instancia, en promover la conversión a conformaciones tipo nativas más compactas. Como ha sido demostrado, el efecto de esta cavidad de plegamiento puede ser comparable a el papel de los enlaces disulfuro al restringir el espacio conformacional de proteínas secretadas (Chakraborty *et al.*, 2010). Además, eventos

repetidos en los ciclos de plegamiento tienen la finalidad de invertir o ayudar en la transición de los estados cinéticamente atrapados o mal plegados a estados nativos. Así pues, las chaperoninas pueden ser capaces de eliminar barreras entrópicas y entálpicas en el paisaje energético sinuoso del plegamiento de proteínas (Thirumalai & Lorimer, 2001; Lin & Rye, 2008; Sharma *et al.*, 2008).

2.2 Múltiples genes chaperonina *groEL* en bacterias

Los genes *groEL* (también denominados Cpn60) de *E. coli*, fueron los primeros genes chaperonina en ser descubiertos. Fueron inicialmente identificados ya que, al ser mutados estos genes, prevenían la infección de algunos bacteriófagos (Georgopoulos *et al.*, 1972; Takano & Kakefuda, 1972). Además, las mutantes en estos genes también daban origen a fenotipos bacterianos sensibles a la temperatura, sugiriendo el papel fundamental de estos genes para la vida celular (Tilly *et al.*, 1981).

Con el surgimiento de la genómica y la información contenida en extensas bases de datos sobre la anotación del genoma de una gran diversidad de organismos bacterianos, se ha revelado que muchos de estos microorganismos poseen múltiples copias de genes *groEL*. Ésto, abre varias hipótesis sobre la función, evolución y distribución de estos genes. La posesión de múltiples copias parece no ser un proceso meramente aleatorio, sino manejado por una fuerza de presión selectiva, ya que en algunos grupos bacterianos, por ejemplo los miembros del género *Spirochaeta* tienen únicamente un gen, mientras que en otros grupos como *Actinobacteria* y *Proteobacterias* casi todos los miembros presentan múltiples copias (**Tabla 1**). En otros casos como los micoplasmas, en los cuales se conoce que carecen de homólogos de chaperoninas 60 (GroEL), Clark & Tillier (2010) se sugieren con base en evidencias experimentales que la función de estas proteínas en el género *Mollicutes* no desempeñan la función característica de chaperona, sino como una adhesina/invasina involucrada en la patogenicidad hacia células hospederas. Esto último refleja la importancia evolutiva de esta función alternativa en estos organismos.

Tabla 1.- Distribución de múltiples genes GroEL (chaperonina) en genomas bacterianos completamente secuenciados.

Grupo en NCBI	Número de homólogos de GroEL								
	Total	0	1	2	3	4	5	6	7
<i>Actinobacteria</i>	54	0	9	40	2	3	0	0	0
<i>Alphaproteobacteria</i>	90	0	55	18	8	2	5	1	1
<i>Aquificae</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Bacteroidetes/Chlorobi</i>	23	0	22	1	0	0	0	0	0
<i>Betaproteobacteria</i>	60	0	35	17	6	0	1	1	0
<i>Chlamydiae/Verrucomicrobia</i>	13	0	0	0	13	0	0	0	0
<i>Chloroflexi</i>	7	0	4	3	0	0	0	0	0
<i>Cyanobacteria</i>	33	0	0	30	3	0	0	0	0
<i>Deinococcus-Thermus</i>	4	0	4	0	0	0	0	0	0
<i>Deltaproteobacteria</i>	19	0	12	6	1	0	0	0	0
<i>Epsilonproteobacteria</i>	20	0	20	0	0	0	0	0	0
<i>Fibrobacter/Acidobacteria</i>	2	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>Firmicutes</i>	148	13	125	10	0	0	0	0	0
<i>Fusobacteria</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Planctomycetes</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Gammaproteobacteria</i>	172	0	158	12	2	0	0	0	0
<i>Spirochaetes</i>	14	0	14	0	0	0	0	0	0
<i>Thermotogae</i>	7	0	5	2	0	0	0	0	0
Total	669	13	467	139	36	5	6	2	1

Pero, ¿por qué es sorprendente la presencia de múltiples genes *groEL* en bacterias? Como ya fue descrito arriba, GroEL reconoce una amplia variedad de proteínas celulares, aunque se desconoce y se tiene poca evidencia acerca de la especificidad estructural o en secuencia que éstas poseen. Además, en muchos casos se ha documentado cómo los homólogos de GroEL provenientes de otras bacterias pueden mantener la función sin ningún problema, cuando las células mutantes de *E. coli* son complementadas. Esto abre la pregunta sobre ¿Cuál es el significado adaptativo de estas múltiples copias? Tres explicaciones podrían darse acerca de este fenómeno observado: (i) todos los productos génicos tienen una función similar formando así un sistema regulatorio complejo; (ii) las copias extras evolucionaron para el plegamiento de proteínas específicas, (iii) o

estás posean una actividad “moonlighting” o no relacionada con la que comúnmente desempeñan.

Evidencias experimentales soportan las proposiciones antes descritas, como el caso particular de las α -proteobacterias, las cuales poseen los organismos con mayor número de copias, el caso en particular es *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 el cual alberga siete copias de *groEL* dentro de su genoma (Kaneko *et al.*, 2002). Este último establece una relación simbiótica con plantas, en donde induce la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. Aunque no está establecido certeramente el papel de estas proteínas en la fijación de nitrógeno, es sabido que el gen *groEL1* de *Sinorhizobium meliloti*, otro organismo fijador de nitrógeno, es requerido para la expresión de genes *nod*, y que esta función podría no ser remplazada con homólogos de *E. coli* (Ogawa & Long, 1995).

Esto sugiere algún grado de especificidad en el reconocimiento de clientes proteicos involucrados en el proceso de fijación de nitrógeno. Sin embargo, también se sabe que en esta misma bacteria *S. meliloti*, el cual tiene cuatro operones *groESL* y un gen individual *groEL*, puede sobrevivir en ausencia de este último, mientras que los operones *groESL1* y *groESL 2* son necesarios para el crecimiento y supervivencia de la bacteria (Bittner, Foltz & Oke, 2007).

En *Rhizobium leguminosarum* otra bacteria fijadora de nitrógeno, existen tres operones GroEL llamados Cpn60.1, Cpn60.2 y Cpn60.3. La proteína Cpn60.1 tiene un 80.8% de identidad en secuencia con su parálogo Cpn60.2 y un 73.5% con Cpn60.3. Esto correlaciona perfectamente con lo reportado para genes parálogos, donde se ha observado un porcentaje de similitud que va desde un 60 hasta un 80 % entre éstos (Rodríguez-Quinones *et al.*, 2005). Además, en *R. leguminosarum* se mostró que los niveles de expresión de Cpn60.1 eran más altos en comparación con Cpn60.2, mientras que Cpn60.3 no fue detectada en condiciones normales de crecimiento, aunque su expresión se vio potenciada bajo condiciones anaerobias. El análisis de inactivación génica reveló que la proteína Cpn60.1 es esencial para la viabilidad y crecimiento celular. Así mismo, una comparación de las actividades chaperonina mostró que Cpn60.1 y Cpn60.2 fueron igualmente capaces de plegar la enzima lactato deshidrogenasa, sin embargo, Cpn60.3 no presentó esta habilidad. Sorprendentemente, la proteína Cpn60.2 no puede sobreexpresarse en *R. leguminosarum* y no puede reemplazar la función de la proteína Cpn60.1, mientras que Cpn60.3 puede ser sobreexpresada y la transformante puede sobrevivir en ausencia de Cpn60.1, sin embargo el fenotipo es sensible a la temperatura (Gould, Burgar & Lund, 2007).

Otro ejemplo interesante se encuentra en el género *Chlamydia*, donde todos sus miembros poseen tres genes GroEL (llamadas Cpn) y algunas de estas proteínas están involucradas en la patología del tejido al que afectan. Se sabe también que las proteínas Cpn60.2 y Cpn60.3 se encuentran más estrechamente relacionadas una a la otra que a Cpn60.1. Se ha propuesto que la proteína Cpn60 en *Chlamydia*, se duplicó al inicio del linaje dando lugar así a tres proteínas distintas (McNally & Fares, 2007). A diferencia de otras bacterias con múltiples copias de Cpn60, los porcentajes de identidad en secuencias entre estas proteínas son bajos con intervalos menores al 20% (Karunakaran *et al.*, 2003). Uno de los hechos más sorprendentes encontrado en estas proteínas es el haber detectado diversas mutaciones en el transcurso de la historia evolutiva de los genes Cpn60.2 y Cpn60.3 en los sitios de unión a ATP, las cuales fueron altamente conservadas en estas proteínas. Por lo tanto, la secuencia conservada GDGTTT ha mutado a GDGAKT en Cpn60.2 y ADGVIS en Cpn60.3 (Karunakaran *et al.*, 2003). Entonces ¿Qué papel juegan estas tres proteínas? Aunque esta pregunta no puede responderse definitivamente, existe evidencia sobre la regulación diferencial de estas proteínas. En experimentos de infección con células HeLa, Karunakaran *et al.* (2003) reportaron que la proteína Cpn60.1 de *Chlamydia*, era la proteína con mayor nivel de expresión durante el ciclo infectivo, así como cuando era sometida a choque térmico. Sin embargo, en un reporte por separado mostraron que *Chlamydia trachomatis* al infectar a la línea celular Hep2, el gen con mayor expresión fue Cpn60.3, mientras que al infectar monocitos el gen con mayor expresión fue Cpn60.2 (Gérard *et al.*, 2004). *Chlamydia* puede causar artritis en los seres humanos y en los tejidos de las articulaciones infectadas por estos organismos, siendo los genes *cpn60.1* y *cpn60.2* mayormente sobreexpresados en este tipo de afectaciones, presentando esta última proteína niveles de expresión mucho mayores con respecto a la primera. Por el contrario, no hubo detección en la expresión de Cpn60.3 (Gérard *et al.*, 2004). Esto sugiere una interacción compleja y distinta entre la bacteria y el huésped, dependiendo del tipo de célula a la cual infecta.

Las Cianobacterias son un grupo bacteriano capaz de llevar a cabo procesos fotosintéticos, estos organismos generalmente codifican para dos proteínas Cpn60 (Lund, 2009). En un estudio comparativo de las dos proteínas pertenecientes al género *Synechococcus elongatus* PCC 7942, que fueron referidas como *GroEL1* y *GroEL2*, ambas proteínas pudieron prevenir la agregación proteica pero su actividad de plegamiento fue mucho menor cuando estas fueron comparadas con la proteína homóloga GroEL de *E. coli*, además, la actividad ATPasa de *GroEL1* fue solo del 15% mientras que la *GroEL2* mostró una actividad insignificante. Esta actividad fue comparable a lo encontrado en dos proteínas Cpn60 de *Mycobacterium tuberculosis* (Qamra & Mande, 2004;

Shahar *et al.*, 2011). Otro hecho notable fue en cuanto al desarrollo o formación de estructuras más complejas denominadas oligómeros, así, la proteína *GroEL1* (nativa o recombinante) formó homotetradecámeros, mientras que la proteína *GroEL2* formó únicamente homoheptámeros u homodímeros. Ambas GroEL formaron oligómeros muy inestables (Huq *et al.*, 2010). Se conoce muy poco acerca de si otras proteínas Cpn60 de cianobacterias presentan las mismas características fisicoquímicas, sin embargo, ha sido documentado que el gen *groEL1* de otras dos especies de cianobacterias *Synechocystis sp.* PCC 6803 y *Synechococcus vulcanus*, pueden complementar sin ningún problema la mutante *groEL* de *E. coli*, sin embargo el gen *groEL2* falla completamente en la complementación (Tanaka, Hiyama & Nakamoto, 1997; Kovács *et al.*, 2001).

Como un ejemplo final del papel de múltiples copias de genes *groEL* en el estilo de vida de los procariontes, se hace mención de las dos proteínas Cpn60 encontradas en la mixobacteria gram negativa, *Myxococcus xanthus* (Jiang *et al.*, 2008). Las mixobacterias se caracterizan por tener un comportamiento social complejo ya que forman colonias deslizantes llamadas “enjambres” que pueden alimentarse de otros microorganismos. Estas también forman estructuras multicelulares llamadas cuerpos fructíferos cuando los nutrientes comienzan a agotarse (Shimkets, 1999). En *M. xanthus*, la delección de cualquiera de los dos genes Cpn60 no afecta la viabilidad celular, sin embargo, la inactivación de ambos genes no es posible. El gen Cpn60.2 mostró ser clave para la supervivencia de estos organismos a altas temperaturas $\geq 42^{\circ}\text{C}$. Cuando las dos diferentes mutantes fueron crecidas en medio el cual contenía proteínas hidrolizadas estas crecieron tan bien como la cepa silvestre. No obstante, cuando éstas fueron cultivadas en medio que contenía caseína o células de *E. coli* como fuente de proteína, la mutante que carecía de Cpn60.2 pero no así la de Cpn60.1, fue deficiente en la depredación bacteriana y en la utilización de caseína. Por el contrario, la delección del gen *cpn60.1*, pero no la del gen *cpn60.2*, resultó en un fracaso rotundo de este organismo para desarrollar cuerpos fructíferos bajo condiciones de nutrientes escasos (Li *et al.*, 2010).

2. PROTEÍNAS “MOONLIGHTING”

Las proteínas moonlighting, son un subconjunto de proteínas multifuncionales en las que una sola cadena polipeptídica lleva a cabo dos o más funciones bioquímicas o biofísicas, no obstante, dentro de esta definición se excluyen todas aquellas proteínas que son el resultado de fenómenos como la fusión génica, edición alternativa de intrones (splicing), fragmentos proteolíticos o enzimas inherentemente promiscuas. Hoy en día se conocen alrededor de 500 proteínas moonlighting

(Mani *et al.*, 2015). Muchas de estas proteínas conocidas son proteínas citosólicas, chaperonas u otras proteínas que exhiben una segunda función en una localización celular alterna de donde normalmente se encuentra, en otro tipo celular, como parte de un complejo multiproteico, cuando se unen a otras macromoléculas como DNA o RNA o cuando la concentración celular de algún sustrato, producto o ligando cambia en el ambiente celular (Amblee y Jeffery, 2015). Estas proteínas son capaces de ejecutar diferentes funciones de manera autónoma, a menudo sin relación y sin la partición de estas funciones en diferentes dominios proteicos. La independencia de funciones, significa que la inactivación de una de las funciones (por alguna mutación) no debería afectar la segunda función y viceversa (Jeffery, 2009). Otro criterio importante a tomar en cuenta para estas proteínas es que su función no debe ser confundida con fenómenos pleiotrópicos. Los efectos pleiotrópicos generalmente son el resultado de la inactivación de una función sencilla, la cual está involucrada en diferentes procesos celulares, por ejemplo, enzimas las cuales tienen participación en diversas vías metabólicas.

Los primeros en observar este fenómeno fueron Joram Piatigorsky y Graeme Wistow, quienes, trabajando en el Instituto Nacional para la Vista en Bethesda, E.E.U.U, reportaron que una proteína podría tener más de una función. En el estudio realizado por ambos científicos encontraron que las proteínas del lente ocular en aves y reptiles, el cristalino, se encontraba conformado principalmente por enzimas relacionadas con el metabolismo celular como son la argininosuccinato liasa, lactato deshidrogenasa o la α -enolasa (Piatigorsky *et al.*, 1988). Piatigorsky y Wistow inicialmente acuñaron el término "*gene sharing*" traducido como intercambio de genes. Trabajos posteriores dentro de su laboratorio revelaron que un número significativo de enzimas metabólicas entre otras, han evolucionado para desempeñar funciones estructurales dentro del lente ocular en una amplia variedad de especies animales. El término más tarde sufrió una transmutación pasando a denominarse como "proteínas moonlighting". Un vocablo utilizado por vez primera en 1999 por la bióloga estructural de la Universidad de Chicago, Constance Jeffery. Tiene su base en una analogía con un concepto utilizado en la jerga anglosajona para aquella gente que tiene un segundo empleo no relacionado a su área y generalmente durante la noche, además de sus ocupaciones durante el día.

Muchas de las proteínas moonlighting conocidas actualmente, son enzimas altamente conservadas, también llamadas enzimas ancestrales. Especialmente son enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa. Se ha especulado que 7 de las 10 enzimas involucradas en la vía glicolítica así como 7 de las 8 enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos tienen

una función moonlighting (Fothergill-Gilmore & Michels, 1993; Yuan *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2005; Kim & Dang, 2005; Decker & Wickner, 2006; Lu *et al.*, 2007).

El porqué las funciones moonlighting son tan frecuentemente identificadas en proteínas altamente conservadas sigue siendo muy especulativo. Numerosos autores han relacionado este hecho a que las proteínas altamente conservadas están presentes en diferentes organismos y por lo tanto existe una mayor probabilidad de que estas funciones sean detectables comparadas con aquellas proteínas que se encuentran presentes en sólo unas pocas especies. Estas funciones también suelen incidir en proteínas las cuales tienen una expresión constitutiva y en altos niveles. Para estas proteínas el desarrollo de una nueva función no se encuentra restringida a condiciones específicas (Fothergill-Gilmore & Michels, 1993; Jeffery, 1999).

Aunque muchas de las funciones se encuentran en proteínas altamente conservadas, la presencia de algunas de estas funciones no puede ser predicha basándose únicamente en la homología. Por ejemplo, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* posee dos enzimas piruvato carboxilasa, cada una de las cuales comparten alrededor del 80% de identidad en secuencia con la piruvato carboxilasa de la levadura metilotrófica *Ogataea polymorpha*. A pesar de tener una similitud muy alta entre estas proteínas, ninguna de las proteínas pertenecientes a *S. cerevisiae* puede llevar a cabo las funciones moonlighting de *O. polymorpha* que consiste en el ensamble y translocación del complejo peroxisomal alcohol oxidasa (Ozimek *et al.*, 2006).

Se ha especulado que las funciones moonlighting posiblemente evolucionaron como una vía para extender las capacidades funcionales de un organismo sin el costo extenuante y energético de una expansión genómica (Jeffery, 1999; Gregory, 2005).

Gancedo presentó una explicación más plausible e hizo referencia a “el enmendador de la evolución”, el cual hace referencia a que no existe una meta en la evolución y que las nuevas funciones se desarrollan adaptando las ya existentes. Si una función novedosa resulta en una ventaja para el organismo, esta función será seleccionada durante su evolución (Jacob, 1977; Gancedo y Flores, 2008).

Además, dos modelos de la evolución de las funciones moonlighting han sido propuestos, los cuales están basados sobre aspectos estructurales de las proteínas: **(i)** el modelo por alostería y **(ii)** el modelo por adaptabilidad. El modelo por alostería surge de la observación común en proteínas donde un tamaño voluminoso es requerido en muchas enzimas. La mayoría de las proteínas

muestra una estructura compleja y grande que es necesaria para llevar a cabo una función específica, donde las áreas superficiales aparentemente sin utilizar podrían dar origen a nuevos sitios activos o de unión para ejecutar una nueva función. Ejemplos que soportan evidencia para este modelo son las enzimas glicolíticas (Jeffery, 1999; Jeffery, 2004b; Huberts y Van der Klei, 2010)

Por otra parte, el modelo por adaptabilidad es un modelo basado en la localización de una proteína en diferentes tipos celulares. Las proteínas expresadas en diferentes tipos de células podrían exhibir diferentes actividades propias de la necesidad local y los nuevos patrones de interacción. Ejemplos para este modelo son las chaperonas moleculares algunas como Hsp60 y Hsp70 (Jeffery, 2004a).

3.1 Actividades moonlighting en proteínas GroEL

A primera vista nos parece sorprendente y potencialmente confuso el amplio rango de las diferentes funciones que se han descrito para muchas proteínas, sin embargo, este número tan grande de las actividades moonlighting puede ser entendido en el contexto del número astronómico de secuencias peptídicas que pueden ser generadas cuando a la evolución se le permite el libre juego combinatorio con los 20 diferentes aminoácidos. El hiperespacio proteico es un término conjeturado por los físicos Smith T.F y Morowitz J.H para abarcar el número teórico de proteínas que es posible generar mediante un proceso combinatorio. Para poner en contexto, pensemos en una proteína de 10 kDa (con alrededor de 100 residuos de aminoácidos), pueden ser producidas 20^{100} ó 10^{130} diferentes combinaciones, para darnos una idea sobre estos números, es sabido que el número de estrellas en el universo es de alrededor de 10^{24} (Smith y Morowitz, 1982). Aún, si solo 1 de cada 10^{30} proteínas fuera potencialmente soluble y con alguna actividad funcional tendríamos una cantidad inimaginable. Por lo tanto, con una gama ilimitada de secuencias y con 3800 millones de años para jugar (con un tiempo de duplicación para *E. coli* de 30 minutos, este tiempo permitiría 6.7×10^{13} divisiones celulares), la evolución tendría el suficiente tiempo y una buena oportunidad para la utilización del hiperespacio proteico. Hasta 1995 se creía en el dogma de un gen una proteína y por ende una sola función.

En una proteína como GroEL, con más de 500 residuos, podría haber un enorme número de pentapéptidos biológicamente activos, decaapéptidos y así sucesivamente, proporcionando a esta proteína una capacidad potencialmente ilimitada para realizar funciones alternativas. Por supuesto, lo mismo es cierto para cualquier proteína, lo que resulta en la pregunta obvia ¿Son el

creciente número de funciones moonlighting atribuidas a las proteínas GroEL únicas? Y en caso afirmativo, ¿Por qué?

Han pasado 30 años desde el primer reporte en el que la proteína GroEL podía presentar actividades biológicas adicionales. Este fue el informe de que una proteína de unión al moco intestinal por parte del patógeno entérico *Salmonella typhimurium*, y donde fue identificada y caracterizada una proteína GroEL la responsable de dicha función en este organismo (Ensgraber & Loos, 1992). Para poder actuar de esta manera, GroEL tuvo que ser secretada y después unirse a la pared celular, esto lleva a dos hallazgos clave para esta proteína. La primera, es una actividad que presumiblemente no está relacionada con el plegamiento de proteínas, en este caso la unión al moco. La segunda es que esta actividad requiere que la proteína GroEL supuestamente intracelular pueda salir de la célula y después asociarse con la membrana. Se ha reportado que la proteína GroEL se encuentra en la superficie celular de 22 bacterias diferentes, donde se sabe que funciona como una adhesina, uniéndose a componentes del huésped (**Tabla 2**).

Tabla 2 .- Géneros bacterianos con proteínas GroEL de superficie celular y sus ligandos conocidos.

Bacterium	Chaperonin 60	Host receptor	References
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Cpn60	?	Goulhen <i>et al.</i> (1998)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Cpn60	Glycosphingolipid	Kaneda <i>et al.</i> (1997)
<i>Brucella abortis</i>	Cpn60	?	Watarai <i>et al.</i> (2003)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Cpn60.1	?	Wuppermann <i>et al.</i> (2008)
<i>Clostridium difficile</i>	Cpn60	?	Hennequin <i>et al.</i> (2001)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Cpn60	?	Frisk <i>et al.</i> (1998)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Cpn60	Glycosphingolipids	Pantzar <i>et al.</i> (2006)
<i>Helicobacter pylori</i>	Cpn60	?	Yamaguchi <i>et al.</i> (1996, 1997a)
<i>Helicobacter pylori</i>	Cpn60	Lactoferrin	Amini <i>et al.</i> (1996)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Cpn60	CD11/CD18	Long <i>et al.</i> (2003)
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Cpn60	Mucin	Bergonzelli <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Cpn60	?	Saad <i>et al.</i> (2009)
<i>Lactococcus lactis</i>	Cpn60	Yeast invertase	Katakura <i>et al.</i> (2010)
<i>Legionella pneumophila</i>	Cpn60	?	Garduño <i>et al.</i> (1998a) and Garduno <i>et al.</i> (1998b)
<i>Leptospira interrogans</i>	Cpn60	?	Natarajasecnivasan <i>et al.</i> (2011)
<i>Mycobacterium avium</i>	Cpn60	$\alpha_3\beta_3$	Hayashi <i>et al.</i> (1997)
<i>Mycobacterium bovis BCG</i>	Cpn60.1	DC-SIGN	Carroll <i>et al.</i> (2010)
<i>Mycobacterium leprae</i>	Cpn60.2	?	Esaguy & Aguas (1997)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cpn60.2	CD43	Hickey <i>et al.</i> (2010)
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Cpn60	?	Esaguy & Aguas (1997)
<i>Plasiomonas shigelloides</i>	Cpn60	?	Tsugawa <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cpn60	?	Zaborina <i>et al.</i> (1999)
<i>Salmonella typhimurium</i>	Cpn60	Mucus	Ensgraber & Loos (1992)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cpn60	?	Hughes <i>et al.</i> (2002)
<i>Streptococcus suis</i>	Cpn60	?	Wu <i>et al.</i> (2008)

CD11/CD18- receptor integrina; **$\alpha_3\beta_3$** -receptor integrina; **DC-SIGN**- Molécula de adhesión intercelular específica de las células dendríticas - no integrina. Tomado de Henderson *et al.*, 2013.

Se esperaría que los ligandos para estas proteínas GroEL de superficie celular bacteriana, fueran idénticos o al menos limitados a un tipo de molécula. Sin embargo, los ligandos de unión identificados para estas proteínas van desde glucoesfingolípidos, moco del epitelio, invertasa y proteínas tales como DC-SIGN y CD43. Además, se ha reportado que la proteína Cpn60.2 de *Mycobacterium bovis* BCG y la proteína GroEL de *E. coli* se unen de manera no covalente a ácidos grasos y metil glucósidos (De Bruyn *et al.*, 2000). Esta capacidad de las proteínas Cpn60 bacterianas para unirse a los constituyentes de la superficie celular de las células humanas puede explicar de alguna manera por qué estas proteínas son capaces de actuar como moléculas de señalización intercelular.

La segunda actividad moonlighting reportada para GroEL, fue la proteína Cpn60.2 de *M. tuberculosis* (también conocida como Hsp65) que estimulaba a las células de monocitos humanos a sintetizar citocinas proinflamatorias (Friedland *et al.*, 1993). Esta fue la primera que se reportó que la proteína Cpn60 podía actuar como una molécula de señalización intercelular. Han transcurrido veinte años desde estos informes primarios y ahora se ha establecido que la proteína Cpn60 de bacterias tiene una gama extremadamente amplia de actividades biológicas alternas a las que comúnmente desempeña como chaperona que asiste el plegamiento.

Estas acciones biológicas pueden dividirse a groso modo en: (i) funciones intracelulares no relacionadas con el plegamiento de proteínas, en eucariotas, la proteína Cpn60 encontrándose a menudo fuera de la mitocondria; (ii) localización en la superficie de la célula con función como receptor; (lii) interacciones de unión a ligandos dentro o fuera de células (receptor soluble); y (iv) la proteína Cpn60 secretada que funciona como una molécula de señalización intercelular con una amplia variedad de células y que son descritos completamente en la **Tabla 3** (Henderson *et al.*, 2013).

Tabla 3.- Resumen de las actividades moonlighting en proteínas GroEL de bacterias (Continúa)

Especie	Chaperonina	Función biológica	Referencias
Bacteria			
<i>A.actynomicetemcomitans</i>	Cpn60	Estimula la descomposición ósea <i>in vitro</i>	Kirby <i>et al.</i> (1995)
<i>A.actynomicetemcomitans</i>	Cpn60	Promueve la migración celular	Zhang <i>et al.</i> (2004a)
<i>A.actynomicetemcomitans</i>	Cpn60	Exposición por periodos largos a Cpn60, inhibe la viabilidad en cultivos de células epiteliales	Zhang <i>et al.</i> (2004b)
<i>A.actynomicetemcomitans</i>	Cpn60	Inhibe el proceso de apoptosis en células epiteliales a través de la activación de ERK e inhibición de la caspasa-3	Zhang <i>et al.</i> (2004c)
<i>Bartonella baciliformis</i>	Cpn60	Promueve la apoptosis de las células endoteliales vasculares en cultivo	Smitherman & Minnick (2005)
<i>Buchnera sp.</i>	Cpn60	La secreción de Cpn60 es necesaria para estabilizar el virus de enrollamiento de la hoja de la patata en la hemolinfa del insecto, lo que permite la transmisión del virus	Hogehout <i>et al.</i> (1998)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Cpn60.1	Estimula la síntesis de citoquinas y metaloproteinasas en los macrófagos	Kol <i>et al.</i> (1998)
<i>C.pneumoniae</i>	Cpn60.1	Estimula la maduración de las células dendríticas derivadas de médula ósea murina	Costa <i>et al.</i> (2002)
<i>C.pneumoniae</i>	Cpn60.1	Estimula la maduración de células dendríticas derivadas de monocitos humanos	Ausiello <i>et al.</i> (2006)
<i>C.pneumoniae</i>	Cpn60.1	Activa las células endoteliales vasculares humanas	Bulut <i>et al.</i> (2002)
<i>C.pneumoniae</i>	Cpn60.1	Favorece la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)	Kalayoglu <i>et al.</i> (2000)
<i>C.pneumoniae</i>	Cpn60.1	Estimula la proliferación de las células musculares lisas vasculares	Sasu <i>et al.</i> (2001)
<i>C.pneumoniae</i>	Cpn60.1	Inhibe la síntesis de NO de las células endoteliales vasculares	Chen <i>et al.</i> (2009)
<i>C.pneumoniae</i>	Cpn60.1	La administración <i>in vivo</i> induce la acumulación local de neutrófilos	Da Costa <i>et al.</i> (2004)
<i>C.pneumoniae</i>	Cpn60.1	La administración local induce inflamación en los pulmones	Bulut <i>et al.</i> (2009)
<i>C.pneumoniae</i>	Cpn60.1	Funciona como una adhesina en la superficie celular para unirse a las células del hospedero	Wuppermann <i>et al.</i> (2008)
<i>C.pneumoniae</i>	Cpn60.2 Cpn60.3	Ninguna de estas proteínas funciona como una adhesina celular	Wuppermann <i>et al.</i> (2008)
<i>C.pneumoniae</i>	Cpn60.1	Estimula la síntesis de Lox-1 en las CEV y favorece la aterogénesis	Lin <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Cpn60.1	Se une a HrcA y aumenta la represión transcripcional	Wilson <i>et al.</i> (2005)

<i>C.trachomatis</i>	Cpn60.2 Cpn60.3	Incapaz de unirse a HrcA	Wilson <i>et al.</i> (2005)
<i>C.trachomatis</i>	Cpn60.1	Promueve la apoptosis de las células epiteliales endocervicales	Jha <i>et al.</i> (2011)
<i>C.trachomatis</i>	Cpn60.1	Induce la apoptosis de los trofoblastos humanos	Equils <i>et al.</i> (2006)
<i>C.trachomatis</i>	Cpn60.2	La transcripción de este gen responde a una baja concentración de hierro circundante	LaRue <i>et al.</i> (2007)
Endosimbionte del pulgón del guisante	Cpn60	Funciona como una histidina quinasa	Morioka <i>et al.</i> (1994)
Bacteria endosimbionte	Cpn60	Se cree que participa en la evolución de la endosimbiosis en los insectos	Fares <i>et al.</i> (2005) y Williams <i>et al.</i> (2010)
Bacteria endosimbionte	Cpn60	Participa en la transmisión de varios virus de los insectos a las plantas debido a la capacidad de Cpn60 para unirse a varios virus	Banerjee <i>et al.</i> (2004), Akad <i>et al.</i> (2007), Edelbaum <i>et al.</i> (2009) y Gottlieb <i>et al.</i> (2010)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Cpn60	Potente neurotoxina para insectos	Yoshida <i>et al.</i> (2001)
<i>E.coli</i>	Cpn60	Sin actividad como neurotoxina de insectos, a menos que se muten residuos individuales	Yoshida <i>et al.</i> (2001)
<i>E.coli</i>	Cpn60	Estimula la síntesis de citoquinas en los monocitos	Tabona <i>et al.</i> (1998)
<i>E.coli</i>	Cpn60	Estimula la formación de osteoclastos y activa estas células	Reddi <i>et al.</i> (1998)
<i>E.coli</i>	Cpn60	Regula la ADN polimerasa IV propensa a errores	Layton & Foster (2005)
<i>E.coli</i>	Cpn60	Estimula la síntesis de citoquinas en las células HeLa transfectadas con CD36 o con receptores de clase B scavenger tipo I y II	Baranova <i>et al.</i> (2012)
<i>E.coli</i>	Cpn60	Estimula la generación de células T murinas CD4(+) CD25(+) Foxp3(+)	Ohue <i>et al.</i> (2011)
<i>Francisella tularensis</i>	Cpn60	Estimulador más activo de la síntesis de citoquinas de los monocitos que el LPS de esta bacteria y sinergiza con LPS para activar los monocitos	Noah <i>et al.</i> (2010)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Cpn60	Induce un comportamiento pro-aterogénico tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i>	Lee <i>et al.</i> (2012)
<i>Helicobacter pylori</i>	Cpn60	Cpn60 se localiza en la superficie celular y los anticuerpos contra esta proteína inhiben el crecimiento de la bacteria	Yamaguchi <i>et al.</i> (1996, 1997a,b)
<i>H.pylori</i>	Cpn60	Funciona como una adhesina de la superficie celular para la unión de las bacterias a las células del hospedero	Kamiya <i>et al.</i> (1998)
<i>H.pylori</i>	Cpn60	La proteína recombinante estimula la síntesis de citoquinas de los monocitos a través de la participación del receptor tipo Toll (TLR)2	Takenaka <i>et al.</i> (2004)

<i>H.pylori</i>	Cpn60	La Cpn60 no recombinante estimula la síntesis de citoquinas de los monocitos sin participación de TLR2 o TLR4	Gobert <i>et al.</i> (2004)
<i>H.pylori</i>	Cpn60	Estimula la síntesis de citoquinas de las células epiteliales a través de TLR2	Zhao <i>et al.</i> (2007)
<i>H.pylori</i>	Cpn60	Estimula la síntesis de IL-8 por las células epiteliales gástricas	Yamaguchi <i>et al.</i> (1999)
<i>Histophilus somni</i>	Cpn60	Cpn60 se encuentra en las biopelículas de este organismo y los anticuerpos contra la Cpn60 bacteriana inhiben la formación de biopelículas	Zarankiewicz <i>et al.</i> (2012)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cpn60	Protege a las células mononucleares de la apoptosis inducida por la dexametasona	Ortega-Ortega <i>et al.</i> (2011)
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Cpn60	Estimula la síntesis de citoquinas proinflamatorias en las células epiteliales	Bergonzelli <i>et al.</i> (2006)
<i>L.johnsonii</i>	Cpn60	Provoca la agregación de <i>Helicobacter pylori</i> pero no otras bacterias intestinales	Bergonzelli <i>et al.</i> (2006)
<i>H.pylori</i>	Cpn60	A diferencia de la proteína Cpn60 de <i>L. johnsonii</i> , no agrega a <i>H. pylori</i>	Bergonzelli <i>et al.</i> (2006)
<i>Legionella pneumophila</i>	Cpn60	Función como invasina, que también funciona para reclutar mitocondrias dentro de las células invadidas y modula el citoesqueleto de actina	Chong <i>et al.</i> (2009)
<i>E.coli</i>	Cpn60	GroEL de <i>E. coli</i> no pudo replicar los efectos anteriores de la Cpn60 de <i>L. pneumophila</i>	Chong <i>et al.</i> (2009)
Mollicutes	Cpn60	Una parte de los micoplasmas no tienen genes cpn60. En los que tienen la proteína Cpn60, parece ser una proteína de la superficie celular que participa en la adhesión de las bacterias a las células de su huésped	Clark & Tillier (2010)
<i>Mycobacterium bovis</i>	Cpn60.1	Cpn60.1 controla la síntesis de los ácidos micólicos de la superficie celular. La eliminación del gen resulta en un organismo menos virulento y en un aumento masivo de los niveles de secreción de Cpn60.2	Wang <i>et al.</i> (2011)
<i>Mycobacterium leprae</i>	Cpn60.2	Potente inhibidor experimental del asma en murinos	Rha <i>et al.</i> (2002)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cpn60.2	Inactivo como inhibidor del asma experimental murino	Rha <i>et al.</i> (2002) and Riffo-Vasquez <i>et al.</i> , 2004
<i>M.leprae</i>	Cpn60.2	La proteína tiene un sitio activo de proteasa capaz de escindir oligopéptidos	Portaro <i>et al.</i> (2002)
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Cpn60.1	Esencial para la formación de biopelículas	Ojha <i>et al.</i> (2005)
<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.1	No es esencial para la formación de biopelículas	Hu <i>et al.</i> (2008)
<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.2	Estimula la síntesis de citoquinas de los monocitos sin activarlos clásicamente	Friedland <i>et al.</i> (1993) y Peetermans <i>et al.</i> (1994)
<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.2	Estimula la expresión de la proteína de adhesión celular de los endotelios vasculares por un nuevo mecanismo que no involucra a la IL-1 β o TNF α	Verdegaal <i>et al.</i> (1996)

<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.2	No estimula la descomposición del hueso ni la formación de osteoclastos	Kirby <i>et al.</i> (1995) y Meghji <i>et al.</i> (1997)
<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.2	Se une al receptor CD43 de la superficie celular de los macrófagos y actúa como adhesina para permitir que la bacteria invada los macrófagos	Hickey <i>et al.</i> (2009, 2010)
<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.1	Estimulador de citoquinas de monocitos más potente que Cpn60.2	Lewthwaite <i>et al.</i> (2001)
<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.1	Potente inhibidor del asma alérgico murino	Riffo-Vasquez <i>et al.</i> (2004, 2012)
<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.2	No inhibe el asma experimental murino	Rha <i>et al.</i> (2002) y Riffo-Vasquez <i>et al.</i> (2004)
<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.1	Potente inhibidor de la formación de osteoclastos que actúa a través de NFATc1	Winrow <i>et al.</i> (2008)
<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.1	Bloquea la destrucción ósea osteoclástica en la artritis adyuvante en ratas	Winrow <i>et al.</i> (2008)
<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.1	Estimula la formación de células gigantes multinucleadas en sangre humana	Cehovin <i>et al.</i> (2010)
<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.1	La inactivación del gen cpn60.1 da lugar a un mutante isogénico incapaz de inducir inflamación granulomatosa en ratones y cobayas	Hu <i>et al.</i> (2008)
<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.1	Inhibe la síntesis de citoquinas de los monocitos humanos inducida por la PPD	Khan <i>et al.</i> (2008)
<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.1	Inhibe la diapedesis de leucocitos en el modelo pulmonar alérgico	Riffo-Vasquez <i>et al.</i> (2012)
<i>M.tuberculosis</i>	Cpn60.1	Proteína de unión al DNA monocatenario	Basu <i>et al.</i> (2009)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Cpn60	Estimula el receptor NF-κB de los macrófagos	Argueta <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Cpn60.1	No estimula a los monocitos humanos a sintetizar citoquinas	Lewthwaite <i>et al.</i> (2002a)
<i>R.leguminosarum</i>	Cpn60.3	Estimula a los monocitos humanos a sintetizar citoquinas	Lewthwaite <i>et al.</i> (2002a)
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	Cpn60	Toxina de insecto que actúa uniéndose a las células intestinales	Joshi <i>et al.</i> (2008)
<i>Xenorhabdus budapestensis</i>	Cpn60	Toxina de insectos	Yang <i>et al.</i> (2012)
<i>Xenorhabdus ehlersii</i>	Cpn60	Toxina de insectos	Shi <i>et al.</i> (2012)

3.2 Actividad moonlighting en proteínas GroEL provenientes de bacterias simbiotes

Sólo un pequeño número de proteínas Cpn60 han sido examinadas y sorprendentemente, no todas exhiben las mismas actividades alternativas. Quizás la función más sorprendente de los miembros de la familia GroEL es la de mostrar actividades tóxicas en contra de eucariontes.

Los Mirmeleóntidos (*Myrmeleontidae*) son un grupo del orden Neuroptera, conocidos comúnmente como hormigas león. Estos son depredadores que son capaces de paralizar a sus insectos presa y succionar los fluidos de su cuerpo. La saliva de la larva de la hormiga león (*Myrmeleon bore*) contiene factores insecticidas que son producidos por una bacteria endosimbionte, *Enterobacter aerogenes* (Yoshida *et al.*, 2001). Sorprendentemente, en los caldos de cultivo de la cepa *Enterobacter* se identificó una proteína la cual paralizaba rápidamente y mataba a cucarachas del género *Blatella germanica* cuando ésta se inyectaba en el hemocele del insecto, esta proteína fue caracterizada e identificada como una GroEL. Cuando esta fue expresada en *E. coli* mostró el mismo efecto tóxico sobre estos organismos, mientras la homóloga proveniente de *E. coli* no mostró efecto alguno. El grado de homología entre las secuencias es elevada, ya que se encontraron diferencias en tan solo 11 aminoácidos, de los cuales solo cuatro fueron críticos para conferir la actividad tóxica (Val 100, Asn 101, Asp 338 y Ala 471) y la sustitución de estos aminoácidos en la GroEL de *E. coli* también le confirió toxicidad (**Figura 3**).

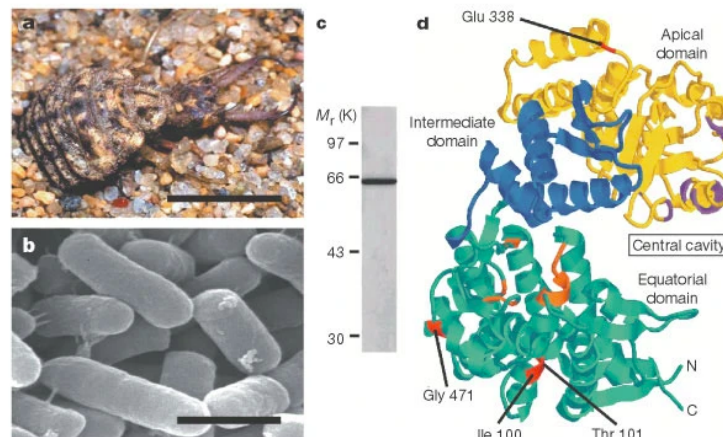


Figura 3. Una toxina de insecto producida por un endosimbionte salival de las larvas de la hormiga león es un homólogo de GroEL. a, Larva de *M. bore*. Barra de escala, 5 mm. **b,** Micrografía electrónica de barrido del endosimbionte bacteriano *E. aerogenes*. Barra de escala, 1 µm. **c,** Electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 10 % de la proteína tóxica purificada a partir de un cultivo de *E. aerogenes*. **d,** La estructura tridimensional de una subunidad en una molécula GroEL de 14 polímeros de *E. coli* (creada utilizando un archivo PDB,1DER). Los dominios apical, intermedio y

ecuatorial están coloreados en amarillo, azul y verde, respectivamente. Las localizaciones de los residuos en los que la mutación confiere toxicidad se muestran en rojo. Los sitios en los que la mutación bloquea la unión del polipéptido y de GroES en el dominio apical y los residuos implicados en la unión del ATP en el dominio ecuatorial se muestran en morado y naranja, respectivamente (Tomada de Yoshida *et al.*, 2001).

Otro ejemplo de GroEL con actividad tóxica se encuentra en la bacteria patógena de insectos *Xenorhabdus nematophila*, que se encuentra en asociación simbiótica con nematodos entomopatógenos del género *Steinernema* y que habita en el intestino de estos organismos (Herbert y Goodrich-Blair, 2007). El nematodo es encontrado en insectos hospederos o en el suelo durante su etapa como juvenil infectivo, esperando infectar nuevas presas. Una vez dentro del insecto hospedero este es capaz de llegar al hemocele, donde libera a la bacteria. La bacteria se multiplica y expulsa factores tóxicos que contribuyen matando al insecto, permitiéndole al nemátodo alimentarse y completar su ciclo de vida. En caldos de cultivo de la cepa *X. nematophila* se encontraron pequeñas vesículas provenientes de la membrana externa que contenían factores tóxicos insecticidas, incluyendo una proteína GroEL (XnGroEL) como mayor constituyente. Interesantemente, la co-chaperonina XnGroES no fue detectada en las vesículas, sugiriendo una vía específica para la exportación de XnGroEL al exterior. La proteína purificada XnGroEL presentó actividad insecticida en contra de larvas neonatas del insecto-plaga *Helicoverpa armigera* después de su administración por vía oral (Joshi *et al.*, 2008). Además, experimentos posteriores demostraron que esta proteína tiene como blanco el intestino de las larvas. Análisis por mutaciones reveló que dos aminoácidos de esta proteína (Thr 347 y Ser 356) fueron críticos para la unión y toxicidad de XnGroEL (Joshi *et al.*, 2008). Ya han sido reportadas actividades insecticidas de homólogos de GroEL de otras especies de *Xenorhabdus* (*X. budapestensis* y *X. ehlersii*) estas fueron tóxicas contra *Galleria mellonella* (Shi *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012) Así en estas bacterias entomopatógenas, GroEL ha evolucionado como un importante factor de virulencia (Kumary *et al.*, 2013).

Es interesante hacer notar que las proteínas GroEL provenientes de *Sodalis glossinidius*, un endosimbionte secundario de la mosca tse-tse *Glossina morsitans*, contiene los cuatro residuos cruciales para la toxicidad de la proteína mencionada arriba, proveniente de *Enterobacter*, mientras que algunas otras proteínas GroEL de endosimbiontes primarios como son *Wigglesworthia* y *Sodalis pierantonius* contienen tres de los cuatro residuos (Haines *et al.*, 2002). Hasta el momento no existen datos disponibles, pero esto plantea la cuestión de si las bacterias endosimbióticas pudieran ser potencialmente tóxicas hacia sus hospederos en al menos ciertos

estadios de su interacción. Muchos insectos mutualistas están estrechamente relacionados a bacterias patogénicas y tienen una historia evolutiva común, indicándonos una relación patogénica al comienzo de la simbiosis al menos para algunas interacciones mutualistas.

3.3 Modos de acción propuestos a través de los cuales GroEL actúa como toxina

A pesar de conocerse con poca profundidad el mecanismo a través del cual la proteína GroEL ejerce su actividad como toxina, existe evidencia para dos modos de acción mediante dos vías diferentes que podría explicarlo.

El primero de ellos es reportado por Joshi y colaboradores en el 2008, quienes evaluaron la actividad insecticida de una proteína GroEL proveniente de *X.nematophila* sobre larvas neonatas de *Helicoverpa armigera*. Ellos evalúan la proteína nativa y recombinante en concentraciones de entre 1 a 20 ug cuando es administrada oralmente. También retardan el crecimiento de las larvas observándose una disminución en el peso medio de éstas, entre un 50 - 55% comparadas con el control. También observaron mortalidad con un efecto dosis dependiente en concentraciones de 5 - 15 ug/g de dieta (**Figura 4**).

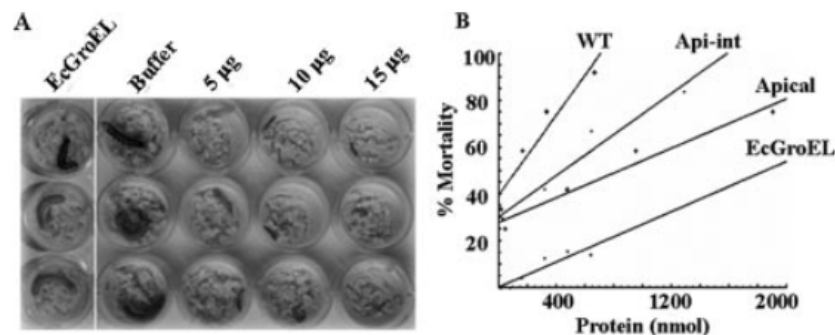


Figura 4. Actividad insecticida de XnGroEL sobre las larvas de *H. armigera*. **A**, las proteínas purificadas XnGroEL (5-15 g/g de dieta) y EcGroEL a una concentración de 20 g/g de dieta se añadieron a la dieta de neonatos de 1 día de edad, y se registraron el crecimiento y la mortalidad durante 6 -12 días de periodo larvario. **B**, gráfico del porcentaje de mortalidad frente a la concentración de proteínas. Cada punto del gráfico representa la media de tres experimentos individuales. El rango de concentración de proteína con alta significación estadística ($p < 0,001$) fue seleccionado para el análisis de regresión lineal; rango de concentración mostrado en el gráfico: XnGroEL (16 - 400 nmol), apical-intermedio (30 -1300 nmol), apical (40 -2000 nmol), y EcGroEL (16 -700 nmol). Los parámetros calculados para cada línea son los siguientes: pendiente (m) 0,006, 0,011, 0,021 y 0,006, intercepción (c) 6,638, 7,207, 9,430 y 0,011 para las proteínas apical, apical-intermedia, XnGroEL de longitud completa y EcGroEL respectivamente. WT, tipo salvaje.

Mediante la construcción de mutantes donde se tenía únicamente el dominio apical y apical-intermedio, ellos reportan una retención de la actividad por parte de estas dos mutantes de un tercio y un medio de la actividad cuando es comparada con la proteína completa, indicando que el dominio ecuatorial juega un papel trascendental en la ejecución de la toxicidad, atribuyendo esta disminución a la incapacidad de la proteína para oligomerizar que podría ser necesario para proporcionar una toxicidad efectiva mediante la unión cooperativa de ésta proteína. Además, mediante el análisis de mutantes puntuales dentro de la cadena revelan la importancia de dos residuos clave en la ejecución de la actividad insecticida, S356 y T347. Cuando estos residuos fueron mutados por alaninas la actividad se vio reducida en hasta un 80%, $p < 0.001$. Además, los autores concluyen que estos dos residuos son críticos para la interacción de la proteína XnGroEL con el epitelio intestinal de los insectos, esto a través de la unión a moléculas de quitina (**Figura 5**).

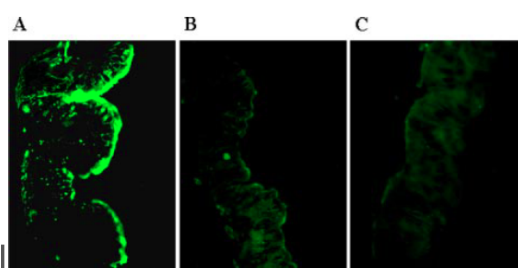


TABLE 1

Binding constants of XnGroEL to α -chitin

Protein	K_d (\pm S.D.)	B_{max} (\pm S.D.)
	μM	$\mu mol/g \text{ chitin}$
Wild type	0.64 ± 0.10	4.68 ± 0.16
Apical intermediate	0.96 ± 0.28	3.65 ± 0.38
Apical domain protein	1.14 ± 0.05	2.94 ± 0.05
T347A mutant	1.87 ± 0.05	2.02 ± 0.01
S356A mutant	2.57 ± 0.20	1.78 ± 0.08
Double mutant	4.71 ± 0.76	1.84 ± 0.23

Figura 5. Detección de la unión de XnGroEL a la membrana epitelial del intestino mediante inmunohistoquímica y constantes de unión de XnGroEL a la quitina. Se diseccionó el intestino de las larvas de cuarto a quinto estadio de *H. armigera*, se lavó y se fijó en solución fijadora. Secciones de 6 μm de grosor se incubaron con proteínas (XnGroEL o doble mutante) y se tificaron con anticuerpos anti-XnGroEL (1:10.000). Las secciones se trataron con anticuerpos secundarios ALEXA 488 anti-conejo a una dilución de 1:1500 y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon ECLIPSE TE 2000-U) bajo luz azul a un aumento de 20. A, XnGroEL de tipo salvaje; B, mutante doble; C, control control negativo, sin proteína.

Con base en la evidencia antes descrita, es aceptado que uno de los blancos de las proteínas GroEL con actividad insecticida sea el intestino de los insectos, cuando ésta es administrada oralmente en dieta artificial.

El otro modo de acción es mediante la interacción y activación del sistema profenoloxidasa (PPO). El sistema PPO es un importante mecanismo de encapsulación utilizado por muchos invertebrados superiores pero, por razones desconocidas, no por los prevertebrados o vertebrados. La profenoloxidasa (PPO) es la forma zimógena de la enzima fenoloxidasa (PO) y tiene una masa molecular de 70-80 kDa. En los animales más primitivos, la PPO se encuentra en forma libre en la

hemolinfa o depositada en el exoesqueleto. En especies más avanzadas, la PPO suele estar secuestrada en vesículas intracelulares dentro de las células granulares. Cuando hay lipopolisacáridos microbianos, glucanos o peptidoglicanos, se desencadena la cascada de coagulación y/o se producen cambios en la concentración de Ca^{2+} o en el pH que activan una serie de serina proteasas presentes en la hemolinfa. Estas serinproteasas activadas escinden la PPO para generar PO activada. La PO es una oxidorreductasa que oxida los fenoles para producir quinonas, que luego se polimerizan de forma no enzimática para formar el pigmento melanina (Cerenius y Söderhäll, 1998)(Ver Figura 6).

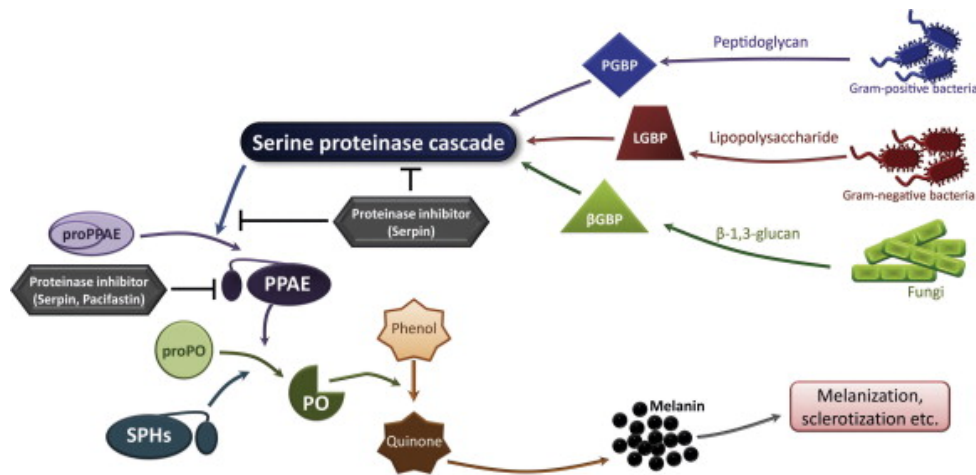


Figura 6. Resumen esquemático de los sistemas de activación de la profenoloxidasas en los artrópodos. Tras una infección o lesión, las moléculas no propias, como el lipopolisacárido (LPS), el peptidoglicano y el β-1,3-glucano, son reconocidas por proteínas de reconocimiento de patrones (proteína de unión al peptidoglicano, PGBP; proteína de unión al LPS y al β-1,3-glucano, LGBP; y la proteína de unión a β-1,3-glucano, βGBP), lo que lleva a la activación de la cascada de serin-proteinasas, que incluye varias serina-proteinasas y una serin-proteinasas final de dominio de clip designada como enzima activadora de PPO (PPAE). Posteriormente, el zimógeno PPO inactivo es convertido en fenoloxidasas (PO) activa, por la PPAE para producir las quinonas, que pueden reticular las moléculas vecinas para formar melanina en el lugar de la lesión o alrededor de los microorganismos invasores (Tomada de Cerenius y Söderhäll, 2004).

Tanto la melanina como los intermediarios de su síntesis son tóxicos para los microbios. Así, un patógeno en la hemolinfa atrapado en esta cascada termina como una mancha paralizada y ennegrecida, ya que la melanina se deposita en ella en un proceso llamado reacción de melanización. La activación de la cascada de la ProPO también genera productos intermedios que pueden funcionar como opsoninas para mejorar la fagocitosis y estimular otras proteínas que participan en la defensa del huésped. Debido a estas características, el sistema PPO y la reacción

de melanización se han comparado con las vías de activación de la lectina o del complemento alternativo descritas para los mamíferos (Nagai y Kawabata, 2000)

Evidencias experimentales sugieren que la administración directa de la proteína GroEL en el hemocele del insecto desencadena la sobreactivación de esta vía en los insectos probados. Así lo reporta Yang *et al.*, 2012, con un homólogo de GroEL denominado Hip57, que al ser inyectado sobre larvas de *G.mellonella* desencadena un ennegrecimiento generalizado del cuerpo de las larvas a los 30 min de haber sido inyectadas. Ellos evalúan la actividad PPO, y observan que Hip57 es capaz de activar el sistema aproximadamente tres veces mayor que el del PBS y también mayor que el del LPS a la misma dosis de inyección (Yang *et al.*, 2012) (Figura 7A).

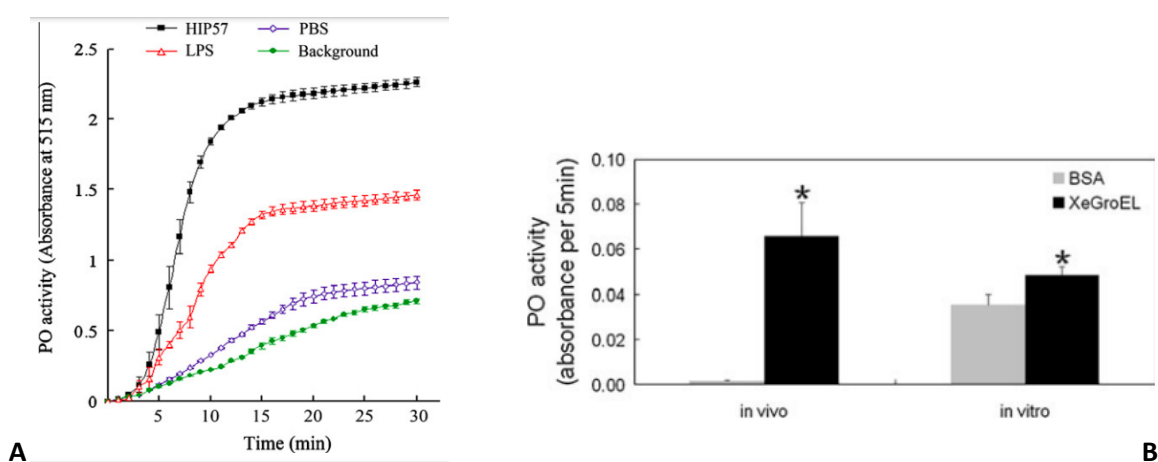


Figura 7. Análisis de la actividad de la PPO en la hemolinfa de las larvas de *G. mellonella*. A) La PPO fue activada a la PO activa por el activador HIP57 o el LPS en la hemocoela de las larvas. Se analizó in vitro la actividad de actividad de la PPO en la hemolinfa de las larvas de *G. mellonella* se analizó in vitro. Se añadió una solución de sustrato de Idopamina y se controló la absorbancia a 515 nm inmediatamente con el tiempo utilizando un espectrofotómetro de barrido. Los resultados representaron los valores medios de al menos tres determinaciones independientes con errores estándar. B) Una comparación de la influencia de XeGroEL en la actividad de PO entre el tratamiento in vivo e in vitro, con la BSA utilizada como control. Cada medición representa tres réplicas. El asterisco sobre las barras de desviación estándar indican diferencias significativas entre XeGroEL y el tratamiento con BSA (prueba LSD, P\0,05)

Así mismo, Shi *et al.*, 2012 reportan una proteína proveniente de *X.ehlersii* denominada XeGroEL capaz de activar el sistema PPO tanto *in vitro* como *in vivo* en larvas de *G.mellonella*. XeGroEL fue capaz de activar cinco veces más la actividad PPO in vivo que in vitro, sugiriendo los autores el sistema del insecto como un mejor blanco de activación (Shi *et al.*, 2012) (Figura 7B).

3. ANTECEDENTES

En el Laboratorio de Estudios Ecogenómicos (LEE, UAEM), se aisló a la bacteria *Alcaligenes faecalis* MOR02 a partir de una larva de *G. mellonella* infectada con nematodos entomopatógenos. Los bioensayos de patogenicidad contra *G. mellonella* muestran que la bacteria causó el 96% de mortalidad a las 24 horas después de inyectar 24,000 UFC en la hemolinfa de las larvas. Interesantemente, los análisis de microscopía de fluorescencia mostraron que la bacteria *A. faecalis* MOR02 fue localizada en el intestino del nematodo durante la fase juvenil a diferencia de *E. coli* DH5 α , que fue incapaz de introducirse en los nematodos. Además, en este mismo reporte se mostró la actividad tóxica del caldo de cultivo proveniente de esta cepa, donde a las 96 horas de tratamiento la población de larvas presentaba una mortalidad del 73.3% y 83.3% de mortalidad usando 1, 2 y 4 μ g del extracto proteico. Sin embargo, cuando fue analizado el genoma de *A. faecalis* MOR02 no fueron detectados genes candidatos que pudieran conferir la toxicidad observada ni genes con actividad insecticida. Con base en la literatura, fue sugerida la actividad de la proteína GroEL como un componente tóxico encontrado en bacterias simbiotes, el análisis de las secuencias mostró 87% de similitud con HIP57 proveniente de *X. budapestensis*, de la cual se tiene reporte de actividad tóxica en contra de larvas de *G. mellonella* (Quiroz *et al.*, 2015).

Así mismo, en el LEE se obtuvo un aislamiento de un nematodo entomopatógeno identificado molecularmente como *Heterorhabditis indica* MOR03 mediante los marcadores 18S y la región ITS del rRNA y que fue aislado de campos de cultivo del Estado de Morelos. Además, dos bacterias asociadas al nematodo fueron aisladas. La primera se obtuvo de la hemolinfa de larvas infectadas con *H. indica* MOR03 y la segunda de juveniles infectivos previamente desinfectados. Estas bacterias se identificaron con el marcador 16S como *Photorhabdus luminescens* HIM3 y *Pseudomonas aeruginosa* NA04. En el mismo estudio fueron evaluadas las bacterias sobre larvas de *G. mellonella* resultando ser altamente virulentas cuando fueron inyectadas a las 48 horas de tratamiento. Así mismo, fueron evaluadas mediante el mismo método en larvas de *Diatrea magnifactella*, en donde hubo diferencias en la mortalidad, *P. luminescens* HIM3 alcanzó un 90% mientras *P. aeruginosa* NA04 solo 10% a las 48 horas (Salgado, 2015).

4. JUSTIFICACIÓN

Las chaperonas moleculares son proteínas encargadas de asistir el plegamiento así como de mantener la integridad del proteoma. Sin embargo, numerosos estudios reportan actividades alternativas para estas proteínas por lo que se le ha considerado una proteína moonlighting. Una de las actividades de mayor interés es la de toxina insecticida, esta actividad ha sido reportada principalmente en microorganismos con estilos de vida simbióticos, en asociación con insectos o nematodos entomopatógenos.

En el Laboratorio de Estudios Ecogenómicos se aislaron bacterias que presentan una asociación simbiótica con nematodos entomopatógenos como fueron *A. faecalis* MOR02, *P. aeruginosa* NA04 y *P. luminescens* HIM3 y *X. nematophila* SC 0516 en las cuales no existen reportes de la actividad insecticida en la proteína GroEL. Por lo que resulta de un gran interés, el estudio evaluación y caracterización de la actividad tóxica frente a insectos, así como de los cambios bioquímicos y moleculares que les confieren la actividad insecticida a las proteínas GroEL provenientes de estos microorganismos. Principalmente por su uso potencial como agente de control biológico, además de documentar esta función en especies simbióticas diferentes a las ya descritas.

5. HIPÓTESIS

La actividad insecticida de las proteínas GroEL se debe a los cambios a nivel de secuencia, y esta actividad insecticida se encuentra estrechamente relacionada a la asociación simbiótica con nemátodos entomopatógenos por parte de la bacteria de la cual provienen.

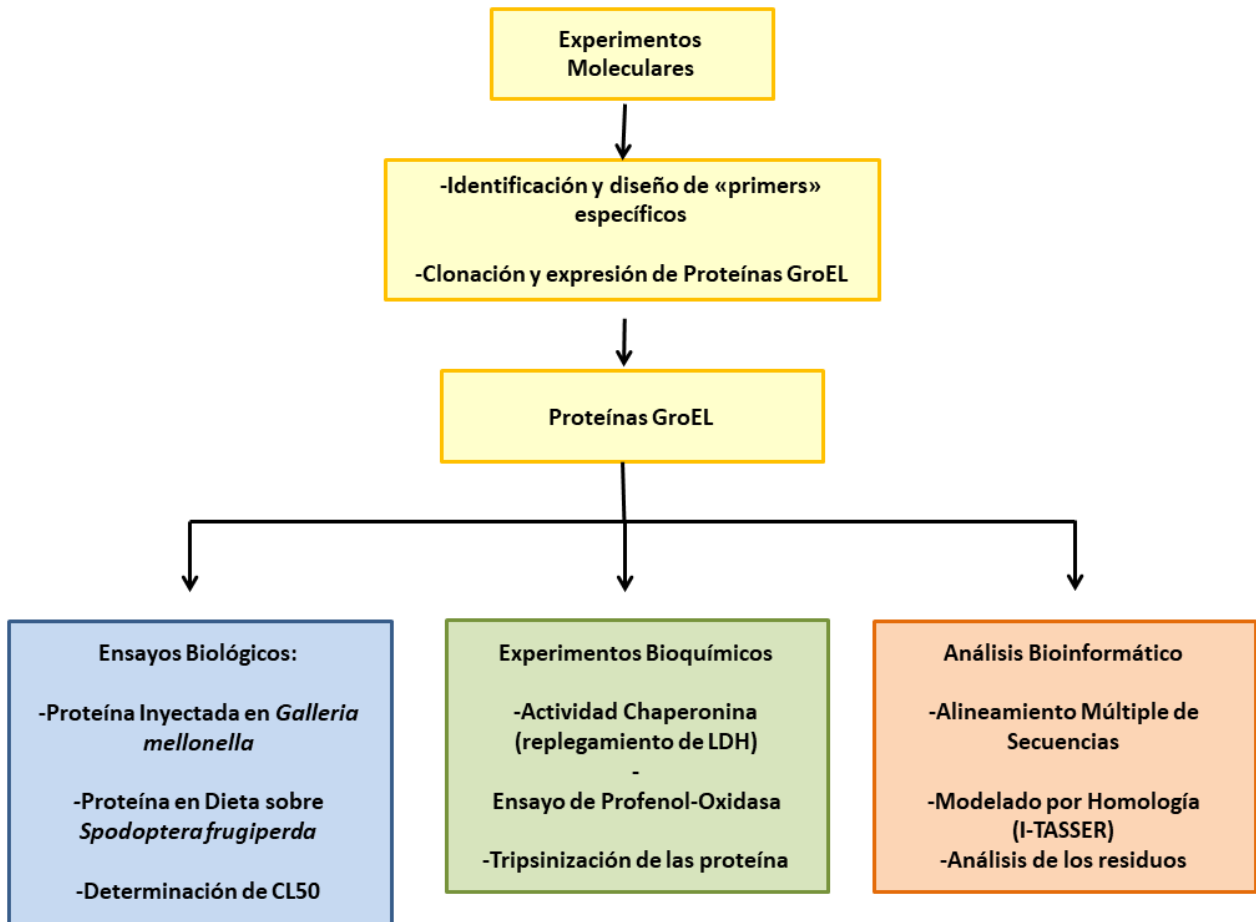
6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad insecticida y caracterizar los posibles cambios a nivel de secuencia que les confieren esta doble actividad a las proteínas GroEL provenientes de bacterias simbiotes.

7.1 Objetivos particulares

- Evaluar la actividad insecticida intrahemocele y determinar la DL50 de las diversas proteínas GroEL.
- Evaluar la actividad insecticida por vía oral de las diversas proteínas GroEL.
- Evaluar la actividad chaperonina de las diferentes proteínas GroEL.
- Evaluar la actividad profenoloxidasa *in vitro*.
- Identificar y mapear los diferentes cambios a nivel de secuencia entre las diferentes proteínas GroEL, que pudieran ser responsables de la actividad insecticida.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Mantenimiento de las Cepas

Todas las cepas bacterianas utilizadas para los experimentos fueron reactivadas de gliceroles almacenados a -75°C, posteriormente éstas fueron mantenidas en agar nutritivo sólido con azul de bromotimol (medio NBTA) a 28°C para los casos de *P. luminescens* HIM3 y *Xenorhabdus nematophila* SC0516. Para el resto de las cepas *A. faecalis* MOR02, *P. aeruginosa* NA04 y *E. coli* DH5α, éstas fueron incubadas y mantenidas en medio LB a 37°C.

8.2. Extracción de ADN y amplificación de los genes GroEL

La extracción del ADN genómico de las bacterias se llevó a cabo usando el kit Ultra Clean Microbial DNA Isolation (MOBIO). La concentración de ADN genómico fue determinado usando el equipo Nanodrop 2000c de Thermo Scientific mediante el software previamente instalado y recomendado por el fabricante. Una vez obtenido el ADN, se amplificaron las regiones correspondientes a los genes GroEL mediante PCR con primers específicos que se diseñaron con base en información previa de la secuenciación del genoma para cada cepa. GroEL de *E.coli* DH5α Fw: 5'CCATATGGCAGCTAAAGACGTAAAATTCG3', Rev: 5'GAATTCATTACATCATGCCGCCCATGCCAC 3', GroEL de *Photorhabdus luminescens* HIM3: Fw: 5'CATATGGCAGCTAAAGACGTAAAATTTGG3', Rv: 5'GAATTCTTACATCATGCCGCCCATACCG3', GroEL de *Pseudomonas aeruginosa* NA04: Fw: 5'CATATGGCTGCCAAAGAAGTTAAGTTC3', Rv: 5'GAATTCTTACATCATGCCGCCCATGC3'; *Xenorhabdus nematophila* SC0516 Fw:5'CATATGGCAGCTAAAGACGTAAAATTTG3' and Rv:5'GAATTCACATCATGCCGCCATTCCAC3'. En todos los casos fueron agregados sitios de corte para las enzimas EcoRI y NdeI.

8.3. Transformación de *E.coli* XL-1 Blue con vector PJET1.2

Se generaron células quimiocompetentes de *E.coli* XL-1 Blue por el método de rubidio. Una vez obtenidas las células de XL-1 Blue se transformaron con el vector de clonación pJET 1.2 conteniendo el fragmento de interés, con las condiciones tal como las describe el fabricante con el kit CloneJET PCR Cloning de Thermo Fisher. Este plásmido contiene un gen letal llamado *eco47IR* que permite una selección positiva de las clonas y además un cassette con resistencia a ampicilina. Las células fueron transformadas por choque térmico, incubándolas en un principio a 4°C durante 30 minutos para después ser expuestas a 42 °C durante 45 seg. Posteriormente las células fueron

plaqueadas en cajas Petri con LB + ampicilina (100 µg/ml). Las clonas positivas fueron analizadas mediante PCR en colonia con los primers específicos provistos por el fabricante.

8.4. Expresión y purificación de las proteínas GroEL

Células de *E.coli* BL-21 fueron transformadas con el vector de expresión pET-28a(+) el cual fue doblemente digerido con las enzimas EcoRI y NdeI para una clonación con extremos cohesivos, dentro de las características primarias para este vector está la de marcar con una etiqueta de histidinas (6xHis) el N – terminal de la proteína de interés para facilitar su purificación, además cuenta también con un casete de resistencia a Kanamicina para la selección de las clonas. Una vez corroborada la clonación del fragmento dentro del vector, se llevó a cabo la expresión de la proteína. Para esto un cultivo de 25 ml de LB con 50 µg/ml de Kanamicina para cada cepa fue incubado toda la noche a 37°C y 200 rpm. Posteriormente se tomaron 5 ml de cada cultivo y fueron inoculados en matraces nuevos de 1 L con 500 ml de LB y 50 µg/ml de Kanamicina y crecidos hasta alcanzar una O.D de 0.5 (3 horas aproximadamente), llegados los cultivos a la OD indicada fue agregado el compuesto inductor IPTG 1mM e incubados nuevamente durante 12 horas a 30°C y 200 rpm. Para corroborar la correcta expresión de la proteína, fue tomada una alícuota de 1 ml de medio y las células fueron lisadas mediante congelación y calor, un volumen de 10 µl del sobrenadante fue cargado en un gel SDS – PAGE para la visualización de la proteína GroEL. Una vez corroborada la correcta expresión se centrifugó el volumen total de los cultivos a 10000 rpm durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y las células fueron sonicadas utilizando un pulso de 9×10^6 joules, una amplitud de 60% durante 40 seg durante 5 ciclos, posteriormente el lisado fue centrifugado a 25,000 rpm durante 30 min. El sobrenadante libre de restos celulares fue pasado a través de una columna de afinidad de Ni-NTA (ácido nitriloacético-níquel), la columna con las proteínas fue lavada en un principio con un buffer de 20 mM de Imidazol, para eluir las proteínas se utilizó una solución de imidazol 250 mM. Las proteínas fueron dializadas para quitar el exceso del compuesto imidazólico y cuantificadas mediante método de Bradford y almacenadas a 4°C hasta su utilización.

8.5. Ensayos de toxicidad por inyección en *Galleria mellonella*

Para evaluar la actividad insecticida de las diferentes proteínas GroEL purificadas, utilizamos larvas de *G. mellonella* del sexto instar que fueron inyectadas en el último segmento de la región abdominal del insecto utilizando así mismo, diferentes concentraciones de la proteína: 100, 200, 500, 1000 y 2000 ng por larva. La proteína fue resuspendida en buffer PBS y la concentración se

ajustó a un volumen final de 10 μ l. La mortalidad de los insectos fue observada cada 24 horas durante 4 días. Las larvas fueron mantenidas a una temperatura constante de 25 °C. Para los controles negativos se utilizó BSA en una concentración de 2000 ng. También se utilizó como control larvas que solo sufrieron el pinchazo (sin inyectar nada) para evaluar el daño por la aguja. Se utilizaron 15 larvas por cada tratamiento, y los experimentos fueron repetidos en 3 ensayos independientes.

8.6. Alineamiento múltiple de secuencias

El alineamiento múltiple de las secuencias GroEL se realizó utilizando el programa BioEdit v7.1.9 utilizando la suite de ClustalW con los parámetros que trae por default.

8.7. Modelamiento de las estructuras de GroEL

Para la generación de los modelos estructurales a partir de la secuencia de aminoácidos utilizamos el método por homología a través del servidor en línea I-TASSER (Yang y Zhang, 2015).

8.8. Evaluación de la actividad bioquímica de chaperonina GroEL

La evaluación de la actividad chaperonina fue llevada a cabo mediante el ensayo de replegamiento de la enzima bacteriana lactato deshidrogenasa LDH (L3888, Sigma) como lo describe Hristozova *et al.*, 2016. La enzima LDH fue completamente desnaturalizada mediante choque térmico a 75 °C durante 60 minutos. La solución de reacción fue preparada con 6.6 mM NADH (N8129, Sigma), 30 mM de piruvato de sodio (P2256, Sigma), 1 mM MgCl₂, 5 mM ATP (0220, VWR LifeScience) todo esto en un buffer con 200 mM Tris-HCl at pH: 7.3. La concentración de la enzima durante la reacción de replegamiento fue de 10 μ M de LDH a una temperatura de 25 °C. Un exceso de cinco veces la concentración molar de GroEL con respecto a la enzima fue agregada a la reacción de replegamiento. Como controles fueron utilizados la mezcla de reacción sin proteínas, la mezcla con LDH únicamente (sin GroEL) y la mezcla más LDH y GroEL (sin ATP y sin Mg²⁺). Este ensayo fue llevado a cabo en placas de 96 pozos con un volumen final de 200 μ l para cada tratamiento. La reacción fue monitoreada cada 5 min a 360 nm durante 90 min a 25 °C en un lector de microplacas.

8.9. Evaluación de la toxicidad en dieta sobre *Spodoptera frugiperda*

Para los bioensayos de la actividad insecticida por vía oral, fueron utilizadas larvas neonatas de 24 horas de nacidas de *S. frugiperda* que fueron mantenidas en recipientes de plástico del número 0. Las proteínas fueron resuspendidas en buffer 1X PBS a pH: 7 y llevadas a un concentración de 2 mg/ml. Se utilizaron tres concentraciones para la evaluación de la toxicidad las cuales fueron 10,

20 y 50 ug/g de dieta. La proteína fue aplicada sobre la dieta artificial y se le permitió percolar de la superficie al fondo durante 1 hora. Posteriormente un gramo de dieta fue puesto por larva para cada tratamiento utilizando un total de 100 individuos por tratamiento en 3 experimentos independientes. Las larvas se mantuvieron a temperatura ambiente 25°C durante 6 días y la mortalidad fue registrada cada 24 horas. Como controles negativos fueron utilizados buffer PBS y dieta sin tratar.

8.10 Secuenciación y anotación del genoma

El DNA genómico de *X. nematophila* SC 0526 se extrajo utilizando el kit ZR Fungal/Bacterial MiniPrep™ (Zymo Research, Irvine, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se secuenciaron 5 µg de ADN genómico en la plataforma Illumina MiSeq. La calidad de las lecturas fueron analizadas con FastQC. Las secuencias adaptadoras de Illumina se eliminaron utilizando ILLUMINACLIP del software Trimmomatic v0.39. Las lecturas de baja calidad fueron eliminadas utilizando el algoritmo DynamicTrim del paquete de software SolexaQA++ v3.1.7.1 con una puntuación de calidad Phred de Q = 13. Las lecturas de extremo pareado se ensamblaron *de novo* utilizando el programa SPAdes v3.14.1 con las siguientes opciones (i) sólo ejecutar el módulo de ensamblaje (-only-assembler); (ii) reducir el número de desajustes (-careful); y (iii) longitudes de k-mer entre 21 y 71, lo que generó 248 contigs. Los contigs de menos de 500 pb de longitud se descartaron, y los contigs restantes se utilizaron para un análisis multidraft utilizando el genoma de referencia de la cepa *X. nematophila* YL001 con el programa MeDuSa v1.6. Se realizó un paso final de pulido del ensamblaje reasignando las lecturas de secuencia de alta calidad filtradas a los andamios ordenados utilizando BWA y pasando los alineamientos binarios ordenados resultantes a SAMtools para su indexación. Los alineamientos indexados se utilizaron para un análisis con el software Pilon v1.23. El borrador del genoma bacteriano se anotó automáticamente utilizando el servidor RAST versión 2.0 (disponible en <https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>), y las secuencias del gen 16S rRNA se obtuvieron utilizando el servidor RNAmmer (<http://www.cbs.dtu.dk/services/RNAmmer/>).

8.11 Análisis filogenómico

La filogenia del genoma central se estimó bajo el criterio de máxima verosimilitud (ML) utilizando las suites de los programas GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira y Vinuesa, 2013) y GET_PHYLOMARKERS (Vinuesa *et al.*, 2018). El script *get_homologues.pl* se utilizó en combinación con *compare_clusters.pl* para calcular un genoma central consenso resultante de agrupar los

resultados de BLASTP (con una cobertura de consulta del 90%) con los algoritmos BDBH (Bi-directional Best Hits), COG (Cluster of Orthologous Groups-triangles) y OrthoMCL (Markov Clustering of orthologs) implementados en GET_HOMOLOGUES (Vinuesa y Contreras-Moreira, 2015). Así mismo, fue ejecutada la búsqueda de dominios en PFAM para las últimas corridas. Un pangenoma consenso se calculó de forma similar a partir de los algoritmos COG y OMCL únicamente. Los clusters consenso del pangenoma se introdujeron en el pipeline GET_PHYLOMARKERS para seleccionar los alineamientos con atributos filogenéticos óptimos (sin evidencia significativa de recombinación, produciendo topologías de árbol y longitudes de rama que no se desviaron significativamente de la distribución esperada de estos parámetros y mostrando valores de soporte de rama promedio > 0,6). Los alineamientos que pasaron estos filtros fueron concatenados, y se estimó una filogenia ML con IQ-TREE 1.6.1 utilizando el modelo de mejor ajuste y eligiendo la filogenia con la mayor puntuación de probabilidad de las encontradas entre las búsquedas independientes. Finalmente, la filogenia se enraizó utilizando los genomas de *Y. pestis*. Los árboles filogenéticos se visualizaron y editaron con el programa FigTree v1.4.3.

8.12 Ensayo de la actividad profenol-oxidasa (PPO)

La activación de la profenol oxidasa (PPO) fue llevada a cabo directamente en el hemocele del insecto de acuerdo con Kopáček (Kopáček *et al.*, 1995) and Altincicek (Altincicek *et al.*, 2007). Veinte larvas del último instar de *G.mellonella* fueron usadas en este ensayo por tratamiento, inyectando una cantidad de 1000 ng de proteína en PBS (GroELXn y GroELAf) por individuo. Se realizaron tomas de muestra de la hemolinfa a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos e inmediatamente depositada en un buffer de almacenamiento en una dilución 1:10 (100 mM Bis-Tris-HCl buffer, pH 6.5). Las larvas fueron previamente desinfectadas y se les realizó una incisión en el segundo par de patas traseras obteniendo de esta forma hemolinfa con la enzima activa. La concentración de proteínas se determinó con el método de Bradford utilizando una curva de albúmina de suero bovino como estándar. La mezcla de reacción se preparó mezclando el sustrato de 100 ul de 4 mg/ml de DOPA (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina, Sigma) con 100 ul de tampón Bis-Tris-HCl 100 mM, pH 6,5, y 50 ul de muestra de enzima(30 ug). Fue utilizado como control negativo mezcla de reacción del tiempo cero agregando inmediatamente 20 ul de N-feniltiourea al 0.5M como un inhibidor de la enzima PPO. La mezcla final se monitorizó continuamente durante un periodo de 1 hora cada 15 minutos a una longitud de onda de 515 nm utilizando un espectrofotómetro de barrido (Shimadzu modelo UV-2550, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, USA) a 25 C.

8.13 Tripsinización de proteínas GroEL

Para ensayar el efecto de fragmentos con posible actividad enzimática insecticida, recurrimos a la proteólisis de las proteínas GroEL con tripsina. Las proteínas fueron solubilizadas en Buffer de fosfatos (PBS 1X) ajustando la concentración de las proteínas a 1 mg/ml. Posteriormente, fueron tomados 50 ug de cada proteína y les fue agregado 5 ul de tripsina (2 mg/ml). La mezcla fue incubada por 30 min a una temperatura de 37 °C. Una vez pasado este tiempo, les fue agregado 5 ul PMSF (150 ug/ml). Cada una de las muestras fue transferida a un gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% y teñidos con Comassie Blue para visualizar la degradación de las diferentes proteínas. Una vez hecha la confirmación de la degradación proteolítica, fueron tomados 1000 ng de las diferentes proteínas GroEL tratadas y sin tratar e inyectadas en individuos de *G. mellonella*, utilizando 15 individuos por tratamiento en tres ensayos independientes.

8.14 Análisis estadístico

Los análisis de supervivencia, que generalmente son un conjunto de métodos para analizar datos en los que la variable de resultado es el tiempo hasta la aparición de un evento de interés (mortalidad). Los datos de los experimentos (n= 60) se representaron mediante el estimador de Kaplan-Meier, un estadístico no paramétrico, y se realizó una prueba de log-rank para detectar diferencias significativas entre los tratamientos. Para aislar uno o más grupos y encontrar diferencias entre éstos, se llevó a cabo un procedimiento de comparación múltiple mediante el método de Holm-Sidak. En ambos casos, la probabilidad de rechazo fue de $p > 0.005$.

Los datos de mortalidad se transformaron por la función arcoseno antes de someterse a su análisis estadístico, en un diseño completamente al azar, por medio de un modelo simple, utilizando un procedimiento lineal general. La comparación de medias se efectuó mediante la prueba Tukey, a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

En el caso de las regresiones lineales semilogarítmicas, se realizó un ANCOVA para detectar diferencias significativas entre las dos rectas, con una probabilidad de rechazo de $p > 0,05$.

Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism versión 8.4.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9. 1 Evaluación de la actividad insecticida de las diferentes cepas provenientes de nemátodos entomopatógenos y sus extractos proteicos.

Como parte de una evaluación sistemática, procedimos en primer lugar a evaluar el potencial insecticida de las células bacterianas completas de las diferentes cepas utilizadas en este estudio y que se aislaron de larvas muertas y de nemátodos entomopatógenos directamente. Para esto utilizamos diferentes cantidades 100, 200, 500 y 1000 células/larva. Como se muestra en la **Figura 8**, las cepas identificadas como *X. nematophila* SC 0516, *P. luminescens* HIM3 y *P. aeruginosa* NA04 resultaron ser patógenas y altamente virulentas difiriendo significativamente $F (DFn= 3 DFd= 40) = 11.16$ $p < 0.0001$ de *A. faecalis* y *E. coli* DH5 α en todas las concentraciones utilizadas cuando éstas fueron inyectadas en *G. mellonella*. El análisis también demostró que *X. nematophila* SC 0516 y *P. luminescens* HIM3 mostraron diferencias significativas con respecto a la mortalidad cuando fueron comparadas con *P. aeruginosa* NA04 en las concentraciones de 100 y 200 células por larva principalmente. Otro hecho a destacar fueron las diferencias observadas en el fenotipo una vez concluidas las 48 horas del tratamiento, las larvas tratadas con *P. luminescens* HIM3 mostraron una coloración rojiza oscuras de consistencia sólida y sin olor, mientras aquellas tratadas con *P. aeruginosa* NA04 mostraron una consistencia sumamente flácidas, ligeramente oscuras y con olor pestilente. Las larvas tratadas con *X. nematophila* SC 0516 mostraron una coloración oscuro intenso de consistencia flácida, pero sin olor.

Aunque existen reportes sobre la evaluación de la actividad insecticida de las bacterias canónicas provenientes de nemátodos entomopatógenos *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* en diferentes modelos de insectos, la información con respecto a otros simbioses (*Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Pseudochrobactrum*, *Ochrobactrum*, *Brevundimonas*, *Deftia*, etc.) es muy escasa y hasta el momento existen pocos estudios que avalen la contribución de su patogenicidad con el nemátodo (Ogier *et al.*, 2020). Esto correlaciona con el estudio anterior ya que las cepas *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Pseudochrobactrum*, *Ochrobactrum* no mostraron mortalidad alguna incluso a concentraciones de 10^5 – 10^6 CFU/mL. En contraste, las diferentes *Pseudomonas* aisladas en el estudio (*Pseudomonas protegens* PpSc_PP-SC-10, *Pseudomonas protegens* PpSg_SG6 Apo, *Pseudomonas chlororaphis* PcSg_SK39 ApoA, *Pseudomonas protegens* PpSw_SW4, *Pseudomonas protegens* PpSw_TCH07 2-2,

Pseudomonas protegens CHAOT, *Pseudomonas chlororaphis* CFBP 2132T) resultaron ser altamente virulentas a concentraciones de 10^2 – 10^3 CFU/ml (Ogier *et al.*, 2020).

Para el caso de las bacterias canónicas Mahar *et al.*, 2005 demostraron que para alcanzar el 100 % de mortalidad con células de *Xenorhabdus* fueron necesarias 4×10^6 células/ml. Para el caso de *Photorhabdus* en estudios más recientes Salazar-Gutiérrez *et al.*, 2017 demostraron que la cantidad de células por larva para alcanzar el 100% de mortalidad en una población de *G.mellonella* a las 48 hrs con *Photorhabdus luminescens* SL0708 fue de 1×10^3 - 10^4 CFU/ml. Nuestras cepas mostraron una mayor virulencia en comparación con los reportes que se tienen sobre estas bacterias.

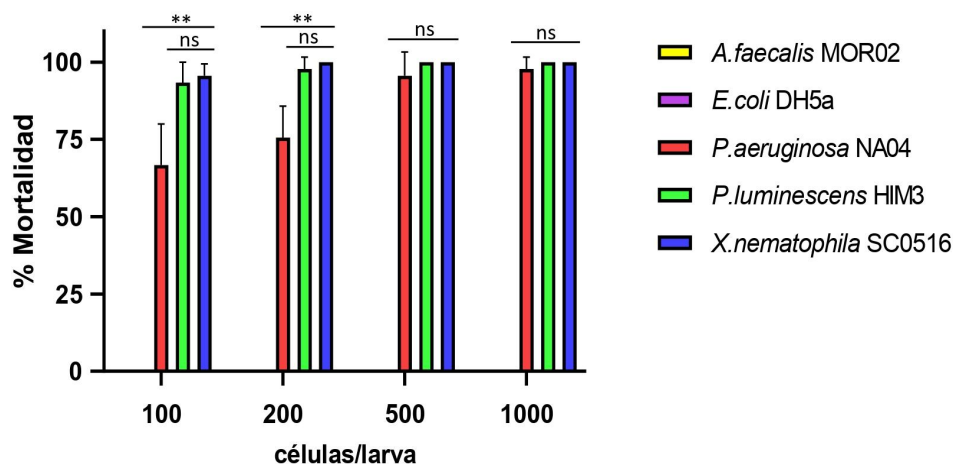


Figura 8. Evaluación de la patogenicidad de las diferentes cepas bacterianas a las 48 horas post inyección. Individuos de *G.mellonella* fueron inyectados con las concentraciones correspondientes las cuales son indicadas en el eje de las equis en un volumen total de 10 μ l. Se utilizaron 15 individuos por tratamiento con 3 repeticiones cada uno. Las barras representan el promedio \pm DS. Los asteriscos (**) arriba indican diferencias de acuerdo con la prueba de ANOVA y aquellas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.0001$). ns indica que no hubo diferencias significativas.

También se evaluó la actividad tóxica del extracto proteico del sobrenadante proveniente de las cepas arriba mencionadas, los cuales fueron evaluados en las concentraciones de 100, 200, 500 y 1000 ng de proteína/larva. Igualmente, los extractos proteicos de las cepas *X.nematophila* SC 0516, *P.luminescens* HIM3 y *P.aeruginosa* NA04 que anteriormente mostraron la actividad más

acentuada $F(DFn=3 DFd=40)= 28.96$ $p<0.0001$ con células completas, también fueron las que exhibieron la mayor actividad tóxica mediante un fenómeno dependiente de la concentración como se muestra en la **Figura 9**.

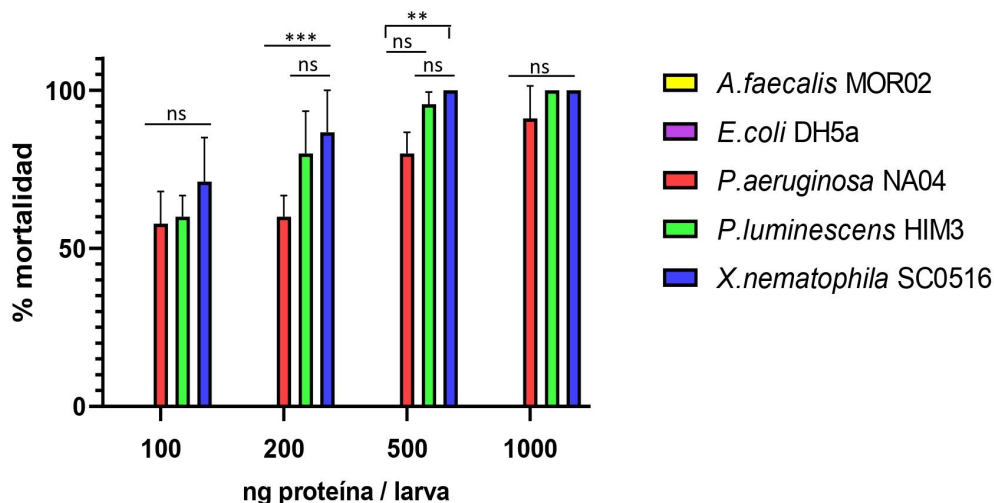


Figura 9. Evaluación de la toxicidad del extracto proteico del sobrenadante de las diferentes cepas a las 48 post inyección. Individuos de *G. mellonella* fueron inyectados con las concentraciones correspondientes las cuales son indicadas en el eje de las equis en un volumen total de 10 μ l. Se utilizaron 15 individuos por tratamiento con 3 repeticiones cada uno. Las barras representan el promedio \pm DS. Los asteriscos (*) arriba indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.0001$). ns indica que no hubo diferencias significativas.

No se observaron diferencias significativas entre los diferentes extractos con respecto a la mortalidad a las concentraciones de 100 y 1000 ng de proteína/larva. Sin embargo, en la concentración de 200 ng/larva los extractos provenientes de *X. nematophila* SC 0516 y *P. luminescens* HIM3 fueron diferentes estadísticamente al de *P. aeruginosa* NA04. A la concentración de 500 ng/larva también hubo diferencias estadísticas significativas entre el extracto de *X. nematophila* SC 0516 y *P. aeruginosa* NA04.

Los datos empatan perfectamente con lo reportado para el género *Xenorhabdus* ya que la actividad ha sido encontrada también en el sobrenadante como fue reportado por Khandelwal *et al.*, 2004 quienes detectaron la presencia de vesículas provenientes de la membrana externa (OMV's por sus siglas en inglés) en el extracto, que contenían proteínas que fueron oralmente

tóxicas para larvas neonatas de *Helicoverpa armigera*. También Salazar-Gutierrez *et al.*, 2017 evaluaron la actividad del extracto extracelular de *Photorhabdus luminescens* SL0708 en el cual a la concentración de 350 ng/larva de proteína proveniente de un extracto extracelular alcanzaron una mortalidad del 100% a las 48 y 72 horas de tratamiento en larvas de *G.mellonella*, mientras que a la misma concentración obtuvieron un mortalidad de 65% y 94 % a las 48 y 72 horas en larvas de *Spodoptera frugiperda*. Las diferencias en la mortalidad entre nuestras cepas y las aquí reportadas del mismo género y con el mismo modelo de insecto en este caso *G.mellonella*, podrían explicarse a través de la ausencia o presencia de diferentes genes que codifican para factores de virulencia o toxinas dentro del genoma de cada cepa. La diferencia entre distintos insectos se debe principalmente a la diferente respuesta celular y humoral, compuesta por la producción de hemocitos con capacidad de fagocitosis y la producción de péptidos antimicrobianos destinados a actuar sobre la superficie de la pared celular de los microorganismos invasores, ambas inducidas por los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés) (Ffrench-Constant *et al.*, 2010, Nation, 2008).

Por otra parte, evaluamos también el contenido intracelular de cada cepa utilizando las mismas concentraciones antes mencionadas de 100, 200, 500 y 1000 ng/larva. Los datos obtenidos mostraron un comportamiento muy similar con el extracto del sobrenadante. No se obtuvieron diferencias significativas $F(DFn: 3 \text{ DFd: } 40) = 22.18 \text{ } p < 0.0001$ entre los tres extractos en las concentraciones de 500 y 1000 ng/larva obteniendo mortalidades de entre el 80% al 100% a las 48 horas con los extractos intracelulares de las cepas *P. aeruginosa* NA04, *P. luminescens* HIM3 y *X. nematophila* SC 0516 respectivamente, como se muestra en la **Figura 10**. Por otro lado, en la concentración de 200 ng/larva se observaron diferencias únicamente entre el extracto de *P.aeruginosa* NA04 cuando fue comparado con el de *P. luminescens* HIM3 y *X. nematophila* SC 0516. En el tratamiento de 100 ng/larva hubo diferencias sólo en entre los extractos de *P.aeruginosa* NA04 y *X. nematophila* SC 0516.

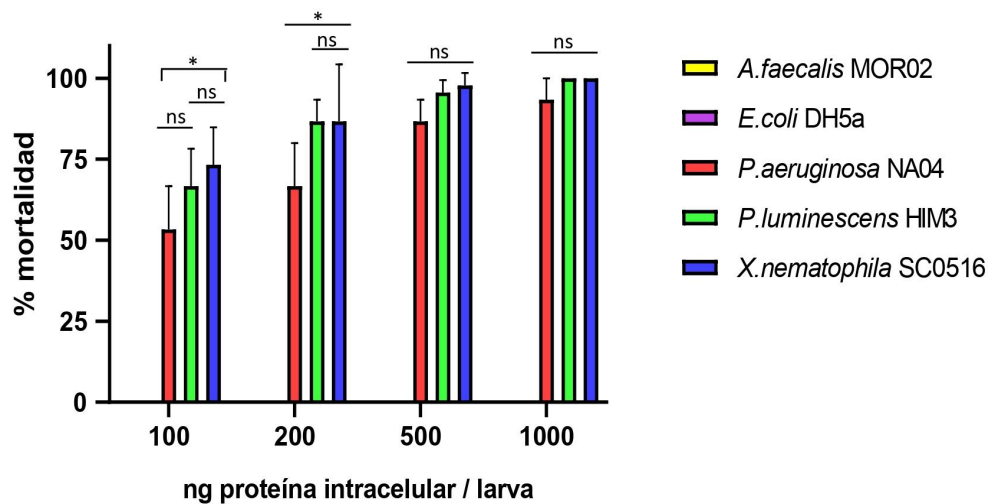


Figura 10. Evaluación de la toxicidad del extracto proteico intracelular de las diferentes cepas a las 48 horas post inyección. Individuos de *G. mellonella* fueron inyectados con las concentraciones correspondientes las cuales son indicadas en el eje de las equis en un volumen total de 10 μ l... Las barras representan el promedio \pm DS. Los asteriscos (*) arriba indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.0001$). ns indica que no hubo diferencias significativas.

En el mismo estudio de Salazar-Gutierrez *et al.*, 2017 evaluaron la actividad del extracto intracelular de *P. luminescens* SL0708 en el cual se muestra una mortalidad cuando éstos fueron inyectados de entre el 50% y el 60% a las 48 horas en *G. mellonella* y una mortalidad extremadamente baja menor al 15% en *S. frugiperda* a las 72 horas.

9.2 Expresión y purificación de las diferentes proteínas GroEL

Para evaluar la contribución a la toxicidad de las proteínas GroEL y descartar cualquier aportación a la actividad de alguna otra toxina, metabolito o factor de virulencia, recurrimos a la clonación y expresión de la proteína en un sistema heterólogo. Las proteínas recombinantes fueron expresadas en *E. coli* BL21, estas fueron obtenidas a partir de la construcción del vector pET28 con el gen GroEL proveniente de cada cepa aislada y posteriormente purificadas a partir del lisado celular que fue pasado a través de una columna de afinidad de ácido nitriloacético-níquel. El rendimiento de cada proteína GroEL se obtuvo a partir de un cultivo total de 500 ml que se dejó induciendo durante 12 horas con IPTG 1 mM. Aunque el rendimiento fue mayor al de la tabla en la **Figura 11**, se

seleccionó la fracción con mucha mayor pureza de la proteína para poder llevar a cabo los bioensayos en *G. mellonella*.

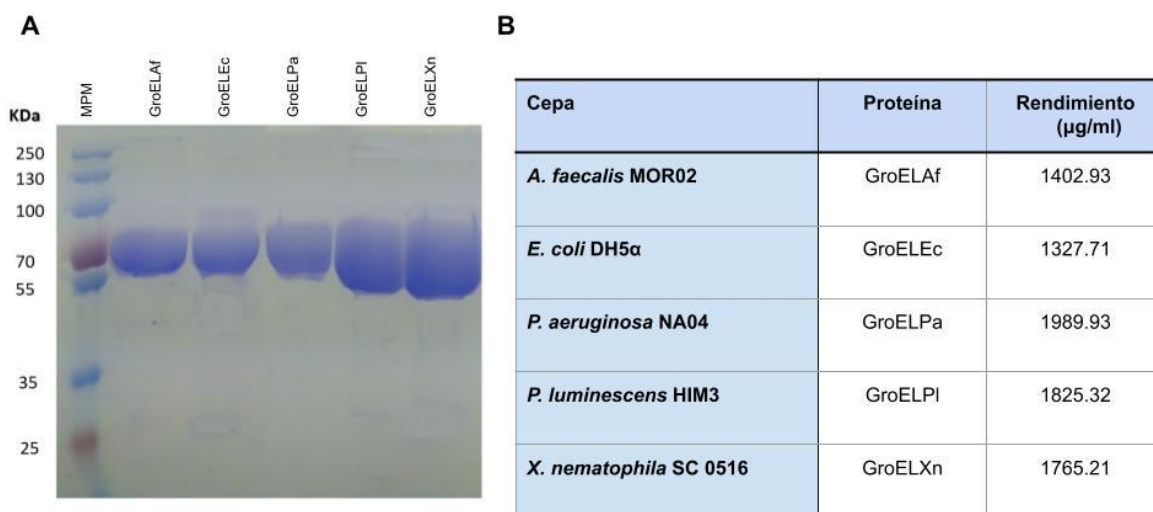


Figura 11. Purificación y rendimiento de las proteínas GroEL recombinantes. (A) SDS-PAGE 12 % teñido con azul de Coomassie MPM: marcadores de peso molecular, GroELAf: GroEL de *Alcaligenes faecalis*, GroELEc: GroEL de *E.coli* DH5a, GroELPa: GroEL de *Pseudomonas aeruginosa* NA04, GroELPI: GroEL de *Photorhabdus luminescens* HIM3, GroELXn: GroEL de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516. **(B)** Rendimiento obtenido de las diferentes proteínas GroEL después de la purificación por la columna de Ni-TFA.

Como se puede observar en la **Figura 11A**, se logró obtener una pureza de las proteínas mayor al 90%, así mismo la variación en los rendimientos para cada una de las proteínas fue mínimo, teniendo un máximo de 2000 µg para la GroEL proveniente de *Pseudomonas aeruginosa* NA04 (PS), mientras que la concentración más baja fue para la proteína GroEL proveniente de *E.coli* DH5a (EC) con 1327 µg/ml (**Figura 11B**). De acuerdo con lo reportado para la expresión y rendimiento de estas proteínas, nuestros resultados obtenidos son considerados buenos en términos generales.

9.3 Evaluación de la actividad insecticida de las proteínas GroEL

Para evaluar la actividad insecticida de las proteínas GroEL, éstas fueron inyectadas igualmente en el organismo modelo de *G. mellonella* del sexto instar, en concentraciones crecientes utilizando 100, 200, 500, 1000, y 2000 ng de proteína por individuo en un volumen final de 10 µl.

Este método de entrega directa de la proteína en el hemocele del insecto a través de una inyección, mimetiza la expresión de las toxinas de forma natural por parte de la bacteria una vez

dentro del insecto blanco. Como se puede observar en la **Figura 12** todas las proteínas mostraron una actividad que fue considerada como basal de alrededor del 30% para los casos de las proteínas GroEL provenientes de *A. faecalis* MOR02 (GroELAf), *P. luminescens* HIM3 (GroELPI) y *P. aeruginosa* NA04 (GroELPa) a las 48 horas de tratamiento. Notablemente la GroEL proveniente de *E. coli* DH5a utilizada como control negativo muestra un ligero incremento en la actividad, desplegando un efecto dependiente de la concentración, mostrando un porcentaje de mortalidad del 46% en las concentraciones de 1000 y 2000 ng a las 48 horas. La proteína que mostró la mayor actividad tóxica fue la proveniente de *X. nematophila* SC 0516 (GroELXn), exhibiendo porcentajes de mortalidad de 58%, 69%, 79% y 100% a las concentraciones de 100, 200, 500, 1000 ng respectivamente. Esta proteína muestra un efecto dosis dependiente desde las 24 hasta las 48 horas, en contraste con sus ortólogos que no parecen ejercer el mismo efecto. El análisis de las curvas mediante una prueba de ANCOVA mostró diferencias altamente significativas ($F=8.932$, $Dfn=4$, $DFd=65$; $p<0.0001$) entre la curva de GroELXn cuando fue comparada en contra de todas las demás. La segunda curva con mayor significancia estadística fue la de GroELEc. La DL50 para GroELXn fue de 102.34 ng/larva, mientras que para la proteína GroELEc fue de 895.51 ng/larva. Las DL50 de las otras proteínas no pudieron ser determinadas. Además, un fenómeno bastante evidente fue un cambio en el fenotipo de las larvas cuando se inyectaron con dosis crecientes en la concentración de la proteína GroELXn, desencadenando un ennegrecimiento generalizado en el cuerpo de la larva después de 15 minutos postinyección.

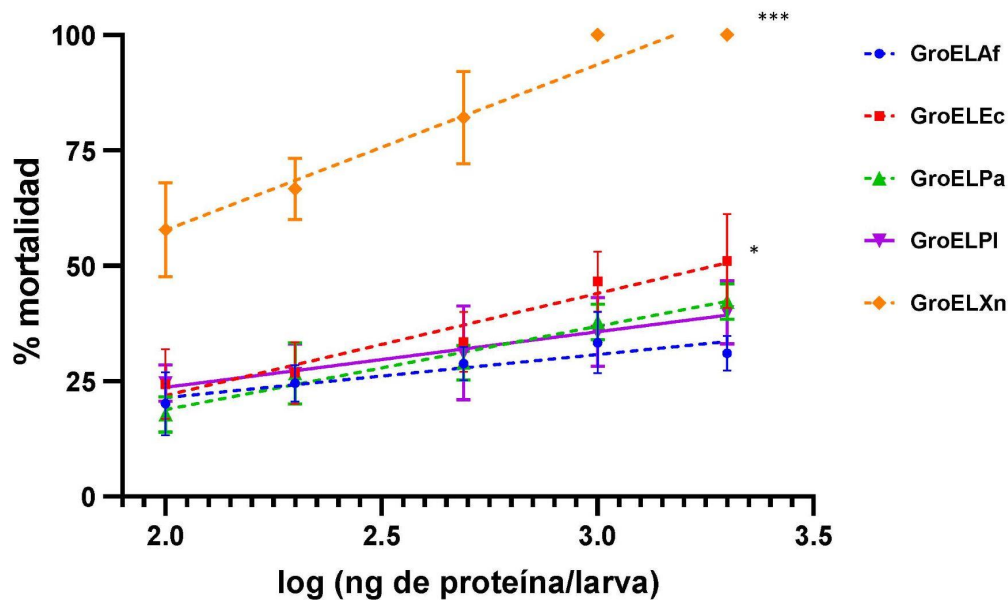


Figura 12. Evaluación de la actividad insecticida de las proteínas GroEL a las 48 horas post inyección. Individuos de *G. mellonella* fueron inyectados con las concentraciones correspondientes las cuales son indicadas en el eje de las equis en un volumen total de 10 μ l. Cada punto en la gráfica representa el promedio de tres experimentos individuales \pm DS. Los asteriscos en la parte superior indican el grado de significancia estadística $p < 0.001$ (***) alta, (*) baja, de acuerdo con el análisis de ANCOVA.

La actividad basal tóxica observada por parte de las proteínas evaluadas, podría entenderse debido a las características altamente inmunogénicas de la chaperonina GroEL, la cual ha sido evidenciada en diversos estudios. Las proteínas GroEL son exclusivamente intracelulares y son únicamente expulsadas al medio extracelular cuando existe un daño mecánico o un proceso necrótico en las células, por lo que la expulsión al medio es reconocido por parte de los hospederos como patrones moleculares asociados a daño o a patógenos, activando fuertemente el sistema inmune innato de los organismos. Sin embargo, existen numerosas pruebas de la presencia de GroEL en la superficie celular de bacterias patógenas, donde se ha demostrado su papel y las importantes consecuencias inmunológicas. Éstas se producen de forma constitutiva y aumentan notablemente durante la infección del huésped, sin embargo, el proceso de translocación de la Hsp60 a la superficie del patógeno no está claro, especialmente porque la proteína no lleva ningún péptido señal clásico. Las proteínas GroEL también desempeñan un papel importante en la formación de biopelículas (Multhoff y Hightower, 1996; Zügel y Kaufmann, 1999).

Yang *et al.*, 2012 reportaron la actividad de una GroEL proveniente de *X. budapestensis* la cual fue administrada mediante inyección también en larvas de *G.mellonella*. El efecto de esta proteína también muestra un efecto dosis dependiente alcanzando una DL50 de 206.81 ng/larva a las 48 horas. Así mismo, Shi *et al.*, 2012 también reportaron la actividad tóxica de otra proteína GroEL proveniente de *Xenorhabdus ehlersii*, sin embargo la DL50 para ésta última fue de 760 ng/ larva. Como podemos observar nuestra proteína GroELXn muestra una DL₅₀ más baja en comparación con sus ortólogos, lo que se traduce en un porcentaje de letalidad mayor en un periodo de tiempo similar cuando es administrada vía inyección en insectos.

9.4 Toxicidad de las proteínas GroEL por vía oral sobre *S. frugiperda*

La actividad insecticida también fue evaluada en dieta artificial sobre larvas neonatas de 1 día de nacidas de *Spodoptera frugiperda*, una plaga de importancia agrícola que ataca cultivos de importancia económica como son maíz y algodón. Esto se hizo con el fin de determinar si la acción tóxica de las proteínas se restringe únicamente a la inyección directa dentro del hemocele del insecto, o si al ser ingeridas presentan el mismo efecto tóxico. Para evaluar esto, se realizó un análisis de supervivencia de las larvas neonatas exponiéndose a tres diferentes concentraciones de proteína 10, 20 y 50 µg de proteína/g de dieta, evaluando la mortalidad cada 24 horas durante 6 días.

Dada la baja mortalidad y un efecto poco claro en las concentraciones de 10 y 20 µg de proteína/g de dieta, únicamente se muestra la gráfica de 50µg/g de dieta. Como podemos observar en todas las proteínas observamos un efecto acumulativo de las cero hasta las 72 horas, sin embargo, es a las 120 horas cuando se observa el mayor porcentaje de mortalidad dentro de las poblaciones tratadas, siendo la proteína GroELXn la que mayor mortalidad causa en la población de larvas. Para el caso de la concentración de 50 µg/g de dieta los porcentajes de supervivencia fueron diferentes estadísticamente entre cada tratamiento (log-rank test, $X^2=572.652$, $df=6$, $p<0.001$) con una disminución en la población del 9% para GroELAf, 35% GroELPI, 38% GroELEc, 47% GroELPa y 100% para GroELXn a las 144 horas de exposición **Figura 13**.

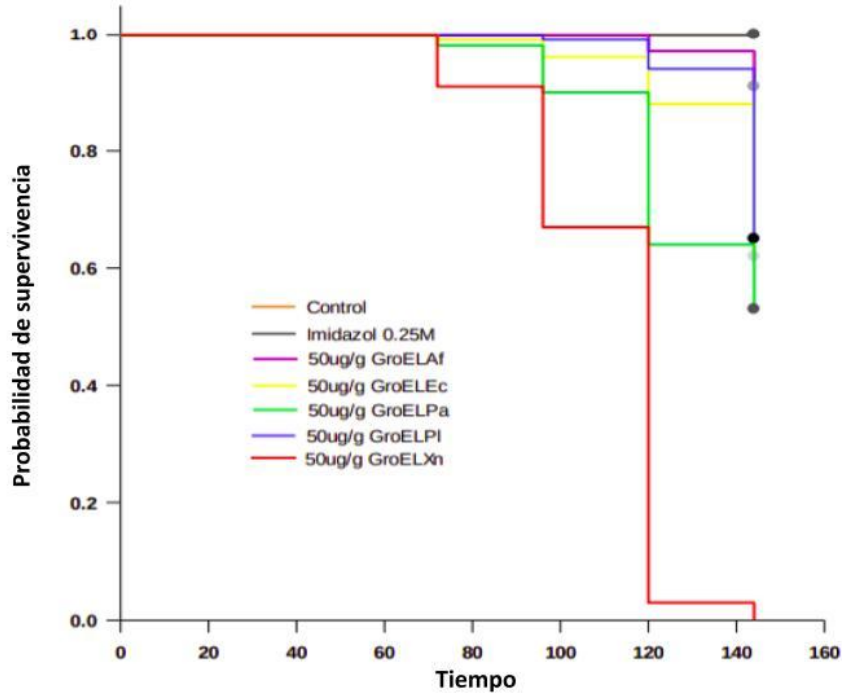


Figura 13. Análisis de la supervivencia de *Spodoptera frugiperda* expuestas a diferentes concentraciones de GroEL en dieta artificial. Los experimentos se realizaron 3 veces en ensayos independientes y la supervivencia se evaluó cada 24 horas durante 6 días. Las diferencias en la supervivencia fueron calculadas utilizando la prueba de log-Rank $X^2=572.652$, $df=6$, $p<0.001$.

Estos datos ponen nuevamente de manifiesto una diferencia en la actividad tóxica entre las diferentes proteínas GroEL, siendo nuevamente la GroELXn la proteína con mayor actividad y GroELAf con la menor. La DL_{50} para GroELXn fue de $17.56 \mu\text{g/g}$ de dieta, para el caso de las cuatro proteínas restantes no fue posible determinar la DL_{50} debido a la baja mortalidad que se presentó.

Joshi *et al.*, 2008 reportaron la actividad de un homólogo proveniente de *Xenorhabdus nematophila* el cual fue tóxico oralmente sobre larvas neonatas de *Helicoverpa armigera*, la DL_{50} para la proteína fue de $3.6 \mu\text{g/g}$ de dieta. La diferencia marcada entre valores de dosis letal podría deberse a la especificidad e interacción de la proteína con el blanco molecular entre los diferentes insectos, a pesar de que ambos organismos son Lepidópteros existe información de la variación en cuanto a la letalidad en otras proteínas insecticidas dependiente del insecto sobre el que se haga la evaluación debido a la expresión diferencial de genes involucrados en el mecanismo molecular de las toxinas.

Así mismo y siguiendo en línea con respecto a la evidencia de la actividad tóxica de la proteína GroEL por vía oral, existe un reporte sobre la generación de líneas transgénicas en plantas de tabaco y tomate donde la proteína proveniente de *Xenorhabdus nematophila* mostró toxicidad cuando las plantas fueron retadas en contra de *H. armigera*, afectando el crecimiento y el desarrollo de las larvas (Kumari *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2015)

9.5 Evaluación de la actividad chaperonina de las diferentes GroEL

Además de la actividad insecticida, se llevó a cabo la evaluación de la actividad chaperonina de las diferentes proteínas GroEL. Con el fin de establecer si GroEL_{Xn} ha conservado ambas funciones a lo largo de su historia evolutiva o se ha especializado en una u otra función, en este caso de toxina, relegando su función como chaperonina. Como se ha mencionado a principios del texto, la actividad chaperonina consiste en tener la capacidad de poder ayudar a alcanzar el plegamiento correcto de proteínas sintetizadas *de novo* dentro de la célula o aquellas que han sufrido daños estructurales como consecuencia de algún tipo de estrés.

Para medir la actividad como chaperonina, utilizamos el ensayo de replegamiento de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) de origen bacteriano proveniente de *Lactobacillus leichmanni*, la cual fue desnaturalizada térmicamente, por lo que la enzima no es capaz de llevar a cabo la función catalítica de conversión del piruvato en lactato, una reacción de oxidorreducción que es dependiente del cofactor NADH como agente reductor. Como podemos ver en la **Figura 14**, no se observa diferencia alguna significativa en cuanto a la actividad chaperonina. Todas las chaperoninas evaluadas fueron capaces de restablecer en un 100% la actividad de la LDH, comenzando a los 10 minutos un incremento en el replegamiento correcto de la enzima, llevándolo a cabo completamente a los 40 minutos de haber iniciado la reacción de replegamiento, indicándonos que todas ellas son capaces de plegar la enzima LDH desnaturalizada a su estado nativo y funcional en tiempos casi idénticos. Esto lo sabemos a través de la disminución en la absorbancia a 340 nm, ya que el compuesto NADH es capaz de absorber esta longitud de onda, por lo que una disminución indica que está siendo utilizado en la reacción enzimática por parte de la enzima. Como podemos observar en el control donde se encuentra únicamente la enzima LDH desnaturalizada, el compuesto se mantiene estable a lo largo del periodo de medición, por lo que descartamos un proceso de degradación del compuesto o la utilización de éste por parte de la enzima, un comportamiento idéntico se observa en el tratamiento donde solo se encuentra la enzima LDH en presencia de GroEL sin los cofactores esenciales (ATP y Mg²⁺) para llevar a cabo la función chaperonina. Nuestros resultados de toxicidad nos arrojan que GroEL_{Xn} posee un grado de

especialización mucho mayor en comparación con todos los demás ortólogos en la actividad insecticida, al no haber diferencias en cuanto a la actividad chaperonina nos permite sugerir de que esta proteína podría ser considerada como una proteína moonlighting, ya que conserva ambas funciones en una sola cadena proteínica.

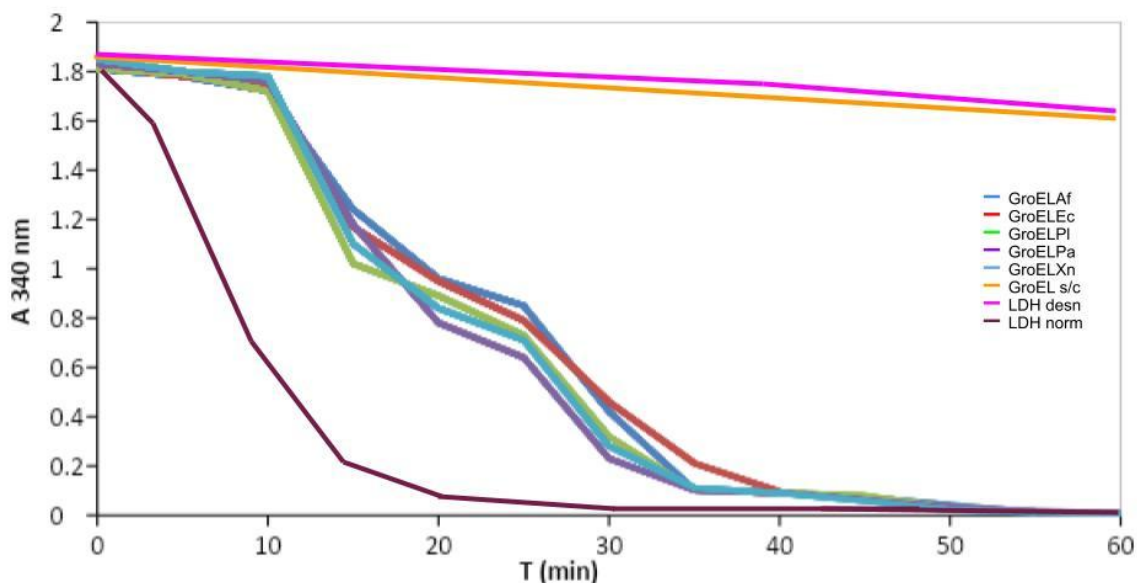


Figura 14.- Evaluación de la actividad chaperonina de las proteínas GroEL. Cada uno de los tratamientos se realizó en un volumen total de 250 ul por triplicado y la actividad enzimática fue medida indirectamente por una disminución en la absorbancia a 340 nm que indican la utilización del cofactor NADH en la reacción de reducción del piruvato a lactato por la enzima LDH.

9.6 Evaluación de la actividad insecticida de las proteínas GroEL tripsinizadas.

Una de las características de las proteínas moonlighting es la llevar a cabo una doble función manteniendo siempre su estructura intacta, es decir no se consideran proteínas moonlighting aquellas proteínas que sufren proteólisis y algunos de los fragmentos resultantes dan lugar a una nueva actividad. Para probar esta hipótesis con las proteínas GroEL las sometimos a un proceso de degradación proteolítica con la enzima tripsina. El análisis bioinformático con el predictor de cortes Peptidecutter nos arrojó un total de 60 sitios en todas las proteínas. Para corroborar la degradación parcial de las proteínas se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 12% como se observa en la **Figura 15**.

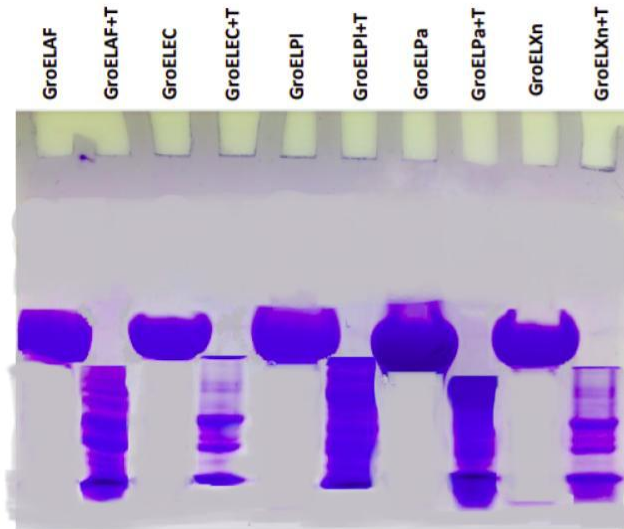


Figura 15. Comparativa de proteínas GroEL intactas contra proteínas tratadas con tripsina. Después de dos horas de tratamiento con tripsina las proteínas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 12%, cargando en cada pozo 30 μ g de proteína en todos los casos las letras arriba señalan las diferentes proteínas por cepa GroELAF: *Alcaligenes faecalis* MOR02, AF+T: *A. faecalis* con tripsina, GroELEC: *E. coli* DH5a, EC+T: *E. coli* con tripsina, GroELPI: *P. luminescens* HIM3, PL+T: *P. luminescens* con tripsina, GroELPa: *P. aeruginosa* NA04, PA+T: *P. aeruginosa* con tripsina, GroELXn: *X. nematophila* SC 0516, XN+T: *X. nematophila* SC 0516 con tripsina.

Posteriormente, procedimos a la evaluación de ambas proteínas las tratadas con tripsina y aquellas que no lo fueron, inyectándolas en *G. mellonella*. Para este experimento inyectamos 1000 ng/ larva sabiendo con anterioridad que a esta concentración alcanzamos 100% de mortalidad a las 48 horas. Como podemos observar en la **Figura 16**, todas las proteínas digeridas con la enzima tripsina perdieron completamente la capacidad de ejercer toxicidad en los insectos. Esto nos indica que las proteínas GroEL necesitan de su estructura completa para poder ejercer toxicidad sobre los insectos. Concluyendo a partir de estos experimentos que la proteína GroELXn podría entrar en la categoría moonlighting.

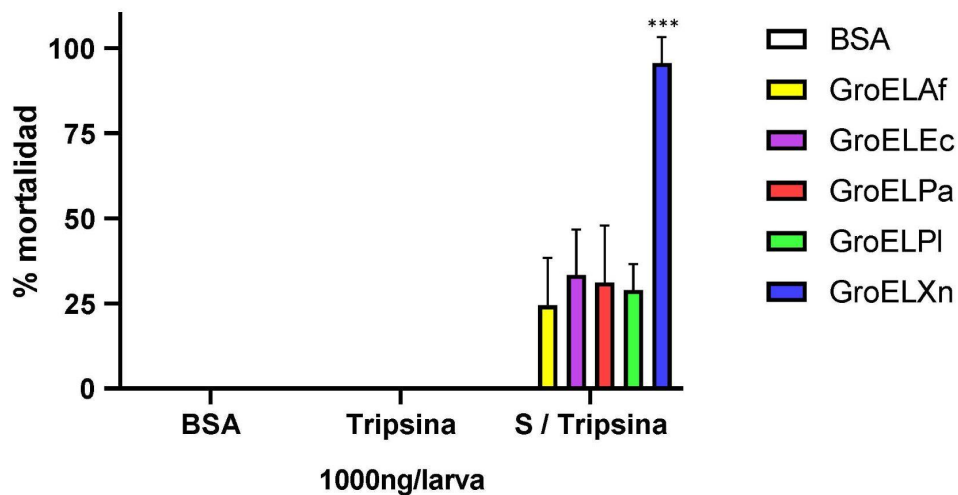


Figura 16. Evaluación de la actividad insecticida de los fragmentos proteolíticos provenientes de las proteínas GroEL tripsinizadas. En todos los tratamientos se utilizaron 1000 ng de proteína en un volumen de 10 μ l. Las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes \pm DS. Para examinar las diferencias en las medias fue aplicado un análisis de ANOVA de una vía $F(17.23, p < 0.05)$. Los asteriscos (***) arriba indican diferencias altamente significativas entre los grupos de acuerdo con la prueba de Tukey.

9.7 Evaluación *in vitro* de la activación del sistema profenol-oxidasa (PPO) por proteínas GroEL

Como parte de las observaciones en el cambio del fenotipo de las larvas de *G. mellonella* después de ser inyectadas con la proteína GroELXn, desencadenando un ennegrecimiento generalizado del cuerpo de larva, nos permitimos evaluar la hipótesis de que la proteína GroELXn podría estar activando vías que forman parte del sistema inmune innato en el insecto. Para esto evaluamos la actividad de la enzima profenol oxidasa, la cual forma parte del sistema inmune innato de la mayoría de invertebrados. La enzima profenoloxidasa (PPO) es un zimógeno de la enzima fenoloxidasa (PO), la cual es una enzima oxidoreductasa que convierte compuestos fenólicos para producir compuestos llamados quinonas a través de un proceso de oxidación, los cuales posteriormente polimerizan mediante una reacción no enzimática para producir pigmentos melanínicos los cuales suelen ser insolubles en medio acuoso. Estos compuestos así como algunos intermediarios, son tóxicos frente a microorganismos, así mismo estimulan y potencian los procesos de fagocitosis ya que funcionan como opsoninas (Cerenius y Söderhäll, 2004).

Para llevar a cabo el experimento, utilizamos la concentración correspondiente a 1000 ng por larva de la proteína GroELXn en comparación a la proteína GroELAf que fue la que mostró una menor actividad tóxica, ambas proteínas fueron utilizadas la misma concentración. Como podemos observar en la **Figura 17** la actividad profenoloxidasa se ve mayormente incrementada cuando es tratada con la proteína GroELXn, cuando se comparan las dos curvas de actividad enzimática observamos un incremento altamente significativo estadísticamente ($F=77.64$, $DFn=3$, $DFd=52$ $p<0.0001$) en la velocidad de la reacción traducidos como un incremento en la pendiente de cada recta, siendo para GroELXn un valor de 17.16 mientras que para GroELAf es de 7.084. Por lo tanto los resultados nos sugieren que el mecanismo mediante el cual GroELXn podría estar actuando cuando es inyectada en la hemocele de los insectos es mediante una sobreactivación del sistema profenoloxidasa.

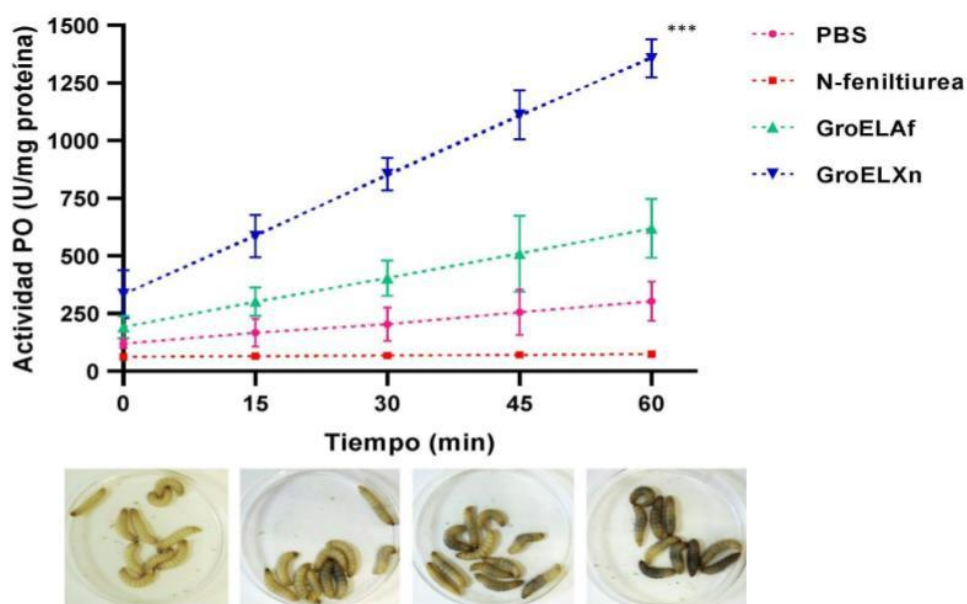


Figura 17. Análisis *in vitro* de la actividad profenoloxidasa con hemolinfa de *G. mellonella*. La actividad profenoloxidasa fue medida adicionando L-Dopa como sustrato de la enzima y la actividad fue monitoreada por absorbancia a 515 nm. Los puntos en el gráfico representan el promedio de 3 experimentos independientes \pm DS. Los asteriscos en la parte superior indican diferencias significativas $P>0.0001$ cuando los tratamientos fueron comparados de acuerdo con el análisis de ANCOVA.

En los invertebrados, la actividad de la PO se encuentra finamente regulada, por lo que produce compuestos tipo quinonas de manera limitada y en cantidades que no son letales para los insectos. Sin embargo, en presencia de GroELXn, el color del cuerpo de las larvas de *G. mellonella* apareció negro. Este fenómeno demostró que las larvas lanzan una intensa reacción inmunitaria (actividad PO), que en consecuencia produce cantidades inmoderadas de quinonas, que son tóxicas para las larvas, llevando esto a la muerte del insecto.

9.8 Alineamiento múltiple de secuencias GroEL

Para investigar los posibles cambios a nivel de secuencia (mutaciones) responsables de la disparidad de actividades entre las diferentes proteínas GroEL, realizamos un alineamiento múltiple con la secuencia primaria de cada proteína para observar el número de sustituciones y el grado de similitud entre éstas.

Las proteínas muestran un porcentaje de similitud con respecto a GroELXn que mostró la mayor actividad, del 72% para la proteína GroELAf, 89.6% para GroELEc, 79.6% para GroELPa y 93.6% para GroELPI. De acuerdo con este análisis la secuencia con mayor grado de divergencia fue GroELAf, mientras que la que muestra un menor grado y por ende una relación filogenética más estrecha es su ortólogo GroELPI.

El análisis también nos arrojó que las diferentes mutaciones entre proteínas no ocurren en una región en específico de la cadena polipeptídica, sino que se encuentran dispersas a lo largo de ésta (**Figura 18**). La proteína GroELXn posee 155 sustituciones puntuales diferentes en comparación con GroELAf de *A. faecalis* de las cuales, 88 de las 155 sustituciones se encuentran dentro del dominio ecuatorial, 47 en el apical y 20 en el intermedio. Para el caso particular de la proteína GroELPa que es la segunda proteína con mayor divergencia, existen un total de 111 diferencias, de las cuales 59 están sobre el dominio ecuatorial, 36 en el apical y 16 en el intermedio. La proteína GroELEc posee 57 diferencias puntuales, 33 en el dominio ecuatorial, 18 en el apical y 6 en el intermedio. La proteína con una relación evolutiva más estrecha, la proveniente de *P. luminescens* HIM3 (GroELPI) posee únicamente 35 sustituciones puntuales con respecto a GroELXn, y de las cuales 20 están sobre el dominio ecuatorial, 13 en el apical y 2 en el intermedio. Así mismo, la secuencia GroELXn presenta 15 sustituciones que son únicas y que probablemente podrían estar involucradas en el mayor despliegue de actividad insecticida mostrada por esta proteína en comparación con sus homólogos (**Figura 18**).

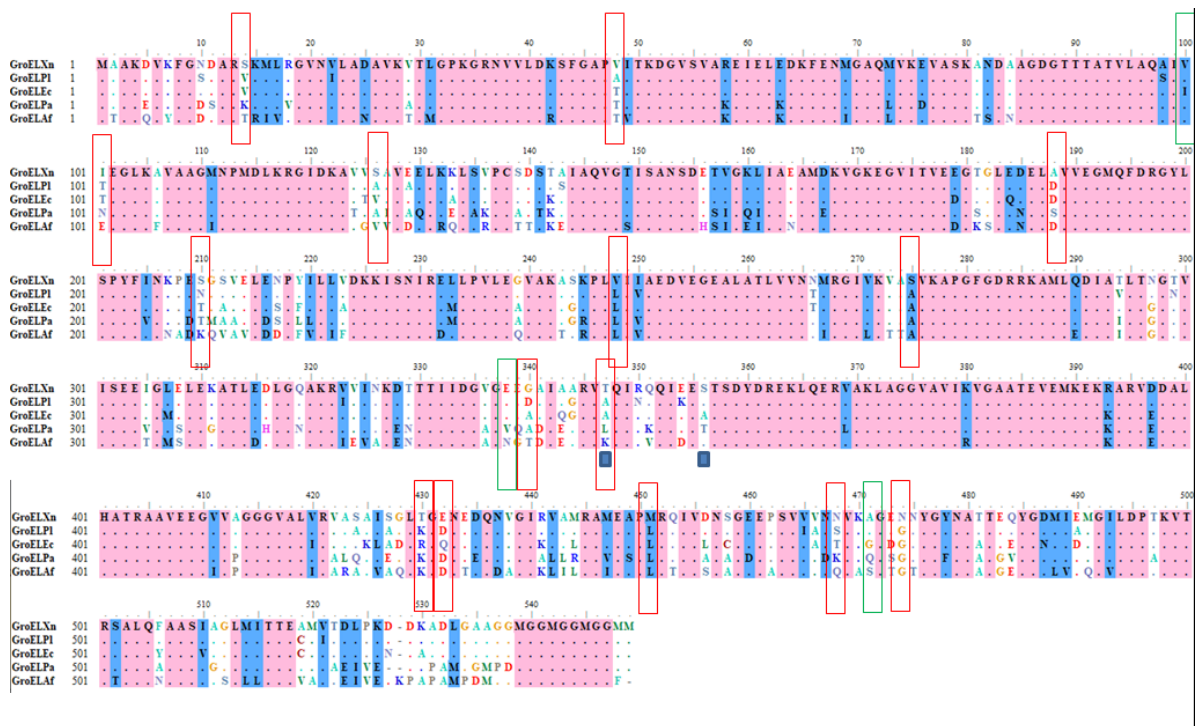


Figura 18. Alineamiento múltiple de secuencias y estructuras 3D de las proteínas GroEL. Se muestra la comparación de las distintas secuencias de aminoácidos de las proteínas GroEL. (Rosa): regiones idénticas entre las diferentes secuencias, (azul): regiones similares entre las diferentes secuencias, (blanco): regiones sin identidad ni similitud. Los recuadros en rojo muestran las 15 mutaciones puntuales únicas para la secuencia de la proteína GroELXn. Los recuadros en azul muestran la Thr347 y la Ser356. El alineamiento fue llevado a cabo con el programa BioEdit v.2.1 usando como aplicación accesoria ClustalW.

De acuerdo con lo reportado en la literatura sobre las proteínas GroEL tóxicas para insectos, Yoshida *et al.*, 2001 mencionan la importancia de 4 mutaciones puntuales imprescindibles para que el homólogo proteico proveniente de *Enterobacter aerogenes* pueda ejercer toxicidad sobre cucarachas del género *Blattella germanica*, éstas son Val100, Asn101, Asp338 y Ala471. El análisis nos muestra que la proteína GroELXn posee dos mutaciones de las cuatro indicadas Val100 y Ala471, por lo que su homólogo estructural y ésta podrían ejercer toxicidad en contra e insectos a través de mecanismos diferentes que no involucren los mismos aminoácidos claves las proteínas GroELEc, GroELPa y GroELPI también tuvieron (V100 y N101) de las cuatro reportadas para *Enterobacter*, sin embargo, la toxicidad que ejercieron fue poco significativa en comparación con GroELXn. En otro estudio Joshi *et al.*, 2008, reportaron la presencia de dos sustituciones clave para ejercer toxicidad en un homólogo proveniente de *X. nematophila*, Thr347 y Ser356. Estos dos residuos fueron los encargados de unirse a glicoproteínas del epitelio intestinal en larvas de neonatas de *H. armígera*, cuando estos fueron mutados por alaninas la toxicidad fue

reducida hasta en un 80%. Nuestro análisis indica que el residuo Thr347 sólo se encuentra presente en la secuencia de GroELXn, mientras que la posición S356 se encuentra en dos secuencias proteicas adicionales GroELAf y GroELPI, además de GroELXn.

10. CONCLUSIONES

- De las 5 proteínas evaluadas la que presentó una mayor toxicidad tanto inyectada como oralmente fue GroELXn proveniente de *Xenorhabdus*
- Todas las proteínas GroEL evaluadas poseen la capacidad de replegamiento de proteínas desnaturalizadas por estrés térmico.
- La actividad insecticida de las proteínas GroEL se encuentra estrechamente vinculada a la estructura completa e íntegra de las mismas, por lo que GroELXn podría ser considerada una proteína moonlighting
- GroELXn es capaz de activar fuertemente el sistema profenoloxidasa de manera significativa cuando es comparada con su homólogo GroELAf
- GroELXn posee 15 sustituciones aminoacídicas únicas a lo largo de la secuencia, y éstas podrían estar estrechamente vinculadas a su actividad insecticida.

11. DATOS ADICIONALES

Características genómicas y métricas de ensamblaje de la cepa SC 0516

Como parte de las observaciones y los resultados de mortalidad obtenidos por parte de la cepa bacteriana *X. nematophila* SC 0516, procedimos a una caracterización más profunda secuenciando el genoma de esta cepa. El genoma bacteriano de la cepa SC 0516 fue secuenciado y ensamblado *de novo*. El borrador del genoma de la cepa SC 0516 tuvo una longitud de 4.179.879 pb, con una cobertura del genoma de 142x y un contenido de G+C de aproximadamente el 43,5%. Se generaron un total de 103 contigs, con una longitud N50 de 73.255 pb y un valor L50 de 16 contigs. No se detectaron plásmidos en el análisis.

Para analizar funcionalmente el genoma de la cepa SC 0516, los contigs se sometieron a la anotación de subsistemas en el servidor RAST. Un total de 4174 genes codificadores de proteínas, incluidos 51 ARNt, 5 ARNr y 5 ARN no codificantes, fueron asignados a 336 subsistemas anotados, que pueden definirse como procesos biológicos que son componentes del metabolismo o complejos estructurales apoyados por un conjunto de papeles funcionales. Se predijo que la mayoría de estos genes estaban implicados en el metabolismo de aminoácidos y derivados (309 genes), proteínas (189 genes) y carbohidratos (150 genes).

Este proyecto de escopeta de genoma completo se ha depositado en el GenBank con el número de acceso JACDOS000000000.1. La versión descrita en este artículo es la primera versión.

Análisis del pangenoma y filogenético de *X. nematophila* SC 0516

Con los datos del genoma de la cepa SC 0516 y con información disponible sobre este género y su homólogo *Photorhabdus* en la base de datos del Genbank, procedimos a hacer un análisis pangenómico con el fin de hacer una búsqueda de genes únicos relacionados a patogenicidad y virulencia hacia insectos en nuestra cepa en comparación con 39 genomas de *Xenorhabdus* y 51 de *Photorhabdus*. Además, esto también nos permitió realizar una filogenia con el genoma central para identificar la posición taxonómica de la misma.

Un pangenoma está compuesto por un genoma central (core), que incluye todos los genes presentes y comunes en todas las cepas estudiadas, generalmente estos genes codifican funciones relacionadas con la biología básica y los fenotipos de la especie o del género. Un segundo componente es el "genoma accesorio o prescindible", que incluye genes presentes en algunas cepas estudiadas, pero no en todas (shell), así como genes únicos o específicos de cada cepa (cloud). El genoma prescindible suele estar asociado a funciones no esenciales, además de conferir ventajas evolutivas y de selección, como la adaptabilidad a nichos ecológicos, la capacidad de colonizar nuevos entornos o la resistencia a los antibióticos o algún otro xenobiótico (McInerney *et al.*, 2017; Tettellin *et al.*, 2008).

La matriz pangenómica consenso de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* en nuestro conjunto de datos fue de 23,603 grupos de genes (**Figura 19A**). Más de la mitad del conjunto completo de genes que constituyen el pangenoma 15,662 genes, que representan el 66%, se encontraron con presencia única (genoma cloud), lo que significa que cada cepa aportó un promedio de 172 genes nuevos al pangenoma. El genoma shell (presencia en genomas $\geq 50\%$) y soft core (genomas = 95%) consistieron en 6311 y 1630 grupos de genes, respectivamente (**Figura 19A**). El análisis mostró que el pangenoma tiene una forma abierta (**Figura 19B**). Esto ocurre cuando el número de nuevas familias de genes sigue aumentando en un linaje taxonómico en una tendencia no asintótica, independientemente de cuántos nuevos genomas se añadan al análisis. Tasas altas de ganancia de genes conseguidas a través de procesos de transferencia horizontal de genes (HGT) son características en estos linajes (Treangen y Rocha, 2011; Brockhurst *et al.*, 2019). El genoma central, caracterizado como el conjunto de genes presentes en todos los genomas analizados, fue de aproximadamente 348 genes presentes en los 91 genomas estudiados, representando el 1,4% del pangenoma (**Figura 19C**). El genoma central presentó una tendencia negativa o inversamente proporcional debido a que la incorporación de nuevos genomas disminuyó la probabilidad de compartir genes entre cepas (**Figura 19D**). Esto es coherente con los estudios que revelan una relación negativa general entre el tamaño del pangenoma y la proporción de genes centrales, donde los pangenomas "abiertos" más grandes tienen una menor proporción de genes centrales (Brockhurst *et al.*, 2019). En general, el pangenoma de *Xenorhabdus*-*Photorhabdus* mostró un alto nivel de variabilidad en el genoma, con sólo un 1% de su genoma constante. Así, un 66% restante del pangenoma está compuesto por un amplio repertorio de genes y funciones moleculares .

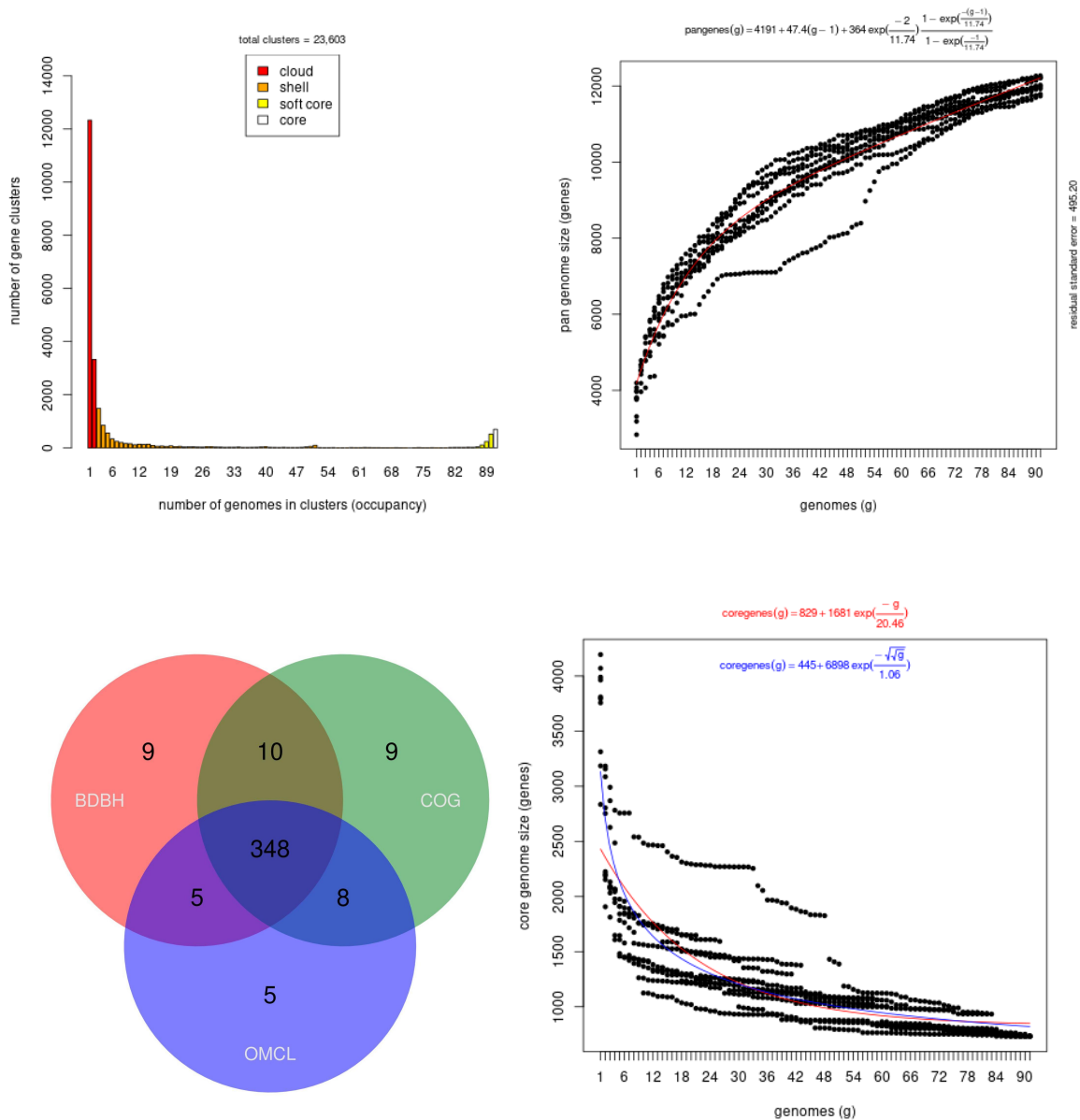


Figura 19. Análisis del pangenoma (A) Diagrama de barras de la frecuencia de los genes en los 91 genomas incluidos en el análisis. Los genes presentes en un solo genoma son específicos del linaje, mientras que en el extremo opuesto de la escala, los genes encontrados en los 91 genomas representan el genoma central. **(B)** Gráfico que muestra el tamaño estimado del pangenoma de *Xenorhabdus-Photorhabdus* ajustado con la función de Tettelin. **(C)** Diagrama de Venn del genoma central generado por los algoritmos bidireccional best-hit (BDBH), Cluster of Orthologous Groups (COG) y Markov Clustering of orthologs (OMCL). **(D)** Gráfico que muestra el tamaño estimado del genoma central de *Xenorhabdus-Photorhabdus*.

Hasta donde sabemos, este es el primer análisis pangenómico del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* en el que se examinaron los genomas centrales utilizando las estrategias BDBH, COG y OMCL. Con base en la base de datos Clusters of Orthologous Groups (COGs) del NCBI, muchos de los genes pertenecientes al genoma central están implicados en los procesos de generación y conversión de energía (29,35%), traducción, estructura y biogénesis de ribosomas (19,18%), transporte y metabolismo de aminoácidos (12,40%) y replicación, recombinación y reparación (11,61%), como se muestra en la **Figura 20**.

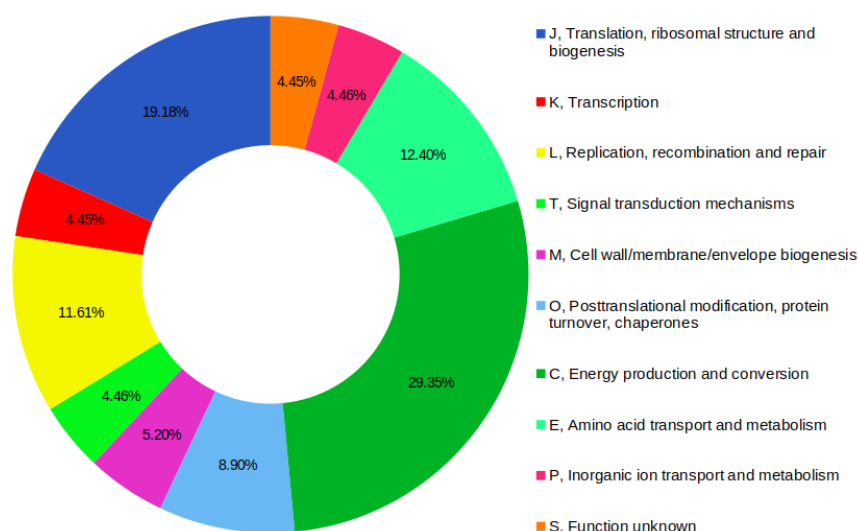


Figura 20. Clasificación funcional COG de los genes pertenecientes al genoma central de *Xenorhabdus-Photorhabdus*. Se utilizó la anotación de la base de datos COG para clasificar los 348 miembros pertenecientes al genoma central. Se muestra la abundancia de clases de genes específicos.

La posición taxonómica de la cepa SC 0516 se evaluó utilizando una filogenia con el genoma central utilizando el método de máxima verosimilitud calculada a partir de 281 marcadores con mayor puntuación y atributos filogenéticos óptimos (sin evidencia significativa de recombinación, produciendo topologías de árbol y longitudes de rama que no se desvían significativamente de la distribución esperada de estos parámetros y mostrando valores medios de soporte de rama > 0.6) seleccionados a través del software GET_PHYLOMARKERS teniendo como entrada los 348 grupos de genes consenso calculados por el software GET_HOMOLOGUES. En el análisis filogenético se incluyeron tres genomas completos de *Y. pestis*. La filogenia del genoma central mostró que SC

0516 se asocia dentro del grupo de *X. nematophila*, como se muestra en la **Figura 21**, y está estrechamente relacionado con *X. nematophila* YL001 (número de acceso del GenBank CP032329.1), aislado de nemátodos de una muestra de suelo recogida en la localidad de Shanxi, China. La solidez del árbol filogenético obtenido mediante este enfoque basado en el genoma central resolvió los clados con un valor de soporte nodal máximo.



Figura 21. Filogenia del genoma central de máxima verosimilitud (ML). El árbol ML se basa en 281 genes consenso codificadores de proteínas definidos por el paquete GET_HOMOLOGES y filtrados a través de GET_PHYLOMARKERS, seleccionados por sus óptimos atributos filogenéticos. Los valores de soporte nodal están codificados por colores como se muestra en la leyenda. El primer valor corresponde a los valores de soporte bayesianos aproximados, mientras que el segundo corresponde a los valores bootstrap ultrarrápidos, tal y como se implementan en IQTREE. La escala representa el número de sustituciones esperadas por sitio bajo el modelo GTR2+F+R3 (binario) mejor ajustado. La filogenia

corresponde al árbol con la mayor puntuación (lnL = -3.045.265,731) encontrada entre 10 búsquedas independientes en IQTREE. El nombre científico marcado en rojo señala la cepa *X.nematophila* SC 0516, mientras que la marcada en azul señala a la cepa *P.luminescens* HIM3 aisladas en el laboratorio de Estudios Ecogenómicos.

Además, el análisis nos permitió localizar genes específicos del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, destacando los implicados en la patogenicidad y la virulencia. En general, encontramos que el género *Xenorhabdus* carece de elementos únicos relacionados con la patogenicidad y la virulencia. Sin embargo, los genes distintivos presentes en el género incluyen genes asociados a la resistencia al telurio y al transporte de poliaminas. Por otro lado, el género *Photorhabdus* presentó 29 elementos únicos asociados a la virulencia y la patogenicidad relacionados con el sistema de secreción de tipo III, las estructuras de los pilus y las fimbrias. Este análisis fue consistente con las observaciones previas de que *Photorhabdus* posee genes relacionados con el sistema de secreción tipo III que están ausentes en *Xenorhabdus*, y estos juegan un papel importante en la invasión de insectos huéspedes, así como en la secreción de toxinas y factores de virulencia (Goodrich y Clarke, 2007; Chaston *et al.*, 2011; Brugirard-Ricaud *et al.*, 2004; Brugirard-Ricaud *et al.*, 2005). Los resultados mostraron que, aunque estos géneros están filogenéticamente relacionados con estilos de vida similares, difieren drásticamente en sus mecanismos moleculares de patogenicidad en el mismo huésped. Los datos indican que *Xenorhabdus* probablemente depende de diferentes efectores y sistemas de secreción, lo que podría reflejarse en las diferencias en la capacidad de virulencia entre los dos géneros.

Evaluación y comparación de la patogenicidad de las cepas *X.nematophila* SC0516 y *P.luminescens* HIM3 en *G.mellonella*.

Para llevar a cabo una comparación en la patogenicidad entre *X. nematophila* SC 0516 y *P.luminescens* HIM3, se realizaron experimentos de supervivencia en *G. mellonella* inyectando diferentes dosis de unidades formadoras de colonias (UFC). Los bioensayos mostraron que ambas bacterias fueron patógenas para las larvas de *G. mellonella*, como lo demuestra la tasa de mortalidad visualizada en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, que difirieron significativamente del control *E. coli* DH5 α ($X^2 = 457,636$, $df = 6$, $p < 0,001$), como se muestra en la **Figura 22**. Este análisis también reveló que *X. nematophila* SC 0516 fue más virulenta que *P. luminescens* HIM3 en todas las dosis utilizadas (**Figura 22**). Esta diferencia también quedó ilustrada por los tiempos medios de supervivencia (para los que sobreviven el 50% de las larvas) estimados a partir del análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. En el caso de *X. nematophila* SC 0516, los

tiempos medios fueron de 26.4 y 24 h para las dosis de 10^2 y 10^3 UFC, respectivamente, y de 30,4 h para la dosis de 10^1 UFC. Sin embargo, *P. luminescens* HIM3 mostró tiempos medios de 37,2 y 36 h para dosis de 10^2 y 10^3 UFC, respectivamente, y 41 h para una dosis de 10^1 UFC.

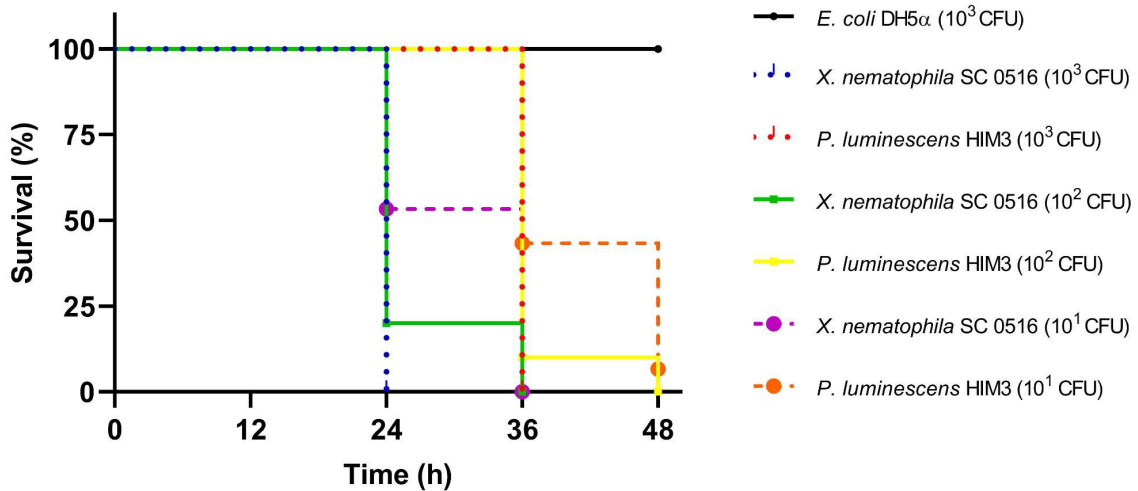


Figura 22. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de larvas de *G. mellonella* tras la inyección directa con *X. nematophila* SC 0516. Los experimentos se realizaron cuatro veces en bioensayos independientes, y la supervivencia se evaluó a las 12, 24, 36 y 48 h después de la infección. Las diferencias en la supervivencia ($n = 60$) se calcularon mediante la prueba de rango logarítmico $X^2 = 457,636$, $df = 6$, $p < 0,001$.

También observamos diferencias en los fenotipos de las larvas muertas. En las larvas tratadas con *X. nematophila* SC 0516, se observó un ligero oscurecimiento del cuerpo tras 48 h de tratamiento, mientras que las tratadas con *P. luminescens* HIM3 desarrollaron un color rojizo oscuro al mismo tiempo. No se observaron síntomas externos en las larvas de control (tratadas con *E. coli* DH5α) como se muestra en la Figura 23.



Figura 23. Fenotipos de las larvas de *G. mellonella* tras la inyección de *X. nematophila* SC 0516. De izquierda a derecha se muestra el fenotipo de la larva de quinto estadio de *G. mellonella* infectada con *X. nematophila* SC 0516, *P. luminescens* HIM3 y *E. coli* DH5a (control negativo) a las 48 horas después de la infección.

Para explicar estas diferencias, buscamos elementos únicos relacionados con la virulencia y la patogenicidad presentes en los genomas de ambas bacterias. Nuestro análisis mostró que *P. luminescens* HIM3 presentó un mayor número y diversidad de componentes asociados a la patogenicidad y la virulencia que *X. nematophila* SC 0516 en casi todas las categorías (**Figura 24**). Los elementos únicos que presentó *X. nematophila* SC0516 fueron la toxina mcf (makes caterpillars floppy), reportada en la literatura como una toxina altamente insecticida, y un mayor número de genes asociados con el sistema de secreción tipo IV (T4SS) y el sistema de toxina-antitoxina tipo I (Figura 5). An *et al.* 2009 compararon la expresión génica de *Photorhabdus temperata* y *Xenorhabdus koppenhoeferi in vivo* en el insecto *Rhizotrogus majalis*, y descubrieron que más del 60% de los genes se indujeron de forma única en una de las dos bacterias. Sin embargo, en *Xenorhabdus*, los mecanismos de entrega de las toxinas al insecto no se conocen del todo. Se han sugerido algunos mecanismos de secreción a través del aparato flagelar o por sistemas vesiculares de la membrana externa (Cowles y Goodrich-Blair, 2005; Darsouei *et al.*, 2019). La patogenicidad de algunas bacterias Gram negativas depende de su capacidad para secretar factores de virulencia en el huésped mamífero a través de la liberación de vesículas de la membrana externa (OMV). Algunos factores de virulencia incluyen proteasas, hemolisinas, fosfolípidos y lipopolisacáridos (Schwechheimer y Kuehn, 2015; Avila-Calderón *et al.*, 2021). El análisis de las proteínas de las OMVs condujo a la identificación de un homólogo de GroEL de 58 kDa como componente principal de un complejo caracterizado como factor de virulencia con actividad insecticida en algunas

especies de *Xenorhabdus*, incluyendo *X. nematophila* [Khandelwal y Banerjee-Bhatnagar, 2003; Khandelwal *et al.*, 2004].

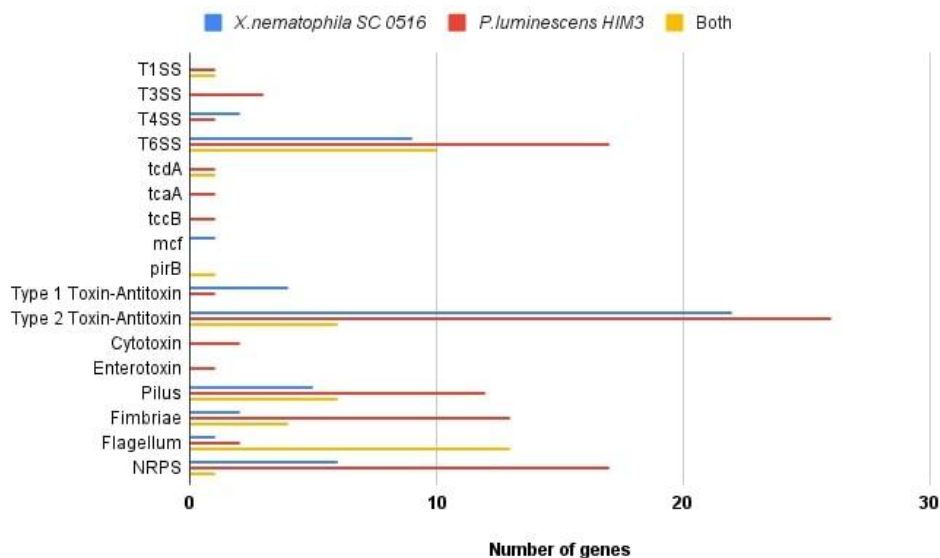


Figura 24. Genes únicos y compartidos entre *X. nematophila* SC 0516 y *P. luminescens* HIM3. El eje de abscisas indica el número total de genes presentes en una o ambas bacterias, y el eje de ordenadas indica los tipos de genes asociados a la virulencia; Sistema de secreción de tipo (TSS), Complejo de toxinas (tc), Hace que las orugas sean flexibles (mcf), Toxinas relacionadas con el insecto Photorhabdus (Pir) y Péptido sintetasa no ribosomales (NRPS).

CONCLUSIÓN

En este estudio y como parte de los resultados adicionales al proyecto, secuenciamos y reportamos el genoma de la cepa *X. nematophila* SC 0516 lo que nos permitió realizar el primer análisis pangenómico asignando 91 genomas totales de los cuales 41 pertenecen al género *Xenorhabdus* y 50 a *Photorhabdus*, utilizando tres algoritmos diferentes que robustecen la salida así como la identificación de genes de estas bacterias. Nuestros resultados revelaron que las diferencias entre estos dos géneros principalmente están dadas en aquellos genes pertenecientes a los sistemas de secreción de tipo III y relacionados con la fimbria y el pilus, los cuales se encuentran presentes en *Photorhabdus* pero ausentes en *Xenorhabdus*. Lo que indicaría que estas bacterias tienen diferentes mecanismos de patogenicidad cuando infectan a un insecto hospedero. A pesar de ello, los datos de los experimentos biológicos relacionados con la patogenicidad y la virulencia mostraron que ambas cepas *X. nematophila* SC0516 como *P. luminescens* HIM3 fueron patógenas. Sin embargo, *X. nematophila* SC0516 resultó ser más virulenta en todas las concentraciones probadas, lo que indicaría elementos codificados dentro del genoma mayormente eficaces para matar a los insectos, en comparación con el número de éstos.

12. REFERENCIAS

1. Akad, F., Eybishtz, A., Edelbaum, D., Gorovits, R., Dar-Issa, O., Iraki, N., Czosnek, H. Making a friend from a foe: expressing a GroEL gene from the whitefly *Bemisia tabaci* in the phloem of tomato plants confers resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Archives of Virology* (2007); 152: 1323–1339
2. Altincicek, B., Linder, M., Linder, D., Preissner, K. T., & Vilcinskis, A. Microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activate innate immune responses in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Infection and Immunity* 75.1 (2007); 175-183.
3. Ambler, V., Jeffery, C.J. Physical Features of Intracellular Proteins that Moonlight on the Cell Surface. *PLoS ONE*. (2015); 10(6): e0130575
4. Amini, H. R., Ascencio, F., Cruz-Villacorta, A., Ruiz-Bustos, E., Wadstrom, T. Immunochemical properties of a 60kDa cell surface associated heat shock-protein (Hsp60) from *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (1996); 16: 163–172.
5. An, R.; Sreevatsan, S.; Grewal, P.S. Comparative in Vivo Gene Expression of the Closely Related Bacteria *Photorhabdus temperata* and *Xenorhabdus koppenhoeferi* upon Infection of the Same Insect Host, *Rhizotrogus majalis*. *BMC Genom.* (2009); 10, 433.
6. Argueta, J. G., Shiota, S., Yamaguchi, N., Masuhiro, Y., Hanazawa, S. Induction of *Porphyromonas gingivalis* GroEL signaling via binding to Toll-like receptors 2 and 4. *Oral Microbiology and Immunology* (2006); 21: 245–251
7. Avila-Calderón, E.D., Ruiz-Palma, M.d.S., Aguilera-Arreola, M.G., Velázquez-Guadarrama, N., Ruiz, E.A., Gomez-Lunar, Z., Witonsky, S., Contreras-Rodríguez, A. Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria: An Outlook on Biogenesis. *Front. Microbiol.* (2021), 12, 557902.
8. Ausiello, C.M., Fedele, G., Palazzo, R., Spensieri, F., Ciervo, A. & Cassone, A. 60-kDa heat shock protein of *Chlamydia pneumoniae* promotes a T helper type 1 immune response through IL-12/IL-23 production in monocyte-derived dendritic cells. *Microbes and Infection* (2006); 8: 714–720.
9. Banerjee, S., Hess, D., Majumder, P., Roy, D., Das, S. The interactions of *Allium sativum* leaf agglutinin with a chaperonin group of unique receptor protein isolated from a bacterial endosymbiont of the mustard aphid. *Journal of Biological Chemistry* (2004); 279: 23782–23789

10. Baranova, I. N., Vishnyakova, T. G., Bocharov, A. V., Leelahavanichkul, A., Kurlander, R., Chen, Z., Souza, A. C., Yuen, P. S., Star, R. A., Csako, G., Patterson, A. P., Eggerman, T. L. Class B scavenger receptor types I and II and CD36 mediate bacterial recognition and proinflammatory signaling induced by *Escherichia coli*, lipopolysaccharide, and cytosolic chaperonin 60. *Journal of Immunology* (2012); 188: 1371–1380
11. Basu, D., Khare, G., Singh, S., Tyagi, A., Khosla, S., Mande, S. C. A novel nucleoid-associated protein of *Mycobacterium tuberculosis* is a sequence homolog of GroEL. *Nucleic Acids Research* (2009); 37: 4944–4954
12. Bergonzelli, G. E., Granato, D., Pridmore, R. D., Marvin-Guy, L. F., Donnicola, D., Cortesy-Theulaz, I. E. GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* (2006); 74: 425–434
13. Bittner, A. N., Foltz, A., Oke, V. Only one of five *groEL* genes is required for viability and successful symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* (2007); 189, 1884–1889
14. Brinker, A., Pfeifer, G., Kerner, M. J., Naylor, D. J., Hartl, F. U., Hayer-Hartl, M. Dual function of protein confinement in chaperonin-assisted protein folding. *Cell*. (2001); 107(2):223–33
15. Brockhurst, M. A.; Harrison, E.; Hall, J. P. J.; Richards, T.; McNally, A.; MacLean, C. The Ecology and Evolution of Pangenomes. *Curr. Biol.* (2019); 29, R1094–R1103.
16. Brugirard-Ricaud, K., Givaudan, A., Parkhill, J., Boemare, N., Kunst, F., Zumbihl, R., Duchaud, E. Variation in the Effectors of the Type III Secretion System among *Photobacterium* Species as Revealed by Genomic Analysis. *J. Bacteriol.* (2004); 186, 4376–4381.
17. Brugirard-Ricaud, K.; Duchaud, E.; Givaudan, A.; Girard, P. A.; Kunst, F.; Boemare, N.; Brehélin, M.; Zumbihl, R. Site-Specific Antiphagocytic Function of the *Photobacterium luminescens* Type III Secretion System during Insect Colonization. *Cell* (2005); 7, 363–371.
18. Bulut, Y., Shimada, K., Wong, M. H., Chen, S., Gray, P., Alsabeh, R., Doherty, T. M., Crother, T. R., Arditi, M. Chlamydial heat shock protein 60 induces acute pulmonary inflammation in mice via the Toll-like receptor 4- and MyD88-dependent pathway. *Infection and Immunity* (2009); 77: 2683–2690
19. Carroll, M. V., Sim, R. B., Bigi, F., Jakel, A., Antrobus, R. & Mitchell, D. A. Identification of four novel DC-SIGN ligands on *Mycobacterium bovis* BCG. *Protein & Cell* (2010); 1: 859–870
20. Cehovin, A., Coates, A. R., Hu, Y., Riffo-Vasquez, Y., Tormay, P., Botanch, C., Altare, F., Henderson, B. Comparison of the moonlighting actions of the two highly homologous chaperonin 60 proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* (2010); 78: 3196–3206

21. Söderhäll, K., & Cerenius, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current opinion in immunology*. (1998); 10(1), 23-28.
22. Cerenius, L., & Söderhäll, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological reviews* (2004); 198(1), 116-126
23. Chakraborty, K., Chatila, M., Sinha, J., Shi, Q., Poschner, B.C., Sikor, M., Jiang, G., Lamb, D.C., Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M. Chaperonin-catalyzed rescue of kinetically trapped states in protein folding. *Cell*. (2010); 142 (1):112-22
24. Chaston, J.M., Suen, G., Tucker, S.L. The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Convergent lifestyles from divergent genomes. *PLoS ONE* (2011); 6, e27909.
25. Chen, C., Chai, H., Wang, X., Lin, P. H., Yao, Q. *Chlamydia* heat shock protein 60 decreases expression of endothelial nitric oxide synthase in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Cardiovascular Research* (2009); 83: 768–777
26. Chen, X.J., Wang, X., Kaufman, B.A., Butow, R.A. Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance, *Science* (2005); 307:714–717
27. Chong, A., Lima, C.A., Allan, D.S., Nasrallah, G.K., Garduno, R.A. The purified and recombinant *Legionella pneumophila* chaperonin targets mitochondrial trafficking and microfilament organization. *Infection and Immunity* (2009); 77: 4724–4739
28. Clark, G.W., Tillier, E.R. Loss and gain of GroEL in the Mollicutes. *Biochemistry and Cell Biology* (2010); 88, 185–194
29. Contreras-Moreira, B., & Vinuesa, P. GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Applied and environmental microbiology*. (2013); 79(24), 7696-7701.
30. Costa, C. P., Kirschning, C. J., Busch, D., Durr, S., Jennen, L., Heinzmann, U., Prebeck, S., Wagner, H. & Miethke, T. Role of chlamydial heat shock protein 60 in the stimulation of innate immune cells by *Chlamydia pneumoniae*. *European Journal of Immunology* (2002); 32: 2460–2470.
31. Cowles, K.N.; Goodrich-Blair, H. Expression and Activity of a *Xenorhabdus nematophila* Haemolysin Required for Full Virulence towards *Manduca sexta* Insects. *Cell. Microbiol.* (2005); 7, 209–219.
32. Da Costa, C. U., Wantia, N., Kirschning, C. J., Busch, D. H., Rodriguez, N., Wagner, H., Miethke, T. Heat shock protein 60 from *Chlamydia pneumoniae* elicits an unusual set of inflammatory responses via Toll-like receptor 2 and 4 in vivo. *European Journal of Immunology* (2004); 34: 2874–2884

- 33.** Darsouei, R., Karimi, J., Dunphy, G.B. Functional Characterization of Outer Membrane Proteins (OMPs) in *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus luminescens* through Insect Immune Defense Reactions. *Insects* (2019); 10, 352.
- 34.** DeBruyn, J., Soetaert, K., Buysens, P., Calonne, I., DeCoene, J.L., Gallet, X., Brasseur, R., Wattiez, R., Falmagne, P., Montrozier, H., Lanée, M. A., Daffé, M. Evidence for specific and non-covalent binding of lipids to natural and recombinant *Mycobacterium bovis* BCG hsp60 proteins, and to the *Escherichia coli* homologue GroEL. *Microbiology* (2000); 146: 1513–1524.
- 35.** Decker, B.L., Wickner, W.T. Enolase activates homotypic vacuole fusion and protein transport to the vacuole in yeast. *J. Biol. Chem.* (2006) 281: 14523–14528
- 36.** Edelbaum, D., Gorovits, R., Sasaki, S., Ikegami, M., Czosnek, H. Expressing a whitefly GroEL protein in *Nicotiana benthamiana* plants confers tolerance to tomato yellow leaf curl virus and cucumber mosaic virus, but not to grapevine virus A or tobacco mosaic virus. *Archives of Virology* (2009); 154: 399–407
- 37.** Ensgraber, M., Loos, M. A 66-kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infection and Immunity* (1992); 60: 3072–3078.
- 38.** Equils, O., Lu, D., Gatter, M., Witkin, S. S., Bertolotto, C., Arditi, M., McGregor, J. A., Simmons, C. F., Hobel, C. J. *Chlamydia* heat shock protein 60 induces trophoblast apoptosis through TLR4. *Journal of Immunology* (2006); 177: 1257–1263
- 39.** Esaguy, N., Aguas, A. P. Subcellular localization of the 65-kDa heat shock protein in mycobacteria by immunoblotting and immunogold ultracytochemistry. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* (1997); 29: 85–90
- 40.** Fares, M. A., Moya, A., Barrio, E. Adaptive evolution in GroEL from distantly related endosymbiotic bacteria of insects. *Journal of Evolutionary Biology* (2005); 18: 651–660
- 41.** Opens overlay Fothergill-Gilmore, L.A., Michels, P.A.M. Evolution of glycolysis. *Prog Biophys Mol Biol* (1993); 59: 105–235
- 42.** French-Constant, R., Eleftherianos, I., Clarke, D.J., Dowling, A.J., Reynolds, S. Dissecting the immune response to the entomopathogen *Photorhabdus*. *Cell press* (2010); 18(12): pp. 552-560

43. Friedland, J. S., Shattock, R., Remick, D. G., Griffin, G. E. Mycobacterial 65-kD heat shock protein induces release of proinflammatory cytokines from human monocytic cells. *Clinical and Experimental Immunology* (1993); 91: 58–62.
44. Frisk, A., Ison, C. A., Lagergard, T. GroEL heat shock protein of *Haemophilus ducreyi*: association with cell surface and capacity to bind to eukaryotic cells. *Infection and Immunity* (1998); 66: 1252–1257
45. Fujiwara, K., Ishihama, Y., Nakahigashi, K., Soga, T., Taguchi, H. A systematic survey of in vivo obligates chaperonin- dependent substrates. *EMBO J.* (2010); 29: 1552-1564.
46. Gancedo, C., Flores, C.L. Moonlighting proteins in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2008); 72: 197–210
47. Garduño, R. A., Faulkner, G., Trevors, M. A., Vats, N., Hoffman, P. S. Immunolocalization of Hsp60 in *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* (1998a); 180: 505–513.
48. Garduño, R.A., Garduno, E., Hoffman, P.S. Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infection and Immunity* (1998b); 66: 4602–4610
49. Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Kaiser, A.D., Wood, W.B. Role of the host cell in bacteriophage morphogenesis: effects of a bacterial mutation on T4 head assembly. *Nature New Biology* (1972); 239, 38–41.
50. Gérard, H.C., Whittum-Hudson, J.A., Schumacher, H.R., Hudson, A.P. Differential expression of three *Chlamydia trachomatis* hsp60-encoding genes in active vs. persistent infections. *Microbial Pathogenesis* (2004); 36, 35–39
51. Gobert, A. P., Bambou, J. C., Werts, C., Balloy, V., Chignard, M., Moran, A. P. & Ferrero, R. L. *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 mediates interleukin-6 production by macrophages via a toll-like receptor (TLR)-2-, TLR-4-, and myeloid differentiation factor 88-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* (2004); 279: 245–250
52. Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Mozes-Daube, N., Kotsedalov, S., Skaljac, M., Brumin, M., Sobol, I., Czosnek, H., Vavre, F., Fleury, F., Ghanim, M. The transmission efficiency of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaco* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. *Journal of Virology* (2010); 84: 9310–9317
53. Goodrich-Blair, H., Clarke, D.J. Mutualism and Pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Two Roads to the Same Destination. *Mol. Microbiol.* (2007), 64, 260–268.

54. Gould, P.S., Burgar, H.R., Lund, P. A. Homologous cpn60 genes in *Rhizobium leguminosarum* are not functionally equivalent. *Cell Stress & Chaperones* (2007); 12, 123–131
55. Goulhen, F., Hafezi, A., Uitto, V. J., Hinode, D., Nakamura, R., Grenier, D., Mayrand, D. Subcellular localization and cytotoxic activity of the GroEL like protein isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infection and Immunity* (1998); 66: 5307–5313
56. Gregory, T.R., Synergy between sequence and size in large-scale genomics, *Nat.Rev.Genet.* (2005) 6: 699–708.
57. Haines, L.R., Haddow, J.D., Aksoy, S., Gooding, R.H., Pearson, T.W. The major protein in the midgut of teneral *Glossina morsitans morsitans* is a molecular chaperone from the endosymbiotic bacterium *Wigglesworthia glossinidia*. *Insect Biochem Mol Biol.* (2002); 32:1429-1438.
58. Hartl, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* (1996) 381(6583):571-9
59. Hartl, F.U., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* (2011) 475:324–32
60. Hartl, F.U., Hayer - Hartl, M. Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nat.Struct.Mol.Biol.* (2009); 16(6):574-81.
61. Hayashi, T., Rao, S. P., Catanzaro, A. Binding of the 68-kilodalton protein of *Mycobacterium avium* to alpha(v)beta3 on human monocyte-derived macrophages enhances complement receptor type3 expression. *Infection and Immunity* (1997); 65: 1211–1216
62. Henderson, B., Fares, M.A., Lund, P.A. Chaperonin 60: a paradoxical, evolutionarily conserved protein family with multiple moonlighting functions. *Biological Reviews.* (2013); 88: 955-987.
63. Hennequin, C., Porcheray, F., Waligora-Dupriet, A., Collignon, A., Barc, M., Bourlioux, P., Karjalainen, T. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* (2001); 147: 87–96
64. Herbert, E.E., Goodrich-Blair, H. Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nat Rev Microbiol.* (2007); 5:634-646.
65. Hickey, T.B., Ziltener, H.J., Speert, D.P., Stokes, R.W. *Mycobacterium tuberculosis* employs Cpn60.2 as an adhesin that binds CD43 on the macrophage surface. *Cellular Microbiology* (2010); 12: 1634–1647

66. Hogenhout, S. A., van der Wilk, F., Verbeek, M., Goldbach, R. W., van den Heuvel, J. F. Potato leafroll virus binds to the equatorial domain of the aphid endosymbiotic GroEL homolog. *Journal of Virology* (1998); 72: 358–365
67. Horwich, A.L., Fenton, W.A. Chaperonin-mediated protein folding: using a central cavity to kinetically assist polypeptide chain folding. *Q.Rev.Biophys.* (2009) 42, 83-116
68. Horwich, A.L., Fenton, W.A., Chapman, E., Farr, W.G. Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol.* (2007); 23:115-45.
69. Hu, Y., Henderson, B., Lund, P. A., Tormay, P., Ahmed, M. T., Gurcha, S. S., Besra, G.S., Coates, A.R. A *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the groEL homologue cpn60.1 is viable but fails to induce an inflammatory response in animal models of infection. *Infection and Immunity* (2008); 76: 1535–1546
70. Huberts, D.H., van der Klei, I.J. Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta* (2010); 1803:520–525
71. Hughes, M. J., Moore, J. C., Lane, J. D., Wilson, R., Pribul, P. K., Younes, Z. N., Dobson, R. J., Everest, P., Reason, A. J., Redfern, J. M., Greer, F. M., Paxton, T., Panico, M., Morris, H.R., Feldman, R.G., Santangelo, J. D. Identification of major outer surface proteins of *Streptococcus agalactiae*. *Infection and Immunity* (2002); 70: 1254–1259
72. Huq, S., Sueoka, K., Narumi, S., Arisaka, F., Nakamoto, H. Comparative biochemical characterization of two GroEL homologs from the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (2010); 74, 2273–2280
73. Jacob, F. Evolution and tinkering. *Science* (1977); 196: 1161–1166.
74. Jeffery, C.J. Molecular mechanism for multitasking: recent crystal structures of moonlighting proteins. *Curr Opin Struct Biol.* (2004); 14: 663-668.
75. Jeffery, C.J. Moonlighting proteins- a update. *Molecular BioSystems.* (2009); 5:345-350.
76. Jeffery, C.J. Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences.* (1999); 24:8-11.
77. Jeffery, C.J. Moonlighting proteins: complications and implications for proteomics research. *DDT: Targets* (2004); 3:71–78
78. Jha, R., Vardhan, H., Bas, S., Salhan, S., Mittal, A. *Chlamydia trachomatis* heat shock proteins 60 and 10 induce apoptosis in endocervical epithelial cells. *Inflammation Research* (2011); 60: 69–78
79. Jiang, D. M., Zhao, L., Zhang, C. Y., Li, J., Xia, Z. J., Wang, J., Wu, Z. H., Li, Y.Z. Taxonomic analysis of *Sorangium* strains based on HSP60 and 16S rRNA gene sequences and

morphology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2008); 58, 2654–2659

80. Joshi, M.C., Sharma, A., Kant, S., Birah, A., Gupta, G.P., Khan, S.R., Bhatnagar, R., Banerjee, R. An insecticidal GroEL protein with chitin binding activity from *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Biological Chemistry* (2008); 283(42): 28287–28296.

81. Kalayoglu, M. V., Indrawati, Morrison, R. P., Morrison, S. G., Yuan, Y., Byrne, G.I. Chlamydial virulence determinants in a thermogenesis: the role of chlamydial lipopolysaccharide and heat shock protein 60 in macrophage-lipoprotein interactions. *Journal of Infectious Diseases* (2000); 181(Suppl. 3): S483–S489

82. Kamiya, S., Yamaguchi, H., Osaki, T., Taguchi, H. A virulence factor of *Helicobacter pylori*: role of heat shock protein in mucosal inflammation after *H. pylori* infection. *Journal of Clinical Gastroenterology* (1998); 27(Suppl. 1): S35–S39

83. Kaneda, K., Masuzawa, T., Yasugami, K., Suzuki, T., Suzuki, Y., Yanagihara, Y. Glycosphingolipid-binding protein of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Infection and Immunity* (1997); 65: 3180–3185

84. Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., Tabata, S. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research* (2002); 9, 189–197

85. Karunakaran, K.P., Noguchi, Y., Read, T.D., Cherkasov, A., Kwee, J., Shen, C., Nelson, C.C., Brunham, R.C. Molecular analysis of the multiple GroEL proteins of *Chlamydiae*. *Journal of Bacteriology* (2003); 185, 1958–1966.

86. Katakura, Y., Sano, R., Hashimoto, T., Ninomiya, K., Shioya, S. Lactic acid bacteria display on the cell surface cytosolic proteins that recognize yeast mannan. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2010); 86: 319–326

87. Kerner, M.J., Naylor, D.J., Ishihama, Y., Maier, T., Chang, H.C., Stines, A.P., Georgopoulos, C., Frishman, D., Hayer-Hartl, M., Mann, M., Ulrich Hartl, F. Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell*. (2005); 122:209–20

88. Khan, N., Alam, K., Mande, S. C., Valluri, V. L., Hasnain, S. E., Mukhopadhyay, S. *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 60 modulates immune response to PPD by manipulating the surface expression of TLR2 on macrophages. *Cellular Microbiology* (2008); 10: 1711–1722

89. Khandelwal, P., Banerjee-Bhatnagar, N. Insecticidal Activity Associated with the Outer Membrane Vesicles of *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol* (2003); 69, 2032–2037.
90. Khandelwal, P.; Bhatnagar, R.; Choudhury, D.; Banerjee, N. Characterization of a Cytotoxic Pilin Subunit of *Xenorhabdus nematophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004), 314, 943–949.
91. Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Ulrich Hartl, F. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual review of biochemistry* (2013); 82, 323-355.
92. Kim, J.W., Dang, C.V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes, *Trends Biochem. Sci.* (2005); 30: 142–150
93. Kirby, A. C., Meghji, S., Nair, S. P., White, P., Reddi, K., Nishihara, T., Nakashima, K., Willis, A. C., Sim, R., Wilson, M., Henderson, B. The potent bone-resorbing mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is homologous to the molecular chaperone GroEL. *Journal of Clinical Investigation* (1995); 96: 1185–1194
94. Kol, A., Sukhova, G. K., Lichtman, A. H., Libby, P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation* (1998); 98: 300–307
95. Kovács, E., van der Vies, S. M., Glatz, A., Török, Z., Varvasovszki, V., Horváth, I., Vigh, L. The chaperonins of *Synechocystis* PCC 6803 differ in heat inducibility and chaperone activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2001); 289, 908–915
96. Kopáček, Petr, Christoph Weise, and Peter Götz. The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme. *Insect biochemistry and molecular biology* 25.10 (1995); 1081-1091.
97. Kumar, S.C.M., Mande, S.C., Mahajan, G. Multiple chaperonins in bacteria-novel functions and non-canonical behaviors. *Cell Stress and Chaperones.* (2015); 20(4):555-74
98. Kumari, P., Kant, S., Zaman, S., Mahapatro, G.K., Banerjee, N., Sarin, N.B. A novel insecticidal GroEL protein from *Xenorhabdus nematophila* confers insect resistance in tobacco. *Transgenic Res.* (2013); 23:99-107.
99. LaRue, R. W., Dill, B. D., Giles, D. K., Whittimore, J. D. & Raulston, J. E. Chlamydial Hsp60-2 is iron responsive in *Chlamydia trachomatis* serovar E-infected human endometrial epithelial cells in vitro. *Infection and Immunity* (2007); 75: 2374–2380

- 100.** Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D., Finch, J.T. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* (1978); 275, 416–420
- 101.** Layton, J. C., Foster, P. L. Error-prone DNA polymerase IV is regulated by the heat shock chaperone GroE in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* (2005); 187: 449–457
- 102.** Lee, H. R., Jun, H. K., Kim, H. D., Lee, S. H. & Choi, B. K. *Fusobacterium nucleatum* GroEL induces risk factors of atherosclerosis in human microvascular endothelial cells and ApoE(-/-) mice. *Molecular Oral Microbiology* (2012); 27: 109–123
- 103.** Lewthwaite, J.C., Coates, A.R., Tormay, P., Singh, M., Mascagni, P., Poole, S., Roberts, M., Sharp, L., Henderson, B. *Mycobacterium tuberculosis* chaperonin 60.1 is a more potent cytokine stimulator than chaperonin 60.2 (Hsp 65) and contains a CD14-binding domain. *Infection and Immunity* (2001); 69: 7349–7355
- 104.** Li, J., Wang, Y., Zhang, C. Y., Zhang, W. Y., Jiang, D. M., Wu, Z. H., Liu, H., Li, Y.Z. *Myxococcus xanthus* viability depends on *groEL* supplied by either of two genes, but the paralogs have different functions during heat shock, predation, and development. *Journal of Bacteriology* (2010); 192, 1875–1881
- 105.** Lin, F. Y., Lin, Y. W., Huang, C. Y., Chang, Y. J., Tsao, N. W., Chang, N. C., Ou, K. L., Chen, T. L., Shih, C. M. & Chen, Y. H. GroEL1, a heat shock protein 60 of *Chlamydia pneumoniae*, induces lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 expression in endothelial cells and enhances atherogenesis in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Immunology* (2011); 186: 4405–4414
- 106.** Lin, Z., Madan, D., Rye, H.S. GroEL stimulates protein folding through forced unfolding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2008); 15:303–11
- 107.** Long, K.H., Gomez, F.J., Morris, R.E., Newman, S.L. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. *Journal of Immunology* (2003); 170: 487–494.
- 108.** Lu, M., Ammar, D., Ives, H., Albrecht, F., Gluck, S.L. Physical interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase is essential for the assembly and activity of the proton pump, *J. Biol. Chem.* (2007); 282: 24495–24503
- 109.** Lund, P. A. Multiple chaperonins in bacteria – why so many? *FEMS Microbiology Reviews* (2009). 33, 785–800
- 110.** Mahar, A. N., Munir, M., Elawad, S., Gowen, S. R., & Hague, N. G. Pathogenicity of bacterium, *Xenorhabdus nematophila* isolated from entomopathogenic nematode (*Steinernema*

carpocapsae) and its secretion against *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Zhejiang University Science*. (2005). *B*, 6(6), 457–463

111. Mani, M., Chen, C., Amblee, V., Liu, H., Mathur, T., Zwicke, G., Zabad, S., Patel, B., Thakkar, J., Jeffery, C.J. MoonProt: a database for proteins that are known to moonlight. *Nucleic Acids Res.* (2015) 43, 277–282.

112. McNerney, J.O., McNally, A., O’Connell, M.J. Why Prokaryotes Have Pangenomes. *Nat. Microbiol* (2017); 2, 17040.

113. McNally, D., Fares, M.A. *In silico* identification of functional divergence between the multiple groEL gene paralogs in *Chlamydiae*. *BMC Evolutionary Biology* (2007); 7, 81

114. Morioka, M., Muraoka, H., Yamamoto, K., Ishikawa, H. An endosymbiont chaperonin is a novel type of histidine protein kinase. *Journal of Biochemistry* (1994); 116: 1075–1081

115. Multhoff, G., & Hightower, L. E. Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell stress & chaperones*. (1996); 1(3), 167.

116. Munro, S., Pelham, H.R. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* (1986); 46, 291–300

117. Nagai, T., & Kawabata, S. I. A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *Journal of Biological Chemistry*. (2000); 275(38), 29264-29267.

118. Natarajaseenivasan, K., Artiushin, S. C., Velineni, S., Vedhagiri, K., Vijayachari, P., Timoney, J. F. Surface-associated Hsp60 chaperonin of *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis N2 strain as an immunoreactive protein. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (2011); 30: 1383–1389

119. Nation, J. *Insect Physiology and Biochemistry*. Taylor and Francis Group, Florida (2008)

120. Noah, C.E., Malik, M., Bublitz, D.C., Camenares, D., Sellati, T.J., Benach, J. L., Furie, M. B. GroEL and lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* live vaccine strain synergistically activate human macrophages. *Infection and Immunity* (2010); 78: 1797–1806

121. Ogawa, J., Long, S.R. The *Rhizobium meliloti* groELc locus is required for regulation of early nod genes by the transcription activator NodD. *Genes&Development* (1995); 9, 714–729

- 122.** Ogier, J.C., Pagès, S., Frayssinet y Gaudriault, S. Entomopathogenic nematode-associated microbiota: from monoxenic paradigm to pathobiome. *Microbiome* (2020); 8, 25
- 123.** Ohue, R., Hashimoto, K., Nakamoto, M., Furukawa, Y., Masuda, T., Kitabatake, N., Tani, F. Bacterial heat shock protein 60, GroEL, can induce the conversion of naïve T cells into a CD4 CD25(+) Foxp3-expressing phenotype. *Journal of Innate Immunity* (2011); 3: 605–613
- 124.** Ojha, A., Anand, M., Bhatt, A., Kremer, L., Jacobs, W. R. J r., Hatfull, G. F. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell* (2005); 123: 861–873
- 125.** Ortega-Ortega, Y., Garcia-Latorre, E.A., Lezama, R.A., Luna-Herrera, J., Vega-Lopez, A., Dominguez-Lopez, M. L. Heat shock protein 60 from *Klebsiella pneumoniae* protects mononuclear cells from apoptotic cell death induced by dexamethasone. *Microbial Pathogenesis* (2011); 51: 352–359.
- 126.** Ozimek, P., Kotter, P., Veenhuis, M., van der Klei, I.J. *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* Pex5p's recognize different, independent peroxisomal targeting signals in alcohol oxidase, *FEBS Lett.* (2006); 580: 46–50
- 127.** Pantzar, M., Teneberg, S., Lagergard, T. Binding of *Haemophilus ducreyi* to carbohydrate receptors is mediated by the 58.5-kDa GroEL heat shock protein. *Microbes and Infection* (2006); 8: 2452–2458.
- 128.** Peetermans, W. E., Raats, C. J., Langermans, J. A., van Furth, R. Mycobacterial heat shock protein 65 induces proinflammatory cytokines but does not activate human mononuclear phagocytes. *Scandinavian Journal of Immunology* (1994); 39: 613–617
- 129.** Piatigorsky, J., O'brien, W.E., Norman, B.L., Kalumuck, K., Wistow, G.J., Borrás, T., Nickerson, J.M., Wawrousek, E.F. Gene sharing by delta-crystallin and argininosuccinate lyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (1988); 85:3479-3483.
- 130.** Portaro, F.C., Hayashi, M.A., DeArauz, L.J., Palma, M.S., Assakura, M.T., Silva, C. L., de Camargo, A. C. The *Mycobacterium leprae* hsp65 displays proteolytic activity. Mutagenesis studies indicate that the *M. leprae* hsp65 proteolytic activity is catalytically related to the HsIVU protease. *Biochemistry* (2002); 41: 7400–7406
- 131.** Qamra, R., Mande, S.C. Crystal structure of the 65-kilodalton heat shock protein, chaperonin 60.2, of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* (2004); 186, 8105–8113

- 132.** Quiroz, C.R.E., Mendoza, M.A., Obregón, B.V., Martínez, O.F., Hernandez, M.A., Martínez, G.F., Guillén, S.G., Sanchez, R.F., Peña, C.G., Ortiz, H.L., Gaytan, C.P., Dantán, G.E. Identification of a new *Alcaligenes faecalis* strain MOR02 and assessment of its toxicity and pathogenicity to insects. *BioMed Research Internationa.l* (2015); 2015: 570243
- 133.** Raineri, E., Ribeca, P., Serrano, L., Maier, T. A more precise characterization of chaperonin substrates. *Bioinformatics*. (2010); 26:1685-1689.
- 134.** Reddi, K.,Meghji, S.,Nair, S. P.,Arnett, T. R.,Miller, A. D.,Preuss, M., Wilson, M.,Henderson, B., Hill, P. The *Escherichia coli* chaperonin 60 (groEL) is a potent stimulator of osteoclast formation. *Journal of Bone and Mineral Research* (1998); 13: 1260–1266
- 135.** Rha, Y. H.,Taube, C.,Haczku, A.,Joetham, A.,Takeda, K.,Duez, C., Siegel, M.,Aydintug, M. K.,Born, W. K.,Dakhama, A., Gelfand, E. W. Effect of microbial heat shock proteins on airway inflammation and hyperresponsiveness. *Journal of Immunology* (2002); 169: 5300–5307
- 136.** Ryobova, N., Marchenkov, V., Kotova, N., Semisotnov, G. Chaperonin GroEL reassembly: An effect of proteins ligands and solvents compositions. *Biomolecules*. (2014), 4, 458-473
- 137.** Richter, K., Haslbeck, M., Buchner,J. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell* (2010); 40:253–266
- 138.** Riffo-Vasquez, Y.,Spina, D.,Page, C.,Tormay, P.,Singh, M.,Henderson, B., Coates, A. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* chaperonins on bronchial eosinophilia and hyper-responsiveness in a murine model of allergic inflammation. *Clinical and Experimental Allergy* (2004); 34: 712–719
- 139.** Rodriguez-Quinones, F., Maguire, M., Wallington, E. J., Gould, P. S., Yerko, V., Downie, J. A. &Lund, P. A. Two of the three *groEL* homologues in *Rhizobium leguminosarum* are dispensable for normal growth. *Archives of Microbiology* (2005) ; 183, 253–265
- 140.** Saad, N., Urdaci, M., Vignoles, C., Chaignepain, S., Tallon, R., Schmitter, J.M Bressollier, P. *Lactobacillus plantarum* 299v surface-bound GAPDH: a new insight into enzyme cell walls location. *Journal of Microbiology and Biotechnology* (2009); 19: 1635–1643
- 141.** Sasu, S., LaVerda, D., Qureshi, N., Golenbock, D. T., Beasley, D. *Chlamydia pneumoniae* and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circulation Research* (2001); 89: 244–250

- 142.** Shahar, A., Melamed-Frank, M., Kashi, Y., Shimon, L., Adir, N. The dimeric structure of the Cpn60.2 chaperonin of *Mycobacterium tuberculosis* at 2.8 Å reveals possible modes of function. *Journal of Molecular Biology* (2011); 412, 192–203
- 143.** Sharma, S., Chakraborty, K., Müller, B.K., Astola, N., Tang, Y.C., Lamb, D.C., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U. Monitoring protein conformation along the pathway of chaperonin-assisted folding. *Cell* (2008); 133:142–53
- 144.** Shi, H., Zeng, H., Yang, X., Zhao, J., Chen, M., Qiu, D. An insecticidal protein from *Xenorhabdus ehlersii* triggers prophenoloxidase activation and hemocyte decrease in *Galleria mellonella*. *Curr Microbiol.* (2012); 64:604-610.
- 145.** Shimkets, L.J. Intercellular signaling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*. *Annual Review of Microbiology* (1999); 53, 525–549
- 146.** Smith, T. F., Morowitz, H. J. Between history and physics. *Journal of Molecular Evolution.* (1982); **18**: 265–282.
- 147.** Smitherman, L. S., Minnick, M. F. *Bartonella bacilliformis* GroEL: effect on growth of human vascular endothelial cells in infected cocultures. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2005); 1063: 286–298.
- 148.** Schwechheimer, C.; Kuehn, M.J. Outer-Membrane Vesicles from Gram-Negative Bacteria: Biogenesis and Functions. *Nat. Rev. Microbiol.* (2015); **13**, 605–619.
- 149.** Tabona, P., Reddi, K., Khan, S., Nair, S. P., Crean, S. J., Meghji, S., Wilson, M., Preuss, M., Miller, A. D., Poole, S., Carne, S., Henderson, B. Homogeneous *Escherichia coli* chaperonin 60 induces IL-1 and IL-6 gene expression in human monocytes by a mechanism independent of protein conformation. *Journal of Immunology* (1998); 161: 1414–1421
- 150.** Taipale, M., Tucker, G., Peng, J., Krykbaeva, I., Lin, Z. Y., Larsen, B., Choi, H., Berger, B., Gingras, A.C., Lindquist, S. A quantitative chaperone interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis pathways. *Cell* (2014); 158, 434–448.
- 151.** Takano, T., Kakefuda, T. Involvement of a bacterial factor in morphogenesis of bacteriophage capsid. *Nat New Biol* (1972); 239: 34–37
- 152.** Takenaka, R., Yokota, K., Ayada, K., Mizuno, M., Zhao, Y., Fujinami, Y., Lin, S. N., Toyokawa, T., Okada, H., Shiratori, Y., Oguma, K. *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells. *Microbiology* (2004); 150: 3913–3922.

- 153.** Tanaka, N., Hiyama, T., Nakamoto, H. Cloning, characterization and functional analysis of groESL operon from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Biochimica et Biophysica Acta* (1997); 1343, 335–348
- 154.** Tang, Y.C., Chang, H.C., Roeben, A., Wischnewski, D., Wischnewski, N., Kerner, M.J., Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M. Structural features of the GroEL-GroES nano-cage required for rapid folding of encapsulated protein. *Cell*. (2006); 125(5): 903-14
- 155.** Tartaglia, G.G., Dobson, C.M., Hartl, F.U., Vendruscolo, M. Physicochemical determinants of chaperone requirements. *J.Mol.Biol.* (2010); 400:579-588.
- 156.** Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., Medini, D. Comparative Genomics: The Bacterial Pan-Genome. *Curr. Opin. Microbiol* (2008); 11, 472–477.
- 157.** Thirumalai, D., Lorimer, G.H., Chaperonin-mediated protein folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (2001); 30:245–69
- 158.** Tilly, K., Murialdo, H., Georgopoulos, C. Identification of a second Escherichia coli groE gene whose product is necessary for bacteriophage morphogenesis. *P Natl Acad Sci* (1981); 78: 1629–1633.
- 159.** Treangen, T.J., Rocha, E.P.C. Horizontal Transfer, Not Duplication, Drives the Expansion of Protein Families in Prokaryotes. *PLoS Genet* (2011); 7, e1001284.
- 160.** Tsugawa, H., Ito, H., Ohshima, M., Okawa, Y. Cell adherence-promoted activity of *Plesiomonas shigelloides* groEL. *Journal of Medical Microbiology* (2007); 56: 23–29
- 161.** Verdegaal, E. M. E., Zegveld, S. T., van Furth, R. Heat shock protein 65 induces CD62e, CD106 and CD54 on cultured human endothelial cells and increases their adhesiveness for monocytes and granulocytes. *Journal of Immunology* (1996); 157, 369–376
- 162.** Vinuesa, P., & Contreras-Moreira, B. (2015). Robust identification of orthologues and paralogues for microbial pan-genomics using GET_HOMOLOGUES: a case study of pInCA/C plasmids. In *Bacterial Pangenomics* (pp. 203-232). Humana Press, New York, NY.
- 163.** Vinuesa, P., Ochoa-Sánchez, L. E., & Contreras-Moreira, B. GET_PHYLOMARKERS, a software package to select optimal orthologous clusters for phylogenomics and inferring pan-genome phylogenies, used for a critical geno-taxonomic revision of the genus *Stenotrophomonas*. *Frontiers in microbiology*. (2018); 771.
- 164.** Wang, X. M., Lu, C., Soetaert, K., S'Heeren, C., Peirs, P., Lan'eele, M. A., Lef'evre, P., Bifani, P., Content, J., Daff' e, M., Huygen, K., De Bruyn, J. & Wattiez, R. Biochemical and immunological characterization of a cpn60.1 knockout mutant of *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiology* (2011); 157: 1205–1219

- 165.** Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., Horiuchi, M., Shirahata, T., Sakaguchi, S., Katamine, S. Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *Journal of Experimental Medicine* (2003); 198: 5–17
- 166.** Williams, T.A., Codoner, F.M., Toft, C., Fares, M.A. Two chaperonin systems in bacterial genomes with distinct ecological roles. *Trends in Genetics* (2010); 26: 47–51
- 167.** Wilson, A. C., Wu, C. C., Yates, J. R. III & Tan, M. Chlamydial GroEL autoregulates its own expression through direct interactions with the HrcA repressor protein. *Journal of Bacteriology* (2005); 187: 7535–7542
- 168.** Winrow, V. R., Mesher, J., Meghji, S., Morris, C. J., Maguire, M., Fox, S., Coates, A. R., Tormay, P., Blake, D. R., Henderson, B. The two homologous chaperonin 60 proteins of *Mycobacterium tuberculosis* have distinct effects on monocyte differentiation into osteoclasts. *Cellular Microbiology* (2008); 10: 2091–2104
- 169.** Wu, Z., Zhang, W., Lu, C. Immunoproteomic assay of surface proteins of *Streptococcus suis* serotype 9. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (2008); 53: 52–59
- 170.** Wuppermann, F. N., Molleken, K., Julien, M., Jantos, C. A., Hegemann, J. H. *Chlamydia pneumoniae* GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEp-2 cells. *Journal of Bacteriology* (2008); 190: 3757–3767
- 171.** Wuppermann, F. N., Molleken, K., Julien, M., Jantos, C. A., Hegemann, J. H. *Chlamydia pneumoniae* GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEp-2 cells. *Journal of Bacteriology* (2008); 190: 3757–3767
- 172.** Xu, Z.H., Horwich, A.L., Sigler, P.B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature*. (1997); 388: 741-749.
- 173.** Yamaguchi, H., Osaki, T., Kurihara, N., Taguchi, H., Hanawa, T., Yamamoto, T., Kamiya, S. Heat-shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori* is associated with adhesion of *H. pylori* to human gastric epithelial cells. *Journal of Medical Microbiology* (1997a); 46: 825–831
- 174.** Yamaguchi, H., Osaki, T., Taguchi, H., Hanawa, T., Yamamoto, T., Kamiya, S. Flow cytometric analysis of the heat shock protein 60 expressed on the cell surface of *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology* (1996); 45: 270–277.
- 175.** Yamaguchi, H., Osaki, T., Taguchi, H., Hanawa, T., Yamamoto, T., Fukuda, M., Kawakami, H., Hirano, H., Kamiya, S. Growth inhibition of *Helicobacter pylori* by monoclonal antibody to heat-shock protein 60. *Microbiology and Immunology* (1997b); 41: 909–916
- 176.** Yang, J., & Zhang, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic acids research*. (2015); 43(W1), W174-W181.

- 177.** Yang, J., Zeng, H.M., Lin, H.F., Yang, X.F., Liu, Z., Guo L.H., Yuan, J.J., Qiu, D.W. An insecticidal protein from *Xenorhabdus budapestensis* that result in prophenoloxidase activation in the wax moth, *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol.* (2012); 110:60-67.
- 178.** Yoshida, N., Oeda, K., Watanabe, E., Mikami, T., Fukita, Y., Nishimura, K., Komai, K., Matsuda, K. Protein function: chaperonin turned insect toxin. *Nature.* (2001); 411:44.
- 179.** Yuan, W., Tuttle, D.L., Shi, Y.J., Ralph, G.S., Dunn, W.A Jr. Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the alpha-subunit of phosphofructokinase. *J Cell Sci.* (1997); (Pt 16):1935-45
- 180.** Zaborina, O., Misra, N., Kostal, J., Kamath, S., Kapatral, V., El-Idrissi, M. E., Prabhakar, B. S., Chakrabarty, A. M. P2Z-Independent and P2Z receptor-mediated macrophage killing by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Infection and Immunity* (1999); 67: 5231–5242
- 181.** Zarankiewicz, T., Madej, J., Galli, J., Bajzert, J., Stefaniak, T. Inhibition of in vitro *Histophilus somni* biofilm production by recombinant Hsp60 antibodies. *Polish Journal of Veterinary Science* (2012); 15: 373–378
- 182.** Zhang, L., Koivisto, L., Heino, J., Uitto, V. J. Bacterial heat shock protein 60 may increase epithelial cell migration through activation of MAP kinases and inhibition of alpha6beta4 integrin expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2004a); 319: 1088–1095.
- 183.** Zhang, L., Pelech, S. & Uitto, V. J. Long-term effect of heat shock protein 60 from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on epithelial cell viability and mitogen-activated protein kinases. *Infection and Immunity* (2004b); 72: 38–45.
- 184.** Zhang, L., Pelech, S., Uitto, V. J. Bacterial GroEL-like heat shock protein 60 protects epithelial cells from stress-induced death through activation of ERK and inhibition of caspase 3. *Experimental Cell Research* (2004 c); 292: 231–240.
- 185.** Zhao, Y., Yokota, K., Ayada, K., Yamamoto, Y., Okada, T., Shen, L., Oguma, K. *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces interleukin-8 via a Toll-like receptor (TLR)2 and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway in human monocytes. *Journal of Medical Microbiology* (2007); 56: 154–164
- 186.** Zügel, U., & Kaufmann, S. H. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews* (1999); 12(1), 19-39.



Article

Comparative genomics and pathogenicity analysis of two bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes: The role of the GroEL protein in virulence

Abraham Rivera-Ramírez ¹, Rosalba Salgado-Morales ², Alfredo Jiménez-Pérez ³, Rebeca Pérez-Martínez ², Blanca Inés García-Gómez ⁴ and Edgar Dantán-González ^{2,*}

¹ Posgrado en Ciencias, Instituto de Investigaciones en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos, México; abraham.rivera@uaem.mx.

² Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos, México; salgadamoralesr@hotmail.com (R.S.-M.); rebeca_62533@hotmail.com

³ Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Calle Ceprobi No. 8, San Isidro, Yautepec, 62739 Morelos, México; aljimenez@ipn.mx

⁴ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, 62250, Morelos, México. blanca.garcia@ibt.unam.mx

* Correspondence: edantan@uaem.mx; Tel.: +52-777-329-7000

Citation: Rivera-Ramírez, A.; Salgado-Morales, R.; Jiménez-Pérez, A.; Pérez-Martínez, R.; García-Gómez, B.I.; Dantán-González, E. Comparative genomics and pathogenicity analysis of two bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes: The role of the GroEL protein in virulence. *Microorganisms* **2022**, *10*, x.

<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s):

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Bacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* are symbionts of entomopathogenic nematodes. Despite their close phylogenetic relationship, they show differences in their pathogenicity and virulence mechanisms in target insects. These differences were explored by the analysis of the pangenome, as it provides a framework for characterizing and defining the gene repertoire. We performed the first pangenome analysis of 91 strains of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, the analysis showed that the *Photorhabdus* genus has a higher number of genes associated with pathogenicity. However, biological tests showed that whole cells of *X. nematophila* SC 0516 were more virulent than those of *P. luminescens* HIM3 when both were injected into *G. mellonella* larvae. In addition, we cloned and expressed the GroEL proteins of both bacteria, as this protein has been previously indicated to show insecticidal activity in the genus *Xenorhabdus*. Cpn60-Xn was found to be the most toxic at all concentrations tested, with an LC50 value of 102.34 ng/larva. Sequence analysis suggested that the Cpn60-Xn toxin was homologous to Cpn60-PI; however, Cpn60-Xn contained thirty-five differentially substituted amino acid residues that could be responsible for its insecticidal activity.

Keywords: *Xenorhabdus*; *Photorhabdus*; pangenome; pathogenicity, *G.mellonella*; chaperonin

1. Introduction

Xenorhabdus and *Photorhabdus* are closely related phylogenetic groups belonging to the family Enterobacteriaceae; they are Gram-negative gammaproteobacteria that have evolved to form symbiotic associations with soil entomopathogenic nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae, respectively [1]. These bacteria have a complex life cycle involving a mutualistic symbiotic stage, in which the bacteria become established and colonize the nematode gut, and a pathogenic stage, in which susceptible insects become infected with the nematode via its entry through natural openings such as respiratory spiracles, the mouth or the anus [2]. Once the bacteria are inside the hemocoel, they actively replicate and release compounds that have the potential to suppress the host insect’s immune response as a protective strategy to maintain symbiosis with the

nematode. The bacterium enters the stationary phase of its growth cycle, resulting in the production of a wide range of compounds, including toxins, phospholipases, proteases and antibiotics. Degradative enzymes bioconvert the macromolecules of the insect, thus providing a supply of essential nutrients to the nematode in its reproduction and development cycle, while antibiotic substances inhibit the growth of other microorganisms that might compete for the carcass [3, 4]. During the final stages of development, the nematode and bacteria reassociate, and there is a corresponding decrease in nutrients. These processes lead to the differentiation of the nematode from the juvenile stages to the infective juvenile (IJ) stage, in which it no longer feeds on the insect. Infective juveniles carrying bacteria in their intestinal tract emerge from insect carcasses in search of new prey [5–7].

Although the life cycle of this nematode-bacteria symbiotic complex shows a high degree of similarity, there are differences in the life cycle itself and in the mechanism of pathogenicity, which involves evasion of the insect immune system and the expression of virulence factors [8]. Some studies have suggested the existence of functionally divergent mechanisms of these functions [9–11]. One approach to the study of these differences is comparative genomics, which allows the comparison of complete genomes and provides abundant genetic information to elucidate genomic structural landmarks, novel gene repertoires and phylogenetic relationships between different organisms. The fundamental goal of comparative genomics is to achieve pangenome analysis from genomes [12, 13]. The pangenome is composed of a core genome, which includes all the genes present in all the strains studied and probably encodes functions related to the basic biology and phenotypes of the species, and an "accessory or dispensable genome," which is composed of genes present in some but not all strains studied as well as strain-specific genes. The dispensable genome is generally associated with nonessential functions, in addition to conferring selective advantages such as adaptability to the ecological niche, the ability to colonize new environments and antibiotic resistance [13–16]. To date, there have been no pangenome analyses of the entomopathogenic bacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*.

In this work, we sequenced and reported the genome of *Xenorhabdus nematophila* SC 0516. In addition, we performed a pangenome analysis with the complete genome sequence data available from 91 different strains of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* and determined the phylogenetic position of our strain using the core genome. We also characterized the virulence capacity of *X. nematophila* SC 0516 in a strain previously assessed in our laboratory, identified as *Photorhabdus luminescens* HIM3, and we further characterized a protein component with unique properties, GroEL, which is a chaperonin shared by both strains with differential insecticidal activity.

2. Materials and Methods

2.1. Maintenance of insects and nematodes

Galleria mellonella was maintained at a temperature of 25 ± 2 °C with a light/dark (LD) photoperiod of 12:12 h and relative humidity (RH) of $70 \pm 10\%$ and was cultured on an artificial diet. The nematodes were reared on last-instar *G. mellonella* larvae, and infective juveniles (IJs) were recovered from white traps at 12–14 days after inoculation with IJs.

2.2. Bacterial growth

Bacterial strains were grown on NBTA medium (nutrient agar supplemented with 0.025 g bromothymol blue and 0.04 g 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride per liter). For experimental purposes, a 48-h colony was transferred to 50 mL nutrient broth medium (NB) in a 250 mL Erlenmeyer flask and incubated at 25 ± 1 °C at 120 rpm for 24 h.

2.3. Genome collection

A total of 91 sequences were collected from the annotated genomes of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* available in the open access RefSeq: NCBI Reference Sequence Database,

among which 14 were complete, and 77 were drafts in various stages of completion. As a selection criterion, genomes that were highly fragmented (> 300 contigs) were excluded. Three complete *Yersinia pestis* genomes were included in the phylogenetic analysis.

2.4. Genome sequencing and annotation

Genomic DNA from *X. nematophila* SC 0526 was extracted using the ZR Fungal/Bacterial MiniPrep™ Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Subsequently, 5 µg of genomic DNA was sequenced on the Illumina MiSeq platform. Read quality was analyzed with FastQC [17]. Illumina adapter sequences were removed using the ILLUMINACLIP trimming step of Trimmomatic v0.39 software [18]. Low-quality bases were removed from Illumina paired-end reads using the DynamicTrim algorithm of the SolexaQA++ v3.1.7.1 software package with a Phred quality score of Q=13 [19]. Paired-end reads were assembled de novo using the SPAdes v3.14.1 program with the following options: i) only run the assembly module (-only-assembler); ii) reduce the number of mismatches (-careful); and iii) k-mer lengths between 21 and 71, which generated 248 contigs [20]. Contigs of less than 500 bp in length were discarded, and the remaining contigs were used for a multidraft-based analysis using the genome of the *X. nematophila* YL001 strain via the MeDuSa v1.6 scaffolder [21]. A final assembly polishing step was performed by reassigning the filtered high-quality sequence reads to the ordered scaffolds using BWA and passing the resulting ordered binary alignments to SAMtools for indexing [22]. The indexed alignments were used for analysis by Pilon v1.23 [23]. The draft bacterial genome was automatically annotated using the RAST server version 2.0 [24] (available at <https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>), and 16S rRNA gene sequences were obtained using the RNAmmer server [25] (<http://www.cbs.dtu.dk/services/RNAmmer/>).

2.5. Phylogenomic analyses

The core genome phylogeny was estimated under the maximum likelihood (ML) criterion using the GET_HOMOLOGUES [26] and GET_PHYLOMARKERS [27] software suites. The get_homologues.pl program was used in combination with compare_clusters.pl to compute a consensus core genome resulting from clustering BLASTP results (with 90% query coverage) with the BDBH (Bi-directional Best Hits), COG triangles and OrthoMCL (Markov Clustering of orthologs) algorithms implemented in GET_HOMOLOGUES [28]. Domain search was allowed in PFAM for the last runs. A consensus pangenome was similarly computed from COG triangles and OMCL clusters. The pangenome consensus clusters were input into the GET_PHYLOMARKERS pipeline to select alignments with optimal phylogenetic attributes (no significant evidence of recombination, producing tree topologies and branch lengths that did not deviate significantly from the expected distribution of these parameters and showing average branch support values > 0). 6). The alignments that passed these filters were concatenated, and an ML phylogeny was estimated with IQ-TREE 1.6.1 [29] using the best-fit model and choosing the phylogeny with the highest probability score of those found among independent searches. Finally, the phylogeny was rooted using the *Y. pestis* genomes. Phylogenetic trees were visualized and edited with FigTree v1.4.3 [30].

2.6. Pathogenicity assays in *Galleria mellonella*

Pathogenicity bioassays in *G. mellonella* were performed by the direct injection of 10¹, 10² or 10³ CFUs of *X. nematophila* SC 0516 into the hemolymph of fifth-instar larvae of *G. mellonella*. Larvae were 6/13 selected by weight (250 to 350 mg) in all trials. A final volume of 10 µl of LB containing the bacterial suspension was injected into the hemolymph of individual insects in the last left pro-leg with a 31-gauge insulin needle (BD Medical-Diabetes Care, Holdrege, NE, USA). Equivalent doses of *P. luminescens* HIM3 and *E. coli* DH5α (negative control) were used in all assays. Fifteen larvae were used per dose, and each larva was placed in a 9 cm Petri dish. Experiments were performed four times in

independent bioassays (n=60), and survival was assessed at 12, 24, 36 and 48 hours post infection. 145
146

2.7. Cloning, expression and purification of GroEL proteins 147

Based on the genomic information obtained from the bacteria, specific primers were 148
designed for the PCR amplification of the groEL sequences of *X. nematophila* SC 0516 (Fw: 149
5' CATATGGCAGCTAAAGACGTAAAATTTG 3' and Rv: 5' 150
GAATTCACATCATGCCGCCCATCCAC 3') and *P. luminescens* HIM3 (Fw: 5' CAT- 151
ATGGCAGCTAAAGACGTAAAATTTG 3' and Rv: 5' 152
GTCGACTTACATCATGCCGCCCATACCG 3'). The 1.7 kb coding sequences were 153
cloned into the pJET1.2 blunt vector (Thermo Scientific), and the resultant constructs were 154
transformed into *E. coli* DH5 α cells following the protocol described by the manufacturer. 155
Subsequently, the 1.7 Kb fragments of both vectors were ligated into the expression vector 156
pET28a, and these constructs were transformed into *E. coli* BL21DE3, thus producing the 157
recombinant protein-producing strains XnGroEL and PlGroEL. These cells were grown at 158
37 °C and 150 rpm in LB medium containing 50 μ g/ml kanamycin until an O.D. of 0.5 was 159
reached, when gene expression was immediately induced by the addition of 1 mM IPTG 160
for 4-5 hours. Cells were washed and lysed by sonication, and the cell debris-free super- 161
natant was filtered through a cold agarose-acetic acid-nickel agarose affinity column (Ni- 162
NTA Agarose QIAGEN) following the manufacturer's recommended protocol. 163

2.8. Evaluation of the insecticidal activity of GroEL proteins 164

The insecticidal activity of the GroEL proteins from *X. nematophila* SC 0526 (named 165
Cpn60-Xn) and *P. luminescens* HIM3 (named Cpn60-Pl) was evaluated in fifth-instar *G.* 166
mellonella larvae using doses of 100, 200, 500, 1000 and 2000 ng of protein per larva. Injec- 167
tion was performed directly into the insect hemolymph with 0.3 ml 31G X 6 mm Ultra 168
Fine U-100 insulin syringes (BD Medical-Diabetes Care, Holdrege, NE, USA). The final 169
injection volume was 10 μ l in all treatments, and BSA (2000 ng) was used as a negative 170
control. The assays were repeated three times using 15 larvae per treatment. The 50% le- 171
thal dose of the purified proteins was assessed using semilogarithmic regression, apply- 172
ing the logarithm base 10 of the protein concentrations and using the following formula: 173
 $y = 42.73 * x - 35.79$. 174

2.9. Sequence and Structure Analysis 175

The global alignment of the GroEL sequence of *X. nematophila* SC 0516 with that of *P.* 176
luminescens HIM3 was performed with the program Clustal Omega [31]. I-TASSER [32] 177
was used to generate the three-dimensional structure, which was visualized and analyzed 178
with VMD [33, 34]. 179

2.10. Statistical analysis 180

Survival analysis, which is generally a set of methods for analyzing data in which the 181
outcome variable is time to the occurrence of an event of interest (mortality), was per- 182
formed. Data from the experiments (n=60) were plotted using the Kaplan–Meier estima- 183
tor, a nonparametric statistic, and a log-rank test was performed to detect significant dif- 184
ferences between treatments. To isolate one or more groups that differed from the others, 185
a multiple comparison procedure was carried out using the Holm-Sidak method. In both 186
cases, $p > 0.005$ was the rejection probability. 187

In the case of semilogarithmic linear regressions, ANCOVA was performed to detect 188
significant differences between the two lines, with a probability of rejection of $p > 0.005$. 189

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 8.4.3 (GraphPad 190
Software Inc., San Diego, CA, USA). 191

3. Results 192

3.1. Genomic Features and Assembly Metrics of the SC 0516 strain

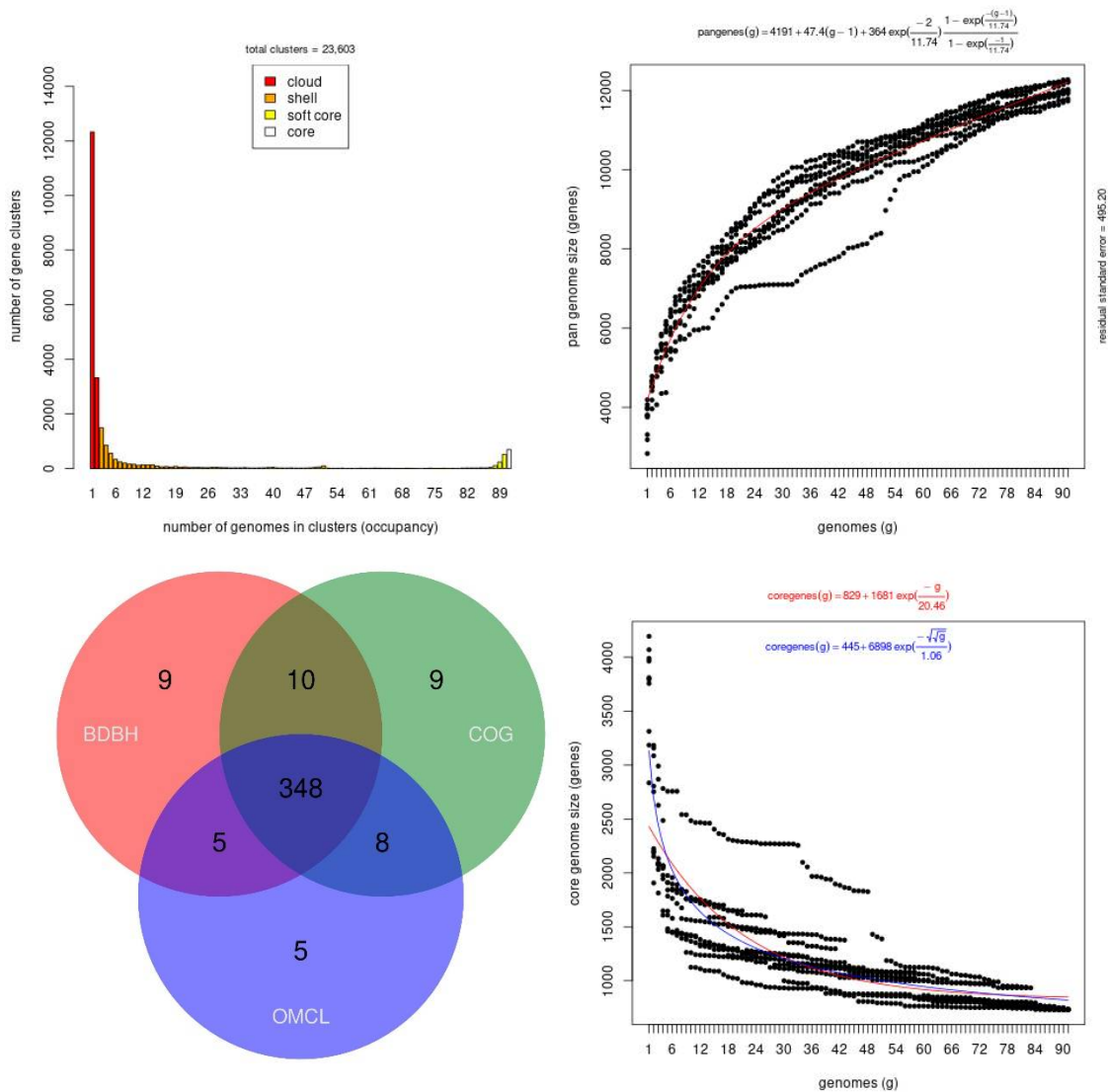
In the present study, bacterial strain SC 0516 was isolated from the hemolymph of infected larvae as well as from a macerate of infective juvenile *Steinernema carpocapsae* larvae. In addition, the bacterial genome of SC 0516 was sequenced and assembled de novo. The draft genome of strain SC 0516 was 4,179,879 bp in length, with 142-fold genome coverage and an approximately 43.5% G+C content. A total of 103 contigs were generated, with an N50 contig length of 73,255 bp and an L50 value of 16 contigs. No plasmids were detected in the analysis.

To functionally analyze the genome of strain SC 0516, the contigs were subjected to subsystem annotation on the RAST server. A total of 4174 protein-coding genes, including 51 tRNAs, 5 rRNAs and 5 noncoding RNAs, were assigned to 336 annotated subsystems, which can be defined as biological processes that are components of metabolism or structural complexes supported by a set of functional roles. Most of these genes were predicted to be involved in the metabolism of amino acids and derivatives (309 genes), proteins (189 genes) and carbohydrates (150 genes).

This whole-genome shotgun project has been deposited in GenBank under accession number JACDOS000000000.1. The version described in this article is the first version.

3.2. Pangenome and phylogenetic analysis of *Xenorhabdus nematophila* SC 0516

A pangenome consists of core genes (i.e., genes found in all strains of a genus or species), flexible genes (found in more than one strain but not all strains), and single genes (found in only one strain, also known as accessory genes). We included 77 drafts and 14 complete genomes of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria in the analysis (Supplementary Data 1). As a selection criterion, genomes that were highly fragmented (> 300 contigs) were excluded. The consensus pangenomic matrix of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* from our dataset consisted of 23,603 gene clusters (Figure 1A). More than half of the complete set of genes constituting the pangenome (15,662 genes, 66%) were found to be uniquely present (referred to as a cloud genome), meaning that each strain contributed approximately 172 new genes on average to the pangenome. The shell genome (genomes \geq 50%) and the soft core (genomes = 95%) consisted of 6,311 and 1,630 gene clusters, respectively (Figure 1A). This analysis showed that the pangenome of both genera has an open form (Figure 1B). This occurs when the number of new gene families continues to increase in a taxonomic lineage and this increase does not appear to be asymptotic, regardless of how many new genomes are added to the pangenome; higher rates of gene gains by horizontal gene transfer (HGT) are characteristic of these lineages [16, 35]. The core genome was characterized as the set of genes present in all the genomes analyzed. We established that the core genome contained approximately 348 genes that were present in all 91 genomes studied, representing 1.4% of the pangenome (Figure 1C). However, the core genome presented a negative trend due to the addition of new strains, as the probability of gene sharing between strains decreased as new strains were incorporated into the study sample (Figure 1D). This was consistent with studies revealing a general negative relationship between pangenome size and the proportion of core genes, where larger "open" pangenomes have a lower proportion of core genes [36]. Overall, the *Xenorhabdus*-*Photorhabdus* pangenome showed a high level of genome variability, with only 1% of its genome being constant. Thus, the remaining 66% of the pangenome is presented as a variable piece of DNA composed of a wide repertoire of genes and molecular functions.



238

239

Figure 1. (A) Barplot of the frequency of genes within the 91 genomes included in this analysis. Genes present in a single genome represent lineage-specific genes, while at the opposite end of the scale, genes found in all 91 genomes represent the core genome. (B) Plot of the estimated pangenome sizes of *Xenorhabdus* - *Photorhabdus* fitted with the Tettelin function. (C) Venn diagram of the core genome generated by the BDBH, COG, and OMCL algorithms. (D) Plot of the estimated core genome sizes of *Xenorhabdus* - *Photorhabdus*.

240
241
242
243
244

To our knowledge, this was the first pangenomic analysis of the *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* genera in which the core genomes were examined using BDBH, COG and OMCL strategies. Based on most of the genes that are part of the core genome grouping according to the NCBI Clusters of Orthologous Groups (COGs) database, a high percentage of the genes are involved in the generation and conversion of energy processes (29.35%), translation, ribosome structure and biogenesis (19.18%), amino acid transport and metabolism (12.40%) and replication, recombination and repair (11.61%), as shown in Figure 2.

245
246
247
248
249
250
251
252

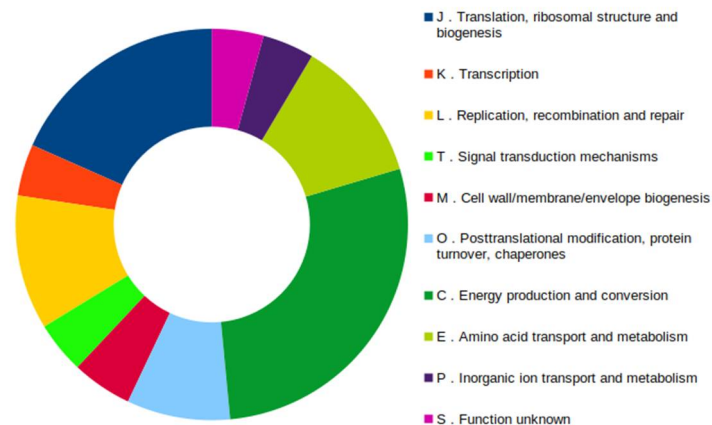


Figure 2. COG functional classification of the genes belonging to the core genome. COG database annotation was used to classify the 348 members belonging to the core genome. The abundance of specific gene classes is shown.

The taxonomic position of strain SC 0516 was assessed using a maximum likelihood core genome phylogeny calculated from the 281 highest-scoring markers selected by the GET_PHYLOMARKERS pipeline from the 348 consensus groups calculated by GET_HOMOLOGUES. Three complete genomes of *Y. pestis* were included in the phylogenetic analysis. The core genome phylogeny showed that our strain, SC 0516, was clustered with the species *X. nematophila*, as shown in Figure 3. Strain SC 0516 is closely related to *X. nematophila* YL001 (GenBank accession number CP032329.1), which was isolated from nematodes from a soil sample collected in the locality of Shanxi, China. The strength of the phylogenetic tree obtained using this core genome-based approach resolved clades with maximum support.

In addition, this analysis allowed us to locate genus-specific genes of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, highlighting those genes involved in pathogenicity and virulence. Overall, we found that the genus *Xenorhabdus* did not possess unique elements related to pathogenicity and virulence. However, the distinctive genes present in the genus included genes associated with tellurium resistance and polyamine transport. On the other hand, the genus *Photorhabdus* presented 29 unique elements associated with virulence and pathogenicity related to the type III secretion system, pilus structures and fimbriae (Supplementary Data 2). This analysis was consistent with previous observations that the genus *Photorhabdus* possesses genes related to the type III secretion system that are absent in *Xenorhabdus*; these genes play an important role in host insect invasion as well as the secretion of toxins and various virulence factors [10, 11, 37, 38]. These results reveal that, although the members of these genera are phylogenetically related bacteria with similar lifestyles, they may differ drastically in their molecular mechanisms of pathogenicity in the same host, and *Xenorhabdus* probably uses different effectors and secretion systems, which could be reflected in the differences in virulence capacity between the two genera.



Figure 3. Maximum likelihood core genome phylogeny. The ML tree is based on 281 consensus protein-coding genes defined by the GET_HOMOLOGES package and filtered through GET_PHYLOMARKERS selected for their optimal phylogenetic attributes. Nodal support values are color-coded as shown in the legend. The first value corresponds to approximate Bayesian support values, and the second corresponds to ultrafast bootstrap values, as implemented in IQTREE. The scale represents the number of expected substitutions per site under the best-fit GTR2+F+R3 (binary) model. The phylogeny corresponds to the tree with the highest score (lnL = -3045265.731) found among 10 independent searches in IQTREE.

3.3. Evaluation of pathogenicity in Galleria mellonella

To evaluate the pathogenicity of our strain, *X. nematophila* SC 0516, survival experiments were performed in *G. mellonella* by injecting different doses of colony forming units

281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290

(CFUs). For a comparative analysis of pathogenicity, we used a bacterial strain previously characterized in our working group, identified as *Photorhabdus luminescens* HIM3 [39]. Bioassays showed that both bacteria were pathogenic to *G. mellonella* larvae, as demonstrated by the mortality rate visualized in Kaplan–Meier survival curves, which differed significantly from the control (*E. coli* DH5 α) ($X^2= 457.636$, $df= 6$, and $p <0.001$), as shown in Figure 4. This analysis revealed that *X. nematophila* SC 0516 was more virulent than *P. luminescens* HIM3 at all doses used (Figure 4). This difference was also illustrated by the median survival times (the time for which 50% of the larvae survive) estimated from the Kaplan–Meier survival analysis. In the case of *X. nematophila* SC 0516, the median times were 26.4 and 24 hours for doses of 10^2 and 10^3 CFUs, respectively, and 30.4 hours for a dose of 10^1 CFUs. However, *P. luminescens* HIM3 showed median times of 37.2 and 36 hours for doses of 10^2 and 10^3 CFUs, respectively, and 41 hours for a dose of 10^1 CFUs (Table 1). We also observed differences in the phenotypes of the dead larvae. In the larvae treated with *X. nematophila* SC 0516, a slight darkening of the body was observed after 48 hours of treatment, while those treated with *P. luminescens* HIM3 developed a dark reddish color at the same time. No external symptoms were observed in the control larvae (treated with *E. coli* DH5 α) (Supplementary Figure S1).

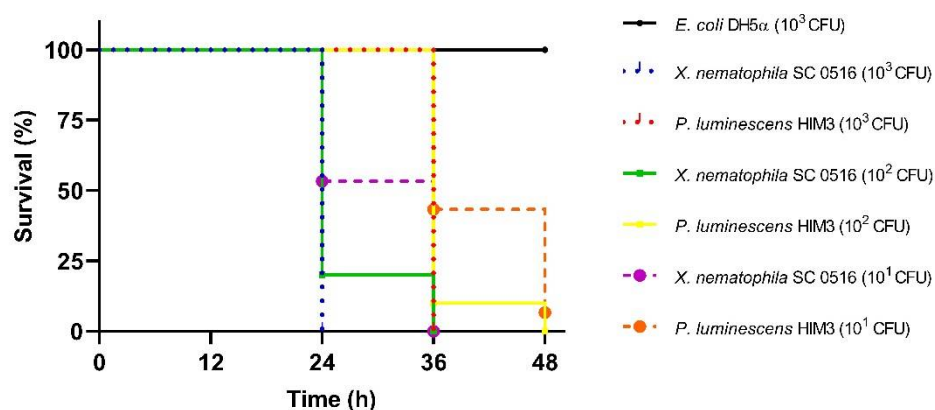


Figure 4. Kaplan–Meier survival curves of *G. mellonella* larvae after direct injection with *X. nematophila* SC 0516. Experiments were performed four times in independent bioassays, and survival was assessed at 12, 24, 36 and 48 hours after infection. Differences in survival ($n=60$) were calculated using the log-rank test $X^2= 457.636$, $df= 6$, $p <0.001$.

Table 1. Survival time (h) of *G. mellonella* larvae injected with different doses of colony forming units (CFUs) of *X. nematophila* SC 0516 and *P. luminescens* HIM3.

Strain	10^1 CFU	10^2 CFU	10^3 CFU
<i>E.coli</i> DH5 α	-	-	48 A
<i>P.luminescens</i> HIM3	41 ± 0.771 B	37.2 ± 0.469 B	36 B
<i>X. nematophila</i> SC 0516	30.4 ± 0.779 C	26.4 ± 0.625 C	24 C

Log-Rank test: 457.636 , $df= 6$, $p <0.001$. Survival time on the same column followed by the same letter are not significantly different (Holm-Sidak test, $p >0.05$).

To explain these differences, we looked for unique virulence- and pathogenicity-related elements present in the genomes of both bacteria. Our analysis showed that *P. luminescens* HIM3 presented a higher number and diversity of pathogenicity- and virulence-associated components than *X. nematophila* SC 0516 in almost all categories (Figure 5). The only unique elements presented by *X. nematophila* SC0516 were the mcf (makes caterpillars floppy) toxin (reported in the literature as a highly insecticidal toxin) and a higher number of genes associated with the type IV secretion system (T4SS) and the type I toxin-antitoxin system (Figure 5). An et al., 2009 compared the gene expression of *Photorhabdus temperata*

and *Xenorhabdus koppenhoeferi* in vivo in the insect *Rhizotrogus majalis* and found that more than 60% of the genes were uniquely induced in one of the two bacteria [40]. However, in *Xenorhabdus* bacteria, the mechanisms of toxin delivery to the insect are not completely known, although some mechanisms of secretion through the flagellar apparatus or by vesicular systems of the outer membrane have been suggested [41,42]. The pathogenicity of some Gram-negative bacteria depends on their ability to secrete virulence factors into the mammalian host through the release of outer membrane vesicles (OMVs). Some virulence factors of OMVs include proteases, hemolysins, phospholipids and lipopolysaccharides [43,44]. The analysis of OMV proteins led to the identification of a 58 kDa GroEL homolog as a major component of a complex that has been characterized as a virulence factor with insecticidal activity in some *Xenorhabdus* species, including *X. nematophila* [45,46]. These factors, termed moonlighting proteins, escaped our pangenome analysis, as was the case for the GroEL chaperonin, and could explain the differences in pathogenicity and virulence found between the two bacteria.

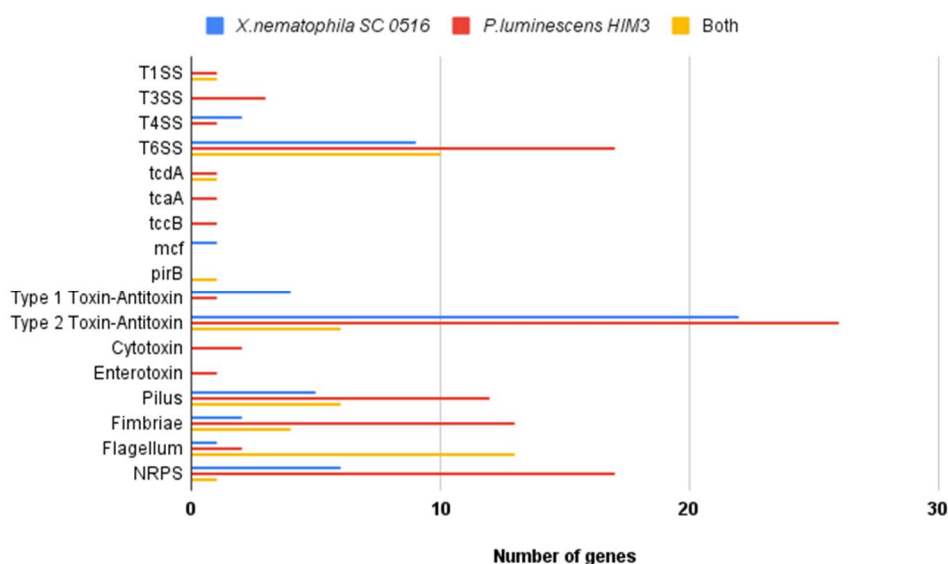


Figure 5. Unique and shared genes between *X. nematophila* SC 0516 and *P. luminescens* HIM3. The X axis indicates the total number of genes present in one or both bacteria, and the Y axis indicates the types of genes associated with virulence: Type Secretion System (TSS), Toxin Complex (tc), Makes Caterpillars Floppy (mcf), Photorhabdus Insect Related Toxins (Pir) and NRPS (Non-Ribosomal Peptide Synthetases).

3.4. Evaluation of the insecticidal activity of GroEL proteins

In this case, we decided to clone and express the GroEL proteins from both bacteria, and we named them Cpn60-Xn and Cpn60-Pl (Supplementary Figure S2). It should be noted that genomic data obtained from these bacteria show that they possess only a single copy of the groEL gene. The biological activity of the two purified proteins was evaluated by a direct hemolymph injection method. This method introduced the protein directly into the insect, mimicking the release of toxins by bacteria, a phenomenon that occurs shortly after a nematode infects a target insect.

The bioassay results indicated that only the Cpn60-Xn protein killed a high percentage of *G. mellonella* larvae and that the mortality rate depended on the concentration of protein used. The relationship between larval death and the protein concentration was assessed by semilogarithmic linear regression analysis, and the slope values (m) representing toxicity were 42.73 and 16.87 for Cpn60-Xn and Cpn60-Pl, respectively; thus, the difference between the slopes was highly significant ($F= 31.50$, $DFn= 1$, $DFd= 26$, $p<0.001$). (Figure 6). The 50% lethal concentration (LC50) of the purified Cpn60-Xn protein was found to be 102.34 ng/larvae. No external symptoms or mortality were observed in control

larvae infiltrated with PBS or BSA (2000 ng), or simply punctured. GroEL toxicity has been reported in *Enterobacter aerogenes* (EnGroEL) and some *Xenorhabdus* species. EnGroEL was shown to be a paralytic toxin that ultimately killed cockroaches of the genus *Blattella* when injected into the hemolymph at a minimum dose of 2.7 ± 1.6 ng [47]. Later, a GroEL protein from *X. nematophila* was purified and found to show insecticidal activity against larvae of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, after oral administration but showed no effect when injected into the hemolymph of this insect [48]. Two other proteins from *X. budapestensis* (HIP57) and *X. ehlersii* (XeGroEL) were shown to be toxic in *G. mellonella* larvae when injected into the hemolymph, with LC50 values of 206.81 and 0.76 ± 0.08 ng/larva, respectively [49, 50]. In the genus *Photorhabdus*, there is an initial report that GroEL is a protein component of an 860 kDa complex found in the toxic fraction of the *P. luminescens* W-14 extract (51); however, no direct evidence supporting this finding has been reported. Our work provides the first evaluation of the activity of this protein.

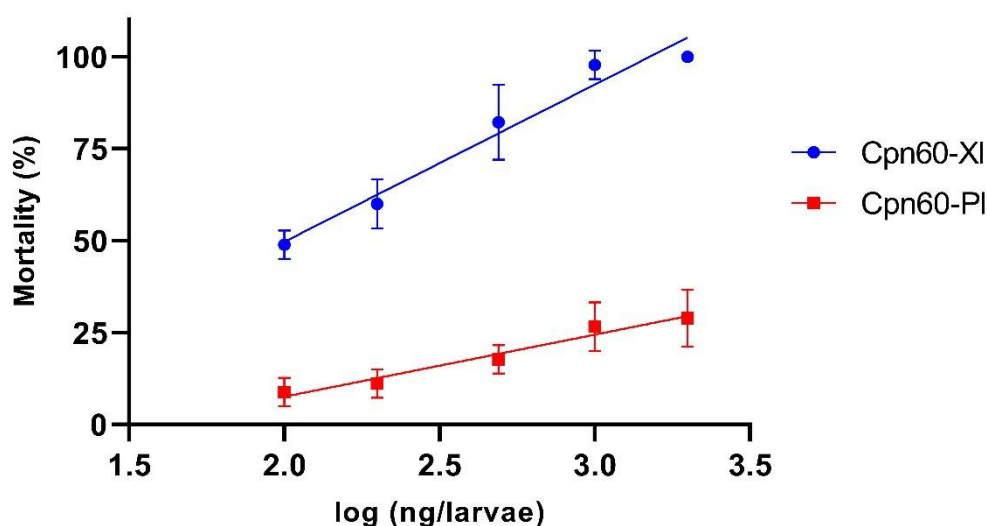


Figure 6. Insecticidal activity of GroEL from *X. nematophila* SC 0516 (Cpn60-Xn) and *P. luminescens* HIM3 (Cpn60-PI) against *G. mellonella* larvae. Plot of percent mortality against the protein concentration. Each dot in the plot represents the average of three individual experiments \pm standard error.

A global alignment of these two protein sequences showed that they were very similar, sharing 89.86% identity of 548 residues. Cpn60-Xn showed 35 substitutions relative to Cpn60-PI, which were distributed throughout the protein. A three-dimensional homology-generated model of Cpn60-Xn showed that 13 of these substitutions were located in the apical domain, 2 in the intermediate domain and 20 in the equatorial domain (Supplementary Figure S2). These point substitutions could be responsible for conferring the greater toxicity of Cpn60-Xn relative to Cpn60-PI.

5. Conclusions

In this study, we sequenced and reported the genome of *X. nematophila* strain SC0516, which allowed us to perform the first robust pangenomic analysis of 91 genomes of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, using three different algorithms. The results revealed that the differences between these two genera mainly involved genes belonging to the type III secretion systems and related to the fimbria and pilus, which are absent in the genus *Xenorhabdus*. Despite this, data from biological experiments related to pathogenicity and virulence showed that both the *X. nematophila* SC0516 and *P. luminescens* HIM3 strains were pathogenic; however, the former was more virulent at all concentrations tested, indicating differences in the mechanism of pathogenicity. In addition, the GroEL protein

(reported as a virulence factor in the genus *Xenorhabdus*) from *X. nematophila* SC0516 (Cpn60-Xn) showed significantly more insecticidal activity than that from *P. luminescens* HIM3 (Cpn60-PI) at all concentrations used in *Galleria mellonella* larvae when injected. The analysis of the GroEL sequences of both bacteria showed that this protein was highly conserved in *X. nematophila* SC 0516 and *P. luminescens* HIM3, although the former presented 13 specific differences that could contribute to explaining the difference in insecticidal activity.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title; Table S1: title; Video S1: title.

Author Contributions: A.R.R. conceptualized the experimental design, conducting experiment, analyzed the data and wrote the manuscript; R.S.M. performed bioassay with *G. mellonella* and revision of the manuscript; A.J.P. performed statistical analyses and proofreading of the manuscript; R.P.M. performed bioinformatics analyses and revision of the manuscript; B.I.G.G. technical assistance in bioassays and proofreading of the manuscript; E.D.G. conceptualized the experimental design, analyzed the data and wrote the manuscript.

Data Availability Statement: All data associated with this manuscript are given in the manuscript such as in the Supplementary Material the entire genome of *X.nematophila* SC0516 was sequenced and deposited in GenBank (NCBI) with the assigned accession number: JACDOS000000000.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JACDOS000000000.1/>)

Acknowledgments: In this section, you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Akhurst, R.J.; Dunphy, G.B. Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes, and their insect hosts. In: *Parasites and Pathogens of Insects*. Academic Press; 1993; Volume 2, pp. 1-23.
- Akhurst, R.J. Bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes: the power behind the throne. In: *Nematodes and the biological control of insect pests*. East Melbourne, Vic: CSIRO Australia; 1993; pp. 127-135.
- Forst, S.; Dowds, B.; Boemare, N.; Stackebrandt, E. *XENORHABDUS* AND *PHOTORHABDUS* SPP.: Bugs That Kill Bugs. *Annual Review of Microbiology* 1997, 51 (1), 47–72. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.47>.
- Owuama, C. I. Entomopathogenic Symbiotic Bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of Nematodes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2001, 17 (5), 505–515. <https://doi.org/10.1023/A:1011916021378>.
- Adams, B. J.; Fodor, A.; Koppenhöfer, H. S.; Stackebrandt, E.; Patricia Stock, S.; Klein, M. G. Reprint of "Biodiversity and Systematics of Nematode–Bacterium Entomopathogens". *Biological Control* 2006, 38 (1), 4–21. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(06\)00126-5](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(06)00126-5).
- Gulcu, B.; Cimen, H.; Raja R, K.; Hazir, S. Entomopathogenic Nematodes and Their Mutualistic Bacteria: Their Ecology and Application as Microbial Control Agents. *Biopesticides International* 2017, 13, 79–112.
- Sajnaga, E.; Kazimierczak, W. Evolution and Taxonomy of Nematode-Associated Entomopathogenic Bacteria of the Genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: An Overview. *Symbiosis* 2020, 80 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00660-0>.
- Hinchliffe, S. J. Insecticidal Toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* Bacteria. *TOTNJ* 2013, 3 (1), 101–118. <https://doi.org/10.2174/1875414701003010101>.
- Poinar, G. Nematode biopesticides *Fundam. Appl. Nematol.* 1998, 21, 733–737
- Goodrich-Blair, H.; Clarke, D. J. Mutualism and Pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Two Roads to the Same Destination. *Molecular Microbiology* 2007, 64 (2), 260–268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05671.x>.
- Chaston, J.M.; Suen, G.; Tucker, S.L. The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Convergent lifestyles from divergent genomes. *PLoS One* 2011, 6, e27909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027909>.
- Lu, Q.-F.; Cao, D.-M.; Su, L.-L.; Li, S.-B.; Ye, G.-B.; Zhu, X.-Y.; Wang, J.-P. Genus-Wide Comparative Genomics Analysis of *Neisseria* to Identify New Genes Associated with Pathogenicity and Niche Adaptation of *Neisseria* Pathogens. *International Journal of Genomics* 2019, 2019, e6015730. <https://doi.org/10.1155/2019/6015730>.
- Kim, Y.; Gu, C.; Kim, H. U.; Lee, S. Y. Current Status of Pan-Genome Analysis for Pathogenic Bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 2020, 63, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.001>.
- Tettelin, H.; Maignani, V.; Cieslewicz, M. J. Genome Analysis of Multiple Pathogenic Isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the Microbial "Pan-Genome." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005, 102 (39), 13950–13955. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506758102>.

- 15 Tettelin, H.; Riley, D.; Cattuto, C.; Medini, D. Comparative Genomics: The Bacterial Pan-Genome. *Current Opinion in Microbiology* 2008, 11 (5), 472–477. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.006>. 447
448
- 16 McNerney, J. O.; McNally, A.; O'Connell, M. J. Why Prokaryotes Have Pangenomes. *Nat Microbiol* 2017, 2 (4), 1–5. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.40>. 449
450
- 17 Wingett, S. W.; Andrews, S. FastQ Screen: A Tool for Multi-Genome Mapping and Quality Control. *F1000Res* 2018, 7, 1338. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.2>. 451
452
- 18 Bolger, A. M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 2014, 30 (15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>. 453
454
- 19 Cox, M. P.; Peterson, D. A.; Biggs, P. J. SolexaQA: At-a-Glance Quality Assessment of Illumina Second-Generation Sequencing Data. *BMC Bioinformatics* 2010, 11 (1), 485. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-485>. 455
456
- 20 Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Pribel-ski, A.D. Spades: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012, 19, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021> 457
458
459
- 21 Bosi, E.; Donati, B.; Galardini, M.; Brunetti, S.; Sagot, M.-F.; Lió, P.; Crescenzi, P.; Fani, R.; Fondi, M. MeDuSa: A Multi-Draft Based Scaffold. *Bioinformatics* 2015, 31 (15), 2443–2451. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv171>. 460
461
- 22 Li, H.; Durbin, R. Fast and Accurate Short Read Alignment with Burrows–Wheeler Transform. *Bioinformatics* 2009, 25 (14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>. 462
463
- 23 Walker, B. J.; Abeel, T.; Shea, T.; Priest, M.; Abouelliel, A.; Sakthikumar, S.; Cuomo, C. A.; Zeng, Q.; Wortman, J.; Young, S. K.; Earl, A. M. Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. *PLOS ONE* 2014, 9 (11), e112963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>. 464
465
466
- 24 Aziz, R. K.; Bartels, D.; Best, A. A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R. A.; Formsma, K.; Gerdes, S.; Glass, E. M.; Kubal, M.; Meyer, F.; Olsen, G. J.; Olson, R.; Osterman, A. L.; Overbeek, R. A.; McNeil, L. K.; Paarmann, D.; Paczian, T.; Parrello, B.; Pusch, G. D.; Reich, C.; Stevens, R.; Vassieva, O.; Vonstein, V.; Wilke, A.; Zagnitko, O. The RAST Server: Rapid Annotations Using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 2008, 9 (1), 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>. 467
468
469
470
- 25 Lagesen, K.; Hallin, P.; Rødland, E. A.; Stærfeldt, H.-H.; Rognes, T.; Ussery, D. W. RNAmmer: Consistent and Rapid Annotation of Ribosomal RNA Genes. *Nucleic Acids Research* 2007, 35 (9), 3100–3108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm160>. 471
472
- 26 Contreras-Moreira, B.; Vinuesa, P. GET_HOMOLOGUES, a Versatile Software Package for Scalable and Robust Microbial Pan-genome Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 2013, 455–477. <https://doi.org/10.1128/AEM.02411-13>. 473
474
- 27 Vinuesa, P.; Ochoa-Sánchez, L. E.; Contreras-Moreira, B. GET_PHYLOMARKERS, a Software Package to Select Optimal Orthologous Clusters for Phylogenomics and Inferring Pan-Genome Phylogenies, Used for a Critical Geno-Taxonomic Revision of the Genus *Stenotrophomonas*. *Frontiers in Microbiology* 2018, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00771>. 475
476
477
- 28 Vinuesa, P.; Contreras-Moreira, B. Robust Identification of Orthologues and Paralogues for Microbial Pan-Genomics Using GET_HOMOLOGUES: A Case Study of PIncA/C Plasmids. In *Bacterial Pangenomics: Methods and Protocols*; Mengoni, A., Galardini, M., Fondi, M., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, 2015; pp 203–232. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1720-4_14. 478
479
480
481
- 29 Nguyen, L.-T.; Schmidt, H. A.; von Haeseler, A.; Minh, B. Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 2015, 32 (1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>. 482
483
484
- 30 Rambaut, A. FigTree v1.4.4. Institute of Evolutionary Biology; University of Edinburgh: Edinburgh, UK, 2010. 485
- 31 Madeira, F.; Park, Y. mi; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A. R. N.; Potter, S. C.; Finn, R. D.; Lopez, R. The EMBL-EBI Search and Sequence Analysis Tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research* 2019, 47 (W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>. 486
487
488
- 32 Yang, J.; Zhang, Y. I-TASSER Server: New Development for Protein Structure and Function Predictions. *Nucleic Acids Research* 2015, 43 (W1), W174–W181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>. 489
490
- 33 Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics* 1996, 14 (1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5). 491
492
- 34 Roberts, E.; Eargle, J.; Wright, D.; Luthey-Schulten, Z. MultiSeq: Unifying Sequence and Structure Data for Evolutionary Analysis. *BMC Bioinformatics* 2006, 7 (1), 382. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-382>. 493
494
- 35 Treangen, T. J.; Rocha, E. P. C. Horizontal Transfer, Not Duplication, Drives the Expansion of Protein Families in Prokaryotes. *PLoS Genet* 2011, 7 (1), e1001284. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001284>. 495
496
- 36 Brockhurst, M. A.; Harrison, E.; Hall, J. P. J.; Richards, T.; McNally, A.; MacLean, C. The Ecology and Evolution of Pangenomes. *Current Biology* 2019, 29 (20), R1094–R1103. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.012>. 497
498
- 37 Brugirard-Ricaud, K.; Givaudan, A.; Parkhill, J.; Boemare, N.; Kunst, F.; Zumbihl, R.; Duchaud, E. Variation in the Effectors of the Type III Secretion System among *Photobacterium* Species as Revealed by Genomic Analysis. *Journal of Bacteriology* 2004. <https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4374381.2004>. 499
500
501
- 38 Brugirard-Ricaud, K.; Duchaud, E.; Givaudan, A.; Girard, P. A.; Kunst, F.; Boemare, N.; Brehélin, M.; Zumbihl, R. Site-Specific Antiphagocytic Function of the *Photobacterium Luminescens* Type III Secretion System during Insect Colonization. *Cellular Microbiology* 2005, 7 (3), 363–371. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00466.x>. 502
503
504

- 39 Salgado-Morales, R.; Martínez-Ocampo, F.; Obregón-Barboza, V.; Vilchis-Martínez, K.; Jiménez-Pérez, A.; Dantán-González, E. Assessing the Pathogenicity of Two Bacteria Isolated from the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis Indica* against *Galleria Mellonella* and Some Pest Insects. *Insects* 2019, 10 (3), 83. <https://doi.org/10.3390/insects10030083>. 505
- 40 An, R.; Sreevatsan, S.; Grewal, P. S. Comparative in Vivo Gene Expression of the Closely Related Bacteria *Photorhabdus Temperata* and *Xenorhabdus Koppenhoeferi* upon Infection of the Same Insect Host, *Rhizotrogus Majalis*. *BMC Genomics* 2009, 10 (1), 433. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-433>. 506
- 41 Cowles, K. N.; Goodrich-Blair, H. Expression and Activity of a *Xenorhabdus Nematophila* Haemolysin Required for Full Virulence towards *Manduca Sexta* Insects. *Cellular Microbiology* 2005, 7 (2), 209–219. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00448.x>. 507
- 42 Darsouei, R.; Karimi, J.; Dunphy, G. B. Functional Characterization of Outer Membrane Proteins (OMPs) in *Xenorhabdus Nematophila* and *Photorhabdus Luminescens* through Insect Immune Defense Reactions. *Insects* 2019, 10 (10), 352. <https://doi.org/10.3390/insects10100352>. 508
- 43 Schwechheimer, C.; Kuehn, M. J. Outer-Membrane Vesicles from Gram-Negative Bacteria: Biogenesis and Functions. *Nat Rev Microbiol* 2015, 13 (10), 605–619. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>. 509
- 44 Avila-Calderón, E. D.; Ruiz-Palma, M. del S.; Aguilera-Arreola, Ma. G.; Velázquez-Guadarrama, N.; Ruiz, E. A.; Gomez-Lunar, Z.; Witonsky, S.; Contreras-Rodríguez, A. Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria: An Outlook on Biogenesis. *Frontiers in Microbiology* 2021, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.557902>. 510
- 45 Khandelwal, P.; Banerjee-Bhatnagar, N. Insecticidal Activity Associated with the Outer Membrane Vesicles of *Xenorhabdus Nematophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2003. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2032-2037.2003>. 511
- 46 Khandelwal, P.; Bhatnagar, R.; Choudhury, D.; Banerjee, N. Characterization of a Cytotoxic Pilin Subunit of *Xenorhabdus nematophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, 314 (4), 943–949. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.187>. 512
- 47 Yoshida, N.; Oeda, K.; Watanabe, E.; Mikami, T.; Fukita, Y.; Nishimura, K.; Komai, K.; Matsuda, K. Chaperonin Turned Insect Toxin. *Nature* 2001, 411 (6833), 44–44. <https://doi.org/10.1038/35075148>. 513
- 48 Joshi, M. C.; Sharma, A.; Kant, S.; Birah, A.; Gupta, G. P.; Khan, S. R.; Bhatnagar, R.; Banerjee, N. An Insecticidal GroEL Protein with Chitin Binding Activity from *Xenorhabdus nematophila**. *Journal of Biological Chemistry* 2008, 283 (42), 28287–28296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804416200>. 514
- 49 Yang, J.; Zeng, H.-M.; Lin, H.-F.; Yang, X.-F.; Liu, Z.; Guo, L.-H.; Yuan, J.-J.; Qiu, D.-W. An Insecticidal Protein from *Xenorhabdus budapestensis* That Results in Prophenoloxidase Activation in the Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology* 2012, 110 (1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.02.006>. 515
- 50 Shi, H.; Zeng, H.; Yang, X.; Zhao, J.; Chen, M.; Qiu, D. An Insecticidal Protein from *Xenorhabdus Ehlersii* Triggers Prophenoloxidase Activation and Hemocyte Decrease in *Galleria mellonella*. *Curr Microbiol* 2012, 64 (6), 604–610. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0114-7>. 516
- 51 Guo, L.; Fatig, R. O.; Orr, G. L.; Schafer, B. W.; Strickland, J. A.; Sukhapinda, K.; Woodsworth, A. T.; Petell, J. K. *Photorhabdus Luminescens* W-14 Insecticidal Activity Consists of at Least Two Similar but Distinct Proteins: Purification and characterization of toxin a and toxin b *. *Journal of Biological Chemistry* 1999, 274 (14), 9836–9842. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9836>. 517