

CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN GÉNICA PLU3309 – PLU3314 DE *PHOTORHABDUS LUMINESCENS* SL0708



María Paula Catalina Mora
Gamboa

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
2019

**CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN GÉNICA PLU3309 – PLU3314 DE
PHOTORHABDUS LUMINESCENS SL0708**

María Paula Catalina Mora Gamboa

Wilson Terán Pérez, PhD
Director

Claudia Liliana Cuervo Patiño, PhD
Evaluador

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
2019

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Resumen	5
1. Introducción	7
2. Marco Teórico	8
<i>Photorhabdus luminescens</i>	8
Ciclo de vida.....	8
Genoma de <i>Photorhabdus luminescens</i> y sistemas de regulación de dos componentes.....	9
Sistema regulador de respuesta de dos componentes (2-component system response regulator).....	11
3. Objetivos	13
4. Metodología	13
4.1. Mantenimiento y crecimiento de la cepa.....	13
4.2. Análisis de la secuencia del locus plu3309 - plu3313 y diseño de prime.....	14
4.3. Extracción de ácidos nucleicos de <i>P. luminescens</i>	15
4.4. Transcripción inversa y determinación de la longitud de la unidad transcripcional.....	15
4.5. Técnica RACE.....	16
4.6. Identificación y clonación de la región promotora de operón <i>plu3313-plu3309</i>	16
4.7. Estandarización de la metodología para evaluar la actividad promotora a través a fusión transcripcional al gen reportero <i>gfp</i>	17
5. Resultados	17
Extracción de ARN y análisis RT-PCR	17
Amplificación de la región 5' del cDNA del operón plu3313-plu3310 mediante RACE	20
Clonación de la región candidata a promotor en el vector pCR2.1.....	21
Estandarización de la medición de fluorescencia de la proteína reportera GFP a partir de cultivos bacterianos	22
6 Discusión	25
7 Conclusiones	27
8. Bibliografía	28

Resumen

Photobabidus luminescens es una enterobacteria caracterizada por presentar un ciclo de vida complejo. Esta bacteria tiene la capacidad de alternar su ciclo de vida entre dos fases, una simbiótica, en donde se aloja en el intestino de nematodos entomopatógenos de la familia Heterorhabditidae. Estos nematodos se caracterizan por infectar larvas de insectos de Coleópteros y Lepidópteros. Tras la infección, la bacteria es regurgitada en las cavidades internas de las larvas en donde esta alterna su ciclo, presentando actividad patogénica contra los insectos. *P. luminescens* comparte algunos genes que codifican sistemas transductores de señales extracelulares, conocidos como sistemas de dos componentes (SDC), con otras enterobacterias patógenas de animales como *Yersinia enterocolitica* (GlnK y GlnR) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (YfhK y YfhA). En estas bacterias aún no es clara la molécula señal sensada por este sistema, sin embargo, se predice un papel hipotético en la regulación del metabolismo de nitrógeno y amino azúcares e involucrado en la interacción con el hospedero. Esto convierte a este sistema de dos componentes en un candidato de interés a estudiar, particularmente con respecto a su posible relación con la alternancia de estados simbiótico/patogénico de *P. luminescens*. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente la organización transcripcional de los genes contenidos en la región génica *plu3309 – plu3314* de *P. luminescens* SL0708. Se realizó una RT-PCR de las regiones intergénicas contenidas entre los genes *plu3309 – plu3314*, en donde se determinó que los genes *plu3310*, *plu3311*, *plu3312* y *plu3313*, pertenecen a un mismo operón, por lo que es probable que este sistema regulador de respuesta esté relacionado con la regulación del metabolismo de nitrógeno. Igualmente, no se evidenció promotor de este operón en la región intergénica *plu3313 – plu3314*, por lo que existe un solapamiento del promotor con el gen *plu3314*. Adicionalmente, se logró clonar la región candidata a promotor en el vector pCR2.1 para facilitar su subclonación al vector de destino final pPROBE. Finalmente, se realizó una estandarización preliminar de medición de fluorescencia de GFP en placa con el fin de contar con un sistema que permita a futuro la evaluación y monitoreo, dentro de cada hospedero, de la expresión transcripcional del SDC *plu3313-plu3311* por medio de una fusión transcripcional a GFP. Se evidenció interferencia del medio de cultivo y de los pozos translucidos de la microplaca sobre las mediciones de fluorescencia.

1. Introducción:

Photorhabdus luminescens es una enterobacteria caracterizada por su capacidad de producir luciferasas, e igualmente, por presentar un ciclo de vida complejo entre dos hospederos y en donde se han identificado dos fases, una simbiótica, en donde se aloja en el intestino de nematodos entomopatógenos de la familia Heterorhabditidae, los cuales tienen la capacidad de infectar larvas de insectos de Coleópteros y Lepidópteros [1]. Tras la infección, la bacteria es regurgitada en las cavidades internas de las larvas en donde entra en una nueva fase metabólica caracterizada por su alta virulencia y capacidad patogénica frente a larvas de insectos. *P. luminescens* se replica y secreta una alta cantidad de enzimas hidrolíticas y toxinas, que licúan y convierten los órganos y tejidos de las larvas en un ambiente adecuado para el desarrollo del nematodo [1, 2, 3].

Se ha reportado que estos nematodos de la familia Heterorhabditidae son de gran importancia por su aplicación como controladores biológicos de un amplio espectro de plagas de insectos y nematodos parásitos de plantas. Lo anterior representa una alternativa al uso indiscriminado de insecticidas químicos orgánicos e inorgánicos que presentan toxicidad para el consumidor y el ambiente [4]. Tal es el caso de *P. luminescens* SL0708, simbiote del nematodo *Heterorhabditis* sp. SL0708, aislado de suelos agrícolas del Departamento del Valle [5]. El papel de la bacteria en la patogenicidad y capacidad infectiva y controladora del nematodo es fundamental debido a que es la bacteria la principal productora de factores de virulencia y toxinas insecticidas. Por tal motivo, distintos estudios se han enfocado en describir la asociación nematodo-bacteria y su actividad patogénica contra las larvas de insectos, en donde se ha reportado la producción de ciertas adhesinas, proteasas, lipasas, toxinas y hemolisinas por parte de *P. luminescens* [6, 7].

Se han identificado diferentes genes asociados con esta patogenicidad, muchos de ellos codificando toxinas contra insectos, como los genes *plu4117* y *plu3668*, que codifican proteínas RTX, las cuales pueden ser citolíticas, metaloproteasas y lipasas. Igualmente se han identificado genes que codifican toxinas contra competidores, los genes *plu0250*, *plu2474*, *plu2475*, *plu2476*, que son similares a genes de *Burkholderia glumae*, y están involucrados en la producción de toxoflavina. Asimismo, se han identificado genes que tienen un papel importante en la interacción con el hospedero, como genes codificantes de adhesinas (*plu2096* y *plu2433*) entre otros [6].

A pesar de haber identificado distintos genes en *P. luminescens*, aún no se tiene claridad absoluta sobre las vías de regulación que condicionan la alternancia entre el estado simbiote avirulento y el estado patogénico entre sus dos hospederos, en particular no se tiene claridad aún sobre los sistemas de transducción de señales que permiten a *P. luminescens* sentir el ambiente contrastante asociado a estos dos estados de su ciclo de vida. Este trabajo tiene por objetivo caracterizar molecularmente la organización transcripcional de los genes contenidos en la región génica *plu3309 – plu3314* de *P. luminescens* SL0708, la cual contiene dos genes codificantes de un sistema regulador de dos componentes (*plu3313-plu3311*), el cual es un sistema de transducción de señales extracelulares que aún no ha sido caracterizado en esta bacteria.

2. Marco Teórico:

2.1 *Photorhabdus luminescens*

2.1.2 Ciclo de vida

Photorhabdus luminescens es una enterobacteria conocida por ser la única bacteria terrestre capaz de producir luciferasas [1] e igualmente, por presentar un ciclo de vida complejo (**Figura 1.**) *P. luminescens* se encuentra normalmente en el intestino de nematodos de la familia Heterorhabditidae, en estado juvenil infeccioso (JI). En esta etapa, el nemátodo no se alimenta, se desarrolla, y se dispersa por el suelo para infectar un nuevo hospedero. Cuando el nemátodo penetra la larva de insecto, *P. luminescens* es regurgitado del intestino del nemátodo y, en forma libre, se alimenta de la hemolinfa del insecto, y se replica produciendo una alta densidad celular (10^8 UFC después de 48 a 72 horas) [1, 2]. Así mismo, secreta una gran cantidad de enzimas hidrolíticas extracelulares (lipasas y proteasas) que convierten los órganos y tejidos del insecto en un ambiente adecuado para el desarrollo del nemátodo. Como consecuencia de la secreción de estos y otros factores de patogenicidad, entre ellos complejos de toxinas Pir AB, Mcf1 o Mcf2, casetes de virulencia y enzimas como proteasas, lipasas y fosfolipasas, las larvas de insecto mueren rápidamente [6].

Durante la septicemia el nemátodo desarrolla un estado hermafrodita en donde utiliza la biomasa de la larva como fuente de nutrientes para su desarrollo y crecimiento. Este estado es estimulado por señales de bajo peso molecular presentes en la hemolinfa del insecto y por señales que indican alta densidad de *Photorhabdus*. El nemátodo hermafrodita deja huevos que eclosionan y se desarrollan. Posteriormente, los nemátodos juveniles

reciben señales que estimulan el estado de diapausa y el desarrollo del estado JI en el cual se produce una recolonización del intestino de estos nematodos por parte de *P. luminescens* como simbiote [2].

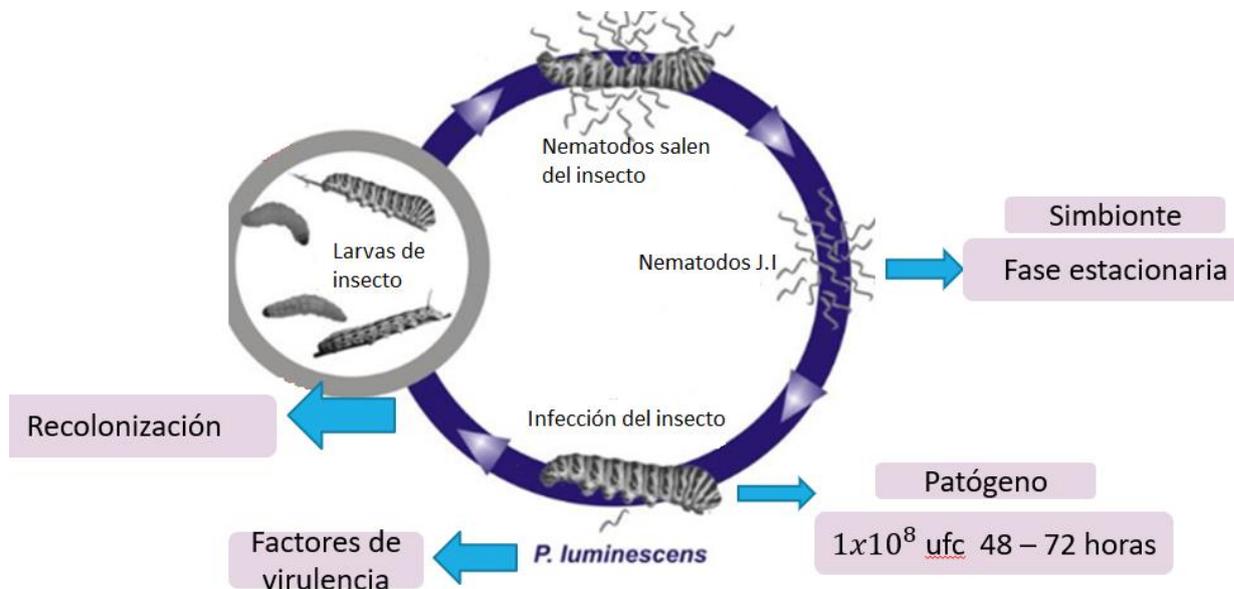


Figura 1. Ciclo de vida de *Photorhabdus luminescens*. (Modificado de Heermann et al., 2006)

2.1.3 Genoma de *Photorhabdus luminescens* y sistemas de regulación de dos componentes.

El genoma de la cepa de *P. luminescens* laumondii TT01 fue secuenciado en 2003 [6] lo cual ha permitido el desarrollo de diferentes aproximaciones de genómica funcional para ahondar en diferentes aspectos de la biología de esta bacteria. Este genoma está compuesto de un cromosoma circular de 5,688,987 pares de bases, con un 42.8% de GC. Así mismo, se reportan 4,839 genes codificantes de proteínas, incluyendo 157 pseudogenes, 7 conjuntos de ARN ribosomal y 85 de ARN de transferencia [6]. La cepa *Photorhabdus luminescens* SL0708 aislada de suelos colombianos presentó un 99.5% de identidad de secuencia en el gen ARNr16S con especies de este grupo [5]. Posteriormente, se pudo realizar una identificación molecular más robusta basada en un análisis filogenético poligénico, que permitió identificar a *P. luminescens* SL0708 como perteneciente a la subespecie *akhurstii* [7].

En *Photorhabdus luminescens* se ha identificado el papel que cumplen varios genes y su importancia en la regulación de las distintas interacciones con los nematodos, las larvas y competidores, sin embargo, aún no se tiene claridad sobre los aspectos regulatorios que

determinan los importantes cambios fenotípicos que ocurren entre los dos hospederos de esta bacteria, en particular sobre las proteínas o sistemas de señalización que permiten sentir a nivel extracelular las señales de cada hospedero de la bacteria.

La secuenciación del genoma de *P. luminescens* ha permitido la realización de estudios de genómica comparativa entre *P. luminescens* y otras enterobacterias como *Yersinia enterocolitica* [8] en los cuales se destaca que estas dos bacterias comparten 17 genes codificantes de sistemas reguladores de dos componentes (SDC), principales sistemas de transducción de señales empleados por las bacterias.

Entre estos sistemas, queda aún por definir la función biológica para dos de ellos, entre los cuales figura el sistema de dos componentes codificado por los genes *plu3313* y *plu3311*. Estos dos genes codifican las proteínas sensora de membrana y reguladora de respuesta respectivamente, proteínas que presentan gran similitud con las proteínas GlnK (Sensor like His-kinase) y GlnR (Two-component Transcriptional Regulator) de *Y. enterocolitica* a su vez ortólogas de YfhK y YfhA de *Escherichia coli* K12. En estas bacterias aún no es clara la molécula señal sensada por este sistema, así como sus genes blanco, si bien se predice un papel hipotético en la regulación del metabolismo de nitrógeno y amino azúcares [9,10,11]. Esto convierte a este sistema de dos componentes en un candidato de interés a estudiar, particularmente con respecto a su posible relación con la alternancia de estados simbiótico/patogénico de *P. luminescens*. Con respecto a su contexto genético en el genoma de *P. luminescens*, los genes *plu3313* y *plu3311* se encuentran contenidos entre la región *plu3309* y *plu3314* que abarca cerca de 6 kb [6] (**Figura 2.**) y contiene algunos genes asociados con regulación del metabolismo de nitrógeno. Así, se sabe que el gen *plu3309* codifica una proteína reguladora de nitrógeno de la familia PII.1, el gen *plu3310* codifica una NAD⁺ sintetasa dependiente de glutamina, y el gen *plu3312* codifica una proteína similar a YfhG de *E. coli*, con función desconocida [10]. Los anteriores genes conforman un cluster con la misma orientación en cuanto a su sentido de transcripción, y presentan regiones intergénicas muy cortas o incluso ausentes, como se aprecia en el solapamiento existente entre los marcos de lectura abiertos de los genes *plu3311* y *plu3312* (**Figura 2.**), por lo que podrían hipotéticamente agruparse en un único o en varios operones. Finalmente, el gen *plu3314* con función desconocida, presenta una dirección opuesta, lo que hace pensar que en la región intergénica 3314 -3313 pueda ubicarse la región promotora y reguladora de al menos el gen *plu3313* (*YfhK*), o de un operón que podría contener entre 1 y 3 genes situados corriente abajo del mismo.

Dado que la organización en operón de genes bacterianos garantiza su co-regulación y expresión, caracterizar o validar este tipo de organizaciones podría dar unos primeros indicios acerca de relaciones funcionales entre los genes contenidos en un mismo operón. Así, determinar si los genes *plu3309*, *plu3310*, *plu3311*, *plu3312*, y *plu3313* hacen parte de un mismo operón, (**Figura 2.**) aportaría luces acerca de si existe o no relación del sistema de dos componentes YfhK/YfhA con la regulación del metabolismo del nitrógeno en *P. luminescens*. Adicionalmente, surge la necesidad de identificar la región promotora respectiva de este operón hipotético, como parte de la caracterización molecular de este operón y con el fin de permitir el estudio de la expresión y regulación de estos genes transductores de señales en *P. luminescens in vivo*.



Figura 2. Organización de la región genética plu3309-plu3314 de *Photorhabdus luminescens*. Se presentan los cinco marcos de lectura abiertos (ORFs) con su respectiva orientación contenidos en esta región de aproximadamente 6 kb. El gen *plu3309* codifica una proteína reguladora de nitrógeno de la familia PII.1, el gen *plu3310* codifica una NAD⁺ sintetasa dependiente de glutamina, y el gen *plu3312* codifica una proteína similar a YfhG de *E.coli*, con función desconocida. Los genes *plu3313* y *plu3311* codifican las proteínas sensora de membrana (YfhK) y reguladora de respuesta (YfhA) respectivamente. El gen *plu3314* tiene función desconocida.

2.2 Sistema regulador de respuesta de dos componentes (2-component system response regulator)

Los sistemas reguladores de respuesta de dos componentes, conocidos también como sistemas de dos componentes (SDC) son sistemas de transducción de señales que constan de un sensor de membrana con actividad histidina quinasa, y un regulador transcripcional citoplasmático, generalmente activador. Estos sistemas responden a un amplio espectro de estímulos, que son transformados en señales celulares por medio de una fosforilación de las proteínas regulatorias, lo que induce cambios conformacionales de estas, permitiendo su

activación y posterior activación transcripcional de los respectivos genes blanco [12]. Los reguladores de dos componentes están relacionados en la regulación de distintos procesos metabólicos, respuestas a estrés, virulencia o procesos de división y diferenciación celular. Asimismo, tienen gran importancia en las bacterias patógenas o simbiotas que interactúan con hospederos. En el genoma de *Photobacterium luminescens* se han identificado diferentes SDCs que intervienen en la regulación de virulencia como el sistema PhoPQ codificado por el locus *phoPQ*, que media la adaptación a ambientes con bajas concentraciones de Mg^{2+} y de Ca^{2+} [13], o el sistema *stRS* que está involucrado en la adaptación de las células a la fase estacionaria [14].

Se ha identificado que los genes *plu3313* y *plu3311* con un tamaño de 1497 pb y 1337 pb respectivamente, presentan homología con el sistema de dos componentes *yfbAK* en *E. coli* K12. Las proteínas *YfbK*, quinasa sensora putativa de 498 aa (*plu3313*) y *YfbA*, regulador de respuesta de 445 aa (*plu3311*) de *P. luminescens* presentan 65.96% y 86.5% de identidad respectivamente con sus homólogas en la cepa *E. coli* K12. En esta cepa patógena de humanos, estos genes han sido rebautizados *glrK* y *glrR* debido a que su función en la activación del RNA regulador *glmY* involucrado en la regulación de la síntesis de glucosamina 6-fosfato, relacionado con la regulación del metabolismo del Nitrógeno y la adhesión en fase estacionaria [11].

La asociación de este SDC con adhesión y virulencia en enterobacterias ha sido también evidenciado experimentalmente en otra cepa de *E. coli* patógena de humanos, la cepa enterohemorrágica *E. coli* (EHEC), en donde estos mismo genes portan los nombres *qseE* y *qseF*, los cuales han sido asociados con la cascada de señalización AI-3/epinefrina/noradrenalina, activando la transcripción de *rpoE* (sigma24), *glmY* (RNA regulador) y *espFu*, genes asociados con homeostasis de la envoltura celular bacteriana en fase estacionaria y virulencia, induciendo la polimerización de la actina durante la formación de lesiones de adhesión y borrado (*Attachment and Effacing*, AE) en células epiteliales intestinales [10].

Dado que en *E. coli* existe una asociación con virulencia y patogenicidad, este SDC se convierte en un candidato de interés a ser caracterizado en *P. luminescens*, tanto a nivel de su organización genética, como funcionalmente, con el fin de poder establecer una posible relación en algún tipo de señalización asociado a estos cambios de hospedero y estado metabólico de la bacteria. Por lo tanto, este trabajo tiene por objetivo caracterizar

molecularmente la organización transcripcional de los genes contenidos en la región génica *plu3309 – plu3314* de *P. luminescens* SL0708, como un primer acercamiento indispensable a su caracterización funcional.

3. Objetivos:

Objetivo General:

Caracterizar molecularmente la región génica *plu3309 – plu3314* de *Photobacterium luminescens* SL0708.

Objetivos Específicos:

1. Identificar la región promotora que determina la expresión de los genes *plu3313* y *plu3311*.
2. Determinar la extensión de la unidad transcripcional que contiene los genes *plu3313* y *plu3311*.
3. Clonar la posible región promotora de los genes *plu3313* y *plu3311* al vector pCR2.1, para su posterior subclonación en el vector pPROBE .

4. Metodología:

Todas las actividades realizadas en este trabajo de grado y que impliquen acceso a recursos genéticos se encontraron debidamente y legalmente amparadas bajo el contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados N°257 Suscrito entre el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Pontificia Universidad Javeriana.

4.1 Mantenimiento y crecimiento de la cepa

Se realizó el banco de trabajo de *P. luminescens* conservando las cepas en glicerol, el cual quedó a una concentración final del 32 % (v/v). Se conservaron a una temperatura de -80 °C. Posteriormente, las cepas fueron reactivadas en agar Luria Bertani (LB) (Tripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, agar 15 g/L), con Ampicilina (100 ug/mL), y se dejaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 48 horas.

Las cepas de *E. coli* DH5 α que contenían el vector pPROBE (**Figura 3.**) y otros plásmidos empleados en este trabajo, se conservaron en glicerol al 32 % (v/v) a una temperatura de -80 °C. Las cepas se reactivaron en agar LB con Kanamicina (50 ug/ml) a una temperatura de 37 °C por 24 horas.

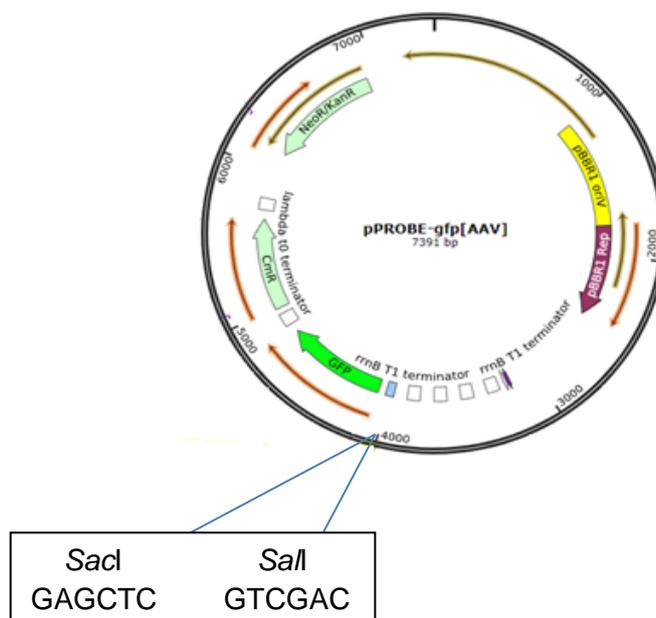


Figura 3. Vector pPROBE [11]. Este vector permite la construcción de fusiones transcripcionales al gen reportero GFP (Green Fluorescent protein). Se resaltan los dos sitios de restricción *SalI* y *SacI* del polilinker que se pretenden emplear para clonar la región promotora de interés.

4.2 Análisis de la secuencia del locus *plu3309 – plu3313* y diseño de primers

Se diseñaron primers sobre el inicio y final de cada marco abierto de lectura (ORF) con el fin de amplificar las diferentes regiones intergénicas (**Figura 4**). Estos mismos primers se emplearon tanto para amplificar la región intergénica *plu3314-plu3313*, candidata a promotor, como las regiones intergénicas *plu3313-plu3312* y *plu3311-plu3310* con el fin de identificar la extensión de la unidad transcripcional que contiene los genes *plu3311* y *plu3313* empleándolos sobre ADNc (**Tabla 1**).

Tabla 1. Primers usados y tamaño esperado.

Nombre	Primers	Región amplificada	Tamaño esperado	Tm
Pm1 F	5' <u>GTCGAC</u> CGTCGTCATTGCTCAGG 3'	<i>plu3313 –</i>	136 pb	55 °C
Pm1 R	3' <u>GAGCTC</u> CAGTACACCAATGCTAAC 5'	<i>plu3314</i>		55 °C
Pm2 F	5' TAGCTGCTGAGAATGAATAA 3'	<i>plu3313 –</i>	133 pb	47 °C
Pm2 R	3' GAAACTCGTGGTAATAACAA 5'	<i>plu3312</i>		47 °C
Pm3 F	5' GAATTGGATGCGAATGATTT 3'	<i>plu3311 –</i>	116 pb	47 °C



Figura. 4. Posición de los primers diseñados sobre la región génica.

4.3 Extracción de ácidos nucleicos de *P. luminescens*

Para la extracción de ADN genómico se utilizó el kit Dneasy de Qiagen, a partir de cultivos de la cepa *P. luminescens* SL0708 de 48 horas en caldo LB y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la extracción de ARN total se emplearon cultivos en caldo LB de la cepa *P. luminescens* SL0708 provenientes de dos puntos de fase exponencial (24 y 48h) y dos de fase estacionaria (72h y 96h).

La extracción de ARN total se realizó empleando el reactivo Trizol® (Invitrogen), y posteriormente, el ARN total fue tratado con DNAsaI empleando el kit TurboDNafree (Ambion), siguiendo las instrucciones de cada fabricante.

Se realizó evaluación de la pureza (relación DO_{260}/DO_{280}) y cuantificación de los ácidos nucleicos en un espectrofotómetro nanodrop 1000 (Thermo, Scientific), y posteriormente, se evaluó la integridad por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v).

4.4 Transcripción inversa y determinación de la longitud de la unidad transcripcional.

Con el fin de determinar si los genes *plu3313*, *plu3312*, *plu3311* y *plu3310* (**fig.1**) hacen parte de la misma unidad transcripcional y por ende constituyen un operón, se empleó RT-PCR usando los primers anteriormente descritos y diseñados para amplificar las regiones intergénicas del locus *plu3309 - plu3313* a partir de ADNc.

El ADNc se obtuvo a partir de los ARN extraídos en distintas fases de cultivo de *P. luminescens* SL0708 y tratados con DNAsaI. Se empleó el kit comercial first strand cDNA synthesis kit (New England Biolabs) usando oligonucleótidos aleatorios (octámeros) para la transcripción inversa de los mRNAs bacterianos. Una vez obtenido el ADNc, se procedió a realizar las reacciones de RT-PCR con las diferentes combinaciones de primers (Tabla 1). Todas las mezclas de reacción se hicieron en un volumen final de 20 μ l que contenía: 0.5 μ M de primer directo y reverso, buffer 1X de Gentaq polimerasa, 200 μ M de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNApolimerasa (Gentaq) y ADNc como molde (equivalente a 20 ng de ARN molde). Para cada amplificación RT-PCR, se incluyeron todos los respectivos controles: negativo sin molde, positivo empleando ADN molde, y sin retrotranscripción, empleando 20 ng de ARN total como molde.

4.5 Técnica RACE.

Para intentar complementar la identificación del punto de inicio de la transcripción del posible operón *plu3313-plu3310*, se empleó el kit RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), el cuál permite determinar por tamaño la distancia entre el extremo 5' de un mRNA y un primer reverso conocido que hibride sobre el mRNA. Se utilizó ARN de las horas 48 y 96 siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon dos primers reversos denominados 3311A y 3311C, con los cuales se esperaba un tamaño amplificado aproximado de 3.8 kpb y 2.3 kpb respectivamente.

4.6 Identificación y clonación de la región promotora de operón *plu3313-plu3310*

La región intergénica candidata a promotor (*plu3313 - plu3314*) se amplificó por PCR a partir de ADN genómico con los primers Pm1 F y Pm1 R (**Tabla 1**). Estos primers se diseñaron de tal manera que portaran en sus extremos 5' los sitios de restricción GTCGAC y CTAACC con el fin de permitir su subclonación al vector de fusión a *gfp*, pPROBE (figura 2).

Una vez verificada la obtención del producto amplificado (136 pb), éste se clonó en el vector pCR2.1 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transformación de células competentes *E. coli* DH5 α , selección y screening de clones recombinantes se realizó en medios con agar LB, kanamicina (50 mg/L), IPTG (100 μ g/mL) y XGal (100 μ g/mL).

Los clones recombinantes obtenidos provenientes de colonias blancas se verificaron por PCR de colonias empleando los mismos primers que permitieron la amplificación de la región promotora.

Una vez verificada la presencia del inserto candidato a promotor (*plu3313-plu3314*), se realizaron cultivos puros de los clones para la posterior purificación del plásmido portador de la región promotora., cuya presencia se verificó nuevamente por PCR sobre el plásmido puro. Este plásmido recombinante portará el nombre pPROM3313.

4.7 Estandarización de la metodología para evaluar la actividad promotora a través a fusión transcripcional al reportero *gfp*.

Con el fin de contar con un sistema que permita la evaluación y monitoreo de la expresión transcripcional del SDC *plu3313-plu3311* por medio de la fusión transcripcional del promotor candidato a GFP, una vez se logre obtener la misma, se buscó realizar una estandarización previa de la medición de la fluorescencia de GFP en placa. Para esto se emplearon células de *E. coli* transformadas con una fusión del promotor constitutivo del operón lactosa (Plac) al reportero *gfp* insertada en el vector pPROBE [11] y generando el plásmido pLAC::GFP. Como control negativo de las lecturas de fluorescencia se emplearon células de *E. coli* portadoras del vector pPROBE, el cual contiene el gen *gfp* pero sin promotor (**Figura 3**). Se utilizó el equipo medidor de fluorescencia Twinkle LB 970 (Berthold Technologies) con una longitud de onda de excitación y emisión de 485/535. Se evaluaron factores como tipo de microplaca multipocillos (negra o translúcida), densidad celular del cultivo, celular, así como la interferencia del medio de cultivo.

5. Resultados:

Extracción de ARN y análisis RT-PCR:

El protocolo de extracción de ARN basado en el uso del reactivo trizol[®] permitió obtener buenas cantidades de ARN total de *P. luminescens* SL0708 en las horas 24, 48, 72 y 96, con buena pureza e integridad aceptable (**Tabla 2** y **Figura 5**).

Tabla 2. Concentración de ARN y relación DO260/280

Hora	ng/ul	DO260/280
24	2288.8	1.98
48	3481.0	1.99
72	1663.1	1.95
96	367.1	1.85

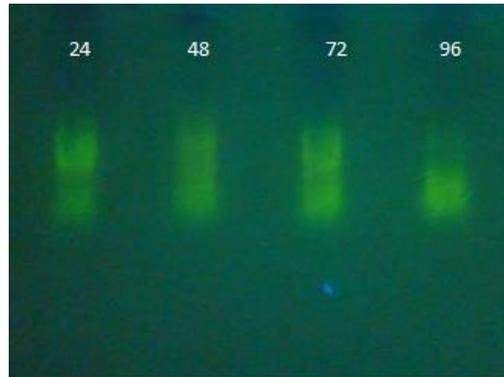


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de ARN total extraídas a las horas 24, 48, 72 y 96.

Una vez verificada la calidad e integridad y concentración de las muestras de ARN total, se realizaron las amplificaciones mediante RT-PCR para cada pareja de primers y que permitieran amplificar las diferentes regiones intergénicas en forma específica y con base en los primers diseñados (**Figura 6**).

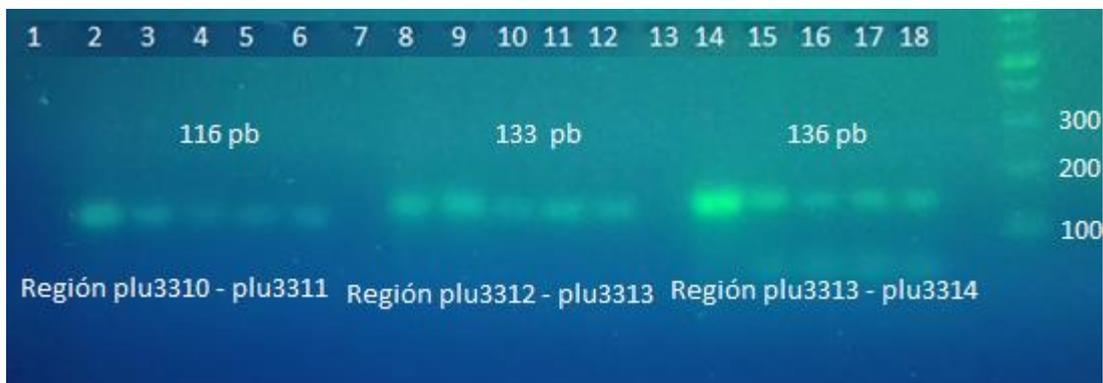


Figura 6. RT-PCR de las regiones intergénicas entre plu3309 – plu3314. Carril 1, 7 y 13: Controles negativos con agua. Carril 2, 8 y 14: Controles positivos con ADN genómico. Carril 3 al 6: ADNc de las horas 24, 48, 72 y 96 respectivamente. Carriles 9 a 12: ADNc de las horas 24, 48, 72 y 96 respectivamente. Carriles 15 a 18: ADNc de las horas 24, 48, 72 y 96 respectivamente.

Las amplificaciones obtenidas muestran que cada uno de los espacios intergénicos están contenidos en el mismo ARNm, permitiendo inferir que los genes *plu3313*, *plu3312*, *plu3311* y *plu3310* hacen parte de un mismo operón. Sin embargo, al realizar pruebas de contaminación con ADN genómico a partir de ARN total empleando los mismos primers específicos, se obtuvieron amplificaciones indeseadas en estos controles negativos únicamente para la región *plu3313-plu3314* (**Figura 7**). Por esta razón, fue necesario tratar cada muestra de RNA por medio del kit TurboDNFree (Ambion) y repetir estos controles negativos con nuevas diluciones de estos primers, permitiendo entonces evidenciar ausencia de contaminación con DNA (**Figura 8A**). Una vez verificado lo anterior se repitió la RT-PCR para esta región candidata a región promotora, y se confirmó nuevamente su amplificación a partir de cDNA (**Figura 8B**). Este resultado es sorprendente ya que por la orientación divergente de los genes en este espacio intergénico, era esperado encontrar en la misma el promotor del operón *plu3313-3309*. Sin embargo, la amplificación sugiere que el inicio de la transcripción del operón se encuentra aún más corriente arriba y por ende dentro de la secuencia codificante del gen divergente *plu3314*. Por este motivo se hizo necesario implementar una nueva aproximación para corroborar este hallazgo e identificar la localización exacta del punto de inicio de la transcripción del operón, y su región promotora a través de la técnica RACE.



Figura 7. Controles negativos con ARN y positivos con ADN genómico. Carril 2, 8, 14: Control positivo con ADN genómico. Carril 3, 9 y 15: Control negativo con agua. Carril 4, 5, 6 y 7: ARN de la hora 24, 48, 72 y 96 respectivamente. Carril 10, 11, 12 y 13 ARN de la hora 24, 48, 72 y 96 respectivamente. Carril 16, 17, 18 y 19 ARN de la hora 24, 48, 72 y 96 respectivamente.

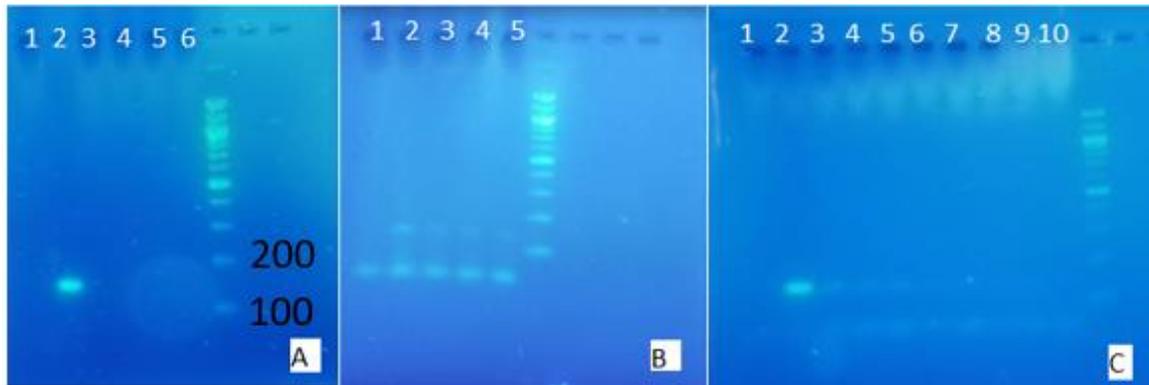


Figura 8. RT PCR de la región *plu3313-plu3314*. A. Carril 1: Control negativo (agua) Carril 2: control positivo ADN genómico. Carril 3, 4, 5 y 6: Control negativo con ARN de la hora 24, 48, 72 y 96 respectivamente. B. Carril 1: Control negativo con agua. Carril 2, 3, 4 y 5: ADNc de la hora 24, 48, 72 y 96 respectivamente. C. Carril 1: Control negativo (agua) Carril 2: Control positivo con ADN genómico. Carril 3, 4 y 5: ADNc de la hora 24, 48, 72 y 96 respectivamente. Carril 6, 7 y 8: Control negativo con ARN de la hora 24, 48, 72 y 96 respectivamente.

Por otro lado, a través del análisis RT-PCR realizado con los ARNs libres de contaminación con DNA, se observaron diferencias en la intensidad de las bandas amplificadas a lo largo de la curva de crecimiento bacteriano (**Figura 8B y C**), evidenciando un ligero patrón de represión en la transcripción del transcrito respectivo a medida que la bacteria va entrando en fase estacionaria (> 36-48 h). Si bien la RT-PCR no es cuantitativa, puede volverse una técnica semicuantitativa para inferir cambios en la expresión transcripcional, sin embargo esto debe confirmarse por medio de técnicas cuantitativas. Así, al observar el mayor brillo de las bandas en la condición de fase exponencial, es probable que los genes del operón *plu3313-plu3309* tengan una mayor expresión en fase exponencial temprana que en tiempos más avanzados de la curva de crecimiento (fase estacionaria), siendo esto un primer reporte preliminar asociado a un cambio de expresión de los genes *plu3313-plu3310* en función de una diferencia importante en las tasas de crecimiento, densidad celular, y metabolismo que caracterizan esa transición de fase exponencial a fase estacionaria. Esta misma tendencia en la expresión se pudo verificar cambiando las regiones intergénicas amplificadas por RT-PCR y corroborando que es un único transcrito largo propio de una estructura en operón.

Amplificación de la región 5' del cDNA del operón plu3313-plu3310 mediante RACE:

Para identificar el punto de inicio de la transcripción del operón objeto de estudio, se buscó amplificar el extremo 5' del cDNA correspondiente al respectivo mRNA. Para esto se hizo uso de la técnica RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), la cual hace uso de una ligasa de RNA para acoplar un adaptador de RNA al extremo de un mRNA con secuencia interna conocida, y, tras su retotranscripción, amplificar el extremo por medio de primers que hibriden a una región interna conocida y al adaptador ligado. El tamaño del amplicón obtenido dará cuenta de la distancia entre el extremo 5' del mRNA (punto de inicio de la transcripción) y la región de hibridación del primer conocido.

Sin embargo, esta técnica no permitió arrojar ningún resultado positivo, pues no fue posible obtener ninguna amplificación con ninguno de los dos primers empleados (**Figura 9**), probablemente debido a la gran diferencia entre las temperaturas de fusión (T_m) de los primers reversos empleados, y que hibridan con las secuencias de los genes *plu3313* y *plu3311* (T_m de 72 °C y 66 °C, respectivamente), y la T_m del primer directo que hibrida con el adaptador RACE (60 °C). Lamentablemente, esta técnica se llevó a cabo en la última semana del semestre y no fue posible repetirla a tiempo para lograr tener resultados positivos. Sin embargo, se recomienda repetir la amplificación final con distintas diluciones del cDNA y a su vez realzando un gradiente de temperatura de hibridación con el fin de lograr obtener alguna amplificación positiva.



Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados mediante RACE. Carril 1: Hora 48 con primer plu3311A. Tamaño esperado: 3.8 kb, carril 2: Hora 48 con primer plu3311C. Tamaño esperado: 2.3 kb. Carril 3: Hora 96 con primer plu3311A. Tamaño esperado: 3.8 kb. Carril 4: Hora 96 con primer plu3311C. Tamaño esperado: 2.3 kb.

Clonación de la región candidata a promotor en el vector pCR2.1:

La región candidata a promotor del operón que contiene el SDC (región intergénica *plu3313-plu3314*) fue amplificada por PCR con los primers Pm1F y Pm1R, los cuales portaban en sus extremos 5' sitios de restricción compatibles con la posterior subclonación orientada del producto clonado, en el vector de destino pPROBE, cuyo polilinker permite insertar fragmentos portadores de promotores de interés a estudiar, y obtener las fusiones transcripcionales respectivas al reportero GFP (proteína verde fluorescente, por sus siglas en inglés). Así, se diseñaron los primers Pm1F y Pm1R portadores de los sitios de restricción para *SaI* (GTCGAC) y *SacI* (CTAACC), respectivamente. Una vez obtenida la amplificación de la región candidata a promotor, ésta se ligó al vector de clonación pCR2.1 (Invitrogen) y se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α . Entre los clones transformantes obtenidos, se obtuvieron colonias blancas indicadoras de una correcta clonación del inserto en el vector (Figura 10 A.), por lo que se procedió a verificar la presencia del inserto en una colonia de clones positivos por medio de PCR de colonia y empleando los mismo primers que se usaron para amplificar la región candidata a promotor. En la figura 10 B, se observa la verificación de la presencia del inserto en el clon o colonia seleccionada, al observarse amplificación del tamaño esperado (136 pb). Este clon fue aislado, y posteriormente conservado para extraer el plásmido portador de la región candidata a promotor, y a partir del cual se realizará la subclonación hacia el vector de fusión a GFP, pPROBE.

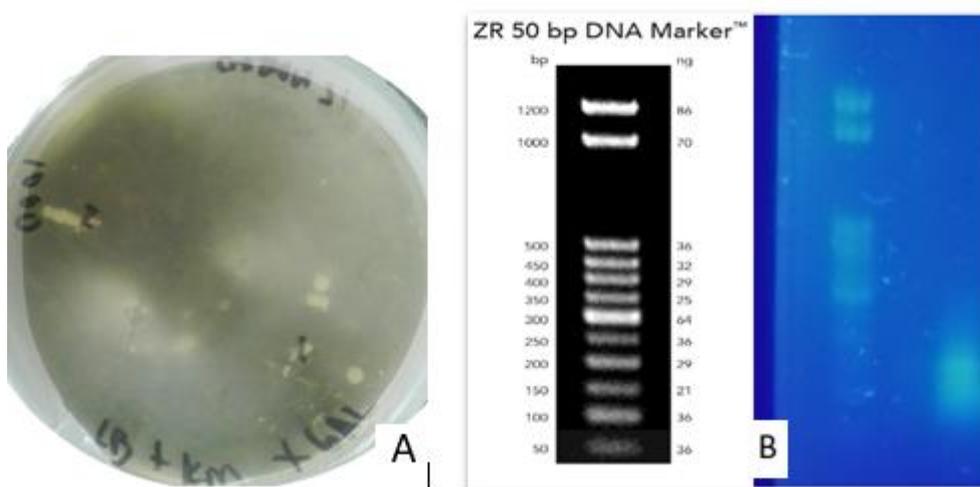


Figura 10. PCR colonia de las células transformadas. La banda más brillante se encuentra en el tamaño esperado. (136 pb)

Estandarización de la medición de fluorescencia de la proteína reportera GFP a partir de cultivos bacterianos.

Con el fin de analizar la viabilidad de realizar futuros estudios de expresión génica del operón *plu3311-plu3310* de *P. luminescens* en respuesta a una gran variedad de sustratos nitrogenados, hemolinfa, extractos de larvas o condiciones de crecimiento, que permitan identificar mejor las condiciones en que se activa el operón portador del SDC por medio de la fusión transcripcional de su promotor al gen reportero GFP, se buscó estandarizar en forma preliminar algunas condiciones y parámetros a tener en cuenta en los ensayos de medición de fluorescencia en micro placas y con células enteras.

Para esta estandarización, se emplearon cultivos celulares de *E. coli* DH5 α portadoras de la fusión transcripcional *Plac::gfp*, fusión obtenida previamente por la inserción del promotor *Plac* en el polilinker del vector pPROBE. En esta cepa de *E. coli* DH5 α , deficiente en el represor *LacI*, el promotor *Plac* se vuelve constitutivo, permitiendo la expresión permanente del reportero GFP. Como controles negativos, se emplearon las mismas células de *E. coli* transformadas con el vector vacío pPROBE (portador de GFP pero desprovisto de promotor para su transcripción). En la **Tabla 3**, se muestran los valores de fluorescencia obtenidos en donde si bien hay unos valores de fluorescencia superiores para la cepa pLAC::GFP que para su control pPROBE, se evidencia una interferencia importante del medio de cultivo LB, así como de la microplaca translúcida empleada. Por lo tanto se evaluó si al centrifugar los cultivos lavar las células y resuspenderlas en buffer fosfato (PBS), podía eliminarse o disminuir la interferencia del medio: esta modificación mejoró mucho la señal positiva de fluorescencia y redujo significativamente el ruido del medio LB (**Tabla 4**). Finalmente, se buscó mejorar aún más la detección de la señal de fluorescencia emitida por GFP en microplacas, empleando microplacas oscuras o negras, más indicadas para lecturas de fluorescencia. En la **Figura 11** y **Tabla 5** se presentan los valores promedio de fluorescencia de la proteína GFP medida en microplacas negras y a partir de células resuspendidas en buffer PBS. En comparación con la fluorescencia medida en las células control y pocillos vacíos, los valores obtenidos muestran que con la implementación de estas modificaciones (uso de placa negra, lavado y resuspensión de las células en buffer PBS) se logra maximizar la señal de fluorescencia GFP, obteniendo valores de fluorescencia 16 veces más altos para la cepa *Plac::GFP* que para su respectivo control negativo (pPROBE). Estos resultados sugieren que es factible emplear este método sencillo, en células en suspensión, para realizar estudios de expresión génica por medio de

fusiones transcripcionales a GFP. Sin embargo, aunque *E. coli* y *P. luminescens* son ambas enterobacterias y bacilos Gram-negativos, es necesario verificar si este sistema es igual de eficiente en *P.luminescens*.

Tabla 3. Fluorescencia de la proteína GFP en cultivos celulares y en medio LB (microplaca translúcida)

	pPROBE	pLAC::GFP	Pocillos vacíos	pLAC::GFP + IPTG.	Solo medio
A	25600,0	23110,0	210,0	31760,0	26280,0
B	24770,0	23400,0	230,0	37250,0	26700,0
C	25320,0	23310,0	220,0	34530,0	25120,0
D	24750,0	22040,0	210,0	36390,0	24310,0
Promedio	25110,0	22965,0	217,5	34982,5	25602,5
DE*	420,07	628,46	9,57	2429,80	1090,39

Volumen final de 200 uL. *DE: Desviación Estándar.

Tabla 4. Fluorescencia de GFP en células lavadas y resuspendidas en buffer fosfato (PBS) (microplaca translúcida)

	pPROBE	pLAC::GFP	Buffer solo en Buffer
A	320,0	2500	20,0

Volumen final de 200 uL.

Tabla 5. Fluorescencia de GFP en células lavadas y resuspendidas en buffer fosfto (PBS) – (microplaca negra).

	pPROBE	pLAC::GFP	Pocillos vacíos
*D.O	1.149	0.927	
A	2190	35910	80
B	2240	33600	70
C	2140	33350	70

D	2290	32960	60
E	1720	34540	50
Promedio	2116	34072	66
**DE	228,31	1180,87	11,40

Volumen final de 200 uL ***D.O**: Densidad óptica a 600 nm, ** **DE**: Desviación estándar.

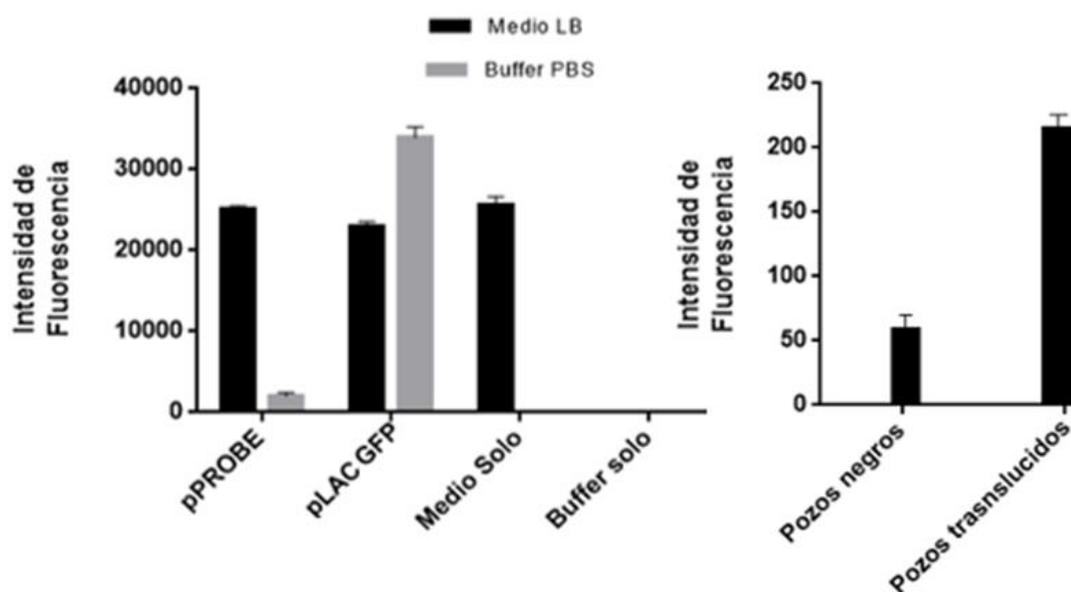


Figura 11. Fluorescencia de GFP en células resuspendidas en buffer y en medio LB de *E. coli* portadoras del gen reportero GFP (Fusión Plac::GFP y su control pPROBE). Se presentan los valores promedio de fluorescencia obtenidos de cinco réplicas técnicas con su respectiva desviación estándar (DS).

6. Discusión:

Al observar amplificación del ADNc de las regiones intergénicas *plu3310 – plu3311*, *plu3312 – plu3313* y *plu3313 – plu3314*, se puede establecer que el sistema regulador de respuesta de dos componentes *yfbK* y *yfbA* (*plu3313-plu3311* respectivamente), el gen que codifica para NAD⁺ sintetasa dependiente de glutamina (*nadE*) y el gen *plu3312* (*yfbG*), están transcripcionalmente relacionados ya que se encuentran regulados bajo un mismo operón, al igual que los genes ortólogos *glrK*, *yfbG*, y *glrR* en *E. coli* K12, y los genes *qseE qseG qseF* y *glnB* en *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) [12,16].

Al encontrarse regulados bajo un mismo operón se podría pensar que los genes *plu3313* y *plu3311* están involucrados en el metabolismo del nitrógeno, para confirmarlo se tendría

que evaluar la estimulación de la fosforilación en respuesta a la ausencia de nitrógeno y diferentes cantidades de este, sin embargo, también sería posible que este sistema regulador de respuesta sense alguna otra molécula diferente al N, ya que genes contenidos en un mismo operón pueden encontrarse funcionalmente relacionados o no [16]. En la cepa enterohemorrágica *E. coli*, se sospechaba que el gen *qseE* fuera un sensor de nitrógeno por la presencia del gen *glnB* en el mismo operón, por tanto, se evaluó la respuesta a este elemento y se llegó a la conclusión de que este gen no es un sensor de N, debido a que solo se estimulaba la fosforilación en presencia de compuestos como sulfatos o fosfatos [17].

Asimismo, para tener otros indicios del papel del SDC sería necesario evaluar si estos genes se expresan durante el estado virulento, ya que solo se confirmó su expresión en condiciones de laboratorio, si bien se evidenciaron diferencias en la expresión en dos fases de crecimiento asociadas con dos estados metabólicamente muy diferentes. Se observó una mayor expresión del operón en fase exponencial acompañada de una probable tendencia a la represión al entrar en fase estacionaria (Figuras 6 y 8B). En fase estacionaria es posible que, por la alta densidad celular, se llegue a ciertos niveles de deficiencia en las fuentes de nitrógeno del medio de cultivo, dejando abierta la hipótesis de que este SDC pueda estar involucrado en el sensado de fuentes de nitrógeno. Esto a su vez puede estar estrechamente relacionado con las dos fases del ciclo de vida de *P. luminescens* entre sus dos hospederos naturales, pues si el sistema regula el metabolismo del nitrógeno o su expresión es dependiente de tasas metabólicas o proliferativas de la bacteria, lo más probable es que estas diferencias se vean reflejadas entre las dos fases virulenta y avirulenta de la bacteria, ya que se ha demostrado que el crecimiento de la bacteria en el insecto está altamente relacionado con la virulencia. En efecto, en esta fase de virulencia o infección de la larva de insecto, se ha mostrado que *P. luminescens* expresa en gran cantidad de rutas metabólicas, reportado con el término de “switch metabólico”, con el fin de asimilar todos los nutrientes de la hemolinfa. La hemolinfa del insecto es una fuente rica de nutrientes como aminoácidos y amino azúcares, por lo que la regulación y el metabolismo de nutrientes como N es fundamental durante la infección [2].

Respecto a la región promotora del operón, se evidencia amplificación de la región *plu3313-plu3314* por RT-PCR, un resultado inesperado al tratarse de una región intergénica entre genes divergentes en su sentido de transcripción. Con lo cual la región promotora del operón debe estar ubicada corriente arriba, es decir sobrelapando con la secuencia

codificante del gen divergente *plu3314*, sin embargo, sería necesario reconfirmar este resultado.

Igualmente, es necesario identificar la región del terminador de transcripción, para posteriormente evaluar qué genes, además de los mencionados, hacen parte del operón, y así poder completar la caracterización de esta organización génica.

7. Conclusiones:

Se evidenció que los genes *plu3313* (*YfbK*), *plu3312* (*YfbG*), *plu3311* (*YfbA*), *plu3310* (*nadE*), de *P. luminescens* SL0708, hacen parte del mismo operón, por lo que es probable que este sistema regulador de respuesta esté relacionado con la regulación del metabolismo de nitrógeno.

La expresión transcripcional del operón *plu3313-plu3310* tiende a reprimirse al pasar de fase exponencial a fase estacionaria, indicando que la expresión del SDC varía según el estado metabólico y tasa proliferativa de *P. luminescens*.

No se evidenció que el promotor, concretamente el punto de inicio de la transcripción, de este operón esté ubicado en la región intergénica *plu3313 – plu3314* como daba a suponer la divergencia en la orientación de estos dos genes, por lo que el promotor del operón debe encontrarse en una región corriente arriba de esta región intergénica, sobrelapando con el gen *plu3314*.

Se logró clonar la región candidata a promotor en el vector pCR2.1 para facilitar su subclonación al vector de destino final pPROBE y obtener la fusión transcripcional a GFP. Sin embargo es necesario confirmar si el fragmento clonado porta o no el promotor del operón *plu3313-plu3310*.

La medición de la proteína reportera GFP en microplacas y a partir de células provenientes de cultivos bacterianos de enterobacterias previamente lavadas y resuspendidas en buffer PBS, es un ensayo viable para la realización de *screenings* de expresión génica a gran escala basado en fusiones transcripcionales a este gen reportero. El medio de cultivo LB es un

interferente para la medición de fluorescencia de la proteína reportera GFP, al igual que los pozos de placa transparente.

Nota: Con las evidencias obtenidas en este trabajo, se recomienda denominar al operón *plu3314-plu3310* “operón *yfb*” debido a que porta tres genes con dicha nomenclatura (*yfbK*, *yfbG* y *yfbA*).

8. Bibliografía:

1. Joyce S, Watson R, Clarke D. The regulation of pathogenicity and mutualism in *Photorhabdus*, *Sciencedirect*, 9:127–132, 2006, Doi: 10.1016/j.mib.2006.01.004
2. A metabolic switch is involved in lifestyle decisions in *Photorhabdus luminescens*, *Molecular Microbiology* 77:(6), 1394–1405, 2010, Doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07300.x
3. Boemare, N. E. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*., In R. Gaugler (ed.), Entomopathogenic nematology. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom, 2002
4. Gerdes E, Upadhyaw D, Mandjiny S, Bullard R, Storms M, Menefee M, Holme L. *Photorhabdus Luminescens*: Virulent Properties and Agricultural Applications, *American Journal of Agriculture and Forestry*. 3:(5), 171-177, 2015, Doi: 10.11648/j.ajaf.20150305.12
5. Saenz A, Pulido F, Jaramillo C. Isolation and characterization of bacterial symbiont *Photorhabdus Luminescens* SL0708, *African Journal of Microbiology*, 8:(33), 3123-313 Doi:10.5897/AJMR2014.6977
6. Duchaud E, Rusniok C, Frangeul L, Buchrieser C, Givaudan A, Taourit S, Bocs S, Boursaux-Eude C, Chandler M, Charles JF, Dassa E, Derosé R, Derzelle S, Freyssinet G, Gaudriault S, Médigue C, Lanois A, Powell K, Siguier P, Vincent R, Wingate V, Zouine M, Glaser P, Boemare N, Danchin A, Kunst F. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*, *Nature Biotechnology*, 21:(11), 2003, Doi:10.1038/nbt886
7. Salazar J, Castelblanco A, Rodríguez M, Terán W, Sáenz A. *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* SL0708 pathogenicity in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:

Noctuidae) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(4), 1112-1121, 2007, Doi: 10.1016/j.aspen.2017.08.001

9. Heermann R, Fuchs T. Comparative analysis of the *Photobacterium luminescens* and the *Yersinia enterocolitica* genomes: uncovering candidate genes involved in insect pathogenicity. *BMC genomics*, 9(1):40, 2006, Doi: [10.1186/1471-2164-9-40](https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-40)
10. Reading C, Torres A, Kendall M, Hughes D, Yamamoto K, Sperandio V. A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. *Journal of bacteriology*, 189(6), 2468-2476, 2007, Doi: 10.1128/JB.01848-06
11. Reading N, Rasko D, Torres A, Sperandio V. The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5889-5894, 2009. Doi: 10.1073/pnas.0811409106
12. Miller WG, Leveau JHJ, Lindow SE. Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol Plant Microbe Interact*, 13(11): 1243-1250, 2000. Doi: 10.1094/MPMI.2000.13.11.1243
13. Reichenbach B, Yvonne G, Boris. Dual control by perfectly overlapping σ_{54} - and σ_{70} - promoters adjusts small RNA *GlmY* expression to different environmental signals." *Molecular microbiology* 74:(5) 1054-1070, 2009, Doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06918.x
14. Dagmar B, Roy G, Regulation of bacterial virulence by two-component systems, *Current Opinion in Microbiology*, 9:(2), 143-152, 2006, Doi: 10.1016/j.mib.2006.01.005
15. Derzelle S, Turlin E, Duchaud E, Pages S, Kunst F, Givaudan A, Danchin A. The PhoP-PhoQ Two-Component Regulatory System of *Photobacterium luminescens* Is Essential for Virulence in Insects, *American society of microbiology*, 186:(5), 1270 - 1279, 2004, Doi: 10.1128/JB.186.5
16. Derzelle S, Ngo S, Turlin É, Duchaud É, Namane A, Kunst F. AstR-AstS, a new two-component signal transduction system, mediates swarming, adaptation to stationary phase and phenotypic variation in *Photobacterium luminescens*. *Microbiology*, 150(4), 897-910, 2004, Doi: 10.1099/mic.0.26563-0
17. Price N, Arkin P. The life-cycle of operons, *PLoS Genet* 2: 859-873, 2006, Doi: doi.org/10.1371/journal.pgen.0020096
18. Reading NC, Rasko DA, Torres AG, Sperandio V. The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial

pathogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009 Apr
7;106(14):5889-94. Doi: 10.1073/pnas.0811409106