

00562



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

1

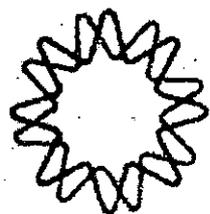
EL ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS PRODUCTOS DE LOS
GENES *mucABCD* DE *Azotobacter vinelandii* EN LA
TRANSCRIPCION MEDIADA POR EL FACTOR SIGMA AlgU.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
P R E S E N T A
BIOL. RENATO LEON RODRIGUEZ

TUTORA: DRA. GLORIA SOBERON CHAVEZ

292396

Cuernavaca, Mor. Mayo del 2001.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
P R E S E N T E

OF.PMDCB.037.2001

Por este conducto me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico, del Programa de Ciencias Bioquímicas que se llevó a cabo el día 15 de diciembre de 2000 se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para examen de Maestría en Ciencias del **BIOL. RENATO LEON RODRIGUEZ**, con número de cuenta 90521458, con la tesis titulada "El estudio del efecto de los productos de los genes mucABCD de *Azotobacter vinelandii* en la transcripción mediada por el factor sigma AlgU", dirigida por la Dra. Gloria Soberón Chávez.

Presidente	Dra. Guadalupe Espin Ocampo
Secretario	Dra. Gloria Soberón Chávez
Vocal	Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos
Suplente	Dr. Guillermo Gosset Lagarda
Suplente	Dr. Ernesto Méndez Salinas

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca. Mor., 26 de abril de 2001

DRA. AMELIA FARRES GONZALEZ S
COORDINADORA DEL PROGRAMA



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, BAJO LA DIRECCION DEL SIGUIENTE COMITE TUTORAL: DRA GLORIA SOBERON CHAVEZ (TUTOR PRINCIPAL); DR. ENRIQUE MERINO PEREZ; DR. JOSE LUIS PUENTE.
EL AUTOR FUE BECADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (No. 113974)

DEDICATORIAS

A uno de los seres más divinos
del universo, el cual me motiva
e inspira para luchar en esta
vida, mi madre Sra. Josefina.

A mi padre Sr. Artemio por su
apoyo en los buenos y en los
difíciles momentos.

A mis hermanos Elizabeth,
Araceli, Meribel, Delia, Erubiel
y Guadalupe, son uno de los
mejores obsequios de mi vida.

A la paqueña alegría que llevo a la
familia (Lety) y su papá.

A mi familia, la que ya conocía y
la que estoy "descubriendo", de
manera especial a mis primos: las
Adelinas, Ariel, Ignacio Leandro
y Lorena por la confraternidad y
confianza que me dan y por las
situaciones que se les ha presentado.
No claudiquen en los objetivos
que se han planteado.

A mis amigos, gracias por su grandiosa
amistad, excluyo sus nombres por la
aprensión de olvidar alguno.

A los que hacen deporte y al deporte
mismo por hacer pasar un bonito
episodio en mi existencia.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, esta máxima casa de estudios por lo que me ha legado.

A la Dra. Gloria Soberón Chávez por su apoyo, orientación, estímulos y por la confianza que me brindo para la realización de este proyecto.

A mi comite tutorial por su conducción y críticas en la elaboración de este trabajo.

A mi jurado por las revisiones y comentarios para el mejoramiento de la sintaxis del presente trabajo.

A todos los integrantes del laboratorio estudiantes, academicos y administrativos que contribuyeron conmigo directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo. Pero sobre todo por ese ambiente de cortesía y amistad, por los acontecimientos que vivimos en la "exploración" de algunos de los prodigiosos y diversos lugares de esta gran nación, y por los festines que se elaboraron.

A los notables maestros que he tenido durante mi formación profesional.

A la familia González-Caballero, por su gran amistan y apoyo que me han brindado, y por permitirme compartir su hábitat.

A la Pfra. Paula González, Marisela Ganzález. Gracias por su ayuda.

A todas aquellas personas que han contribuido a obtener la presente meta.

A los integrantes del STUNAM que me han ayudado en los tramites para estar al corriente en mi situación laboral.

A el CONACyT por le deuda (Beca) que me otorgo.

*El verdadero camino hacia
la democracia no proviene
del simple cambio político,
económico y social, si no del
avance intelectual del individuo
y de su sociedad.*

INDICE

I	RESUMEN.....	1
II	INTRODUCCION.....	2
2.1	Generalidades de <i>A. vinelandii</i>	3
2.1.1	Posición taxonómica.....	3
2.1.2	Características de <i>A. vinelandii</i>	3
2.1.3	Ciclo de vida de <i>A. vinelandii</i>	4
2.2	Composición y propiedades del alginato.....	6
2.3	Aplicaciones del alginato.....	8
2.4	Fuentes de obtención de alginato.....	11
2.5	Fisiología del alginato.....	12
2.6	Bioquímica de la biosíntesis de alginato.....	13
2.7	Genética y regulación de la biosíntesis de alginato.....	17
2.7.1	Organización y localización física de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.7.2	Regulación de la biosíntesis de alginato en <i>P. aeruginosa</i>	18
2.7.3	Regulación por el operón <i>algU mucA mucB mucC mucD</i>	20
2.7.4	Proteínas de regulación pertenecientes al sistema de dos componentes.....	24
2.7.5	Otros elementos reguladores de la biosíntesis de alginato.....	26
2.7.6	Regulación de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i>	26
III	OBJETIVOS.....	29
IV	MATERIALES Y METODOS.....	30
4.1	Cepas utilizadas en este trabajo.....	31
4.2	Plásmidos utilizados en este trabajo.....	32
4.3	Condiciones de crecimiento de las cepas de <i>A. vinelandii</i> y <i>E. coli</i>	32
4.4	Manipulación de ADN.....	33
4.5	Actividad de β -galactosidasa.....	33
4.6	Extensión del iniciador ("Primer extension").....	33
4.7	Amplificación de los genes <i>mucA</i> y <i>mucC</i> de <i>A. vinelandii</i>	34
4.8	Transformación en <i>A. vinelandii</i>	34
4.9	Cuantificación de alginato.....	34
4.10	Ensayos de enquistamiento.....	34

V	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
5.1	Determinación del inicio de la transcripción del operón <i>algUmucABCD</i> de <i>A. vinelandii</i>	37
5.1.1	El promotor P1 del operón <i>algUmucABCD</i> de <i>A. vinelandii</i> es dependiente de σ^E	37
5.1.2	Análisis de las secuencias de los promotores P2 y P3.....	40
5.1.3	Análisis del papel de AlgR en la regulación del operón <i>algUmucABCD</i>	40
5.2	AlgU de <i>A. vinelandii</i> es funcional en <i>E. coli</i>	41
5.3	Mutación de los genes <i>mucA</i> y <i>mucC</i> de <i>A. vinelandii</i>	45
5.3.1	Interrupción del gen <i>mucA</i> de <i>A. vinelandii</i>	45
5.3.2	Interrupción del gen <i>mucC</i> de <i>A. vinelandii</i>	49
5.4	Transferencia de las mutaciones de los genes <i>mucA</i> y <i>mucC</i> al genoma de <i>A. vinelandii</i>	49
5.4.1	Generación de las cepas JRA4 (<i>mucA</i> ⁻ polar) y JRA8 (<i>mucA</i> ⁻ no polar).....	49
5.4.2	Generación de las cepas MLC2 (<i>mucC</i> ⁻ polar) y MLC4 (<i>mucC</i> ⁻ no polar).....	52
5.5	Efecto de las mutaciones de los genes <i>mucA</i> y <i>mucC</i> en la producción de alginato en <i>A. vinelandii</i>	52
5.6	Efecto de las mutaciones de los genes <i>mucA</i> y <i>mucC</i> en el proceso de diferenciación celular de <i>A. vinelandii</i>	56
VI	CONCLUSIONES.....	58
VII	REFERENCIAS.....	59

I. RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria gram-negativa del suelo, que fija nitrógeno atmosférico y tiene un proceso de diferenciación celular en el cual forma quistes resistentes a la desecación, para esto produce dos polímeros: el alginato y el poli- β -hidroxibutirato (PHB), donde el alginato es uno de los componentes más abundantes de la cápsula que rodea al quiste, mientras que el PHB se encuentra en forma de granulos en el cuerpo central de dicho quiste. El interés del estudio genético de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* es debido a su importancia biológica en la formación de quistes [Campos, *et al.*, 1996], y económica porque tiene una amplia aplicación como agente gelificante y viscosificante.

En estudios previos, se identificó y secuenció un operón, involucrado en la biosíntesis de alginato, que consta de cinco genes reguladores denominados *algUmucABCD*. El primer gen, codifica para el factor σ^E , que se requiere para transcribir al gen estructural *algD* de la síntesis de alginato, *mucABD* regulan negativamente a σ^E [Martínez-Salazar, *et al.*, 1996]. En *Pseudomonas aeruginosa*, se ha reportado que *MucA* es un factor antisigma, y *MucB* regula la actividad de *MucA*. *MucD* es una proteasa periplásmica. Sin embargo, se desconoce el papel de *mucC* en la síntesis de alginato.

En el presente trabajo se continuó estudiando este operón. i) En primer lugar, mediante ensayos de complementación, se observó que *AlgU* de *A. vinelandii* fue capaz de iniciar la transcripción de genes dependientes del factor σ^E en *E. coli*, aunque con niveles más bajos. ii) Se determinó el inicio de la transcripción del operón *algUmucABCD* de *A. vinelandii*, con ensayos de extensión del iniciador, y se observó que hay tres inicios de transcripción en este operón, uno de ellos (P1) depende de la actividad del factor σ^E , lo que sugiere que este operón es capaz de iniciar su propia transcripción. Los demás inicios de transcripción no presentan secuencias consenso de promotores ya reportados. iii) Finalmente, se interrumpió los genes, *mucA* y *mucC* con genes que codifican para la resistencia a antibióticos, y se estudió el efecto de éstas mutaciones en la producción de alginato. Se observó que las mutantes aumentaron su producción del exopolisacárido, pero la mutante JRA4 (*mucA::Gm polar*) fué la que presentó un mayor aumento en la producción del polímero. Con respecto al proceso de diferenciación celular encontramos que, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de enquistamiento de las mutantes con respecto a la población.

2.1 GENERALIDADES DE *Azotobacter vinelandii*.

2.1.1 Posición taxonómica:

Familia Azotobacteraceae
Género *Azotobacter*
Especie *Azotobacter vinelandii*

Tomado de Krieg y Holt, 1984.

La familia Azotobacteraceae, comprende 4 géneros de bacterias gram-negativas:

GENERO	CARACTERISTICAS	ADN(mol%G+C)
<i>Azotobacter</i>	Bacilo grande; forma quistes; hábitat principalmente suelos neutrales o salinos.	63-66
<i>Azomonas</i>	Bacilo grande; no forma quistes; hábitad acuático.	53-59
<i>Beijerinckia</i>	Bacilo con forma de pera, en los extremos tiene grandes zonas de lípidos; produce grandes limos; habita suelos ácidos	54-60
<i>Derxia</i>	Bacilo; comúnmente forma colonias arrugadas.	70

Tomado de Bruck, 1984.

2.1.2 Características de *A. vinelandii*.

A. vinelandii al igual que todas las especies del género *Azotobacter*, tienen la capacidad de formar quistes resistentes a la desecación, esta característica los distingue de los otros géneros de la familia Azotobacteraceae. Todos los miembros de esta familia, pueden fijar nitrógeno atmosférico bajo condiciones aeróbicas [Kennedy y Toukdurian, 1987]. En *A. vinelandii* se han identificado tres nitrogenasas que funcionan en diferentes condiciones de oxigenación [Kennedy y Toukdurian, 1987]. *A. vinelandii* tiene una actividad respiratoria alta, generada por el alto contenido de proteínas óxido-reductoras y citocromos.

A. vinelandii posee múltiples copias de su genoma, al crecerla en medio rico, durante la fase estacionaria llega a tener 80 o más copias [Nagpal, *et al.*, 1989; Manna y Das, 1993; Maldonado, *et al.*, 1994]. El tamaño del genoma de esta bacteria es típico de procariontes (4.5

megabases) [Manna y Das, 1993]. Este organismo es un buen receptor de ADN foráneo, se le puede introducir de forma lineal o circular (plásmido); por transformación o por conjugación, además tiene la capacidad de incorporar el ADN homólogo, a su genoma por recombinación [Kennedy y Toukdarian, 1987].

A. vinelandii, sintetiza una gran variedad de productos como: sideróforos; hormonas vegetales reguladoras del crecimiento (p. e. auxinas, giberelinas y citocininas) [González-López, *et al.*, 1985]; además, polímeros de gran importancia económica, como el ácido poli- β -hidroxibutírico (PHB), que puede ser utilizado para la fabricación de plásticos biodegradables, y el alginato que es utilizado como gelificante y viscosificante [Sadoff, 1975].

2.1.3 CICLO DE VIDA DE *A. vinelandii*.

El ciclo de vida de este organismo presenta una fase vegetativa y una fase latente en forma de quiste (Fig. 1). En la fase vegetativa las células son bacilos de $2 \times 5 \mu\text{m}$ (tienen al menos 10 veces el volumen de *E. coli*); presentan locomoción por medio de flagelos peritricos. Cuando se crecen en medio Burk con glucosa del 0.2 al 1%, libre de nitrógeno, las células tienen un tiempo de generación de 2.5 a 3 horas [Wilson y Knight, 1952]. Cuando se dividen tienen forma de "cacahuete".

En la fase latente (quiste) las células, son esféricas, y tienen aproximadamente la mitad del volumen de las células vegetativas ($1.5 \times 2.0 \mu\text{m}$). El quiste está conformado por un cuerpo central con granulos de PHB, que es encapsulado por una cubierta interna llamada intina y otra externa, la exina. En su medio natural la formación de quistes se da cuando las condiciones son adversas, y en el laboratorio, el proceso se da después del crecimiento exponencial, por inducción con butanol o β -hidroxibutirato. Puede permanecer así, en estado de latencia por largos períodos de tiempo en el suelo, hasta que se vuelven a dar las condiciones favorables para su propagación [Lin y Sadoff, 1968], en el laboratorio se ha observado que, los quistes son viables por más de diez años, cuando se tienen en suelo seco [Vela, 1974]. En ésta bacteria, la producción de quistes es generalmente menor al 0.1% de la población de células, cuando se crece en medios de cultivo teniendo como fuente de carbono manitol, ramnosa y otros carbohidratos, así como una gran variedad de ácidos orgánicos y ciertos alcoholes, [Lin y Sadoff, 1968].

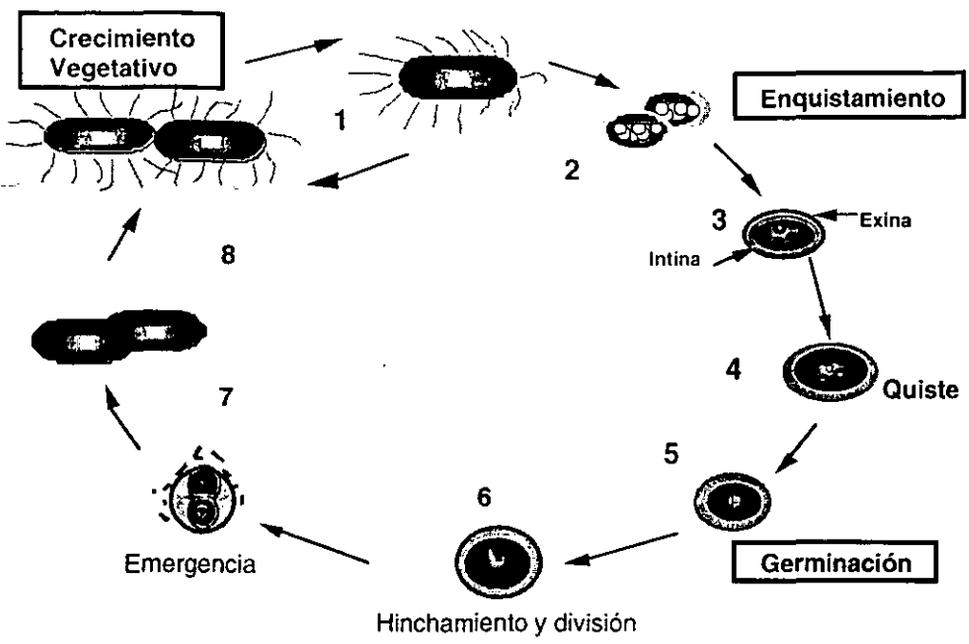


Figura 1. Ciclo de vida de *A. vinilandii*. 1 Crecimiento Vegetativo. 2 Última división vegetativa, engrosamiento de sus paredes y acumulación de PHB. 3 Formación de la exina e intina. 4 Quiste maduro. 5 Germinación. 6 División celular. 7 Emergen dos células por quiste. 8 Primera división celular después de la germinación (recuperan la locomoción) [Sadoff, 1975].

En el proceso de diferenciación celular, el cual dura cinco días [Winogradsky, 1938; Wyss, *et al.*, 1961; Tchan, 1962], las células pierden la locomoción y tienen una última división, adquieren una forma esférica, las paredes sufren un engrosamiento en un período de 4 horas. Los procesos morfogénéticos someten a una disminución del metabolismo de la célula, hay una acumulación de PHB, que se usa durante el proceso de diferenciación celular y en la germinación como fuente de carbono y energía [Lemoigne y Girard, 1943]. Posteriormente, el cuerpo central, se encapsula por la formación de la capa externa (exina) y la capa interna (intina, ambas cubiertas están conformadas principalmente de alginato y proteínas), de esta manera se genera un quiste maduro [Winogradski, 1938]. La germinación de los quistes, en medio con glucosa, tiene una duración de 4 a 6 horas. Pierden gradualmente la cápsula por el hinchamiento del cuerpo central, ocupando el volumen de la intina

[Loperfido y Sadoff, 1973], después sufren una división y, empiezan a crecer dentro de la exina, hasta que le causa una fractura a esta capa externa de la cápsula. Finalmente emergen dos células sin locomoción por cada quiste. En la primera división después de la germinación recobran su locomoción.

2.2 COMPOSICION Y PROPIEDADES DEL ALGINATO.

El alginato es un copolímero lineal formado de β -D ácido manurónico (M) y su C-5 epímero el α -L ácido gulurónico (G), unidos por enlaces 1,4. Estos monómeros se encuentran a lo largo del polímero formando bloques homopoliméricos de ambos tipos (bloques MM y bloques GG; Fig. 2A y 2B) y bloques heteropoliméricos en donde ambos residuos se encuentran en un arreglo alterno (bloques GM o MG; Fig. 2C y 2D) [Grasdalen, *et al.*, 1981; Sime, 1990; May, *et al.*, 1991].

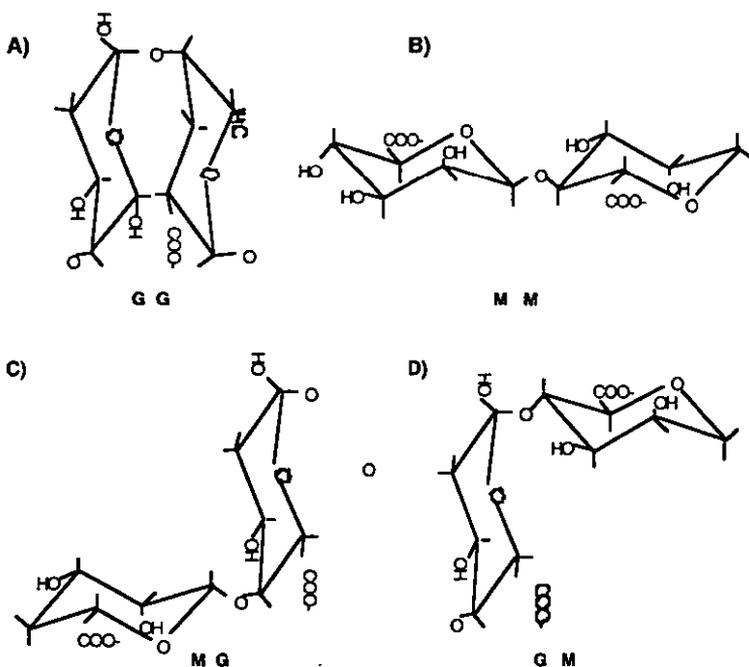


Figura 2. Composición del alginato. A) Bloques G; B) Bloques M; C) y D) Bloques alternos de estos dos monómeros [Grasdalen, *et al.*, 1981].

Los bloques comprendidos de M y MG, forman cadenas relativamente flexibles, mientras que las formadas por bloques G son, rígidas [Atkins, *et al.*, 1971]. Los bloques G muestran una conformación de bucle originado por el enlace díaxial (1-4) entre sus residuos, generando un espacio con la dimensión adecuada para atrapar cationes divalentes (p. e. Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+}). Al unirse los cationes a los bloques G le confieren rigidez, generando así, geles termorresistentes [Stokke, *et al.*, 1991]. Esta forma de gelificación de los bloques G, se conoce como el modelo de la “caja de huevos” (Fig. 3) [Grant, *et al.*, 1973]. Por su parte los bloques M no pueden unir cationes porque adoptan una conformación de listón extendido. El alginato producido por especies de el género *Pseudomonas* no contiene bloques continuos de ácido gulurónico (Tabla I), y por esta razón son incapaces de formar geles.

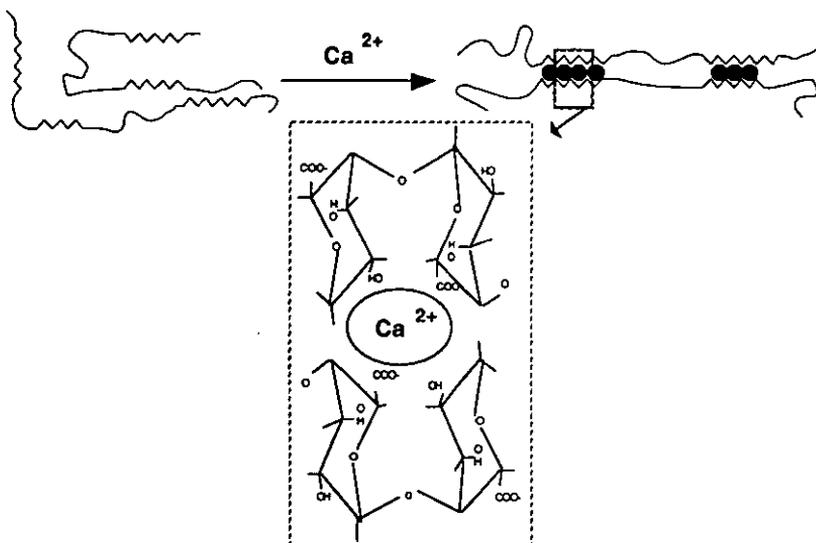


Figura 3. Modelo de la “caja de huevos” de la gelificación del alginato [Grant, *et al.*, 1973].

El alginato producido por bacterias, posee residuos de ácido manurónico con grupos O-acetilos, mientras que, en el alginato algal no existe acetilación (Tabla I) [Annison y Couperwhite, 1986]. El arreglo de la estructura del bloque y el tamaño molecular del alginato afecta la gelificación y viscosidad del polisacárido.

emulsificante auténtico, siendo éste uno de los pocos polisacáridos que tiene esta propiedad [Morris, 1987]. El alginato puede ser utilizado para elaborar alimentos dietéticos, debido a su bajo contenido calórico (1.4 Kcal/g) este polímero puede funcionar como agente de relleno en la formulación de productos hipocalóricos, como mayonesas y otros productos untables que sean bajos en grasas [Clementi, 1997]. En la elaboración de cerveza, la adición de PGA, sirve para incrementar la estabilidad de la espuma.

Tabla II. Algunas aplicaciones de los alginatos.

INDUSTRIA DE ALIMENTOS

Agentes gelificantes

Rellenos de pastelería

Postres de leche

Postres de gelatina

Alimento para animales

Agentes espesantes y estabilizantes

Estabilización de emulsiones en salsas, cremas y aderezos

Estabilización de espumas en cervezas

Espesantes de salsas y rellenos

Suspensión de partículas en jugos y bebidas

Agentes de retención de agua

Elaboración de helados

Estabilidad de alimentos congelados

Mejoramiento de la solubilidad de mezclas secas

MEDICINA

Recubrimiento de órganos transplantados

Impresiones usadas por los dentistas

OTRAS INDUSTRIAS

Agentes gelificantes

Geles refrescantes de aire

Preparaciones farmacéuticas

Agentes espesantes y estabilizantes

Estabilidad de emulsiones en pinturas y esmaltes

Espesantes de lociones y detergentes líquidos

Estabilización de espuma en detergentes

[Yalpani, 1987; Clementi, 1997].

Industria farmacéutica. Se utiliza en la elaboración de jarabes, y actualmente se está estudiando su aplicación en el recubrimiento de

tabletas, para que la liberación de los fármacos pueda ser regulada en un amplio rango [Sirikiae, *et al.*, 1994]. Fibras de calcio y alginato de sodio/calcio son usados en la elaboración de cuerdas quirúrgicas y vendas para heridas [Picquadio y Nelson, 1992]. Se sabe que cuando se utilizan vendajes cubiertos con alginato en heridas, el exudado de la herida se absorbe y forma una capa protectora sobre la superficie de la lesión manteniendo la humedad óptima para la curación [Clementi, 1997].

El alginato ha comenzado a utilizarse con fines médicos. Por las propiedades físicoquímicas. Se ha observado que el ácido algínico y sales solubles de alginato disminuyen la frecuencia de reflujo esofageal, sin interferir con el ácido normal y estatus de las enzimas del estómago. Por lo tanto, es usado como componente activo en un producto farmacéutico contra el desorden esofageal [Hagstam, 1985]. También se ha usado en el trasplante de islotes de Langerhans, en pacientes con diabetes, los islotes se encapsulan con alginato rico en ácido gulurónico. Estas cubiertas protegen las células transplantadas del sistema inmune y permiten la difusión de la insulina producida por éstas [Soom-Shiong, *et al.*, 1994]. La encapsulación de otros tipos celulares como: hepatocitos, hibridomas, células transfectadas con genes de citoquinas y fibroblastos recombinantes secretando el factor IX de humano (hormona de crecimiento) se están estudiando en animales [Dixit, *et al.*, 1993; Liu, *et al.*, 1993; Tai y Sun, 1993; Savelkoul, *et al.*, 1994]. Se ha observado que el alginato rico en bloques M puede estimular la respuesta del sistema inmune [Otterlei, *et al.*, 1991]. Tiene actividad de agente antitumoral en tumores de "merine" [Fujihara y Nagumo, 1992].

El alginato es un polímero que empieza a tener gran demanda en la industria de hidrocoloides. Actualmente se considera el tercer polisacárido de mayor solicitud. El consumo anual de alginato, a nivel mundial por diversas industrias, es de aproximadamente 33,000 toneladas, el cual es obtenido de algas marinas (Tabla III) [Rehm y Valla, 1997] con un precio que oscila entre los 5-20 dólares por Kg. Sin embargo, los alginatos usados en la industria farmacéutica que llegan a alcanzar precios de hasta 40,000 dólares por kilogramo, es en esta área que pueden competir comercialmente los alginatos generados por fermentación bacteriana [Rehm y Valla, 1997].

La producción mundial de alginato se centra en un número pequeño de compañías, entre las que destacan Donisco en Dinamarca, Kimitsu y Kibun Cemifa en Japón, Pronova Biopolymers Inc en Noruega, System Bio-

Industrias en Francia y The Nutra Sweet Kelco Co. en Estados Unidos, esta última genera el 80% de la producción mundial. En México *Macrocystis pyrifera*, se colecta ("cosecha") y, sin ningún proceso se exporta en fresco a los Estados Unidos a la compañía Kelco para su proceso [Zertuche-González, 1994], en consecuencia, México es un importador de los hidrocoloides que consume, importa un total de 187 toneladas de alginatos con un costo de \$7,084,000, esto representa el 7% del valor total de las importaciones de hidrocoloides.

2.4 FUENTES DE OBTENCION DE ALGINATO.

Se han reportado varios organismos como productores de alginato (Tabla III). Pero actualmente la única fuente de obtención para uso comercial, lo constituyen las algas marinas cafés, principalmente los géneros *Fucus*, *Laminaria*, *Macrocystis* y *Ascophyllum*. En México, se colecta la especie *Macrocystis pyrifera*, esta especie se distribuye en mantos desde las Islas Coronado frente a Tijuana hasta punta San Hipólito, un poco al norte de Bahía Magdalena, frente a las costas de Baja California.

Tabla III. Organismos reportados que producen alginato.

ALGAS MARINAS CAFES

MAS EXPLOTADAS	<i>Ascophyllum nodosum</i> <i>Laminaria digitata</i> <i>Laminaria hyperborea</i> <i>Macrocystis pyrifera</i>
MENOS EXPLOTADAS	<i>Laminaria japonica</i> <i>Eclonia maxima</i> <i>Lesonia nigrescens</i> <i>Sargassum sp.</i> <i>Dictyosiphon foeniculares</i> <i>Durvillaea sp.</i> <i>Eisenia bicyllis</i>

BACTERIAS

Azotobacter vinelandii
Azotobacter chroocorum
Azotobacter beijerinckii
Pseudomonas aeruginosa
Pseudomonas cepacia
Pseudomonas fluorescens
Pseudomonas mendocina

[Sime, 1990; Clementi, 1997; Gasesa, 1998]

2.5 FISILOGIA DEL ALGINATO.

El alginato es el polisacárido más abundante en las algas marinas cafés, el cual forma un gel en la matriz celular conteniendo iones de Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} . Esta matriz probablemente funcione como un esqueleto, proporcionando fuerza y elasticidad al tejido algal [Haug, *et al.*, 1974].

En *P. aeruginosa* la producción de alginato tiene un papel muy importante, en la infección de pacientes con fibrosis quística [Boyd y Chakrabarty, 1995]. Cuando esta bacteria invade a pacientes de fibrosis quística, forma biocapas ("biofilms") que son importantes en la colonización del pulmón, vías respiratorias y otros órganos de los pacientes. Además, se ha observado que les confiere resistencia contra los antibióticos y le ayuda a evadir la respuesta inmunológica [Chakrabarty, 1991; Otterlei, *et al.*, 1991]. Se ha propuesto que, cuando *P. aeruginosa* vive en el medio ambiente, la biosíntesis de alginato y las enzimas degradativas de este polímero, son importantes para el desarrollo, mantenimiento y propagación de biocapas, aunque todas las cepas que se han obtenido del ambiente, producen niveles muy bajos del polímero. Otras propiedades de estas biocapas se muestran en la tabla IV.

Tabla IV. Ventajas de la formación de biocapas en *P. aeruginosa*.

Aumento de la resistencia a antibióticos y otros biocidas
Protección a la desecación
Disminución de la susceptibilidad a la muerte por el sistema inmune del hospedero
Retención y concentración de nutrientes
Retención y unión de cationes
Concentración de factores virulentos extracelulares
Utilización de productos metabólicos de otras bacterias
Incremento de la estabilidad de plásmidos e intercambio genético
Aumenta la comunicación de célula-célula
Establecimiento de microambiente

[Boyd y Chakrabarty, 1995].

En células vegetativas de *A. vinelandii*, el alginato tiene diferentes funciones dependiendo de las condiciones ambientales. Por ejemplo, el polímero es necesario para la adhesión de las células a superficies [Costerton, *et al.*, 1987] y actúa como una barrera de difusión contra el oxígeno o metales pesados, también funciona como un sistema de intercambio iónico con alta selectividad para Ca^{++} [Fyfe y Govan, 1983].

Como ya se mencionó, el alginato es esencial para la formación de quistes [Campos, *et al.*, 1996], donde funciona como protector al preservar las células del estrés mecánico y desecación. Se ha observado que el alginato acetilado aumenta la resistencia a la desecación de los quistes, en comparación con el alginato no acetilado [Vázquez, *et al.*, 1999].

2.6 BIOQUIMICA DE LA BIOSINTESIS DEL ALGINATO

La vía de biosíntesis del alginato, se describió por primera vez en el alga café *Fucus gardneri* [Lynn y Hassid, 1966]; después en *A. vinelandii* [Pindar y Bucke, 1975]; y posteriormente en *P. aeruginosa*. La biosíntesis en bacterias y algas es muy similar, excepto en el sustrato inicial ya que las algas inician con D-manosa, mientras que en bacterias inician con D-fructosa [Pindar y Bucke, 1975]. Otra diferencia, es que el alginato de las bacterias posee residuos de ácido manurónico con grupos o-acetilos mientras que en algas no existe acetilación (Tabla I).

La ruta de biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* inicia con la fructosa-6-fosfato (F6P) pero, cuando estas bacterias se crecen en hexosas, estas son oxidadas por la vía Entner-Doudoroff (Fig. 4), esta vía es usada por bacterias del género *Azotobacter* y *Pseudomonas* porque carecen de la glucolisis [Conn y Stumpf, 1992].

La vía Entner-Doudoroff (Fig. 4) tiene la siguiente secuencia de reacciones:

- A) La enzima hexoquinasa, fosforilada la glucosa, y forma la glucosa-6-fosfato (G6F).
- B) Después a partir de la G6F se genera 6-fosfoglucono- δ -lactona (6FL) mediante la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- C) Posteriormente del 6FL a través de la enzima 6-fosfogluconolactonasa produce el ácido-6-fosfogluconico (A6F).
- D) A continuación el A6F, por medio de una deshidrogenasa se deshidrata y se redistribuye para generar 2-ceto-desoxiguconato-6-fosfato, E) al cual, a su vez, lo ataca una enzima del tipo aldolasa, generando piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (con algunas modificaciones a esta vía permiten el metabolismo de otras hexosas). El piruvato derivado de la oxidación de hexosas entra al ciclo de ácidos tricarbóxicos (también conocido como ciclo de Krebs) para generar fructosa-6-fosfato por la vía oxaloacetato y subsecuente gluconeogenesis [Narbad, *et al.*, 1988]. El ciclo de Krebs tiene un papel obligatorio en la conversión de glucosa a alginato [Narbad, *et al.*, 1988].

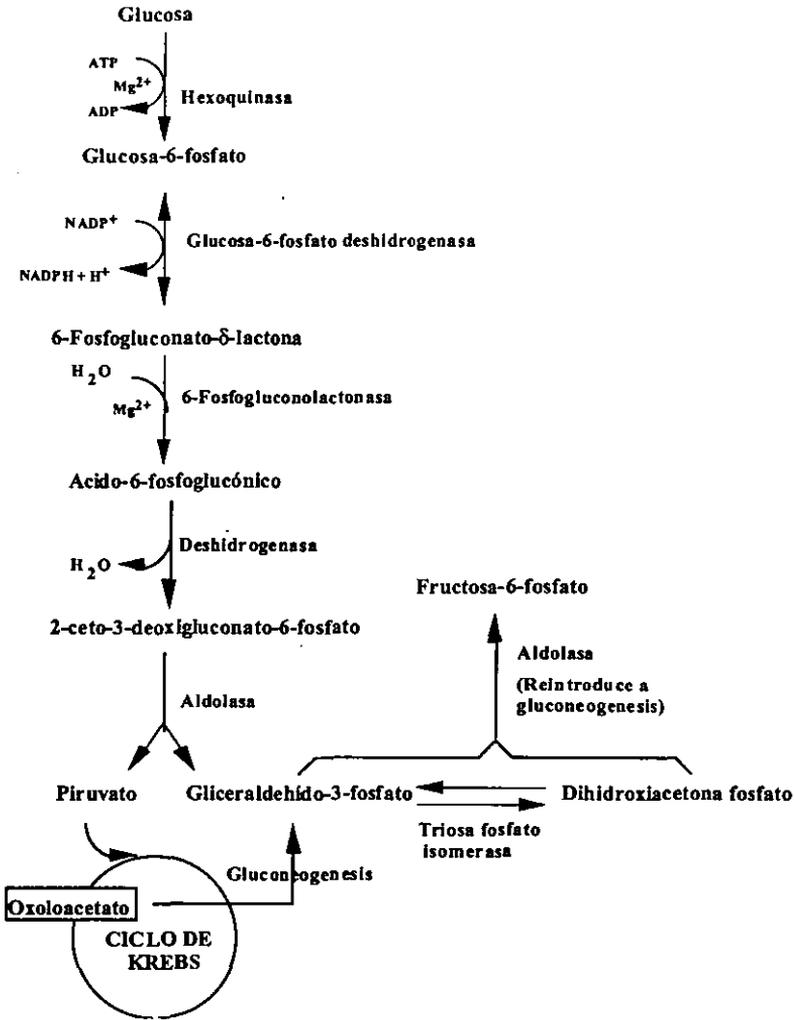


Figura 4. Vía Entner-Doudoroff. Las bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas* utilizan esta vía para oxidar azúcares de 6 carbonos diferentes a la fructosa, posteriormente a través de gluconeogénesis se genera fructosa, la cual se emplea en la síntesis de alginato. [Narbad, *et al.*, 1988; Conn y Stumpf, 1992].

Apartir de la F6P, a través de cuatro reacciones enzimáticas, es convertido a GDP ácido manurónico (Fig. 5), precursor directo del alginato:
 1.- La fructosa-6-fosfato se convierte en manosa 6 fosfato (M6P), por la

enzima fosfomanosa isomerasa (PMI-GMP: AlgA) [Darzins, *et al.*, 1986; Gill, *et al.*, 1986].

2.- A partir de la M6P se genera la manosa 1 fosfato (M1P), a través de la transferencia del grupo fosfato del carbono 6 al carbono 1, reacción que cataliza la enzima fosfomanomutasa (PMM: AlgC) [Zielinski, *et al.*, 1991].

3.- La M1P en presencia de GTP se convierte a GDP-manosa, por la enzima GDP-Manosa pirofosforilasa (PMI-GMP: AlgA) [Darzins, *et al.*, 1986; Gill, *et al.*, 1986].

4.- La GDP-manosa se oxida por la GDP-manosa deshidrogenasa (GMD: AlgD) dependiente de NAD⁺, para formar GDP-ácido manurónico (precursor directo del alginato) + 2 (NADH⁺) [Deretic, *et al.* 1987]. La GDP-manosa deshidrogenasa, es la enzima determinante en la vía al catalizar una reacción irreversible (Fig. 5), comprometiendo así al GDP-ácido manurónico a la vía de síntesis de alginato, mientras que los productos de las primeras reacciones pueden intervenir en otras vías metabólicas. Tal es el caso de la GDP manosa, la cual es común en la biosíntesis de lipopolisacáridos y alginato. El producto generado por AlgC, además de participar en la biosíntesis de estos factores, también interviene en la biosíntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa* [Goldberg, *et al.*, 1993; Ye, *et al.*, 1994].

5.- Una vez generado el ácido GDP-manurónico, en un proceso simultáneo cruza la membrana interna y se polimeriza, postulándose para ello la participación de las proteínas Alg8 y Alg44 (probables proteínas de membrana) [Maharaj, *et al.*, 1993], AlgK se considera como un translocador de alginato [Aarons, *et al.*, 1997]

6.- El alginato polimerizado, puede ser acetilado, epimerizado y cortado por proteínas que se localizan en el espacio periplásmico [Franklin, *et al.*, 1994; Boyd y Chakrabarty, 1995]: a) Para la **acetilación** de los residuos de ácido manurónico, se propone la participación de las proteínas AlgF, AlgI y ALgV (AlgJ en *P. aeruginosa*). Las mutaciones en cada uno de los genes que codifican para estas proteínas causan la producción de alginato no acetilado. AlgI probablemente está unida a la membrana, y permite el paso de los grupos O-acetil del citoplasma al periplasma, donde se transfieren a los residuos de manurónico por la O-acetiltransferasa AlgF [Shinaberger, *et al.*, 1993; Franklin y Ohman, 1993]; b) La **epimerización**, es el paso de ácido manurónico (no acetilado) a ácido gulurónico, esto lo realiza la epimerasa AlgG [Chitnis y Ohman, 1990]. En *A. vinelandii*, además tiene actividad de epimerasa en el medio extracelular [Haug, *et al.*,

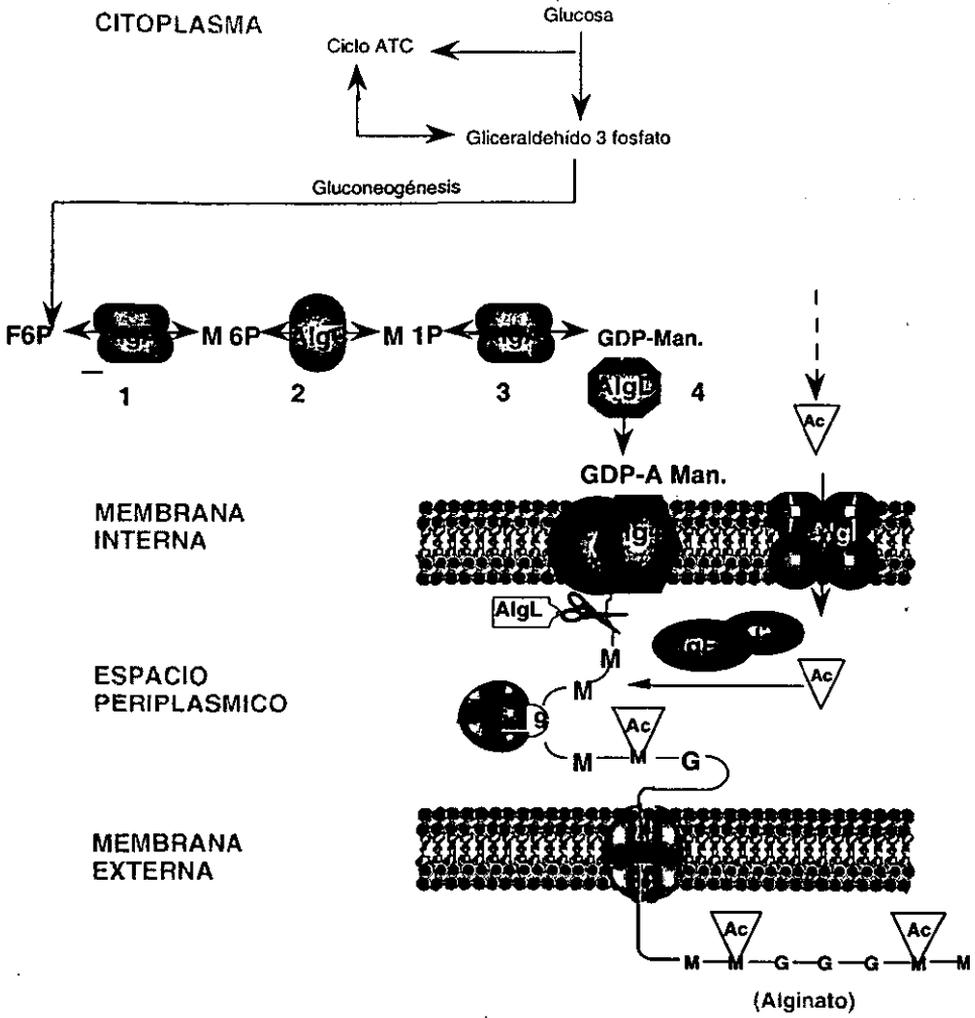


Figura 5. Biosíntesis de alginato en bacterias. Modificado de Gacesa, 1998.

1974], donde se han reportado varios genes que codifican para epimerasas extracelulares diferentes a AlgG [Ertesvag, *et al.*, 1995]. Sin embargo, no se sabe si se expresan todos al mismo tiempo; c) El corte realizado al polímero es hecho por la alginato liasa AlgL [Boyd, *et al.*, 1993; Shiller, *et al.*, 1993].

7.- Finalmente la secreción del alginato ocurre a través de la proteína AlgJ (AlgE en *P. aeruginosa*), proteína de membrana que funciona como canal iónico [Chu, *et al.*, 1991; Rehm, *et al.*, 1996].

2.7 GENETICA Y REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE ALGINATO

A pesar de que primero se describió la vía de biosíntesis de alginato, en *A. vinelandii* y después en *P. aeruginosa*, es en la última donde se ha estudiado más ampliamente la genética de la biosíntesis del alginato, por considerarse al polímero como uno de los factores de virulencia en la patogenicidad de dicha bacteria [Chakrabarty, 1991; Deretic, *et al.*, 1994; May y Chakrabarty, 1994].

2.7.1 Organización y localización física de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa*.

La mayoría de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato se encuentran agrupados principalmente en tres regiones del genoma de *P. aeruginosa*. Todos los genes, excepto *algC*, que codifican para las enzimas, involucradas en la biosíntesis de los monómeros de ácido manurónico, así como los genes que codifican para las proteínas involucradas en la polimerización, modificación (corte, acetilación y epimerización) y secreción del polímero (alginato), se encuentran agrupados en el minuto 34 de su genoma en un sólo operón policistrónico (operón *alg*), el cual se transcribe a partir del promotor *palgD* [Chitnis y Ohman, 1993]. Este operón es encabezado por *algD* seguido de *alg8*, *alg44*, *algK*, *algE*, *algG*, *algX*, *algL*, *algi*, *algJ*, *algF* y *algA* (Fig 6,A) [May y Chakrabarty, 1994].

En otra región del genoma ubicada en el minuto 10, se encuentran los genes reguladores *fimS*, *algR*, *algR2* y *algR3*, entre estos se encuentran genes que no están involucrados en la biosíntesis de alginato (Fig. 6,B) como: *argH* (involucrado en la biosíntesis de arginina); *hemC* y *hemD* (involucrados en la biosíntesis de precursores de grupos hemo) y el gen *fkI* (codifica para un homólogo de la proteína de unión a FK506 de la superfamilia inmunofilina) [Yu, *et al.*, 1997]. Cerca de estos genes se encuentra el gen estructural *algC* (Fig 6,B); y los genes *algB-kinB* [Ma, *et al.*, 1997], en forma separada, se encuentran los genes *algZ* [Baynham, *et al.*, 1999]; *cysB* [Delic-Attree, *et al.*, 1997]; *caP*; *himA* y *himD* genes que codifican para el factor de integración al hospedero [Delic-Attree, *et al.*, 1995].

En una tercera región del genoma (minuto 68), se encuentra un grupo

de 5 genes reguladores denominados *algU mucA mucB mucC mucD*, estos forman un operón (Fig 6,C) [Boucher, *et al.*, 1996 a y b], enseguida de este operón (min 69) se encuentra el gen *algW* [Boucher, *et al.*, 1996 a].

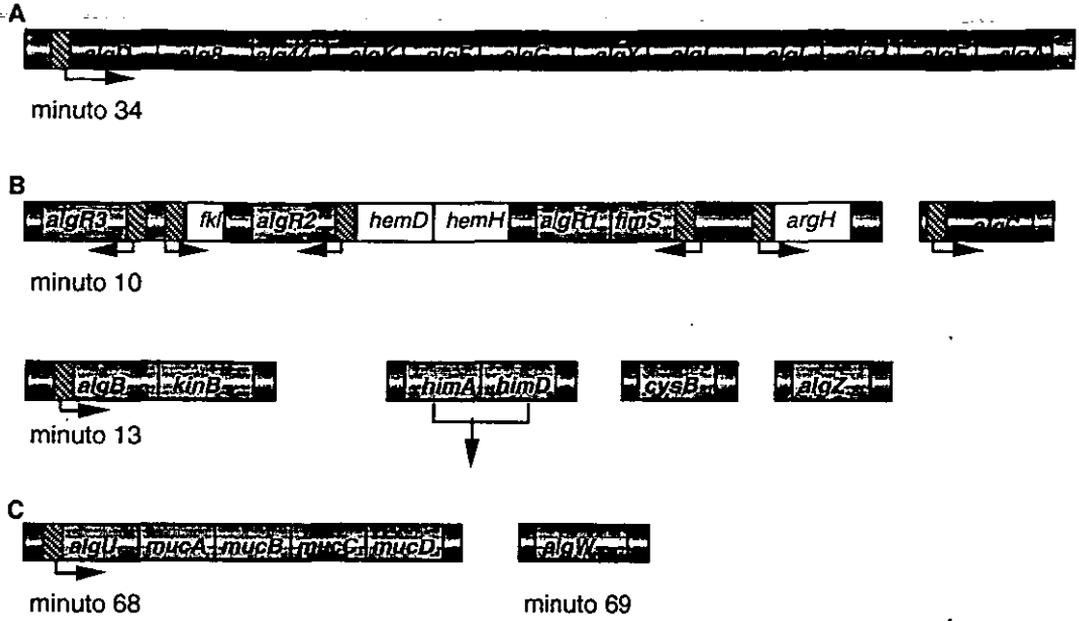


Figura 6. Organización y localización física de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato sobre el genoma de *P. aeruginosa*. A) Genes estructurales, formando un operón, ubicados en el min 34. B) Genes reguladores (excepto *algC*, gen estructural), localizados en los minutos 10, 13 y en otras regiones del genoma. C) Genes que regulan la mucoidia, organizados en un operón, localizados en el min. 68 [Modificado de May y Chakrabarty, 1994].

Designaciones alternativas para algunos genes son: *algU=algT*; *mucA=algS*; *mucB=algN*; *mucC=algM*; *mucD=algY*; *algR=algR1*; *algR2=algQ*; *algR3=algP*; *fimS=algZ*; *algX=alg60*,

2.7.2 Regulación de la biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa*.

En la regulación de la biosíntesis del alginato, a pesar de que ya se han descrito varios elementos (Fig. 7), aún falta mucho por conocer como funcionan estos elementos en los mecanismos de activación transcripcional de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato.

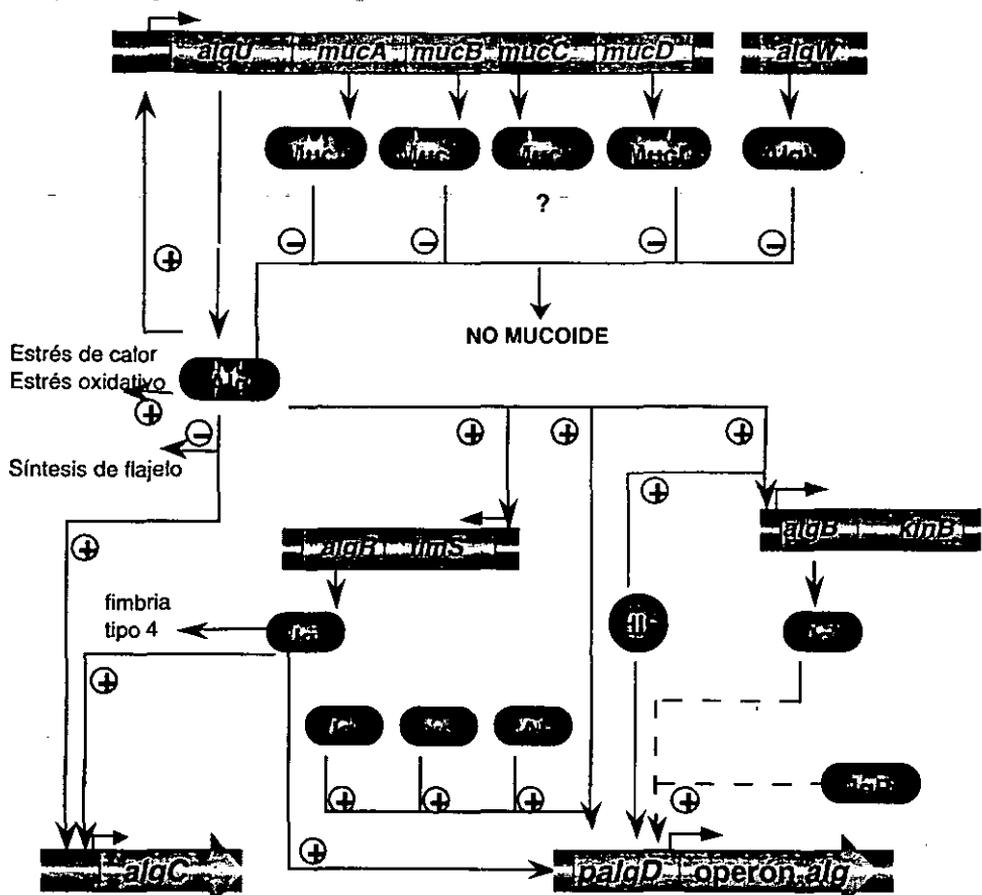


Figura 7. Regulación de la biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa*. AlgU (σ^E) es requerido para iniciar la transcripción de los genes *fimS*-*algR*; *algB*-*kinB*; *algC*; el operón *alg* y su propia transcripción, también esta involucrado en la expresión de sistemas involucrados en la respuesta a estrés de calor y oxidativo. MucA y MucB regulan negativamente la actividad de AlgU controlando así el fenotipo mucoide. MucD y AlgW también regulan negativamente a σ^E . AlgR, AlgB, AlgZ, HIF, CysB y CAP son reguladores positivos en la activación transcripcional del operón *alg* a través del promotor *palgD*, de los cuales AlgR, AlgZ junto con AlgU son esenciales para la expresión del operón *alg*. AlgR también activa la transcripción de *algC*, por su parte HIF se ha observado que también se une al promotor de *algB*. [Modificado de Martin, *et al.*, 1994].

Tal es el caso del promotor *palgD* (de donde se inicia la transcripción del operón *alg*) y es el principal blanco de regulación en la biosíntesis del

polímero, su activación transcripcional es un evento regulatorio importante, porque se refleja significativamente en la fisiología y morfología de la célula [Govan y Deretic, 1996], por lo tanto, está muy controlado. En las secuencias *cis* del promotor *palgD* se unen varias proteínas para su completa activación transcripcional (Fig. 8), dentro de los elementos que intervienen está un factor sigma, proteínas del sistema de regulación de dos componentes, etc., que se describen en forma breve a continuación.

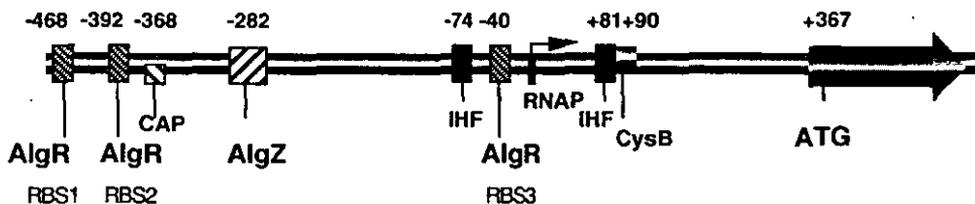


Figura 8. Mapa del promotor *palgD* de *P. aeruginosa*. En el mapa se encuentra la localización de las secuencias *cis* en las cuales se unen las proteínas que activan la transcripción de este operón. Los números están posicionados a partir del inicio de la transcripción del operón *alg*. Las proteínas representadas son: AlgR; CAP, sitio de unión a CAP de *E. coli*; el activador AlgZ; IHF, Factor de integración al hospedero; RNAP, RNA polimerasa; CysB, regulador de la biosíntesis de cisteína. [Baynham, *et al.*, 1999].

2.7.3 Regulación por el operón *algU mucA mucB mucC mucD*.

La regulación de la biosíntesis de alginato involucra el producto de genes específicos y de otros que tienen un papel más general, como el producto de los genes *algUmucABCD*, estos se encuentran en la parte superior de la cascada de regulación (Fig. 7). Genes homólogos a este operón se han descrito en otras bacterias como *A. vinelandii*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Hemophilus influenzae* y *Photobacterium sp.* (Fig. 9) [Chi y Bartlett, 1995; Johnson, *et al.*, 1991; Lipinska, *et al.*, 1988; Martínez-Salazar, *et al.*, 1996].

***algU*.** El gen *algU* codifica para un factor sigma alternativo llamado σ^E (también conocido como AlgU, AlgT y σ^{22}). AlgU inicia la transcripción de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato, como el operón *alg*, *algR-fimS*, *algC*, *algB-kinB*, incluso su propia transcripción (Fig. 7)

[Devries y Ohman, 1994; Martin, *et al.*, 1994; Wozniak y Ohman, 1994]. Además de tener actividad en la transcripción de estos genes, también está involucrado en la expresión de sistemas para incrementar la resistencia a algunos tipos de estrés como el de salinidad, temperatura y el oxidativo [Martin, *et al.*, 1994]. Esta función también se ha observado en el factor σ^E de *A. vinelandii*, *E. coli* y *S. typhimurium* [Johnson, *et al.*, 1991; Lipinska, *et al.*, 1988; Martínez-Salazar, *et al.*, 1996], en el caso de *Photobacterium* se requiere para vivir a altas presiones y bajas temperaturas, condiciones que se dan en el fondo marino su hábitad natural [Chi y Bartlett, 1995]. El factor σ^E es intercambiable de *E. coli* a *P. aeruginosa* y viceversa [Yu, *et al.*, 1995].

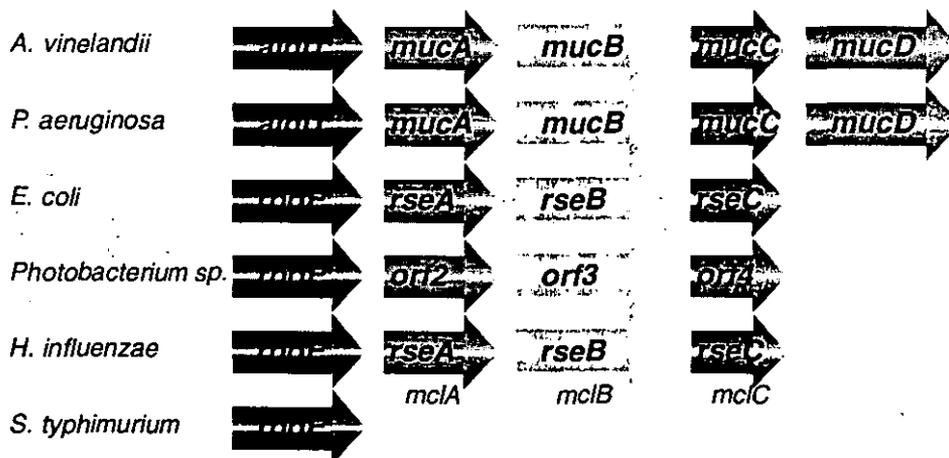


Figura 9. Genes que codifican para el factor de estrés citoplásmico (EFC) y sus homólogos en diferentes bacterias gram-negativas. .

El producto codificado por *algU* y sus homólogos (Fig. 9), se les ha considerado como miembros pertenecientes a una subfamilia de factores de estrés extracitoplásmico (ECF) [Lonetto, *et al.*, 1994; Missiakas y Raina, 1998] los cuales presentan las siguientes características: 1) De las cuatro regiones conservadas en σ^{70} relacionado a los factores σ , la región 3 y gran parte de la región 1 están generalmente ausentes, generando así el tamaño pequeño típico de los factores sigma de EFC (usualmente de 20-30

KDa). 2) Los promotores regulados por los factores sigma del EFC son muy similares, especialmente en la región -35 con el motivo GAACTT conservado [Lonetto, *et al.*, 1994]. 3) Su actividad se regula siempre por factores antisigma específicos codificados por genes que se encuentran hacia abajo del gen que codifica para el factor sigma [Missiakas y Raina, 1998].

***muca*, *mucB* y *mucD*.** Los productos que codifican estos genes regulan negativamente a σ^E . En *Escherichia coli*, se encontraron las proteínas RseA y RseB que son homólogas a MucA y MucB. En ambos organismos, se ha demostrado que, MucB (y RseB) es una proteína periplasmica, mientras que MucA (y RseA) es una proteína de membrana interna con un dominio en el periplasma (interactuando con MucB; RseB) y otro dominio en el citoplasma que funciona como un factor antisigma secuestrando a σ^E (Fig. 10) [De las Peñas, *et al.*, 1997a; Missiakas, *et al.*, 1997; Xie, *et al.*, 1996; Zhi-Dong, *et al.*, 1996]. El modelo que se propone para regular a σ^E por las proteínas antes mencionadas es el siguiente:

Cuando no se requiere de la actividad del factor σ^E , este se encuentra unido a el antisigma MucA, formando un complejo protéico con MucB (Fig. 10), pero cuando existe una señal de estrés y se requiere de la actividad del factor σ^E , la señal la detecta MucB en el periplasma, quien sufre un cambio conformacional que ocasiona su separación de MucA. Esta separación provoca un cambio conformacional a MucA, y genera así, la liberación del factor σ^E . Después, el factor sigma inicia la transcripción de los genes involucrados en la respuesta a la señal de estrés [Xie, *et al.*, 1996; Zhi-Dong, *et al.*, 1996; De las Peñas, *et al.*, 1997a; Mathee, *et al.*, 1997; Missiakas, *et al.*, 1997]. Se sugiere que la señal que se genera en el periplasma es la acumulación de proteínas anormales o proteínas inmaduras de membrana externa ocasionado, por ejemplo, por un estrés de calor. En *P. aeruginosa* las proteínas anormales o inmaduras son retiradas por MucD y AlgW. La proteína AlgW es codificada por el gen *algW*, que se encuentra cerca del operón *algUmucABCD* [Boucher, *et al.*, 1996]. Las proteínas MucD y AlgW tienen homología con la serin proteasa HtrA de *Escherichia coli*, la cual esta encargada de retirar las proteínas mal plegadas del periplasma durante el estrés de calor en dicha bacteria [Erickson y Gross, 1989; Hiratsu, *etal.*, 1995; Rouvière, *et al.*, 1995].

La mucoidia en *P. aeruginosa*, la determina el producto de los genes

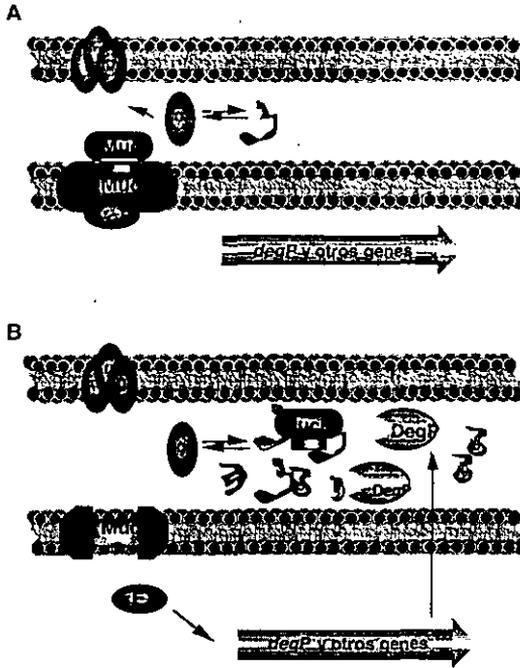


Figura 10. Modelo de regulación de la actividad del factor σ^E en *E. coli*. A) El factor σ^E se encuentra inactivado por el antisigma MucA, formando un complejo con MucB. B) Cuando se genera una señal en el periplasma (p. e. acumulación de proteínas mal plegadas), MucB se separa de MucA, para que σ^E sea liberado y se transcriban los genes cuyos productos están involucrados en la generación de la respuesta a ese estrés [Xie *et al.*, 1996; Zhi-Dong *et al.*, 1996; De las Peñas *et al.*, 1997; Missiakas *et al.*, 1997].

algUmucABCD. En cepas mucoides, AlgU tiene una alta actividad, ya que inicia la transcripción de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato. La sobreproducción del polímero es el causante del fenotipo mucoso [Deretic, *et al.*, 1994]. En cepas no mucoides, las proteínas MucA y MucB inactivan a AlgU (σ^E). En un análisis realizado a cepas mucoides de *P. aeruginosa*, aisladas de pacientes con fibrosis quística, se ha encontrado que la actividad de AlgU es muy alta, a causa de que los genes *muca* y/o *mucB* se encuentran mutados. El gen que con mayor frecuencia sufre mutaciones, es *muca* (84% de las 53 cepas obtenidas de diferentes pacientes), en varias cepas de laboratorio que adquieren espontáneamente

un fenotipo mucoide también es por alteraciones en *mucA*. Se ha observado que la mayoría de las alteraciones es por la generación de codones de terminación de la traducción y por introducir o quitar tripletes que modifican los marcos de lectura [Boucher, *et al.*, 1997].

***mucC*.** Se conoce poco acerca de este gen, en *P. aeruginosa* cuando se mutó a *mucC* no se observó efecto alguno en la biosíntesis de alginato, solo cuando se muta *mucC* en una cepa *mucA*⁻ o *mucB*⁻ y se crece en condiciones de doble estrés (p. e. alta temperatura y alta osmolaridad), se logra observar un aumento de la producción de alginato [Boucher *et al.*, 1997]. En el caso de *Photobacterium* sp. que tiene un gen homólogo a *mucC* (*orf4*), se ha observado que es necesario para vivir a altas presiones y bajas temperaturas, condiciones que se dan en el fondo marino [Chi y Bartlett, 1995]. En *Salmonella typhimurium* se ha observado que al mutar el gen *rseC*, las células se vuelven auxotrofas a tiamina [Beck, *et al.*, 1997].

2.7.4 Regulación por proteínas del sistema de regulación de dos componentes.

Los genes *fimS*-*algR*; *kinB*-*algB*, codifican proteínas que pertenecen al sistema de regulación de dos componentes, AlgR y AlgB son los reguladores de respuesta, mientras que FimS y KinB son las proteínas histidín-cinasas encargadas de registrar los cambios de su ambiente.

AlgR. En la transcripción del operón *alg*, además de requerirse de la actividad de AlgU, es necesaria la participación de los reguladores AlgR y AlgB (Fig. 8) [Deretic *et al.*, 1989; Goldberg y Dahnke, 1992]. AlgR se une al promotor *palgD* en tres sitios denominados RBS (AlgR Binding Site), que contienen las secuencias ACCGTTGTC, y se encuentran ubicados a -468 (RBS1), -392 (RBS2) y -40 (RBS3) del inicio de la transcripción. El sitio RBS3 tiene modificado dos bases (GCCGTTGTC) y se encuentra en sentido opuesto a los dos primeros. Como dos sitios de reconocimiento de AlgR (RBS1 y RBS2) se encuentran distantes del inicio de la transcripción, se postula que el ADN se dobla para acercar este activador al promotor *palgD* y así activar la transcripción [Deretic, *et al.*, 1994]. En el doblamiento de ADN, se propone la participación de las proteínas AlgR3, que tiene una similitud con la histona H1 [Deretic, *et al.*, 1992; Kato, *et al.*, 1990] e IHF (Factor de integración del hospedero), igualmente homóloga a histonas [Mohr y Deretic, 1992; Toussaint, *et al.*, 1993a; Wozniak, 1994; Delic-Attree, *et al.*, 1996] IHF tiene dos sitios de unión en el promotor *palgD*

ubicados a -74 y +81, cuya secuencia es CAACCTGTTG [Mohr y Deretic, 1992; Toussaint, *et al.*, 1993; Wozniak, 1994], IHF también participa en la activación transcripcional de *algB* [Wozniak y Ohman, 1993].

Cuando se muta el gen *algR*, se abate la expresión del operón *alg*. Por su parte, mutantes en IHF, la transcripción del operón *alg* disminuye de 3 a 4 veces, y la producción de alginato se reduce a la mitad en condiciones de alta osmolaridad y limitación de nitrógeno [Delic-Attree, *et al.*, 1996]. Se sugiere que la proteína encargada de fosforilar a AlgR es **FimS**, la cual es una histidin-cinasa atípica. FimS en un principio fue llamada AlgZ pero ésta es diferente a la proteína AlgZ que se une a ADN en el promotor *palgD* (ver más adelante). FimS-AlgR y AlgU además de participar en la regulación de la biosíntesis de alginato también se encuentran regulando la síntesis de la "fimbria" tipo IV que se requiere para un tipo de locomoción de superficie conocido como "twitching-motility", utilizado por *P. aeruginosa* para la invasión de células durante la infección [Witchurch, *et al.*, 1997]. Este mismo tipo de movimiento se encuentra en varias bacterias patógenas [Strom y Lory 1993].

Se sugiere que, para regular la síntesis de alginato o la locomoción superficial por el regulador de respuesta AlgR, depende si se encuentra fosforilado o no fosforilado. En su forma no fosforilado, regularía positivamente la biosíntesis de alginato (se encontraría no fosforilado por la abundancia de AlgR, a causa de la alta actividad de AlgU). Cuando esta fosforilado podría estar regulando positivamente la biosíntesis de fimbria [Ma, *et al.*, 1998].

En el promotor del gen *algC*, existen sitios similares a los del promotor *palgD* y, hay evidencias de que AlgR también activa la transcripción de este gen [Fujiwara, *et al.*, 1993].

AlgB. AlgB muestra homología con los reguladores de respuesta de la subfamilia NtrC [Wozniak y Ohman, 1991]. El mecanismo por el cual AlgB estimula la transcripción del operón *alg* no se conoce, y se sugiere que su efecto es indirecto porque no hay evidencias de unión de esta proteína en las secuencias cercanas del promotor *palgD*. AlgB se requiere para aumentar la producción de alginato, pero no es esencial para la activación transcripcional del operón *alg*, esto se ha observado en mutantes *algB*, donde no desaparece aunque se reduce la producción de alginato [ó la transcripción del operón *alg*]. La proteína histidin-cinasa **KinB**, se sugiere que es la proteína que fosforila a AlgB [Ma, *et al.*, 1997].

2.7.5 Otros elementos reguladores de la biosíntesis de alginato.

AlgZ. AlgZ es una proteína de unión a ADN, que tiene un sitio de unión en el promotor *palgD* localizado hacia arriba (-282) del inicio de la transcripción (Fig 8) [Baynham, *et al.*, 1999]. AlgZ al igual que AlgR y AlgU es una proteína esencial para activar la transcripción del operón *alg*, esto se confirmó al generar cepas mutantes en *algZ* y no detectar transcripción del operón *alg* [Baynham, *et al.*, 1999], no se conoce el mecanismo de acción por el cual AlgZ activa la transcripción del operón *alg*.

AlgR2. Otro elemento regulador positivo que aumenta el inicio de la transcripción del operón *alg* es el producto del gen *algR2* (fig 8). AlgR2 se requiere para la síntesis de alginato a 37°C. Hasta el momento, tampoco se conoce la manera en como regula la transcripción del operón. Se ha reportado, que AlgR2, también participa en la regulación de las enzimas nucleótido difosfato cinasa (Ndk) y succinil coenzima A sintasa (Scs), esta última, del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, [Schilctman, *et al.*, 1994].

CysB. CysB es un activador transcripcional de la familia LysR que participa en la síntesis de cisteína. Pero además, se une al promotor *palgD*, en la posición +90 con respecto al inicio de transcripción (fig. 8). La posible secuencia de unión de esta proteína es 5'TAAAGGCCTTTA3' la cual contiene un par de secuencias invertidas repetidas. Mutantes en CysB disminuye en un 10% o menos la transcripción del operón *alg* en condiciones de alta osmolaridad [Delic-Attree, *et al.*, 1997]

Como se puede observar en la figura 8, el promotor *palgD* de donde se inicia la transcripción del operón *alg*, es un promotor de los cuales no se conocen muchos ejemplos en bacterias. Promotores que están altamente regulados, más parecido a un promotor de eucarionte, que a un promotor de bacteria.

2.7.6 Regulación de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*.

Genes estructurales. En *A. vinelandii* al igual que *P. aeruginosa*, todos los genes estructurales, excepto *algC*, se encuentran agrupados en una sola región del genoma y guardan el mismo orden. La diferencia es a nivel transcripcional, mientras que en *P. aeruginosa* sólo es una unidad transcripcional, en *A. vinelandii* forman tres unidades transcripcionales (Fig. 11): 1) la primera conformada únicamente por el gen *algD*, que es transcrito a partir de tres promotores; el promotor P1 dependiente del factor σ^{70} ; el promotor P2 que depende del factor σ^E (AlgU) y el promotor

P3 que no muestra secuencias consenso de promotores conocidos [Campos, *et al.*, 1996; Núñez, *et al.*, 1999]. II) El segundo operón está constituido por los genes *alg8,44,K,J* [Rehm, *et al.*, 1996; Mejía-Ruiz, *et al.*, 1997a y 1997b]. El operón parece ser transcrito a partir de un promotor dependiente del factor σ^B (homólogo al σ^B (SpoH) de *Bacillus subtilis* y al factor σ^S de *E. coli*) [Mejía-Ruiz, *et al.*, 1997a]. III) El tercer operón contiene los genes *algGXLIVFA* [Lloret, *et al.*, 1996; Rehm, *et al.*, 1996; Mejía-Ruiz, *et al.*, 1997a y 1997b; Vázquez, *et al.*, 1999], su transcripción, inicia en un sitio que no presenta secuencias consenso de promotores conocidos, sin embargo, las secuencias CCGTG-(N)₂₀-CGCT de las regiones -10 y -35 de *algG* son similares a la -10 y -35 (CCGTG(N)₂₃-CGCT) de la región promotora del regulador *algR* [Núñez, *et al.*, 1999], estos dos promotores podrían tener el mismo mecanismo de regulación incluyendo el factor sigma. El gen *algA* tiene su propio promotor, pero la transcripción de *algA* a partir de este, no es suficiente para la biosíntesis de alginato y presentar el fenotipo mucoide [Vázquez, *et al.*, 1999]. Actualmente, en nuestro laboratorio, se está caracterizando por G. Gaona, la regulación del gen *algC*, que se encuentra separado del resto de los genes *alg* en el genoma de *A. vinelandii*.

Genes reguladores. En otra región del genoma se encuentra el grupo de cinco genes reguladores homólogos a *algUmucABCD* de *P. aeruginosa*, los cuales, también se encuentran formando un operón (Fig. 11) [Martínez-Salazar, *et al.*, 1996]. Por otra parte, se identificó el gen homólogo a *algR*, sin embargo, en *A. vinelandii* la participación de AlgR no es esencial para la producción de alginato, porque en cepas mutantes en *algR*, la producción de alginato se disminuye a la mitad pero no se abate [Núñez, *et al.*, 1999]. AlgR en *A. vinelandii* no está involucrado directamente en la transcripción de *algD*, como es el caso de *P. aeruginosa*, su regulación podría ser de una manera indirecta la cual se desconoce. El proceso que se afecta por la mutación de *algR* es el de diferenciación celular. Por su parte, el gen homólogo a *fimS* (la pareja de *algR* en *P. aeruginosa*) no se encuentra en el genoma de este organismo [Núñez, *et al.*, 1999]. Además, se han encontrado el par de genes *gacA-gacS*, los cuales codifican proteínas que pertenecen al sistema de regulación de dos componentes, donde GacA es el regulador de respuesta y GacS es la encargada de registrar los cambios en el ambiente, estos genes no se encuentran juntos como ocurre con otros genes homólogos que pertenecen a este grupo de proteínas reguladoras [Castañeda, *et al.*, 2000]. GacS es un

regulador positivo de la biosíntesis de alginato, pero cuando la concentración de esta proteína aumenta tiene el efecto contrario, posiblemente porque GacS esté defosforilando a GacA [Castañeda, *et al.*, 2000]. La proteína GacS, participa en la regulación transcripcional del gen *algD*, el cual, como ya se menciono, codifica la enzima clave de la biosíntesis de alginato [Castañeda, *et al.*, 2000].

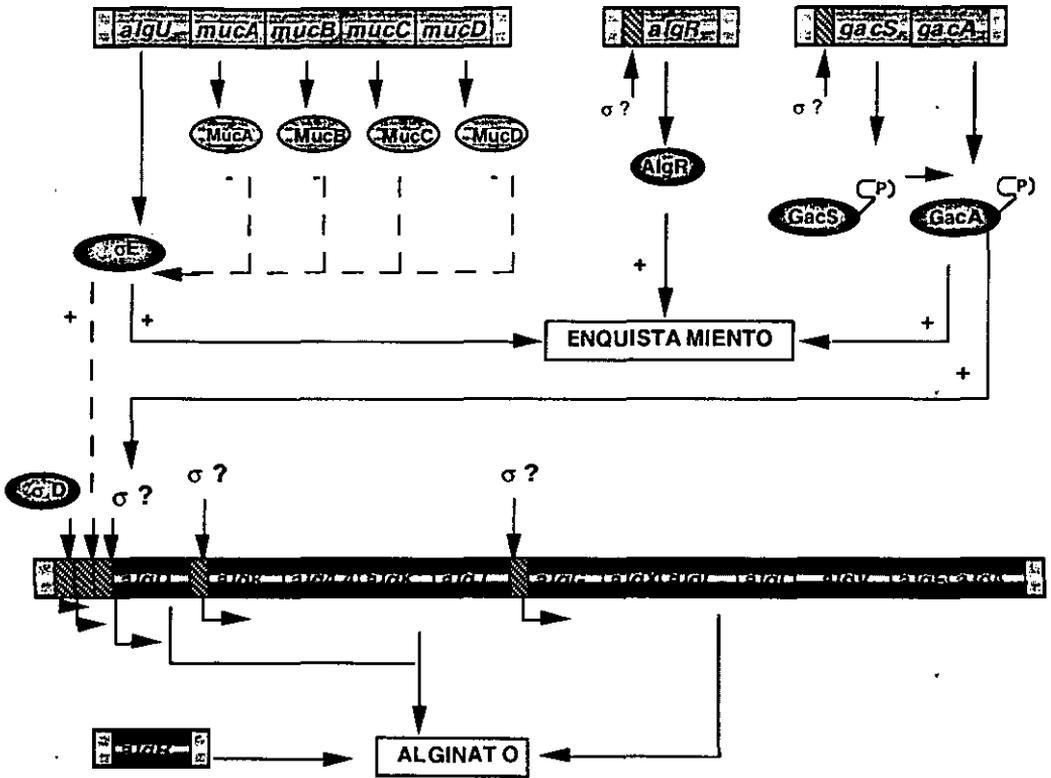


Figura 11. Regulación de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*.

Además, el par de proteínas GacA-GacS regula la producción de PHB, el otro polímero producido por esta bacteria. Se ha observado que GacS tiene los mismos efectos que en la regulación de la biosíntesis de alginato, es decir, lo regula positivamente, pero al aumentar su concentración regula negativamente la biosíntesis de PHB [Castañeda, *et al.*, 2000].

III. OBJETIVOS.

Estudiar el papel de los productos codificados por los genes *mucA*, *mucB*, *mucC* y *mucD* en la producción de alginato y el enquistamiento de *Azotobacter vinelandii*.

Estudiar la regulación transcripcional y la expresión en *Escherichia coli* del gen *algU* de *A. vinelandii*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar el inicio de la transcripción del operón *algU mucABCD* de *A. vinelandii*.
- 2) Determinar si el gen *algU* de *A. vinelandii* es funcional en *E. coli*.
- 3) Mutar los genes *mucA* y *mucC* de *A. vinelandii*.
- 4) Transferir las mutaciones de los genes *mucA* y *mucC* al genoma de *A. vinelandii*, observando su efecto en la producción de alginato y en la diferenciación celular de esta bacteria.

4.1 CEPAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.

CEPA	CARACTERISTICAS	REFERENCIA
<i>A. vinelandii</i>		
ATCC 9046	Cepa silvestre. Nal ^r . Mucoide.	Colección.
SMU88	ATCC 9046 <i>algU</i> :: Ω Km. Km ^r , Nal ^r . No mucoide.	Moreno, <i>et al.</i> , 1998
ATR8	ATCC 9046 <i>algR</i> :: Ω Tc. Tc ^r , Nal ^r . Menos mucoide que la silvestre.	Núñez, <i>et al.</i> , 1999
JR A8	ATCC 9046 <i>mucA</i> :: Ω Gm, en la orientación no polar. Gm ^r , Nal ^r . Mucoide.	Este trabajo.
JR A4	ATCC 9046 <i>mucA</i> :: Ω Gm, en la orientación polar. Gm ^r , Nal ^r . Mucoide.	Este trabajo.
ML C4	ATCC 9046 <i>mucC</i> :: Ω Tc, en la orientación no polar. Tc ^r , Nal ^r . Mucoide.	Este trabajo.
ML C2	ATCC 9046 <i>mucC</i> :: Ω Tc, en la orientación polar. Tc ^r , Nal ^r . Mucoide.	Este trabajo.
AEIV	Cepa silvestre. Mucoide (menos mucoide que la ATCC 9046). Nal ^r .	Svein Valla.
AEC2	AEIV <i>mucC</i> :: Ω Tc, en la orientación no polar. Tc ^r , Nal ^r . Mucoide.	Núñez <i>et al.</i> , 2000
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44, ΔlacV169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1.</i>	Sambrok, <i>et al.</i> , 1989
GAG16037	MC 1061 [Δ (<i>lac</i>)X174], λ (P3:: <i>lacZ</i> del gen <i>rpoH</i>).	Mecenas, <i>et al.</i> , 1993
CAG22216	GAG16037 <i>rpoE</i> :: Ω Cm.	Rouvière, <i>et al.</i> , 1995
22216	CAG22216 complementada con el plásmido pJMSAT1.	Este trabajo.

4.2 PLASMIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.

PLASMIDO	CARACTERISTICAS	REFERENCIA
pJMSAT1	Contiene el PCR (1.6 Kb) de los genes <i>algU</i> y <i>mucA</i> de <i>A. vinelandii</i> , el PCR se obtuvo usando como templado el ADN genómico de la cepa ATCC 9046. Amp ^r .	Moreno, <i>et al.</i> , 1998
pMOSBlue	Vector de clonación (4887 pb). <i>lacZ</i> . Amp ^r .	Amersham Pharmacia Biotech.
pLRA	pMOSBlue con el PCR (1301 pb) del gen <i>mucA</i> de <i>A. vinelandii</i> , PCR obtenido usando como templado el ADN genómico de la cepa ATCC 9046.	Este trabajo.
pLRA8	Derivado del plásmido pLRA con la interrupción del gen <i>mucA</i> con el casete de gentamicina en la orientación no polar.	Este trabajo.
pLRA4	Derivado del plásmido pLRA con el gen <i>mucA</i> interrumpido con el casete de gentamicina en la orientación polar.	Este trabajo.
pLRC	pMOSBlue con el PCR (1324 pb) del gen <i>mucC</i> de <i>A. vinelandii</i> , PCR obtenido usando como templado el ADN genómico de la cepa ATCC 9046.	Este trabajo.
pLRC4	Derivado del plásmido pLRC con la interrupción del gen <i>mucC</i> con el casete de tetraciclina en la orientación no polar.	Este trabajo.
pLRC2	Derivado del plásmido pLRC con la interrupción del gen <i>mucC</i> con el casete de tetraciclina en la orientación polar.	Este trabajo.

4.3 CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *A. vinelandii* Y *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB y se incubaron a 37° C por 12 h. Por su parte, las cepas de *A. vinelandii* se crecieron en medio BS a 30° C por 48 h. Cuando se crecieron en medio líquido, el medio ocupaba 1/5 del volumen total del matraz, y se incubó en agitación a 250 rpm. Los antibióticos usados para *E. coli* y *A. vinelandii* ($\mu\text{g/ml}$) fueron: Ampicilina (Amp) 200: no usado; cloramfenicol (Cm) 10: no usado; kanamicina (Km) 5:5; tetraciclina (Tc) 25:25; gentamicina (Gm) 12.5:1.5 en caja y 0.5 en matraz.

Composición del medio BurK-Sacarosa (BS) (g/l): Sacarosa, 0.2; K_2HPO_4 ,

0.8; KH_2PO_4 , 0.2; Na_2SO_4 , 0.183; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.16; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0002; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.073.

4.4 MANIPULACION DE ADN.

Los protocolos usados en la purificación, así como la electroforesis en geles de agarosa, su purificación de geles de agarosa e hibridación tipo Southern del ADN genómico y de plásmidos, y la transformación de *E. coli* se realizaron conforme a lo descrito por Sambrook, *et al.*, (1989). Las enzimas de modificación y restricción de ADN usadas en este trabajo fueron de las compañías Amersham, Gibco BRL y se usaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los oligonucleótidos que se utilizaron para los experimentos de PCR y extensión del iniciador, fueron hechos en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

4.5 ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA.

Las cepas (GAG16037, CAG22216 y 22216), usadas para el ensayo se crecieron en medio mínimo M9 y se incubaron a 30° C en agitación (250 rpm). Cuando tuvieron una densidad óptica de 0.2 a 600 nm, se les dio un choque de calor a 42°C por 15 min, después se procedió a medir la actividad de β -galactosidasa conforme a lo descrito por Miller (1972).

4.6 EXTENSION DEL INICIADOR ("Primer extension").

La purificación de ARN se hizo de acuerdo al protocolo reportado por Barry *et al.*, (1992). La concentración de ARN se determinó espectrofotométricamente a 260 nm y 280 nm. Para la reacción de transcripción reversa, se utilizó 40µg de ARN de cada cepa y la enzima transcriptasa reversa AV2 (Amersham). Las condiciones de reacción se hicieron conforme a las instrucciones del fabricante. La reacción de secuencia se hizo conforme al método de Sanger *et al.*, (1977) usando el estuche de secuenciación "Thermo sequenase cycle" de Amersham. Se siguieron las instrucciones del fabricante; Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo de desnaturalización a 95° C/60 seg. Después se le dio 25 ciclos, donde cada ciclo consistió de desnaturalización a 95° C/35 seg, alineamiento a 55° C/30 seg, extensión a 72° C/90 seg.

El oligonucleótido usado para las reacciones de transcripción reversa y de secuencia fue el siguiente: *algU* (5'CAATTGCTGATCTTGCTC

CTGG3'), marcado radiactivamente con [γ 32 P] ATP, usando la enzima polinucleotido cinasa T4 (Amersham) de acuerdo a lo descrito por el fabricante.

4.7 AMPLIFICACION DE LOS GENES *mucA* y *mucC* DE *A. vinelandii*.

Los genes *mucA* y *mucC* de *A. vinelandii* se amplificaron por PCR, usando como templado el ADN genómico de la cepa ATCC 9046. Los oligonucleótidos fueron: *mucA1* (5'GGCGAGCCTTCGATTTGCTG3') *mucA2* (5'CTGCCGTTACGCTCGTAGAC3'). *mucC1* (5'GTCCTGCCTGCCAACCTG3') *mucC2* (5'GACTGTGGGGAGATTCG 3'). Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

Para *mucA*, se desnaturalización a 95° C/60 seg. Después se le dio 25 ciclos, donde cada ciclo consistió de desnaturalización a 95° C/35 seg, alineamiento a 55° C/30 seg, extensión a 72° C/90 seg.

Para *mucC*, se desnaturalización a 95° C/90 seg. Después se le dio 25 ciclos, donde cada ciclo consistió de desnaturalización a 95° C/30 seg, alineamiento a 56° C/45 seg, extensión a 72° C/90 seg; estos productos de PCR se clonaron en el vector pMOSBlue.

4.8 TRANSFORMACION DE *A. vinelandii*.

La preparación de células competentes, de *A. vinelandii* para su transformación, se realizó mediante el crecimiento de las células en cajas con medio CM (estriando dos veces), después las células se pasaron en CM líquido. El medio CM es BS, sin fierro ni molibdeno. La transformación se realizó agregando el ADN a las células competentes de acuerdo a lo descrito por Page y Tigerstrom (1978).

4.9 CUANTIFICACION DE LA PRODUCCION DE ALGINATO.

Para éste experimento las células se crecieron en BS por 48 hrs. Se separó el alginato de las células con NaCl y EDTA, después se precipitó con isopropanol. Posteriormente, la cuantificación de este polisacárido, se hizo, mediante la determinación espectrofotométrica de ácidos urónicos, como lo reportan Blumenkrontz y Asboehansen (1973).

4.10 ENSAYOS DE ENQUISTAMIENTO.

Para inducir el enquistamiento, se utilizó n-butanol según el método reportado por Stevenson y Sokolofsky 1966. Para este ensayo, las cepas se crecieron en BS líquido por 24 h, se obtuvieron las células y se lavaron con

MgSO₄ 10Mm, hasta quitarles el alginato, después se colocaron en placas de Burk con n-butanol al 0.2 %, como única fuente de carbono. Después de 5 días se recogieron las células y se resuspendieron en MgSO₄ 10Mm, posteriormente se transfirieron alícuotas (aproximadamente 10⁶ células) a filtros "milipore" HA de 0.45 μm y se secaron a 30° C por 5 días. Para determinar el porcentaje de enquistamiento (células resistentes a desecación), se hizo en base a la relación de cuentas viables de las células que se sometieron a desecación y de las que sobrevivieron a este estrés.

5.1 DETERMINACION DEL SITIO DE INICIO DE LA TRANSCRIPCION DEL OPERON *algUmucABCD* DE *A. vinelandii*.

La determinación del sitio de inicio de la transcripción del operón *algUmucABCD* de *A. vinelandii*, se hizo mediante ensayos de extensión del iniciador ("primer extension"). En las condiciones de nuestros ensayos, observamos que hay tres inicios de transcripción del operón en estudio (Fig. 12). La aportación relativa de cada uno de estos promotores en la expresión del operón, muestra que la transcripción que se origina a partir del P1 es el de mayor contribución, mientras que los promotores P2 y P3 es menor, y la intensidad de estos dos últimos es muy similar entre ellos (Fig. 12).

5.1.1 EL PROMOTOR P1 DEL OPERON *algUmucABCD* DE *A. vinelandii* ES DEPENDIENTE DE σ^E .

El primer inicio de transcripción del operón en estudio, se encuentra a 53 nucleótidos hacia arriba del primer codon del gen *algU* (región -53). Este inicio le denominamos promotor 1 (P1). En el análisis de las regiones nucleotídicas cercanas a este inicio de transcripción se observó que, éstas presentan las secuencias GAACTT (región -86 a -81) y TCAAT (región -64 a -60); que tienen una alta similitud con las secuencias -35 (GAACTT) y -10 (TCTGA) de promotores que dependen de la actividad del factor σ^E [Lonetto, 1994; Missiakas, 1998]. En la figura 13, se encuentra alineado este inicio de transcripción de *A. vinelandii*, con otros inicios de transcripción que se han encontrado en otras bacterias cuyos promotores también dependen de la actividad del factor σ^E . Como se puede observar, los promotores presentan secuencias canónicas, donde la región -35 es la más conservada. Otra evidencia que nos ayudó a confirmar que P1 es un promotor dependiente de la actividad del factor σ^E , fue el resultado de nuestro ensayo de extensión del iniciador, en el que se observa que este inicio de transcripción desaparece en la cepa SMU88 (*algU*-) mientras que en la silvestre (ATCC 9046) y la cepa ATR8 (*algR*-), sí lo presentan (Fig. 12). La cepa SMU 88 es una cepa isogénica derivada de la ATCC 9046, que tiene interrumpido el gen *algU* con un gen que codifica para la resistencia a kanamicina (*algU:: Ω Km*) [Moreno, *et al.*, 1998], donde *algU* codifica para el factor σ^E (σ^{AlgU}) [Martínez-Salazar, *et al.*, 1996].

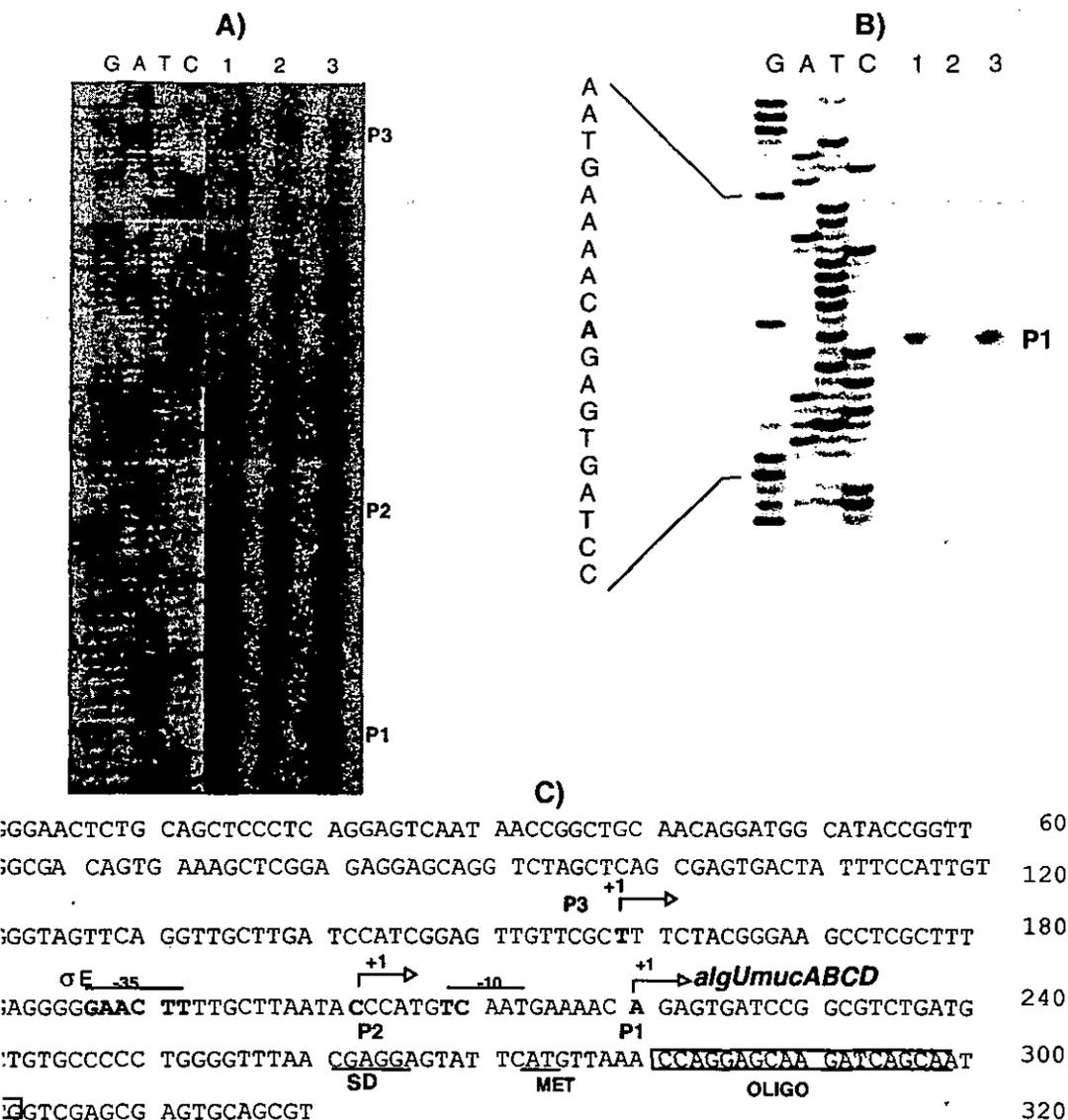


Figura 12. Determinación del inicio de la transcripción del operón *algUmucABCD* de *A. vinelandii*. A) Ensayo de extensión del iniciador de este operón en las cepas: 1) ATCC 9046 (silvestre); 2) SMU88 (ATCC 9046 *algU*::ΩKm); 3) ATR8 (ATCC 9046 *algR*::ΩTc). B) Detalle del promotor P1. C) Secuencia de la región hacia arriba de *algU* indicando los inicios de transcripción, y las secuencias del promotor P1.

σ^E consenso	-35	16/17 pb	-10	+1
	GAACTT		TCTGA	5/6 pb
Gram-negativas				
<i>E. coli.</i>				
<i>rpoH</i> P3	TT GAACTT	GTGGATAAAATCAOGG	TCTGA	TAAAC A
<i>rpoE</i> P2	CG GAACTT	TACAAAAAOGAGACAC	TCTAA	CCCTT G
<i>htrA</i>	CG GAACTT	CAGGCTATAAAAACGAA	TCTGA	AGAAC A
<i>fkpAP2</i>	AAACTA		TCTGA	
<i>ompKP2</i>	GAATTT		TCTTA	
<i>P. aeruginosa.</i>				
<i>algU</i> P1	GA GAACTT	TTGCAAGAAGOOOGAG	TCTAT	CTTGGC A
<i>algU</i> P3	TG GAACTT	TCTTAGAOGCATOGGT	TCCAA	AGCAGG A
<i>rpoH</i>	AG GAACTT	ATACAOOOGCTTGCAAG	TCAGA	TATCCG A
<i>algR</i>	GG GCACTT	TTGGGGOCTAAAGOGAG	TCTCA	GCGTC G
<i>algD</i>	CG GAACTT	OOCTOGCAGAGAAAACA	TCCTA	TCACC G
<i>A. vinelandii.</i>				
<i>algU</i>	GG GAACTT	TTGCTTAATACCCATG	TCAAT	GAAAAC A
<i>S. typhimurium.</i>				
<i>rpoE</i>	CG GAACTT	TACGAAACATAGACAC	TCTAA	CCTGTT G
<i>htrA</i>	CG GAACTT	OGOGTTATAAAATGAA	TCTGA	CGTACA C
Gram-positivas				
<i>S. coelicolor.</i>				
<i>dagAP2</i>	GAACTT		CTCTC	
<i>S. antibioticus.</i>				
<i>phsA</i>	GAAAGC		GTCTC	
<i>M. xanthus.</i>				
<i>carQRS</i>	GAAACA		GTAGA	
<i>B. subtilis.</i>				
<i>sigX(b)</i>	TAACTT		TACGA	

Figura13. Promotores que dependen de la actividad del factor σ^E en diferentes especies de bacterias, las cuales tienen secuencias canónicas, siendo la región -35 la más conservada.

5.1.2 ANALISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS PROMOTORES P2 Y P3.

El segundo y tercer inicio de transcripción, los cuales llamamos promotor 2 (P2) y promotor 3 (P3) respectivamente, se encuentran ubicados a 70 y 114 nucleótidos hacia arriba del codón de inicio de AlgU. Al realizar el análisis de las secuencias cercanas a estos inicios de transcripción, no se encontraron secuencias consenso similares a los de promotores ya reportados en las regiones -10 y -35.

En el presente estudio, nosotros determinamos, los inicios de la transcripción del operón *algUmucABCD* de *A. vinelandii*, donde se observa que la regulación de este operón es compleja, porque su transcripción se inicia a partir de múltiples promotores, donde uno de estos promotores (promotor1), es dependiente de la actividad del factor σ^E (AlgU). Los resultados obtenidos muestran que este operón puede activar su propia transcripción, a través de uno de sus productos codificados (AlgU), teniendo así un proceso de autoregulación, además de poder iniciar a partir de otros promotores. En *A. vinelandii*, el promotor P1*algU* es el primer promotor que se describe que depende de la actividad del factor σ^E , que contiene las secuencias consenso de promotores de este tipo. Anteriormente, ya se había reportado al promotor P2 del gen *algD*, que para su expresión también requiere de la función de σ^E [Núñez, *et al.*, 1999], pero éste no presenta las secuencias canónicas, por lo que la regulación del factor σ^E sobre el P2 de *algD*, posiblemente sea de una manera indirecta.

5.1.3 ANALISIS DEL PAPEL DE AlgR EN LA REGULACION DEL OPERON *algUmucABCD*.

En *P. aeruginosa*, algunos de los promotores que dependen de la actividad del factor σ^E para su transcripción, también se requiere de la actividad del regulador de respuesta AlgR, como es el caso de la expresión del operón *alg*. Para determinar si AlgR estaba involucrado en la regulación de la transcripción del operón *algUmucABCD* de *A. vinelandii*, en nuestros ensayos de extensión del iniciador se incluyó el ARNm de la cepa ATR8 (*algR:: Ω Tc*) una cepa isogénica derivada de la ATCC 9046 [Núñez, *et al.*, 1999]. En nuestros resultados, en el inicio de la transcripción del operón *algUmucABCD*, a partir del promotor P1, el cual es dependiente de AlgU, no se observaron diferencias entre la cepa ATR8 y la silvestre. Tampoco se vió afectada la transcripción, a partir de los promotor P2 Y P3, pues las

tres cepas, tienen la misma intensidad en estas bandas. Lo anterior nos sugiere que, en *A. vinelandii*, para la transcripción del operón en estudio, no se requiere de AlgR.

Posteriormente se podría seguir estudiando con más detalle el inicio de transcripción de este operón. Como los promotores P2 y P3, no muestran similitudes significativas, con las secuencias canónicas de promotores dependientes de σ^{70} o de promotores dependientes de otros factores sigma ya reportados, se tiene que confirmar si realmente son funcionales estos inicios de transcripción. Esto se podría llevar a cabo mediante fusiones transcripcionales de las regiones promotoras de cada uno de estos inicios de transcripción con un gen reportero como *lacZ*. Otro punto a desarrollar es, determinar bajo qué condiciones ambientales (por ejemplo alta osmolaridad, estrés de calor, estrés oxidativo, etc.) se activa un promotor más que los otros, se proponen usar estas condiciones porque se ha visto un efecto en *P. aeruginosa*, ya que los productos codificados por este operón, pertenecen a la familia de Factores de Estrés Periplásmico.

5.2 AlgU DE *A. vinelandii* ES FUNCIONAL EN *E. coli*.

Se estableció que AlgU de *A. vinelandii* es capaz de transcribir genes dependientes de la actividad del factor σ^E en *E. coli*. Esto se hizo con experimentos de complementación y actividad de β -galactosidasa.

La respuesta al estrés por calor ("heat shock") en *E. coli*, está mediada por el factor σ^{32} , codificado por el gen *rpoH*. Este gen tiene promotores que dependen de tres factores sigma para el inicio de su transcripción (Fig. 14). La transcripción del gen *rpoH* a niveles basales depende de el factor σ^{70} (P1, P4, y P5). Cuando la bacteria se somete a un estrés de calor, la transcripción del gen *rpoH* es activada por su producto (σ^{32}) a partir del promotor P2. Posteriormente, el factor σ^{32} inicia la transcripción de genes involucrados en la respuesta a el estrés por calor (Fig. 14), pero cuando el estrés de calor es mayor de 42°C se requiere de la actividad del factor σ^E para transcribir al gen *rpoH* a partir del promotor P3 y al gen *htrA* entre otros (Fig. 14).

Con base, a este modelo, se utilizó la cepa CAG22216 de *E. coli* que tiene interrumpido el gen *rpoE* con el gen que codifica para la resistencia al antibiótico cloramfenicol (*rpoE:: Ω Cm*; Fig. 15a) [Rouvière, *et al.*, 1995]. El gen *rpoE* codifica para el factor σ^E [Rouvière, *et al.*, 1995], además esta

cepa tiene una fusión transcripcional del promotor 3 (P3) del gen *rpoH* con el gen reportero *lacZ* (Fig. 15a) [Meccas, *et al.*, 1993]. La cepa tiene un fenotipo de colonias blancas, cuando se crece en cajas de LB con X-Gal y no

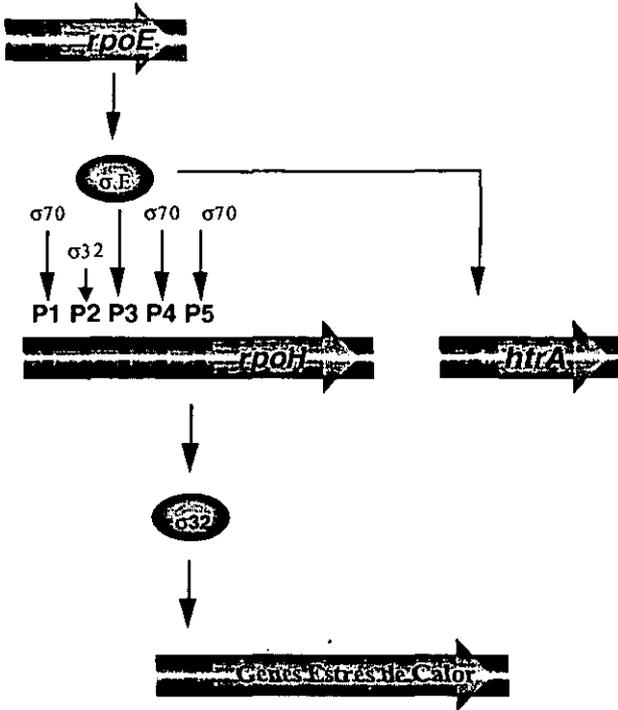


Figura 14. Respuesta al estrés de calor en *E. coli*. Cuando esta bacteria se somete a temperaturas mayores a 42°C, la transcripción del gen *rpoH* (a partir del promotor P3) y del gen *htrA* requieren de la actividad del factor σ^E [Lonetto, 1994; Missiakas, 1998].

puede crecer a 42 °C. La cepa CAG22216 se transformó con el plásmido pJMSAT1 el cual contiene los genes *algU* y *mucA* de *A. vinelandii* (Fig. 15b) [Moreno *et al.*, 1998]. La selección de la transformación se hizo en cajas de LB con ampicilina y X-Gal a 42 °C. Las colonias que se obtuvieron del medio de selección fueron azules, este resultado nos mostró que AlgU de *A. vinelandii* puede iniciar la transcripción del gen *rpoH* a partir del promotor P3 de *E. coli* y que complementa el requerimiento de σ^E para crecer a 42 °C. Se tomaron algunas transformantes al azar, para confirmar que portaran el plásmido y medirles la actividad de β -galactosidasa. En la

figura 15c se muestra que, de las colonias que se tomaron, portaban el plásmido pJMSAT1. El plásmido libera una banda de 1200 pb al digerirlo con *MunI-HindIII*.

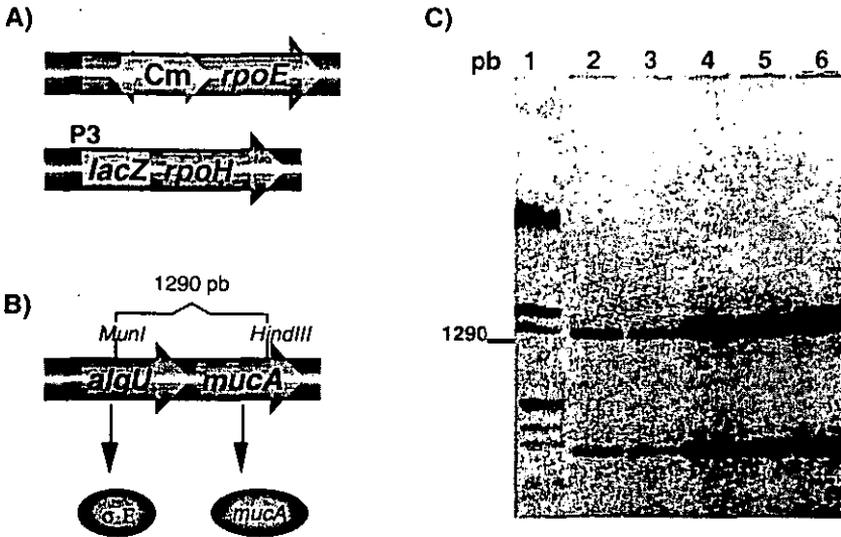


Figura 15. Características del plásmido y de la cepa, utilizados en el ensayo de complementación. **A)** Cepa CAG22216 de *E. coli*, tiene interrumpido el gen *rpoE* (*rpoE*:: Ω Cm) [Rouvière, *et al.*, 1995] y, una fusión transcripcional del promotor P3 del gen *rpoH* con *lacZ* (*lacZ*::P3*rpoH*) [Mecsas, *et al.*, 1993]. **B)** Plásmido pJMSAT1, el cual lleva los genes *algU* (σ^E) y *mucA* de *A. vinelandii* [Moreno, *et al.*, 1998]. **C)** Electroforesis del plásmidos pJMSAT1, obtenido de colonias transformadas de la cepa CAG22216 de *E. coli*, 1) λ *HindIII-EcoRI*; 2-6) pJMSAT1 *HindIII-MunI*.

En los resultados de actividad de β -galactosidasa, podemos observar que la cepa CAG22216 no presentó esta actividad, cuando no tiene el plásmido pJMSAT1 (Fig. 16), pero esta misma cepa cuando se complementó con el plásmido pJMSAT1 (CAG22216/pJMSAT1) sí presenta actividad de β -galactosidasa (Fig. 16). Estos resultados nos muestran que el gen *algU* (σ^E) de *A. vinelandii* es funcional en *E. coli*, al llevar a cabo la transcripción de genes que son dependientes del factor σ^E , como es el caso del gen *rpoH*, a partir del promotor P3. Sin embargo, el nivel de transcripción del gen *rpoH* realizado por AlgU de *A. vinelandii* es

considerablemente más bajo al σ^E de *E. coli*, pero este bajo nivel de expresión, es suficiente para que la cepa CAG22216 sea capaz de crecer a 42 °C.

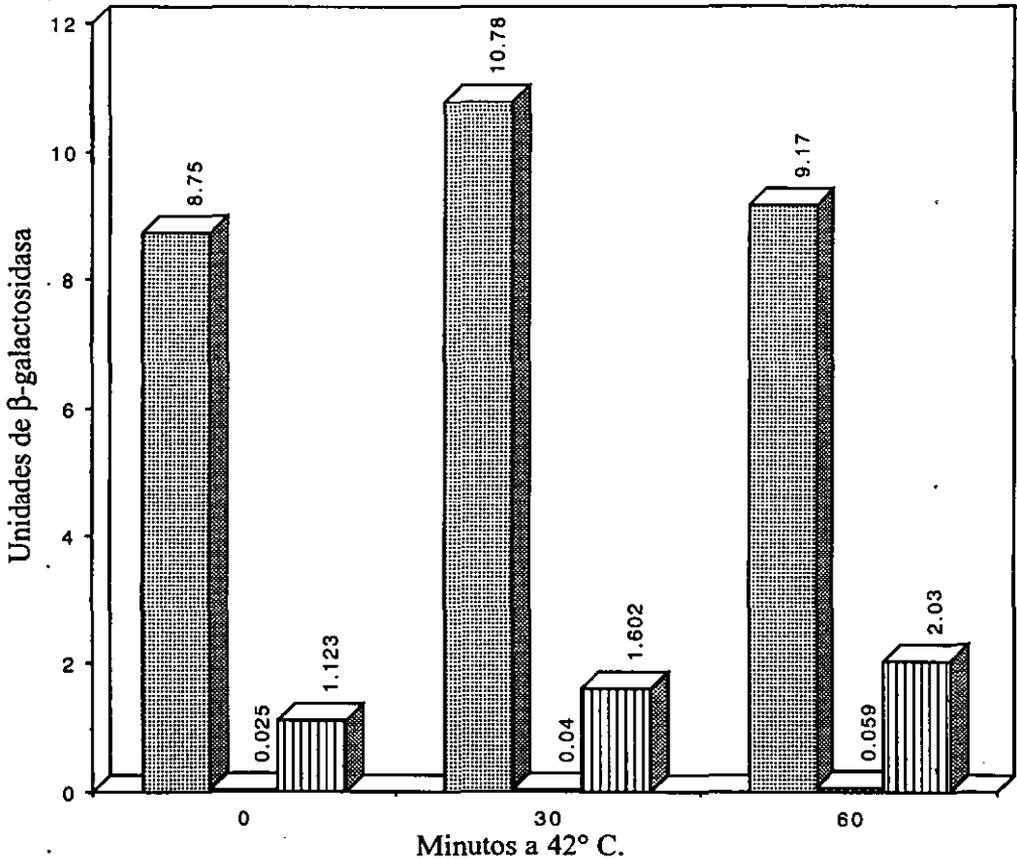


Figura 16. Actividad de β -galactosidasa en *E. coli*. Funcionalidad del Factor σ^E de *A. vinelandii* en *E. coli*. Complementación de la cepa CAG22216 de *E. coli*, con el plásmido pJMSAT1 el cual porta los genes *algU* y *muca* de *A. vinelandii*.

■ CAG16037; ▨ CAG22216; ▤ CAG22216/pJMSAT1.

5.3 MUTACION DE LOS GENES *mucA* y *mucC* DE *A. vinelandii*.

Como en nuestro laboratorio existe el interés de crear cepas hiperproductoras de alginato en *A. vinelandii* y, en base a los antecedentes ya reportados de los genes homólogos al operón *algUmucABCD* en *P. aeruginosa*, donde se ha visto que el producto codificado por el gen *algU* es un factor sigma que se requiere para transcribir genes *algD*, cuyos productos están involucrados en la biosíntesis de alginato, mientras que el gen *mucA*, codifica para un antisigma, que regula negativamente la actividad del factor σ^E . Por lo anterior, se decidió mutar el gen *mucA* de *A. vinelandii*, para que aumente la actividad del factor σ^E y en consecuencia la producción de alginato. Así mismo se decidió construir la mutación del gen *mucC*, por el interés de conocer el papel del producto codificado por este gen en la producción de alginato. También se estudió el efecto de estas mutaciones, en el proceso de diferenciación celular, para contribuir en la comprensión de la regulación genética de este proceso, donde apenas se está iniciando su estudio.

Para mutar los genes *mucA* y *mucC* de *A. vinelandii* se les hizo una interrupción, con genes que codifican para la resistencia a antibióticos (casete). Como ya se contaba con la secuencia nucleotídica del operón *algUmucABCD* [Martinez-Salazar, *et al.*, 1996], se utilizó para buscar un sitio único de restricción en los genes *mucA* y *mucC*. La búsqueda se realizó con ayuda del programa "GeneWorks", y también se utilizó para diseñar los oligos utilizados en la amplificación de los genes por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5.3.1 INTERRUPTCION DEL GEN *mucA*.

Para la interrupción del gen *mucA* de *A. vinelandii*, se hizo una amplificación de este gen por PCR, usando como templado el ADN genómico de la cepa ATCC 9046. El producto de PCR que se obtuvo fue de 1301 pb (Fig. 17), y se clonó en el vector pMOS*Blue* (2887pb) para generar el plásmido pLRA (Fig. 18). Posteriormente, se procedió a transformar a la cepa DH5 α de *E. coli*, con el plásmido pLRA.

Una vez confirmado que el plásmido pLRA portaba el gen *mucA*, se procedió a interrumpirlo con el casete de gentamicina [Alexeyev, *et al.*, 1995]. Este casete se obtuvo después de purificar el plásmido pBSL98 y digerirlo con *Xho*I, para liberar una banda de 800 pb que incluye el gen que codifica para la resistencia al antibiótico. Posteriormente, la banda de 0.8 kb se clonó en el plásmido pLRA. Se volvió a transformar en la cepa DH5 α .

de *E. coli*, y se seleccionó esta construcción en LB con ampicilina y gentamicina. Para determinar la orientación de la inserción del casete, en el gen *mucaA*, se realizó una digestión con *EcoRV*. Al realizar la digestión de los plásmidos con *EcoRV*, si se obtiene una banda de 1.2 kb la orientación en la que cayó el casete es en el mismo sentido a la transcripción del gen (Fig. 18a), mientras que si se obtiene una banda de 0.5 y otra de 0.7 Kb, el casete se insertó en sentido opuesto a la orientación de la transcripción del gen (Fig. 18b).

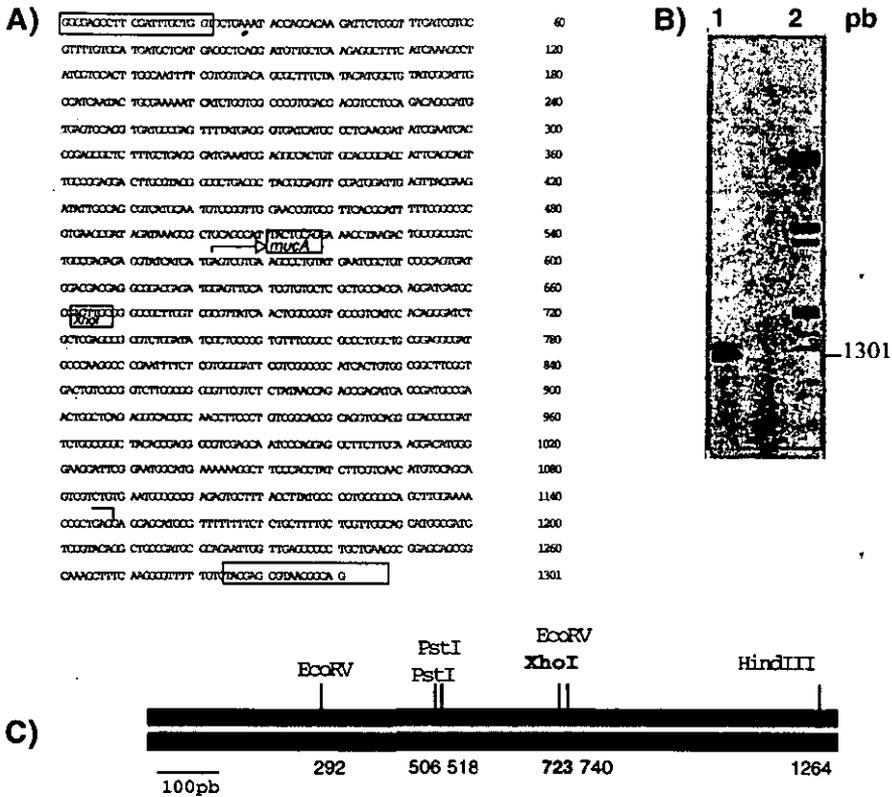


Figura 17. Amplificación del gen *mucaA* de *A. vinelandii* por PCR. A) Secuencia del producto de PCR, en rectángulos se muestran los oligos utilizados en el PCR. B) Electroforesis del producto de PCR, 1) PCR de *mucaA*; 2) λ *HindIII*-*EcoRI*. C) Mapa de restricción del producto de PCR, obtenido con el programa "Gene Works".

El casete de gentamicina, usado para interrumpir al gen *muca* de *A. vinelandii*, está flanqueado por las señales de terminación de la transcripción del gen 32 del bacteriofago TD4 [Prentki y Krisch, 1984], por lo que, independientemente del sentido en el que caiga el casete, debería tener un efecto polar sobre los genes que se encuentran hacia abajo del gen interrumpido de esa unidad transcripcional. Sin embargo, las señales de terminación del bacteriofago TD4, al parecer no son funcionales en *A. vinelandii* y solo existe el efecto polar, cuando el casete cae en sentido opuesto al sentido de la transcripción del gen, mientras que, cuando el casete cae en el mismo sentido de la orientación de la transcripción del gen, no se produce el efecto polar. Esto se ha demostrado tanto a nivel de ARN como de proteína, en la mutación de genes de *A. vinelandii*, con casetes que llevan estas señales de terminación. Por ejemplo, las proteínas que se encuentran involucradas en el transporte y homeostasis de molibdeno, están codificadas por el operón *modEABC*. Se observó que cuando el casete se insertó en sentido opuesto a la transcripción del gen *modE* tuvo un efecto polar sobre los genes que se encuentran hacia abajo del gen interrumpido. Esto se comprobó con ensayos de "inmunoblot", al no detectar las proteínas codificadas por dichos genes. Por otra parte, cuando el casete cayó en el mismo sentido de la transcripción del gen *modE*, los productos de los genes que se encuentran hacia abajo de éste sí se produjeron y fueron detectados en el experimento de "inmunoblot", demostrándose así el efecto polar y no polar [Mouncey, *et al.*, 1995]. A nivel de ARN, la demostración del efecto polar y no polar, se hizo en la mutación de los genes estructurales *alg*, involucrados en la biosíntesis de alginato, en el cual se detectó ARNm de genes ubicados hacia abajo del gen *algK* mutado de la forma no polar, mientras que, la interrupción de la forma polar, no se detectó el ARNm de estos genes. Esto se determinó con ensayos de hibridación ADN-ARN tipo "Slot blot" [Mejía-Ruiz, *et al.*, 1997 a y b].

En la figura 18c, se muestran los resultados de las digestiones realizadas con *EcoRV*. Los datos muestran que tenemos construcciones con el casete en ambas direcciones. El plásmido pLRA4, lleva la interrupción del gen *muca* en forma polar (polar a *mucBCD*) y el plásmido pLRA8 en la forma no polar.

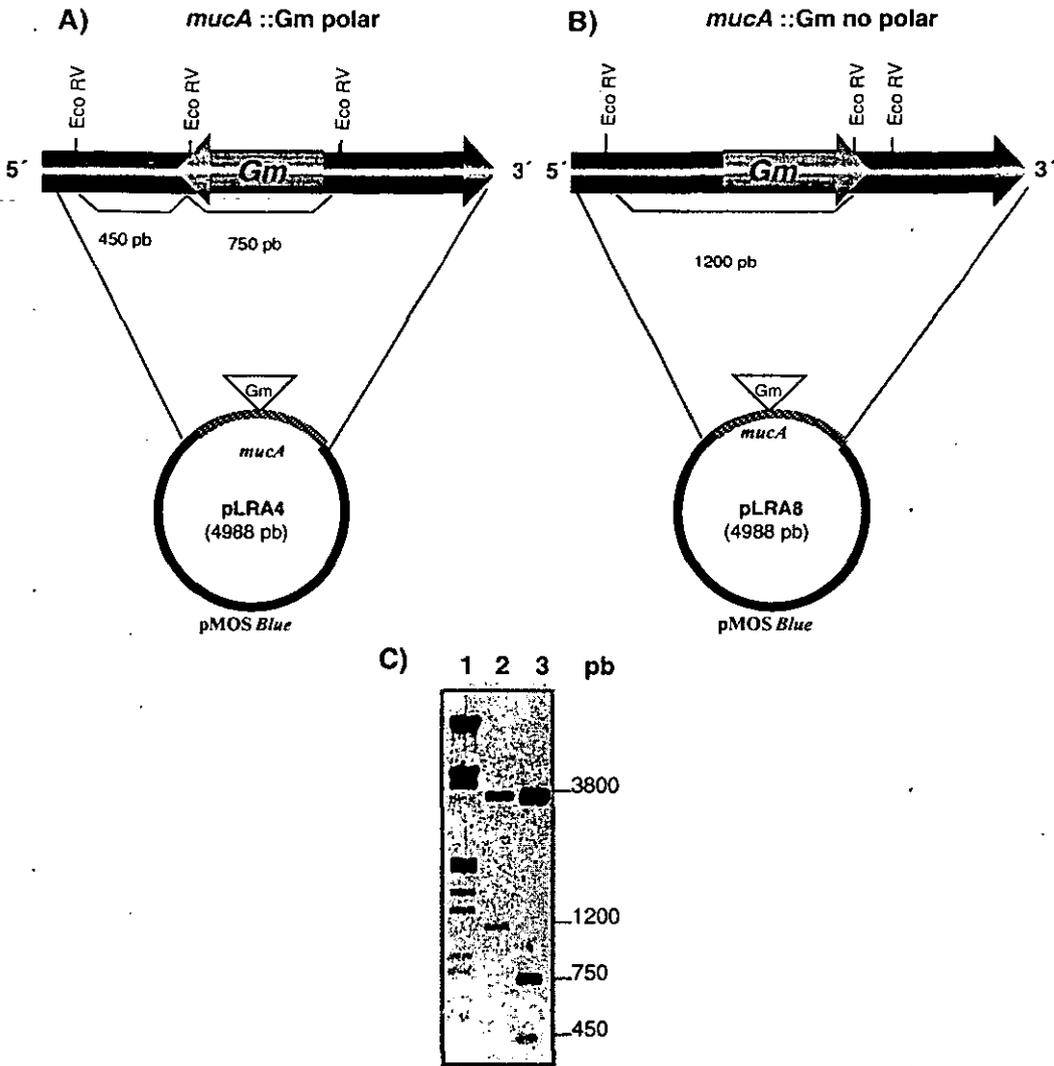


Figura 18. Construcciones de la interrupción del gen *mucA* de *A. vinelandii*, con el gen que codifica para la resistencia a gentamicina (*mucA*:: Ω Gm). A) Plásmido pLRA4, el cual porta la construcción polar. B) Plásmido pLRA8, con la construcción no polar. C) Electroforesis del ADN de estos plásmidos digeridos con *EcoRV*, 1) λ *HindIII-EcoRI*; 2) pLRA8; 3) pLRA4.

5.3.2 INTERRUPCION DEL GEN *mucC*.

La interrupción del gen *mucC* de *A. vinelandii*, se realizó de forma similar a la mutación del gen *mucA*. En nuestra reacción de PCR se observaron dos bandas principales (Fig. 19), una de ellas del tamaño esperado (1324 pb). Se purificó la banda de interés y previo a su clonación, se le hizo una digestión con *Styl*. Al realizar la digestión, generó las bandas esperadas (600, 400 y 300 pb; Fig. 19d). Después se clonó el gen *mucC* en el vector pMOS*Blue* generando el plásmido pLRC. Una vez clonado el gen *mucC*, se procedió a interrumpirlo, utilizando el gen que codifica para la resistencia a tetraciclina (2 Kb), el cual se obtuvo del plásmido pBHP45- Ω TC [Fellay, *et al.*, 1987], con una digestión realizada con *Sma*I. Al digerir el plásmido pLRC con la enzima *Styl*, además de interrumpir al gen *mucC*, le quita un fragmento interno de 300 pb. Posteriormente, se hizo una reacción con la enzima Klenow, para rellenar los extremos que dejó *Styl*, para poder clonar el casete de tetraciclina que se obtuvo con *Sma*I. Con esta construcción se transformó a la cepa DH5 α de *E. coli*, y la selección de la construcción se hizo en medio LB con ampicilina y tetraciclina. Para determinar cómo se insertó el casete, se realizó un análisis de restricción con las enzimas *Xho*I y *Eco*RV. Los datos que obtuvimos (Fig. 20), muestran una banda de 900 pb en la construcción no polar, mientras que en la construcción polar se obtiene una banda de 1700 pb. Al plásmido de la construcción polar (polar a *mucD*) se le denominó pLRC2 y al plásmido de la construcción no polar se le nombro pLRC4. Una vez obtenidas estas construcciones se procedió a transformar a *A. vinelandii*.

5.4 TRANSFERENCIA DE LAS MUTACIONES DE LOS GENES *mucA* y *mucC* AL GENOMA DE *A. vinelandii*.

5.4.1 GENERACION DE LAS CEPAS JRA4 (*mucA*::Gm POLAR) Y JRA8 (*mucA*::Gm NO POLAR).

La transferencia de las mutaciones de los genes *mucA* y *mucC* al genoma de *A. vinelandii*, se realizó transformando células competentes de la cepa silvestre ATCC 9046, con los plásmidos que tienen las construcciones de las interrupciones de los genes *muc*. Estos plásmidos no se pueden replicar en *A. vinelandii*. Los plásmidos pLRA4 y pLRA8 fueron utilizados para introducir la interrupción del gen *mucA*, en la forma polar y no polar respectivamente. La selección de la transformación se hizo en

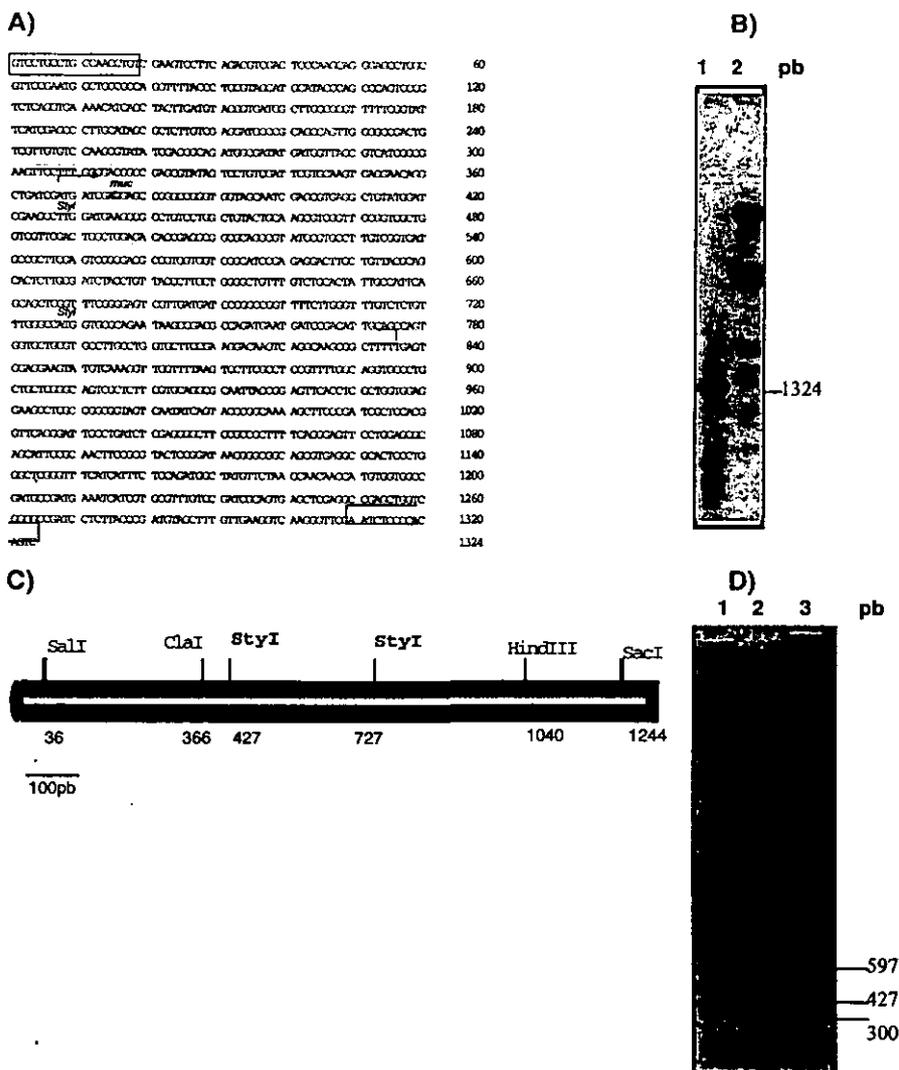


Figura 19. Amplificación del gen *mucC* de *A. vinelandii* por PCR. A) Secuencia del producto de PCR, en rectángulos se muestran los oligos utilizados en el PCR. B) Electroforesis del producto de PCR, 1) PCR de *mucC*; 2) λ *HindIII-EcoRI*. C) Mapa de restricción del producto de PCR, obtenido con el programa "Gene Works". D) Electroforesis del producto de PCR digerido con *StyI*, 1) λ *HindIII-EcoRI*; 2) PCR de *mucC*; 3) Marcador de peso molecular de 100 pb.

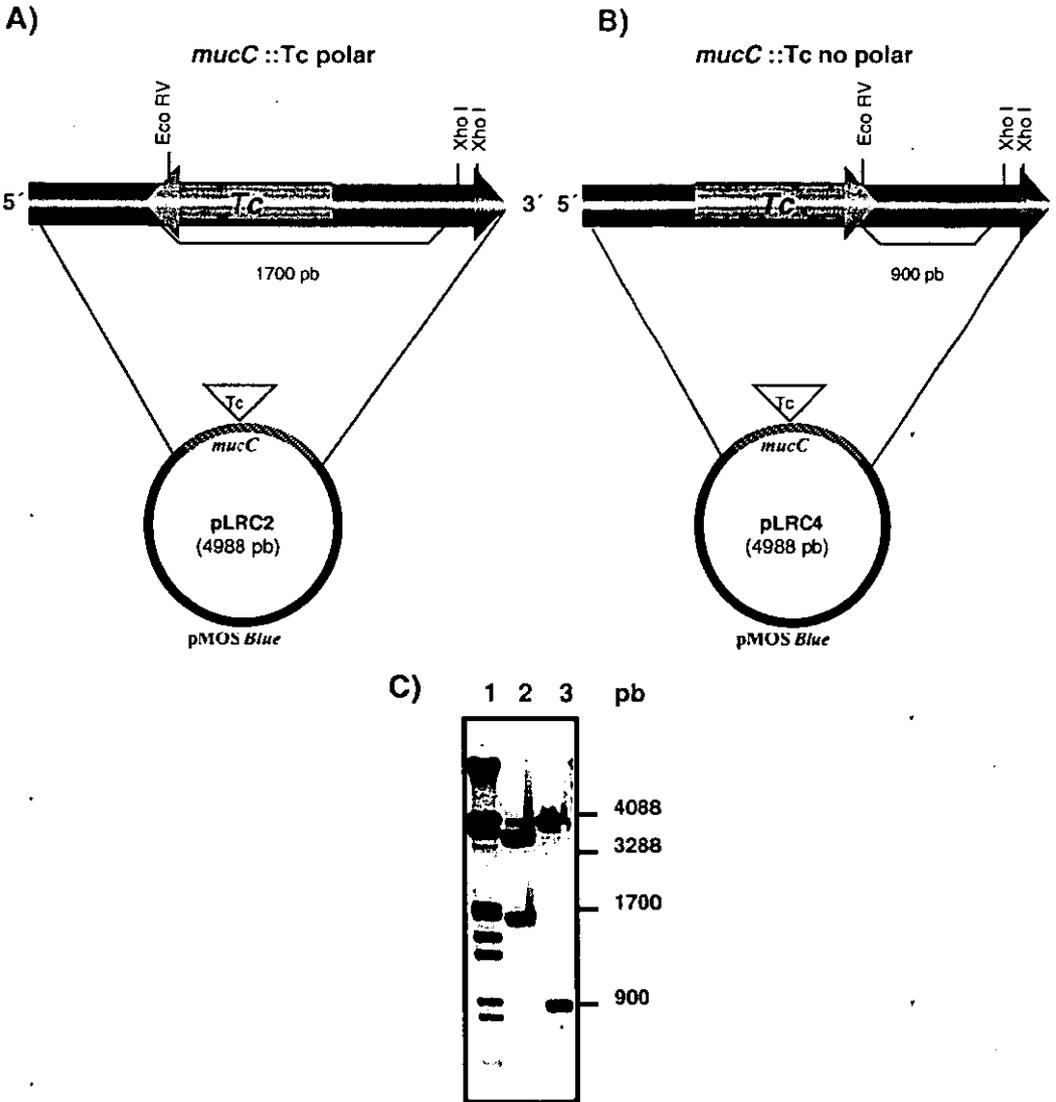


Figura 20. Mutación del gen *mucC* de *A. vinelandii*, mediante la interrupción de éste, con un gen que codifica para la resistencia a tetraciclina (*mucC*:: Ω Tc). A) Construcción polar (pLRC2). B) Construcción no polar (pLRC4). C) Electroforesis del ADN de estos plásmidos digeridos con *XhoI*-*EcoRV*. 1) λ *HindIII*-*EcoRI*; 2) pLRC2; 3) pLRC4.

BS con ácido nalidixico y gentamicina. Las células que se transformaron con los plásmidos pLRA4 ó pLRA8, presentaron un fenotipo más mucoso que la cepa silvestre. La confirmación de la integración de la mutación del gen *mucA*, en el genoma de *A. vinelandii* a través de un evento de doble recombinación homóloga, se hizo por análisis de hibridación tipo Southern (Fig. 21). Para esto se tomaron al azar algunas colonias transformadas para extraerles el ADN genómico y digerirlo con *EcoRV*. Se utilizó como sonda en la hibridación, el gen que codifica para la resistencia a gentamicina. La cepa a la que se le transfirió la mutación polar hacia los genes *mucBCD*, se le denominó JRA4, y la cepa con la mutación no polar se le llamó JRA8. Como se puede observar en la figura 21 C, en la cepa JRA4 presenta dos bandas (450 y 750 pb), una banda de 1200 pb en la JRA8, mientras que en la cepa silvestre no presento señal de hibridación, mostrándonos que la mutación del gen *mucA* en el genoma fue por la integración del casete de gentamicina.

5.4.2 GENERACION DE LAS CEPAS MLC2 (*mucC*::Tc POLAR) Y MLC4 (*mucC*::Tc NO POLAR).

Al igual que en el caso de las mutaciones *mucA*, se transformó a la cepa ATCC 9046 de *A. vinelandii* con los plásmidos pLRC2 y pLRC4. Se seleccionó en BS con tetraciclina y ácido nalidixico. La confirmación de la integración de la mutación del gen *mucC*, en el genoma de *A. vinelandii*, fué por hibridación tipo Southern (Fig. 21 D). Las cepas que se obtuvieron fueron: la MLC2 que porta la mutación en *mucCD* y la cepa MLC4 que tiene la mutación en *mucC*. El ADN genómico de estas mutantes se digirió con *EcoRV*, para dar una banda de 1900 pb en la cepa MLC2 (no polar), en la cepa MLC4 (polar) da una banda de 2900 pb, en la hibridación contra el plasmido pLRA. Estas cepas, no se observaron más mucosidades que la silvestre, como fue el caso de las interrupciones en *mucA*. Una vez hecho las mutaciones en los genes *mucA* y *mucC* sobre el genoma de *A. vinelandii* se procedió a ver el efecto de estas mutaciones en la producción de alginato y en el proceso de diferenciación celular.

5.5 EFECTO DE LAS MUTACIONES DE LOS GENES *mucA* y *mucC* EN LA PRODUCCION DE ALGINATO EN *A. vinelandii*.

Para determinar el efecto de la mutación de los genes *mucA* (JRA8); *mucABCD* (JRA4); *mucC* (MLC4); *mucCD* (MLC2) en la producción de alginato en *A. vinelandii*, las mutantes y la cepa silvestre se crecieron en BS y se

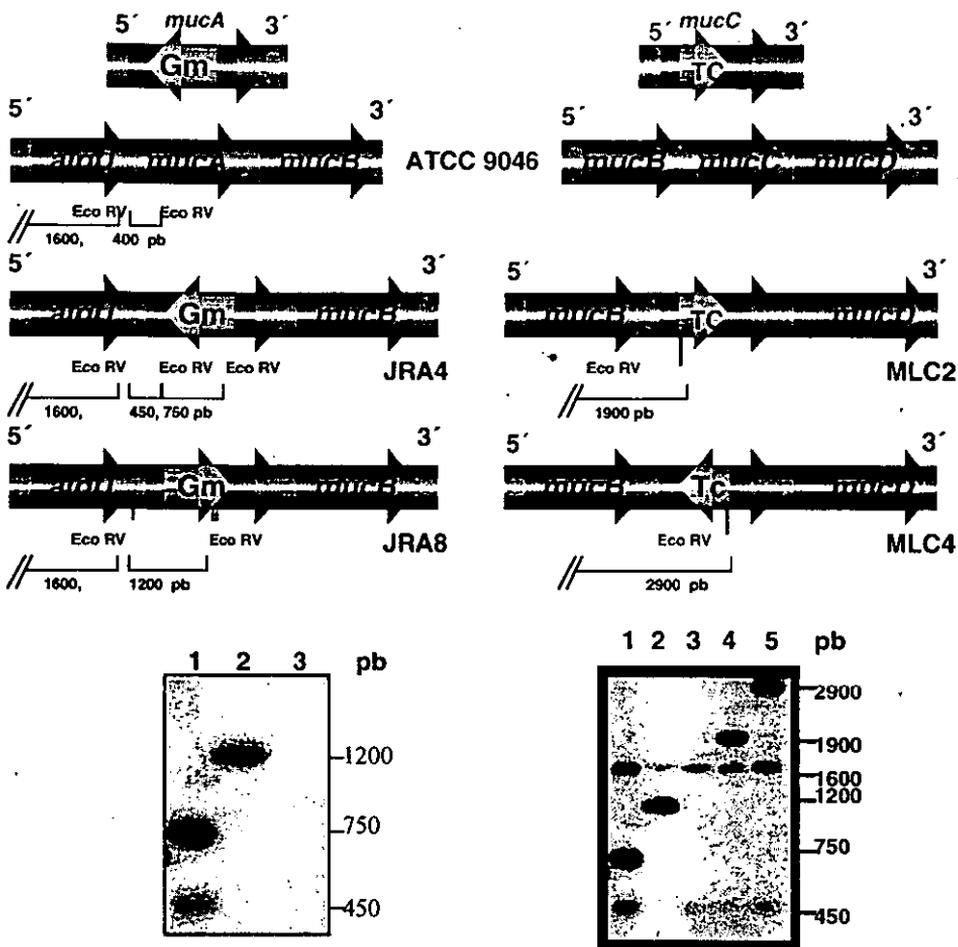


Figura 21. Cepas mutantes de *A. vinelandii*. A) Con el plásmido pLRA4 se transfirió la mutación del gen *mucA* en la forma polar al genoma de *A. vinelandii*, a través de un evento de doble recombinación homóloga, generándose así la cepa JRA4. La construcción de la cepa JRA8, que porta el gen *mucA* interrumpido en la forma no polar, se hizo de la misma manera, utilizando el plásmido pLRA8. B) Plásmido pLRC2 y pLRC4 para generar las cepas MLC2 y MLC4. C) Autoradiografía de la hibridación tipo "Southern" del ADN genómico digerido con *EcoRV*, de las cepas: 1) JRA4; 2) JRA8; 3) ATCC 9046. Se utilizó como sonda el gen que codifica para la resistencia a gentamicina. D) Autoradiografía de la hibridación tipo "Southern" del ADN genómico digerido con *EcoRV*, de las cepas: 1) JRA4; 2) JRA8; 3) ATCC 9046; 4) MLC2; MLC4. Se utilizó como sonda el plásmido pLRA.

cuantificó la producción del polisacárido conforme a lo descrito en materiales y métodos. Los datos obtenidos muestran que las mutantes presentan un incremento en la producción de alginato (TablaV), donde la mutante JRA4 presentó un aumento mayor, 85% con respecto a la silvestre. Sin embargo, cuando la producción de alginato de la cepa JRA4 se cuantificó en cultivo líquido, no mostró el alto incremento en la producción de alginato. Esta falta de correlación se debe a dos cosas: 1) en la mutante la tasa de crecimiento es menor con respecto a la silvestre y, 2) el fenotipo mucóide es inestable, porque posiblemente se seleccionan mutaciones supresoras espontáneas, con una producción reducida de alginato, donde posiblemente se está afectando la expresión de AlgU. Esta inestabilidad es tan alta que después de cuatro subcultivos, encontramos que la mutante JRA4 ya no presenta un aumento en la producción de alginato.

La inestabilidad de la hipermucoidia puede deberse a que parte de la cantidad de energía y esqueletos de carbono, sobre todo estos últimos se canalizan una cantidad importante a la producción de alginato, dejando así, poca fuente de carbono para ser destinada a la generación de biomasa. Pudiera ser que esta sea alguna de las razones por las cuales ya no sea posible que esta especie pueda producir más alginato en estas condiciones. Una alternativa adicional de la inestabilidad de las mutantes, puede ser por la elevada actividad de AlgU, que además de aumentar la transcripción de los genes *alg*, esté aumentando la transcripción de otros genes cuyos productos estén alterando la adecuada función celular. Quizas estas pudieran ser algunas de las explicaciones, de porque se seleccionan un gran número de revertantes cuando se inactivan genes cuyos productos regulan negativamente al factor σ^E .

La homología de AlgU y MucA de *A. vinelandii*, con AlgU y MucA de *P. aeruginosa*; y con RpoE (σ^E) RseA de *E. coli* [De las Peñas, *et al.*, 1997a; Missiakas, *et al.*, 1997; Xie, *et al.*, 1996; Zhi-Dong, *et al.*, 1996], y las evidencias genéticas que obtuvimos en *A. vinelandii* refuerzan nuestra hipótesis planteada, donde MucA en esta bacteria, también estaría funcionando como un factor antisigma, que está regulando negativamente al factor σ^E [Martinez-Salazar *et al.*, 1996]. Por lo tanto cuando mutamos el gen *mucA* se incrementó la producción de alginato. Con respecto a MucB y MucD, por el alto porcentaje de identidad que presentan con sus homólogos en *P. aeruginosa* y *E. coli*, donde ya también se han descrito sus funciones, posiblemente tienen la misma función, donde MucB forma un

complejo proteico con MucA inactivando a σE . Por su parte MucD es probable que funcione como una proteasa en el espacio periplasmico.

Tabla V. Cuantificación de la producción de alginato en las diferentes mutantes de *A. vinelandii*.

Cepa	Genotipo	Mucoidia	Producción de alginato mg/mg de proteína (%)
ATCC 9046	Silvestre	+++	4.8 + 0.3 (100)
JRA4	ATCC 9046 (<i>mucABCD</i> -)	+++++	8.9 + 0.7 (185)
JRA8	ATCC 9046 (<i>mucA</i> -)	+++	6.7 + 0.8 (139)
MLC2	ATCC 9046 (<i>mucCD</i> -)	+++	5.1 + 0.1 (106)
MLC4	ATCC 9046 (<i>mucC</i> -)	+++	4.0 + 0.3 (83)
AEIV	Silvestre	+	0.9 + 0.2 (100)
*AEC2	AEIV (<i>mucC</i> -)	++	2.4 + 0.4 (266)

*Nunez, *et al.*, 2000.

La mutación del gen *mucC*, en la cepa ATCC 9046 de *A. vinelandii*, no aumentó la producción de alginato, pero cuando la mutación del gen *mucC* se transfirió a la cepa AEIV [Nuñez *et al.*, 2000] se observó que en esta cepa incrementa la producción de alginato (Tabla VI). El resultado de la mutación del gen *mucC* en la cepa AEC2, con respecto a la producción de alginato nos muestra lo contrario a lo que se había observado en *P. aeruginosa*, donde MucC no tiene ningún efecto, sólo se logra ver un aumento en la producción de alginato cuando la mutación del gen *mucC* se hace en una cepa que previamente ya tiene otra mutación en algún gen *muc* y se crece en un doble estrés [Boucher *et al.*, 1996b].

Posiblemente la cepa ATCC 9046 tiene una mutación "natural" en algún gen cuyo producto se encontraba regulando negativamente la actividad del factor σE ya sea de manera directa o indirecta, por eso presenta el fenotipo muy mucoide y la mutación en el gen *mucC* no tiene un fenotipo el la producción de alginato

En conclusión demostramos que mutantes en los genes *muc* presentan una mayor producción de alginato, Estos resultados refuerzan el modelo

planteado de regulación del factor sigma AlgU por MucA, MucB y MucD que había sido planteado para *P. aeruginosa*. Por otra parte, nuestros resultados muestran que la proteína MucC tiene un efecto negativo en la producción de alginato, pero su papel específico en esta regulación debe ser aún elucidado.

Aunque la mutante JRA4 tiene una producción mucho mayor de alginato, esta cepa no puede usarse en la producción industrial del polímero debido a su gran inestabilidad y a su baja tasa de crecimiento.

5. 6 EFECTO DE LAS MUTACIONES DE LOS GENES *mucA* y *mucC* EN EL PROCESO DE DIFERENCIACION CELULAR EN *A. vinelandii*.

El proceso de diferenciación celular (enquistamiento) en *A. vinelandii*, se ha observado los cambios morfológicos que sufren las células vegetativas (a células redondas y sin flegelos, etc.), la composición de las capas que rodean al quiste. Pero, la genética de la regulación del enquistamiento apenas se está comenzando a estudiar. En el cual solo se han descrito los genes *algR*, *algU*, y *gacA-gacS*, cuyos productos están involucrados en la regulación de este proceso [Moreno, et al., 1998; Núñez, et al., 1999; Castañeda, et al., 2000]. Por lo cual, decidimos determinar si los genes *muc* están involucrados en el enquistamiento de esta bacteria.

La frecuencia de enquistamiento de las distintas mutantes *muc* de *A. vinelandii*, se muestran en la tabla VI.

En estos resultados podemos observar que las mutantes *mucA* y *mucC* tienen una mayor frecuencia de enquistamiento. Sin embargo, la frecuencia de enquistamiento de la cepa ATCC 9046 presenta gran variación de un ensayo a otro y no consideramos que menos a un orden de magnitud sean significativos. Para determinar si las variaciones encontradas son significativas se tendría que realizar un gran número de experimentos para cuantificar la frecuencia de enquistamiento en la cepa silvestre y en las cepas mutantes. En el caso en el que se encontrara que las mutantes *mucA* y *mucC* en efecto tienen una mayor frecuencia de enquistamiento lo que se tendría que esclarecer más adelante, es si el aumento de la frecuencia de enquistamiento en las mutantes *muc* es porque se está afectando de alguna manera a genes involucrados en este evento, o el incremento de la frecuencia de enquistamiento pudiera ser por un aumento en la producción de alginato, aunque no es aparente una

correlación directa entre estos fenómenos.

Como conclusión general podemos asegurar que los productos de los genes *mucABCD* no son esenciales para el proceso de enquistamiento en *A. vinelandii*.

Tabla VI. Porcentaje de enquistamiento en las diferentes mutantes de *A. vinelandii*.

Cepa	Genotipo	% Enquistamiento
ATCC 9046	Silvestre	2.2
JRA8	ATCC 9046 (<i>mucA</i> -)	4.4
JRA4	ATCC 9046 (<i>mucABCD</i> -)	4.3
MLC2	ATCC 9046 (<i>mucCD</i> -)	6.5
MLC4	ATCC 9046 (<i>mucC</i> -)	4.0

VI. CONCLUSIONES

- *El operón *algUmucABCD* de *A. vinelandii* se transcribe a partir de tres promotores, uno de ellos es dependiente del factor σ^E (AlgU), y los otros dos no mostraron secuencias consenso de promotores ya descritos.
- *Uno de los productos codificado en este operón (AlgU), se requiere para activar su propia transcripción a partir del promotor P1, mostrando así, un proceso de autorregulación.
- *El inicio de transcripción principal del operón *algUmucABCD*, se realiza a partir del promotor P1.
- *AlgR no regula la expresión del operón *algUmucABCD*.
- *La proteína AlgU (σ^E) de *A. vinelandii*, es funcional en *E. coli*.
- *En cepas con los genes *muc* inactivados, la mutante que tuvo un mayor aumento de la producción de alginato fué la cepa JRA4 (*mucABCD*-). Esta no puede usarse para la producción del polímero por fermentación porque tiene una tasa baja de crecimiento y en consecuencia poco rendimiento en la producción, además de ser genéticamente inestable.
- *Las evidencias genéticas en *A. vinelandii* y la demostración de la función de las proteínas homólogas en *P. aeruginosa* y *E. coli*, nos sugiere que, en *A. vinelandii* también MucA, MucB y MucD regulan negativamente la actividad del factor σ^E , donde MucA funcionaría como un factor antisigma.
- *MucC funciona como un regulador negativo de la biosíntesis de el alginato en *A. vinelandii*, desconociéndose el mecanismo de como ejerce esta regulación.
- *Los productos de los genes *mucABC* y *D* de *A. vinelandii* no son esenciales para el proceso de enquistamiento, pero pudieran tener un efecto negativo en este proceso de diferenciación celular que aún no ha sido claramente demostrado.

REFERENCIAS

- Aarons, S. J., Sutherland, I. W., Chakrabarty, A. M. and Gallagher, M. P. 1997. A novel gene, algK, from the alginate biosynthetic cluster of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 143: 641-652.
- Alexeyev, M. F., Shokolenco, I. N. and T. P. Croughan. 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160: 63-67.
- Annisson, G., and L. Couperwhite. 1986. Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Zotobacter vinelandii*. *App. Microb. Biotec.* 25:56-61.
- Atkins, E. D. T. Mackie, W., Parker, K. D., and Smolko, E. E. 1971. Crystalline Structures of poly-L-guluronic Acids. *Polymer Lett.* 9:311-316.
- Barry, T., Geary, S., Hannify, S., MacGearailt, C., Shalloo, M., Heery, D., Gannon, F., and Powell R. 1992. Rapid mini-preparations of RNA from bacteria. *Nucleic Acids research.* 20:4940.
- Baynham, P. J., Brown, A. L., Hall, L. L. and Wozniak, D. J. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* AlgZ, a ribbon-helix-helix DNA-binding protein, is essential for alginate synthesis and *algD* transcriptional activation. *Mol. Microbiol.* 33: 1069-1080.
- Beck, B. J., L. E. Connolly, A. De Las Peñas and D. M. Downs. 1997. Evidence that *rseC*, a gene in the *rpoE* cluster, has a role in thiamine synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 179: 6504-6508.
- Blumenkrantz, N. and G. Asboe-Hansen. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54: 484-489.
- Boucher, J. C., J. Martínez-Salazar, M. J. Schurr, M. Mudd, H Yu and V. Deretic. 1996, a. Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic-fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA. *J. Bacteriol.* 178: 511-523.
- Boucher, J. C., M. J. Schurr, H. Yu, D. W. Rowen and V. Deretic. 1996, b. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: role of *mucC* in the regulation of alginate production and stress sensitivity. *Microbiology.* 143: 3473-3480.
- Boucher, J. C., H. Yu, M. H. Mudd and V. Deretic. 1997. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: Characterization of *muc* mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect. Immun.* 65: 3838-3846.
- Boyd, A., M. Ghosh, T. B. May, D. Shinaberger, R. Koehg, and A. M. Chakrabarty. 1993. Sequence of the *algL* gene of *Pseudomonas aeruginosa* and purification of its alginate lyase product. *Gene*131:1-8.
- Boyd, A. and A. M. Chakrabarty. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of its alginate exopolysaccharide. *J. Ind. Microb.* 15:162-168.
- Bruck, D. T., Smith W. D., Madigan T. M. 1984. Biology of microorganisms. Prentice-Hall.
- Campos, M. E., Martínez-Salazar, J., Lloret, L., Moreno, S., Nuñez, C., Espin, G., and Soberón-Chávez, G. 1996. Cloning and characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 178:1793-1799.
- Castañeda, M., J. Guzmán, S. Moreno and G. Espín. 2000. GacS sensor kinase regulates alginate and poly-β-hidroxybutirate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 182: 2624-2628.
- Chakrabarty, A. M. 1991. Molecular genetics and environmental regulation of alginate biosynthesis. *Appl. Phycology Forum.* 8: 1-6.

- Chi E. and D. H. Bartlett. 1995. An *rpoE*-like locus controls outer membrane protein synthesis and growth at cold temperatures and high pressures in the deep-sea bacterium *Photobacterium* sp. strain SS9. *Mol. Microbiol.* 17: 713-726.
- Chitnis, C. E., and D. E. Ohman. 1990. Cloning of *Pseudomonas aeruginosa* *algG*, which controls alginate structure. *J. Bacteriol.* 172:2894-2900.
- Chitnis, C. E., and D. E. Ohman. 1993. Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure. *Mol. Microbiol.* 8:583-590.
- Chu, L., T. B. May, A. M. Chakrabarty and T. K. Misra. 1991. Nucleotide sequence and expression of the *algE* gene involved in alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 107: 1-10.
- Clementi F. 1997. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology.* 17: 327-361.
- Conn, E. E., and Stumpf. 1992. Rutas alternas del catabolismo de la glucosa. En: Bioquímica fundamental. Limusa. México.
- Costerton, W. J., Cheng, K. J., Gessey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., and Marrie T. J. 1987. Bacterial Biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 435-464.
- Darwins, A., B. Frantz, R. I. Vanags and A. M. Chakrabarty. 1986. Nucleotide sequence analysis of the phosphomannose isomerase gene (*pmi*) of *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with the corresponding *Escherichia coli* gene *manA*. *Gene* 42:293-302.
- De Las Peñas A., L. Connolly and C. A. Gross. 1997. The σ^E -mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of σ^E . *Mol. Microbiol.* 24: 373-385.
- Delle-Attree I, Toussaint B, Vignais PM. 1995. Cloning and sequence analyses of the genes coding for the integration host factor (IHF) and HU proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* 154: 61-4.
- Delle-Attree, I., Toussaint, B., Froger, A., Willison, J. C. and P. M. Vignais 1996. Isolation of an IHF-deficient mutant of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid isolate and evaluation of the role of IHF in *algD* gene expression. *Microbiology* 142: 2785-2793.
- Delle-Attree, I., Toussaint, B., Garin, J. and P. M. Vignais. 1997. Cloning, sequence and mutagenesis of the structural gene of *Pseudomonas aeruginosa* CysB, which can activate *algD* transcription. *Mol. Microbiol.* 24: 1275-1284.
- Deretic, V., J. F. Gill and A. M. Chakrabarty. 1987. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: nucleotide sequence and transcriptional regulation of the *algD* gene. *Nucleic Acid research.* 15: 4567-4581.
- Deretic, V., R. Dikshit, W. M. Konyecsni, T. Misra, A. M. Chakrabarty and T. K. Misra. 1989. The *algR* gene, which regulates mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, belongs to a class of environmentally responsive genes. *J. Bacteriol.* 171: 1278-1283.
- Deretic, V., J. H. Leveau, C. D. Mohr and N. S. Hibler. 1992. In vitro phosphorylation of AlgR, a regulator of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, by a histidine kinase and effects of small phospho-donor molecules. *Mol. Microbiol.* 6: 2761-2767.
- Deretic, V., M. J. Schurr, J. C. Boucher, and D. W. Martin. 1994. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factor. *J. Bacteriol.* 176: 2773-2780.
- Devries, C. A., and Ohman, D. E. 1994. Mucoid-to-non-mucoid conversion in alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* often results from spontaneous mutations in *algT*, encoding a putative alternative sigma factor, and shows evidence for autoregulation. *J. Bacteriol.* 176:

6677-6687

Dixit, V., M. Arthur, and G. Gitnick. 1993. A morphological and evaluation of transplanted isolated encapsulated hepatocytes following long-term transplantation in Gunn rats. *Biomater Artif Cells Immob Biotechnol.* 21: 119-133.

Erlksson, J. W. and C. A. Gross. 1989. Identification of the sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev.* 3: 1462-1471.

Ertesvag, H., H. K. Hoidal, I. K. Hais, A. Rain, B. Doseth and S. Valla. 1995. A Family of modular type mannuronan C-5-epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Microbiol.* 16: 719-731.

Fellay, R., Frey, J., and Krisch, H. 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* 52: 147-154.

Franklin, M. J. and D. E. Ohman. 1993. Identification of *algF* in the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* which is required for alginate acetylation. *J. Bacteriol.* 175: 5057-5065.

Franklin, M. J., C. E. Chitnis, P. Gacesa, A. Sonesson, D. C. White, and D. E. Ohman. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* AlgG is a polymer level alginate C5-mannuron epimerase. *J. Bacteriol.* 176: 1821-1830.

Fujihara, M., and Nagumo, T. 1992. The effect of the content of D-mannuronic acid and L-guluronic blocks in alginates on antitumor activity. *Carbohydr. Res.* 224: 343-347.

Fujiwara, S., N. Zielinski, and A. M. Chakrabarty. 1993. Enhancer-like activity of AlgR1-binding site in alginate gene activation: positional, orientation and sequence specificity. *J. Bacteriol.* 175: 5452-5459.

Fyfe, J. A. M. and Govan, J. R. W. 1983. Synthesis, regulation and biological function of bacterial alginate. In: Progress in Industrial Microbiol. Vol. 18, pp. 45-83, Bushell, M. E., Ed., Elsevier Amsterdam.

Gacesa P. 1998. Bacterial alginate biosynthesis-recent progress and future prospects. *Microbiology.* 144: 1133-1143.

Gill, J. F., V. Deretic, and A. M. Chakrabarty. 1986. Overproduction and assay of *Pseudomonas aeruginosa* phosphomannose isomerase. *J. Bacteriol.* 167:611-615.

Goldberg, J. B. and T. Dahnke. 1992. *Pseudomonas aeruginosa* AlgB, which modulates the expression of alginate, is a member of the NtrC subclass of prokaryotic regulator. *Mol. Microbiol.* 6: 59-66.

Goldberg, J. B., K. Hatano and G. B. Peir. 1993. Synthesis of lipopolysaccharide O side chain by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 requires the enzyme phosphomannomutase. *J. Bacteriol.* 175: 1605-1611.

González López, V. Salmeron, M. V. Martínez-Toledo, F. Ballesteros and A. Ramos Comenzona. 1985. Production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in chemically-defined media and dialysed soil media. *Soil Biol. Biochem.* 18: 119-120.

Govan, J. R. W. and V. Deretic. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60: 539-574.

Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., and Thom, D. 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg box model. *FEBS Lett.* 32: 195-198.

Grasdalen H., Larsen B., and Smidsrod. 1981. ¹³C-NMR studies of monomeric composition and

sequence in alginate. *Car. Res.* **89**: 179-191

Hagstam, H. 1985. Alginates and heartburn -evaluation of a medicine with a mechanical mode of action. In: *Gums and Stabilizers for the food Industry 3*. pp. 363-370. Phillips, G. O., Wedlock, D. J., and Williams P. A., Eds., Elsevier Applied Science Publishers, London.

Haug, A., B. Larsen, and O. Smidsrod. 1974. Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydr. Res.* **32**: 217-225.

Hiratsu, K., M. Amekuro, H. Nashimoto, H. Shinagawa and K. Makino. 1995. The *rpoE* gene of *Escherichia coli*, which encodes σ^E , is essential for bacterial growth at high temperature. *J. Bacteriol.* **177**: 2918-2922.

Johnson, K., I. Charles, G. Dougan, D. Pickard, P. O'Gaora, G. Costa, T. Ali, I. Miller, and C. Hormaeche. 1991. The role of stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. *Mol. Microbiol.* **5**: 401-407.

Kato J., T. K. Misra and A. M. Chakrabarty. 1990. AlgR3, a protein resembling eukariotic histone H1, regulates alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2887-2891.

Kennedy, c., and A. Toukdarian. 1987. Genetics of Azotobacters: Applications to Nitrogen Fixation and related Aspects of metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 227-258.

Krieg, R. N. and J. G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Baltimore. Williams & Wilkins.

Lemoigne, M., and H. Girard. 1943. Reserves lipidiques β -hydroxy-butyriques chez *Azotobacter choococum*. *C. R. Acad. Sci.* **217**: 557-588.

Lin, L. P., and H. L. Sadoff. 1968. Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of β -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* **95**: 2336-2343

Liu, H. W., F. A. Oforu and P. L. Chang. 1993. Expression of human factor IX by microencapsulated recombinant fibroblasts. *Hum. Gene Ther.* **4**: 291-301

Lipinska, B., S. Sharma and C. Georgopoulos. 1988. Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a σ^{32} -independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res.* **16**: 10053-10067.

Lloret, L., R. Barreto, M. E. Campos, S. Moreno, J. M. Martínez-Salazar, G. Espín, R. León and G. Soberón Chávez. 1996. Genetic analysis of the transcription arrangement of *Azotobacter Vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters. *Mol. Microbiol.* **21**:449-457.

Lonetto, M., K. L. Brown, K. E. Rudd, and M. J. Buttner 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigmaE gene reveals the existence of a subfamily of Eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7573-7577.

Lynn, T. Y. and Z. Hassid. 1966. Pathway of alginic acid synthesis in the marine brown alga *Fucus gardneri* (Silva). *J. Biol. Chem.* **241**: 5284-5297.

Loperfido, B., and H. L. Sadoff. 1973. Germination of *Azotobacter vinelandii* cysts: sequence of macromolecular synthesis and nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* **1113**: 841-846.

Ma, S., D. J. Wozniak, and D. E. Ohman. 1997. Identification of the histidine protein kinase KinB in *Pseudomonas aeruginosa* and its phosphorylation of the alginate regulator AlgB. *J. Biol. Chem.* **272**: 17952-17950.

Ma, S., U. Selvaraj, D. E. Ohman R. Quarless, D. J. Hassett and D. J. Wozniak. 1998. Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **180**: 956-968.

Maharaj, R., T. B. May, S. K. Wang and A. M. Chakrabarty. 1993. Sequence of *algB* and *algR*

- genes involved in the synthesis of alginate by *pseudomonas aeruginosa*. *Gene*. 136: 267-269.
- Maldonado, R., I. Jiménez and J. Cassadeus.** 1994. Changes in poliploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *J. bacteriol.* 176: 3911-3919.
- Manna, A. C. and Das, H. K.** 1993. Determination of the size of the *Azotobacter vinelandii* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 241: 719-722.
- Martin, D. W., M. J. Schurr, H. Yu and V. Deretic.** 1994. Analysis of promoters controlled by the putative sigma factor AlgU regulating conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* relation to σ^E an response. *J. Bacteriol.* 176: 6688-6696.
- Martínez-Salazar J. M., S. Moreno, R. Najera, J. C. Boucher, G. Espín, G. Soberón-Chavez and V. Deretic.** 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its .regulators MucA, MucB, MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.* 178: 1800-1808.
- Mathee, K., C. J. McPherson, and D. E. Ohman.** 1997. Posttranslational control of the *algT* (*algU*)-encoded σ^{22} for expression of the alginate regulon in *Pseudomonas aeruginosa* and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (AlgN). *J. Bacteriol.* 179: 3711-3720.
- May, T. B., Dean S., Romilla M., Junichi K. Lien C., James D. D., Siddartha R., Nicolette A. Z., Alan B., Rondy K. R., Tapank M., and A. M. Chakrabarty.** 1991. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* a key pathogenic factor in chronic pulmonary infection of cistic fibrosis patients. *Clin Microb. Rev.* 4: 191-206.
- May, T. B. and A. M. Chakrabarty.** 1994. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends Microbiol.* 2: 151-157.
- Mecasas, J., P. E. Rouviere, J. W. Erickson, T. J. Donohue, and C. A. Gross.** 1993. The activity of σ^E , an *Escherichia coli* heat-inducible σ -factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* 7: 2618-2628.
- Mejía-Ruiz, H., J. Guzman, S. Moreno, G. Soberón-Chávez, G. Espín.** 1997. The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algD*-independent promoter. *Gene* 199: 271-277.
- Mejía-Ruiz, H., S. Moreno, J. Guzman, R. Nájera, R. León, G. Soberón-Chávez, G. Espín.** 1997. Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant. *FEMS Microbiol. Letter.* 156: 101-106.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics, p. 431-435. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Missiakas D., and S. Raina.** 1998. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol. Microbiol.* 28: 1059-1066.
- Missiakas D., M. P. Mayer, M. Lemaire, C. Georgopoulos and S. Raina.** 1997. Modulation of the *Escherichia coli* σ^E (RpoE), heat-shock transcription-factor activity by the RsA, RseB RseC proteins. *Mol. Microbiol.* 24: 355-371.
- Moe, S. T., Draget K. I., SkjaK-Braek, G., and Smidsrod, O.** 1995. Alginates. In: *Food Polysaccharides and their applications*. pp. 245-286, Stephen, A. M., Ed., Marcel Dekker, New York.
- Mohr C. D. and V. Deretic.** 1992. In vitro interactions of the histone-like protein IHF with the *algD* promoter, a critical site for control of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioche. Biophys. Res. Commun.* 189: 837-844.
- Moreno, S., R. Nájera, J. Guzmán, G. Soberón-Chávez and G. Espín.** 1998. Role of alternative σ factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 180: 2766-2769.
- Morris, J. V.** 1987. New and modified polysaccharides. En: R. King Y P. Cheetham. Ed. Food Biotechnology. Elsevier Appl Sci. NY, pp 193 248.

- Mouncey, N. J., L. A. Mitchenall, and R. N. Pau. 1995. Mutational analysis of genes of the *mod* locus involved in molybdenum transport, homeostasis, and processing in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **177**: 5294-5302.
- Nagpal, P., M. A. Reddy and H. K. Das. 1989. Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **171**: 3133-3138.
- Narbad, A., Russell, N. J. and Gacesa, P. 1988. Radiolabelling patterns in alginate of *Pseudomonas aeruginosa* synthesized from specifically-labelled ^{14}C monosaccharide precursors. *Microbios.* **54**: 171-179.
- Núñez, C., S. Moreno, G. Soberón Chávez and G. Espín. 1999. The *Azotobacter vinelandii* response regulator AlgR is essential for cyst formation. *J. Bacteriol.* **181**: 141-148.
- Núñez, C., R. León, J. Guzmán, G. Espín, and G. Soberón-Chávez. 2000. Role of *Azotobacter vinelandii* *mucA* and *mucC* gene products in alginate production. *J. Bacteriol.* **182**: 6550-6.
- Otterlei, M., Ostgard, K., Skjak-Break, G., Smidsrod, O., Soon-Shiong, P., and Espevik, T. 1991. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *J. Immunother* **10**: 286-291.
- Page, W. J. and M. V. Tiggerstrom. 1978. Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. *Can. J. Microbiol.* **24**: 1590-1594.
- Picquadro, D. and Nelson D. B. 1992. Alginates. A new dressing alternative. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* **18**: 992-998.
- Pindar, D. and C. Bucke. 1975. The biosynthesis of alginic acid in *Azotobacter vinelandii*. *J. Biochem.* **152**: 617-622.
- Prentki, P. and Krisch, H. M. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-314.
- Rehm, B. H. A. 1996. The *Azotobacter vinelandii* gene *algJ* encodes an outer membrane protein presumably involved in the synthesis of alginate. *Microbiol.* **142**:873-880.
- Rehm, B. H. A., H. Ertesvag, and S. Valla. 1996. A new *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase gene (*algG*) is part of an *alg* gene cluster physically organized in a manner similar to that in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **178**: 5884-5889.
- Rehm, B. H. A., and S. Valla. 1997. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Microb. Biotech.* **48**: 28-28.
- Rouvière P. E., A. De Las Peñas, J. Meccas, Chi Zen Lu, K. E. Rudd and C. A. Gross. 1995. *rpoE*, the gene encoding the heat-shock sigma factor, σ^E , in *Escherichia coli*: *EMBO J.* **14**:. 1032-1042.
- Sadoff, H. L. 1975. Encystment and Germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev.* **39**(4): 516-539
- Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E. F., 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:5463-5467.
- Savelkoul, H. F., Van Ommen, R., Vossen, A. C. Breediand, E. G., Coffman, R. L. and van Oudenaren, A. 1994. Modulation of systemic cytokine level by implantation of alginate encapsulated cells. *J. Immunol. Meth.* **170**: 185-196.
- Shiller, N. L., S. R. Monday, C. M. Boyd, N. T. Keen and D. E. Ohman. 1993. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase (*algL*): Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 4780-4789.
- Shinabarger, T. B. May, A. Boyd, M. Ghosh and A. M. Chakrabarty. 1993. Nucleotide sequence and expression of the *Pseudomonas aeruginosa* *algF* gene controlling acetylation of alginate. *Mol.*

Microbiol. 9: 1027-1035.

Schilctman, D. A., A. Kavanaugh-Black, S. Shankar and A. M. Chakrabarty. 1994. Energy metabolism and alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: role of the tricarbixilic acid cycle. *J. Bacteriol.* 176: 6023-6029.

Sime, W. J. 1990. Alginates. In: Food Gels, pp. 53-78. Harris, P., Ed. Elsevier.

Sirklae, T., Salonen, H., Veski, P., Juerjenson, H. and Marvola, M. 1994. Biopharmaceutical evaluation of new prolonged-release press-coated ibuprofen tablets containing sodium alginate to adjust drug release. *Int. J. Pharm.* 107: 179-187.

Soom-Shiong, P., Hertz, R. E., Merideth, N., Yao, Q. X., Yoa Z., Zheng, T., Murphy, M., Moloney, M. K., Schmehl, M., Harris, M., Mendez, R., Mendez, R., and Sanfor, P. A. 1994. Insulin independence in a type 1 patient diabetic after encapsulated islet transplantation. *Lancet.* 343: 950-951.

Stevenson, L. H. and M. D. Sokolofsky. 1966. Cyst formation and poly-b-hibroxibutic acid accumulation in *Azotobacter*. *J. Bacteriol.* 91: 304-310.

Stokke, B. T., Smidsrod, O., Bruheim P., and Skjak-Breaek, G. 1991. Distribution of uronate residues in alginate chains in relations to alginate gelling propertis. *Mecromolecules* 24: 4637-4645.

Strom M. S. and S. Lory. 1993. Structure-funtion and biogenesis of the type IV pili. *Ann. Rev. Microbiol.* 47: 565-96

Tal, I. T. and Sun, A. M. 1993. Microencapsulation of recombinant cells: a new delivery system for gene therapy. *FASEB J.* 7: 1061-1069.

Tchan, Y. T., A. Birch-Andersen, and H. L. Jensen. 1962. The ultra structure of vegetative cells and cysts of *Azotobacter chroococcum*. *Arch. Mikrobiol.* 43: 50-66.

Toussaint, B., I. B. Delic-Atree and P. M. Vignais. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-life protein that binds to the *algD* promoter. *Biochem. Biophys Res Commun* 196: 416-421.

Vázquez A., S. Moreno, J. Guzmán, A. Alvarado and G. Espín. 1999. Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algXLVIFA* genes: characterization of *algF* mutants. *Gene.* 232:217-222.

Vela, G. R. 1974. Survival of *Azotobacter* in dry soil. *Appl. Microbiol.* 28: 77-79.

Wilson, P. W., and S. G. Knieght. 1952. Experiment in bacterial physiology. Burgess publishing Co., Minneapolis.

Winogradskg, S. (1938). Sur la morphologie et l' ecologie des *Azotobacter*. *Ann Inst. Pasteur Parris.* 60: 351-400.

Witchurch C. B., R. A. Alam and J. S. Mattick. 1996. The alginate regulator AlgR and un associated sensor FimS are requerid for twiching motiliti in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9839-9843.

Wozniak, D. J. 1994. Integration host factor and sequences downstream of the *Pseudomonas aeruginosa* *algD* transcription star site are requerid for expression. *J. Bacteriol.* 176: 5068-5076.

Wozniak, D. J. and Ohman D. E. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* AlgB, a two-component response regulator of the NtrC-family, is required for *algD* transcription. *J. Bacteriol.* 173: 1406-1413.

Wozniak, D. J. and Ohman D. E. 1993. Involvement of the alginate *algT* gene and integration host factor in the regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *algB* gene. *J. Bacteriol.* 175: 4145-4153.

Wozniak, D. J. and Ohman D. E. 1994. Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa*

- genes *algR*, *algB* and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by *algT*. *J. Bacteriol.* **176**: 6007-6014.
- Wyss, O., M. G. Neumann, and D. Socolofsky. 1961. Development and germination of the *Azotobacter* cyst. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**: 555-565
- Xie, Z.-D., D. Hershberger, S. Shankar, R. W. Ye and A. M. Chakrabarty. 1996. Sigma factor-anti-sigma factor interaction in alginate synthesis inhibition of AlgT by MucA. *J. Bacteriol.* **179**: 2922-2929.
- Yalpani M. and Sandford P. 1987. Commercial polysaccharides: Recent trends and developments. In: M Yalpani Ed. *Industrial polysaccharides: Genetic Engineering, structure/property relations and applications*. Elsevier Science Publisher, Amsterdam. pp 311-333.
- Ye, R. W., N. A. Zielinski and A. M. Chakrabarty. 1994. Purification and characterization of phosphomannomutase/phosphoglucomutase from *Pseudomonas aeruginosa* involved in biosynthesis of both alginate and lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **176**: 4851-4857.
- Yu, H., Schurr, M. J., and Deretic, V., 1995. Functional equivalence of *Escherichia coli* σ^E and *Pseudomonas aeruginosa* AlgU: *E. coli* *rpoE* restores mucoidy and reduces sensitivity to reactive oxygen intermediates in *algU* mutants *P. aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **177**: 3259-3268.
- Yu, H., Mudd, M., Boucher, J. C., Schurr, M. J., and Deretic, V., 1997. Identification of the *algZ* gene upstream of the response regulator *algR* and its participation in control of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179**: 187-193.
- Zertuche-González, F. 1994. Situación actual de la industria de las algas marinas productoras de ficoloides en México. Programa Cooperativo Gubernamental, FAO-Italia. Proyecto Aquila II. Documento de campo No. 13.
- Zhi-Dong, X., Hershberger, C. D., Shankar, S., Ye, R. W., and A. M. Chakrabarty. 1996. Sigma factor-anti-sigma factor interaction in alginate synthesis: inhibition of AlgT by MucA. *J. bacteriol.* **178**: 4990-4996.
- Zielinski, N. A., A. M. Chakrabarty and A. Berry. 1991. Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene encoding phosphomannomutase. *J. Biol. Chem.* **266**: 9754-9763.