

03072

15

28



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y POSGRADO DEL C. C. H.

Instituto de Biotecnología

FALLA DE ORIGEN

Evidencias genéticas de la presencia
de un segundo promotor en el operón *algDA*
en *Azotobacter vinelandii*

T E S I S

Que para obtener el grado de:
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

Presenta la Biól.
tercero
Lourdes Lioret y Sánchez

Cuernavaca, Morelos

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

Deseo manifestar mi agradecimiento:

A mis asesores: la Dra. Gloria Soberón Chávez y el Dr. Jaime Martínez Salazar por sus conocimientos brindados y asesoría directa para la realización de este trabajo.

A cada uno de mis compañeros de laboratorio por su ayuda, amistad y por el ambiente de trabajo que crean cada día.

A Maru por su gran apoyo.

A Eduardo por su valiosa colaboración.

A mis padres por su infinito amor

y a mis hermanos con mi cariño.

Indice

Introducción	1
Antecedentes	6
Objetivos	8
Materiales y métodos	9
Resultados	9
Capítulo I. Construcción de una mutante en la región estructural de algD	9
Capítulo II. "Transcriptional arrangement of <i>Azotobacter vinelandii</i> alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters"	14
Capítulo III. Resultados adicionales.....	58
a) Cuantificación de alginato de las cepas ATCC9046, RSD1 y RSD1/pRSD1	58
b) Reversión a la mucoidía de las cepas RSD1 y RSD1/pRSD1	60
Discusión	62
Conclusiones	65
Bibliografía	65

Introducción

Azotobacter vinelandii es una bacteria gram-negativa del suelo que es capaz de fijar nitrógeno en estado libre bajo condiciones aeróbicas (22). Bajo condiciones medio ambientales no favorables, *A. vinelandii* es capaz de formar quistes es decir, células diferenciadas rodeadas por dos capas las cuales contienen una alta proporción del exopolisacárido alginato. Estas células latentes, que son estructuras resistentes a la desecación, son capaces de sobrevivir en el suelo por largos periodos de tiempo (37, 46). Una característica particular de esta bacteria es la de poseer múltiples copias de su cromosoma completo que pueden llegar a ser 80 o más en la fase estacionaria cuando es crecida en medio rico. (26, 28, 36).

El alginato es un polisacárido de origen natural, constituido por monómeros de ácido manurónico y de su epímero, el ácido gulurónico. En el polímero, los monómeros pueden formar bloques homopoliméricos de manurónico o de gulurónico así como regiones mixtas de ambos componentes. Los bloques de guluronato tienen la capacidad de interactuar con iones divalentes entre otros el Ca^{++} y esto le otorga al alginato la capacidad de formar geles termoresistentes. Esta propiedad hace que este biopolímero sea utilizado en diferentes aplicaciones industriales por ejemplo, la utilización de geles de alginato como matriz de inmovilización y agente estabilizador de reacciones enzimáticas, en la industria alimenticia es utilizado para gelificar la fase acuosa de los alimentos para mantener la forma y textura, también es utilizado como cubierta protectora en el manejo de heridas (3, 43, 44).

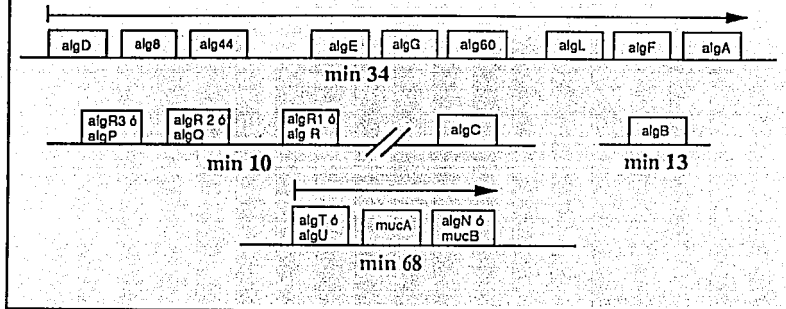
Actualmente el alginato se obtiene para uso comercial a partir de las algas cafées (Phaeophyta) entre las que se encuentran los géneros *Fucus*, *Laminaria*, *Macrocystis* y *Ascophyllum*, sin embargo, esta fuente presenta la desventaja de

estar sujeta a las condiciones climáticas. El alginato también es producido por los géneros bacterianos *Pseudomonas* y *Azotobacter* en los cuales la producción de alginato si podría ser controlada a nivel de fermentación. A diferencia del alginato producido por algas, el bacteriano posee residuos de manuronato modificados con grupos O-acetilos (3). Además de ser una bacteria de vida libre, *A. vinelandii* produce alginato con bloques de ácido gulurónico similares a los que presentan las algas por lo tanto, esta bacteria podría ser utilizada como una alternativa para la obtención de alginato para uso industrial de origen bacteriano.

La ruta de biosíntesis del alginato fue primeramente descrita en *Fucus gardneri* y en *A. vinelandii* (38). No obstante, la genética molecular de la producción de alginato ha sido ampliamente estudiada únicamente en *Pseudomonas aeruginosa* (3, 33, 13) debido a que este microorganismo presenta un interés clínico por ser un patógeno oportunista cuya producción de alginato es la responsable de la evasión de la respuesta inmune en la infección de pacientes que sufren fibrosis quística (3, 33). El estudio de la genética molecular de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* sería de utilidad para la obtención de alginato a partir de esta bacteria por vía fermentativa.

Los genes que codifican para las enzimas de la ruta de biosíntesis de los monómeros de manurónico, así como los genes que codifican para las proteínas involucradas en la polimerización, acetilación, secreción y epimerización de los monómeros del ácido manurónico se encuentran agrupados en la misma estructura operónica en el minuto 34 del cromosoma de *P. aeruginosa* a excepción del gen *algC* que se encuentra junto con los genes regulatorios del minuto 10 (figura I) (4, 9).

Figura I. Organización de los grupos de genes de alginato en el cromosoma de *Pseudomonas aeruginosa*.

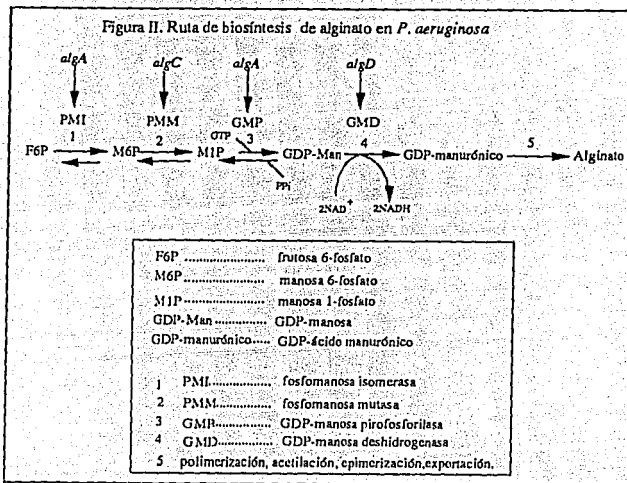


La ruta de biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa* (figura II) involucra la conversión de fructosa 6-fosfato a GDP-manosa vía manosa 6-fosfato y manosa 1-fosfato como intermediarios. La GDP-manosa deshidrogenasa, codificada por el gen *algD* convierte la GDP-manosa en ácido manurónico que es el precursor directo del alginato. La GDP-manosa es también el precursor de GDP-ramnosa que es el precursor de la ruta de biosíntesis del lipopolisacárido LPS (antígeno O) (33), por lo tanto la GDP-manosa deshidrogenasa es la enzima determinante en la ruta de biosíntesis de alginato pues es la que dirige a la GDP-manosa hacia la biosíntesis de alginato.

La fosfomanosa guanosin-isomerasa difosfomanosa pirofosforilasa (PMI-GMP) es una enzima bifuncional codificada por el gen *algA* que cataliza el primer y tercer paso de la ruta de biosíntesis de alginato (8, 18). *algC* codifica para la enzima fosfomanosamutasa (PMM) cataliza el segundo paso de la ruta de alginato convirtiendo a la manosa 6-fosfato en manosa 1-fosfato.

Las tres enzimas periplásmicas que no forman parte de la ruta de biosíntesis pero cuyos genes se encuentran también en el minuto 34 del cromosoma de *P. aeruginosa* son: *algL*, el cual codifica para la liasa periplásmica que corta el

alginate, esta enzima no es esencial para la producción de alginate pero se propone que puede tener algún papel en el procesamiento a nivel de periplasma (2, 3, 35, 33, 39), *algF* que codifica para una acetilasa y *algG* cuyo producto es una enzima con actividad de epimerasa, la cual convierte el ácido manurónico a ácido gulurónico. *algE* que codifica para una proteína de membrana externa involucrada en la exportación del alginate, también se encuentra formando parte de la misma estructura operónica.



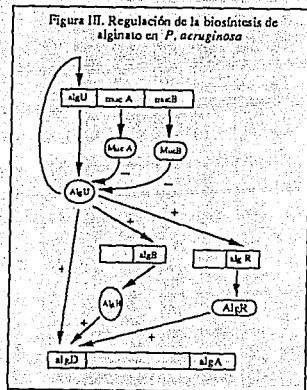
La incorporación del ácido manurónico en el polímero de alginate no se ha entendido hasta el momento, sin embargo, las secuencias nucleotídicas de las mutaciones *alg8*, *alg44* y *alg60* que también se encuentran dentro de la misma estructura operónica, indican que sus productos son proteínas de pegado a membrana y por tanto podrían constituir un complejo de polimerización (2, 6, 12, 18, 33, 39).

En *P. aeruginosa* el operón *alg* es controlado a partir del promotor de *algD*, el cual se encuentra bajo regulación transcripcional positiva de las proteínas AlgR y

AlgB que son codificadas por los genes que se encuentran en el minuto 10 y 13 respectivamente fig I y III (10, 19, 33, 45). El último gene de este grupo es *algA*, el cual está localizado aproximadamente a unos 20 kb hacia el extremo 3' de *algD* (4). La organización de los genes del operón *alg* se muestra en la figura I.

Recientemente ha sido identificado el gene *algU*, cuyo producto es una proteína similar al factor sigma E de *Escherichia coli*, el cual parece ser responsable de la iniciación de la transcripción de *algD*, *algR* y *algB* y su propio gene (13).

Los genes *mucA* y *mucB* codifican para reguladores negativos de la actividad de AlgU, estos tres genes están agrupados en la región muc del minuto 68 del cromosoma de *P. aeruginosa* (figura III) (11,12, 29, 41).



Las cepas mucoides de *P. aeruginosa* que han sido aisladas de pulmones de pacientes con fibrosis quística contienen mutaciones en los genes *mucA*, *mucB* y en otros *loci* aun no identificados. Por el contrario, la baja cantidad de alginato producida por cepas aisladas del medio ambiente o de tejidos de pulmones de pacientes con fibrosis quística en donde *mucA* y *mucB* son funcionales, es atribuida a la baja actividad de AlgU debido a que es inactivada por MucA y MucB (3, 13, 33) por lo tanto, las mutaciones en los genes *mucA* y *mucB* convierten a las cepas de *P. aeruginosa* a un estado de mucoidía constitutivo (13).

Antecedentes

La ruta de biosíntesis de alginato de *P. aeruginosa* y de *A. vinelandii* son muy similares (3, 38). *A. vinelandii* contiene secuencias de DNA homólogas a algunos genes de *P. aeruginosa* involucrados en la biosíntesis y regulación de la producción de alginato tales como *algD*, *algA* y *algR*.

El gene *algD* de *A. vinelandii* muestra gran similitud tanto en la parte estructural como en la parte regulatoria con el correspondiente gene de *P. aeruginosa*, presenta un 73% de identidad y 97% de similitud con el gene *algD* de *P. aeruginosa* (31). Ambas bacterias productoras de alginato, se encuentran filogenéticamente cercanas ya que pertenecen al grupo de Azomonas-azotobacteracea (16). Por lo tanto, es probable que además de presentar secuencias homólogas, también en *A. vinelandii* los genes *alg* de la ruta de biosíntesis se encuentren agrupados dentro de una misma región.

A partir de un banco genómico de *A. vinelandii* ATCC9046 en el cósmido pCP13 (6) fue clonado el gen *algD* de *A. vinelandii* utilizando como probador el gen *algD* de *P. aeruginosa* el cual, fue proporcionado por A.M. Chakrabarty de la Universidad de Illinois en Chicago. De este banco se obtuvo el pMSD675 que contiene un inserto de *A. vinelandii* de 25kb y que porta al gen *algD* de *A. vinelandii*. Debido a que en *P. aeruginosa* los genes de biosíntesis del minuto 34 comprenden aproximadamente 20 kb (3), el pMSD675 se probó también para *algA*, el cual se encuentra en el otro extremo del operón de biosíntesis, utilizando como sonda su homólogo en *P. aeruginosa* y se encontró presente. Los genes *algD* y *algA* de *A. vinelandii* fueron nombrados con el mismo nombre que su homólogo en *P. aeruginosa*.

Dado que ambos genes, extremos del operón de biosíntesis de alginato de *P. aeruginosa*, están contenidos en el pMSD675 y que el gen *algD* de ambas bacterias presentan una alta homología, es probable que también estén presentes dentro de este plásmido los demás genes de biosíntesis que en *P. aeruginosa* se encuentran entre *algD* y *algA* y que el arreglo transcripcional tenga alguna similitud.

Xanthomonas campestris pv campestris es una bacteria gram-negativa, fitopatógena la cual produce al exopolisacárido goma xantana, este polímero está constituido por una columna de β 1-4 D-glucosa con cadenas de trisacáridos unidos a él, estas ramificaciones están compuestas por dos residuos de manosa y uno de ácido glucurónico (43). La cepa de *X. campestris pv campestris* B100-13 presenta una inserción en el gen *xanB* (25). Este gene codifica para la enzima bifuncional PMI-GMP análoga a la enzima AlgA de *P. aeruginosa* razón por la cual esta cepa es deficiente en la producción de manosa y por lo tanto, incapaz de producir goma xantana. Dada la deficiencia de la B100-13 en el gen homólogo a *algA*, esta bacteria se utilizó para realizar estudios de complementación en *trans* para restaurar la producción de goma xantana a partir del gen *algA* de *A. vinelandii*. *X. campestris* no contiene alginato liasa por lo cual, el fondo genético de esta bacteria se utilizó para expresar *algL* de *A. vinelandii*.

Objetivo

Objetivo general

Caracterización del arreglo transcripcional de los genes de la ruta de biosíntesis de alginato de la región *algDA* de *A. vinelandii*.

Objetivos particulares

1. Construcción de una mutante en *algD* en el cromosoma de *A. vinelandii*.
2. Identificación de *algL* en la región *algDA* y evaluación de la polaridad de la expresión de *algD* sobre *algL* y *algA*.

El objetivo número 1., forma el capítulo I y el segundo objetivo se encuentra incluido en el manuscrito "Transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters" que forma el capítulo II.

Materiales y métodos

Los materiales y métodos se describen en el capítulo II, en el manuscrito “Transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters”.

Resultados

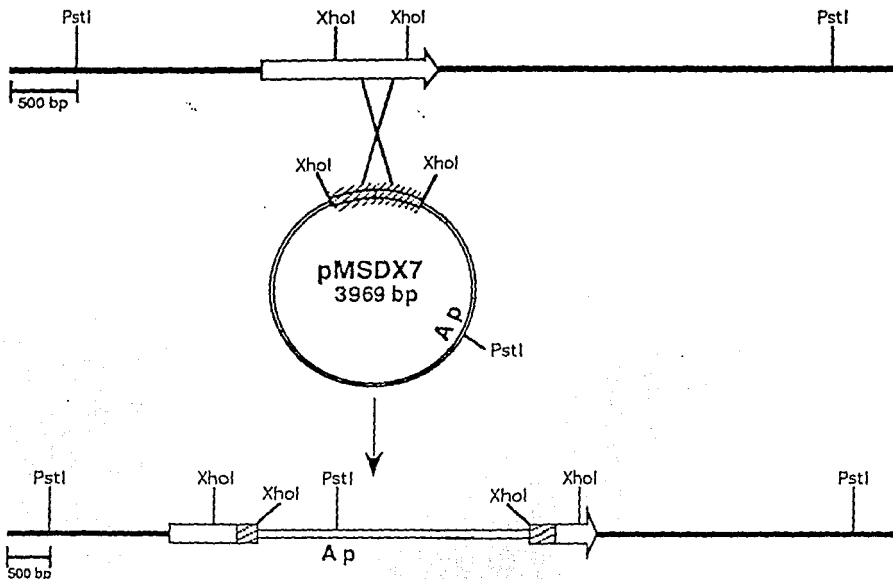
Capítulo I.

Construcción de una mutante en la región estructural de *algD*.

La mutante de *A. vinelandii* en *algD* se construyó en la cepa ATCC 9046 interrumpiendo al gene *algD* del cromosoma de *A. vinelandii* en la región estructural, esta mutante se denominó RSD1 y fue construída mediante un evento de recombinación sencilla del plásmido pMSDX7. El plásmido pMSDX7 mide 3.969 kb, tiene un fragmento XhoI de 594 pb de la secuencia interna del gene *algD* de *A. vinelandii* en el vector pBluescriptSK+, el cual es resistente a Ap y no es capaz de replicarse en *Azotobacter* (figura IVa). La recombinación sencilla del plásmido pMSDX7 en el cromosoma de la ATCC 9046 se demuestra con hibridación tipo Southern (figura IVb), en donde se hibridó el DNA de *A. vinelandii* ATCC 9046, RSD1 y el pMSD675 digeridos con *Pst*I contra el pMSDX7 como sonda. La banda de 3.6 kb de la RSD1 corresponde a la integración del pMSDX7.

El PMSDX7 fue introducido en *A. vinelandii* ATCC 9046 por transformación. Las transformantes fueron seleccionadas en ampicilina 30 µg/ml (Ap30) y son el producto de un evento de recombinación sencilla que truncó al gene *algD* en dos mitades separadas por el pMSDX7. Además de la resistencia a Ap. Las

(a)



(b)

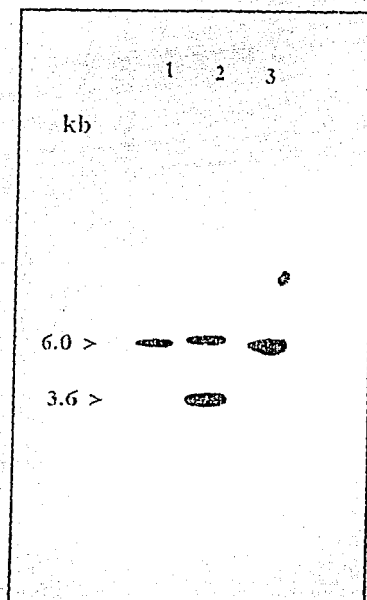


Figura IV. Construcción de una mutante en *algD* mediante la integración del pMSDX7 por un evento de recombinación sencilla. (a) Integración del pMSDX7 en el cromosoma de *A. vinelandii* ATCC 9046 por un evento de recombinación sencilla. (b) Southern utilizando como sonda al pMSDX7 contra el DNA cromosomal de la RSD1. Orden de los carriles (1) DNA cromosomal de la ATCC digerido con *Pst*I, (2) DNA cromosomal de la RSD1 digerido con *Pst*I, (3) pMSD675 digerido con *Pst*I.

transformantes mostraron un fenotipo no mucoide. Debido a la poliploidía de *A. vinelandii* las transformantes presentaron un halo de mucoidía al tercer día de incubación a 30°C al ser picadas en BS (medio Burk con sacarosa como fuente de carbono) Ap30 por lo que se escogió a una de ellas y se subcultivó varias veces en el mismo medio a partir de una colonia aislada para seleccionar las segregantes y obtener una cepa que tuviera la interrupción de *algD* en todos los cromosomas.

El fenotipo de esta cepa purificada, la RSD1, es no mucoide debido a que el gen *algD* es indispensable para la biosíntesis de alginato, en contraste con la cepa parental la ATCC 9046 que es mucoide (figura Va y Vb). En algunas ocasiones pueden observarse zonas mucoides encima del tapete no mucoide a los 3 días de incubación a 30°C. La aparición de estos parches de mucoidía pueden ser debidos a que la construcción en el cromosoma de la RSD1 no sea completamente estable y que el gen truncado se rearregle y vuelva a quedar completo, todas las células hijas de una célula que haya recuperado al gen *algD* completo por haber perdido al pMSDX7 y por lo tanto haber perdido la resistencia a Ap, podrían crecer como colonias satélites de las RSD1 una vez que la RSD1 haya degradado la Ap.

A la RSD1 le fue transferido el pMSD675 por una crucea triparental el cual complementó la mucoidía de esta cepa debido a que este plásmido contiene la región *algDA* (figura Vd). La restauración de la mucoidía por complementación en *trans* proporcionada por el pMSD675 en la RSD1 comprueba que el gen *algD* es indispensable para la biosíntesis de alginato.

A partir de la RSD1/pMSD675 se generó el pRSD1 (figura 4) por un evento de recombinación sencilla mediante el cual el pMSDX7 integrado en cromosoma se integró al pMSD675 interrumpiendo al gen *algD* de este plásmido. La construcción de este plásmido se encuentra contenida en el capítulo II. La cepa resultante, RSD1/pRSD1 tiene interrumpido al gen *algD* tanto en cromosoma

(a)



(b)

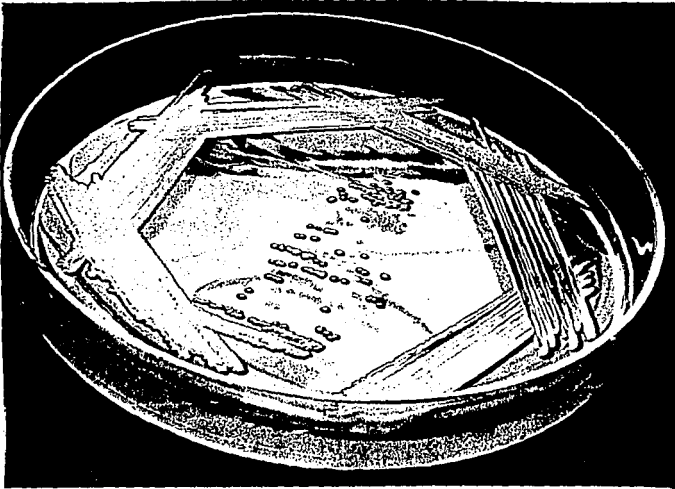


Figura V. Las cepas de *A. vinelandii* derivadas de la ATCC 9046. (a) RSD1, (b) RSD1/pRSD1, y (c) RSD1/pMSD675 (d) ATCC9046 estriadas en BS Ap30, Ap30 y Ap30Tc15 respectivamente. Se pueden observar parches de mucoidía sobre un fenotipo no mucoides a diferencia de la RSD1/pMSD675 y ATCC9046 en que el fenotipo es completamente mucoides.

(c)



(d)



Figura V. Continuación.

como en plásmido y pierde la capacidad de producir alginato, es decir, presenta un fenotipo no mucoide sin embargo, parches de mucoidía aparecen cuando esta cepa es estriada en caja debido a un evento de reversión como se explica más adelante en el capítulo III (figura IVc).

El pRSD1 permitió la evaluación de la polaridad de una interrupción a nivel de *algD* sobre dos genes de la región *algDA* : *algL* y *algA*. La evaluación de *algL* y *algA* se encuentra contenida en el manuscrito referido en el objetivo 2, es decir, en el siguiente capítulo.

Capítulo II.

Identificación de *algL* en la región *algDA* y evaluación de la polaridad de la expresión de *algD* sobre *algL* y *algA*.

Los resultados del objetivo 2 del presente proyecto de maestría se encuentran contenidos en la manuscrito “Transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters” que a continuación anexo.

Las figuras y tablas del manuscrito se numeran con números arábigos y las que no están contenidas en él, se numeran con números romanos.

Title: Transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters

Authors: Lourdes Lloret, Rita Barreto, María-Eugenia Campos, Soledad Moreno, Jaime Martínez-Salazar, Guadalupe Espín, and Gloria Soberón-Chávez*

Address: Departamento de Microbiología Molecular. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo Postal 510-3, Cuernavaca 62250 Morelos, México

Tel: (52) (73) 114700

Fax: (52) (73) 172388

E mail: gloria@pbr322.ceingebi.unam.mx

SUMMARY

The study of the biosynthesis of alginate, the exopolysaccharide produced by *Azotobacter vinelandii* and some *Pseudomonas aeruginosa* strains, has different biotechnological applications. We report here the cloning of the *A. vinelandii* *algA* gene which codes for the bifunctional enzyme phosphomannose isomerase-guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase (PMI-GMP) based on the complementation with an *A. vinelandii* genomic library, for xanthan gum production of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* *xanB*-mutants, which lacks this enzymatic activity. The complementing cosmid clones thus selected, besides containing *algA* gene presented a gene coding for an alginate lyase activity (*algL*), and some of them also contained the *algD* gene which codes for the enzyme GDP-mannose dehydrogenase. We present here the characterization of the *A. vinelandii* chromosomal region comprising *algD* and its promoter region, *algA* and *algL* genes. Our results show that, as has been previously reported for *Pseudomonas aeruginosa*, *A. vinelandii* presents a cluster of the biosynthetic alginate genes which are transcribed from the *algD* promoter, but we also present evidence showing the existence of a second independent promoter in this region which transcribes at least *algL* and *algA* genes. In addition, here we present data which show that the

transcription of the promoter transcribing *algL* and *algA* genes is regulated in a distinct manner as the *algD* promoter.

INTRODUCTION

Azotobacter vinelandii is a gram-negative soil bacterium capable of fixing nitrogen in free living state under aerobic conditions due to an increased respiration rate under conditions of nitrogen starvation (Kennedy and Toukdarian, 1987). When *A. vinelandii* is under unfavorable environmental conditions it is able to form desiccation-resistant cysts which are differentiated cells surrounded by two capsule-like layers containing a high proportion of the exopolysaccharide alginate (Page and Sadoff, 1975; Wyss *et al.*, 1961), this dormant cells are able to survive in dry soil for long periods. Another particular feature of this bacterium is that it posses multiple copies of its entire chromosome (Maldonado *et al.*, 1992; Manna and Das, 1993; Nagpal *et al.*, 1989).

Alginate is a linear polysaccharide constituted by mannuronic acid and its epimer guluronic acid, which is able to form heat resistant gels in the presence of Ca^{++} , this property makes this biopolymer useful in different industrial applications (Sutherland, 1985). The alginate used in industry is extracted from marine brown algae (Chakrabarty, 1991).

The molecular genetics of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa* has been widely studied (Chakrabarty, 1991; Deretic *et al.*, 1994; May and Chakrabarty, 1994). The *P. aeruginosa* pathway of alginate biosynthesis

involves the conversion of fructose 6-phosphate to GDP-mannose via mannose 6-phosphate and mannose 1-phosphate intermediates. The commitment enzyme in this pathway is GDP-mannose dehydrogenase (encoded by *algD* gene) which converts GDP-mannose, a metabolite used for the synthesis of different saccharides, to GDP-mannuronic acid, a direct alginate precursor. Phosphomannose isomerase-guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase (PMI-GMP) is a bifunctional enzyme encoded by the *algA* gene that catalyses the first and third steps of the alginate pathway (Darzins *et al.*, 1986; Gill *et al.*, 1986). *algL* gene encodes the periplasmic alginate lyase, which is not essential for alginate production (Boyd *et al.*, 1993; Murata *et al.*, 1993; Schiller *et al.*, 1993).

The biosynthetic gene cluster which contains most of the genes coding for the enzymes involved in the synthesis of the mannuronic acid monomers, as well as those coding for proteins involved in its polymerization, acetylation, secretion, and epimerization, appear to be arranged in an operonic structure. The existence of this operon was deduced mainly by studies on the polarity of transposon mutations, the presence of an mRNA of approximately 18 kb by Northern blot analysis, which is the expected size of the *alg* mRNA, was not accomplished, presumably for its instability (Chitnis and Ohman, 1993). Weak promoters

have been identified internal to the *alg* operon (Darzins *et al.*, 1985; Chu *et al.*, 1991; Chitnis and Ohman, 1993), but the expression of these promoters was not sufficient to restore the AlgA⁺ phenotype of transposon mutant in which all the *alg* genes except for *algA* were provided *in trans* (Chitnis and Ohman, 1993).

In *P. aeruginosa* the *alg* operon is controlled from the *algD* promoter via positive transcriptional regulation by the AlgR and the AlgB proteins (Deretic *et al.*, 1989; Goldberg and Ohman, 1987; Wozniak and Ohman, 1994). The last gene in this cluster is *algA* which is located approximately 18 kb downstream of *algD* gene, *algL* gene is located in the region between these two genes (May and Chakrabarty, 1994). The recently identified sigma-like factor AlgU seems to be responsible for the initiation of *algD* transcription. This sigma-like factor is similar to the *Escherichia coli* σ^E protein and both recognize similar DNA sequences. *mucA* and *mucB* genes code for negative regulators of AlgU activity (Deretic *et al.*, 1990; Deretic *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1994; Schurr *et al.*, 1993).

The native *P. aeruginosa* strains isolated from the environment or from different human infected tissues do not produce alginate at significant levels. The lack of alginate biosynthesis is caused by the very low AlgU

activity, due to its inactivation by MucA and MucB. All the naturally occurring mucoid strains are isolated from the lungs of Cystic Fibrosis patients and contain mutations in *mucA* or other not yet identified loci (Fyfe and Govan, 1980; Schurr *et al.* 1994). At present, there is not a clear picture on the physiological role that alginate biosynthesis plays for *P. aeruginosa* in the environment (Chakrabarty, 1991; Deretic *et al.*, 1994; May and Chakrabarty, 1994).

Xanthomonas campestris pv *campestris* is a gram-negative phytopathogenic bacteria which produces the exopolysaccharide xanthan gum, which consists of a β 1-4 D-glucose backbone with alternate trisaccharide chains attached to it, these ramifications are composed of two mannose residues and one glucuronic acid residue (Sutherland, 1985). Mutants deficient in mannose production, and thus unable to produce xanthan gum, have been isolated (Köplin *et al.*, 1992). One of these mutants (strain B100-13) presented an insertion in the *xanB* gene, which codes for the bifunctional enzyme PMI-GMP, and is thus analog to the *P. aeruginosa* AlgA enzyme (Köplin *et al.*, 1992).

The alginate biosynthetic pathway from *A. vinelandii* and *P. aeruginosa* are very similar (Chakrabarty, 1991; Pindar and Bucke, 1975). *Azotobacter vinelandii* has been reported to contain DNA sequences homologous to some

P. aeruginosa genes involved in the biosynthesis and regulation of alginate production, such as *algD*, *algA* and *algR* (Fialho *et al.*, 1990). We have previously reported the cloning and characterization of the *A. vinelandii* *algD* gene, showing that it presents important structural and regulatory similarities with the corresponding *P. aeruginosa* gene (Martínez-Salazar *et al.*, submitted-a). We have also reported the existence in *A. vinelandii* of the alternative sigma factor AlgU and its negative regulators MucA and MucB, and the involvement of these proteins in alginate production (Martínez-Salazar *et al.*, submitted-b).

A. vinelandii possesses an alginate lyase activity located in the periplasmic space, which is increased during the exponential phase of growth and during germination (Kennedy *et al.*, 1992). It has also been reported to contain at least four extracellular alginate epimerases which are encoded by genes with no DNA homology with the *P. aeruginosa* epimerase encoded by the gene *algG* (Ertesvag *et al.*, 1994; Ertesvag *et al.*, 1995).

We are interested in the molecular genetic study of alginate biosynthesis in *A. vinelandii*, both for its potential industrial application as for its role in the differentiation process leading to cyst formation. In this paper we report the cloning of the *A. vinelandii* *algA* gene by means of the

complementation of an *X. campestris* pv *campestris xanB*- mutant. We report that *A. vinelandii* has a similar cluster of *alg* genes to *P. aeruginosa*; and that the transcription of the whole *alg* gene cluster seems to be driven from the *algD* promoter, but we show the existence of a second promoter which independently transcribes at least *algL* and *algA* genes and which is regulated in a distinct manner to the *algD* promoter, since it does not depend for its transcription on the alternative sigma factor AlgU.

RESULTS AND DISCUSSION

Cloning of *Azotobacter vinelandii* *algA* gene. In order to clone the *A. vinelandii* *algA* gene coding for the enzyme phosphomannose isomerase-guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase (PMI-GMP) we transferred 1500 cosmid clones of the ATCC 9046 genomic library from *Escherichia coli* S17-1 to *X. campestris* B100-13 (which lacks PMI-GMP activity) and we screened for those cosmids which restored its xanthan production ability. Five different cosmid clones were identified which restored the mucoid phenotype to strain B100-13 (plasmids pMSA51, pMSA55, pMSD75, pMSA151 and pMSD675, Fig. 1), plasmid pMSD675, was previously isolated when *algD* gene was cloned (Martínez-Salazar *et al.*, submitted-a). The complementation of *X. campestris* pv *campestris* B100-13 by *A. vinelandii* DNA, is a strong evidence of the cloning of a functional *algA* gene. Plasmids pMSD675 and pMSA55 were used for more detailed analysis.

In order to determine if the PMI-GMP activity was coded by a gene homologous to the *P. aeruginosa* *algA*, we determined that *P. aeruginosa* *algA* homologous sequences were present on plasmids pMSD675 and pMSA55, we found an 0.9 kb *EcoR*I band which hybridize with *algA* gene (Fig. 2). This band is present in all the cosmids isolated by the

complementation criteria (Fig. 1) suggesting that the *algA* gene homolog to *P. aeruginosa* that has been previously reported (Fialho *et al.*, 1990) is the functional gene encoding the enzyme PMI-GMP.

The fact that *algA* and *algD* genes are closely linked, suggested that a cluster of alginate biosynthetic genes, similar to that described for *P. aeruginosa*, is present on the chromosome of *A. vinelandii* (Chitnis and Ohman, 1993). The presence of *algD* gene on the different cosmids isolated was studied by Southern blot analysis, plasmids pMSA51, pMSA55 and pMSA151 did not contain *algD* gene. In Fig. 2 we show the hybridization of plasmids pMSD675 and pMSA55 with the *P. aeruginosa* *algD* gene.

We have previously reported that plasmid pMSD675 contained the *algD* gene and its promoter sequences (Martínez-Salazar *et al.*, submitted-a), the analysis of this promoting region and the determination of *algD* the mRNA start site, showed that the regulation of *algD* transcription involved many common features with the reported regulation for *P. aeruginosa* *algD* transcription (Schurr *et al.*, 1993; Wozniak and Ohman, 1994) We have also shown the involvement of AlgU, MucA and MucB in *algD* transcription (Martínez-Salazar *et al.*, submitted-b). It has been shown by genetic analysis that *algA* transcription is started from the *algD* promoter in *P. aeruginosa* (Chitnis and Ohman, 1993), but the fact that we have isolated

different cosmid clones which expressed AlgA activity as judged by complementation of *X. campestris* B100-13, but which lack the *algD* gene showed that in these plasmids the transcription of *A. vinelandii* *algA* is independent from the *algD* promoter. However, *algA* transcription from a promoter of the vector pCP13 cannot be excluded.

Identification of *algL* gene linked to *algA* and *algD* genes.

Alginate lyase is an enzyme, coded by *algL* gene, which has been reported to be part of the *alg* operon in *P. aeruginosa* (Boyd *et al.*, 1993; Chitnis and Ohman, 1993; Schiller *et al.*, 1993). An alginate lyase has been reported in *A. vinelandii* (Kennedy *et al.*, 1992), but the gene coding for it has not been identified.

We determined the alginate lyase activity encoded by the five cosmids carrying *A. vinelandii* *algA* gene both on *E. coli* DH5 α and on *X. campestris* pv *campestris* B100-13, and we found that none of these cosmids expressed alginate lyase activity on *E. coli*, while all of them gave a positive result when present on *X. campestris* (Fig. 3 and Table 2). In this way we identified the presence of a gene coding for an alginate lyase closely linked to *algD* and *algA* genes in the chromosome of *A. vinelandii*, we called this gene *algL* by analogy with the *P. aeruginosa* gene present in the *alg* operon.

The fact that *A. vinelandii* *algL* gene is not expressed in *E. coli* suggested that the promoter which control its transcription is not active in this bacteria. The promoters belonging to the plasmid vector pCP13 are active on *E. coli*, so the expression of AlgL on *X. campestris* on cosmids pMSA51, pMSA55 and pMSA151 seemed to be dependent on an *A. vinelandii* promoter different from the *algD* promoter, which is lacking.

P. aeruginosa and *A. vinelandii* alginate lyases are periplasmic enzymes, and the former enzyme has been reported to be active when expressed by *E. coli* (Schiller *et al.*, 1993). A possibility for the lack of *E. coli* expression of *A. vinelandii* alginate lyase is that *algL* is transcribed by *E. coli*, but that the resulting enzyme is inactive. This possibility is not very likely to occur at least in the case of plasmid pMSA55, for a reason which will be presented in the following section.

The lack of alginate lyase expression in *E. coli* of the *algL* gene present in the cosmids described above is another circumstantial evidence for the existence of a promoter transcribing *algA* different from the *algD* promoter, in order to obtain more conclusive evidence for the existence of this promoter we performed the experiments described below.

Isolation of AlgA- mutants on cosmid pMSA55. In order to determine if *algA* gene was part of an operon in *A. vinelandii*, we isolated

mini-Tn5-*lacZ1* insertions on plasmid pMSA55 which were no longer able to complement strain B100-13 for xanthan gum production, and we later determined whether these insertions were located on the *algA* gene, and if not, whether they presented alginate lyase activity.

We were able to isolate eight mini-Tn5-*lacZ1* insertions that were not located on the 0.9 kb *EcoR1* band which hybridize with *P. aeruginosa algA* gene (Fig 3). Three of these insertions (pRSA1, pRSA7 and pRSA8) still presented AlgL activity, while the remaining five insertions besides not complementing strain B100-13 for xanthan gum production, lacked AlgL activity (Table 2). These results strongly suggest that *algA* gene is transcribed from a distant promoter and that *algL* is part of the same operonic structure as *algA*.

In order to determine whether the lack of alginase activity of the *E. coli* derivatives carrying the cosmids containing *A. vinelandii algA* was due to the lack of expression of the promoter transcribing *algL* and *algA*, β -galactosidase expression in *E. coli* of the plasmids pRSA6 and pRSA8 was measured. Both plasmids expressed β -galactosidase activity in the *X. campestris* background and neither of them presented this activity in the *E. coli* cells (Table 2). This result shows that the *algL* and *algA* genes in plasmid pMSA55 are expressed in *X. campestris* from an *A. vinelandii*

promoter, and that this promoter is not active in the *E. coli* genetic background.

Transfer of mutations causing an AlgA⁻ phenotype to the *A. vinelandii* chromosome. In order to determine whether the transcriptional array that we have determined on plasmid pMSA55 on the *X. c. c.* B100-13 genetic background (*algL* transcribed prior to *algA*), was the same in the *A. vinelandii* chromosome, we transferred by transformation two of the AlgA mini-*Tn5-lacZ1* insertions to strain ATCC 9046. The mutations transferred are those in plasmid pRSA6 and plasmid pRSA8, which are located on the 3.5 kb and 1.5 kb bands of plasmid pMSA55, respectively (Fig. 4), and which expressed the β -galactosidase activity encoded in the transposon (Table 2). The resulting strains, RSA6 and RSA8, were non-mucoid (Table 2), these results suggest that the non-mucoid phenotype of these mutants is due to the lack of *algA* expression, and possibly of other genes necessary for alginate production, caused by the mini-*Tn5-lacZ1* insertion. Both mutant strains produced β -galactosidase activity (Table 2), this result shows that the gene which is inactivated by the mini-*Tn5-lacZ1* insertion is being transcribed in the *A. vinelandii* chromosome.

As can be seen in Table 2, strain RSA6 did not presented alginate lyase

activity, this result suggest that there is only one alginase on *A. vinelandii* which is encoded by *algL* gene, an alternative possibility is that more than one alginase are coded on the *alg* chromosomal region and that they are all inactivated by the mutation present in this strain. We are currently subcloning *algL* gene(s) to analyze these possibilities.

As expected, strain RSA8 showed alginate lyase activity (Table 2), but it also presented an unexpected phenotype when grown on the medium to measure alginase (YC medium) which has a low agar concentration, since it spread through the plates as chemotactic *Xanthomonas* do on under starving conditions (Martínez-Salazar *et al.*, 1993).

Taking together, these results strongly suggest that in the *A. vinelandii* chromosome the genes *algL* and *algA* form part of the same operonic structure and that the latter gene is transcribed prior to *algA*.

Evaluation of the polar effect of an *algD* insertion on the expression of *algL* and *algA* genes. Strain RSD1 contains two truncated *algD* genes, one devoid of the 5' end and the other lacking the 3' end of this gene, separated by the cloning vector encoding Apr, and is completely impaired on alginate production (Martínez-Salazar *et al.*, submitted-a; Tables 1 and 2). In order to determine whether the disruption of *algD* gene had a polar effect on the expression of *algL* and *algA* genes,

we transferred the disrupted *algD* gene present on strain RSD1 to plasmid pMSD675, thus constructing plasmid pRSD1 (Fig 5), and then testing *algL* and *algA* expression in *X. campestris* B100-13. As expected, plasmid pRSD1 is not longer able to complement strain RSD1 for alginate production, as does plasmid pMSD675 (Table 2).

As shown in Table 2, the disruption of *algD* gene has none effect on AlgL and AlgA activities when expressed on strain B100-13, AlgL was evaluated by the degradation of alginate on plates and AlgA by the mucoid phenotype of strain B100-13/pRSD1. This clearly shows that, at least in the *X. campestris* background, *algL* and *algA* genes are not exclusively transcribed from the *algD* promoter.

We had previously reported that strain WI12 contained an *algD-lacZ* gene fusion on the 3' end of the gene, and that this strain is not completely impaired on alginate production since it is still able to produce 25% of the alginate produced by the wild type strain (Martínez-Salazar *et al.*, submitted-a). The fact that this *A. vinelandii* strain is still able to produce alginate shows that a mini-Tn5-*lacZ1* insertion in *algD* is not completely polar on *algA* expression as well as on the expression of other genes whose products are essential for alginate biosynthesis. This lack of total polarity on *A. vinelandii* background support the results obtained on

the *X. campestris* pv *campestris* genetic background.

Accordingly to the data presented herein, regarding the lack of polarity of an *algD* insertion on *algL* expression obtained on the *X. campestris* pv *campestris* B100-13 genetic background, we found that the *A. vinelandii* strains RSD1 and WI12 presented alginate lyase activity, but it is also apparent that both strains present a clear reduction on alginate lyase activity (Table 3). The presence of alginate lyase activity in strains RSD1 and WI12 is a strong evidence of the existence in the *A. vinelandii* chromosome of a promoter transcribing *algL*, different from the *algD* promoter. On the other hand, the reduction of alginate lyase activity on the two *algD* insertions strongly suggest that in the *A. vinelandii* genetic background a considerable proportion of *algL* transcription comes from the *algD* promoter.

Alginate lyase activity is considerably increased in strain RSD1 by the presence of plasmids pMSD675 or pRSD1 (Table 3), these increments of alginate lyase activity seem to be due to the increment of functional *algL* copies carried by both plasmids. We have previously reported that plasmid pMSD675 has a positive effect on *algD* transcription (Martínez-Salazar *et al.*, submitted-a), we are currently studying the nature of this transcription increment, and its involvement on the transcription

regulation of the second *alg* promoter described herein.

Evaluation of AlgU role on the transcription of the genes *algL* and *algA*.

We have previously reported that the *A. vinelandii* *algD* promoter is transcribed by the RNA-polymerase containing AlgU sigma factor (Martínez-Salazar *et al.*, submitted-a; Martínez-Salazar *et al.*, submitted-b), and that the *A. vinelandii* strain UW136 presented very low transcription of this promoter, and consequently very low alginate levels, due to the presence of an insertion sequence which inactivates the *algU* gene (Martínez-Salazar *et al.*, submitted-b)

In order to determine whether the promoter transcribing *algA* and *algL* genes was regulated by AlgU in the same way as the *algD* promoter, we measured alginate lyase activity in the presence and absence of a functional AlgU protein, that is, in the ATCC 9046 and UW136 genetic backgrounds. In order to determine only the lyase activity which is transcribed from the second *alg* promoter, we used strains W112 and U5, which are derived from strains ATCC 9046 and UW136 respectively (Table 1), and lack the *algL* transcription driven from the *algD* promoter, due to the *algD-lacZ* fusion. As shown in Table 3, both strains W112 and U5 present the same alginate lyase activity, this alginate lyase activity does not

correlate with the level of *algD* transcription of strains WI12 and U5 since they presented a β -galactosidase activity of 1172 ± 233 and 63 ± 8 units respectively, nor with the amount of alginate produced by the original strains ATCC 9046 and UW136 (Table 3). On the other hand, we have previously shown that the *algD* mRNA level in strain UW136 is so low that the start of *algD* transcript could not be determined in this strain (Martínez-Salazar *et al.*, submitted-b). These results strongly suggest that the level of transcription of the second *alg* promoter described here is not dependent on AlgU activity.

On the near future we will pursue the characterization of the genes involved on alginate biosynthesis present on the identified *A. vinelandii* *alg* gene cluster, localizing the promoter region involved on *algL* and *algA* transcription, and determining whether other genes involved in alginate biosynthesis are transcribed by this promoter.

One of the aims of our research is the study of the role of alginate biosynthesis in the *A. vinelandii* differentiation process leading to cyst formation. In this respect we are analyzing at the ultrastructural level the development of cysts in different strains and in the *alg*-mutants derived from them.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Microbiological Procedures. Bacterial strains and plasmids used in this work are shown on Table 1. *Azotobacter vinelandii* strains were routinely grown on BS medium (Kennedy *et al.*, 1986) at 30°C. *Escherichia coli* strains were grown on LB medium (Miller, 1972) at 37°C. The ability to produce xanthan gum of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* B100-13 was done on BS plates as describe previously (Martínez-Salazar *et al.*, 1993) Antibiotic concentrations in µg/ml, used for *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli* or *Xanthomonas campestris*, respectively, were: ampicillin (Ap) 30 and 200, chloramphenicol 30 and 30, kanamycin (Km) 10 and 60, rifampicin 10 and not used, and tetracycline (Tc) 10 and 30.

Triparental or biparental *A. vinelandii* matings were done as reported previously (Kennedy *et al.*, 1986). *A. vinelandii* transformation was done as reported by Bali *et al* in 1992.

Alginate lyase activity was measured on plates as reported previously (Schiller *et al.*, 1993), it is expressed as mean of the diameter of the halo of alginate hydrolysis after 48 hrs of growth in YC medium, in mm \pm SE. β -galactosidase activity was determined as reported by Miller in 1972, one unit correspond to 1 µM of o-nitrophenyl- β -D-galactoside hydrolyzed per minute and per mg of protein. All measurements were done on triplicate.

Genetic manipulations. The disruption of *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 *algD* gene rendering strain RSD1 has been previously described (Martínez-Salazar *et al.*, submitted-a). Plasmid pRSD1 was constructed by transferring plasmid pMSD675 to strain RSD1, and subculturing on 100 $\mu\text{g/ml}$ of ampicillin. Strain RSD1/pMSD675 is mucoid, but upon the subculture on higher ampicillin concentrations some colonies with a non-mucoid phenotype were isolated, these non-mucoid derivatives were used as donors in a cross with *E. coli* DH5 α , and transconjugants were isolated on Tc, Ap and Nal. The transferred plasmid which carries an interrupted *algD* gene was later tested on *Xanthomonas campestris* pv *campestris* B100-13 for *algA* and *algL* expression.

Alg A⁻ mutants were isolated by selecting mini-Tn5-*lacZ1* insertions on plasmid pMSA55 (Table 1) that were not longer able to complement *Xanthomonas campestris* pv *campestris* B100-13 for xanthan gum production. Kmr^r, Nal^r transconjugants were isolated from the cross between the *E. coli* strains S17-1/ λ pir containing plasmid pUT-mini Tn5 *lacZ* (de Lorenzo *et al.*, 1990) and DH5 α containing plasmid pMSA55 (Table 1), insertions causing an Alg A⁻ phenotype were later identified on *Xanthomonas campestris* pv *campestris* B100-13.

The mini-Tn5-*lacZ*1 insertions from plasmids pRSA6 and pRSA8 were transferred to the *A. vinelandii* chromosome by transformation of strain ATCC 9046 with the linearized plasmids and selecting the Kmr transformants.

Total DNA library construction. Total genomic DNA from *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 was partially digested with *Sau3A* and ligated to the Tcr cosmid vector pCP13 (Darzins and Chakrabarty, 1984) digested with *Bam*H1. Cosmid were packaged onto λ heads and transfected as described previously (Maniatis *et al.*, 1989). About 5000 clones were obtained, which represent at least 10 times the size of the bacterial genome (Martínez-Salazar *et al.*, submitted).

Nucleic acid procedures. DNA isolation and cloning, Southern blotting and nick translation procedures were carried out as described previously (Maniatis *et al.*, 1989). The *Pseudomonas aeruginosa* *algA* and *algD* gene fragments used as probe in this work were described previously (Fialho *et al.*, 1990), and were kindly provided by A. M. Chakrabarty from the University of Illinois at Chicago.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rosalba Sánchez for her technical assistance.

REFERENCES

1. Bali, A., Blanco, G., Hill, S., and Kennedy, C. 1992. Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1711-1718.
2. Boyd, A., Gosh, M., May, T. B., Shinabarger, D., Keogh, R., and Chakrabarty, A. M. 1993. Sequence of the *algL* gene of *Pseudomonas aeruginosa* and purification of its alginate lyase product. *Gene* **131**: 1-8.
3. Chakrabarty, A. M. 1991. Molecular genetics and environmental regulation of alginate biosynthesis. *Appl. Phycology*. **8**: 1-6.
4. Chitnis, C. E., and Ohman, D. E. 1993. Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure. *Mol. Microbiol.* **8**: 583-590.
5. Chu, L., May, T. B., Chakrabarty, A. M. and Misra, T. K. (1991). Nucleotide sequence and expression of the *algE* gene involved in alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **107**: 1-10.
6. Darzins, A., and Chakrabarty, A. M. 1984. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **159**: 9-18.
7. Darzins, A., Wang, S-K, Vanags, R. I. and Chakrabarty A. M. 1985. Clustering of mutations affecting alginic acid biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **164**: 516-524.
8. Darzins, A., Frantz, B., Vanags, R. I., and Chakrabarty, A. M. 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.
9. de Lorenzo, V., and Timmis, K. N. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with *Tn5*- and *Tn10*-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**: 386-405.
10. Deretic, V., Dikshit, R., Konyecsni, W. M., Chakrabarty, A. M., and Misra, T. K. 1989. The *algR* gene which regulates mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, belongs to a class of environmentally responsive genes. *J. Bacteriol.* **171**: 1278-1283.
11. Deretic, V., Govan, J. R. W., Konyecsni, W. M., and Martin, D. W. 1990. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: mutations in the *muc* loci affect transcription of the *algR* and *algD* genes in response to environmental stimuli. *Mol. Microbiol.* **42**: 189-196.
12. Deretic, V., Martin, D. W., Schurr, M. J., Müdd, M. H., Hibler, N. S. Curcic, R., and Boucher, J. C. 1993. Conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bio/Technol.* **11**: 1133-1136.
13. Deretic, V., Schurr, M. J., Boucher, J. C., and Martin, D. W. 1994.

- Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J. Bacteriol.* **176**: 2773-2780.
14. Ertesvag, H., Doseth, B., Larsen, B., Skjak-Braek, G., and Valla S. (1994) Cloning and expression of an *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5 epimerase. *J. Bacteriol.* **176**:2846-2853.
 15. Ertesvag, H., Høidal, H. K., Hals, I. K., Rian, A. Doseth, B. and Valla, S. (1995) A family of modular type mannuronan C-5-epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Microbiol.* **16**: 719-731.
 16. Fialho, A. M., Zielinski, N. A., Fett, W. F., Chakrabarty, A. M., and Berry, A.. 1990. Distribution of the alginate gene sequences in the *Pseudomonas* rRNA homology group I-Azomonas-Azotobacter lineage of superfamily B procaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 436-443.
 17. Fyfe, J. A. M., and Govan, J. R. W. 1980. Alginate synthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*: a locus involved in control. *J. Gen. Microbiol.* **119**: 443-450.
 18. Gill, J. F., Deretic, V., and Chakrabarty, A. M. 1986. Overproduction and assay of *Pseudomonas aeruginosa* phosphomannose isomerase. *J. Bacteriol.* **167**: 611-615.
 19. Goldberg, J. B., and Ohman, D. E.. 1987. Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* *algB* mutants: role of *algB* in high-level production of alginate. *J. Bacteriol* **169**:1593-1602.
 20. Kennedy C., Gamal, R., Humphrey, R., Ramos, J., Brigle, K., and Dean, D. 1986. The *nifH*, *NifM* and *NifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: characterization by *Tn5* mutagenesis and isolation from pLAFR1 gene banks. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 318-325.
 21. Kennedy C., Gamal, R., Humphrey, R., Ramos, J., Brigle, K., and Dean, D. 1986. The *nifH*, *NifM* and *NifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: characterization by *Tn5* mutagenesis and isolation from pLAFR1 gene banks. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 318-325.
 22. Kennedy, C., and Toukdarian, A. 1987. Genetics of Azotobacters: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 227-258.
 23. Kennedy, L., McDowell, K., and Sutherland, I. W. 1992. Alginases from *Azotobacter* species. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2465-2471.
 24. Knutson C.A., and Jeans, A. 1968. A new modification of the carbazole reaction: application to heteropolysaccharides. *Anal. Biochem.* **24**: 470-481.
 25. Köplin, R., Arnold, W. Hötte, B., Simon, R., Wang, G., and Pühler, A. 1992

- Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the *xanA* and *xanB* genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. *J. Bacteriol.* 174:191-194.
26. Maldonado, R., Jiménez, J., and Casadesus, J.. 1994. Changes in ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *J. Bacteriol.* 176: 3911-3919.
27. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
28. Manna A. C., and Das, H. K. 1993. Determination of the size of the *Azotobacter vinelandii* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 241: 719-722.
29. Martin D. W., Schurr, M. J., Yu, H., and Deretic, V. 1994. Analysis of promoters controlled by the putative sigma factor Alg U regulating conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: relation to σ^E an stress response. *J. Bacteriol.* 176: 6688-6696.
30. Martínez-Salazar, J., Palacios, A. N. Sánchez, R., Caro, A. D., and Soberón-Chávez, G. 1993. Genetic stability and xanthan gum production in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* NRRL B1459. *Mol. Microbiol.* 8: 1053-1061.
31. Martínez-Salazar, J., Campos, M. E., Moreno, S., Guzmán, J., Lloret, L., Espín, G., and Soberón-Chávez, G. Cloning and characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, submitted-a.
32. Martínez-Salazar, J., Moreno, S., Najera, R., Boucher, C., Espín, G., Soberón-Chávez, G. and Deretic, V. Cloning and 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 role in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.*, submitted-b.
33. May, T. B. and Chakrabarty, A. M. 1994. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends Microbiol.* 2: 151-157.
34. Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 431-435.
35. Murata, K., Inose, T., Hisano, T., Abe, S., Yonemoto, Y., Yamashita, T., Takagi, M., Sakaguchi, K., Kimura, A., and Imanaka, T. 1993. Bacterial alginate lyase: enzymology, genetics and application. *J. Ferment. Bioeng.* 76: 427-437.
36. Nagpal, P., Reddy, M. A., and Das, H. K. 1989. Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 171: 3133-3138.
37. Page, W., and Sadoff, H. L. 1975. Relationship between calcium and

- uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **122**: 145-151.
38. Pindar D. F., and Bucke, C. 1975. The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* **152**: 617-622.
39. Schiller, N. L., Monday, S. R., Boyd, C. M., Keen, N. T., and Ohman, D. E. 1993. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase gene (*algL*): cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 4780-4789.
40. Schurr, M. J., Martin, D. W., Mudd, M. H., Hibler, N. S., Boucher, J. C., and Deretic, V. 1993. The *algD* promoter: regulation of alginate production by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cell. Mol. Biol. Res.* **39**: 371-376.
41. Schurr, M. J., Martin, D. W., Mudd, M. H., and Deretic, V.. 1994. Gene cluster controlling conversion to alginate -overproducing phenotype in *Pseudomonas aeruginosa*: a functional analysis in a heterologous host and role in the instability of mucoidy. *J. Bacteriol.* **176**: 3375-3382.
42. Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technol.* **1**: 784-791.
43. Sutherland, I. W. 1985. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**: 243-270.
44. Sutherland, I. W. 1990. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge studies in biotechnology 9. Cambridge University Press.
45. 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.
46. Wyss, O., Neumann, G. M., and Scolofsky, M. D. 1961. Development and germination of the *Azotobacter* cyst. *J. Bioph. and Biochem. Cyt.* **10**: 555-565.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this work.

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
ATCC 9046	<i>muc-1</i> , highly mucoid	Martínez-Sal submitted-b
RSD1	<i>algD</i> - mutant derived from ATCC 9046, non mucoid, Apr.	Martínez-Sal submitted-a
WI12	<i>algD-lacZ</i> gene fusion in strain ATCC 9046	Martínez-Sal submitted-a
RSA6	Mini- <i>Tn5-lacZ1</i> insertion in ATCC 9046 <i>alg</i> chromosomal region, non mucoid, AlgL-	This work
RSA8	Mini- <i>Tn5-lacZ1</i> insertion in ATCC 9046 <i>alg</i> chromosomal region, non mucoid, AlgL+	This work
UW136	<i>algU</i> - non-mucoid, Rif ^r	Martínez-Sal submitted-b
U5	<i>algD-lacZ</i> gene fusion in strain UW136	Martínez-Sal submitted-a
<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i>		
B100-13	<i>xanB</i> - mutant, non mucoid, Str ^r , Km ^r	Köplin, 1992

Escherichia coli

S17-1	Able to mobilize plasmids by means of an RP4 derivative inserted in its chromosome	Simon, 1983
S17-1(λ pir)	Same as S17-1, but expressing λ pir protein, able to replicate pUT plasmids	de Lorenzo, 1994
DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1 endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA 1</i>	Stratagene

Plasmids

pCP13	RK2 derived cosmid vector, Tcr	Darzins, 1984
pUT Mini-	Suicide vector for mutagenesis with mini-	de Lorenzo, 1994
Tn5- <i>lacZ1</i>	Tn5- <i>lacZ1</i> , only able to replicate on strains expressing λ pir protein, Kmr.	
pMSD675	Cosmid containing 25 kb of <i>A. vinelandii</i> DNA including <i>algD</i> , <i>algL</i> and <i>algA</i> genes.	Martínez-Sal submitted-a
pRSD1	pMSD675 carrying a disrupted <i>algD</i> gene, Apr, Tcr	This work
pMSD75	Cosmid containing 28 kb of <i>A. vinelandii</i> DNA, <i>algD</i> , <i>algL</i> and <i>algA</i> genes, Tcr, Kmr	This work
pMSA51	Cosmid containing 23 kb of <i>A. vinelandii</i> DNA including <i>algL</i> and <i>algA</i> genes, Tcr, Kmr.	This work

pMSA155 Cosmid containing 23 kb of *A. vinelandii* This work
DNA including *algL* and *algA* genes, Tcr

pMSA55 Cosmid containing 20 kb of *A. vinelandii* This work
D N A including *algL* and *algA* genes,
Tcr.

pRSAn Mini-*Tn5 lacZ* insertion on plasmid pMSA55 This work
causing an Alg A- phenotype, Tcr, Kmr

TABLE 2. Mucoïd phenotype, alginate lyase and β -galactosidase activities.

STRAIN	MUCOIDY	ALGINASE	β -GALACTOSIDASE ^a
<i>Azotobacter vinelandii</i>			
ATCC 9046	+	+	*
RSA6	-	-	+
RSA8	-	+	+
<i>Xanthomonas campestris</i>			
B100-13	-	-	*
B100-13/pMSD675	+	+	*
B100-13/pRSD1	+	+	*
B100-13/pMSA55	+	+	*
B100-13/pRSA1	-	+	-
B100-13/pRSA2	-	-	-
B100-13/pRSA3	-	-	-
B100-13/pRSA4	-	-	-
B100-13/pRSA5	-	-	-
B100-13/pRSA6	-	-	+
B100-13/pRSA7	-	+/-	+
B100-13/pRSA8	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>			

DH5 α	-	-	*
DH5 α /pMSA55	-	-	*
DH5 α /pRSA6	-	-	-
DH5 α /pRSA8	-	-	-

^a β -galactosidase activity represent the transcription of the *lacZ* gene of the mini-*Tn5-lacZ1* from an *A. vinelandii* promoter.

* Strains which lack the *lacZ* gene.

Table 3. Alginate lyase activity of different *Azotobacter vinelandii* strains.

Strain	Genotype	Mucoidy	Alginase ^a
ATCC 9046	<i>muc-1</i>	++++	11.3 ± 0.5
RSD1	<i>muc-1, algD-</i>	-	7.0 ± 0.8
RSD1/pMSD675	<i>muc-1, algD-/algD+</i>	++++	13.2 ± 0.3
RSD1/pRSD1	<i>muc-1, algD-/algD</i>	-	13.5 ± 0.2
WI 12	<i>muc-1, algD-lacZ</i>	+	5.9 ± 0.6
UW136	<i>algU-</i>	-	6.1 ± 0
U5	<i>algU-, algD-lacZ</i>	-	6.0 ± 0

^a alginate lyase activity is expressed as mean of the diameter of the halo of alginate hydrolisis after 48 hrs of growth in YC medium, in mm ± SE

FIGURE LEGENDS

Figure 1. A) Gel electrophoretic pattern of different cosmid DNA containing *algA* gene and digested with *EcoR1* endonuclease. Lanes correspond to the following DNA samples: 1) λ DNA digested with *HindIII* endonuclease, 2) pMSA51, 3) pMSA55, 4) pMSD675, 5) pMSD75, 6) pMSA151 B) Mucoid phenotype of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* B100-13 without (shown by an arrow) and with the plasmids whose restriction pattern is shown on panel A (the same numbers are used on panels A and B to designate the plasmids).

Figure 2. Southern blot analysis of plasmids pMSD675 and pMSA55, restricted with *EcoR1* endonuclease (A) using *Pseudomonas aeruginosa* *algA* (B) and *algD* (C) genes as probe. Lanes correspond to: 1) λ DNA digested with *HindIII* endonuclease, 2) pMSD675 and 3) pMSA55. The migration of DNA fragments of known size is shown.

Figure 3. Alginate lyase activity of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* B100-13 (1, and upper row) and *Escherichia coli* DH5 α (7 and lower row) with plasmids: pMSA51 (2 and 8), pMSA55 (3 and 9), pMSD75 (4 and 10), pMSD675 and (5 and 11) pMSA151 (6 and 12).

Figure 4. Gel electrophoretic pattern of plasmid DNA restricted with *EcoR1* endonuclease. Lanes correspond to 1) pMSA55, 2) pRSA6 and 3)

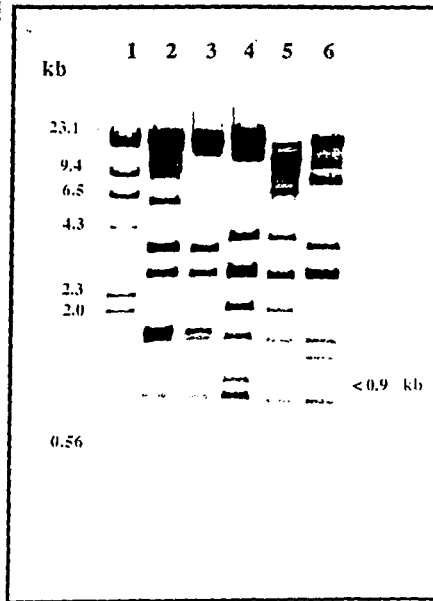
pRSA8.

Figure 5. A) Schematic representation of the construction of plasmid pRSD1 (pMSD675 derivative with disrupted *algD* gene). B) Gel electrophoretic pattern of cosmid DNA restricted with *Pst*I endonuclease. Lanes correspond to 1) λ DNA digested with *Hind*III endonuclease, 2) pMSD675 and 3) pRSD1.

Figure 6. Schematic representation of the *Azotobacter vinelandii* *alg* chromosomal region, showing the presence of the two identified promoters.

figura 1

(A)



(B)

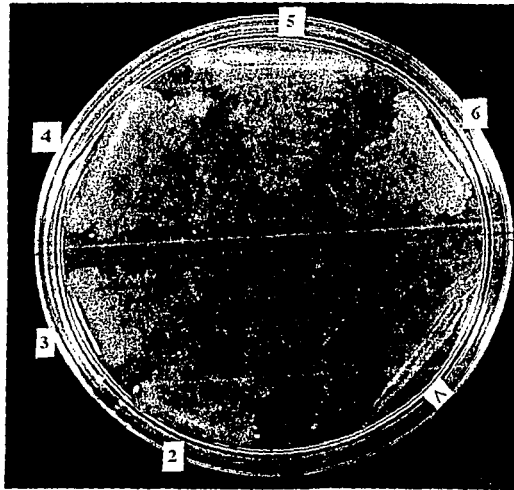


figura 2

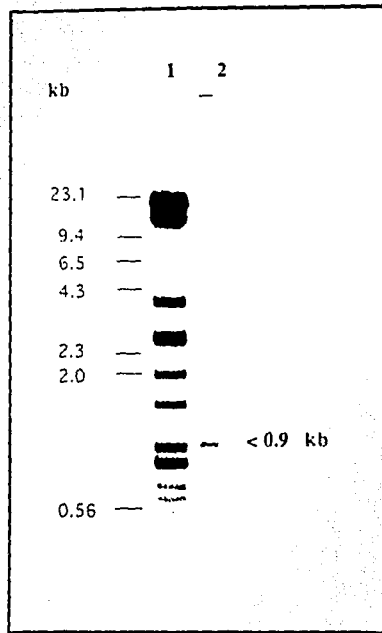


figura 3

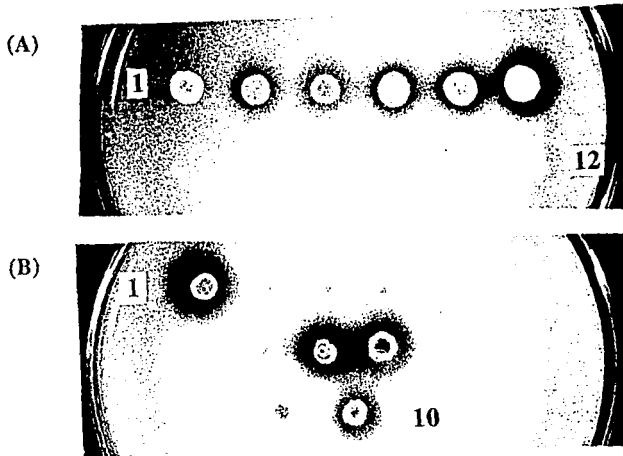
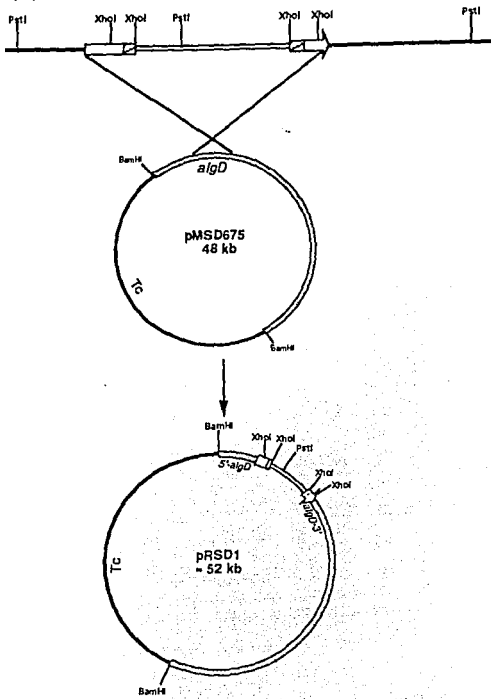


figura 4

(A)



(B)

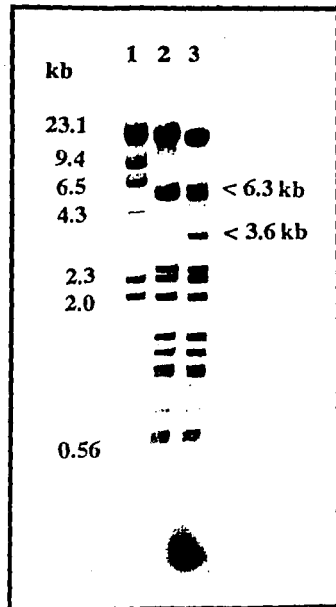
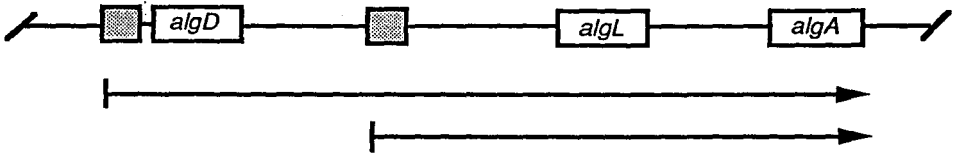


figura 5



figura 6



A continuación se especifica mi participación en el manuscrito anterior.

El pMSD675 contiene un inserto de 25 kb que incluye a los genes *algD* y *algA* de *A. vinelandii*. Para identificar al gen *algL* en la región *algD*-*algA* se evaluó la actividad de liasa de ese plásmido en *X. campestris* B100-13 (figura 5).

Para evaluar la polaridad de *algD* sobre *algL* y *algA* se construyó el plásmido pRSD1. Este plásmido fue generado por un evento de homogenización del pMSD675 a partir del cromosoma de la cepa RSD1 mediante un evento de recombinación sencilla, en el cual se integró el pMSDX7, por lo tanto, el pRSD1 tiene interrumpido al gen *algD* (figura 4a). Para verificar la integración del pMSDX7 en pMSD675 se obtuvo el patrón de restricción del pRSD1 con *PstI*. El pMSD675 gana un fragmento *PstI* de 3.6 kb y el fragmento *PstI* de 6.0 gana 300 pb, lo cual, corresponde a la integración del pMSDX7 en el pMSD675 (figura 4b).

El pRSD1 contiene la región *algDA* pero con una interrupción a nivel de *algD*, utilizando este plásmido, se determinó la polaridad de *algD* sobre la expresión de *algL* y de *algA*. La polaridad de *algD* sobre *algL* se evaluó en las cepas RSD1 y B100-13 con el pRSD1 mediante fenotipo de liasa y la polaridad de *algD* sobre *algA* se evaluó en la B100-13 con la complementación en *trans* del gen *xanB* para mucoidía.

La expresión de *algL* se evaluó con el fenotipo de actividad de liasa en las cepas ATCC 9046, RSD1, RSD1/pMSD675, RSD1/pRSD1, B100-13/pRSD1 y B100-13/pMSD675 con el fin de comparar el tamaño de los halos de actividad cuando *algD* se encuentra en estado silvestre o interrumpido (figura 5).

La polaridad de *algD* sobre *algA* se evaluó por la complementación del fenotipo mucoide de *X. campestris* B100-13 (no mucoide) con el pRSD1. El pRSD1 se transfirió a la B100-13 y las transconjugantes presentaron un fenotipo mucoide como el que presenta esa misma cepa con el pMSD675 que porta el gen *algA* de *A. vinelandii* (figura VI).

Capítulo III

Resultados adicionales

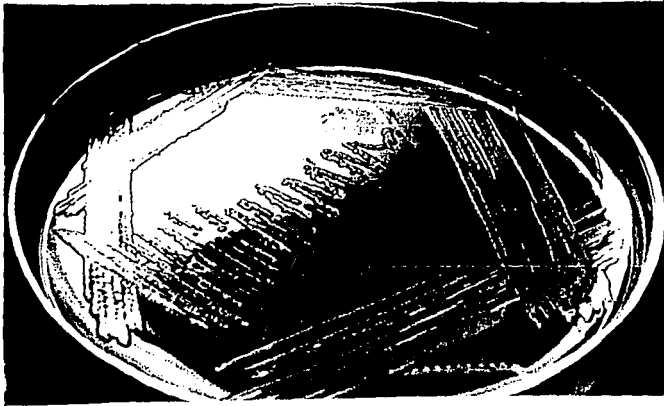
a) Cuantificación de alginato de la ATCC 9046, RSD1, RSD1/pRSD1.

La cantidad de alginato producida por las cepas ATCC 9046, RSD1 y RSD1/pRSD1 se midió a partir de cultivo en placa por el método de determinación de heteropolisacáridos reportado por Knuson et. al.(24).

La ATCC 9046 fue considerada como el punto de comparación con respecto a las demás cepas de *A. vinelandii* derivadas de ella (tabla I).

Ambas cepas derivadas de la ATCC 9046, la RSD1 y la RSD1/pRSD1 producen 1.21% y 1.89% de alginato con respecto a la parental respectivamente (tabla I). La producción de alginato en estas dos cepas que tienen interrumpido al gen *algD* se ve reducida significativamente, más de un 98%, sugiriendo que este gen es indispensable para la biosíntesis de alginato. La pequeña cantidad de alginato coincide con la aparición de parches de mucoidía en ambas cepas, los cuales son más frecuentes en la RSD1/pRSD1 (figura Vc), y se atribuye a la reversión a la condición original que permite tener nuevamente funcional al gen *algD* y por lo tanto la capacidad de sintetizar alginato.

(a)



(b)

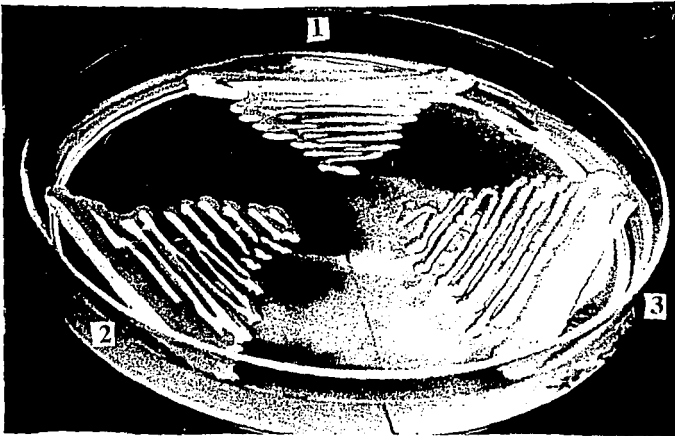


Figura VI. Complementación de la mucoidía de *X. campestris* B100-13. X. (a) *campestris* B100-13 en PY, (b.1) B100-13/pMSD675 en PY Tc25, (b.2) B100-13/pRSD1 proveniente de *A. vinelandii* en PY Ap100Tc15. (b.3) B100-13/pRSD1 proveniente de DH5 α en PY Ap100Tc15.

b) Reversión a la mucoidía de las cepas RSD1 y RSD1/pRSD1.

Tanto la RSD1 como a la RSD1/pRSD1 presentan reversión a la mucoidía aunque la RSD1 en una frecuencia mucho menor que la RSD1 que porta al pRSD1.

A las cepas RSD1 y RSD1/pRSD1 se les midió el porcentaje de reversión a la mucoidía. A partir de un cultivo de 48 hrs. en medio BS Ap30 y Ap30 y Tc15 respectivamente para la RSD1 y RSD1/pRSD1 se hicieron diluciones para obtener colonias aisladas y se determinó el porcentaje de colonias que revirtieran al fenotipo mucoso (tabla II).

Ambas cepas presentaron reversión a la mucoidía aunque la RSD1 a una frecuencia mucho menor que la RSD1 que porta al pRSD1. La aparición de colonias mucosoides en la RSD1 fue hasta el 7o. día y solamente en un 1.2%. La reversión de la RSD1/pRSD1 al 2o. día fue de 0.66% de colonias mucosoides y al tercer día llegó a ser el 3.50%, alcanzando el 75% al 4to día. La aparición de los parches de mucoidía se debe a que las células revertantes pueden crecer como satélites de las resistentes.

La mayor frecuencia de reversión de la RSD1/pRSD1 se debe a que la presencia del pRSD1 permite la posibilidad de que existan células que conserven el pMSDX7 ya sea en cromosoma o en el plásmido integrado y por lo tanto que sean Ap resistentes y al mismo tiempo que hayan rearrreglado la región de *algD* en cromosoma o en plásmido y por lo tanto ser también capaces de producir alginato. La aparición de la mucoidía es más notable cuando la RSD1/pRSD1 es estriada en medio sólido (fig. Vd), esto probablemente se debe a que en la estria existen células vecinas próximas que degradan la Ap y permiten el crecimiento de células hijas no revertantes que hayan perdido la resistencia a Ap.

CEPA	\bar{X}	S.D.	% CON RESPECTO A LA ATCC9046
ATCC9046	85.91	7.13	100.00
RSD1	1.043	0.37	1.21
RSD1/PRSD1	1.63	0.19	1.89

Tabla 1. Cuantificación de alginato producido por las cepas de *A. vinelandii* ATCC 9046, RSD1 y RSD1/pRSD1 mediante determinación espectrofotométrica de heteropolisacáridos a partir de cultivo en placa de 48 hr a 30 °C. La cantidad de alginato producida es expresada en μg de alginato por de por mg de peso celular húmedo.

CEPA	RSD1		RSD1/PRSD1	
	% DE COLONIAS NO MUCOIDES	% DE COLONIAS MUCOIDES	% DE COLONIAS NO MUCOIDES	% DE COLONIAS MUCOIDES
DÍAS DE INCUBACION				
2	100.0	0.0	99.34	0.66
3	100.0	0.0	96.50	3.50
4	100.0	0.0	25.00	75.00
5	100.0	0.0	25.00	75.00
6	100.0	0.0	25.00	75.00
7	98.8	1.2	25.00	75.00

Tabla II. Reversión a la mucoidía de las cepas RSD1 y RSD1/pRSD1

A partir de un cultivo de ambas cepas en medio BS Ap30 y Ap30, Tc15 respectivamente durante 48 hr a 30°C y 250 rpm se obtuvieron colonias aisladas en caja con el mismo medio. La aparición de colonias mucoides se expresa en porcentaje en función del tiempo.

Discusión

La GDP-manosa deshidrogenasa, codificada por el gen *algD*, es la enzima determinante en la ruta de biosíntesis de alginato pues es la que dirige a la GDP-manosa hacia la biosíntesis de alginato (33). El fenotipo no mucoso de la cepa RSD1 (figura V), la cual tiene interrumpido al *algD*, muestra que en *A. vinelandii* esta enzima tiene un papel fundamental en la biosíntesis de alginato.

La aparición poco frecuente de pequeñas zonas mucoides que posee esta cepa se atribuye a un evento de reversión y no a la capacidad de esta cepa para producir alginato (figura Vb; tabla II). La reversión a la mucoidía se presenta en la RSD1/pRSD1 con mayor frecuencia (tabla II, figura Vc) y esto se debe a que la presencia del plásmido aumenta la posibilidad de que existan células heterocigotas que conserven la resistencia a Ap y que hayan rearrreglado el gen *algD* y por lo tanto, puedan crecer en presencia de Ap y ser capaces de producir alginato al mismo tiempo. La reversión a la mucoidía se refleja en la capacidad de las cepas RSD1 y RSD1/pRSD1 de producir alginato aunque en mucho menor cantidad que la cepa parental (tablas I y II).

Se ha probado en *P. aeruginosa* que la transcripción de *algA* se inicia desde el promotor de *algD* ya que inserciones de transposón en diferentes lugares en la región *algDA* hacen incapaz a esta cepa de producir alginato (4). El pMSD675 contiene los genes *algD* y *algA* de *A. vinelandii* que corresponden a los extremos del operón de genes de biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa* (figura I). Este plásmido es capaz de complementar mutaciones en el gen *xanB* de *X. campestris* B100-13 y hacer a esta cepa producir goma xantana (figura VI b.1). Cuando la B100-13 contiene al pRSD1 que es el plásmido derivado del pMSD675 con *algD* interrumpido (figura 4), también se vuelve mucoso (figura VI). Lo mismo sucede cuando se complementa con los plásmidos pMSA que contienen

algA pero que no contienen *algD* (figura 1). Esto sugiere que a diferencia de *P. aeruginosa*, la transcripción del gen *algA* en *A. vinelandii* no depende exclusivamente del promotor de *algD*.

El gen *algL* de *P. aeruginosa* se encuentra formando parte del operón de genes de biosíntesis entre *algD* y *algA* (33). La B100-13 con el pMSD675 además de complementar la mucoidía, expresa la actividad de AlgL, lo cual significa que *algL* también se encuentra dentro de la región *algDA* de *A. vinelandii*. La actividad de liasa también se observa en la B100-13 que contiene al pRSD1, el cual tiene interrumpido a *algD* y en las clonas pMSA que tienen *algA* pero que no tienen a *algD* (figuras 3a y 5, tabla 1). Esto sugiere que *algL* también puede ser transcrito por otro promotor distinto al de *algD*, sin embargo, los halos de actividad de liasa en las cepas de *A. vinelandii* RSD1 y WI12 derivadas de la ATCC 9046, las cuales tienen interrumpido al gen *algD* en el cromosoma, son considerablemente más pequeños que el que se observa en la parental (figura 5) lo cual sugiere que una proporción considerable de la transcripción de *algL* proviene del promotor de *algD*.

Tres de las inserciones generadas en el pMSA55 presentan actividad de liasa mientras que las cinco restantes además de no complementar a la B100-13 para su capacidad de producir goma xantana, carecen de actividad de liasa (figura 3 y tabla 2). Esto sugiere que *algL* se encuentra antes de *algA*.

El hecho de que inserciones generadas en el pMSA55 evitan la actividad tanto de AlgL como de AlgA, sugiere que *algA* además de ser transcrito por el promotor de *algD*, se transcribe a partir de otro promotor y *algL* forma parte de la misma estructura operónica que *algA* (figura 6).

La actividad de AlgL persiste en la RSD1 aunque el halo de actividad se reduce notablemente en comparación con la cepa parental (figura 5) lo cual sugiere que *algL* puede transcribirse a partir del promotor de *algD* .

Cuando la cepa RSD1 se complementa con el pMSD675, el halo de actividad de liasa se recupera y llega a ser más grande que el de la cepa parental (figura 5). Esto puede ser debido al incremento de copias de *algL* que porta este plásmido. Otra posibilidad es que exista un regulador positivo dentro de la región *algDA* de la transcripción de *algD* contenido en el pMSD675 o bien que ocurra una titulación de represor, es decir, que no sea suficiente la cantidad de represor para disminuir la expresión de *algL* (31).

La RSD1 con el pRSD1 también incrementa el tamaño del halo de manera similar al que presenta esta misma cepa con el pMSD675 a pesar de tener interrumpido al gen *algD* y esto apoya la idea de que *algL* puede ser transcrito a partir de otro promotor además del de *algD* .

Por lo anterior, se propone el modelo de la figura 6 en el que los genes de biosíntesis de alginato de la región *algDA* de *A. vinelandii* , a diferencia de *P. aeruginosa*, no se encuentran agrupados en un solo operón. En *A. vinelandii* existe un segundo promotor dentro de la región *algDA* a partir del cual también se transcriben los genes *algL* y *algA*.

Conclusiones

- El gen *algD* es indispensable para la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*.
- Los genes *algD*, *algL* y *algA* de *A. vinelandii* se encuentran agrupados en la misma región.
- *algA* puede ser transcrito a partir de un promotor distinto al de *algD*.
- *algL* se encuentra entre *algD* y *algA*.
- *algL* forma parte de la misma estructura operónica que *algA*.
- La transcripción de *algL* puede provenir del promotor de *algD* y de un segundo promotor.
- Dentro de la región *algDA* de *A. vinelandii* existe un segundo promotor

Bibliografía

La bibliografía consultada para el presente trabajo se encuentra contenida en el manuscrito "Transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters" (capítulo II).