



03072  
2  
287

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FALLA DE ORIGEN**

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**ESTUDIO DE LA REGULACION  
TRANSCRIPCIONAL DEL  
GENE *algD* EN *Azotobacter vinelandii*.**

**Tesis que para obtener el grado de  
Maestría en Biotecnología  
presenta:**

**IBQ. MARIA EUGENIA CAMPOS TORRES**



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.

## AGRADECIMIENTOS:

A los Doctores Gloria Soberón Chavez y Jaime Martinez Salazar por la experiencia brindada y la asesoría directa en la realización de este proyecto de maestría.

Al Dr. Jaime Martínez Salazar por todos sus valiosos conocimientos, discusiones y sugerencias durante la realización de este trabajo. Además por su valiosa revisión de la presente tesis.

A mis amigas y compañeras de proyecto Lourdes Lloret y Rita Barreto por su apoyo y amistad.

A mis compañeros de laboratorio por su valiosa colaboración y amistad.

A mi esposo Gabriel mi gratitud por su gran apoyo y comprensión.

A mi madrina Beatriz Toledo por haberme impulsado a seguir adelante.

A los miembros del comité tutorial por sus valiosos conocimientos y aportaciones.

### Comité Tutorial:

Dra. Gloria Soberón Chávez

Dr. Jaime Martínez Salazar

Dra. Guadalupe Espín Ocampo

Dra. Alejandra Covarrubias Robles

A los miembros del jurado de examen por la valiosa revisión y sugerencias en el presente trabajo.

### Jurado de Examen:

Presidente	Dra. Gloria Soberón Chávez
Vocal	Dra. Carmen Gómez Eichelmann
Secretario	Dr. José Luis Puente García
Suplente	Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo
Suplente	Dr. Enrique Merino Pérez

**A mis padres Ma. de la Luz y Carlos Antonio,  
a mis hermanos Maguis, Marco Antonio, Rudy,  
Rolando y Alejandro con infinito cariño.**

**A mi esposo Gabriel con todo mi amor.**

# I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
A) Generalidades	2
B) Ruta biosintética de alginato	3
C) Regulación de la mucoidía en <i>P. aeruginosa</i>	7
D) Regulación del gene <i>algD</i> en <i>P. aeruginosa</i>	8
ANTECEDENTES	11
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y METODOS	13
RESULTADOS	13
A) Construcción de la fusión transcripcional <i>algD-lacZ</i> en el cromosoma de tres cepas de <i>A. vinelandii</i> con diferente fenotipo mucoide.	13
B) "Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase ( <i>algD</i> ) from <i>Azotobacter vinelandii</i> ".	18
C) Efecto de la temperatura sobre la expresión del gene <i>algD</i> en la cepa A2/pMSD675.	60
D) Efecto del incremento en la concentración de kanamicina sobre la expresión del gene <i>algD</i> en las cepas WI 12 y WI 12 / pMSD675.	61
DISCUSION	63
CONCLUSIONES	68
PERSPECTIVAS	69
BIBLIOGRAFIA	70

## RESUMEN

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria Gram negativa de vida libre capaz de producir alginato de manera extracelular y como constituyente de estructuras resistentes a la desecación. El gene *algD* de *A. vinelandii* fue clonado en base a su homología con el gene *algD* de *Pseudomonas aeruginosa*. En *P. aeruginosa* *algD* codifica la enzima GDP-manosa deshidrogenasa, esencial en la biosíntesis de alginato. La expresión del gene *algD* es controlada por varios elementos regulatorios como: (a) AlgU, factor sigma alternativo de estrés por calor y oxidativo; (b) AlgR, regulador positivo y posible histidin-quinasa de respuesta a estímulos ambientales; (c) AlgB, regulador positivo y al igual que AlgR pertenece a la clase de reguladores de dos componentes; (d) AlgP proteína de la familia IHF que afecta la estructura del nucleóide.

Con el objeto de estudiar la regulación de *algD* de *A. vinelandii*, se construyó una fusión transcripcional *algD-lacZ* en tres cepas de *A. vinelandii* con diferente fenotipo mucoide. Las cepas fueron construidas, reemplazando el gene silvestre por la fusión *algD-lacZ* localizada en un plásmido, mediante un evento de doble recombinación. La expresión del gene *algD* determinada como actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa reveló una estricta correlación entre la expresión del gene *algD* y la producción de alginato (fenotipo mucoide). Para conocer la correlación que existe entre la actividad de *algD* y la producción de alginato en diferentes condiciones ambientales, el plásmido pMSD675 que contiene una región de aproximadamente 25 kb de *A. vinelandii* con los genes *algD*, *algL* y *algA* y posiblemente otros genes biosintéticos, fue introducido en las cepas *algD-lacZ* de *A. vinelandii*. Se analizó el efecto de la osmolaridad, de las diferentes fuentes de nitrógeno NH<sub>4</sub> y nitrato y de la temperatura sobre la transcripción del gene *algD*. Aunque se mantiene la correlación entre la transcripción del gene *algD* y la producción de alginato, la regulación de la expresión genética en las condiciones estudiadas fue diferente en cada cepa. Estos resultados son similares a los previamente reportados en *P. aeruginosa*, en donde la regulación de *algD* es diferente en cada cepa y dependiente de una mutación regulatoria localizada en otra región.

## INTRODUCCION

### A) Generalidades

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria Gram-negativa de vida libre, que posee varias características que le permiten ser un sistema de interés biológico, las cuales son: (a) capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones aeróbicas, por la presencia de tres nitrogenasas que funcionan en diferentes condiciones de oxigenación (Kennedy, *et al.* 1987), (b) una actividad respiratoria alta, que se genera por el alto contenido de proteínas óxido-reductoras y citocromos, (c) una habilidad para adquirir DNA circular o lineal por medio de conjugación o transformación, este microorganismo tiene un sistema natural de transformación, (d) una capacidad recombinogénica que le permite incorporar DNA en su cromosoma, e) en algunas fases de su crecimiento presenta múltiples copias de su cromosoma (Nagpal, *et al.* 1989; Maldonado, *et al.* 1994), (f) capacidad de producir alginato extracelular y (g) un proceso de diferenciación o enquistamiento bajo condiciones ambientales adversas. Este proceso le permite la formación de estructuras resistentes a la desecación denominadas quistes, las cuales en su forma madura están rodeadas por dos cápsulas con un alto contenido de alginato (Page, *et al.* 1975; Jarman, *et al.* 1978).

El alginato es un polisacárido lineal constituido por los ácidos D-manurónico y L-gulurónico (epímero del ácido manurónico) unidos a través de enlaces glicosídicos  $\beta(1-4)$  (May, *et al.* 1991). Las propiedades viscosificantes y gelificantes del polímero en presencia de iones calcio (Sutherland, 1985; Annison, *et al.* 1986), son de gran utilidad comercial en la industria farmacéutica, textil, alimenticia, etc.

En la industria, el alginato es obtenido de las algas marinas café de los géneros *Ascophyllum*, *Laminaria* y *Macrocystis* en las que el polisacárido constituye cerca del 40% de su peso seco (Sutherland, 1985). El crecimiento de otras especies de algas y las variaciones climáticas que afectan la pureza y el rendimiento del alginato, son algunos factores que han llevado a una búsqueda alternativa para la obtención industrial de alginato por vía fermentativa. Una opción para la industrialización son las especies bacterianas de *Pseudomonas* y *Azotobacter* que producen alginato parcialmente acetilado (Annison, *et al.* 1986).

El uso industrial del alginato obtenido a partir de *Pseudomonas aeruginosa* tiene dos inconvenientes: (a) *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que infecta los pulmones de pacientes con fibrosis quística, y el alginato es uno de los factores importantes en la patogénesis de este microorganismo (Deretic, *et al.* 1995) y (b) la ausencia de bloques contiguos de ácido gulurónico en el polímero, responsables de las propiedades gelificantes (Sutherland, 1985). En contraste *Azotobacter vinelandii* es un microorganismo de vida libre no patógeno, y el polisacárido que

produce contiene bloques de ácido galurónico, por lo que constituye una buena fuente de obtención de alginato bacteriano por vía fermentativa.

#### B) Ruta biosintética de alginato

Aunque la ruta de biosíntesis de alginato fue primeramente descrita en el alga café *Fucus gardneri* y en *A. vinelandii* (Lin, *et al.* 1966; Pindar, *et al.* 1975), su genética y biología molecular han sido ampliamente estudiadas en *P. aeruginosa*.

Las enzimas que participan en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* son similares a las reportadas en el alga marina *Fucus gardneri*. Sin embargo el sustrato inicial de la biosíntesis de alginato en algas es D-manosa, mientras que en *A. vinelandii* es D-fructosa (Pindar, *et al.* 1975). La ruta de biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa* y en *A. vinelandii* es muy similar (Pindar, *et al.* 1975; Chakrabarty, 1991) e involucra la conversión de fructosa-6-fosfato a GDP-ácido manurónico vía manosa-6-fosfato, manosa-1-fosfato y GDP-manosa como intermediarios (Fig. I). Con excepción de *algC*, todos los genes involucrados en la biosíntesis y modificación del alginato se han encontrado en una región de aproximadamente 18 kb en el minuto 34 del cromosoma de *P. aeruginosa* (Fig. II). Dentro de esta región se han descrito 9 genes en una estructura operónica (Chitnis, *et al.* 1993): *algD*, codifica la enzima GDP-manosa deshidrogenasa (GMD) que convierte la GDP-manosa en GDP-ácido manurónico, precursor directo de alginato (Deretic, *et al.* 1987); *alg8* y *alg44*, son genes cuyos productos se han propuesto como parte del complejo de polimerización (Maharaj, *et al.* 1993); *algE*, codifica una proteína de membrana externa implicada en la exportación del alginato, semejante a las porinas (Chu, *et al.* 1991); *algG*, codifica para la epimerasa que convierte los residuos de manurónico en galurónico (Chitnis, *et al.* 1990); inmediatamente después de *algG*, se ha descrito una mutación que confiere un fenotipo no mucoide denominada *alg60*; aunque el gene no se ha caracterizado, es posible que Alg60 forme parte del complejo de polimerización (Fig. I), (May, *et al.* 1994); *algL*, codifica una enzima alginato liasa, capaz de depolimerizar el alginato (Boyd, *et al.* 1993; Schiller, *et al.* 1993); *algF*, codifica para una acetilasa (Shinabarger, *et al.* 1993; Franklin, *et al.* 1993); y *algA*, codifica una enzima bifuncional que participa en dos pasos no consecutivos de la ruta biosintética, posee actividad de fosfomanosa isomerasa (PMI), que convierte la fructosa-6-fosfato a manosa-6-fosfato (Darzins, *et al.* 1985), y de pirofosforilasa implicada en la síntesis de GDP-manosa (Shinabarger, *et al.* 1991), (Tabla I y Fig. I).

El gene *algC*, localizado en el minuto 10, único gene biosintético fuera de la región en el minuto 34, codifica para una fosfomanosamutasa (PMM) que convierte a la manosa-6-fosfato en manosa-1-fosfato. Recientemente se ha reportado que las proteínas AlgC y AlgA también participan en la

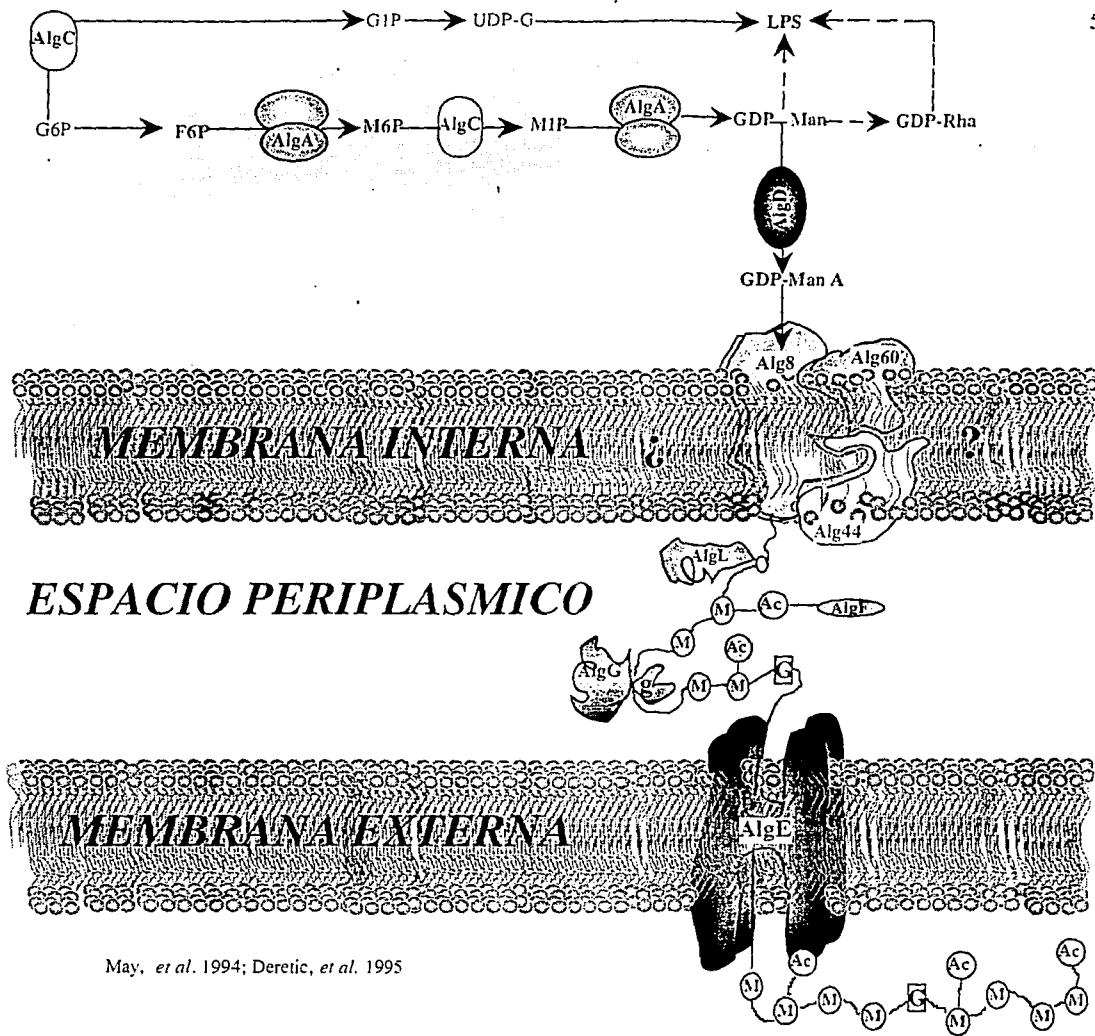


Tabla I. Genes de biosíntesis y regulación de la producción de alginato en *P. aeruginosa*.

Gene	Designaciones alternativas	Funciones <sup>a</sup>	Peso molecular (kDa) <sup>b</sup>
a). Genes de biosíntesis			
<i>algA</i>	( <i>pmi</i> )	PMI-GMP	53.4
<i>algC</i>	( <i>pmm</i> )	PMM	50.2
<i>algD</i>		GMD	47.6
<i>algE</i>		Función de transporte?	54.4
<i>algF</i>		Acetilasa	22.8
<i>algG</i>		Epimerasa	59.8
<i>algL</i>		Alginato-liasa	40.9
<i>alg8</i>		Polimerización?	56.9
<i>alg44</i>		Polimerización?	34.3
<i>alg60</i>		?	-
b). Genes reguladores			
<i>algR</i>	( <i>algR1</i> )	Regulador positivo, se une y controla a los genes <i>algD</i> y <i>algC</i>	27.6
<i>algQ</i>	( <i>algR2</i> )	Homólogo a la quinasa PfrA (regulador de la síntesis de sideroforos)	18.0
<i>algP</i>	( <i>algR3</i> , Hp1)	Factor parecido a Histona	39.0
<i>algB</i>		Regulador positivo; afecta la expresión del gene <i>algD</i>	49.3
<i>algU</i>	( <i>algT</i> , $\sigma^E$ P.a.)	Factor sigma, afecta la transcripción de <i>algD</i> , <i>algR</i> y <i>algU</i> a nivel de promotor próximo (Pp)	27.5
<i>mucA</i>		Regulador negativo de <i>algU</i> ; mutaciones en este gene causan conversión al estado mucóide	20.0
<i>mucB</i>	( <i>algN</i> )	Regulador negativo de <i>algU</i> ; mutaciones en este gene causan conversión al estado mucóide.	33.2

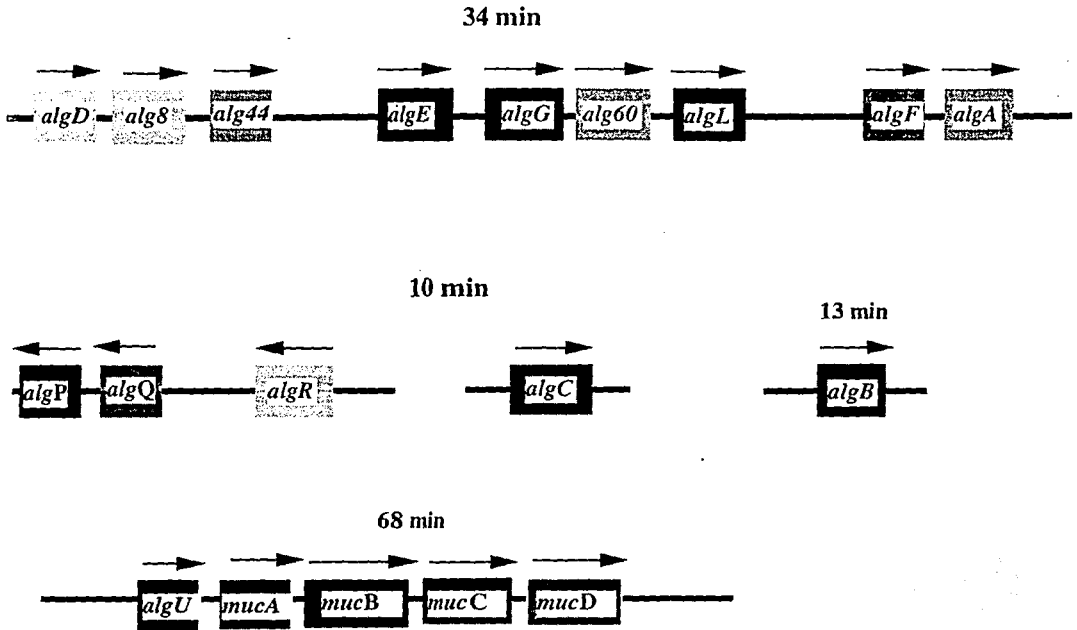
<sup>a</sup> PMI-GMP, fosfomanosa isomerasa-guanosina difosfomanosa pirofosforilasa; PMM, fosfomanosa mutasa; GMD, guanosina difosfomanosa deshidrogenasa.

<sup>b</sup> Determinado a partir de la secuencia de DNA; para AlgP y MucA determinado por movilidad en geles SDS-PAGE (Deretic, *et al.* 1994; May, *et al.* 1994).



May, *et al.* 1994; Deretic, *et al.* 1995

**Fig. I. Ruta de biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa*.** La Fructosa 6-fosfato (F6P) es convertida a GDP-ácido manurónico (GDP-ManA), el cual proporciona los residuos manuronato (M) para la polimerización. Los residuos guluronato (G) son incorporados vía epimerización de los residuos manuronato por la proteína AlgG; g representa la etapa de transición de la epimerización de manuronato a guluronato. Los residuos de ácido manurónico de los alginatos bacterianos son parcialmente o-acetilados por la proteína AlgF. Los signos de interrogación indican que las funciones del producto de los genes *alg8*, *alg44* y *alg60* y las posibles interacciones de estas proteínas son hipotéticas. El producto de los genes *algC* y *algA* están involucrados en la síntesis de lipopolisacáridos. Abreviaciones usadas: G6P, glucosa 6-fosfato; G1P, glucosa 1-fosfato; F6P, Fructosa 6-fosfato; M6P, manosa 6-fosfato; M1P, manosa 1-fosfato; GDP-Man, GDP-manosa; GDP-Man A, GDP-ácido manurónico; GDP-Rha, GDP-ramnosa; Ac, grupos o-acetilados y UDP-G, UDP-glucosa.



Modificado de May, T.B. *et al.* 1994

**Fig. II. Localización y organización de los genes de alginato en *P. aeruginosa*.** Los genes de alginato están localizados en tres regiones diferentes en el cromosoma de *P. aeruginosa*. Los genes biosintéticos se encuentran en una región de 18 kb en el minuto 34, excepto el gene *algC*, que está en el minuto 10. Los genes reguladores mapean en los minutos 10 y 13. Los genes responsables de la conversión a la mucoidía se encuentran localizados en el minuto 68. Las flechas sobre los genes indican la dirección de transcripción.

biogénesis de lipopolisacárido (Goldberg, *et al.* 1993; Ye, *et al.* 1994).

En *P. aeruginosa* y *A. vinelandii*, la formación de unidades de ácido gulurónico ocurre a nivel de polímero por acción de la enzima epimerasa (AlgG) sobre los residuos de manuronato que no han sido acetilados por la enzima alginato acetilasa (AlgF) (Pindar, *et al.* 1975; Franklin, *et al.* 1994). En *P. aeruginosa* la epimerasa se localiza en el espacio periplásmico (Franklin *et al.* 1994), mientras que en *A. vinelandii* la actividad de epimerasa es extracelular (Haug, *et al.* 1971). Además en *A. vinelandii* se han reportado varios genes que codifican para una epimerasa (Ertesvag, *et al.* 1995), sin embargo se desconoce si todas son expresadas al mismo tiempo y si son extracelulares. Aunque las enzimas epimerasa y alginato acetilasa no se requieren para la síntesis del polímero, tienen efecto sobre las propiedades reológicas del polímero (May, *et al.* 1994).

### C) Regulación de la mucoidía en *P. aeruginosa*.

Estudios genéticos en *P. aeruginosa* mostraron que las mutaciones responsables de la conversión al fenotipo mucóide (*muc*) se localizan en la región tardía del cromosoma (Fyfe, *et al.* 1980). Un grupo de mutaciones representado por los alelos *muc-2* y *muc-22*, mapean en el minuto 67.5, mientras que el alelo *muc-23* se encuentra en el minuto 69. La caracterización molecular de la región del minuto 67.5 permitió identificar un grupo de genes estrechamente relacionados, denominados *algUmucAmucB* (Martin, *et al.* 1993 a y b) y recientemente los genes *mucC* y *mucD* (Boucher, *et al.* datos no publicados). Los alelos *muc-2* y *muc-22* representan mutaciones que generan codones de terminación en *mucA*, por una duplicación de 8 pb y una delección de una citosina, respectivamente (Deretic, *et al.* 1994). Este tipo de mutaciones también se han identificado en aislados clínicos mucóides de pacientes con fibrosis quística. Sin embargo, no todas las cepas mucóides contienen mutaciones en *mucA* (Martin, *et al.* 1993b), lo que sugiere la participación de otros genes. El alelo *muc-23* representa una mutación que afecta la expresión de *algW* y codifica una proteína homóloga a la serin-proteasa HtrA involucrada en la proteólisis de proteínas anormales y necesaria para la resistencia al estrés oxidativo y por calor en bacterias entéricas (Boucher, *et al.* datos no publicados).

El gene *algU* codifica un factor sigma alternativo involucrado en la respuesta a estrés oxidativo y a temperatura extrema, que dirige la transcripción de *algD* un gene esencial en la biosíntesis de alginato, y de los genes reguladores *algR*, *algB*, así como su propia transcripción (Wozniak, *et al.* 1994; Martin, *et al.* 1994).

En ausencia de mutaciones *muc*, AlgU es inhibida por el producto de los genes *mucA* y *mucB*, por lo que se proponen como factores anti-sigma (Martin, *et al.* 1993 a y b), los cuales secuestran a su molécula  $\sigma$  afin y evitan que se una a la RNA polimerasa en la transcripción. AlgU comparte

homología con el factor sigma alternativo de *Escherichia coli* ( $\sigma^E$ ), involucrado en la expresión de  $\sigma^{32}$ , el factor sigma del estrés por calor en *E. coli* y *htrA*, un gene necesario para la sobrevivencia a temperaturas extremas en *E. coli* o bajo estrés oxidativo en *Salmonella typhimurium*. (Deretic, *et al.* 1994; Devries, *et al.* 1994).

#### D) Regulación de la expresión del gene *algD* en *P. aeruginosa*.

En *P. aeruginosa*, el gene *algD* localizado estratégicamente al inicio del operón biosintético, es el punto de convergencia de varios factores regulatorios (Fig. III). Todos los genes biosintéticos caracterizados tienen la misma dirección de transcripción y su expresión parece ser regulada por la región promotora de *algD*. En cepas mucoides de *P. aeruginosa* la expresión de *algD* está incrementada, (Deretic, *et al.* 1987) lo que sugiere que es un factor limitante en la producción de alginato, sin embargo la sobreexpresión del gene *algD* en un vector de expresión inducible con IPTG, causa un incremento de la concentración de GDP-manuronato, producto de la reacción catalizada por la enzima GDP-manosa deshidrogenasa, pero tan solo un ligero incremento en la producción de alginato (Tatnell, *et al.* 1994). Lo anterior refleja la dependencia de otras actividades biosintéticas.

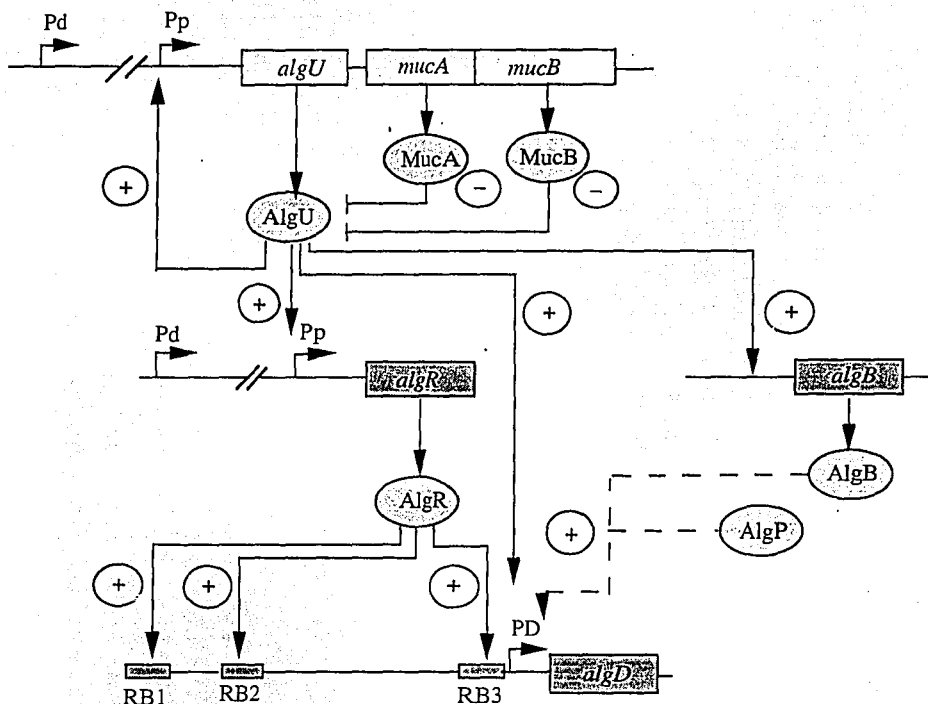
El producto del gene *algR* es un regulador positivo que pertenece a la clase de proteínas reguladoras de dos componentes (Deretic, *et al.* 1989). AlgR se une directamente en tres sitios de la región promotora del gene *algD*. La secuencia consenso que reconoce es ACCGTTGTC (Kato, *et al.* 1991; Mohr, *et al.* 1990; Mohr, *et al.* 1992). Otro elemento regulatorio involucrado en la expresión del gene *algD* y que afecta la estructura del nucleóide, es la proteína AlgP, también conocida como AlgR3 o Hpl (Kato, *et al.* 1990; Konyecsni, *et al.* 1990). Se sugiere que AlgR y AlgP regulan la transcripción de *algD*, por un mecanismo que involucra la formación de una estructura curva que facilita la interacción de AlgR con la maquinaria de transcripción (Deretic, *et al.* 1994). AlgR se requiere también para la transcripción del gene *algC*, en el que se han identificado sitios de unión para AlgR, similares a los encontrados en *algD* (Fujiwara, *et al.* 1993). El gene *algB*, es otro gene involucrado en la sobreproducción de alginato en cepa mucoides de *P. aeruginosa* (Goldberg, *et al.* 1992). Al igual que AlgR, AlgB pertenece a la familia de reguladores del sistema de dos componentes (Wozniak, *et al.* 1994). Las proteínas sensoras que fosforilan a los reguladores AlgR y AlgB y las señales ambientales transducidas por estos sistemas, aún no se conocen. Inicialmente, se propuso que la proteína AlgQ (AlgR2) funcionaba como una quinasa para AlgR; sin embargo, estudios con anticuerpos monoclonales específicos para AlgR y una mutante en *algR*, demostraron que el polipéptido fosforilado por AlgQ no es AlgR (Deretic, *et al.* 1992).

AlgQ es similar e intercambiable a PfrA, un regulador positivo de la biosíntesis de sideróforos en *P. putida* (Venturi, *et al.* 1993).

Recientemente, se ha definido que la transcripción del gene *algD* es dependiente de la proteína AlgU, la cual comparte homología con el factor sigma alternativo de *Escherichia coli* ( $\sigma^E$ ), involucrado en respuesta por estrés ambiental (Deretic, *et al.* 1994; Devries, *et al.* 1994).

La compleja expresión del gene *algD* controlada por varios elementos regulatorios, se ve reflejada en la respuesta a diversos factores ambientales o condiciones de crecimiento. La osmolaridad (Berry, *et al.* 1989), la limitación y fuente de nitrógeno (Deretic, *et al.* 1990), la temperatura (Leitao, *et al.* 1992), etc., son factores que generan una mayor producción de alginato. Sin embargo tales estudios fueron realizados en cepas mutantes de *P. aeruginosa* con un fenotipo mucoide constitutivo. Recientemente se ha demostrado que la regulación ambiental de la producción de alginato depende del tipo de mutaciones *muc* presentes (Deretic, *et al.* 1990). Por ejemplo las mutantes *mucA2* y *mucA22* con una duplicación de 8 pb y una delección de una citosina, respectivamente; responden a la presencia de altas concentraciones de NaCl, con un incremento en la transcripción de *algD* y producción de alginato, mientras que en la cepa mutante en *muc-23* (*algW*) se observó un efecto contrario. Las cepas *mucA2* y *mucA22* responden de manera diferente a la presencia de la fuente de nitrógeno. La cepa *mucA2* presenta un fenotipo no mucoide en un medio mínimo con NH<sub>4</sub> como fuente de nitrógeno, pero adquiere un fenotipo mucoide en el mismo medio con nitrato y la transcripción de *algD* se incrementa 22 veces en estas condiciones, sin embargo la cepa *mucA22* muestra una respuesta modesta con un incremento de dos veces en la transcripción de *algD* en presencia de nitrato (Deretic, *et al.* 1990).

Estos datos ponen de manifiesto que la regulación del gene *algD* en *P. aeruginosa* es dependiente de otra mutación en el fondo genético analizado.



Martin, *et al.* 1994; Wozniak, *et al.* 1994.

**Fig. III. Regulación transcripcional del gene *algD* y expresión del fenotipo mucosoide en *P. aeruginosa*.** Diferentes niveles regulatorios controlan la expresión del gene *algD* de *P. aeruginosa* y en orden se encuentra el grupo de genes *algUmucAmucB* que controlan la conversión al estado mucosoide en este microorganismo. La expresión de *algD* es absolutamente dependiente de dos factores: AlgU, factor sigma de la transcripción de *algD* a nivel de PD, y AlgR, un regulador de respuesta que se une a tres sitios (RB1, RB2 y RB3) hacia arriba del promotor de *algD*, aumentando la expresión del mismo. La expresión de los genes *algU* y *algR* se lleva a cabo al menos de dos promotores, Pd (promotor distal) y Pp (promotor próximo). MucA y MucB actúan suprimiendo la actividad de AlgU, las mutaciones dentro de los genes puede causar la conversión al fenotipo mucosoide por liberación de la regulación negativa sobre AlgU. Esto se asocia con un incremento en la transcripción de los genes reguladores de alginato, lo cual permite la sobreexpresión del gene crítico *algD*. Esta activación puede afectar también la expresión de un grupo grande de genes biosintéticos de alginato localizados hacia abajo de *algD*. Las líneas interrumpidas sugieren una relación entre los productos de los genes *algB* y *algP*, en la regulación de *algD*, sin embargo esto no se ha demostrado. Las designaciones alternativas de los genes son: *algU* (*algT*), *mucB* (*algN*), *algR* (*algR1*) y *algP* (*algR3*).

## ANTECEDENTES

En las bacterias *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* y en el alga marina *Fucus gardneri* se ha descrito que las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de alginato son similares. *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* pertenecen al linaje *Azomonas-Azotobacteraceae*, lo que sugiere una similitud en la organización de los genes involucrados en la producción de alginato (Fialho, *et al.* 1990). Por ejemplo los genes *algA*, *algD*, *algC* y *algR* de *P. aeruginosa* hibridaron con el genoma de *A. vinelandii* sugiriendo una conservación en ambas bacterias (Fialho, *et al.* 1990).

Utilizando los genes *alg* de *P. aeruginosa* como rastreadores en los bancos genómicos de las cepas ATCC 9046 (mucoide) y UW 136 (no mucoide) de *A. vinelandii*, se aislaron cósmidos que contienen fragmentos de DNA con los genes homólogos *algD*, *algA*, *algR*, *algU*, *mucA* y *mucB* de *A. vinelandii* (Martínez-Salazar, comunicación personal). Los genes *algD* y *algA* se encontraron en el cósmido pMSD675, además este cósmido tiene la actividad de alginato liasa codificada por el gene *algL*. El gene *algR* se identificó en el cósmido pMSR1506. Por otro lado se reportó también la clonación y secuenciación de una familia de genes que codifican para la enzima C-5 epimerasa de *A. vinelandii* (Ertesvag, *et al.* 1995).

El cósmido pMSD675 tiene una región de aproximadamente 25 kb de la cepa ATCC 9046 de *A. vinelandii*. En esta región se localizaron los genes *algD*, *algA* y *algL*, los dos primeros fueron detectados por hibridación DNA:DNA tipo Southern con genes de *P. aeruginosa* y el último por medio de actividad enzimática. Cabe mencionar que en *P. aeruginosa* los genes *algD* y *algA* se encuentran en los extremos del operón biosintético separados de aproximadamente 18 kb (May, *et al.* 1991). En el cósmido pMSD675 el gene *algD* se localizó en un fragmento *PstI* de 6 kb el cual fue subclonado en el vector pKOK4 y el plásmido resultante se denominó como pMSD27.

El análisis de secuencia del gene *algD* de *A. vinelandii* revela un 73% de identidad y un 97% de similitud con su homólogo de *P. aeruginosa*. La región reguladora de *algD*, muestra la conservación de algunas secuencias que son reconocidas por algunos factores de regulación: (a) la secuencia CTGCTGCCA, la cual es idéntica a la secuencia RB1 (CTGCTGCCA) que reconoce la proteína AlgR en *P. aeruginosa*; (b) dos secuencias consenso de promotores regulados por la proteína AlgU de *P. aeruginosa* y el factor  $\sigma^E$  de *E. coli*, y (c) una secuencia consenso que reconoce el factor  $\sigma^{54}$ . Esto sugiere que proteínas homólogas a las involucradas en la regulación del promotor *algD* de *P. aeruginosa*, pueden estar involucradas en la regulación de *algD* en *A. vinelandii*.



## OBJETIVOS

La secuencia del gene *algD* de *A. vinelandii* revela la presencia de secuencias consenso reconocidas por proteínas reguladoras en *P. aeruginosa*, lo que sugiere que mecanismos regulatorios similares controlan la producción de alginato en ambas bacterias. Para conocer los mecanismos regulatorios involucrados en la expresión del gene *algD* en *A. vinelandii*, se tiene como objetivo general:

Análizar mediante el uso de fusiones transcripcionales la expresión del gene *algD* en cepas de *A. vinelandii* con diferente fenotipo mucoide, así como el efecto de diferentes condiciones ambientales que inducen o reprimen la expresión.

Para la realización de este estudio, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- Construir un plásmido que permita generar cepas de *A. vinelandii* con una fusión transcripcional *algD-lacZ*.
- Integrar en cepas de *A. vinelandii* con diferente fenotipo mucoide la fusión transcripcional *algD-lacZ*.
- Evaluar la expresión del gene *algD*, cuantificando la actividad  $\beta$ -galactosidasa en diferentes condiciones ambientales en cepas mucoides y no mucoides de *A. vinelandii*.

## MATERIALES Y METODOS

Todos los materiales y métodos empleados en la realización de este proyecto se reportan en el manuscrito:

“Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*”.

## RESULTADOS

A) Construcción de la fusión transcripcional *algD-lacZ* en el cromosoma de tres cepas de *A. vinelandii* con diferente fenotipo mucoso.

Con el objeto de estudiar la regulación del gene *algD* en *A. vinelandii*, se construyó un plásmido con una fusión transcripcional *algD-lacZ*, en un vector incapaz de replicarse en *A. vinelandii*, lo cual permite reemplazar al gene silvesure por la fusión transcripcional por medio de un evento de doble recombinación homóloga. Para generar la fusión transcripcional se utilizó el sistema de transposición del plásmido pUTmini-Tn5*lacZ*1 diseñado por de Lorenzo *et al.* 1990. Este sistema posee las siguientes características: (a) el mini-Tn5*lacZ*1 contiene un sitio de unión a ribosoma pero sin el promotor, característica que permite obtener la fusión transcripcional y expresar *lacZ* a partir de un promotor externo, (b) el mini-Tn5*lacZ*1 tiene un gene de resistencia a kanamicina, (c) la enzima transposasa es codificada por el vector pUT, pero externa al mini-transposón; (d) este plásmido pUT tiene el origen de replicación R6K que depende de la proteína  $\pi$ , la cual no es codificada por el plásmido y es proporcionada “*in trans*” en una cepa lisógena de  $\lambda$ pir en *E. coli*; (e) el pUT es transferible por conjugación debido a que posee las funciones conjugativas del plásmido RP4. La transposición del mini-Tn5*lacZ*1 nos proporciona la inactivación y la fusión transcripcional del gene deseado, además de que el transposón es incapaz de transponer a otra región en ausencia del vector pUT.

El gene *algD* de *A. vinelandii* localizado en un fragmento de *Pst*I de 6 kb en el plásmido pMSD27 se mutagenizó por una cruce biparental entre la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  / pMSD27 y la cepa S17.1 $\lambda$ pir / pUTmini-Tn5*lacZ*1 (Fig. IV). Las exconjugantes ácido nalidíxico (Nal), kanamicina (Km) y cloramfenicol (Cm) resistentes, DH5 $\alpha$  / pMSD27::mini-Tn5*lacZ*1, se analizaron purificando el DNA plasmídico y este fue digerido con enzimas de restricción e hibridación DNA::DNA tipo Southern (Fig. V). El plásmido pCTD273 seleccionado tiene el mini-Tn5*lacZ*1

dentro del gene *algD*. La hibridación DNA::DNA tipo Southern del plásmido pCTD273 contra un fragmento de 670 pb *Ava*I del extremo carboxilo terminal del gene *algD* de *P. aeruginosa*, mostró la integración del mini-Tn5*lacZ*I en el gene *algD* de *A. vinelandii*.

La doble restricción *Hind*III/*Pst*I divide asimétricamente al fragmento *algD*::mini-Tn5*lacZ*I del plásmido pCTD273 en una banda de 7.34 kb y en otra de 2.75 kb, la señal de hibridación fue más intensa en el fragmento de 7.34 kb que en el de 2.75 kb (Fig. V), lo cual sugiere que la integración del mini-Tn5*lacZ*I fue muy cercana al extremo carboxilo terminal del gene *algD* y a 0.55 kb del sitio *Eco*RI del fragmento *A. vinelandii*.

Mediante un evento de doble recombinación homóloga la fusión transcripcional *algD-lacZ* del pCTD273 fue integrada al cromosoma de tres cepas de *A. vinelandii* con diferente fenotipo mucoide: ATCC 9046 (mucoide), AEIV (medianamente mucoide) y UW 136 (no mucoide), (Fig. VI). Debido a que *A. vinelandii* es capaz de ser transformada con DNA lineal y para evitar integración del vector, el plásmido pCTD273 fue digerido con la enzima *Pst*I, que libera el fragmento *algD-lacZ* de 12 kb del vector.

La transformación se llevó a cabo con 30 µg de DNA del pCTD273 digerido con la enzima *Pst*I (Bali, *et al.* 1992). Las colonias transformantes fueron seleccionadas en placas de BS con kanamicina y verificadas para la sensibilidad a tetraciclina codificada en el plásmido pCTD273. Las transformantes se analizaron por hibridación DNA::DNA tipo Southern. El DNA total digerido con *Pst*I e hibridado con el plásmido pCTD273 mostró que, las transformantes tienen una banda de 12 kb de *Pst*I, mientras que las cepas parentales es una banda de 6 kb (Fig. 4 del manuscrito). El reemplazamiento genético fue generado por un evento de doble recombinación del gene *algD* silvestre por la región *algD-lacZ*, en el cromosoma de cada cepa de *A. vinelandii*. Las mutantes *algD-lacZ* derivadas de las cepas ATCC 9046, AEIV y UW 136 fueron llamadas WI 12, A2 y U5, respectivamente.

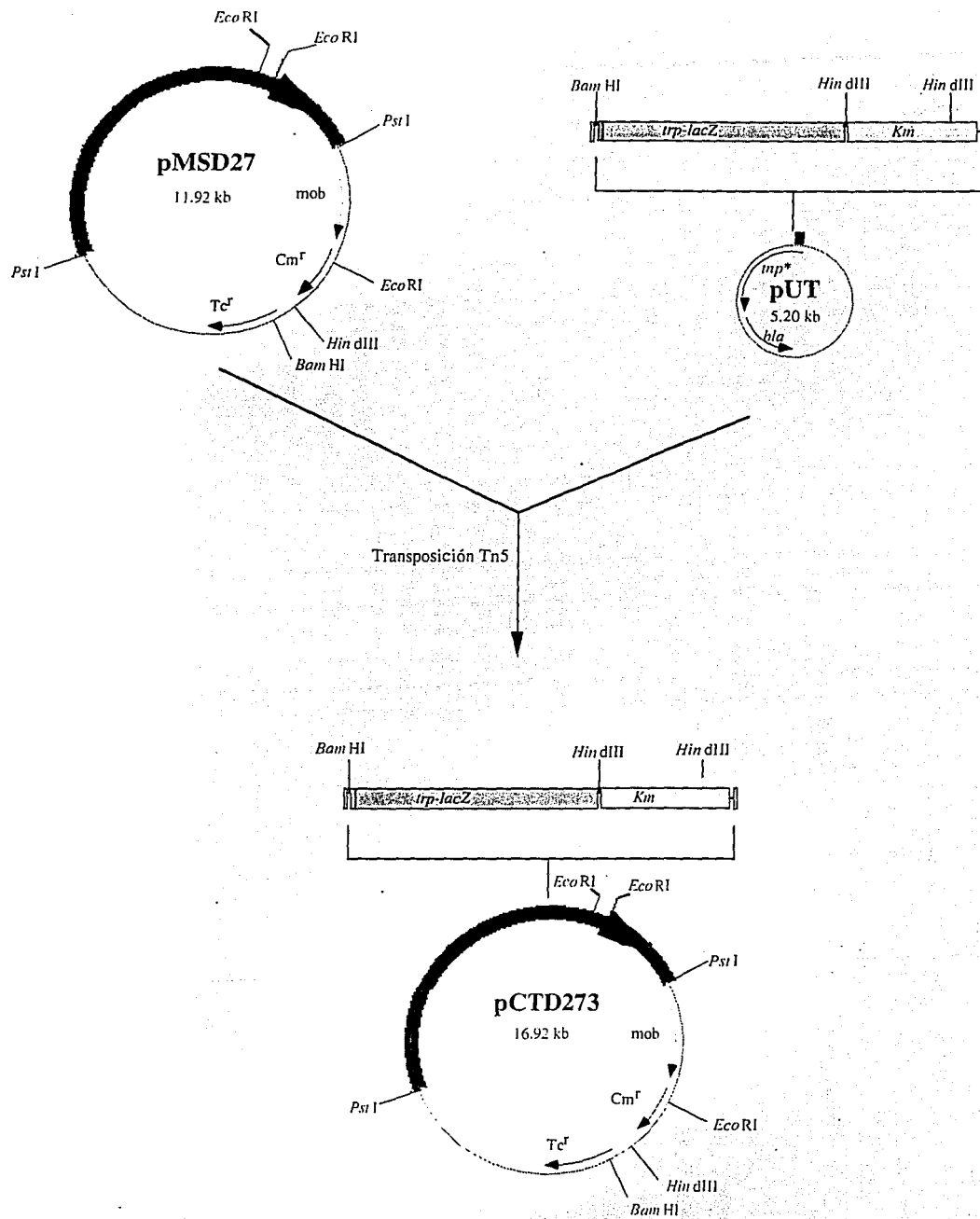
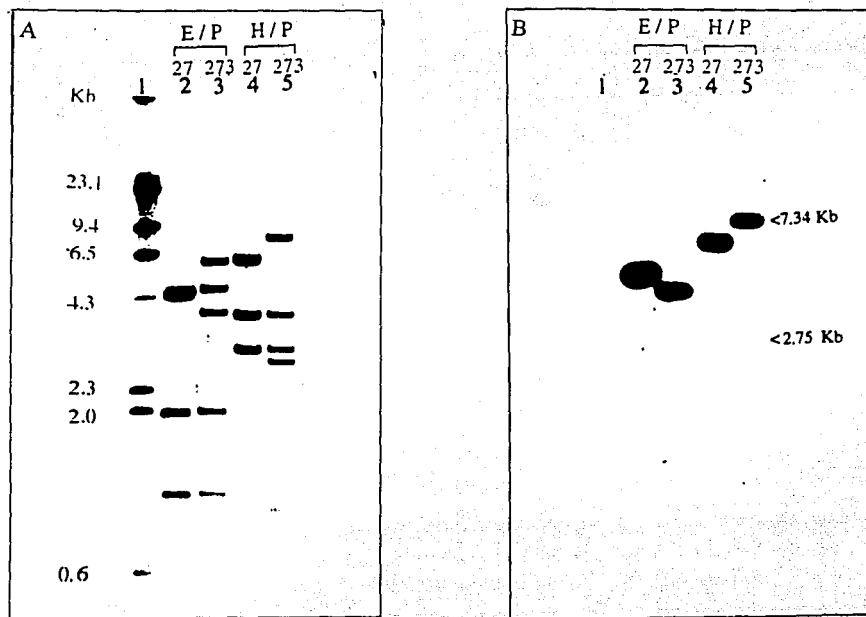
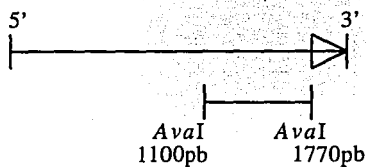


Fig IV. Representación diagramática de la construcción de la fusión transcripcional: *algD-lacZ*



C

*algD* de *P. aeruginosa*



**Fig. V. Localización de la inserción mini-Tn5lacZ1 dentro del gene *algD* de *A. vinelandii* en el pCTD273. A, Patrón de restricción de los plásmidos pMSD27 (carriles 2 y 4) y pCTD273 (carriles 3 y 5) con las enzimas *Eco*RI/*Pst*I (carriles 2 y 3) y *Pst*I/*Hind*III (carriles 4 y 5). El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular DNA de  $\lambda$  digerido con *Hind*III. B, Hibridación DNA::DNA tipo Southern del gel mostrado en el panel A con el probador de *algD* de *P. aeruginosa* de 0.67 kb *Ava*I. C, Representación diagramática del gene *algD* de *P. aeruginosa*, indicando la región del probador empleado en el panel B.**

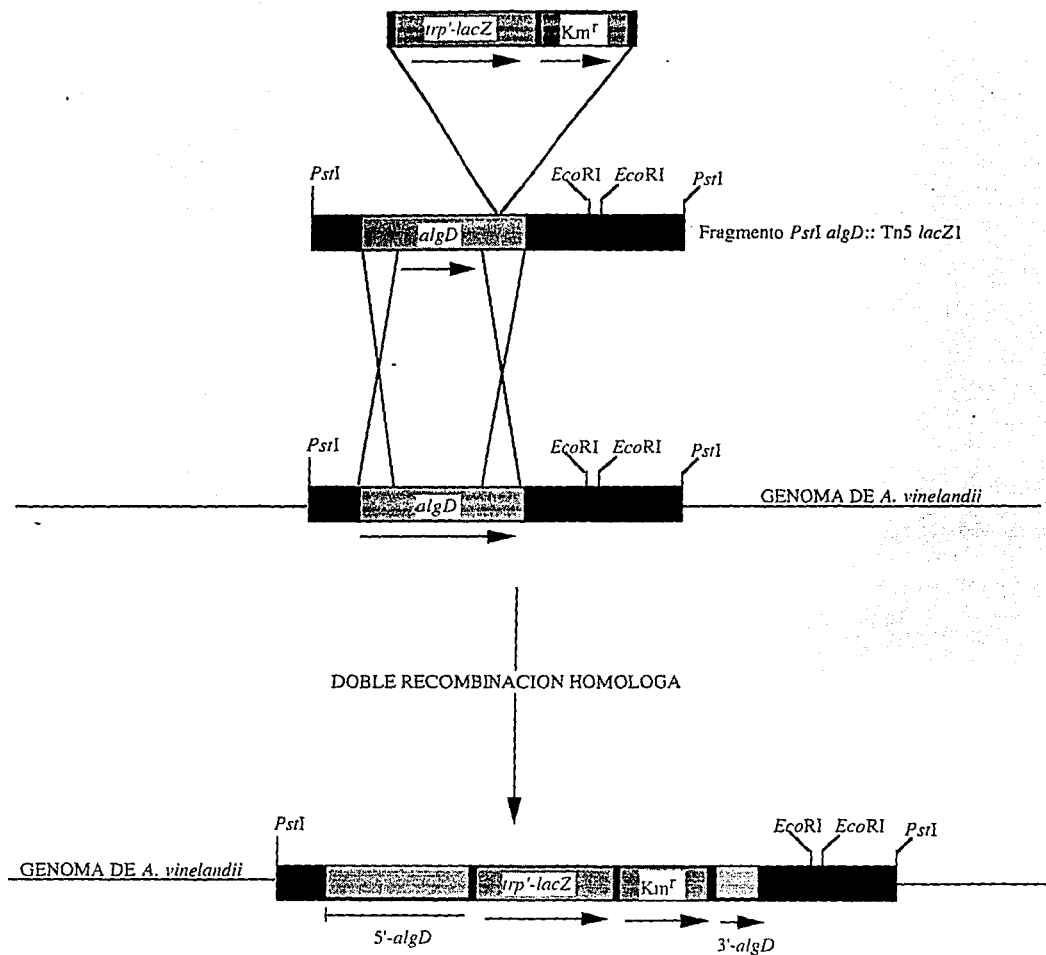


Fig VI. Diagrama esquemático de la construcción de la fusión transcripcional *algD-lacZ* en el cromosoma de *A. vinelandii* por un evento de doble recombinación homóloga.

B). "Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*".

En el manuscrito se describe la clonación y caracterización del gene *algD* de *A. vinelandii*. Este gene fue clonado en base a su homología con *algD* en *P. aeruginosa*. El gene *algD*, codifica para la enzima GDP-manosa deshidrogenasa, esencial en la biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa*.

La caracterización del gene *algD* de *A. vinelandii* involucra un análisis de su expresión mediante el uso de la fusión transcripcional *algD-lacZ* en tres cepas de *A. vinelandii* con diferente fenotipo mucoide. Los resultados muestran una estrecha correlación entre la transcripción del gene *algD* y el fenotipo mucoide en las cepas analizadas. Para evaluar simultáneamente la transcripción del gene *algD* y la producción de alginato en respuesta a diferentes condiciones ambientales, las cepas *algD-lacZ* fueron complementadas con el pMSD675 que contiene los genes *algD*, *algA* y *algL* de *A. vinelandii*. Las condiciones analizadas fueron diferentes concentraciones de NaCl y fuente de nitrógeno como NH<sub>4</sub> y nitrato. Cabe mencionar que hay una correlación entre la transcripción de *algD* y la producción de alginato, sin embargo la regulación transcripcional fue diferente en cada cepa (ver los resultados).

\*

-Manuscrito sometido a revisión para su publicación en la revista Journal of Bacteriology.

-Todas las figuras y tablas del manuscrito se presentan con números arábigos, mientras que las que no están contenidas en él se presentan en números romanos.

**Title:** Characterization of the gene coding for  
GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from  
*Azotobacter vinelandii*.

**Authors:** María-Eugenia Campos, Jaime M. Martínez-Salazar,  
Lourdes Lloret, Soledad Moreno, 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



## ABSTRACT

*Azotobacter vinelandii* presents a differentiation process leading to the formation of desiccation-resistant cysts. Alginate, the exopolysaccharide produced by this bacterium has been postulated to have a role in cyst formation. We report here the cloning and characterization of the *A. vinelandii* gene coding for the enzyme GDP-mannose dehydrogenase (*algD*), which is the key enzyme for alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. This gene has a high degree of similarity with the *algD* gene from *P. aeruginosa*. The upstream DNA region of *A. vinelandii algD* gene shows some conspicuous sequences which suggested that some of the proteins involved in the regulation of the *P. aeruginosa algD* promoter are also involved in the regulation of its transcription. Accordingly we show the existence of two mRNA start sites, one of these promoters seemed to correspond to a promoter sequence transcribed by an RNA polymerase containing a  $\sigma^E$  subunit. An *A. vinelandii algD*- mutant was constructed which is completely impaired in alginate production and is unable to form desiccation-resistant cells. The effect of  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$  and  $\text{NaCl}$  concentrations on *algD* transcription was evaluated on three *A. vinelandii* strains producing different alginate levels. We found a strict correlation between alginate production and *algD* transcription in the three strains studied,

but the *algD* transcriptional regulation by the conditions studied was different for each strain. The analysis of these data suggested that different regulatory mutations might be present in two of the three strains studied.

## INTRODUCTION

*Azotobacter vinelandii* is a gram-negative soil bacterium which suffers a differentiation process leading to the formation of desiccation-resistant cysts under adverse environmental conditions. The encystment process takes about five days and the mature cysts are surrounded by two capsule-like layers containing a high proportion of the exopolysaccharide alginate (18, 35, 44), this dormant cells are able to survive in dry soil for long periods. Other particular features of this bacterium are that under some conditions it has multiple copies of its entire chromosome (23, 25, 33), and that it is capable of fixing nitrogen under aerobic conditions (20).

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 (42). The alginate used in industry is extracted from marine brown algae (42).

Considerable information about alginate biosynthesis and its regulation has been described in *Pseudomonas aeruginosa* (4, 27). The interest is motivated by the pathogenesis of this bacterium since lung infection with *P. aeruginosa* mucoid strains, which produce high amounts of alginate, are the most important cause of death of cystic fibrosis

patients.

The alginate biosynthetic pathway from *A. vinelandii* and *P. aeruginosa* are very similar (4, 36). In *P. aeruginosa* the commitment enzyme in this pathway is GDP-mannose dehydrogenase which converts GDP-mannose, a metabolite used for the synthesis of different saccharides, to GDP-mannuronic acid, a direct alginate precursor. The gene coding for GDP-mannose dehydrogenase is called *algD* (4, 27, 39).

In *P. aeruginosa*, *algD* gene is located in a biosynthetic cluster which contains most of the genes coding for the enzymes involved in alginate synthesis. The gene cluster appears to be transcribed as an operon (5), which is controlled from the *algD* promoter via positive transcriptional regulation by AlgR and AlgB proteins (9; 15, 16, 32). The recently identified sigma factor AlgU is responsible for the initiation of *algD*, *algR* and its own transcription (17, 26, 43). AlgU activity is negatively regulated by the product of *mucA* and *mucB* genes; this sigma-like factor is similar to the *Escherichia coli*  $\sigma^E$  protein and both recognize similar DNA sequences (11, 12, 17, 40).

The native *P. aeruginosa* strains isolated from environmental samples or from different infected human 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 yet unidentified loci (11, 12, 14, 40). At present, there is not a clear picture on the physiological role that alginate biosynthesis plays for *P. aeruginosa* in the environment (27).

*A. 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* and *algR* (13).

In *A. vinelandii* alginate has been proposed to play an important structural role in the cyst (44), but most of the isolates produce this exopolysaccharide also during vegetative growth. Alginate production in *A. vinelandii* is thus a unique biological model and its study at the molecular level will permit the answer of different questions of biological importance.

In this paper we report the cloning and characterization of the *A. vinelandii algD* gene, which includes its sequence analysis, study of the effect of its mutagenesis in the formation of desiccation-resistant cells, and study of its transcription on three strains under different culture conditions.

## MATERIALS AND METHODS

**Microbiological Procedures.** Bacterial strains and plasmids used in this work are shown on Table 1. *A. vinelandii* strains were routinely grown on BS medium which lacks a fixed source of nitrogen (19) at 30°C. *E. coli* strains were grown on LB medium (28) at 37°C. Antibiotic concentrations in µg/ml, used for *A. vinelandii* and *E. coli*, respectively, were: ampicillin (Ap) 30 and 200, chloramphenicol 30 and 30, kanamycin (Km) 10 and 60, nalidixic acid (Nal) not used and 30, rifampicin 10 and not used, and tetracycline (Tc) 10 and 30.

Triparental or biparental *A. vinelandii* matings were done as reported previously (19). *A. vinelandii* transformation was done as reported by Bali *et al* in 1992 (1).

Alginate production was measured by the spectrophotometric determination of uronic acid (3) or by measuring its dry weight from liquid cultures. In the case where we studied the effect in alginate production of a mutation in *rpoN*, cells were grown on BS+LB plates (transformation medium) and alginate was measured by the method described previously (21). All measurements were done by triplicate.

β-galactosidase activity was determined as reported by Miller (28), one unit correspond to 1 nM of o-nitrophenyl-β-D-galactoside hydrolyzed per minute and per mg of protein. All measurements were

done by triplicate.

The resistance to desiccation was measured using bacterial cultures grown for 18 to 24 h on liquid BS medium which were transferred to BS plates with 0.2% n-butanol as carbon source and incubated for 5 days. Approximately  $10^6$  colony forming units of each strain were applied on millipore 0.2 membranes, placed in sterile petri dishes and incubated for additional 5 days. Dried cells (cysts) were resuspended on 1 ml of BS medium and viable counts were made to determine their number.

**Genetic manipulations.** The *A. vinelandii algD* mutant was constructed in the ATCC 9046 strain by selection of single recombinant events using plasmid pMSDX7 (Table 1). Plasmid pMSDX7 has 594 bp *XhoI* fragment containing an internal sequence from *A. vinelandii algD* gene and its unable to replicate in *Azotobacter*. The plasmid was introduced in *A. vinelandii* by transformation, the *Apr* clones selected are expected to be the product of a single recombination event that would render 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 pBluescript SK+. One of the *Apr* transformants is strain RSD1 (Fig. 3) which is presented herein.

*algD-lacZ* transcriptional fusion was isolated by selecting mini-Tn5 *lacZ1* insertions on *algD* gene located in plasmid pMSD27 (Table 1) by

selecting  $Km^r$ ,  $Nal^r$  transconjugants from the cross between the *E. coli* strains S17.1( $\lambda$  pir) containing plasmid pUT mini-Tn5 *lacZ1* (7) and DH5 $\alpha$  containing plasmid pMSD27 (Table 1), insertions on the plasmid were later identified. The plasmid pCTD273 (Table 1) was shown to contain a mini-Tn5 insertion on the 3' end and in the same orientation of *algD* (Fig 4). The *algD-lacZ* transcriptional fusion in three *A. vinelandii* strains were constructed using pCTD273 plasmid. Plasmid pCTD273 was cut with *PstI* endonuclease in order to obtain only double recombinants; the clones were selected for their  $Km^r$  and  $Ap^s$  phenotype after transformation.

In order to simultaneously measure *algD* transcription and alginate production plasmid pMSD675 was introduced by conjugation from *E. coli* S17.1 (Table 1) to the *A. vinelandii* strains W112, U5 and A2 (Table 1) which carry the *algD-lacZ* fusion, the transconjugants were selected on BS medium supplemented with Tc and Km.

**Total DNA library construction.** Total genomic DNA from *A. vinelandii* ATCC 9046 was partially digested with *Sau3A* and ligated to cosmid pCP13 (6) digested with *BamH1* endonuclease. Cosmid were packaged onto  $\lambda$  heads and transfected as described previously (24). About 5000 clones were obtained, which represent at least 10 times the size of the bacterial genome.



**Nucleic acid procedures.** DNA isolation and cloning, Southern blotting and nick translation procedures were carried out as described previously (24). The *P. aeruginosa algD* gene fragment used as probe to screen the *A. vinelandii* genomic library was described previously (13), and was kindly provided by A. M. Chakrabarty from the University of Illinois at Chicago. DNA sequencing was done either with the Sequenase kit, or the Taq polymerase enzyme (United States Biochemical) according to the manufacturers instructions. DNA regions to be sequenced were subcloned on plasmid pBluescript SK+ (Stratagene Cloning Systems). The *algD* mRNA start site was determined by primer extension (24) of RNA extracted from strains ATCC 9046 and UW136, grown for 48 h in BS medium, using as primer the oligonucleotide underlined in Figure 1.

**Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide sequence of the *A. vinelandii algD* gene reported here has been deposited in the GenBank data-base under accession number U11240.

## RESULTS

Cloning and sequencing of *A. vinelandii algD* gene. It has been previously reported that *A. vinelandii* has DNA sequences homologous to *P. aeruginosa* genes of the alginate biosynthetic pathway (13). The *A. vinelandii algD* gene was cloned from strain ATCC 9046 based on its homology with the *P. aeruginosa* corresponding gene. Southern blot analysis using as probe an internal fragment of *P. aeruginosa algD* gene, led to the identification of 6 cosmids which presented a 5.5 kb *Pst*I fragment with *algD* homologous sequences. One of them was selected for further analysis (pMSD675). The 5.5 kb *Pst*I fragment with *algD* homologous sequences from plasmid pMSD675 was subcloned in plasmid pKOK4, the resulting plasmid was called pMSD27 (Table 1).

The *A. vinelandii algD* sequence is shown in Fig 1, it codes for a polypeptide of 47.9 kd which presents a high degree of homology with the corresponding *algD* gene from *P. aeruginosa*, it has 79% identity at the DNA level and 73% identity at the protein level (Fig. 2).

The analysis of the DNA sequence upstream from the first ATG permitted the identification of some putative transcription regulatory sequences (Fig 1). A similar DNA sequence to that of the promoters recognized by the RNA polymerase (RNAP) containing the  $\sigma^{54}$  subunit is present between the nucleotides -389 and -376, the consensus

sequence for this type of promoters is CTGGCACN<sub>4</sub>CTGCA (29) (underlined nucleotides are invariable) and the sequence which we found is CTGGCAAACTGCCGAA. In *P. aeruginosa* the sequence CGTTGGN<sub>17</sub>TATAAT is recognized by RNAP containing the "house-keeping"  $\sigma^D$  (37), we found the sequence ATTTGCN<sub>16</sub>TATAAT between nucleotides -123 and -94. The promoters recognized by the RNAP containing the  $\sigma^E$ -like subunit, which includes AlgU protein, recognize the consensus sequence GAACTN<sub>19</sub>TCT (12, 17), we found the following sequences: GAACTN<sub>17</sub>TCT between nucleotides -439 and -413, and GAACTN<sub>16</sub>TCT between -348 and -321. The AlgU dependent transcription of the *P. aeruginosa algD* gene is positively regulated by the AlgR protein, four sequences where this protein binds have been identified in the *algD* upstream region, one of which (RB1) is in the opposite direction to the other three (31, 32). We found between nucleotides -371 and -363 the sequence CTGGTGCCA, which is very similar to RB1 (CTGGTTGCCA).

Identification of *algD* mRNA start sites. The mRNA start site for the *algD* gene was determined by primer extension. Two *algD* mRNA start sites were found in strain ATCC 9046, one correspond to nucleotide -200 and the other to the nucleotide -86 (Fig. 1), thus the functional promoters which are predominantly used in this strain when

grown, fixing nitrogen, in BS medium are a promoter which is similar to the promoters transcribed by the RNAP containing  $\sigma^E$  subunit (P1), located between nucleotides -235 and -210. The sequence of P1 promoter is GTAAN<sub>20</sub>C (Fig 1). The second promoter (P2) is located at -123 to -94 and is a  $\sigma^D$  type of promoter (Fig 1). No primer extension products were observed in strain UW136.

**Construction and characterization of *algD*- mutants.** In order to determine whether the putative *algD* gene which had been sequenced was functional in *A. vinelandii*, it was disrupted in strain ATCC 9046. The *algD* gene disruption of one of the mutants selected (RSD1, Table 1) was confirmed by Southern blotting (Fig 3), and it was found to lack alginate production (Table 2). Reversion to mucoidy of strain RSD1 is very frequent since the mutation is lost by genetic recombination between the truncated *algD* genes. In plates with a high cell density, mucoid colonies are apparent (data not shown).

Alginate has been proposed to be essential for encystment, since the non-mucoid strain UW is unable to form mature cysts (34), however the nature of the mutation leading to non-mucoidy in strain UW is not known. In order to determine whether alginate was needed for encystment, the formation of desiccation-resistant cells of ATCC 9046 and RSD1 cultures was measured. Strain ATCC 9046 has a frequency of

cyst formation of 10%, while the mutant RSD1 has a frequency of less than  $1 \times 10^{-6}$  of desiccation-resistant cell formation. This result supports the assumption that alginate is essential for cyst formation.

**Correlation between *algD* transcription and alginate production in different *A. vinelandii* strains.** In order to determine the correlation between *algD* transcription and the amount of alginate produced by different *Azotobacter vinelandii* strains, an *algD-lacZ* transcriptional fusion was constructed on the chromosome of three strains with different levels of mucoidy. The substitution of the original *algD* gene with the *algD-lacZ* fusion on the chromosome of these strains was confirmed by Southern blot analysis (Fig 4).

None of the derivatives carrying the *algD-lacZ* fusion on the chromosome is completely impaired in alginate production as is the case of RSD1 *algD*-mutant. Strain WI12, for example, is still able to produce 25% of the alginate produced by the wild type strain (Table 2).

As shown on Table 2, there is a strict correlation between the *algD* transcription, as measured by  $\beta$ -galactosidase activity of the derivatives carrying the *algD-lacZ* gene fusion, and alginate production of the original strains studied. Strain WI12, which is derived from strain ATCC 9046 the most mucoid strain, had the highest  $\beta$ -galactosidase activity, while strain U5, which is derived from the non-

mucoïd strain UW136, presented the lowest values of this enzymatic activity, strain A2 have an intermediate  $\beta$ -galactosidase activity value and is derived from strain AEIV, which produce intermediate alginate levels.

**Regulation of *algD* transcription and alginate production by different environmental stimuli.** In order to simultaneously measure alginate production and  $\beta$ -galactosidase activity under different environmental conditions, we transferred plasmid pMSD675 to the three strains containing the *algD-lacZ* transcriptional fusion, W112, A2 and U5, respectively.

The kinetics of alginate production and *algD* transcription during the growth of strain A2/pMSD675 were determined, and it was found that both are coordinately induced during the growth of the bacteria, reaching their maximum value during the late logarithmic phase of growth (Fig. 5).

The environmental stimuli that we studied were medium osmolarity and nitrogen source. Neither alginate production nor *algD* transcription are increased on medium with high osmolarity in any of the strains studied, on the contrary, a slight decrease of both parameters is apparent on the higher sodium chloride concentration used (Table 3). Alginate production and *algD* transcription were both very low on strain

U5/pMSD675, and were not affected by any of the environmental stimuli studied (Table 3). In the case of strain W112/pMSD675, we found that the alginate production and  $\beta$ -galactosidase activity were always very high, independently of the culture conditions (Table 3). The *algD* transcription was increased on the A2/pMSD675 background when this strain was grown with ammonium as nitrogen source while alginate production remained unaltered, but both were unaffected by other culture conditions (Table 3).

**Alginate production by strain UW136 in the presence of an *rpoN* mutation.** No *algD* mRNA start site was identified in strain ATCC 9046 which correspond to the putative promoter transcribed by the RNAP containing the  $\sigma^{54}$  subunit, but it is still possible that this promoter is used in this strain, albeit to a much lesser extent, or in a different culture condition.

On the other hand, the *algD* mRNA start site in strain UW136 could not be detected by primer extension (data not shown), but this strain produces detectable alginate levels and *algD* transcription could be measured in the derivative carrying the *algD-lacZ* gene fusion (strain U5, Tables 2 and 3). In order to determine whether the low alginate level produced by strain UW136 was due to *algD* transcription from the promoter transcribed by the RNAP containing the  $\sigma^{54}$  subunit, the

alginate produced by the *ntrA* mutant MV700 was measured. Both strains UW136 and MV700 produced similar low alginate levels ( $2.1 \pm 0.5$  and  $4.4 \pm 2.3$  mg/g of wet cell weight, respectively) when grown on plates of BS + LB. This result suggested that the low *algD* transcription in the UW136 genetic background is not due to transcription from the putative  $\sigma^{54}$  promoter.



## DISCUSSION

We report here the cloning and characterization of the *A. vinelandii* gene coding for the GDP-mannose dehydrogenase (*algD*), which is a key enzyme in alginate biosynthesis. We found that it has a high degree of homology with the corresponding *P. aeruginosa algD* gene (8). The analysis of the non-translated upstream DNA sequence of this gene suggested the involvement of some proteins in its regulation. Two sequences were detected which very closely matched with the consensus sequence of the promoters recognized by the RNA polymerase containing a  $\sigma^E$ -like subunit (12, 17), but none of these sequences was found to be a functional promoter by the primer extension analysis. However, a functional promoter was found which resembles a  $\sigma^E$  promoter, it contains all the nucleotides which have been found to be invariable in this type of promoters (17).

In *E. coli* and *P. aeruginosa*  $\sigma^E$  is involved in the response to environmental stress (17, 27). In *P. aeruginosa* the  $\sigma^E$ -like protein AlgU has been shown to be involved in the transcription of the *algD* gene; this transcription is dependent on the positive regulator AlgR, which belongs to the two component class of transcription regulators (9). *A. vinelandii* has been shown to possess DNA sequences homologous to the *P. aeruginosa algR* gene (13), our finding of a sequence similar to the

AlgR binding sequence on the *algD* upstream non-coding region strongly suggest that the transcription of this *A. vinelandii* gene is regulated by AlgR via its activation of the AlgU recognized promoter.

The second *algD* mRNA start site found in strain ATCC 9046 correspond to a promoter transcribed by the RNA polymerase containing a  $\sigma^D$  subunit (37), which is the form of the enzyme which transcribes the "house-keeping" genes. The high homology of the  $\sigma^D$  *algD* promoter with the consensus sequence of this type of promoters in *P. aeruginosa*, suggests that its transcription is constitutive, but the consensus sequence for the  $\sigma^D$  homolog in *A. vinelandii* has not been reported yet.

In the sequence upstream of the coding sequence we detected a similar sequence to that recognized by the RNA polymerase containing a  $\sigma^{54}$ -like subunit, but this sequence is unusually upstream from the first *algD* codon and lacks a C in the -12 region which is present in most of this type of promoters (29). In the case of *P. aeruginosa algD* gene, a putative  $\sigma^{54}$  promoter has been identified and a protein belonging to the  $\sigma^{54}$  bacterial enhancer-binding protein family (30), encoded by *algB* gene, has been shown to have a role in GDP-mannose dehydrogenase expression at the level of transcription (15, 16, 43). We report here that a mutation in the unique *A. vinelandii rpoN* gene in strain UW136 (38) has no significant effect on alginate production. In order to obtain

more conclusive evidence for the functionality of this promoter in the other strains studied, alginate production and *algD* transcription should be determined in the *rpoN* mutants derived from them.

The transcription of *algD* gene on strains WI12 and A2 is more than four fold increased upon the introduction of plasmid pMSD675 (Table 2 and Fig 7), this result suggests that a positive transcription activator is encoded in this plasmid, or that a negative regulator is titrated out by cis-acting sites contained in plasmid pMSD675.

Transcription of the *algD* gene on the three strains studied showed a different response to the environmental factors studied. High osmolarity was reported to be the environmental condition triggering alginate production by *P. aeruginosa*, but it was later reported that in different mucoid isolates, presenting different *muc* mutations, *algD* expression was induced by different environmental stimuli (2, 10), a situation which is similar to that reported here for *A. vinelandii*. Two of the studied strains seem to have a regulatory mutation, strain UW136 behaves like a non-inducible mutant presenting a basal *algD* transcriptional level under all conditions studied, while strain ATCC 9046 seems to produce very high alginate levels under all the conditions studied.

We have shown here that strain RSD1 which contains a disrupted *algD*

gene is unable to produce alginate while a strain, W112, with a different mutation in the same gene caused by a mini-Tn5 insertion showed only a reduction in the production of this polysaccharide. Both mutants are complemented for alginate production by plasmid pMSD675 (Tables 2, 3 and data not shown). We think that the different phenotype of these mutants might be due to the fact that the mini-Tn5 insertion in W112 is located in the 3' end of the gene, rendering a GDP-mannose dehydrogenase with residual activity.

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 have shown that a mutant impaired in alginate biosynthesis is unable to form desiccation-resistant cells. The precise role of alginate in cyst formation is being analyzed at the ultrastructural level in different strains and in the *alg*-mutants derived from them.

## ACKNOWLEDGMENTS

We wish to acknowledge Christina Kennedy and Ananda M. Chakrabarty for their encouraging discussions and their support for the initiation of this project.

We thank Josefina Guzmán for her technical assistance.

## REFERENCES

- 1.- Bali, A., G. Blanco. S. Hill, and C. Kennedy. 1992. Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1711-1718.
- 2.- Berry, A., J. D. DeVault, and A. M. Chakrabarty. 1989. High osmolarity is a signal for enhanced *algD* transcription in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Bacteriol.* **171**: 2312-2317.
- 3.- Blumenkrantz, N., and G. Asboe-Hansen. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochem.* **54**: 484-489.
- 4.- Chakrabarty, A. M. 1991. Molecular genetics and environmental regulation of alginate biosynthesis. *Appl. Phycology.* **8**: 1-6.
- 5.- 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.
- 6.- Darzins, A., and A. M. Chakrabarty. 1984. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **159**: 9-18.
- 7.- de Lorenzo, V., and K. N. Timmis. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with *Tn5*-

and *Tn10*-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**: 386-405.

8.- 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 Acids Res.* **15**: 4567-4581.

9.- Deretic, V., R. Dikshit, W. M. Konyecsni, 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.

10.- Deretic, V., J. R. W. Govan, W. M. Konyecsni, and D. W. Martin. 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.

11.- Deretic, V., D. W. Martin, M. J. Schurr, M. H. Mudd, N. S. Hibler, R. Curcic, and J. C. Boucher. 1993. Conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bio/Technol.* **11**: 1133-1136.

12.- 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 factors. *J. Bacteriol.* **176**: 2773-2780.

- 13.- Fialho, A. M., N. A. Zielinski, W. F. Fett, A. M. Chakrabarty, and A. Berry. 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.
- 14.- Fyfe, J. A. M., and J. R. W. Govan. 1980. Alginate synthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*: a locus involved in control. *J. Gen. Microbiol.* 119: 443-450.
- 15.- Goldberg, J. B., and D. E. Ohman. 1987. Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa algB* mutants: role of *algB* in high-level production of alginate. *J. Bacteriol.* 169:1593-1602.
- 16.- Goldberg, J. B., and T. Dahnke. 1992. *Pseudomonas aeruginosa* AlgB which modulates the expression of alginate, is a member of the NtrC subclass of procaryotic regulators. *Mol. Microbiol.* 6: 59-66.
- 17.- Hershberger, C. D., R. W. Ye, M. R. Parsek, Z.-D. Xie, and A. M. Chakrabarty. 1995. The *algT* (*algU*) gene of *Pseudomonas aeruginosa*, a key regulator involved in alginate biosynthesis, encodes an alternative  $\sigma$  factor ( $\sigma^E$ ). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7941-7945.
- 18.- Jarman, T. R., L. Deavin, S. Slocombe and R. C. Righelato. 1978. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.* 107: 59-64.



- 19.- Kennedy C., R. Gamal, R. Humphrey, J. Ramos, K. Brigle and D. Dean. 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.
- 20.- Kennedy, C., and A. Toukdarian. 1987. Genetics of Azotobacters: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Annu. Rév. Microbiol.* **41**: 227-258.
- 21.- Knutson C. A., and A. Jeanes. 1968. A new modification of the carbazole reaction: application to heteropolysaccharides. *Analyt. Biochem.* **24**: 470-481.
- 22.- Kokotek W., and W. Lotz. 1991. Construction of a mobilizable cloning vector for site-directed mutagenesis of Gram-negative bacteria: application to *Rhizobium leguminosarum*. *Gene*. **98**: 7-13.
- 23.- Maldonado, R., J. Jiménez and J. Casadesus. 1994. Changes in ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *J. Bacteriol.* **176**: 3911-3919.
- 24.- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 25.- Manna A. C., and H. K. Das. 1993. Determination of the size of the *Azotobacter vinelandii* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 719-722.

- 26.- **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  $\sigma^E$  an stress response. *J. Bacteriol.* **176**: 6688-6696.
- 27.- **May, T. B. and A. M. Chakrabarty.** 1994. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends Microbiol.* **2**: 151-157.
- 28.- **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 431-435.
- 29.- **Morett, E., and M. Buck.** 1989. In vivo studies on the interaction of RNA polymerase- $\sigma^{54}$  with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti nifH* promoters: the role of NifA in the formation of an open promoter complex. *J. Mol. Biol.* **210**:65-77.
- 30.- **Morett, E. and L. Segovia.** 1993. The  $\sigma^{54}$  bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* **175**: 6067-6074.
- 31.- **Mohr, C. D., D. W. Martin, W. N. Konyecsni, J. R. W. Govan, S. Lory, and V. Deretic.** 1990. Role of the far-upstream sites of the *algD* promoter and the *algR* and *rpoN* genes in environmental modulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **172**: 6576-6580.

- 32.- Mohr C. D., N. S. Hibler, and V. Deretic. 1991. Alg R, a response regulator controlling mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to the FUS sites of the *algD* promoter located unusually far upstream from the RNA start site. *J. Bacteriol.* **173**: 5136-5143.
- 33.- Nagpal, P., M. A. Reddy and H. K. Das. 1989. Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **171**: 3133-3138.
- 34.- Page, W. J. 1983. Formation of cyst-like structures by iron-limited *Azotobacter vinelandii* strain UW during prolonged storage. *Can. J. Microbiol.* **29**: 1110-1118.
- 35.- Page W., and H. L. Sadoff. 1975. Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **122**: 145-151.
- 36.- Pindar, D. F., and C. Bucke. 1975. The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* **152**: 617-622.
- 37.- Ronald, S., M. A. Farinha, B. J. Allan, and A. M. Kropinski. 1992. Cloning and physical mapping of transcriptional regulatory (sigma) factors from *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. E. Galli, S. Silver, and B. Withold (eds.) ASM, Washington, pp. 249- 257.
- 38.-Toukdarian, A., and C. Kennedy. 1986. Regulation of nitrogen metabolism in *Azotobacter vinelandii*: isolation of *ntr* and *glnA* genes

and construction of *ntr* mutants. EMBO J. 5: 399-407.

39.- Schurr, M. J., D. W. Martin, M. H. Mudd, N. S. Hibler, J. C.

Boucher, and V. Deretic. 1993. The *algD* promoter: regulation of alginate production by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Cell. Mol. Biol. Res. 39: 371-376.

40.- Schurr, M. J., D. W. Martin, M. H. Mudd, and V. Deretic. 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.

41.- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. Bio/Technol. 1: 784-791.

42.- Sutherland, I. W. 1985. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. Annu. Rev. Microbiol. 39: 243-270.

43.- Wozniak, D. J., and D. E. Ohman. 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.

44.- Wyss, O., G. M. Neumann, and M. D. Scolofsky. 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	Highly mucoid	Collection
UW136	Non mucoid, Rif <sup>r</sup> derivative of UW	19
AEIV	Mucoid	Svein Valla
RSD1	<i>algD</i> <sup>-</sup> mutant derived from ATCC 9046	This work.
WI12	<i>algD-lacZ</i> gene fusion on strain ATCC 9046	This work.
U5	<i>algD-lacZ</i> gene fusion on strain UW 136	This work.
A2	<i>algD-lacZ</i> gene fusion on strain AEIV	This work.
MV700	<i>rpoN::Tn5</i> Fix <sup>-</sup> , derived from UW	38
<i>Escherichia coli</i>		
S17.1	Able to mobilize plasmids by means of an RP4 derivative inserted in its chromosome	41
S17.1( $\lambda$ pir)	Same as S17.1, but expressing $\lambda$ pir protein, and thus able to replicate pUT plasmids	7
DH5 $\alpha$	<i>supE44, <math>\Delta</math>lacU169, hsdR17, recA1 endA1, gyrA96, thi-1, relA 1</i>	Stratagene
Plasmids		
pCP13	RK2 derived cosmid vector, Tcr, Kmr	6
pMSD675	Plasmid containing 25 kb of <i>A. vinelandii</i> DNA	

	including <i>algD</i> gene, derived from pCP13	This work
pKOK4	pBR325 derived <i>mob+</i> plasmid, Tcr, Apr, Cmr.	22
pMSD27	Plasmid containing 5.5 kb of <i>A. vinelandii</i> DNA including <i>algD</i> gene, derived from pKOK4	This work
pCTD273	A derivative of plasmid pMSD27 with a mini- <i>Tn5</i> insertion on the <i>algD</i> gene	This work
pBluescri-	Plasmid used for subcloning DNA to be	
pt SK+	sequenced, Apr	Stratagene
pMSDX7	Plasmid containing 560 base pairs of the <i>A. vinelandii algD</i> gene coding from amino-acid 137 to 337, derived from pSK+.	This work
pUT mini-	Suicide vector for mutagenesis with mini-	
Tn5 <i>lacZ1</i>	Tn5 <i>lacZ1</i> , only able to replicate on strains expressing $\lambda$ pir protein, Kmr.	7

---

TABLE 2. Alginate production and *algD* expression on BS medium in different *A. vinelandii* strains.

Strain	Alginate production $\pm$ SD (mg/mg protein) <sup>a</sup>	$\beta$ -galactosidase activity $\pm$ SD (Units/mg protein)
ATCC 9046	4.47 $\pm$ 0.47	-
RSD1	>0.08	-
WI12	1.13 $\pm$ 0.18	831 $\pm$ 13
AEIV	1.74 $\pm$ 0.2	-
A2	0.53 $\pm$ 0.13	285 $\pm$ 39
UW136	0.73 $\pm$ 0.21	-
U5	0.68 $\pm$ 0.31	113 $\pm$ 8

<sup>a</sup> These values were determined from liquid cultures incubated at 30°C and 250 rpm for 48 hrs.



TABLE 3. Alginate production and *algD* expression on BS medium with different supplements in three *A. vinelandii* strains.

Strain	Supplement	Alginate $\pm$ SD (mg/mg protein)	$\beta$ -gal activity $\pm$ SD (Units/mg protein)
WI12/pMSD675	-	5.37 $\pm$ 0.3	5859 $\pm$ 306
"f"	-a	3.76 $\pm$ 0.24	6180 $\pm$ 303
"f"	NaCl (50 mM) <sup>a</sup>	3.59 $\pm$ 0.29	6094 $\pm$ 385
"f"	NaCl (100 mM) <sup>a</sup>	2.76 $\pm$ 0.29	3318 $\pm$ 105
"f"	NO <sub>3</sub>	4.92 $\pm$ 0.04	5177 $\pm$ 139
"f"	NH <sub>4</sub>	4.82 $\pm$ 0.39	4805 $\pm$ 237
A2/pMSD675	-	2.83 $\pm$ 0.13	1550 $\pm$ 120
"f"	NaCl (50 mM) <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1718 $\pm$ 80
"f"	NaCl (100 mM) <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1451 $\pm$ 207
"f"	NO <sub>3</sub>	0.91 $\pm$ 0.16	559 $\pm$ 54
"f"	NH <sub>4</sub>	2.46 $\pm$ 0.15	2668 $\pm$ 162
U5/pMSD675	-	0.43 $\pm$ 0.006	69 $\pm$ 5
"f"	NaCl (50 mM) <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	89 $\pm$ 3
"f"	NaCl (100 mM) <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	91 $\pm$ 2
"f"	NO <sub>3</sub>	0.50 $\pm$ 0.002	101 $\pm$ 0.55
"f"	NH <sub>4</sub>	0.43 $\pm$ 0.35	77 $\pm$ 1.53

<sup>a</sup> These measurements were done at 48 h of growth on BS medium, and all other measurements were done at 72 h of growth on the same medium. ND = not determined

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Nucleotide sequence of *A. vinelandii* ATCC 9046 *algD* gene and its predicted amino acid coding sequence. The presumptive  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^{54}$ ),  $\sigma^E$  ( $\sigma^E$ ), and  $\sigma^D$  ( $\sigma^D$ ) promoters, and AlgR (RB) recognition sequence, are shown. The oligonucleotide used as primer for the identification of the mRNA start site is underlined. Arrows show the identified mRNA start sites.

Figure 2. Alignment of the predicted amino acid AlgD sequence from *A. vinelandii* (AV) and its homolog from *P. aeruginosa* (PA) (Accession number P11579). The alignment was done using the PILEVP program of the University of Wisconsin Genetics Computer Group.

Figure 3. Insertional inactivation of *algD* gene in *A. vinelandii* ATCC 9046 strain. (A) Schematic representation of events leading to *algD* inactivation using plasmid pMSDX7. (B) Southern blot analysis of *algD* inactivation by insertion of pMSDX7 plasmid in strain RSD1. DNA's were digested with *Pst*I endonuclease and hybridized with plasmid pMSDX7. Lanes correspond to: 1) ATCC 9046, 2) RSD1 and 3) plasmid pMSD675.

Figure 4. Construction of *algD-lacZ* transcriptional fusion in *A. vinelandii* strains (A) Schematic representation of *algD*-mini Tn5*lacZ1* insertion located on plasmid pCTD273. B) Southern blot hybridization of total genomic DNA digested with *Pst*I endonuclease

using pCTD273 as probe. Lanes correspond to the following strains: 1) ATCC 9046, 2) W112, 3) AEIV, 4) A2, 5) UW136, 6) U5.

**Figure 5.** Alginate production and  $\beta$ -galactosidase activity during the growth of strain A2/pMSD675 on BS medium.

<u>SaI</u>		
GTGCACTGACATCCCGTGTGTCAAITAGATAITCTAATGGCCATCTTTTAGCAATGAATGCCACCCCAATTGATATCAAAAAGCATTCAACAAGCGGCA		100
	----- $\sigma^E$ -----	
AAACAAAAAAATTCACCTATTCCACACTGGCCAGGGATGGCCAGGGAACTTCTCCAAGTGCACGACTCTGTATGGAGCGAAGGGGACCGCTGCTGGC	-35 -10 -24	200
	----- $\sigma^E$ -----	
AAACTGCCGAAAGGCTGCTGCCAGGGAAAGGACCGAGGAACTATTTCCGAGAAAGTATTTCTTAGGCTGCAACTATTTCGAGCCACATCGTAAACC	-12 RB -35 -10	300
ATGSAAGGACCATACAAGCCAGGAACCAATCACTACAATGAATTGGATGCTGTATGGCAAAAGATAGCGACCCGGAAGCGGGCCCATGACGAC		400
	----- $\sigma^D$ -----	
CGAACATGGATGCGCTTGAGCAGTTATAAAGCATCCCTTGCAACCTGCCCTTTTAAAGCCAGCTCATTTGGCCAGCATTTTATGACTATAATTCGGCTG	-35 -10	500
↓	<u>SaI</u> SD	
CAAATTTCCCTTGAAGCGCGCGCAATGTGACGACCAAGGGTTTTAGTCTGTCGACTTTTCGTAAATAAGGACGAGGTGAACGCCAAATCGGTATCAGCAT		600
	M R I S I	
TTTCGGACTGGGCTATGTAGGTGCAATGTCGCGGCTGTCTTTTCGGGACGTGGGCAAGTGTTCGGCTGGATATTTCCCGCCCAAGATCGACATG		700
F G L G Y V G A V C A G C L S G R G H E V V G V D I S A A K I D M		
ATCAATCAGGGCAAATCCCCCATGTCGAGCGGGACTGGGAGACTCTGCGGAGGCGTGAAGACCGGCGCTGCGCGGCAACCAACGTCGACCG		800
I N Q G K S P I V E P G L G E L L A E G V K T G R L R G T T N V T E		
AAGCGCTCTCGCCACTGAGCTGTCACTGCTTGGCTGGCAGCGAGCAAGTGAACCGGCACTGGAGCTGCACTACATGAGGAAGTTTCGCGCA		900
A V L A T E L S M L C V I G T P S K L N G D L E L D Y I E V O K A Y		
GATGGTTCGCGCTCGCGGACAGACCGAAGCCACACCGTGTGTGCGGACGACCGTCTCGCGGCAACGTCGACACGCTGTGATTCGATTC		1000
M G S A L R D K T E R H T V V V R S T V L P G T V H N V V I P I L	<i>XhoI</i>	
	<u>SaI</u>	
GAGGAGTCTCCGGCAAGAAGCGCGGCTGCACTTCGGTGTGGCGTCAACCCGAGTTCCTGGCGAGAGCACCGCGATCAAGGACTACAACCTTCCCGC		1100
E E F S G K K A G V D F G V A V N P E F L R E S T A I K D Y N F P P		
CGATGACCTGTGATCGGTGAGCTGGACAAGCCCTCGGGCGACGCTCGGCTCCATCTACCGGCACTCGACGCCCCGATCGTCGCGAAGGGCATCGCCGT		1200
M T V I G E L D K A S G R R L A S I Y A E L D A P I V R K G I A V		
CGCCGAGATGATCAAGTACACCTGCAACGCTCGGCAAGGACCAAGGTCACCTTCGCCAAGGATCGCAACATCGCAAGGCGCGCGCTGATGTC		1300
A E M I K Y T C N V W H A T K V T F A N E I G N I A K A A G V D G		
CGCGAGGTGATGGAAGTGGTCTGCAATGGACAACAAGCTCAACCTGTCCAGTACTACATGCGGCCCGCTTGGCGTTCGGCGGTTCCTGCTGCCAAGG		1400
R E V M E V V C M D N K L N L S O Y Y M R P G L A F G G S C L P K D		
ACGTGACCCGCTCAGCTACCGTGCCACCTGTGGGACATGAGGCGCCGCTGATCAGTTCGCTGATCGCGCAAGCCGCCCGGCGCAGAAAGCCTA		1500
V S A L S Y R A H L W D I E A P L I S S L M R S N L A E O V O K A Y		
CGACATGATCGCAAGCACCGCTCGCGCAAGTGTGCGCTGTCTGGCGTGAAGCTTCAAGGCGCGCACGACCTGCGCGAAGCGCCCAAGCTCGAGCTG		1500
D M I D K H G S R K V A L L G L S F K A G T D D L R E S P Q L E L	<i>XhoI</i>	
GCCGAGATGCTGATCGGCAAGGGCTCAAGCTGACATCTTCGACAGCAAGCTGAGTACGCCCGTGACACCGGCGCAACGGCCACTACATCAAGAACG		1700
A E M L I G K G F K L S I F D S N V E Y A R D H G A N G H Y I K N E		
AGATCCCCCACGCTCCCGCCTGTTCAGTCCGATCTGACAAAGGTCGTGCGGAAAGCGACGTCATCGTTCTCGGCAACCGCGATCCGCGCTCGAGAA		1800
I P H V S A L L Q S D L K V V A E A D V I V L V G N A D P R F E K		
GCTGGCAAGGAGTGCCTCGCGCGCAAGAGGTCATGACCTGGTCCGCTCATGCTCAGCGCACCGCGGTCGCGCAGAAAGGCATCTGCTGTAATCC		1900
L A K D V P A G K K V I D L V G F M P Q R T A G A A E G I C W		
GCCGCGTCCGCGCTTCGGGGCGGACTCTGGAAGGGCTGCGGACAGAACGCAACAGTCCGCGCGGACCGGCTGCGAATACAGCAGCAGGACTC		2000
AAGAGAAATTAAGCAGGCTTAAGCATGCTCTTGGAGAGGCCACC		2046

Figure 1.

AV Pa	REISIFGSLA REISIFGSLA	SSACASCT SSACASCT	GGRV A	V I	AA VST	M L	 L	 L	GE EA
AV Pa	AEVKTGKLR QQRQTGRIS	GTNVTE GTDFKKA	ATELML DSDVFI	LHGD LKHEDI	E D	LD IG	EE EET	Q CE	MS IFF
AV Pa	EDKTERHTV PEKSERHTV	VRSTVLPGT VPSTVLPGT	HNVYI NNVYI	ILLE LIFD	FSGKAGYDF CSGYAGYDF	AVNPEFL GTNPEFL	 G	 G	ES ES
AV Pa	KDYNFFPMT KDVDFPMT	IGELDYASGR IGELDYQTD	RLASI LUEEY	AELL RELL	APIVRRHGIA APIIPEITVE	REN REN	 N	 N	SH SH
AV Pa	VTFANEIGNI VTFANEIGNI	AKRAGYDGR AKAVGVDPGF	VMEVC VMDIC	MDNF QDHF	LULSQYMR LMLRYMRF	LAFGGSGL GFAFGGSGL	 F	 F	MD PDR
AV Pa	LSYRHHLWDI ITYRSQLDV	EALISSLMP HFHMLGSLMP	SMAAQVQKAY SHSNCOQYF	 F	DMIDKXGSR PLITSEDTRY	ALLGLSEFK GGLGLSEFK	 E	 E	ST TDD
AV Pa	RESFLVLELA RESFLVLELA	MLIGKGFKLS MLIGKGYEFR	IFLSUVEYAF IFLRHVEYAF	 F	DHGALGHYIK VHGALKEYIE	NEIPHVEALL SKIPHVEALL	 L	 L	QS VSD
AV Pa	KVVEA EVVSSD	LGHADPRFEK LGHGDELVD	LAKDVFAKKI LVNKTESRYF	 F	VIDLVGFMFQ LVDLVGFMFH	RTAGAAGGIC TTTAQAERIC	 C	 C	436 436

Figure 2.

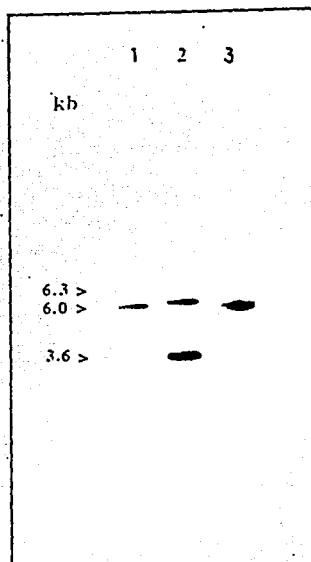
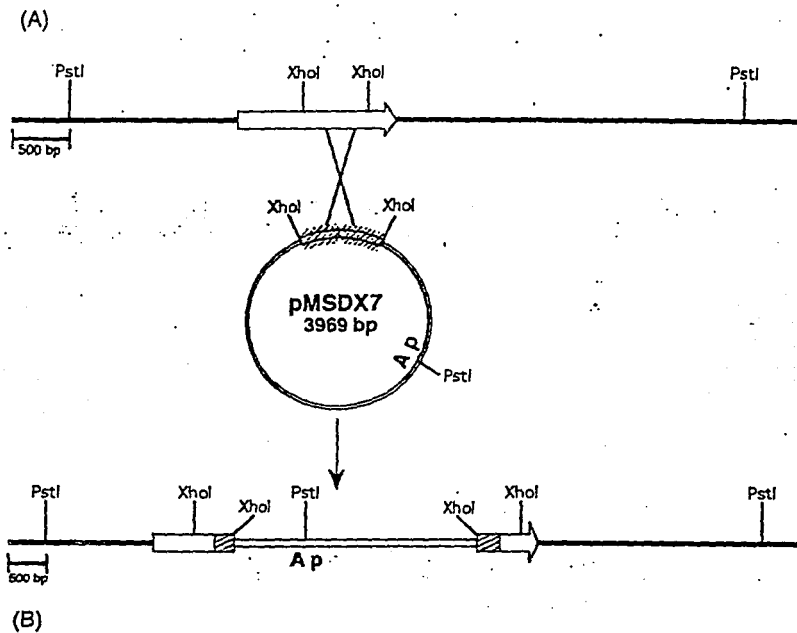
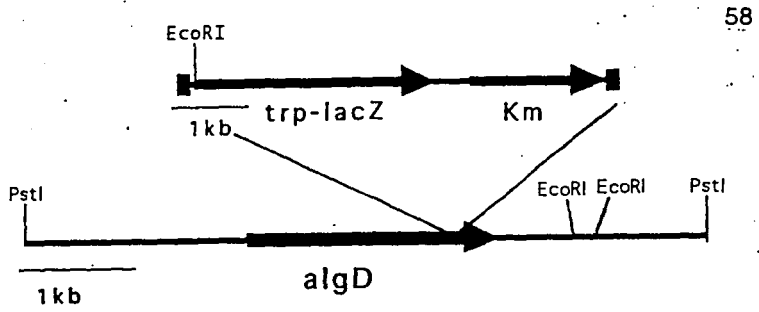


Figure 3.

(A)



(B)

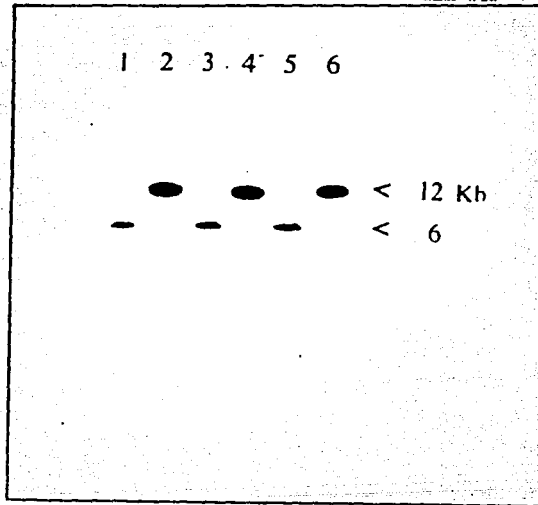


Figure 4.

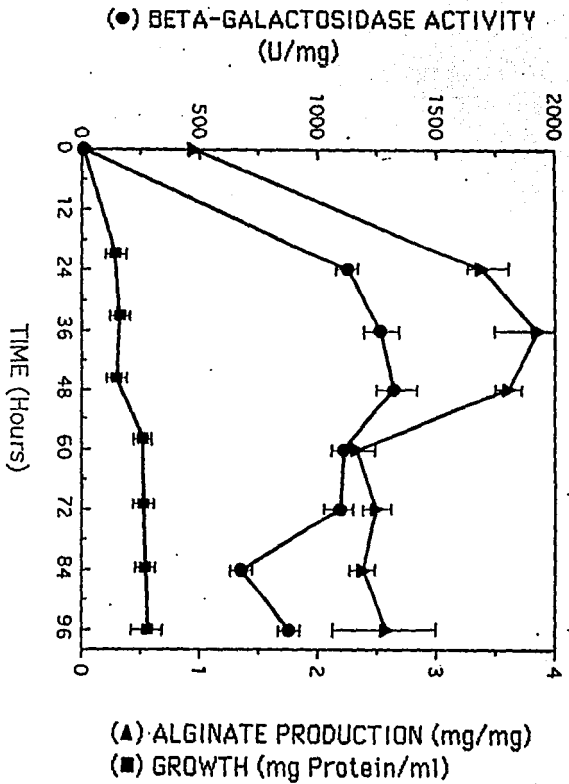


Figure 5.



C). Efecto de la temperatura sobre la expresión del gene *algD* en la cepa A2 / pMSD675.

En *P. aeruginosa*, el gene *algU* codifica para un factor  $\sigma$  alternativo inducido por estrés oxidativo y por calor y que es requerido para la transcripción de los genes *algD*, *algB*, *algR* y *algU*. AlgU es homólogo al factor  $\sigma^E$  de *E. coli*, *S. Typhimurium* y *Photobacterium* (Erickson, *et al.* 1989; Deretic, *et al.* 1994; Deretic, *et al.* 1995). En *E. coli*  $\sigma^E$  está involucrado en la transcripción de  $\sigma^{32}$ , el factor sigma del estrés por calor y *htrA*, un gene necesario para la sobrevivencia a temperaturas extremas (Erickson, *et al.* 1989; Lipinska, *et al.* 1988). En *S. typhimurium*, *htrA* es necesario para la resistencia a estrés oxidativo (Johnson, *et al.* 1991). Además la expresión del gene *algD* en la fusión transcripcional *algD-xyIE* de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* (no mucoide) es inducida por el factor  $\sigma^E$  de *E. coli* (Yu, *et al.* 1995). Cabe mencionar también que en la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* se ha reportado un incremento en la cantidad de alginato de tres veces cuando las células son crecidas a 42°C en medio LB complementado con 0.3 M de NaCl (Schurr, *et al.* 1995). En base a los antecedentes expuestos y a que el gene *algD* de *A. vinelandii* presenta dos secuencias consenso que reconoce AlgU ( $\sigma^E$ ), se evaluó el efecto de la temperatura en la expresión de *algD* y de la producción de alginato.

Las cepas WI 12 / pMSD675, A2 / pMSD675 y U5 / pMSD675 se crecieron en placas de BSKmTc a diferentes temperaturas por 72 horas. A 42°C las cepas fueron incapaces de crecer, mientras que a 37°C, sólo la cepa A2 / pMSD675 mostró un incremento en la mucoidía. Al evaluar la expresión del gene *algD*, cuantificando la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, es posible apreciar un incremento del 15 % en la expresión de *algD* y un incremento de 2.4 veces en la producción de alginato a 37°C (Tabla II). Estos datos indican que la expresión del gene *algD* y la producción de alginato son incrementadas por calor sugiriendo un mecanismo de regulación similar al encontrado en *P. aeruginosa*.

Tabla II. Efecto de la temperatura sobre la expresión del gene *algD* en la cepa A2 / pMSD675.

CEPA	TEMPERATURA (°C)	ACTIVIDAD $\beta$ -GAL	PRODUCCION DE ALGINATO
		U $\beta$ -gal mg proteína $\pm$ SD	mg alginato mg proteína $\pm$ SD
A2/pMSD675	30	934 $\pm$ 43.23	1.16 $\pm$ 0.18
A2/pMSD675	37	1104 $\pm$ 33.67	2.85 $\pm$ 0.30

El experimento se llevó a cabo creciendo las cepa A2 / pMSD675 en placas de BS con kanamicina 10  $\mu$ g/ml y tetraciclina 10  $\mu$ g/ml. Las células se dejaron en incubación a 30° C y a 37°C durante 72 horas y luego el crecimiento celular fué colectado con 20 ml de solución salina al 0.9%. La cuantificación de alginato se realizó por el método del peso seco. Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

D) Efecto del incremento en la concentración de kanamicina sobre la expresión del gene *algD* en la cepa WI 12 / pMSD675.

Se ha descrito que *A. vinelandii* puede tener varios cromosomas. Para cuantificar el número de cromosomas se han empleado experimentos de hibridación cuantitativa de genes codificados en el cromosoma como *leu* y *nif* (Nagpal, *et al.* 1989). Los resultados mostraron que la poliploidía (o número de cromosomas) es dependiente del medio de cultivo y de la fase de crecimiento, por ejemplo en medio rico y en fase estacionaria de crecimiento, es capaz de tener 80 copias de su cromosoma por célula. Por otro lado en diferentes especies bacterianas se han observado regiones del cromosoma capaces de ser amplificadas. Las amplificaciones han sido seleccionadas de diversas maneras, una de las cuales es el empleo de genes que confieren resistencia a antibióticos que responden a dosis génica.

El crecimiento de las cepas *algD-lacZ* y *algD-lacZ* / pMSD675 en medio BS con diferentes concentraciones de kanamicina, permitió observar que las cepas en altas concentraciones de kanamicina fueron más mucoides.

La actividad de *algD*, así como la cantidad de alginato producido fue analizado sólo en las cepas derivadas de la ATCC 9046, dado el interés biotecnológico que esta cepa representa por su fenotipo altamente mucóide. Al cuantificar la actividad de *algD* en las cepas WI 12 y WI 12 / pMSD675 se observó un incremento en la actividad  $\beta$ -galactosidasa en altas concentraciones de antibiótico (BSKm100  $\mu$ g/ml) correspondiente al 20% del nivel detectable en el medio de crecimiento (BSKm10). El incremento en la expresión de *algD* es reflejado en el incremento de la

producción de alginato (Tabla III) de 5.7 veces en la WI 12 y de 4.4 veces en la WI 12 / pMSD675.

Debido a que el incremento en la producción de alginato es observado en la cepa WI 12, el fenómeno parece deberse a la poliploidía de *A. vinelandii* o bien a un evento de amplificación de la región de *algD* en presencia de altas concentraciones de kanamicina.

Tabla III. Efecto del incremento en la concentración de kanamicina sobre la expresión del gene *algD* en la cepas WI 12 y WI 12 / pMSD675.

CEPA	MEDIO	ACTIVIDAD $\beta$ -GAL	PRODUCCION DE ALGINATO
		U $\beta$ -gal mg proteína $\pm$ SD	mg alginato mg proteína $\pm$ SD
WI 12	BSKm10	4971 $\pm$ 299	0.84 $\pm$ 0.09
WI 12	BSKm100	5877 $\pm$ 182	4.63 $\pm$ 0.22
WI 12/pMSD675	BSKm10Tc10	7687 $\pm$ 463	1.76 $\pm$ 0.20
WI 12/pMSD675	BSKm100Tc10	9261 $\pm$ 146	7.80 $\pm$ 0.94

Este experimento se llevó a cabo creciendo las cepas WI 12 y WI 12 / pMSD675 en placas de BSKm10 y BSKm100; y en BSKm10Tc10 y BSKm100Tc10, respectivamente. Las células se dejaron en incubación a 30°C durante 72 horas y luego el crecimiento celular fué colectado con 20 ml de solución salina al 0.9%. La cuantificación de alginato se realizó por el método del peso seco. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

## DISCUSION

En el presente trabajo se describe un estudio sobre la regulación transcripcional del gene *algD* en diferentes cepas de *Azotobacter vinelandii*. Este gene codifica para la enzima GDP-manosa deshidrogenasa esencial en la biosíntesis de alginato.

La secuencia del gene *algD* de *A. vinelandii* revela un alto grado de similitud con su homólogo en *P. aeruginosa*, presentando un 73% de identidad y un 97% de similitud. La región reguladora de *algD* muestra la presencia de dos secuencias consenso para la proteína AlgU de *P. aeruginosa* y el factor  $\sigma^E$  de *E. coli* y una secuencia consenso para el factor sigma  $\sigma^{54}$ . También existe una secuencia de reconocimiento para la proteína AlgR que es idéntica a la secuencia RB1 (CTGCTGCCA) de *P. aeruginosa*. Cabe mencionar que a partir de un banco genómico se han identificado cósmidos con genes homólogos *algR* y *algU* en *A. vinelandii*. Lo anterior sugiere la conservación de mecanismos regulatorios de la expresión del gene *algD* en *A. vinelandii*.

Para estudiar la regulación genética del gene *algD* en *A. vinelandii*, se construyó una fusión transcripcional del gene *algD* con el gene reportero *lacZ* en un vector no replicable en *A. vinelandii*. Esta fusión fue integrada al cromosoma de tres cepas de *A. vinelandii* con diferente fenotipo mucoide, a través de un evento de doble recombinación homóloga. La fusión *algD-lacZ* permitió evaluar la expresión de *algD* por medio de la actividad reportera  $\beta$ -galactosidasa.

El análisis de expresión del gene *algD* en las cepas *algD-lacZ* de *A. vinelandii*, reveló que en este microorganismo hay una correlación directa entre la expresión del gene *algD* y la producción de alginato (fenotipo mucoide). Es decir, la cepa WI 12, derivada de la cepa ATCC 9046 que produce la mayor cantidad de alginato (4.47 mg/mg proteína), presentó la más alta actividad de  $\beta$ -galactosidasa, la cepa U5 derivada de la cepa UW 136 que produce la menor cantidad de alginato (0.73 mg/mg proteína), presentó el valor más bajo y la cepa A2, derivada de la cepa AEIV que produce niveles intermedios de alginato (1.74 mg/mg proteína), presentó un nivel intermedio en la actividad de  $\beta$ -galactosidasa.

Es importante mencionar que la construcción de la fusión transcripcional *algD-lacZ* en las tres cepas de *A. vinelandii*, fue realizada con el gene *algD* proveniente de la cepa ATCC 9046. Los resultados anteriormente mencionados indican que la región *algD* de la ATCC 9046 no afectó la expresión genética de este gene en cada cepa. Esto puede deberse a que el reemplazamiento genético no incluyó la región promotora o a que en las cepas la región promotora es idéntica. En ambos casos la regulación genética de *algD* será dependiente de los factores reguladores que estan

presentes en las diferentes cepas.

La cepa RSD1 que contiene una mutación a nivel estructural del gene *algD* en la cepa ATCC 9046 es incapaz de producir alginato, mientras que la cepa WI 12 con una mutación en el mismo gene es capaz de producir el 25 % de alginato con respecto a la cepa parental (Tabla 2 del manuscrito). Esta diferencia puede deberse a que en la cepa WI 12 la inserción del mini transposón se localizó en el extremo 3' del gene *algD* (Fig. V), por lo que *algD* puede codificar para una proteína GDP-manosa deshidrogenasa con actividad residual. Sin embargo, esta construcción es útil para estudiar la expresión del gene *algD* en otros procesos metabólicos íntimamente relacionados a la síntesis de alginato en *A. vinelandii*, tal como la producción de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) y el proceso de enquistamiento que requiere de la producción de ambos polímeros (alginato y PHB).

En forma similar a lo reportado en *P. aeruginosa*, la expresión del gene *algD* está incrementada en cepas mucoides de *A. vinelandii*, por lo que se deduce que en este microorganismo al igual que en *P. aeruginosa* la expresión del gene *algD* tiene un papel relevante en la biosíntesis de alginato (Deretic, *et al.* 1987). Sin embargo, cuando el gene *algD* de *P. aeruginosa* es sobreexpresado a partir de un vector inducible con IPTG, hay un incremento en la concentración de GDP-manuronato pero no en la producción de alginato (Tatnell, *et al.* 1994), esto sugiere la dependencia de otras actividades biosintéticas para la sobreproducción de alginato.

La introducción del pMSD675 muestra un incremento de más de 4 veces en la expresión del gene *algD* en las cepas WI 12 y A2 derivadas de las cepas mucoides ATCC 9046 y AEIV respectivamente (Tabla 2 del manuscrito), así como un notable incremento en la producción de alginato. En el pMSD675 se han encontrado los genes *algD*, *algA* y *algL*. La organización estructural de estos genes puede ser similar a la descrita en *P. aeruginosa*, en donde *algD* y *algA* se localizan en los extremos del operón biosintético. Las posibles explicaciones del incremento en la producción de alginato pueden ser: (a) la presencia de un activador de la expresión de *algD* en el pMSD675, (b) el pMSD675 puede titular algún represor de la expresión *algD*, resultando en un incremento de su expresión. (c) varias copias del pMSD675 generan una mayor producción de varias enzimas biosintéticas necesarias para la producción de alginato.

Para medir simultáneamente la transcripción de *algD* y la producción de alginato en diferentes condiciones ambientales, las cepas *algD-lacZ* fueron complementadas con el pMSD675. Las condiciones analizadas fueron la concentración de NaCl, fuente de nitrógeno como NH<sub>4</sub> y nitrato, temperatura e incremento en la concentración de kanamicina. La respuesta observada ante la presencia de estos factores ambientales fue diferente para cada cepa estudiada. La cepa no mucoide UW 136, no presentó alteraciones en la expresión de *algD* y de producción de alginato y en todas las condiciones probadas esta cepa tiene los niveles más bajos. Por otro lado, la cepa más mucoide

ATCC 9046, presentó el nivel más alto de expresión del gene *algD* y de producción de alginato bajo todas las condiciones de cultivo.

La cepa AEIV de *A. vinelandii* que presenta un fenotipo mucoide intermedio, mostró diferentes respuestas en las condiciones analizadas. En presencia de nitrato como fuente de nitrógeno, se apreció una disminución tanto de la expresión del gene *algD*, como en la cantidad de alginato (Tabla 3 del manuscrito), mientras que en presencia de  $\text{NH}_4$ , se detectó un incremento en la transcripción del gene *algD* pero no en la producción de alginato (Tabla 3 del manuscrito). El crecimiento de la cepa en presencia de  $\text{NH}_4$  podría favorecer otro proceso metabólico diferente a la síntesis de alginato en este microorganismo complejo. Por otra parte, en presencia de nitrato, probablemente el alginato pueda estar siendo degradado o bien que la actividad biosintética de otra enzima y no la actividad de la enzima GDP-manosa deshidrogenasa sea el paso limitante en la producción de alginato.

En *P. aeruginosa*, se ha propuesto que factores como, la alta osmolaridad (Berry, *et al.* 1989), limitación de fuente de nitrógeno (Deretic, *et al.* 1990) y temperatura (Leitao, *et al.* 1992), afectan positivamente la transcripción de *algD* y la producción de alginato. Es importante notar que los estudios sobre regulación ambiental fueron realizados en cepas mutantes de *P. aeruginosa* con fenotipo mucoide. Ahora podemos correlacionar los datos y observar que la regulación ambiental de la producción de alginato depende del tipo de mutaciones *muc* presentes (Deretic, *et al.* 1990; Schurr, *et al.* 1993). Cepas mutantes en *mucA* responden positivamente a la presencia de altas concentraciones de NaCl con un incremento en la transcripción de *algD* y del fenotipo mucoide, mientras en la cepa mutante en *algW* (*muc-23*) las mismas condiciones, producen un efecto contrario. La fuente de nitrógeno también afecta a las cepas *mucA*, sin embargo la respuesta es dependiente del tipo de mutación. La cepa *mucA2* tiene una duplicación de 8 pb que genera un codón de terminación fuerte en *mucA*, presenta un fenotipo no mucoide en presencia de  $\text{NH}_4$  como fuente de nitrógeno, pero adquiere un fenotipo mucoide con nitrato y un incremento de 22 veces en la expresión de *algD*, sin embargo la cepa *mucA22* con una delección de una citosina que genera un codón de terminación débil en *mucA* muestra una respuesta modesta, con un incremento de dos veces en la transcripción de *algD* en presencia de nitrato (Deretic, *et al.* 1990).

Análisis recientes de las cepas UW 136 y ATCC 9046 han permitido conocer que *A. vinelandii*; también posee los genes *algUmucAmucBmucCmucD* homólogos de *P. aeruginosa* (Martinez-Salazar, datos no publicados). En el caso de la cepa UW 136 se encontró que una secuencia de inserción interrumpe al gene *algU* (Martinez-Salazar, datos no publicados). En *P. aeruginosa* *algU* codifica para el factor sigma involucrado en la transcripción de los genes *algD*, *algR*, *algB* y *algU*; así como de algunos genes de respuesta a estrés oxidativo y al calor.

AlgU, comparte homología con el factor  $\sigma^E$  de *Escherichia coli* (Deretic, *et al.* 1995) involucrado en la expresión de  $\sigma^{32}$ , el factor sigma del estrés por calor en *E. coli*, y *htrA*, un gene necesario para la sobrevivencia bajo temperaturas extremas en *E. coli* o bajo estrés oxidativo en *S. typhimurium*. (Erickson, *et al.* 1989; Lipinska, *et al.* 1988; Johnson, *et al.* 1991). El análisis de la secuencia de la región *algUmucAB* de la cepa ATCC 9046, permitió la identificación de una mutación puntual en el gene *mucA*, esta mutación es conservada y no altera la secuencia de la proteína. Este defecto, no explica el fenotipo mucoide, sin embargo, es posible que posea otra mutación en los genes *mucC*, *mucD* o *algW* que favorezca la expresión constitutiva del gene *algD*. Los genes *mucD* y *algW* codifican para proteínas homólogas a la serin-proteasa HtrA de bacterias entéricas involucrada en la proteólisis de proteínas anormales necesarias en la resistencia al estrés oxidativo y por calor (Boucher, *et al.* datos no publicados).

Dado que la secuencia del gene *algD* de *A. vinelandii* revela la presencia de dos secuencias de reconocimiento para la proteína AlgU de *P. aeruginosa* y el factor  $\sigma^E$  de *E. coli*, a nivel de la región promotora, muy probablemente una proteína homóloga a estas podría ser el factor sigma necesario para la expresión del gene *algD* en *A. vinelandii*. El análisis genético de la cepa ATCC 9046 por complementación con un plásmido que porta la región *algUmucAB* de *P. aeruginosa*, señaló que el fenotipo altamente mucoide en esta cepa, puede ser suprimido por la presencia de este plásmido (Martinez-Salazar, datos no publicados). Lo anterior sugiere que existe una deficiencia en el control negativo sobre la expresión de la proteína AlgU, lo cual permite un nivel más alto en la expresión del gene *algD*.

Las cepa de A2 / pMSD675 derivada de la cepa AEIV en condiciones de estrés por calor, responde con un incremento en la expresión del gene *algD* y de la producción de alginato (Tabla II). Cabe mencionar que se ha reportado en la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* un incremento en la producción de alginato de tres veces cuando las células son crecidas en presencia de 0.3 M de NaCl y a 42° C (Schurr, *et al.* 1995). En *E. coli*, la temperatura y el etanol son factores que inducen la expresión del factor alternativo  $\sigma^E$  involucrado en la respuesta a estrés por calor (Mecsas, *et al.* 1993). Por lo anterior es probable que en *A. vinelandii* la proteína AlgU ( $\sigma^E$ ) homóloga, esté involucrada en la respuesta a estrés por calor.

Las cepas *algD-lacZ* y *algD-lacZ* / pMSD675 presentan un incremento de su fenotipo mucoide en presencia de altas concentraciones de kanamicina. En las mismas condiciones la expresión de *algD* y la producción de alginato se incrementan tanto en la cepa WI 12 como en su derivada WI 12 / pMSD675. Debido a que el incremento en la producción de alginato es observado en la cepa WI

12, el fenómeno puede reflejar la poliploidía de *A. vinelandii* o bien un evento de amplificación de la región de *algD* en estas condiciones de crecimiento.

El presente estudio proporciona los primeros indicios respecto al modo de regulación del gene *algD* en *A. vinelandii*. Los datos obtenidos hasta el momento reflejan una gran similitud a los mecanismos regulatorios que gobiernan la biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa*. *A. vinelandii* representa una buena fuente de obtención de alginato bacteriano por vía fermentativa y el conocimiento de los factores que inducen una mayor y mejor producción de alginato permitirá controlar su producción a nivel fermentativo y la obtención de un producto con propiedades reológicas de interés industrial.



## CONCLUSIONES

- La inserción del miniTn5*lacZ* en el extremo 3' del gene *algD* de *A. vinelandii*, no inactivó completamente la función de la enzima GDP-manosa deshidrogenasa.
- La regulación de *algD* depende de los factores transcripcionales presentes o ausentes en cada cepa de *A. vinelandii*.
- En analogía con *P. aeruginosa*, la expresión del gene *algD* está incrementada en cepas mucoides de *A. vinelandii*.
- Existe una estrecha correlación entre la transcripción del gene *algD* y la producción de alginato en cepas de *A. vinelandii* con diferente fenotipo mucoide, sugiriendo que la actividad de esta enzima juega un papel importante en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*.
- La sobreexpresión de actividades enzimáticas importantes como el producto de los genes *algD* y *algA* contenidos en el pMSD675 resulta en una mayor producción de alginato en las cepas WI 12 y A2 de *A. vinelandii*.
- El aumento en la transcripción del gene *algD* por complementación de las cepas WI 12 y A2 de *A. vinelandii* con el pMSD675, sugiere la presencia de un activador transcripcional de este gene en el plásmido.
- A diferencia de lo reportado en *P. aeruginosa*, las condiciones de estrés osmótico por concentración de NaCl y fuente de nitrógeno no regulan positivamente la expresión del gene *algD* en *A. vinelandii*, sin embargo condiciones de estrés por calor o por incremento en la concentración de kanamicina inducen una mayor producción de alginato y expresión del gene *algD*, aunque la respuesta depende de cada cepa.

## PERSPECTIVAS

Diversos estudios pueden ser realizados para comprender mejor los mecanismos regulatorios involucrados en la expresión del gene *algD* y de otros genes *alg* importantes en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*.

-Dado que la secuencia del gene *algD* de *A. vinelandii* muestra la presencia de dos secuencias consenso reconocidas por el factor sigma AlgU de *P. aeruginosa* podría probarse si este es el factor sigma requerido para la transcripción del gene *algD* en *A. vinelandii* mediante el análisis de la expresión de *algD* y la producción de alginato en la cepa U5 complementada con *algU*.

-La complementación de cepas de *P. aeruginosa* mutantes en *algU* con el gene homólogo de *A. vinelandii* podría mostrar la equivalencia funcional de este gene en ambos microorganismos.

-Mediante mutagénesis con transposones o por análisis de delección del pMSD675 que contiene un fragmento de 25 kb del genoma de *A. vinelandii*, es posible caracterizar al posible activador transcripcional de la expresión del gene *algD*.

-Experimentos de hibridación cuantitativa del gene *algD* en las cepas *algD-lacZ* de *A. vinelandii* crecidas en altas y bajas concentraciones de kanamicina, podría revelar si bajo estas condiciones se manifiesta el caracter poliploíde de *A. vinelandii*, o está asociado a un evento de amplificación de la región de *algD*.

-El uso de la fusión transcripcional *algD-lacZ*, para estudiar la expresión del gene *algD* en otros procesos metabólicos propios de *A. vinelandii*, tal como el proceso de enquistamiento que requiere de la producción de alginato o la producción de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB).

## BIBLIOGRAFIA

- Annison, G., and Lain C.** 1986. Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 55-61.
- Bali, A., G. Blanco. S. Hill, and C. Kennedy.** 1992. Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1711-1718.
- Berry, A., J. D. DeVault, and A. M. Chakrabarty.** 1989. High osmolarity is a signal for enhanced *algD* transcription in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Bacteriol.* **171**: 2312-2317.
- Boyd, A., M. Ghosh, T. B. May, D. Shinaberger, R. Koegh, and A. M. Chakrabarty.** 1993. Sequence of the *algL* gene of *Pseudomonas aeruginosa* and purification of its alginate lyase product. *Gene.* **131**: 1-8.
- Chakrabarty, A. M.** 1991. Molecular genetics and environmental regulation of alginate biosynthesis. *Appl. Phycology. Forum.* **8**: 1-6
- 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.
- Darzins, A., S. K. Wang, R. I. Wanags, and A. M. Chakrabarty.** 1985. Clustering of mutations affecting alginic acid biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **164**: 516-524.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 Transposon Derivatives for Insertion Mutagenesis, Promoter Probing, and Chromosomal Insertion of Cloned DNA in Gram-Negative Eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6568-6572.
- 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. Acids. Research.* **15**: 4567-4581.
- Deretic, V., R. Diksit, 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. R. W. Govan, W. M. Konyecsni, and D. W. Martin.** 1990. Mucooid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: Mutations in the *muc* loci affect transcription of the *algR* and the *algD* genes in response to environmental stimuli. *Mol. Microbiol.* **4**: 189-196.
- Deretic, V., J. H. J. Leveau, C. D. Mohr, and N. S. Hibler.** 1992. In vitro phosphorylation of AlgR, a regulator of mucooidy in *Pseudomonas aeruginosa*, by a histidine protein 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 mucooidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J. Bacteriol.* **176**: 2773-2780.
- Deretic, V., M. J. Schurr, and H. Yu.** 1995. *Pseudomonas aeruginosa*, mucooidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. *Trends Microbiol.* En prensa.
- Devries, C. A., and D. E., Ohman.** 1994. Mucooid-to-nonmucooid conversion in alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* often results from spontaneous mutations in *algT*, encoding a putative alternate sigma factor, and shows evidence for autoregulation. *J. Bacteriol.* **176**: 6677-6687.
- Erickson, 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. Hals, A. Rian, 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.
- Fialho, A. M., N. A. Zielinski, W. F. Fett, A. M. Chakrabarty and A. Berry.** 1990. Distribution of alginate gene sequences in the *Pseudomonas* rRNA homology group I-A *Azomonas-Azotobacter* lineage of superfamily HB. prokaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 436-443.
- Fyfe, J. A. M., and J. R. W. Govan.** 1980. Alginate synthesis in mucooid *Pseudomonas aeruginosa*: a chromosomal locus involved in control. *J. Gen. Microbiol.* **119**: 443-450.
- 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-mannuronan epimerase. *J. Bacteriol.* **176**: 1821-1830.
- Fujiwara, S., N. Zielinski, and A. M. Chakrabarty.** 1993. Enhancer-like activity of

- AlgR1-binding site in alginate gene activation: positional, orientational, and sequence specificity. *J. Bacteriol.* **175**: 5452-5459.
- 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 regulators. *Mol. Microbiol.* **6**: 59-66.
- Goldberg, J. B., K. Hatano, and G. B. Peir.** 1993. Synthesis of lipopolysaccharide O side chains by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 requires the enzyme phosphomannomutase. *J. Bacteriol.* **175**: 1605-1611.
- Haug, A., and B. Larsen.** 1971. Biosynthesis of alginate. II. Polymannuronic acid C5-epimerase from *Azotobacter vinelandii*. *Carbohydr. Res.* **17**: 297-308
- Jarman, T. R., L. Deavin, S. Slocombe and R. C. Righelato.** 1978. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 59-64.
- Johnson, K., I. Charles, G. Dougan, D. Pickard, P. O'Gaora, G. Costa, T. Ali, I. Miller, and C. Hormaeche.** 1991. The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. *Mol. Microbiol.* **5**: 401-407.
- Kato, J., and A. M. Chakrabarty.** 1991. Purification of the regulatory protein AlgR1 and its binding in the far upstream region of the *algD* promoter in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 1760-1764.
- Kennedy, C., and A. Toukdarian.** 1987. Genetics of Azotobacters: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 227-258.
- Konyecsni, W. M., and V. Deretic.** 1990. DNA sequence and expression analysis of *algP* and *algQ*, components of the multigene system transcriptionally regulating mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: *algP* contains multiple direct repeats. *J. Bacteriol.* **172**: 2511-2520.
- Leitao, J. H., A. M. Fialho, and I. Sa-Correia.** 1992. Effects of growth temperature on alginate synthesis and enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* variants. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 605-610.
- Lin, 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.
- Lipinska, B., S. Sharma, and C. Georgopoulos.** 1988. Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a  $\sigma^{32}$ -independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res.* **16**: 10053-10067.
- Maharaj, R., T. B. May, S.-K. Wang, and A. M. Chakrabarty.** 1993. Sequence of the *alg8* and *alg44* genes involved in the synthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*.

136: 267-269.

**Maldonado, R., J. Jiménez and J. Casades.** 1994. Changes in ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *J. Bacteriol.* **176**: 3911-3919.

**Martin, D. W., B. W. Holloway, and V. Deretic.** 1993a. Characterization of a locus determining the mucoid status of *Pseudomonas aeruginosa*: AlgU shows sequence similarities with a *Bacillus sigma* factor. *J. Bacteriol.* **175**:1153-1164.

**Martin D. W., M. J. Schurr, M. H. Mudd, J. R. W. Govan, B. W. Holloway, and V. Deretic.** 1993b. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:8377-8381.

**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  $\sigma^E$  an stress response. *J. Bacteriol.* **176**:6688-6696.

**Martinez-Salazar, J.** Datos no publicados.

**May, T. B.; Dean S.; Romilla M.; Junichi K.; Lein C.; James D. D.; Siddartha R.; Nicolette A. Z.; Alan B.; Randi K. R.; Tapank M.; and A. M. Chakrabarty.** 1991. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infection of cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. 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.

**Mecas, J., P. E., Rouviere, J. W., Erickson, T. J. Donohue, and C. A. Gross.** 1993. The activity of  $\sigma^E$ , an *Escherichia coli* heat-inducible  $\sigma$ -factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* **7**: 2618-2628.

**Mohr C. D., N. S. Hibler, and V. Deretic.** 1991. AlgR, a response regulator controlling mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to the FUS sites of the *algD* promoter located unusually far upstream from the RNA start site. *J. Bacteriol.* **173**: 5136-5143.

**Mohr, C. D., and V. D. 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*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**:837-844.

**Nagpal, P., M. A. Reddy and H. K. Das.** 1989. Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **171**: 3133-3138.

**Page W., and H. L. Sadoff.** 1975. Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **122**: 145-151.

**Pindar, D. F., and C. Bucke.** 1975. The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter*

*vinelandii*. *Biochem. J.* **152**:617-622.

Schiller, N. L., S. R. Monday, C. M. Boyd, N. T. Keen, and D. E. Ohman. 1993. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase gene (*algL*): cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 4780-4789.

Shinabarger, D., A. Berry, T. B. May, R. Rothmel, A. Fialho, and A. M. Chakrabarty. 1991. Purification and characterization of phosphomannose isomerase-guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase a bifunctional enzyme in the alginate biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **266**:2080-2088.

Schurr, M. J., D. W. Martin, M. H. Mudd, N. S. Hibler, J. C. Boucher, and V. Deretic. 1993. The *algD* promoter: regulation of alginate production by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cell. Mol. Biol. Res.* **39**:371-376.

Schurr, M. J., H. Yu, J. C. Boucher, N. S. Hibler, and V. Deretic. 1995. Multiple Promoters and induction by heat shock of the gene encoding the alternative sigma factor AlgU ( $\sigma^E$ ) which controls mucoidy in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **177**: 5670-5679.

Shinabarger, D., 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.

Sutherland, I. W. 1985. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**: 243-270.

Tatnell, P. J., N. J. Russell, P. Gacesa. 1994. GDP-mannose dehydrogenase is the key regulatory enzyme in alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence from metabolite studies. *Microbiol.* **140**: 1745-1754.

Venturi, V., C. Ottevanger, J. Leong, and P. Weisbeek. 1993. Identification and characterization of a siderophore regulatory gene (*pfra*) of *Pseudomonas putida* WCS358: homology to the alginate regulatory gene *algQ* of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **10**: 63-73.

Wozniak, D. J., and D. E. Ohman. 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.

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., M. J. Schurr, and V. Deretic. 1995. Functional equivalence of *Escherichia coli*  $\sigma^E$  and *Pseudomonas aeruginosa* AlgU: *E. coli* *rpoE* restores mucoidy and reduces sensitivity to reactive oxygen intermediates in *algU* mutants of *P. aeruginosa*. *J. Bacteriol.* En prensa.