



03072

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

9
24

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
UACPyP/CCH

**Identificación de genes reguladores
de la biosíntesis de alginato en
Azotobacter vinelandii.**

TESIS

Que para obtener el grado de
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA
Presenta: ^{xiro}
Q.F.B. Cinthia E.^{re} Núñez López

Cuernavaca, Morelos 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

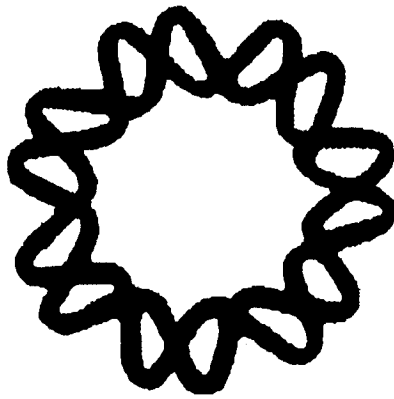


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Esta tesis se realizó en el Instituto de Biotecnología/UNAM, en el Departamento de Microbiología Molecular bajo la dirección de la Dra. E. Guadalupe Espín O.

Agradecimientos

A la Dra. Guadalupe Espín por brindarme su valioso apoyo.

A mis cotutores los Dres. Gloria Soberón Ch., Alejandra Vázquez R. y Federico Sánchez R., por su importante aportación en el desarrollo experimental del proyecto y en la preparación de la tesis.

A mis compañeros y amigos.

A mi familia.

A Luis.

**A mis padres, Minerva y
Esteban y a mis hermanos
con infinito amor.**

INDICE

	Pg
1) RESUMEN	1
2) INTRODUCCION	3
2.1 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	3
2.2 El alginato, estructura química y fuentes de obtención	3
2.3 Bioquímica y genética molecular de la biosíntesis de alginato	5
2.4 Regulación de la transcripción del gen <i>algD</i> en <i>P. aeruginosa</i>	9
2.5 Mutaciones y factores medioambientales que resultan en la sobreproducción de alginato en <i>P. aeruginosa</i> .	11
3) ANTECEDENTES	13
Genética molecular de la biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i>	
3.1 Genes estructurales	13
3.2 Regulación de la transcripción del gen <i>algD</i>	15
3.3 Genes reguladores	16
4) OBJETIVOS	18
5) MATERIALES Y METODOS	19
5.1 Cepas y plásmidos	19
5.2 Medios de cultivo	20
5.3 Mutagénesis al azar	20
5.4 Identificación de mutantes con alteraciones en la transcripción de <i>algD</i> .	22
5.5 Transformación	22
5.6 Cuantificación de alginato	22
5.7 Cuantificación de la actividad de β -galactosidasa	24
5.8 Cuantificación de proteína	24

5.9 Hibridación tipo "Southern"	24
6) RESULTADOS Y DISCUSION.	25
6.1 Obtebción de un banco de mutantes	25
6.2 Identificación de mutantes con alteraciones en la transcripción del gen <i>algD</i> .	25
6.3 Las mutantes RC26 y AC28 portan el miniTn5/ <i>luxAB</i>	27
6.4 Cuantificación de β -galactosidasa en las cepas RC26 y AC28	29
6.5 Construcción de cepas derivadas de la ATCC 9046, AEIV y UW136 que contienen las mutaciones <i>muc26</i> y <i>muc28</i> .	31
6.6 Efecto de las mutaciones <i>muc26</i> y <i>muc28</i> sobre la producción de alginato en cultivos desarrollados en medio solido	32
6.7 Efecto de las mutaciones <i>muc26</i> y <i>muc28</i> sobre la producción de alginato en cultivos desarrollados en medio líquido.	33
6.8 Efecto de las mutaciones <i>muc26</i> y <i>muc28</i> sobre la producción volumétrica de alginato.	34
6.9 Las mutaciones <i>muc26</i> y <i>muc28</i> estan ligadas al gen <i>algU</i> .	35
6.10 Los <i>locus muc26</i> y <i>muc28</i> no corresponden a los contenidos en los cósmidos pSMU588, pSMU865 y pMSU986.	36
6.11 Posibles funciones de los locus <i>muc26</i> y <i>muc28</i> .	36
7) CONCLUSIONES	42
8) PERSPECTIVAS	44
9) BIBLIOGRAFIA	46

1.- RESUMEN

El alginato es un polímero que posee amplia aplicación industrial como agente gelificante y viscosificante, actualmente su única fuente de obtención la constituyen las algas marinas cafés. *Azotobacter vinelandii* es una bacteria capaz de producir grandes cantidades de este polisacárido, constituyendo una fuente potencial de obtención de alginato por vía fermentativa.

Conocer la genética molecular de esta ruta biosintética es un paso indispensable para la construcción de cepas con capacidades mejoradas en la producción de este polisacárido. Para entender la biología molecular de su regulación y, específicamente, con el objeto de identificar genes reguladores, en el grupo de la Dra. Gloria Soberón se construyeron cepas que poseen el gen *algD* (cuyo promotor es blanco importante de regulación en la biosíntesis de alginato) en fusión transcripcional con el gen reportero *lacZ*. De esta manera, la actividad del promotor de *algD* puede ser estimada de manera indirecta por los niveles de actividad de β -galactosidasa.

En el presente trabajo, la cepa WI12, una de las cepas que poseen la construcción *algD::lacZ*, se sometió a una mutagénesis al azar con el transposón *miniTn5luxAB*. En placas con X-gal se identificaron dos cepas que exhibieron un color más azul que la cepa parental, sugiriendo que eran mutantes en las que el gen *algD* se sobreexpresada; a estas mutaciones se les denominó *muc26* y *muc28*, portadas por las cepas RC26 y AC28, respectivamente.

Se realizó una cinética de actividad de β -galactosidasa, con las mutantes y con la cepa parental WI12, en las diferentes fases de la curva de crecimiento. Al inicio de la fase logarítmica, se observó una drástica caída de la actividad de β -galactosidasa en las tres cepas; Sin embargo, al final de la fase logarítmica, en las mutantes se alcanzan niveles elevados de β -galactosidasa, mientras que en la cepa parental sólo se observa un pequeño aumento hasta la fase preestacionaria. El aumento neto en la transcripción del gen *algD* durante la curva de crecimiento, medido como el aumento en la actividad de β -galactosidasa, fue del 73 y 45% en las mutantes RC26 y AC28, respectivamente. Para evaluar el efecto de las mutaciones sobre la producción de alginato, éstas se transfirieron por transformación a 3 cepas de *A. vinelandii*. Se observó que ambas mutaciones elevan la producción específica de

alginato, pero depende del tipo de medio de cultivo utilizado, sólido o líquido, y también, del fondo genético de la cepa ensayada. Estos resultados nos sugieren, que las mutaciones *muc26* y *muc28* han interrumpido genes cuyos productos regulan negativamente la biosíntesis de alginato.

El gen *algU* codifica para un factor sigma (σ^E) involucrado en el reconocimiento y activación de promotores de genes de la biosíntesis de alginato, para inicio de la transcripción de los mismos. La cepa UW136 posee una inserción en este gen y por ello es incapaz de producir alginato. Cuando se transfirieron las mutaciones *muc26* y *muc28* a esta cepa, se restableció la producción de este polisacárido. Estos resultados nos permitieron concluir que dichas mutaciones están ligadas al gen *algU*.

2.- INTRODUCCION

2.1) Generalidades de *Azotobacter vinelandii*.

Azotobacter vinelandii es un bacilo Gram negativo, móvil a través de flagelos peritricos, aeróbio estricto y cuyo hábitat natural es el suelo. Esta bacteria posee varias características y capacidades metabólicas que la hacen interesante: 1.- Fija nitrógeno atmosférico en condiciones aeróbicas [Kennedy y Toukdarian, 1987]; 2.- Su consumo de oxígeno es 10 veces mayor que el observado en *Escherichia coli*; 3.- Llega a tener hasta 80 copias de su genoma durante la fase estacionaria de cultivos crecidos en medio rico [Maldonado, et al. 1994]; 4.- Es un buen receptor de DNA introducido por transformación y de plásmidos introducidos por conjugación, además de tener la capacidad de incorporar DNA a su cromosoma por recombinación [Kennedy y Toukdarian, 1987]; 5.- Produce sideróforos, reguladores del crecimiento de plantas, como auxinas, giberelinas y citokininas [González-López, et al. 1985] y dos polímeros de importancia comercial: polihidroxibutirato y alginato [Sadoff 1975]; 6.- Forma quistes resistentes a la desecación bajo condiciones adversas o en respuesta a ciertos agentes químicos (p. e. n-butanol).

El proceso de diferenciación que sufre *A. vinelandii* dura de 3 a 5 días y produce células en estado latente rodeadas de dos capas, una interna llamada intina y otra externa llamada exina; estas capas están compuestas principalmente de proteínas y del exopolisacárido alginato [Sutherland, 1985; Sadoff, 1975]. Se ha demostrado que la producción de alginato es indispensable para que se lleve a cabo este proceso de diferenciación. Mutantes que tienen bloqueada esta ruta biosintética son incapaces de formar quistes maduros [Campos, et al. 1996].

2.2) El alginato: estructura química y fuentes de obtención.

El alginato es un copolímero lineal compuesto de residuos de ácido β -D-manurónico (M) y su epímero el ácido α -L-gulurónico (G) unidos por enlaces β (1-4) (fig. 1) [May, et al. 1991]. Este polisacárido tiene la capacidad de formar geles en presencia de cationes divalentes. Dicha capacidad depende de la cantidad de residuos G, así como de su distribución; una mayor cantidad de

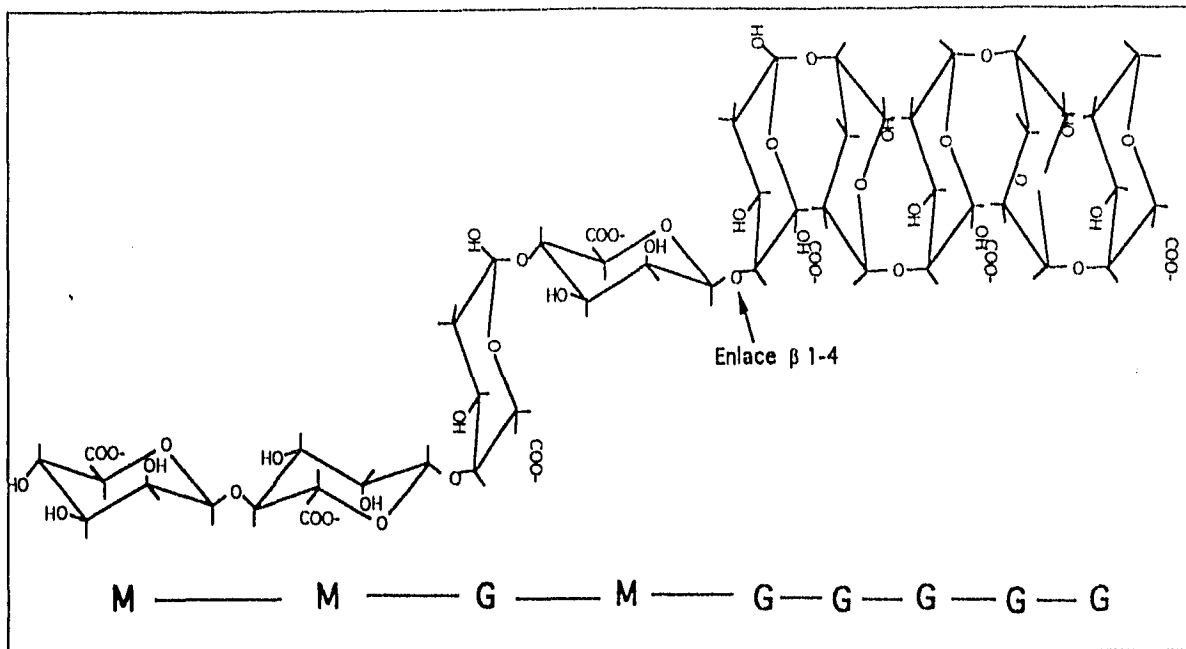


Figura 1.- Estructura del Alginato en *Azotobacter vinelandii*

M - M - M - M - G - G - G - M - G - M - G	Algal
M - M - M - M - G - G - G - M - G - M - G OAc OAc OAc OAc	<i>A. vinelandii</i>
M - M - M - M - M - M - M - M - M - M - G OAc OAc OAc OAc OAc	<i>P. aeruginosa</i>
M - M - M - M - M - M - G - M - G - M - G OAc	<i>P. pútida</i> <i>P. fluorescens</i>

Fig. 2.- Distribución de bloques de residuos Manurónicos (M) y Gulurónicos (G) en los diversos alginatos. A diferencia del alginato algal, el bacteriano se encuentra O-acetilado (OAc).

resíduos. Com o intuito de garantir a qualidade
colimada, foi desenvolvido um sistema de controle de qualidade
e a gestão de resíduos, visando a redução dos impactos ambientais
decorrentes das atividades operacionais da empresa.

A fim de garantir a qualidade dos produtos e serviços oferecidos
aos clientes, a empresa adotou um sistema de controle de qualidade
baseado na norma ISO 9001:2015, visando a melhoria contínua
dos processos operacionais e a redução dos riscos associados
às atividades operacionais.

A fim de garantir a qualidade dos produtos e serviços oferecidos
aos clientes, a empresa adotou um sistema de controle de qualidade
baseado na norma ISO 9001:2015, visando a melhoria contínua
dos processos operacionais e a redução dos riscos associados
às atividades operacionais.

A fim de garantir a qualidade dos produtos e serviços oferecidos
aos clientes, a empresa adotou um sistema de controle de qualidade
baseado na norma ISO 9001:2015, visando a melhoria contínua
dos processos operacionais e a redução dos riscos associados
às atividades operacionais.

A fim de garantir a qualidade dos produtos e serviços oferecidos
aos clientes, a empresa adotou um sistema de controle de qualidade
baseado na norma ISO 9001:2015, visando a melhoria contínua
dos processos operacionais e a redução dos riscos associados
às atividades operacionais.

A fim de garantir a qualidade dos produtos e serviços oferecidos
aos clientes, a empresa adotou um sistema de controle de qualidade
baseado na norma ISO 9001:2015, visando a melhoria contínua
dos processos operacionais e a redução dos riscos associados
às atividades operacionais.

A fim de garantir a qualidade dos produtos e serviços oferecidos
aos clientes, a empresa adotou um sistema de controle de qualidade
baseado na norma ISO 9001:2015, visando a melhoria contínua
dos processos operacionais e a redução dos riscos associados
às atividades operacionais.

A fim de garantir a qualidade dos produtos e serviços oferecidos
aos clientes, a empresa adotou um sistema de controle de qualidade
baseado na norma ISO 9001:2015, visando a melhoria contínua
dos processos operacionais e a redução dos riscos associados
às atividades operacionais.

A fim de garantir a qualidade dos produtos e serviços oferecidos
aos clientes, a empresa adotou um sistema de controle de qualidade
baseado na norma ISO 9001:2015, visando a melhoria contínua
dos processos operacionais e a redução dos riscos associados
às atividades operacionais.

A fim de garantir a qualidade dos produtos e serviços oferecidos
aos clientes, a empresa adotou um sistema de controle de qualidade
baseado na norma ISO 9001:2015, visando a melhoria contínua
dos processos operacionais e a redução dos riscos associados
às atividades operacionais.

resíduos G distribuidos en bloques resulta en mayor capacidad gelificante del polímero [Sutherland, 1985; Skjak-Brek, *et al.* 1985]. Debido a esta propiedad, el alginato es utilizado comercialmente como agente gelificante y espesante en diversas industrias que incluyen la farmacéutica, la textil y la alimenticia [Chakrabarty, 1991].

La única fuente de obtención de alginato para cubrir la demanda industrial la constituyen las algas marinas café de los géneros *Macrocystis* y *Laminaria*, entre otros. Su explotación implica cambios en la ecología de los mares donde se cosechan las algas y que la cantidad y calidad de los alginatos obtenidos, varíe dependiendo de factores ambientales fuera del control del hombre [Chakrabarty, 1991].

Lo anterior, ha provocado que se busquen fuentes alternativas para la obtención de alginato, siendo la fermentación bacteriana una de las más prometedoras [Annison and Lain, 1986].

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa que también produce alginato. Este exopolisacárido le sirve para protegerse de las adversidades del ambiente y como medio de adhesión a superficies sólidas al formar "biofilms" [Boyd y Chakrabarty, 1995]; también lo produce cuando infecta pulmones de pacientes con fibrosis quística [Deretic, *et al.* 1995]. Sin embargo, el hecho de ser un patógeno oportunista, la descarta como una fuente para la producción de alginato.

En este contexto, *A. vinelandii* constituye la mejor alternativa para la obtención de alginatos por fermentación bacteriana por dos razones:

- es una bacteria inocua.
- la distribución de los bloques de residuos M y G es similar a la encontrada en los alginatos extraídos de algas y por ende, las propiedades gelificantes del polímero también son similares (fig. 2).

2.3) Bioquímica y genética molecular de la biosíntesis de alginato.

La ruta biosintética de alginato ha sido descrita en el alga café *Fucus gardneri*, en *A. vinelandii* y en *P. aeruginosa* [Lin y Hassid, 1966; Pindar y Bucke, 1975]; existen algunas diferencias en esta ruta entre algas y bacterias. En algas, el sustrato inicial es D-manosa, mientras que en bacterias es D-fructosa [Pindar y

Bucke, 1975]. El alginato producido por bacterias está acetilado, contrario a lo observado en algas.

La genética molecular de esta ruta biosintética ha sido estudiada ampliamente en *P. aeruginosa* (fig. 3):

1.- La fructosa 6P (F6P), que proviene de la ruta de Entner-Doudoroff, se convierte a manosa 6P (M6P) por la acción de la fosfomanosa isomerasa (PMI), la cual es una de las funciones de la proteína bifuncional AlgA .

2.- La fosfomanomutasa, codificada por el gen *algC*, convierte M6P a manosa-1-fosfato (M1P).

3.- La M1P es el sustrato de la GDP-manosa pirofosforilasa (GMP), la otra actividad enzimática de AlgA, que con GTP forma GDP-manosa (GDP-Man.).

4.- La GDP-Man. es oxidada por la GDP-manosa deshidrogenasa (GMD, AlgD) para producir GDP-ácido manurónico [Derectic, *et al.* 1987]. Esta constituye la unidad de polimerización y exportación a través de la membrana interna, proceso en el que se postula participan los productos de los genes *alg8* y *alg44*, que son probables proteínas de membrana [Maharaj, *et al.* 1993].

Las enzimas responsables de la epimerización de ácido manurónico a ácido gulurónico AlgG [Chitnis y Ohman, 1990], de la acetilación de residuos manurónicos (AlgF) [Shinabarger, *et al.* 1993; Franklin y Ohman 1993] y del corte del polímero inicial (AlgL) [Boyd, *et al.* 1993; Shiller, *et al.* 1993], se localizan en el espacio periplásmico [Franklin, *et al.* 1994; Boyd y Chakrabarty, 1995]. Alg60 es una proteína que se requiere para la síntesis de alginato posiblemente en la etapa de acetilación del polímero, ya que su secuencia de aminoácidos muestra homología con las proteínas acil-acarreadoras [Boyd y Chakrabarty, 1995]. AlgE es una proteína de membrana externa la cual actúa como un canal iónico y podría estar implicada en la secreción del polímero final [Chu, *et al.* 1991; Rhem, *et al.* 1994].

Con excepción de uno de los genes biosintéticos identificados, todos se localizan en el minuto 34 del cromosoma y forman una estructura operónica que está encabezada por el gen *algD* [Chitnis y Ohman, 1993]. La excepción es *algC*, el cual se localiza en el minuto 10 del cromosoma (fig. 4). Los productos de *algA* y *algC* también participan en la biosíntesis de lipopolisacáridos (fig. 3) [Goldberg, *et al.* 1993; Ye, *et al.* 1994].

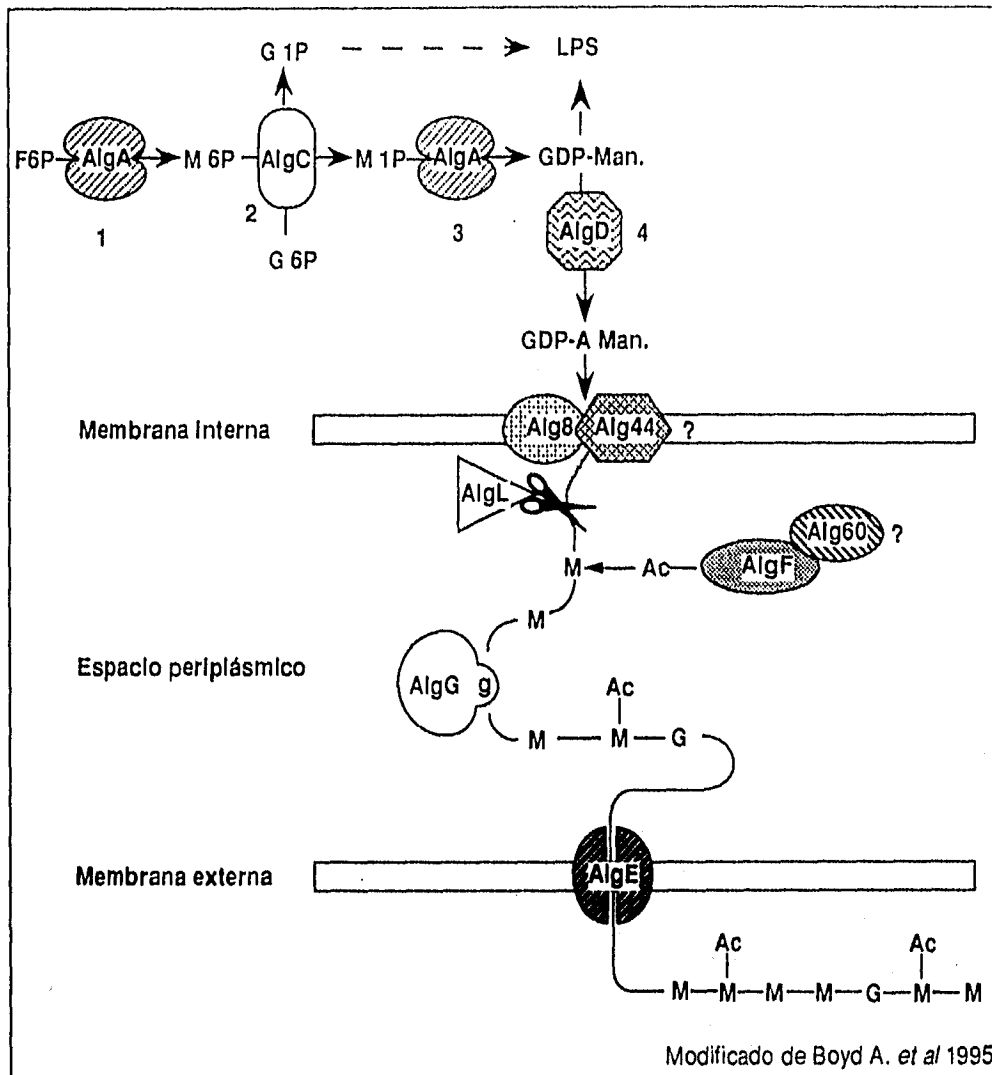


Fig. 3 Biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa*. La Fructosa 6-fosfato (F6P) se convierte a GDP-ácido manurónico (GDP-AMan). Esta molécula provee residuos de manurónico (M) para su polimerización. Algunos residuos gulurónicos (G) son incorporados vía epimerización de residuos manurónicos por la proteína AlgG; g representa el estado de transición entre manurónico y gulurónico. Algunos residuos de ácido manurónico en alginatos bacterianos son O-acetilados por la proteína AlgF. Los signos de interrogación indican que las funciones de Alg8 y Alg44 como formadoras de un complejo de polimerización, así como la participación de la proteína Alg60 en la acetilación de residuos manurónicos son hipotéticas. Las flechas discontinuas indican pasos enzimáticos para la síntesis de lipopolisacáridos. AlgC participa en la conversión de Glucosa 6-fosfato a Glucosa 1-fosfato en la formación de lipopolisacáridos [Soberón-Chávez G., comunicación personal]. Abreviaturas: M6P, manosa 6-fosfato; M1P, manosa 1-fosfato; GDP-Man, GDP-manosa; GDP-Rha, GDP-Ramnosia; Ac, grupos O-acetilados.

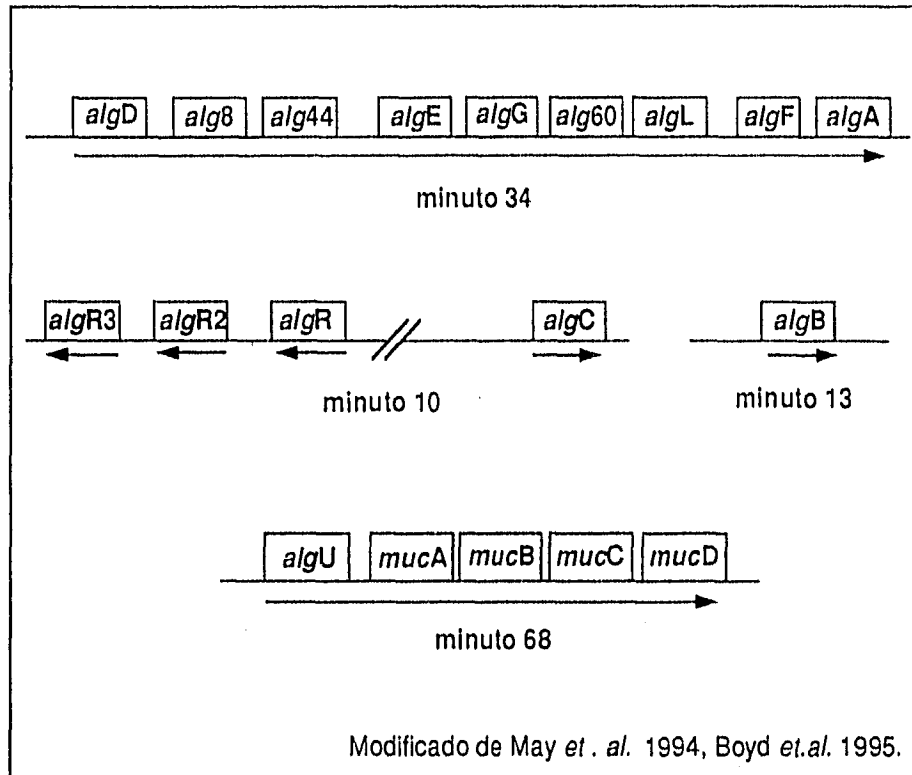


Fig. 4.- Organización de los genes para la biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa*. Los genes para la biosíntesis de alginato, se localizan en tres regiones dentro del cromosoma de *P. aeruginosa*. A excepción del gen *algC*, localizado en el minuto 10, todos los genes estructurales hasta ahora conocidos se localizan al minuto 34. Los genes regulatorios se encuentran en el minuto 10 y en el minuto 13, y los genes responsables de la conversión al fenotipo mucoso se localizan en el minuto 68. Las flechas representan las unidades transcripcionales y la dirección de su transcripción. Las designaciones alternativas de los genes son: *algU* (*algT*), *mucA* (*algS*), *mucB* (*algN*), *algR* (*algR1*), *algR2* (*algQ*), *algR3* (*algP*).

2.4) Regulación de la transcripción del gen *algD* en *P. aeruginosa*.

Uno de los genes biosintéticos más importantes en la producción de alginato es *algD*, el cual codifica para la GDP-manosa deshidrogenasa, una enzima NAD⁺ dependiente que cataliza el paso limitante de esta ruta biosintética, la doble oxidación de GDP-manosa a GDP-ácido manurónico. Este gen está estratégicamente localizado al inicio del operón que contiene todos los genes para la biosíntesis de alginato, excepto uno, y experimenta una fuerte activación transcripcional en cepas mucoides [Deretic, *et al.* 1987]. Su promotor posee una estructura compleja y ya se han descrito varios elementos regulatorios que participan en su activación (fig. 5): el factor sigma AlgU (σ^E) es el responsable del inicio de la transcripción [Martin, *et al.* 1994]. Además, se han reportado dos reguladores de respuesta: AlgR y AlgB que pertenecen al sistema de transducción de señales de dos componentes y afectan la transcripción de *algD* [Deretic, *et al.* 1989; Goldberg, *et al.* 1992]. AlgR se une a tres sitios en el promotor de *algD*, que contienen las secuencias ACCGTTGTC, pero solo su forma fosforilada activa la transcripción [Kato y Chakrabarty, 1991; Mohr, *et al.* 1991; Mohr y Deretic, 1992; Deretic, *et al.*, 1992]. Inserciones en *algR* bloquean la expresión de *algD*. Existen sitios similares en el promotor de *algC* y hay evidencias de que AlgR también activa su transcripción [Fujiwara, *et al.* 1993]. Dado que dos de los tres sitios de reconocimiento de AlgR, en el promotor de *algD*, se encuentran lejos del inicio de la transcripción (-500pb), se postula que se requiere del doblado del DNA para que ésta se inicie [Deretic, *et al.* 1994]. Varias proteínas que pudieran afectar la estructura global o local del DNA, tales como AlgR3 [Kato, *et al.* 1990] e IHF [Mohr y Deretic, 1992], han sido involucradas en la expresión de *algD*.

El otro regulador de respuesta, AlgB, también aumenta la transcripción de *algD*; Sin embargo, hasta el momento no se conoce de que manera ejerce su efecto. Se sabe que AlgB se requiere para la producción de altos niveles de alginato y que no es indispensable para la activación transcripcional de *algD*. Las proteínas sensoras Histidín-cinasas responsables de la fosforilación de AlgR y de AlgB, así como los factores ambientales que éstas sensan aún no han sido identificados.

Otro elemento regulador positivo de la transcripción de *algD* es el producto del gen *algR2*. AlgR2 se requiere para la síntesis de alginato a 37°C. Hasta el momento, tampoco se conoce de que manera regula la transcripción de *algD*.

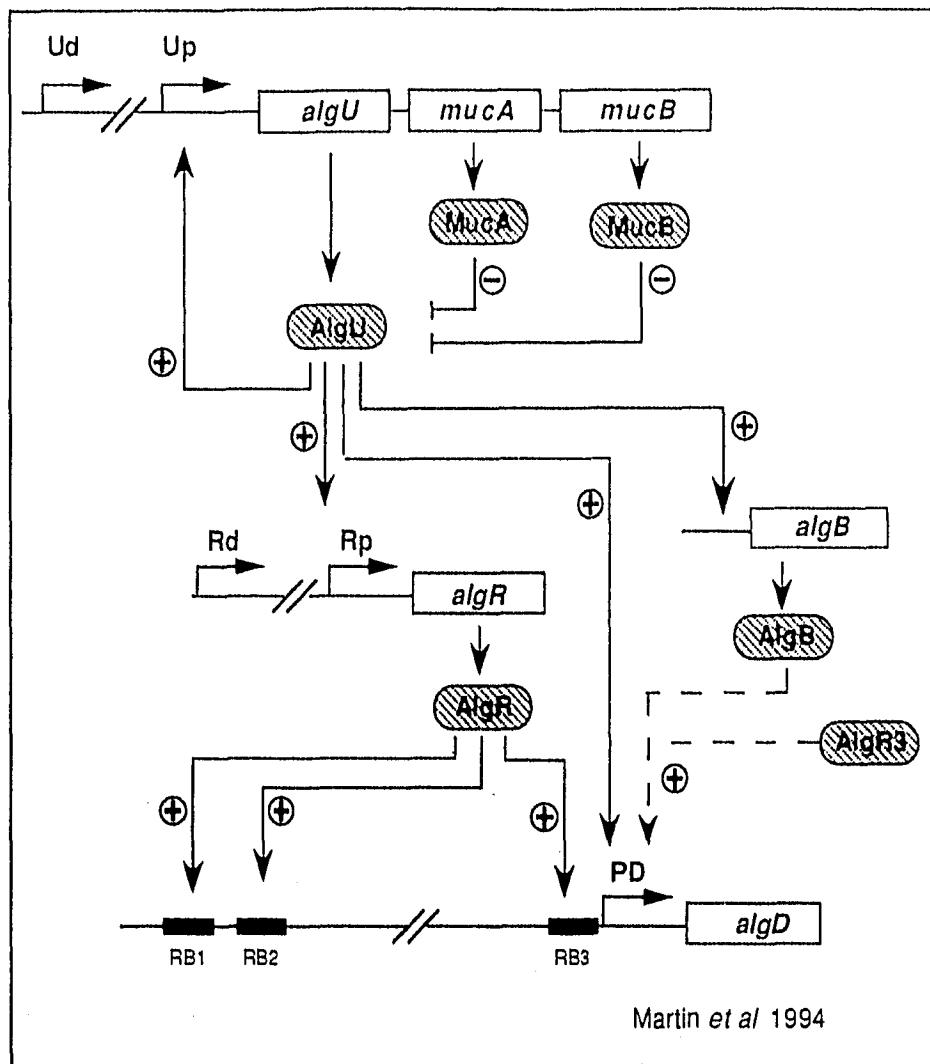


Fig. 5.- Circuito regulatorio que controla la transcripción de *algD* y la expresión de mucoidía en *Pseudomonas aeruginosa*. Hasta arriba de la cascada regulatoria se encuentra el grupo de genes *algU*, *mucA* y *mucB* que controlan la conversión de esta bacteria al fenotipo mucolde. Por lo menos dos promotores, Ud (distal) y Up (proximal), controlan la expresión de *algU*. La transcripción de *algR* inicia de los promotores Rd (distal) y Rp (proximal). El gen *algD* parece ser transcrito de un solo promotor, PD. La expresión de *algD* es absolutamente dependiente de dos factores: el factor sigma AlgU y el regulador de respuesta AlgR, el cual se une a los sitios RB1, RB2 y RB3. MucA y MucB suprimen la actividad de AlgU. Mutaciones en estos genes causan conversión al fenotipo mucolde al liberar a AlgU de la regulación negativa y consecuentemente se eleva la transcripción de *algD* y de todos los genes biosintéticos localizados abajo de este gen. Las líneas discontinuas indican que la manera en que AlgB regula la transcripción de *algD*, aún no ha sido aclarada, pero se postula la participación de AlgR3.

Se ha reportado que participa en la regulación de las enzimas nucleótido difosfato cinasa (Ndk) y Succinil Coenzima A sintasa (Scs), esta última del ciclo de los ácidos tricarboxílicos [Schlichtman, *et al.* 1994].

2.5) Mutaciones y factores ambientales que resultan en la sobreproducción de alginato en *P. aeruginosa*.

La mucoidía es el resultado de la sobreproducción del exopolisacárido alginato y es considerado el factor de virulencia más importante expresado por *P. aeruginosa*, durante la colonización de pulmones de pacientes con fibrosis quística [Deretic, *et al.* 1994].

La expresión constitutiva de los operones biosintéticos encabezados por *algD* y *algC* en cepas de *P. aeruginosa* (condición que resulta en un fenotipo mucoide) es causada, en su mayoría, por mutaciones en regiones particulares del cromosoma [Fyfe y Govan, 1980]. En cepas silvestres sólo se observa una transcripción basal de dichos genes biosintéticos y un fenotipo no mucoide [Deretic, *et al.* 1994].

En la región tardía del cromosoma de *P. aeruginosa* (minuto 67.5) se localizan los genes *algU*, *mucA*, *mucB*, *mucC* y *mucD* (fig. 4). Los dos últimos genes fueron encontrados recientemente [Boucher, *et al.* 1996]. El gen *algU* codifica un factor sigma homólogo al factor σ^E de *Escherichia coli*, un factor alternativo de respuesta a estrés a altas temperaturas [Mecsas, *et al.* 1993]. AlgU reconoce los promotores de los genes de la biosíntesis de alginato para inicio de la transcripción, además del promotor de *algR*, *algB* y su propio promotor [Wozniak, *et al.* 1994; Martin, *et al.* 1994]. La mayoría de las cepas aisladas de pulmones de pacientes con fibrosis quística poseen mutaciones en el gen *mucA*, lo que resulta en la expresión constitutiva de los genes biosintéticos y en un fenotipo mucoide [Martin, *et al.* 1993a]. Además, inserciones en *mucB* también resultan en un fenotipo mucoide [Martin, *et al.* 1993b]. Estos resultados sugieren que los productos de los genes *mucA* y *mucB* regulan de manera negativa la función de AlgU, posiblemente a través de un efecto antisigma. En esta misma región, se han localizado mutaciones supresoras de este fenotipo. Estas mutaciones se localizaron en el gen *algU* [Schurr, *et al.* 1994].

Sin embargo, no todas las cepas mucoides que se han investigado poseen mutaciones en el gen *mucA*, lo que sugiere la participación de otros elementos

regulatorios. Por ejemplo, se identificó la mutación *muc23*, entre el minuto 69 y 71 del cromosoma, que también resulta en la sobreproducción de alginato. Esta mutación interrumpió el gen *algW* que codifica para una proteína homóloga a la serín-proteasa HtrA, la cual está involucrada en la proteólisis de proteínas anormales y en la resistencia a estrés oxidativo y por calor en bacterias entéricas [Lipinska y Georgopolous 1988]. También se ha reportado la existencia de secuencias de inserción arriba del gen *toxA* que resultan en un fenotipo mucoso [Sokol, *et al.* 1994].

Por otro lado, también se han reportado condiciones ambientales en las que se incrementa la producción de alginato. Estas condiciones son alta osmolaridad [Berry, *et al.* 1989], limitación de nutrientes [Terry, *et al.* 1992], tipo de fuente de nitrógeno [Deretic, *et al.* 1990], etc. Así mismo, ensayos posteriores indicaron que la regulación ambiental de la biosíntesis de alginato, también depende del fondo genético de la cepa utilizada. Por ejemplo, una cepa que lleva una mutación en *mucA* muestra una elevada biosíntesis de alginato en alta osmolaridad, contrario a lo observado en una cepa con una mutación *muc23*. Por tal razón, cuando se ensayó el efecto del calor sobre la biosíntesis de este polisacárido, se utilizó una cepa silvestre de *P. aeruginosa* denominada PAO1. Sólo cuando el cultivo fue sometido a estrés por calor, simultáneamente con alta osmolaridad, se observó un incremento del 300% en la producción de alginato [Schurr, *et al.* 1995].

3.- ANTECEDENTES.

Genética molecular de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*

3.1) Genes estructurales

A. vinelandii y *P. aeruginosa* pertenecen al linaje *Azomonas-Azotobacteriaceae*, lo que sugiere una similitud en la organización de los genes de la biosíntesis de alginato [Fialho, *et al.* 1990].

En un banco genómico de *A. vinelandii* se identificaron cósmidos que muestran homología con los genes estructurales *algD*, *algA* y *algC* de *P. aeruginosa*. Al igual que en *P. aeruginosa*, el gen *algC* se encuentra separado de los genes *algD* y *algA*. Estos dos últimos genes se encuentran en un cósmido denominado pMSD675 (cósmido derivado de la cepa hipermucoide de *A. vinelandii* ATCC 9046) [Campos, *et al.* 1996]; trabajos posteriores permitieron identificar, en este mismo cósmido, todos los genes estructurales, excepto *alg60*, que son homólogos a los del operón policistrónico encabezado por *algD* en *P. aeruginosa* (ver fig. 4). A pesar de que el orden de estos genes es similar en ambas bacterias, en *A. vinelandii* no se conserva la estructura de un sólo operón para todos ellos. Resultados preliminares sugieren que existen al menos 3 unidades transcripcionales, una de las cuales encabeza *algD* (fig. 6) [Lloret, *et al.* 1996, Mejía H. datos no publicados]. Por otro lado, se reportó la clonación y secuencia de un grupo de genes que codifican para la C-5 epimerasa (AlgE) en *A. vinelandii* [Entesvag, *et al.* 1995].

La secuencia del gen *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 homología. Ensayos de "primer extension" con RNA extraído de la cepa ATCC 9046, mostraron que bajo condiciones de fijación de nitrógeno, la transcripción de *algD* se inicia a partir de dos promotores: uno reconocido por AlgU (σ^E) y otro reconocido por σ^D (homólogo al factor σ^{70} de *E. coli*). Sin embargo, hay resultados que sugieren que la cepa no mucoide de *A. vinelandii* UW136, sólo posee el inicio de transcripción reconocido por AlgU. Además, se

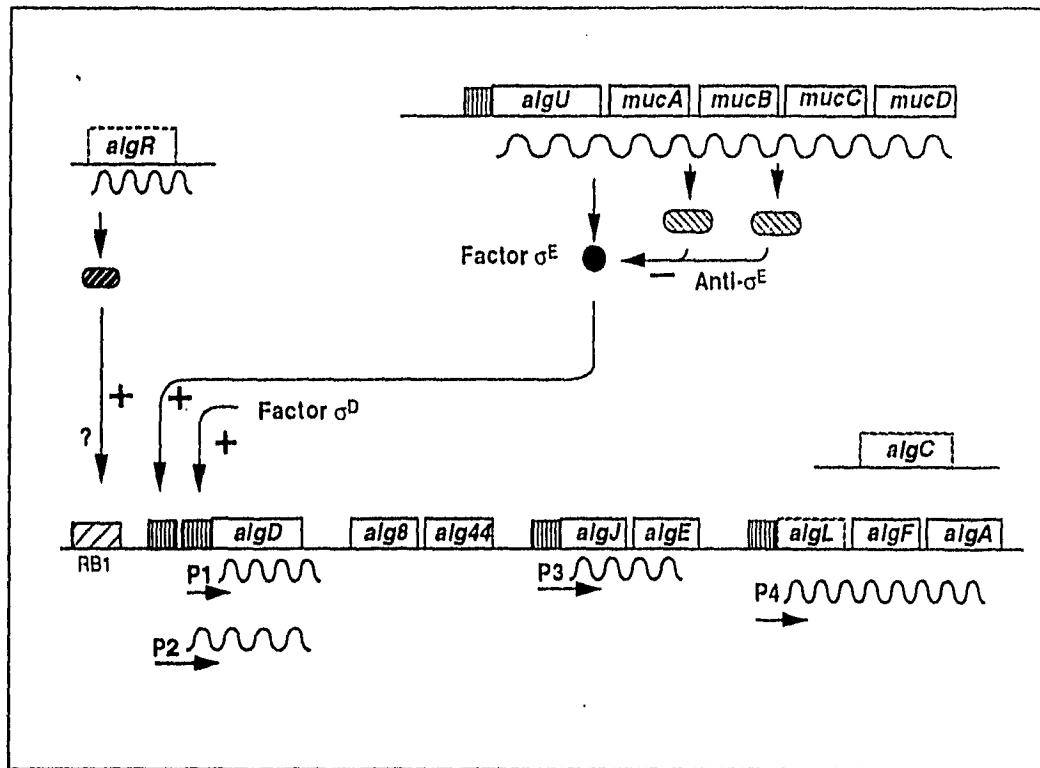


Fig. 6.- Genes reguladores y estructurales de la biosíntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*. Los genes *algJ* y *algE* son homólogos a los genes *algE* y *algG*, respectivamente, de *Pseudomonas aeruginosa*. Hay resultados que sugieren que AlgR es el activador transcripcional de *algD*, sin embargo esto no ha sido totalmente comprobado. Los genes *alg8* y *alg44* pudieran ser transcritos a partir de su propio promotor o a partir del promotor de *algD*, pero esto no ha sido aclarado. Los cuadros con líneas discontinuas indican que los genes no han sido secuenciados pero que fueron identificados por ensayos de complementación (*algL*) o por hibridación tipo "Southern" (*algC* y *algR*).

identificó una secuencia de reconocimiento para la proteína AlgR que, a excepción de una base, es idéntica a la secuencia RB1 (CTGCTGCCA) de *P. aeruginosa*. Esto sugiere fuertemente que, al igual que en *P. aeruginosa*, AlgR también participa en la activación transcripcional del gen *algD* en *A. vinelandii* [Campos, et al.1996].

3.2) Regulación de la transcripción del gen *algD*.

En el grupo de la Dra. Gloria Soberón Ch., para estudiar la regulación de la transcripción de *algD* en *A. vinelandii*, se construyeron a partir de 3 cepas que muestran diferentes grados de mucoidía, derivadas que poseen en fusión transcripcional el gen *algD* con el gen reportero *lacZ* [Campos, et al. 1996]. La estrategia fue la siguiente: se mutagenizó un fragmento interno del gen *algD* con un miniTn5/*lacZ* que lleva la resistencia a Km. Posteriormente, esta construcción se transfirió a las tres cepas de *A. vinelandii*. Dado que el vector utilizado no era capaz de replicarse en estas cepas, se seleccionaron derivadas en las que se dió un evento de doble recombinación homóloga lo que resultó en la interrupción del gen *algD*. De esta forma se obtuvieron derivadas Km^r, β-galactosidasa⁺. Las derivadas de las cepas mucoides con la construcción *algD-lacZ* fueron capaces de producir alginato debido a que el gen *algD* quedó parcialmente funcional ya que la inserción del minitransposón se localizó al extremo 3' de este gen. Sin embargo, los niveles de alginato que alcanzaron fueron menores que los alcanzados por sus respectivas cepas parentales (ver tabla 1). Esto puede deberse a la parcial funcionalidad del gen *algD* y/o a un efecto polar de la inserción sobre otros genes estructurales de la biosíntesis de alginato localizados abajo de este gen.

El análisis de la expresión del gen *algD* en las cepas *algD-lacZ*, reveló que en este microorganismo hay una correlación entre la expresión del gen *algD* y la producción de alginato (tabla 1). Esto sugiere que parte de la regulación de la producción de alginato pudiera darse a nivel de la transcripción de este gen.

cepa	Producción de alginato (mg/mg proteína)	Actividad de β -galact. (U Miller /mg proteína)
ATCC 9046	4.47 \pm 0.47	-
WI12	1.13 \pm 0.18	831 \pm 13
AEIV	1.74 \pm 0.20	-
A2	0.53 \pm 0.13	285 \pm 39
UW136	0.73 \pm 0.21	-
U5	0.68 \pm 0.31	113 \pm 8

Tabla 1.- Producción de alginato y expresión de *algD* en diferentes cepas de *A. vinelandii*. La cepa WI12, la A2 y la U5 son derivadas *algD-lacZ* de las cepas ATCC 9046 (cepa hipermucoide), AEIV (cepa medianamente mucoide) y UW136 (cepa no mucoide), respectivamente [tomado de Campos, *et al.* 1996].

Estudios realizados con las tres cepas que llevan la construcción *algD-lacZ*, mostraron que la transcripción de *algD* y la producción de alginato no se afectan por la alta osmolaridad. Sin embargo, cuando a la cepa A2 se le adicionó NO_3^- como fuente de nitrógeno se disminuyó en un 60% tanto la transcripción de *algD* como la producción de alginato, mientras que en la cepa WI12 no se observó ninguna diferencia. Por otro lado, cuando la cepa A2 utilizó el NH_4^+ como fuente de nitrógeno la transcripción de *algD* se incrementó pero no así la producción de alginato. Este resultado es contrario al observado en un cultivo de esta misma cepa sometido a una temperatura de 37°C, ya que la transcripción de *algD* no se alteró, pero la producción de alginato se incrementó en un 100%. Todos estos datos en conjunto indican una regulación compleja tanto de la transcripción de *algD*, como de la producción de alginato en *A. vinelandii*. Además de que la regulación por factores ambientales, al igual que en *P. aeruginosa*, depende del fondo genético de la cepa sometida a ensayo [Campos, *et al.* 1996].

3.3) Genes reguladores.

En el cósmido pMSR1506, derivado de un banco de genes de la cepa ATCC 9046, se identificó por hibridación tipo "Southern" un fragmento *EcoRI* que

mostró homología con el gen *algR* de *P. aeruginosa*, sin embargo, aún no se sabe si funcionalmente también son homólogos.

En el laboratorio se construyó un banco genómico a partir del DNA de la cepa no mucóide UW136. Con el objeto de identificar genes cuyos productos regularan negativamente la biosíntesis de alginato, el banco proveniente de la cepa UW136 se transfirió a la cepa hiper mucóide ATCC 9046. De esta manera, se lograron identificar 3 cósmidos que suprimieron la mucoidía de esta cepa: el pSMU588, el pSMU865 y el pSMU986 [Martínez-Salazar, *et al*, 1996].

En el cósmido pSMU865 se localizaron, en base a su homología con los correspondientes genes de *P. aeruginosa*, los genes *algU*, *mucA* y *mucB* en una banda *EcoRI* de 10kb. Dado que *mucA* y *mucB* son genes reguladores negativos de la transcripción de *algD*, esto explicaría la supresión de la mucoidía de la cepa ATCC9046 por este cósmido. Aún no se sabe que tipo de genes, cuyos productos regulan de manera negativa la biosíntesis de alginato, estén contenidos en los cósmidos pSMU588 y pSMU986.

Utilizando DNA cromosomal de las cepas ATCC 9046 y del cósmido pSMU865, se secuenciaron los genes *algU*, *mucA* y *mucB*. Las secuencias de los genes *algU*, *mucA* y *mucB* son altamente homólogas a las correspondientes en *P. aeruginosa*; AlgU muestra un 93% de identidad y MucA y MucB, 64.4% y 63.9%, respectivamente. Formando parte del mismo operón, se encuentran los genes *mucC* y *mucD* (ver fig. 6). El producto del primero es homólogo a ORF4 de *Photobacterium* SS9, mientras que el del otro pertenece a la familia de las serín proteasas HtrA [Martínez-Salazar, *et al*. 1996]. Cabe mencionar, que también estos genes fueron encontrados con el mismo arreglo en *P. aeruginosa*. Interesantemente, la cepa de *A. vinelandii* UW136 posee una inserción de 900 bp en el gen *algU* y hay resultados que indican que por esta razón no produce alginato.

4.- OBJETIVOS

Los resultados de la tabla 1 indican que el promotor de *algD*, al igual que en *P. aeruginosa*, también es blanco importante de regulación de la biosíntesis de alginato. Con el propósito de identificar genes cuyos productos regulen esta ruta biosintética en *Azotobacter vinelandii*, nos hemos propuesto el siguiente objetivo general:

Identificar genes reguladores de la transcripción de *algD*.

Los objetivos particulares son los siguientes:

- 1.- Mutagenizar la cepa WI12, que lleva la construcción *algD-lacZ*, e identificar aquellas derivadas que tengan alterada la transcripción de *algD*.
- 2.- Realizar la caracterización de las mutantes.

5.- MATERIALES Y METODOS

5.1) Cepas y plásmidos.

Tabla 2.- Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepa	Característica relevante	Referencia
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
ATCC 9046	altamente mucosida	ATCC
AEIV	Mucosida	Ertesvag, <i>et al</i> , 1995.
UW136	No mucosida, Rif ^r	Kennedy, <i>et al</i> , 1986.
W112	Fusión <i>algD-lacZ</i> en ATCC 9046. Km ^r	Campos, <i>et al</i> . 1996
RC26	W112, <i>muc26</i> . Km ^r , Tc ^r .	este trabajo
AC28	W112 <i>muc28</i> Km ^r , Tc ^r .	este trabajo
CNT26	ATCC 9046, <i>muc26</i> , Tc ^r	este trabajo
CN26	AEIV, <i>muc26</i> , Tc ^r	este trabajo
CN28	AEIV, <i>muc28</i> , Tc ^r	este trabajo
CNW26	UW136, <i>muc26</i> , Tc ^r , Rif ^r	este trabajo
CNW28	UW136, <i>muc28</i> Tc ^r , Rif ^r	este trabajo
<i>Escherichia coli</i> .		
S17.1 (λ pir)	RP4+, λ pir+	de Lorenzo, <i>et al</i> . 1990.
Plásmidos		
pUT miniTn5/ <i>luxAB</i>	Vector suicida Ap ^r para mutagénesis con miniTn5/ <i>luxAB</i> Tc ^r . Se replica en cepas (λ pir)+	de Lorenzo, <i>et al</i> . 1990.
pSMU588	Supresor de mucoidia	Martínez-Salazar, <i>et al</i> , 1996.
pSMU865	<i>algU</i> ⁻ , <i>mucA</i> ⁺ , <i>mucB</i> ⁺ . Supresor de mucoidia.	Martínez-Salazar, <i>et al</i> , 1996.
pSMU986	Supresor de mucoidia	Martínez-Salazar, <i>et al</i> , 1996.

5.2) Medios de cultivo.

A. vinelandii se cultivó de forma rutinaria en placas de medio Burk-Sacarosa (BS) sin fuente de nitrógeno [Kennedy, *et al.* 1986]. Para realizar las determinaciones de alginato y cuantificación de la actividad de β -galactosidasa, las cepas se crecieron en medio Burk-Sacarosa modificado sin antibiótico [Tinoco, 1993]. Para cultivos líquidos, siempre se mantuvo en 5:1 la relación volumétrica de matraz-medio de cultivo y una velocidad de agitación de 250 rpm. En todos los casos, la temperatura de incubación fué de 30°C. Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB a 37°C [Miller, 1972]. Las concentraciones de antibiótico en $\mu\text{g/ml}$ de medio, usadas para *A. vinelandii* y *E. coli* respectivamente fueron: ampicilina (Ap), no utilizada y 200; kanamicina (Km), 8 y 30; nalidixico (Nal), 20 y no utilizada; rifampicina (Rif), 10 y no utilizada; tetraciclina (Tc), 5-20 y 10.

5.3) Mutagénesis al azar.

Para la mutagénesis al azar se realizaron cruzas biparentales entre la cepa receptora WI12 y la cepa donadora S17.1(λ pir) pUTminiTn5/luxAB, siguiendo protocolos previamente reportados (fig.7) [Kennedy, *et al.* 1896]. El plásmido pUTminiTn5/luxAB es incapaz de replicarse en *A. vinelandii*. Esto permite la generación de mutantes resistentes a tetraciclina (el miniTn5/luxAB posee un cassette de resistencia a Tc) por inserción del minitransposón en el cromosoma de la bacteria [de Lorenzo, *et al.* 1990]. Estas mutantes se seleccionaron en medio BS-Km (8 $\mu\text{g/ml}$) con una concentración inicial de tetraciclina de 5 $\mu\text{g/ml}$ de medio. Trabajos en el laboratorio, realizando hibridaciones tipo "Southern", permitieron concluir que para segregar una mutación a todas las copias del cromosoma de *A. vinelandii*, es necesario realizar por lo menos dos subcultivos de la mutante en medio que contenga concentraciones cada vez mayores del marcador que lleva la mutación. Por esta razón, se realizaron subcultivos de las mutantes aumentando la concentración de tetraciclina a 10 y posteriormente a 15 $\mu\text{g/ml}$ con el propósito de tener la inserción del minitransposón en las múltiples copias del cromosoma que posee *A. vinelandii*.

Las mutantes se mantuvieron en medio BS-Tc (10 $\mu\text{g/ml}$), Km (8 $\mu\text{g/ml}$).

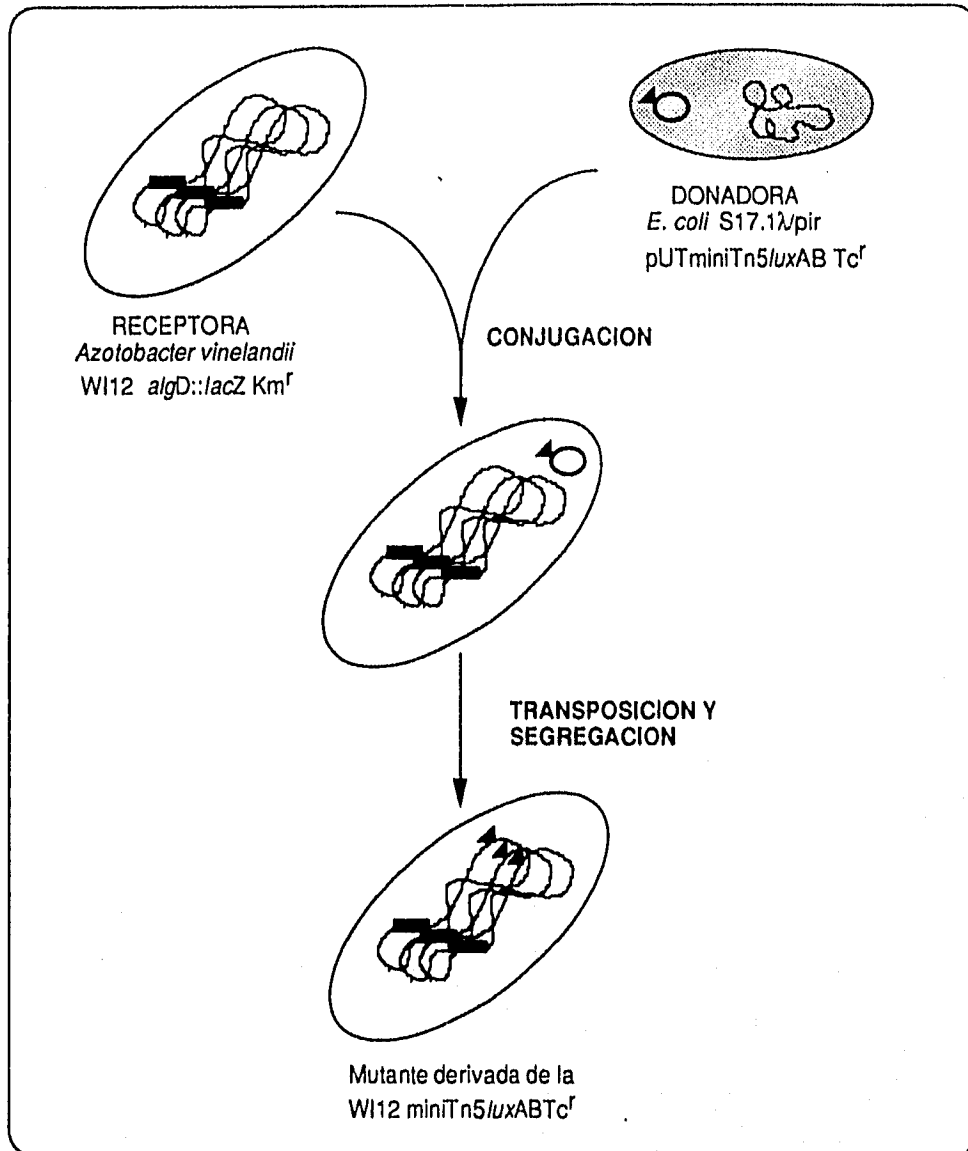


Fig. 7.- Esquema de la mutagénesis al azar de la cepa WI12 con el miniTn5/luxAB. La segregación de la mutación, a todos los cromosomas, se logra elevando la concentración de tetraciclina.

5.4) Identificación de mutantes con alteraciones en la regulación de la transcripción de *algD*.

Las transconjugantes Tc^r derivadas de la W112, se transfirieron a placas con X-gal (20 µg/ml de medio), Tc (10 µg/ml), Km (8µg/ml). Se buscaron aquellas que exhibieron un color blanco o un color más azul que la cepa padre W112; dichos fenotipos podrían sugerir que genes reguladores positivos o negativos, respectivamente, de la transcripción de *algD*, estarían siendo interrumpidos (fig. 8).

5.5) Transformación.

Se prepararon células competentes de *A. vinelandii*, sometiéndolas a dos cultivos sucesivos en medio BS libre de hierro y molibdeno [Page, 1982].

La transformación de *A. vinelandii* con DNA cromosomal de las mutantes Tc^r, se realizó según protocolo ya reportado [Page y Sadoff, 1976]. Las transformantes Tc^r se seleccionaron en medio BS con Tetraciclina. La concentración de Tc varió dependiendo de la cepa receptora utilizada: para seleccionar transformantes derivadas de la ATCC 9046, se utilizaron concentraciones de 20 µg/ml y para las derivadas de la AEIV y de la UW136, 10 µg/ml de medio de cultivo.

5.6) Cuantificación de alginato.

Con el propósito de comparar la producción de alginato de las cepas originadas en el presente trabajo con la producción que exhiben otras cepas reportadas en trabajos anteriores, la cuantificación de este polisacárido se realizó por dos métodos: por el método espectrofotométrico de cuantificación de ácidos urónicos utilizando carbazol para cultivos desarrollados en medio sólido [Knutson y Jeans, 1968] o por el método de peso seco a partir de cultivos líquidos [Jarman, *et al.* 1978].

Para la cuantificación de alginato en medio sólido, se inoculó la superficie de placas de BS-modificado con células de un precultivo en placa de 48 hrs. Para la cuantificación de alginato en medio líquido, se inocularon 50 ml de medio BS modificado con células provenientes de un precultivo líquido de 24 hrs. La

5.4) Identificación de mutantes con alteraciones en la regulación de la transcripción de *algD*.

Las transconjugantes Tc^r derivadas de la W112, se transfirieron a placas con X-gal (20 µg/ml de medio), Tc (10 µg/ml), Km (8µg/ml). Se buscaron aquellas que exhibieron un color blanco o un color más azul que la cepa padre W112; dichos fenotipos podrían sugerir que genes reguladores positivos o negativos, respectivamente, de la transcripción de *algD*, estarían siendo interrumpidos (fig. 8).

5.5) Transformación.

Se prepararon células competentes de *A. vinelandii*, sometiéndolas a dos cultivos sucesivos en medio BS libre de fierro y molibdeno [Page, 1982].

La transformación de *A. vinelandii* con DNA cromosomal de las mutantes Tc^r, se realizó según protocolo ya reportado [Page y Sadoff, 1976]. Las transformantes Tc^r se seleccionaron en medio BS con Tetraciclina. La concentración de Tc varió dependiendo de la cepa receptora utilizada: para seleccionar transformantes derivadas de la ATCC 9046, se utilizaron concentraciones de 20 µg/ml y para las derivadas de la AEIV y de la UW136, 10 µg/ml de medio de cultivo.

5.6) Cuantificación de alginato.

Con el propósito de comparar la producción de alginato de las cepas originadas en el presente trabajo con la producción que exhiben otras cepas reportadas en trabajos anteriores, la cuantificación de este polisacárido se realizó por dos métodos: por el método espectrofotométrico de cuantificación de ácidos urónicos utilizando carbazol para cultivos desarrollados en medio sólido [Knutson y Jeans, 1968] o por el método de peso seco a partir de cultivos líquidos [Jarman, *et al.* 1978].

Para la cuantificación de alginato en medio sólido, se inoculó la superficie de placas de BS-modificado con células de un precultivo en placa de 48 hrs. Para la cuantificación de alginato en medio líquido, se inocularon 50 ml de medio BS modificado con células provenientes de un precultivo líquido de 24 hrs. La

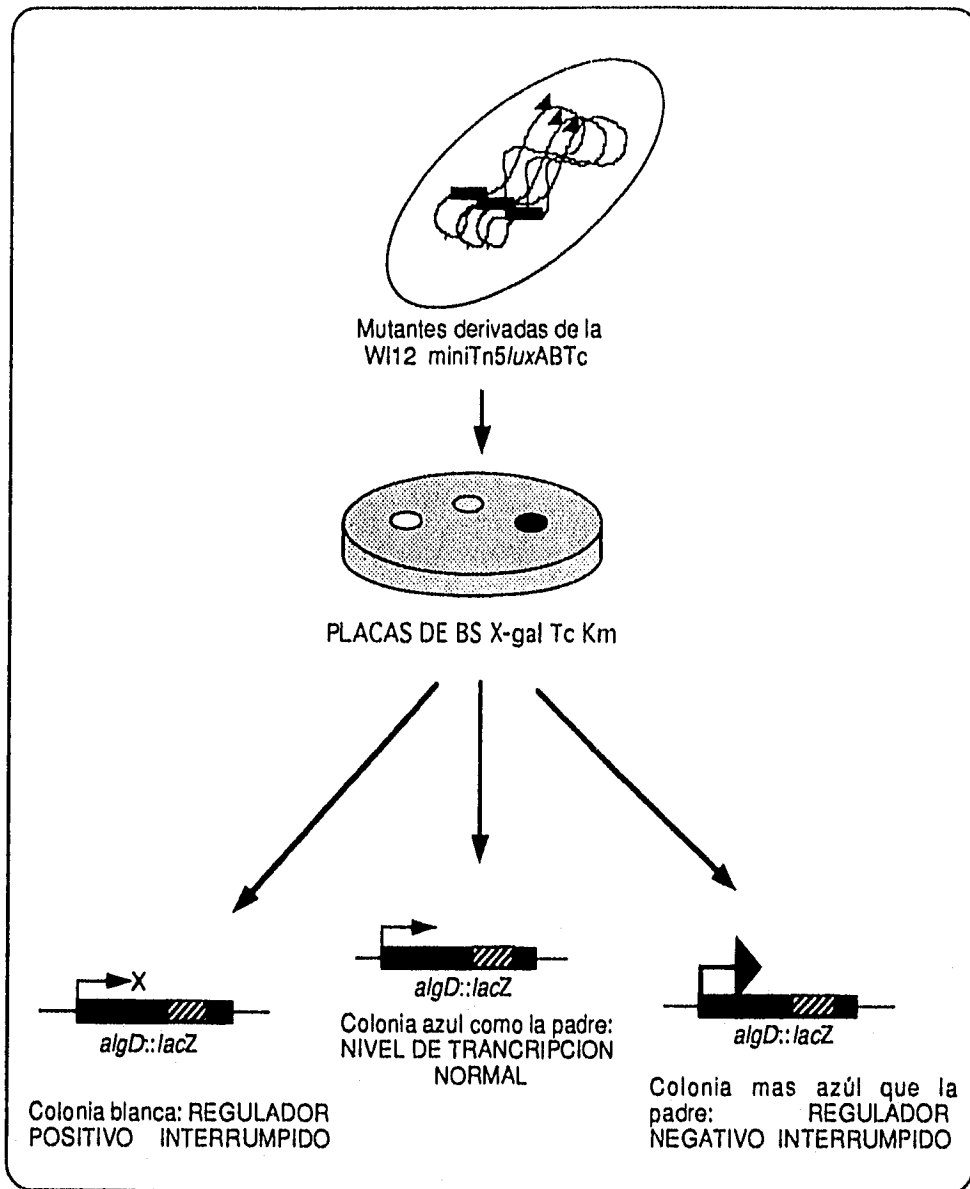


Fig. 8.- Esquema de la identificación de mutantes con defectos en la regulación de la transcripción de *algD*.

cuantificación de alginato se realizó, en ambos casos, después de 72 hrs de incubación. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

5.7) Cuantificación de la actividad de β -galactosidasa.

Se centrifugó 1 ml de cultivo de las cepas W112, AC28 y RC26 desarrolladas en medio BS-modificado sin antibiótico. Las células se lavaron con solución de cloruro de sodio al 0.85% (SSF) hasta que estuvieran libres de alginato. El paquete celular se guardó a -20°C hasta antes del ensayo. La cuantificación de β -galactosidasa se realizó por el método de Miller [1972] con algunas modificaciones en la etapa de lisis celular [Ferrari, *et al.* 1985]. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de SSF. Se tomó una cantidad adecuada de células y se trataron con lisozima (0.01%), incubándose a 37°C durante 5 minutos. Enseguida se le adicionó tritón X100 (0.1%) a temperatura ambiente y se continuó con la determinación de β -galactosidasa según Miller. Las unidades reportadas son unidades Miller que equivalen a los nmoles de Orto-Nitrofenol generados cada minuto a 28°C / mg de proteína. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

5.8) Cuantificación de proteína.

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Lowry [1951]. Los ensayos se realizaron por triplicado

5.9) Hibridación tipo "Southern".

Cuando se requirió, los DNAs cromosomales de las mutantes fueron hibridados, de acuerdo a métodos ya reportados (Maniatis, 1989). Las sondas utilizadas se indican en la parte de **Resultados** y se marcaron radiactivamente con ^{32}P utilizando el método de "Random Primer" (Dupont).

6.- RESULTADOS Y DISCUSION.

6.1) Obtención de un banco de mutantes.

Con el fin de obtener un banco de mutantes derivado de la cepa WI12, se realizaron 21 cruzas biparentales entre esta cepa (receptora) y la cepa S17.1 λ (pir) miniTn5/luxAB (donadora). La frecuencia de transconjugantes fue del orden de 10^{-6} . De cada crusa se tomaron sólo alrededor de 150 transconjugantes para formar un banco de 3200 mutantes. La selección inicial se hizo en medio BS Km(8 μ g/ml), Tc (5 μ g/ml); se realizaron subcultivos posteriores aumentando la cantidad de Tc a 10 y finalmente a 15 μ g/ml.

6.2) Identificación de mutantes con alteraciones en la transcripción de *algD*.

La cepa WI12 posee en fusión transcripcional, el gen *algD* con el gen reportero *lacZ*, por lo que en placas con X-gal sus colonias exhiben un color azul.

Cuando se inició el presente trabajo suponíamos que la transcripción de *algD* en la cepa WI12 (derivada de la cepa ATCC 9046) dependía solo del factor sigma AlgU. Como se mencionó anteriormente, trabajos posteriores sugieren que la transcripción de *algD* también se inicia a partir de un promotor constitutivo dependiente de σ^D . Por ello, trabajando con esta cepa, estuvimos en posibilidades de identificar sólo genes que regularan negativamente la transcripción de *algD* y cuya inserción resultó en un fenotipo más azul que la cepa padre. La interrupción de genes reguladores positivos, dado que existe además un promotor constitutivo, no resultó en un fenotipo blanco como habíamos supuesto inicialmente. Por tal razón, cuando se transfirieron las 3200 mutantes obtenidas a placas con X-gal, no se logró identificar ninguna que tuviera un color blanco estable. Sin embargo, se lograron identificar 4 candidatas con defectos en la transcripción de *algD* que exhibieron un color azul más intenso que la WI12. Este fenotipo sólo fue estable en 2 candidatas, las que finalmente constituyen el objeto de estudio del presente trabajo. A estas cepas se les designó RC26 y AC28 y a las mutaciones que portaban, *muc26* y *muc28*, respectivamente (fig.9).

La mutante RC26, además de su color azul más intenso que la WI12, mostró una morfología colonial rugosa y reseca. El alginato es el responsable del

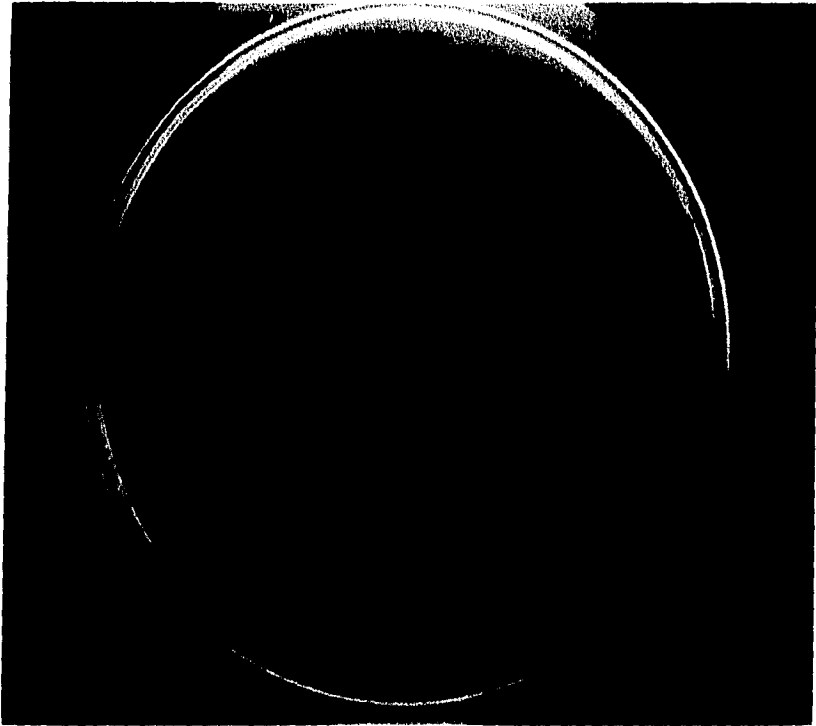


Fig. 9.- Mutantes derivadas de la cepa WI12 que muestran un fenotipo más azul en placas de BS con X-gal. Sólo las mutanes RC26 y AC28, que portan las mutaciones *muc26* y *muc28*, respectivamente, mostraron un fenotipo consistente.

fenotipo mucoso en cepas de *A. vinelandii*. El aspecto de las colonias de la RC26 nos sugirió entonces que esta mutante no producía alginato en placa a pesar de que su color en placas con X-gal sugiere que la transcripción de *algD* se encuentra aumentada. Esto fue confirmado cuando se realizaron ensayos de cuantificación de este exopolisacárido (tabla 3). Los resultados sugieren que, bajo estas condiciones de cultivo, la mutación *muc26* afecta de manera negativa, directa o indirectamente otros genes estructurales de la biosíntesis de alginato.

Cepa	Fenotipo mucoso	Alginato ($\mu\text{g} / \text{mg}$ células húmedas).
WI12	++	84.93 ± 13.3
RC26	-	5.20 ± 1.3
AC28	++	64.58 ± 8.4

Tabla 3.- Cuantificación de alginato en cultivos desarrollados en placas de medio BS modificado. Cultivo de 72 hrs/30°C.

Sin embargo, esta mutante RC26 sí fue capaz de producir alginato en cultivos líquidos en niveles similares a los producidos por su cepa parental (datos no mostrados). Por otro lado, la mutación *muc28* no incrementó la síntesis de alginato en la cepa AC28 bajo estas condiciones de cultivo.

6.3) Las mutantes RC26 y AC28 portan el miniTn5/luxAB.

Con el objeto de comprobar que las cepas RC26 y AC28 llevaban el minitransposón, se realizaron hibridaciones tipo "Southern" del DNA cromosomal de cada cepa y se utilizó como sonda el pUTminiTn5/luxAB. Este minitransposón no posee sitios para la enzima *XhoI* [de Lorenzo, *et al.* 1990], por lo que el DNA cromosomal de las mutantes se digirió con esta enzima de restricción buscando observar una sola banda de hibridación. Como se puede observar en la figura 10, la inserción de la mutante RC26 se localizó en una banda *XhoI* de 8 kb, mientras que la de la AC28 se localizó en una banda *XhoI* de 20 kb.

Sin embargo, en el carril de la mutante RC26 (carril 3) se observó otra banda más débil, de alrededor de 10 kb, que también hibridó. Para descartar que

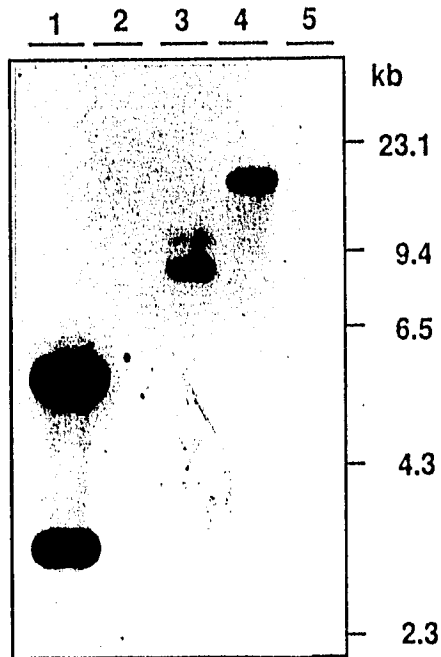


Fig. 10.- Autorradiografía de la Hibridación tipo "Southern" realizada para comprobar que las mutantes RC26 y AC28 llevaran el minitransposón. El DNA cromosomal fué digerido con *XhoI* y como sonda se utilizó el pUTminiTn5*luxAB*. 1).- pUTminiTn5*luxAB* digerido con *PstI* (control positivo), 2).- WI12, 3).- RC26, 4).- AC28, 5).- marcador de peso molecular λ *HindIII*

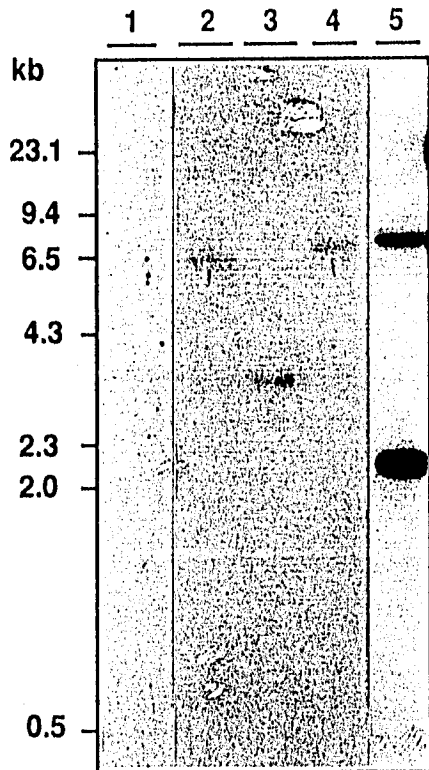


Fig. 11.- Autorradiografía de la hibridación tipo "Southern" utilizando DNA cromosomal de la mutante RC26 digerido con diferentes enzimas de restricción y como sonda el cassette de resistencia a Tc del miniTn5*luxAB*. 1.- Marcador de peso molecular λ *HindIII*, 2).- *Clal*, 3).- *BglII*, 4).- *KpnI*, 5).- miniTn5*luxAB* digerido con *SmaI*. La banda del carril 5 de 2kb corresponde al cassette de resistencia a Tc.

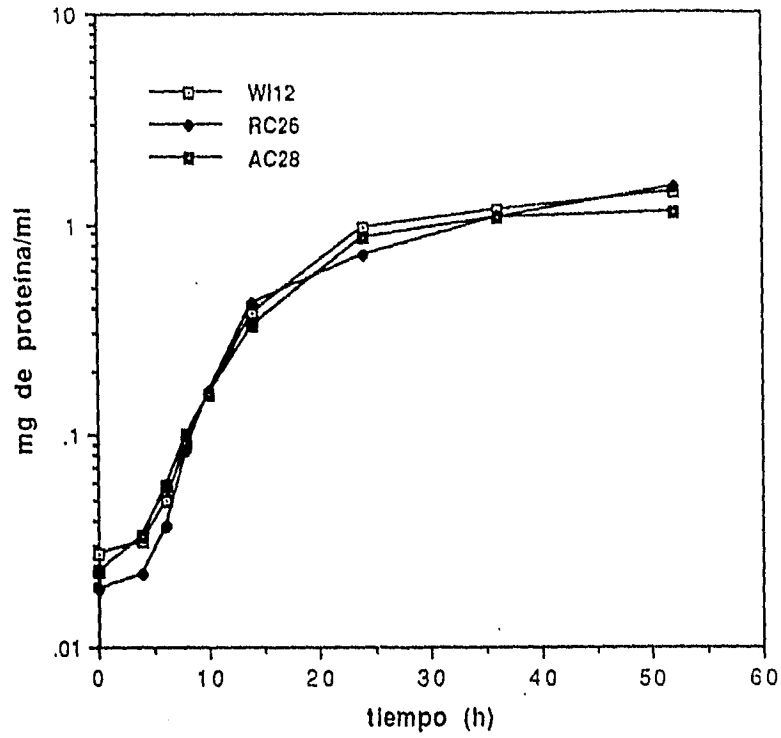
ésto se debiera a una doble inserción del minitransposón en el cromosoma, se realizó otra hibridación tipo "Southern" en la que se digirió el DNA cromosomal de la RC26 con enzimas de restricción que no estuvieran en el cassette de resistencia a tetraciclina y se utilizó como sonda este cassette. Si se habían dado dos eventos de transposición, hibridarían dos bandas, pero los resultados de la autorradiografía de la fig.11 nos indicaron que la doble banda que veíamos en el carril de la RC26, en la fig.10, era un artificio y que esta mutante poseía sólo una inserción del minitransposón ya que con todas las enzimas de restricción utilizadas sólo se observó una banda de hibridación.

6.4) Cuantificación de β -galactosidasa en las cepas RC26 y AC28.

El fenotipo en placa de las mutantes RC26 y AC28 nos sugirió que había un aumento en la actividad del producto del gen reportero *lacZ*, a consecuencia del aumento en la transcripción de *algD*. Para ver si este era el caso, se realizaron cinéticas de la actividad de β -galactosidasa en cultivos líquidos, tanto de la cepa padre WI12, como de sus derivadas RC26 y AC28. La fig. 12-A muestra que las mutaciones *muc26* y *muc28*, no afectan el crecimiento de las cepas RC26 y AC28, respectivamente, pues mostraron un patrón de crecimiento y niveles de proteína similares a los observados para la cepa parental WI12.

La Fig. 12-B muestra que en la cepa WI12 se observó una drástica caída de los niveles de β -galactosidasa durante la primera mitad de la etapa de crecimiento logarítmico. Posteriormente, esta actividad aumentó durante la fase preestacionaria y alcanzó el máximo nivel al inicio de la fase estacionaria (alrededor de las 24 hrs), en donde se mantuvo prácticamente constante. Estos resultados nos sugirieron que la transcripción de *algD* depende de la fase de crecimiento del cultivo: en la etapa de crecimiento logarítmico hay una disminución de la transcripción de *algD*, que posteriormente se eleva y alcanza niveles estables en la etapa estacionaria. Por otro lado, entre las mutantes y la cepa WI12 existen diferencias claras en el patrón de actividad de β -galactosidasa y en los valores absolutos alcanzados de dicha actividad. En las mutantes RC26 y AC28 se observó que, aún cuando existe la misma caída drástica en la primera mitad de la fase logarítmica, hay un aumento en la actividad de β -galactosidasa todavía en esta fase y alcanza los máximos niveles en fase preestacionaria (alrededor de las 15 hrs). Estos niveles,

A)



B)

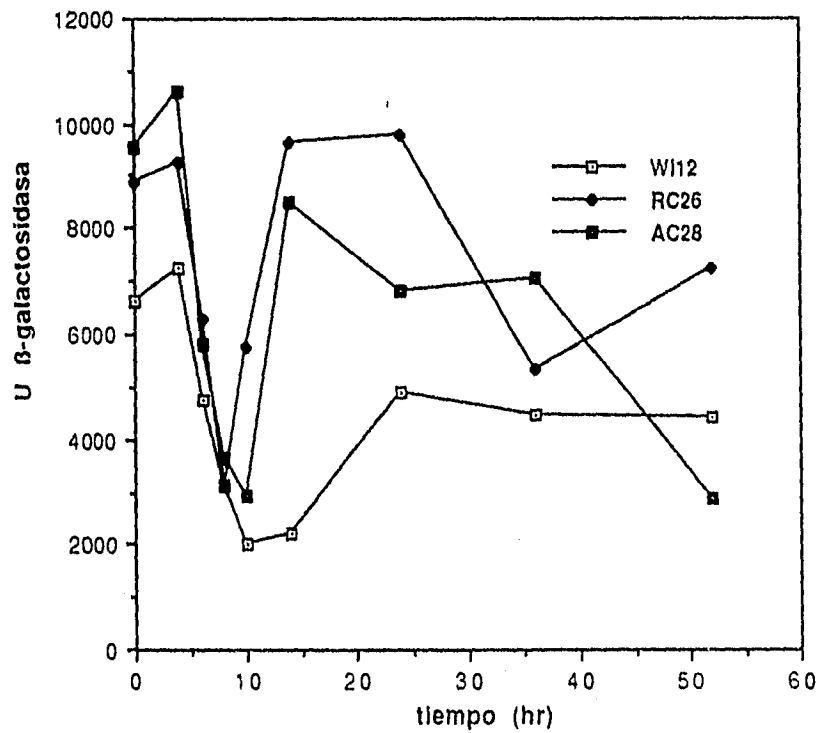


Fig. 12.- Determinación de β -galactosidasa en las cepas WI12, RC26 y AC28. A) curva de crecimiento, B) cinética de la actividad de β -galactosidasa.

incluso, fueron superiores a los máximos niveles que exhibe la cepa parental W112. Posteriormente, durante la fase estacionaria, se presenta una disminución de dicha actividad para ambas mutantes. El aumento neto de la actividad de β -galactosidasa en las mutantes RC26 y AC28 (calculado como el aumento del área bajo la curva con respecto a la cepa W112), fue del 73 y 45%, respectivamente. Sin embargo, este aumento no es constante a lo largo de la curva de crecimiento, observándose la mayor diferencia durante la segunda mitad de la fase de crecimiento logarítmico y en fase preestacionaria. Con estos resultados concluimos que, bajo estas condiciones de cultivo, en ambas mutantes la transcripción de *algD* se hallaba aumentada.

6.5) Construcción de cepas derivadas de ATCC 9046, AEIV y UW136 que contienen las mutaciones *muc26* y *muc28*.

En la cepa W112 se disminuyó la producción de alginato a niveles de un 25% con respecto a su cepa parental (ATCC 9046), debido a que contiene la fusión transcripcional del gen *algD* con el gen reportero *lacZ* (*algD::lacZ*) [Campos, *et al.* 1996].

Dado que las mutantes RC26 y AC28 llevan la misma fusión *algD::lacZ*, no es posible evaluar el efecto total de las mutaciones *muc26* y *muc28* sobre la biosíntesis de alginato. Por tal razón, estas mutaciones se transfirieron, por transformación, a las cepas ATCC 9046, AEIV y UW136, seleccionándose derivadas resistentes a tetraciclina y sensibles a kanamicina, que es el marcador de la fusión transcripcional *algD::lacZ* (tabla 2).

Las cepas ATCC 9046, AEIV y UW136 poseen diferencias claras en el patrón de digestión de DNA cromosomal, utilizando la enzima de restricción *Pst*I. Esta característica se utilizó para verificar que los patrones de digestión de las cepas construídas, correspondieran al patrón de su cepa parental. Además, se comprobó que estas derivadas tuvieran la inserción del miniTn5*luxAB* en su cromosoma, realizando hibridaciones tipo "Southern" (datos no mostrados). La transferencia de la mutación *muc28* al fondo de la ATCC 9046 se intentó 3 veces sin lograrlo, en todos los casos se obtuvieron mutantes espontáneas Tc^r. Como se mencionó anteriormente, la cepa ATCC 9046 es una cepa hipermucoide de *A. vinelandii*; hay resultados que sugieren que esta cepa tiene una mutación que afecta la regulación negativa de la biosíntesis de alginato [Martínez-Salazar, *et al.* 1996]. El hecho de que la mutación *muc28* no

pudo ser transferida a este fondo genético pero que sí fue estable en cepas medianamente mucoides (p. ej. en la WI12 y AEIV) sugirió que la mutación *muc28* en la cepa ATCC 9046 es letal, tal vez debido a la carga metabólica que representa sobreproducir aún más alginato.

6.6) Efecto de las mutaciones *muc26* y *muc28* sobre la producción de alginato en cultivos desarrollados en medio sólido.

Una vez que se transfirieron las mutaciones *muc26* y *muc28* a las 3 cepas de *A. vinelandii* (excepto la mutación *muc28* a la cepa ATCC 9046), se procedió a cuantificar el alginato producido por las diferentes cepas en medio BS modificado sólido. Los resultados se muestran en la tabla 4. La mutación *muc26* en el fondo de la ATCC 9046, al igual que en la cepa RC26 (ver tabla 2), disminuyó la producción de alginato en medio sólido, en un 50%, mientras que en la cepa RC26 casi abatió los niveles de este polisacárido.

mutación	ATCC 9046	AEIV	UW136
ninguna	454.5 ± 38.5	18.7 ± 3.3	2.73 ± 0.4
<i>muc26</i>	242.4 ± 26.6	76.9 ± 16.7	95.17 ± 20.6
<i>muc28</i>	*	145.0 ± 11.2	142.36 ± 13.0

Tabla4.- Cuantificación de alginato (μg /mg de células húmedas) en placas de BS modificado, cultivo de 72 hrs/30°C.

* no se logró obtener esta mutante.

En contraste, en las cepas derivadas de la AEIV y UW136 con las mutaciones *muc26* y *muc28*, se aumentó de manera significativa la producción de alginato. Dado que las cepas AEIV, UW136 y ATCC 9046 no son isogénicas, es posible que la diferencia observada en la producción de alginato en estas derivadas se deba a genes de la ATCC 9046 (hipermucoide) cotransferidos en la transformación y no a las mutaciones *muc26* y *muc28*. Para conocer únicamente el efecto de la mutación *muc26* y *muc28* en los fondos de las cepas AEIV y UW136, es necesario transferir sólo los genes afectados por estas mutaciones. Actualmente se trabaja en la clonación de las regiones interrumpidas por ambas mutaciones. Uno de los propósitos es transferirlas a cepas no isogénicas para evaluar su efecto sobre la biosíntesis de alginato.

6.7) Efecto de las mutaciones *muc26* y *muc28* sobre la producción de alginato en cultivos desarrollados en medio líquido.

Se cuantificó el alginato de cultivos desarrollados en medio BS modificado líquido. Los resultados se muestran en la tabla 5. A diferencia de lo observado en medio sólido, en estas condiciones la mutación *muc26* no afectó la cantidad de alginato producido por la cepa ATCC 9046. En *P. aeruginosa*, ya se había reportado que la sobreexpresión del gen *algD* no siempre implicaba un aumento en la biosíntesis de alginato [Tatnell, *et al*, 1995]. Lo mismo parece ocurrir en este caso, ya que la producción de alginato no se modificó a pesar de que la transcripción de *algD* se incrementa en un 73%, debido a la mutación *muc26* (fig. 12-B). Esto nos sugirió que pudiera existir una regulación postranscripcional del gen *algD* y que, a pesar de que hay un aumento en su transcripción, no exista un aumento paralelo en los niveles de la proteína AlgD. Sin embargo, también es probable que este no sea el caso y que la razón por la que no hay aumento en la producción de alginato sea porque, bajo estas condiciones, el producto de otro(s) gen(es) estructural(es) es(son) limitante(s).

mutación	ATCC 9046	AEIV	UW136
ninguna	3.8 ± 0.31	2.2 ± 0.05	0.10 ± 0.01
<i>muc26</i>	3.8 ± 0.32	2.6 ± 0.36	2.53 ± 0.28
<i>muc28</i>	*	3.0 ± 0.17	1.91 ± 0.04

Tabla 5.- Cuantificación de alginato (mg/mg proteína) en medio BS modificado líquido. Cultivo de 72 hrs/30°C.

* no se logró obtener esta mutante.

En el fondo de la cepa AEIV, tomando en cuenta las desviaciones estandar, la mutación *muc26* no tuvo ningún efecto significativo sobre la producción de alginato, mientras que la *muc28* la elevó en un 27%. Se observa claramente que en medio líquido, el efecto de estas mutaciones sobre la biosíntesis de alginato en el fondo de la cepa AEIV, no es tan marcado como el observado en medio sólido (comparar los resultados de la Tabla 4 y 5 para las cepas derivadas de la AEIV). ¿Por que en medio sólido, en el fondo genético de la AEIV, la mutación *muc28* incrementó la producción de alginato en un 775% y en medio líquido solo un 27% y por que la mutación *muc26* la incrementó sólo

en medio sólido pero no en líquido?. Aun no se tienen los datos suficientes para contestar a esta pregunta, pero lo que sí es claro, es que esta diferencia depende de factores ambientales ligados a un cultivo sólido y a uno líquido como por ejemplo, el grado de oxigenación del cultivo o las diferencias en la comunicación intercelular.

También en cultivos líquidos se pudo observar un aumento claro en la producción de alginato en las derivadas de la cepa UW136 con las mutaciones *muc26* y *muc28* (el efecto de ambas mutaciones en el fondo de la cepa UW136 se trata en el punto 6.9)

6.8) Efecto de las mutaciones *muc26* y *muc28* sobre la producción volumétrica de alginato.

Por otro lado, también se evaluó la cantidad de alginato producido por mililitro de medio de cultivo, valor que depende, comparado con la producción específica, de la cantidad de biomasa producida por cada cepa. Volumétricamente la mutación *muc26* aumentó en un 20 y en un 26% la producción de alginato en los fondos de las cepas ATCC 9046 y AEIV, respectivamente (tabla 6). Esto se debe a que ambas derivadas lograron alcanzar niveles de proteína superiores a los alcanzados por sus respectivas cepas parentales, sin que se afectara la producción de alginato.

mutación	ATCC 9046	AEIV	UW136
ninguna	3.68 ± 0.21	2.72 ± 0.11	0.16 ± 0.02
<i>muc26</i>	4.6 ± 0.51	3.44 ± 0.08	3.26 ± 0.23
<i>muc28</i>	*	2.70 ± 0.14	2.50 ± 0.05

Tabla 6.- Cuantificación de alginato (gr/litro de medio de cultivo) en medio BS modificado líquido. Cultivo de 72 hrs/30°C.

* no se logró obtener esta mutante.

La mutación *muc28* en el fondo de la cepa AEIV, volumétricamente no alteró los niveles de alginato a pesar de que específicamente elevó en un 27% la producción de este polisacárido. Este resultado se explica fácilmente ya que, según observaciones hechas en el laboratorio, existe una correlación inversa entre la producción específica de alginato y la producción de biomasa.

Los datos de producción de alginato en las cepas que llevan las mutaciones *muc26* y *muc28*, nos indicaron que, al igual que en *P. aeruginosa*, en *A. vinelandii* hay diferencias claras en el fenotipo de la misma mutación (p. ej. *muc26* ó *muc28*) dependiendo de los fondos genéticos (ATCC 9046 ó AEIV), lo cual se aprecia en los resultados de las tablas 4 y 5. Además, para *A. vinelandii* se confirmó que las condiciones de cultivo (en este caso el tipo de medio de cultivo utilizado, sólido o líquido), son determinantes en el efecto de una mutación sobre la producción específica de alginato. El caso más claro es el de la mutación *muc26* en el fondo de la cepa ATCC 9046 donde la producción de alginato disminuyó en medio sólido pero no en medio líquido. En *P. aeruginosa* sucede algo similar, el efecto sobre la biosíntesis de alginato de una mutación en el gen regulador *algR2*, depende de la temperatura de cultivo; a 30° no se observa ningún efecto mientras que a 37°C esta mutación bloquea la biosíntesis de este polisacárido, lo que indica que el gen *algR2* es necesario para la producción de alginato a 37° pero no a 30°C [Deretic y Konieczni, 1989; Kato, *et al.* 1989].

6.9) Las mutaciones *muc26* y *muc28* están ligadas al gen *algU*.

La cepa UW136 no es mucoide y no produce alginato por tener una secuencia de inserción de 900 pb en el gen *algU*, de tal forma que cuando se le transfiere el gen *algU* silvestre se restablece la producción de alginato [Martínez-Salazar *et al.*, 1996]. Como se puede observar en las Tablas 4, 5 y 6, las derivadas de la cepa UW136 con las mutaciones *muc26* y *muc28* (cepas denominadas CNW26 y CNW28, respectivamente), fueron capaces de producir alginato a niveles comparables con los de la ATCC 9046 y la AEIV (ver fig. 13). Esto nos sugirió que las mutaciones *muc26* y *muc28*, se localizan cerca del gen *algU* y que al transferir estas mutaciones se cotransfirió el gen *algU* silvestre.

Como se mencionó en la introducción, en el laboratorio se identificó el cósmido pSMU865, el cual contiene los genes *algU*, *mucA* y *mucB* en una banda *EcoRI* de 10 kb. Si en las cepas CNW26 y CNW28 se efectuó un reemplazo del gen *algU* truncado por el gen *algU* silvestre, los genes *algU*, *mucA* y *mucB* ahora se localizarían en un fragmento de restricción *EcoRI* 900 pb menor que el observado en la cepa UW136. Para ver si este era el caso, se realizaron hibridaciones tipo "Southern" utilizando DNA cromosomal de las mutantes,

digerido con *EcoRI* y como sonda el fragmento *EcoRI* de 10 kb derivado del pSMU865 que contiene los genes *algU*, *mucA* y *mucB*.

Los resultados mostraron que en las cepas CNW26 y CNW28 los genes *algU*, *mucA* y *mucB* se localizan en una banda *EcoRI* menor que la observada en la UW136 y del mismo tamaño que la observada en la cepa ATCC 9046 (fig. 14). Lo anterior confirmó que las cepas CNW26 y CNW28 llevan el gen *algU* silvestre y por ello concluimos que las mutaciones *muc26* y *muc28* se localizan cerca de *algU*, pero fuera de la región del fragmento *EcoRI* de 10 kb, ya que de haberse insertado el minitransposón en este fragmento, hubieran hibridado dos bandas de tamaño menor pues el miniTn5*luxAB* posee sitios *EcoRI*.

6.10) Los locus *muc26* y *muc28* no corresponden a los contenidos en los cósmidos pSMU588, pSMU865 y pSMU986.

Como se mencionó anteriormente, ensayos de supresión de la mucoidía de la cepa ATCC 9046 por un banco de genes provenientes de la cepa UW136, permitieron identificar 3 cósmidos con genes cuyos productos regulan negativamente la biosíntesis de alginato: pSMU588, pSMU865 y pSMU986.

Para ver si los locus *muc26* y *muc28* corresponden a los contenidos en estos cósmidos, se realizaron hibridaciones tipo "Southern" utilizando estos cósmidos como probadores y DNA cromosomal de las dos mutantes inicialmente seleccionadas (RC26 y AC28) y de la cepa parental WI12 (fig. 15, 16, y 17). Dado que los patrones de hibridación son idénticos entre las mutantes y la cepa WI12, se concluyó que los locus *muc26* y *muc28* son diferentes a los locus reguladores negativos de la biosíntesis de alginato contenidos en los cósmidos pSMU588, pSMU865 y pSMU986.

6.11) Posibles funciones de los locus *muc26* y *muc28*.

El promotor del gen *algD* en la cepa de *A. vinelandii* WI12, como se mencionó anteriormente, posee dos inicios de la transcripción, uno dependiente del factor sigma AlgU y el otro del factor σ^D , homólogo al factor σ^{70} de *E. coli*. Dado que este último inicio de la transcripción sería constitutivo, uno esperaría que la regulación de la transcripción del gen *algD* se dé a través de regular el inicio de la transcripción dependiente de AlgU. Esto último puede lograrse por lo menos de dos maneras: mediante la regulación negativa de la actividad del factor sigma AlgU, a través de factores antisigma, p. ej. MucA y MucB, y/o

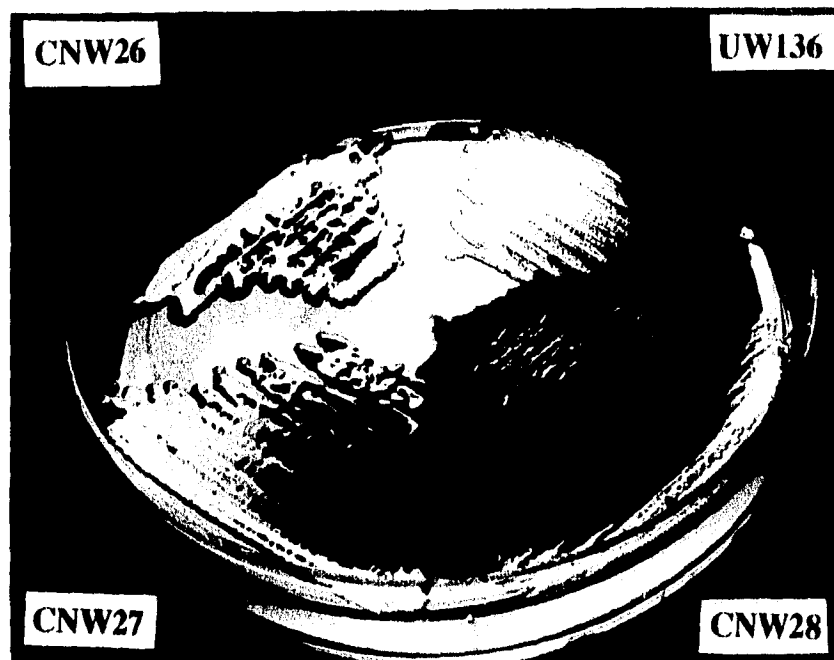


Fig. 13.- Fenotipo de la cepa UW136 y de sus derivadas que llevan la mutación *muc26* y *muc28* (denominadas CNW26 y CNW28, respectivamente). Se puede apreciar que, contrario a lo observado en la cepa UW136, las derivadas poseen un fenotipo mucoso por haberse restablecido la producción de alginato.

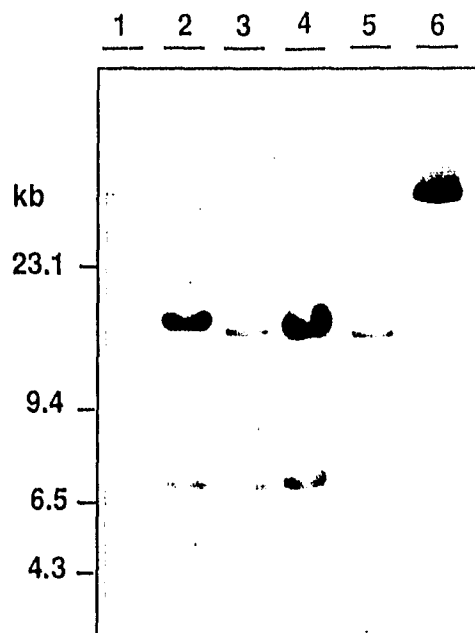


Fig. 14.- Autorradiografía de la Hibridación tipo "Southern" de DNA cromosomal digerido con *EcoRI* y utilizando como sonda un fragmento *EcoRI* de 10 kb derivado del cósmido pSMU865 que contiene los genes *algU*, *mucA* y *mucB*. 1).- Marcador de peso molecular λ *HindIII*, 2).- UW136, 3).-CNW26, 4).-CNW28, 5).ATCC 9046, 6).-pSMUD865 (control positivo).

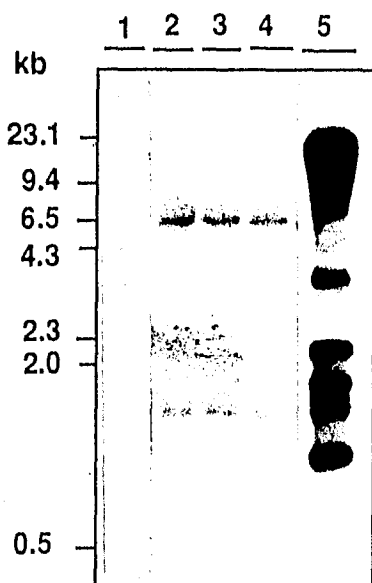


Fig. 15.- Autorradiografía de la hibridación tipo "Southern" utilizando DNA cromosomal digerido con *PstI* y como sonda el cósmido pSMU588. 1).- marcador de peso molecular λ *HindIII*, 2).-W112, 3).-RC26, 4).-AC28, 5).pSMU588 digerido con *PstI*.

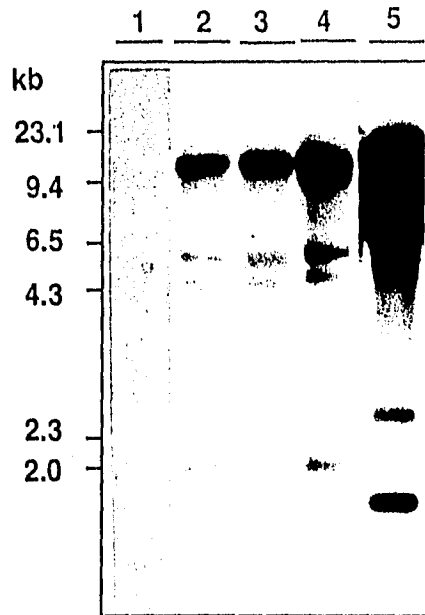


Fig. 16.- Autorradiografía de la hibridación tipo "Southern" utilizando DNA cromosomal digerido con *EcoRI* y como sonda el cósmido pSMU865. 1).- Marcador de peso molecular λ HindIII, 2).-WI12, 3).-RC26, 4).-AC28, 5).- pSMU865 digerido con *EcoRI*.

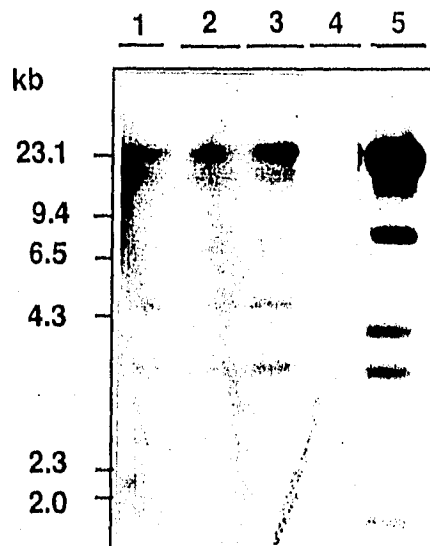


Fig. 17.- Autorradiografía de la hibridación tipo "Southern" utilizando DNA cromosomal digerido con *EcoRI* y como sonda el cósmido pSMU986. 1).- WI12, 2).-RC26, 3).-AC28, 4).- marcador de peso molecular λ HindIII, 5).-pSMU986 digerido con *EcoRI*.

modulando la actividad de reguladores positivos como AlgR. Por un lado, hay evidencias que sugieren que en *A. vinelandii* la actividad de AlgU está regulada de forma negativa por el producto de los genes *mucA* y *mucB*, de tal manera que cuando se sobreexpresan, disminuye la producción de alginato [Martínez-Salazar, *et al.*1996]. Pero además, es probable que exista una regulación positiva de la actividad de AlgU a través de modular la actividad del factor antisigma MucA de la misma manera como ocurre con la regulación de la actividad de σ^E en *E. coli*. En esta bacteria, dado que este factor sigma participa en respuesta a estrés por calor, su actividad se incrementa con la presencia de proteínas anormales en el espacio periplásmico [Meccas, *et al.* 1993]. Resultados preliminares sugieren que la presencia de estas proteínas anormales inactivan el factor antisigma RseA, proceso en el cual participa la proteína RseB. RseA y RseB son proteínas homólogas a MucA y a MucB, respectivamente. RseA se encuentra unido a membrana interna, cuando es inactivada libera el factor σ^E lo que resulta en un aumento en la actividad de este factor [Alejandro De las Peñas, comunicación personal]. De esta forma, en condiciones en donde se acumulan proteínas anormales en el espacio periplásmico, ya sea en situaciones de estrés por calor, por la falta de proteasas periplásmicas encargadas de eliminar dichas proteínas (p. ej. HtrA) o por la sobreexpresión de proteínas de membrana interna, se incrementa la actividad de σ^E . En *P. aeruginosa*, como ya se había comentado con anterioridad, se identificó el gen *algW*, que codifica para una serín proteasa homóloga a HtrA. Se encontró que mutaciones en este gen resultan en la sobreexpresión de los genes estructurales de la biosíntesis de alginato y en un fenotipo mucoide [Boucher, *et al.*, 1996]. Este hecho apoya la idea de que la regulación de AlgU pudiera ser similar a la de σ^E . Por analogía, en *A. vinelandii* la actividad de AlgU pudiera verse incrementada por estrés calórico o por la falta de proteasas homólogas a HtrA.

Por otro lado, es posible que exista una regulación negativa por proteólisis de activadores transcripcionales o de reguladores positivos, similar a la reportada en *E. coli*, para la producción de un polisacárido capsular llamado ácido colánico. La transcripción de algunos genes estructurales de la biosíntesis de este polisacárido, entre ellos los genes *cps*, se incrementan en cepas que poseen mutaciones en el gen *lon*, el cual codifica para una proteasa. Estudios posteriores sugieren que el incremento en la expresión de los genes *cps* y el fenotipo mucoide en mutantes *lon*, se debe al incremento en la actividad de un

regulador positivo llamado RcsA, el cual es sustrato de la proteasa Lon. De esta manera, el regulador positivo en mutantes *lon* está libre de la regulación negativa que ejerce sobre él esta proteasa, lo que resulta en la sobreexpresión de los genes estructurales de la biosíntesis de ácido colánico y en un fenotipo mucoide [Gottesman, 1987]. Por analogía, es probable que la regulación negativa de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*, también se dé a través de regular por proteólisis la actividad de elementos reguladores positivos de esta ruta biosintética.

Con lo que respecta a las mutaciones *muc26* y *muc28*, identificadas en el presente trabajo, es necesario realizar la secuencia nucleotídica de los genes interrumpidos con el objeto de esclarecer de que manera ejercen su efecto negativo sobre la transcripción de *algD*. Sin embargo, por lo antes mencionado, estos genes reguladores negativos pudieran codificar factores antisigma que modularan la actividad de AlgU o proteasas específicas que de alguna manera modulen la actividad de MucA o la de reguladores positivos como AlgR, aunque si este último fuera el caso, esta proteasa, según hibridaciones tipo "Southern", utilizando como probador el cósmido pMSD1506 y DNA cromosomal de las mutantes, no se localizaría cerca del gen *algR* (datos no mostrados).

7.- CONCLUSIONES

1.- La transcripción del gen *algD* es dependiente de la fase de crecimiento. Se disminuye en fase logarítmica, posteriormente se incrementa en fase preestacionaria y alcanza niveles máximos y estables al inicio de la fase estacionaria.

2.- Las mutaciones *muc26* y *muc28* aumentan la transcripción de *algD*, probablemente porque han afectado genes que, directa o indirectamente, regulan negativamente dicha transcripción.

3.- Los locus *muc26* y *muc28* no corresponden a los locus reguladores negativos de la biosíntesis de alginato contenidos en los cósmidos pMSU588, pMSU865 ni pMSU986. Esto indica que en *A. vinelandii* existen al menos 5 regiones con genes reguladores negativos de la biosíntesis de alginato.

4.- Las mutaciones *muc26* y *muc28* están ligadas al gen que codifica para el factor sigma AlgU.

5.- La mutación *muc26*, en el fondo de la cepa ATCC9046, disminuye la producción de alginato en cultivos desarrollados en medio sólido, pero no en medio líquido.

6.- El aumento en la transcripción de *algD*, debido a la mutación *muc26*, no resulta en un aumento en la biosíntesis de alginato. Esto sugiere que otras actividades enzimáticas son limitantes.

7.- La mutación *muc26* aumenta la producción de biomasa en las derivadas de las cepas ATCC9046 y AEIV, al cabo de 72 hr de cultivo en medio BS modificado líquido; por esta razón, se aumenta en un 20 y 26%, respectivamente, la producción volumétrica de alginato.

8.- Las mutaciones *muc26* y *muc28* aumentan de manera significativa la biosíntesis de alginato en la cepa AEIV en medio sólido, al elevarla en un 411 y 775%, respectivamente. En medio líquido sólo la mutación *muc28* la

incrementa en un 27%. Estos datos nos indican (ver también punto No. 5) que el efecto de una misma mutación sobre la biosíntesis de alginato depende de factores ambientales particulares de las condiciones de un cultivo sólido y uno líquido. Estos factores pudieran ser las diferencias en el grado de oxigenación del cultivo o en la comunicación intercelular.

8.- PERSPECTIVAS

Actualmente se tiene clonada la región cromosomal de las mutantes RC26 y AC28 que llevan la resistencia a Tc. Este DNA cromosomal se va a utilizar de sonda para localizar, en un banco genómico de la cepa ATCC 9046, los cósmidos que lleven la región silvestre correspondiente de ambas mutantes. Posteriormente, se subclonarán los genes interrumpidos para determinar la secuencia nucleotídica de cada uno de ellos.

Como se mencionó con anterioridad, dado lo que se conoce de la genética molecular de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*, se puede esperar que la regulación negativa de la transcripción del gen *algD*, se dé a través de regular el inicio de la transcripción dependiente de AlgU. Si esto es verdad, en las mutantes RC26 y AC28, la transcripción de *algD* a partir del promotor dependiente de AlgU, se encontrará aumentada. Sería interesante realizar ensayos de "primer extension" para esclarecer totalmente este punto. En este contexto, la regulación negativa de la transcripción de *algD* se puede dar a través de regular negativamente la actividad del factor σ^E (AlgU) o de reguladores positivos como AlgR. De esta forma pudieran estar implicados otros factores antisigma, además de los ya reportados o proteasa que modulen indirectamente la actividad de factores antisigma como MucA o directamente la actividad de reguladores positivos de la transcripción de *algD*. Posiblemente con las secuencias nucleotídicas de los genes afectados por las mutaciones *muc26* y *muc28*, se pueda sugerir algún modelo que explique el mecanismo por el cual éstos regulan de manera negativa la transcripción de *algD*.

Resultados preliminares sugieren que el efecto de la mutación *muc26* sobre la transcripción de *algD* pudiera estar regulado por oxígeno, lo que explicaría los diferentes efectos que esta mutación tiene sobre la producción de alginato en cultivos desarrollados en medio sólido y en medio líquido; sin embargo, con el objeto de comprobarlo totalmente, es necesario realizar cinéticas de actividad de β -galactosidasa variando de forma fina la tensión de oxígeno disuelto en el medio de cultivo.

Por otro lado, sería interesante construir una doble mutante *muc26* y *muc28* para saber si poseen un efecto aditivo sobre la transcripción de *algD* y la biosíntesis de alginato. Esto con el objeto de tratar de esclarecer si las mutaciones han afectado mecanismos diferentes de la regulación de la

transcripción de *algD* o ambas han alterado dicha transcripción a través de afectar un solo elemento regulador.

Los resultados del presente trabajo nos indican que la utilización de la construcción *algD::lacZ* es buena estrategia para identificar genes reguladores de la biosíntesis de alginato. Dado que el banco de mutantes que se obtuvo fué de 3200, consideramos que aún se pueden identificar mas genes reguladores negativos si se continúa la mutagénesis de la cepa WI12. Sin embargo, hay resultados que nos sugieren que la regulación de la biosíntesis de alginato no sólo se da a nivel de la transcripción de *algD*. Por esta razón, es necesario conocer la regulación que sufren otros genes estructurales de esta biosíntesis con el fin de proponer un modelo mas general. Uno de los genes estructurales cuya regulación sería interesante estudiar es *algC* ya que se localiza fuera del grupo de genes estructurales encabezados por *algD* y además, en *P. aeruginosa*, participa en la biosíntesis de lipopolisacáridos, condición que pudiera ser similar en *A. vinelandii*. Otra alternativa es estudiar la regulación a la que están sujetos genes reguladores ya identificados como el operón encabezado por *algU* y el esclarecimiento de la naturaleza de los genes reguladores negativos contenidos en los cósmidos supresores de mucoidía pSMU588 y pSMU986.

9.- BIBLIOGRAFIA

- Annison, G. and Lain C. 1986. Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Microb. Biotech.* 25: 55-61.
- Berry, A., J.D. De Vault and A.M. Chakrabarty. 1989. High osmolarity is a signal for enhance *algD* transcription in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Bacteriol.* 171: 2312-2317.
- Boucher, C.J., Martínez-Salazar J., Schurr M. J., Mudd M. H., Yu H. and V. Deretic. 1996. Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA. *J. Bacteriol.* 178: 511-523.
- Boyd, A., M. Ghosh, T. B. May, D. Shinaberger, R. Koehg, and A. M. Chakrabarty. 1993. Sequence of the *algL* gene of *Pseudomonas aeruginosa* and purification of its alginate lyase product. *Gene* 131:1-8
- Boyd, A. and A.M. Chakrabarty. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *J. Ind. Microb.* 15: 162-168
- Chakrabarty, A. M. 1991. Molecular genetics and environmental regulation of alginate biosynthesis. *Appl. Phycology. Forum.* 8: 1-6.
- Campos, M.E., J. M. Martínez-Salazar, L. Lloret, S. Moreno, C. Núñez, G. Espín and G. Soberón Chávez. 1996. Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 178: 1793-1799.
- 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 Microb.* 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
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik and K. N. Timmis. 1990. Mini Tn-5 Transposon Derivatives for insertion mutagenesis, Promoter, 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 Acid research.* 15:4567-4581.
- Deretic, V. and W. M. Konyecsni. 1989. Control of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: Transcriptional regulation of *algR* and identification of the second regulatory gene, *algQ*. *J. Bacteriol.* 171: 3680-3688.
- Deretic, V., R. Dikshit, W. M. Konyecsni, T. Misra, A. M. Chakrabarty, and T. K. Misra. 1989. The *algR* gene, which regulates mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, belongs to a class of environmentally responsive genes. *J. Bacteriol.* 171:1278-1283

- Deretic, V., J. R. W. Govan, W. M. Konieczni and D. W. Martin.** 1990. Mucoicid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: Mutations in the *muc* loci affect transcription of the *algR* and *algD* genes in response to environmental stimuli. *Mol. Microb.* 4: 189-196.
- Deretic, V., J. H. Leveau, C. D. Mohr and N. S. Hibler.** 1992. In vitro phosphorylation of AlgR, a regulator of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, by a histidine kinase and effects of small phospho-donor molecules. *Mol. Microbiol.* 6: 2761-2767.
- Deretic, V., M. J. Schurr, J.C. Boucher and D. W. Martin.** 1994. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factor. *J. Bacteriol.* 176: 2770-2780.
- Deretic, V., M. J. Schurr and H. Yu.** 1995. *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. *Trends Microb.* 3(9): 351-356.
- Ertesvag, H., H. K. Hoidal, I. K. Hals, A. Rian, B. Døseth and S. Valla.** 1995. A family of modular type mannuronan C-5 epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Microb.* 16:719-731.
- Ferrari Eugenio, Sandra M. H. Howard and James A. Hoch.** 1985. Effect of sporulation mutations on subtilisin expression, assayed using a subtilisin- β -Galactosidase gene fusion. In J. A. Hoch and P. Setlow (ed.), *Molecular biology of microbial differentiation*. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 180-184.
- 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-Azotobacteri* lineage of superfamily B prokaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:436-443.
- 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, orientation and sequence specificity. *J. Bacteriol.* 175: 5452-5459.
- Fyfe, J. A. M., and J. R. W. Govan.** 1980. Alginate synthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*: a chromosomal locus involved in control. *J. Gen. Microbiol.* 119: 443-450.
- 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. Microb.* 6: 59-66
- Goldberg, J. B., K. Hatano and G. B. Peir.** 1993. Synthesis of lipopolysaccharide O side chain by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 requires the enzyme phosphomannomutase. *J. Bacteriol.* 175: 1605-1611.
- 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.

- González-López, J., V. Salmeron, M. V. Martínez-Toledo, F. Ballesteros and A. Ramos-Cormenzana.** 1985. Production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC12837 in chemically-defined media and dialysed soil media. *Soil. Biol. Biochem.* **18**: 119-120.
- Gottesman, S.** 1987. Regulation by proteolysis. In J. L. Ingraham, K. Brooks Low, B. Magazanik, M. Schaechter and H. E. Unbarger (ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1308-1312.
- Kato, J., L. Chu, J. D. DeVault, K. Kimbara, A. M. Chakrabarty and T. K. Misra.** 1989. Nucleotide sequence of a regulatory region controlling alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of the *algR2* gene. *Gene*: **84**: 31-38.
- Kato, J., TK Misra and A. M. Chakrabarty.** 1990. AlgR3, a protein resembling eukaryotic histone H1, regulates alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 2887-2891.
- 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., 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.
- Kennedy, C., and Toukdarian.** 1987. Genetics of Azotobacters: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 227-258.
- Knutson, C. A., and A. Jeans.** 1968. A new modification of the carbazole reaction: applications to heteropolysaccharides. *Analyt. Biochem.* **24**: 470-481.
- Lowry, D., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- 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. Georgopolous.** 1988. Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a σ^{32} -independent mechanism of heat inducible transcription. *Nucleic Acids Research* **16**: 10053-10067.
- Lloret, L., R. Barreto, M. E. Campos, S. Moreno, J. M. Martínez-Salazar, G. Espín, R. León and G. Soberón.** 1996. Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters. *Mol. Microb. sometido*.
- Maharaj, R., T.B. May, S. K. Wang and A. M. Chakrabarty.** 1993. Sequence of *alg8* and *alg44* genes involved in the synthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: *Gene*. **136**: 267-269
- Maldonado, R., J. Jiménez and J. Cassadeus.** 1994. Changes in ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *J. Bacteriol.* **176**: 3911-3919.
- Martin** 1993. *Mol. Microbiol.* **9**:495-506.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Martin, D. W., M. J. Schurr, M. H. Mudd, J. R. W. Govan, B. W. Holloway and V. Deretic.** 1993-a. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:8377-8381.
- Martin D.W., B.W. Holloway and V. Deretic.** 1993-b. 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, H. Yu and V. Deretic.** 1994. Analysis of promoters controlled by the putative sigma factor AlgU regulating conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: relation to σ^E an stress response. *J. Bacteriol.* 176: 6688-6696.
- Martínez-Salazar J., S. Moreno, R. Nájera, C. Boucher, G. Espín, G. Soberón-Chávez and V. Deretic.** 1996. Characterization of genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their role in alginate Biosynthesis. *J. Bacteriol.* 178: 1800-1808.
- May, T.B., Dean S., Romilla M., Junichi K., Leln 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. Microb. Rev.* 4:191-206.
- May, T. B. and A. M. Chakrabarty.** 1994. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends Microbiol.* 2: 151-157.
- Meccas, J., P. E. Rouviere, J. W. Erickson, T. J. Donohue and C. A. Gross.** 1993. The activity of σ^E , an *Escherichia coli* heat-inducible σ -factor, is modulated by expression of outer membranes 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. 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.
- Miller, J.H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 432-435.
- Page, W. and H. L. Sadoff.** 1976. Physiological factors affecting transformation of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 125: 1080-1087.
- Page, W.** 1982. Optimal conditions for induction of competence in nitrogen-fixing *Azotobacter vinelandii*. *J. Microbiol.* 28: 389-397.
- Pindar, D. F. and C. Bucke.** 1975. The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* 152:617-622.
- Rehm, B. H. A., G. Bohelm, J. Thommassen and U. K. Winkler.** 1994. Overexpression of *algE* in *Escherichia coli*: subcellular localization, purification and ion channel properties. *J. Bact.* 176: 5639-5647
- Sadoff, H. L.** 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. rev.* 39 (4): 516-539.

- Shiller, 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, 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. Microb. 9:1027-1035.
- Schlichtman, D. A., A. Kavanaugh-Black, S. Shankar and A. M. Chakrabarty. 1994. Energy metabolism and alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: role of the tricarboxylic acid cycle. J. Bacteriol. 176: 6023-6029
- Schurr, M.J., D. W. Martin, M. H. Mudd and V. Deretic. 1994. Gene cluster controlling conversion to alginate overproducing phenotype in *Pseudomonas aeruginosa*: functional analysis in a heterologous host and role in the instability of mucoidy. J. Bacteriol. 176:3375-3382
- 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 (σ^E) which control mucoidy in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 177: 5670-5679.
- Skjak-Brek, G., Larsen B. and H. Grasdalen. 1985. The role of O- acetyl groups in the biosynthesis of alginate by *Azotobacter vinelandii*. Carb. Research. 145: 169-174.
- Sokol, P. A., M. Luan, D. G. Storey and P. Thirykkumaran. 1994. Genetic rearrangement associated with in vivo Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO is due to insertion elements. J. Bacteriol. 176: 553-562.
- Sutherland, I. W. 1985. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharide. Annu Rev. Microbiol. 39: 243-270.
- Tatnell, P.J., N. J. Russell, P. Gacesa. 1994. GDP manose dehydrogenase is the key regulatory enzyme in alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence from metabolite studies. Microbiol. 140: 1745-1754.
- Tinoco, V. R. 1993. Obtención de alginatos bacterianos por fermentación líquida de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría en Biotecnología IBT. UNAM, México. 39-40.
- Terry, J. M., S. E. Piña and S. J. Mattingly. 1991. Environmental conditions which influence mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Infect Immun. 59: 471-477.
- Wozniak, D. J., and D. E. Ohman. 1994. Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* *i* genes *algR*, *ialgB* 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.