

85  
29



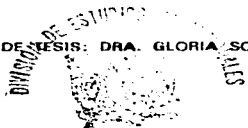
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**IDENTIFICACION DE ALGUNOS PROMOTORES QUE  
INICIAN LA TRANSCRIPCION DE LOS GENES  
ESTRUCTURALES PARA LA BIOSINTESIS DEL  
EXOPOLISACARIDO ALGINATO EN  
*Azotobacter vinelandii*.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A  
**RENATO LEON RODRIGUEZ**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GLORIA SOBERON CHAVEZ



FACULTAD DE CIENCIAS  
SEPT 1987

**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Banule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Identificación de algunos promotores que inician la transcripción de los genes estructurales para la biosíntesis del exopolisacárido alginato en Azotobacter vinelandii, realizado por Renato León Rodríguez.

con número de cuenta 9052145-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dra. Gloria Soberón Chávez.
Propietario	Dr. Ignacio Camacho Arroyo.
Propietario	M en C. Víctor Manuel Valdés López.
Suplente	BIOL. Miguel Angel Meneses Pérez.
Suplente	M en IBB. Rosalinda Tapia López.

*Gloria Soberón*  
*I. M. Ar*  
*V. M. Valdés*  
*M. Meneses*  
*R. Tapia*

Consejo Departamental de Biología

*[Signature]*  
C. de la Facultad de Ciencias, UNAM, México

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO Y BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. GLORIA SOBERON CHAVEZ, EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.**

**A Josefina Rodríguez Senaida**  
Su amor y su perseverancia  
no conocen límites

uno por su pureza y la otra  
por su valor para doblegar al  
destino.

Por ello, nada más diáfano  
y sincero en mi vida,

que dedicar este trabajo  
a mi madre, por su cariño  
infinitamente cierto.

**A mi padre Artemio León Pérez**  
Por depositar su confianza para  
concretar parte de sus  
ilusiones.

**A mis hermanos Elizabeth,**  
Araceli, Meribel, Delia,  
Erubiel y Guadalupe  
Porque su fraternidad  
latante, es uno de los  
preciados lujos de mi vida.

**A la memoria de mis abuelos**  
Felipe León y Nicolasa Pérez  
Donde quiera que esten, muchas  
Gracias.

**A mi familia, especialmente a**  
Mercedes León P. Que de uno  
u otro modo me han ayudado  
y estimulado para seguir  
adelante. Y a J. Concepción León  
P. Por la anecdótica situación  
que esta viviendo.

**A mis amigos. Citar nombres no**  
tiene sentido, lo improtante fué  
la oportunidad de crear lazos y  
de establecer vinculos más  
solidos y estrechos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Gloria Soberón Chávez por todo el apoyo, orientación y estímulos constantes que me ha brindado.

A mis sinodales por las revisiones y comentarios hechas a este trabajo: Dra. Gloria Soberón C., Dr. Ignacio Camacho A., M en C. Víctor Valdes L., Biól. Miguel A. Meneses P. y M en IBB. Rosalinda Tapia L.

A todos los integrantes del laboratorio estudiantes, académicos y administrativos que colaboraron conmigo directa o indirectamente, especialmente al M en B. Humberto Mejía y la Biól. Soledad Moreno por la conducción inicial en el trabajo experimental.

A todos los grandes maestros que he tenido durante mi formación profesional.

A la UNAM, esta maxima casa de estudios por lo que me ha brindado.

A todas aquellas personas que contribuyeron a obtener la presente meta.

## INDICE

I	RESUMEN.....	iii
II	IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA BIOSINTESIS DEL ALGINATO EN <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	iv
III	INTRODUCCION.....	1
3.1	Generalidades de <i>A. vinelandii</i> .....	1
3.1.1	Posición Taxonomica.....	1
3.1.2	Características de <i>A. vinelandii</i> .....	1
3.1.3	Ciclo de vida de <i>A. vinelandii</i> .....	2
3.2	Composición y propiedades del alginato.....	5
3.3	Aplicaciones del alginato.....	5
3.4	Fisiología del alginato.....	8
3.5	Fuentes de obtención de alginato.....	9
3.6	Bioquímica de la biosíntesis de alginato.....	10
3.7	Genética y regulación de la biosíntesis de alginato.....	16
3.7.1	Organización y localización física de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato en <i>P. aeruginosa</i> .....	16
3.7.2	Regulación de la mucoidía en <i>P. aeruginosa</i> .....	18
3.7.3	Regulación de la transcripción del operón <i>alg</i> en <i>P. aeruginosa</i> .....	19
IV	ANTECEDENTES.....	23
V	OBJETIVOS.....	25
VI	MATERIALES Y METODOS.....	26
6.1	Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.....	27
6.2	Enzimas de restricción utilizadas en este trabajo.....	28
6.3	Purificación de ADN plásmidico.....	29
6.4	Purificación de ARN total de <i>A. vinelandii</i> .....	29
6.5	Electroforesis.....	30
6.5.1	Electroforesis de ADN.....	30
6.5.2	Electroforesis de ARN.....	30
6.6	Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	31
6.7	Purificación de bandas de ADN.....	31
6.8	Marcaje radiactivo de sondas.....	32
6.9	Hibridación de ADN-ADN (tipo "Southern").....	32
	Transferencia de ADN.....	32

	Hibridación.....	33
6.10	Hibridación de ARN-ADN (tipo "dot blot").....	34
	Transferencia del ARN.....	34
	Estrategia experimental.....	35
VII	RESULTADOS Y DISCUSION.....	36
7.1	Obtención de los fragmentos que se utilizaron como sondas las hibridaciones.....	37
7.2	Localización de los genes <i>algJ</i> y <i>algG</i> en la región <i>alg</i> del genoma de <i>A. vinelandii</i> .....	39
7.3	Identificación de tres promotores que inician la transcripción de los genes estructurales para la biosíntesis del alginato en <i>A. vinelandii</i> .....	41
7.3.1	Localización de los promotores <i>algD</i> y <i>algA</i> .....	43
7.3.2	Localización del promotor <i>algJ</i> .....	49
VIII	CONCLUSIONES.....	52
XI	REFERENCIAS.....	54
IX	APENDICE (soluciones y medios de cultivo).....	60



## I. RESUMEN

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria gram-negativa del suelo, que fija nitrógeno atmosférico y forma quistes resistentes a la desecación, para ello produce dos polímeros el ácido poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) y el alginato. Estos polímeros son de interés comercial. El PHB puede utilizarse para fabricar plásticos biodegradables, mientras que el alginato tiene una amplia aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica, como gelificante y viscosificante. Hasta ahora la única fuente de obtención de alginato lo constituyen las algas marinas cafées, pero pudiera obtenerse uno de mejor calidad por vía fermentativa. *A. vinelandii* es un buen candidato para obtener el alginato por este proceso, pero para ello se requiere conocer entre otras cosas la genética de biosíntesis de este biopolímero.

El objetivo de este trabajo fue el de caracterizar algunos de los genes biosintéticos de alginato (genes *alg*) que se encuentran agrupados en una región (región *alg*) del genoma de *A. vinelandii*. Los genes que se caracterizaron fueron *algJ* y *algG*, localizados entre los genes *alg44* y *algL*, por medio de técnicas de hibridación de ADN-ADN.

Utilizando pruebas de hibridación de ARN-ADN, se identificaron tres promotores que inician la transcripción de estos genes. Los resultados obtenidos muestran que uno de los promotores se encuentra hacia arriba del gen *algD* y para el inicio de su transcripción depende del factor  $\sigma$  AlgU. Otro se encuentra arriba del gen *algJ* y el tercero hacia arriba del gen *algL*. Estos dos últimos promotores (*algJ*, *algL*), no dependen de la actividad del factor  $\sigma$  AlgU.

## II. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA BIOSINTESIS DEL ALGINATO EN *A. vinlandii*.

El alginato es un polímero que empieza a tener gran demanda, su consumo anual a nivel mundial, por diversas industrias es de aproximadamente 33 millones de toneladas y su precio oscila entre los 5 y 12 dolares por Kg. El consumo aparente en México en el período de 1981-1982 fue superior a las 350 toneladas.

Para obtener este polímero se recurre a la extracción de algas, sin embargo, la explotación de estas como en el caso de la mayoría de los recursos naturales renovables, no siguen un programa de manejo racional, dando tiempo a que se regeneren. Esta sobreexplotación podría llegar hasta su exterminio, provocando de esta manera graves perturbaciones ambientales, del lugar de obtención de las algas. Por otra parte, la cantidad y calidad del alginato obtenido de algas, es muy heterogénea, ya que su desarrollo está sujeto a las condiciones ambientales.

Lo anterior ha provocado que se busquen fuentes alternativas para la obtención del alginato, siendo la fermentación bacteriana la más factible. De esta manera, la composición del alginato producido, por esta vía sera más homogéneo y disminuiría la explotación de algas. Para este fin existen dos géneros de bacterias que producen alginato *Azotobacter* y *Pseudomonas*, sin embargo, el género *Pseudomonas* queda descartado como fuente de obtención del alginato, por tener especies patógenas como *P. aeruginosa*, un patógeno oportunista del hombre, que invade los pulmones y vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística, además no presenta los bloques continuos de ácido gulurónico que le proporciona la propiedad gelificante. Por otra parte *A. vinlandii* es una bacteria inocua y la

distribución de los bloques de residuos de ácido manurónico y ácido gulurónico constituyentes del alginato es similar a la encontrada en el alginato de algas. De esta manera *A. vinelandii*, constituye la mejor alternativa para la obtención de alginato por fermentación. Para producir grandes cantidades de alginato a partir de *A. vinelandii*, se deben conocer todos los factores involucrados en la producción del polímero, entre ellos está conocer la genética de la biosíntesis.

Actualmente el proyecto general del laboratorio propone estudiar la genética, regulación y los factores externos involucrados en la biosíntesis del alginato en *A. vinelandii*. Este trabajo pretende los dos siguientes objetivos principales:

- 1.- Construir cepas hiperproductoras y con capacidades mejoradas en la producción de este polisacárido.
- 2.- Observar el papel que tiene este polímero en el proceso de diferenciación celular (enquistamiento).

### III. INTRODUCCION

#### 3.1 GENERALIDADES DE *Azotobacter vinelandii*.

##### 3.1.1 Posición taxonómica:

Familia	<i>Azotobacteraceae</i>
Género	<i>Azotobacter</i>
Especie-	<i>Azotobacter vinelandii</i>

Tomado de Krieg y Holt, 1984. Bergey's Manual of systematic bacteriology.

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

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

Tomado de Bruck, 1984. biology of microorganims.

##### 3.1.2 Características de *A. vinelandii*.

El género *Azotobacter*, se distingue de los otros géneros de esta familia por la capacidad que tienen las especies que la conforman, de

formar quistes. *A. vinelandii* al igual que todos los miembros de la familia Azotobacteraceae, es capaz de fijar nitrógeno atmosférico bajo condiciones aeróbicas [Kennedy y Toukdurian, 1987]. En *A. vinelandii* se han identificado tres nitrogenasas que funcionan en diferentes condiciones de oxigenación [Kennedy y Toukdurian, 1987]. Tiene una actividad respiratoria alta, generada por el alto contenido de proteínas oxido-reductoras y citocromos.

Esta bacteria posee múltiples copias de su genoma, al crecería en medio rico durante la fase estacionaria llega a tener 80 o más [Maldonado, *et al.*, 1994; Manna y Das, 1993; Nagpal, *et al.*, 1989]. Contiene más ADN (ácido desoxirribonucleico) que la mayoría de las bacterias, sin embargo, el tamaño de su genoma es típico de procariontes, calculándose en 4.5 de megapares de bases aproximadamente [Manna y Das, 1993]. Este organismo es un buen receptor de ADN foráneo, se le puede introducir de forma lineal o circular (plásmido) por transformación o por conjugación, además tiene la capacidad de incorporar el ADN a su genoma por recombinación [Kennedy y Toukdurian, 1987].

*A. vinelandii*, sintetiza una gran variedad de productos como: sideróforos; hormonas vegetales reguladoras del crecimiento (p. e. auxinas, giberelinas y citocininas) [González-López, *et al.*, 1985]; además dos polímeros de gran importancia económica el ácido poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) y el alginato [Sadoff, 1975].

### **3.1.3 CICLO DE VIDA DE *A. vinelandii*.**

El ciclo de vida de este organismo presenta una fase vegetativa y una fase latente en forma de quiste (Fig. 1). Las células vegetativas son bacilos de 2 x 5  $\mu$ m, son móviles (locomoción), por la presencia de

flagelos peritricos. Cuando son crecidas en medio Burk con glucosa al 1%, libre de nitrógeno, las células tienen un tiempo de generación de 2.5 a 3 horas [Wilson y Knight, 1952].

En condiciones de laboratorio después del crecimiento exponencial, o por inducción con agentes químicos como el butanol, las células vegetativas forman quistes latentes. En su medio natural los forman cuando las condiciones son adversas; permaneciendo de esta manera en estado de latencia por largos periodos de tiempo en el suelo, hasta que se vuelven a dar las condiciones para su propagación [Lin y Sadoff, 1968]. En el laboratorio es cultivada en medios de cultivo con manitol, ramnosa y otros carbohidratos como fuente de carbono, así como una gran variedad de ácidos orgánicos y ciertos alcoholes, pero la producción de quistes es generalmente menor al 0.1% de la población de células [Lin y Sadoff, 1968].

En el proceso de diferenciación las células pierden la locomoción y tienen una última división, adquiriendo una forma esférica. Las paredes sufren un engrosamiento. Los procesos morfogenéticos someten a un pausamiento a la célula, hay una acumulación de reservas en forma de PHB que se usará en la germinación como fuente de carbono y energía de reserva [Lemoigne y Girard, 1943]. El cuerpo central, es encapsulado por una capa interna (intina) y una capa externa (exina), estas capas están conformadas por alginato y proteínas [Winogradski, 1938]. Cuando se lleva acabo la germinación de los quistes, se pierde gradualmente la cápsula por el hinchamiento del cuerpo central, ocupando el volumen de la intina [Loperfido y Sadoff, 1973], después sufre una división, cuando empieza a crecer se fractura la capa externa de la cápsula y emergen dos células por quiste, estas son inmóviles (no tienen locomoción). Las células recobran su locomoción, en la primera división después de la

germinación.

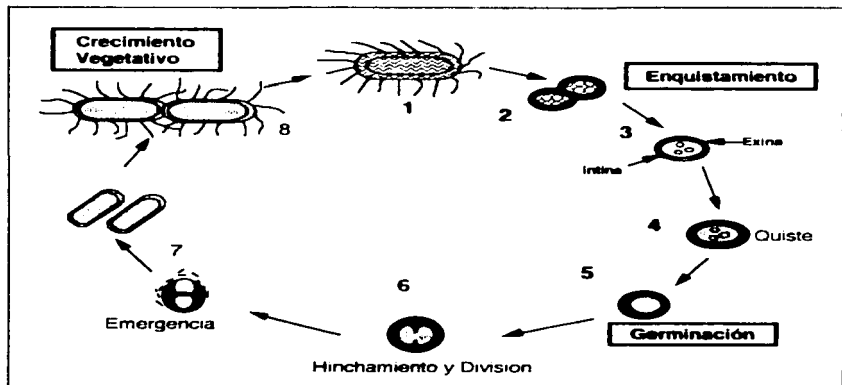


Figura 1. Ciclo de vida de *Azotobacter vinilandi*. 1 Fase de crecimiento Vegetativo. 2 Última división vegetativa, engrosamiento de sus paredes y acumulación de PHB. 3 Formación de la exina e intina. 4 Quiste maduro. 5 Inicio del proceso de germinación (degradación de PHB). 6 Síntesis de ADN (división celular). 7 Emergencia de dos células vegetativas por cada quiste. 8 Primera división celular después de la germinación (recuperación de la locomoción).

### **3.2 COMPOSICION Y PROPIEDADES DEL ALGINATO.**

El alginato es un copolímero lineal comprendido de  $\beta$ -D ácido manurónico (M) y su C-5 epímero  $\alpha$ -L ácido gularónico (G), unidos por enlaces 1,4. (Fig. 2) [May, *et al.*, 1991]. Estos ácidos urónicos se encuentran arreglados en cadenas de tres formas distintas, formando los bloques estructurales del alginato, estos son: homopoliméricos, constituidos por poli  $\beta$ -D ácido manurónico (Bloques MM), poli  $\alpha$ -L ácido gularónico (Bloques GG) y heteropolimérico comprendido por un arreglo alterno entre los dos monómeros dando bloques GM o MG (Fig. 3).

Los bloques comprendidos de M y MG, forman cadenas relativamente flexibles, mientras que las formadas por bloques G son, rígidas [Atkins, *et al.*, 1971]. El alginato con bloques G en presencia de cationes divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$  forma geles termorresistentes, por la unión de estos iones al residuo G [Stokke, *et al.*, 1991]. El alginato producido por especies de el género *Pseudomonas* no contiene bloques continuos de ácido gularónico, siendo incapaces de formar geles.

El alginato producido por bacterias posee residuos de manurónico con grupos O-acetilados, mientras que en el alginato algal no existe acetilación (Fig. 4) [Annisson y Couperwhite, 1986]. El arreglo de la estructura del bloque y el tamaño molecular del alginato afecta la gelificación y viscosidad del polisacárido.

### **3.3 APLICACIONES DEL ALGINATO.**

Las aplicaciones industriales del alginato están determinadas por su peso molecular y composición química. Soluciones acuosas de este polímero pueden ser usadas como agentes espesantes, estabilizantes de espumas y emulsiones, así como en suspensiones de partículas sólidas.



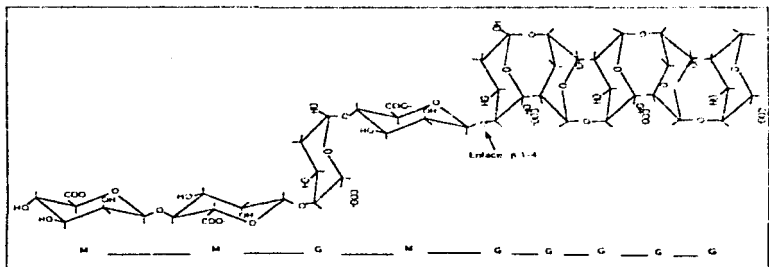


Figura 2. Estructura del alginato en A. ventricoli. Tomado de Nuñez, 1996. Tesis de Maestría.

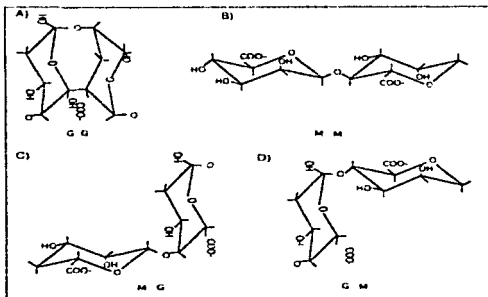


Figura 3. Arreglo de los residuos de ácido gulónico y ácido manurónico. A) y B) polímeros homopoliméricos. C) y D) dímeros heteropoliméricos. Tomado de Nuñez, 1996. Tesis de Maestría.

También se adiciona en alimentos para mejorar la retención de agua, y para inhibir la congelación del agua en alimentos congelados con la cual se proporciona estabilidad en su proceso de congelación-descongelación. Se ha sugerido que el éster formado entre el alginato con el propilenglicol funciona como un emulsificante auténtico siendo el alginato uno de los pocos polisacáridos que tiene esta propiedad [Morris, 1987]. Otras aplicaciones se muestran en la tabla I.

**Tabla I. ALGUNAS APLICACIONES DE LOS ALGINATOS**

-----  
**APLICACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

**Agentes gelificantes**

Rellenos de pastelería  
Postres de leche  
Postres de gelatina  
Alimento para animales

**Agentes espesantes y estabilizantes**

Estabilización de emulsiones en salsas, cremas y aderezos  
Estabilización de espumas en cervezas  
Espesantes de salsas y rellenos  
Suspensión de partículas en jugos y bebidas

**Agentes de retención de agua**

Estabilidad de alimentos congelados  
Mejoramiento de la solubilidad de mezclas secas

**APLICACIONES DE ALGINATOS EN OTRAS INDUSTRIAS:**

**Agentes gelificantes**

Geles refrescantes de aire  
Impresiones usadas por los dentistas  
Preparaciones farmacéuticas

**Agentes espesantes y estabilizantes**

Estabilidad de emulsiones en pinturas y esmaltes  
Espesantes de lociones y detergentes líquidos  
Estabilización de espuma en detergentes

-----  
Tomado de Tinoco, 1993. Tesis de maestría.

Además de estas aplicaciones biotecnológicas el alginato ha comenzado a utilizarse con fines médicos. Se ha observado que el alginato rico en bloques M puede evadir la respuesta del sistema inmune [Otterlei, *et al.*, 1991]. Tiene actividad de agente antitumoral en tumores de "merine" [Fujihara y Nagumo, 1992]. En trasplantes de islotes de Langerhans, realizado a pacientes de diabetes, los islotes son encapsulados con alginato rico en ácido gulurónico, éstas cubiertas protegen las células transplantadas del sistema inmune y permiten la difusión de la insulina producida por éstas [Soom-Shiong, *et al.*, 1994]. La encapsulación de otros tipos celulares están siendo estudiadas en animales, como son hepatocitos, hibridomas, células transfectadas con genes de citoquinas y fibroblastos recombinantes secretando el factor IX de humano (hormona de crecimiento) [Dixit, *et al.*, 1993; Savelkoul *et al.*, 1994; Liu, *et al.*, 1993; Tai y Sun, 1993]. También se está estudiando su aplicación en el recubrimiento de tabletas, para que la liberación de los fármacos pueda ser regulada en un amplio rango [Sirikiae, *et al.*, 1994].

### **3.4 FISIOLOGIA DEL ALGINATO.**

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

En *P. aeruginosa* el alginato tiene un papel muy importante, pues lo utiliza para protegerse del ambiente y como medio de adhesión a superficies sólidas formando "biofilms" [Boyd y Chakrabarty, 1995]. Cuando invade a pacientes de fibrosis quística forma estos "biofilms"

permitiendo así la colonización del pulmón y vías respiratorias (y otros órganos de los pacientes), además se ha observado que les confiere resistencia contra los antibióticos y le ayuda a evadir la respuesta inmunológica [Chakrabarty, 1991; Otterlei *et al.*, 1991].

En *A. vinelandii* se ha observado que el alginato es esencial para la formación de quistes ya que mutantes en la biosíntesis de este exopolisacárido, son incapaces de formar quistes maduros [Campos *et al.*, 1996].

### 3.5 FUENTES DE OBTENCION DE ALGINATO.

Se han reportado varios organismos que tiene la capacidad de producir alginato (Tabla II), a pesar de ello actualmente la única fuente de obtención para uso comercial lo constituyen las algas marinas caféas, principalmente los géneros *Fucus*, *Laminaria*, *Macrocystis* y *Ascophyllum*. En México se extrae de la especie *Macrocystis pyrifera*, distribuida en las costas de Baja California.

TABLA II. ORGANISMOS REPORTADOS QUE PRODUCEN ALGINATO

-----  
ALGAS MARINAS CAFES

*Ascophyllum nodosum*  
*Laminaria digitata*  
*Laminaria hyperborea*  
*Macrocystis pyrifera*  
*Dictyosiphon foeniculares*  
*Durvillaea sp.*  
*Eisenia bicyllis*

BACTERIAS

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

-----  
Tomado de Tinoco, 1993. Tesis de Maestría.

### 3.6 BIOQUIMICA DE LA BIOSINTESIS DEL ALGINATO

Existen algunas diferencias en la biosíntesis del alginato entre las bacterias y algas. En algas el sustrato inicial es D-manosa, mientras que en bacterias es D-fructosa [Pindar y Bucke, 1975]. Otra diferencia muy importante, es que el alginato de bacterias posee residuos de ácido manurónico con grupos o-acetilados mientras que en algas no existe acetilación (Fig 4).

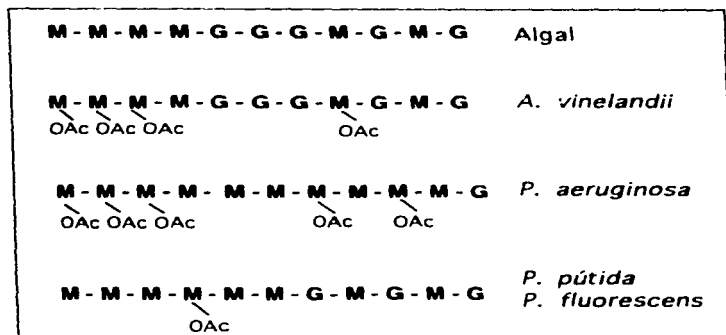


Figura 4. Distribución de los bloques de residuos de ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G) en el alginato producido por diferentes organismos. El alginato producido por *A. vinelandii* y el de algas es muy similar en la formación de bloques gulurónicos, la diferencia es que los residuos M, de *A. vinelandii* están acetilados (OAc) al igual que en *Pseudomonas*, mientras que en algas no existe acetilación. Tomado de Núñez, tesis de Maestría, 1995.

La vía de biosíntesis, se describió por primera vez en el alga café *Fucus gardneri* [Lin y Hassid, 1966], después en *A. vinelandii* [Pindar y

Bucke, 1975], sin embargo, donde ha sido estudiada más detalladamente la genética de la biosíntesis, es en *P. aeruginosa*, [Chakrabarty, 1991; Deretic *et al.*, 1994; May y Chakrabarty, 1994]. El interés de estudiar más en este organismo la biosíntesis del alginato es por el problema que presenta en los hospitales en la infección a pacientes con fibrosis quística, pacientes con quemaduras y personas inmunodeprimidas, donde se ha observado que el alginato tiene un papel importante en la virulencia junto con otros elementos como: pirocianina, fosfolipasa C, elastasa etc.

La ruta de biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa* (Fig 5), inicia con la fructosa 6-fosfato (F6P), proveniente de la ruta de Entner-Doudoroff\*\* para convertirla a GDP-ácido manurónico a través de las siguientes reacciones:

- 1.- La fructosa-6-fosfato es convertida a manosa 6 fosfato (M6P), por la intervención de la enzima fosfomanosa isomerasa (PMI-GMP<sup>+</sup>; codificada por el gen *algA*) [Darzins *et al.*, 1986; Gill *et al.*, 1986].
  - 2.- El grupo fosfato de la M6P es transferido del carbono 6 al carbono 1, generando manosa 1 fosfato (M1P), reacción catalizada por la enzima fosfomanomutasa (PMM; codificada por el gen *algC*).
  - 3.- En la tercera reacción interviene la enzima GDP-Manosa pirofosforilasa (PMI-GMP<sup>+</sup>; codificada por el gen *algA*) que en presencia de GTP, convierte la M1P a GDP-manosa [Darzins *et al.*, 1986; Gill *et al.*, 1986].
  - 4.- La GDP-manosa es oxidada por la GDP-manosa deshidrogenasa (GMD; codificada por el gen *algD*) dependiente de NAD<sup>+</sup>, para formar GDP-ácido manurónico, precursor directo del alginato + 2 (NADH<sup>+</sup>) [Deretic *et. al.* 1987], para posteriormente ser polimerizado, epimerizado, modificado
- \*\* Enzima bifuncional (PMI-GMP) codificada en el gen *algA*.

y exportado.

El ácido GDP-manurónico, es polimerizado y exportado a través de la membrana interna. En el proceso de polimerización se postula la participación de los productos de los genes *alg8* y *alg44*, probables proteínas de membrana [Maharaj *et al.*, 1993]. El corte realizado al polímero inicial, es hecho por la alginato liasa (codificada por el gen *algL*) [Boyd *et al.*, 1993; Shiller *et al.*, 1993]. La epimerización de ácido manurónico a ácido gulurónico es realizado por la epimerasa (enzima codificada por el gen *algG*) [Chitnis y Ohman, 1990], mientras que la acetilación de los residuos de ácido manurónico, es realizado por la acetilasa (enzima codificada por el gen *algF*) [Shinaberger *et al.*, 1993; Franklin y Ohman 1993]. Estas proteínas se localizan en el espacio periplásmico [Franklin *et al.*, 1994; Boyd y Chakrabarty, 1995]. La secuencia de la proteína *alg60*, muestra similitud con proteínas acilacarreadoras [Boyd y Chakrabarty, 1995], por lo cual es postulada en la participación de la síntesis del alginato en la etapa de acetilación en conjunto con la acetilasa. La secreción extracelular del alginato, es realizada por la proteína codificada por el gen *algE*, ésta es una proteína de membrana que funciona como canal iónico [Chu *et al.*, 1991; Rehm *et al.*, 1994]. Algunas características de estas enzimas se muestran en la tabla III.

La enzima determinante en esta vía es la GDP-manosa deshidrogenasa codificada por el gen *algD*, que cataliza una reacción irreversible (Fig. 5), convirtiendo la GDP-manosa, a GDP-ácido manurónico, precursor directo del alginato. El producto de *algC* también participa en la biosíntesis de lipopolisacáridos [Goldberg *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 1994].

En *P. aeruginosa* y en *A. vinelandii*, la formación de unidades de

ácido galurónico ocurre a nivel de polímero por acción de la enzima epimerasa (AlgG) sobre residuos de manurónico que no han sido acetilados por la acetilasa (AlgF) [Pindar y Bucke, 1975; Franklin et al., 1994]. En *P. aeruginosa* la actividad de la epimerasa se localiza en el espacio periplásmico [Franklin et al., 1994]. Mientras que en *A. vinelandii*, también existe actividad de epimerasa en el medio extracelular [Haug et al., 1974]. En *A. vinelandii* se han reportado varios genes que codifican para epimerasas extracelulares diferentes a AlgG [Ertesvag et al., 1995], sin embargo, no se sabe si se expresan todos al mismo tiempo.



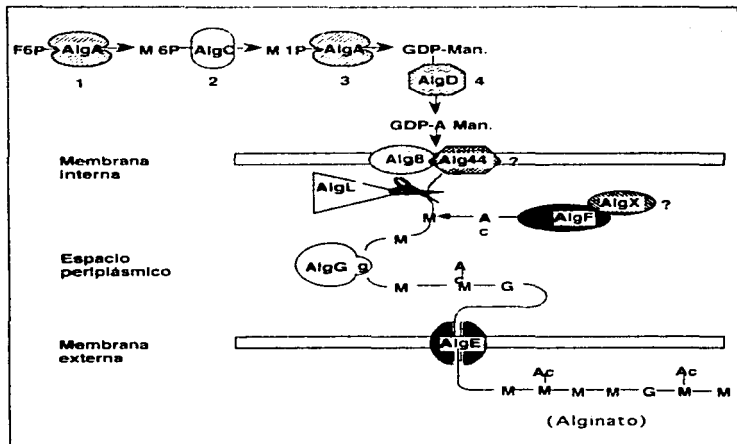


Figura 5. Ruta de biosíntesis del alginato en *P. aeruginosa*. La biosíntesis inicia con la conversión de la fructosa-6-fosfato (F6P) a GDP-acido manurónico (GDP-Aman.) precursor directo del alginato. Esta conversión es realizada en 4 reacciones: el producto del gen *algA* interviene en la primera y tercera reacción, en la segunda reacción interviene el producto de *algC*, para la cuarta se requiere el producto de *algD*. Posteriormente es polimerizado, modificado y excretado el alginato. Tomado de Nuñez, 1996. Tesis de Maestría.

TABLA III. CARACTERISTICAS DE LAS PROTEINAS INVOLUCRADAS EN LA BIOSINTESIS DEL ALGINATO [Modificado de May y Chakrabarty, 1994].

GEN	SECUENCIADO	PROTEINA PURIFICADA	FUNCION DE LA PROTEINA	PESO MOLECULAR KDa
<i>algA</i>	*	*	PMI-GMP	53.4
<i>algC</i>	*	-	PMM (PGM)	50.2
<i>algD</i>	*	*	GMD	47.6
<i>algE</i>	*	-	TRANSPORTE	54.4
<i>algF</i>	*	-	ACETILASA	22.8
<i>algG</i>	*	*	EPIMERASA	59.8
<i>algL</i>	*	*	ALGINATO LIASA	40.9
<i>algB</i>	*	-	POLIMERIZACION	56.9
<i>alg44</i>	*	-	POLIMERIZACION	34.3
<i>algX</i>	-	-		?
<i>algB</i>	*	-	REGULACION	9.3
<i>algR1</i>	*	*	REGULACION	27.6
<i>algR2</i>	*	-	REGULACION	18.0
<i>algR3</i>	*	-	REGULACION	39.0
<i>algZ</i>	*	*	REGULACION	35
<i>algU</i>	*	-	INTERRUPTOR GENETICO	27.5
<i>mucA</i>	*	-	INTERRUPTOR GENETICO	20.0
<i>mucB</i>	*	-	INTERRUPTOR GENETICO	33.2
<i>mucC</i>	*	-	?	
<i>mucD</i>	*	-	?	

\* SI.  
-NO.

### 3.7 GENETICA Y REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE ALGINATO

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

Todos los genes, excepto *algC*, que codifican para las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de los monómeros de ácido manurónico, así como los genes que codifican para las proteínas involucradas en la polimerización, acetilación, epimerización y secreción de estos monómeros (alginato), se encuentran agrupados en una sola región, formando un operón (operón *alg*), localizado en el min 34, sobre el genoma de *P. aeruginosa* [Chitnis y Ohman, 1993]. El primer gen del operón es *algD* y aproximadamente a 18 kilobases (kb) hacia abajo de este gen se encuentra *algA*, el último gen de este operón, en medio de estos genes se encuentra *algB*, *alg44*, *algE*, *algG*, *algX*, *algL*, *algJ* *algI* y *algF* en ese orden (Fig 6,A) [May y Chakrabarty, 1994].

El gen *algC*, se encuentra cercano a los genes reguladores *algZ*, *algR*, *algR2* y *algR3*, ubicados en el minuto 10 del genoma de *P. aeruginosa*, pero la transcripción de *algC* es a partir de un promotor diferente, del que se transcriben los genes reguladores (Fig 6,B). En esta región también se encuentran otros genes que no están involucrados en la biosíntesis de alginato, estos genes son: *argH* involucrado en la biosíntesis de arginina; *hemC* y *hemD* involucrados en la biosíntesis de precursores de grupos hemo y el gen *fkl* que codifica para un homólogo de la proteína de unión a FK506 de la superfamilia inmunofilina [Yu et al., 1997].

El gen que codifica para el factor sigma ( $\sigma$ ) AlgU, se encuentra junto con los genes *mucA*, *mucB* y los recientemente encontrados *mucC* y *mucD* [Boucher et al., 1996]. *mucA* y *mucB* codifican para los

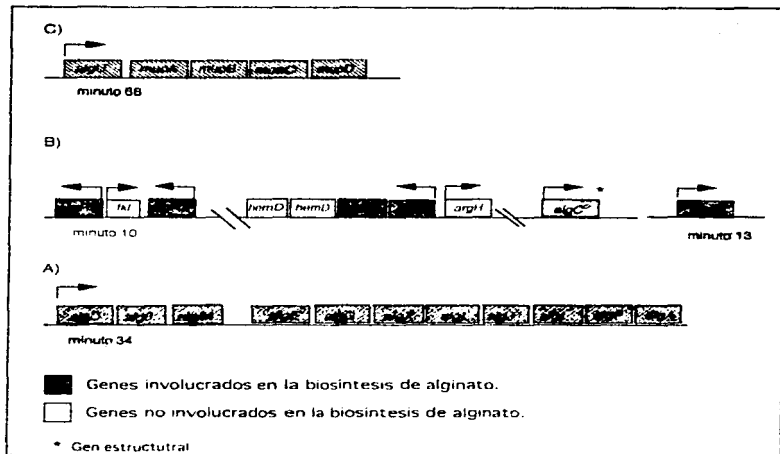


Figura 6. Organización y localización física de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato sobre el genoma de *P. aeruginosa*, encontrándose agrupados en cuatro regiones. A) Genes estructurales, excepto *algC*, formando una estructura operónica ubicados en el min 34. B) Genes reguladores, localizados en el min 10 y 13. C) Genes que regulan la mucoidia, organizados en un operón, localizados en el min. 68 (modificado de May y Chakrabarty, 1994).

Designaciones alternativas para algunos genes son: *algU* = *algT*, *muca* = *algS*, *mucaB* = *algN*, *algR* = *algR1*, *algR2* = *algQ*, *algR3* = *algZ*, *algX* = *algG0*.  
 LAS FLECHAS MUESTRAN EL SENTIDO DE LA TRANSCRIPCIÓN

productos que regulan negativamente la actividad del factor  $\sigma$  AlgU y forman un operón localizado en el min 68 sobre el genoma (Fig 6,C).

### **3.7.2 Regulación de la mucoidía en *P. aeruginosa*.**

La regulación de la mucoidía está dada por los productos del operón *algU mucABCD*. El gen *algU* codifica para el factor sigma ( $\sigma$ ) alternativo AlgU, éste tiene una alta actividad en cepas mucoides (iniciando la transcripción de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato figura 8); el fenotipo mucoide se debe a una sobreproducción de alginato. Los productos de los genes *mucA* y *mucB* regulan negativamente la actividad de AlgU (Fig. 8) [Deretic *et al.*, 1990; Deretic *et al.*, 1993; Goldberg *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1994; Schurr *et al.*, 1993]. Estos genes están involucrados en la conversión espontánea entre el fenotipo mucoide y no mucoide. En cepas aisladas de pacientes con fibrosis quística, los genes *mucA* y *mucB* se encuentran mutados, por lo cual no producen el elemento que inhibe la actividad de AlgU, generando así cepas mucoides.

El factor  $\sigma$  AlgU es similar a la proteína  $\sigma^E$  de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Photobacterium* sp. En *P. aeruginosa* además de tener actividad en cepas mucoides, también está involucrada en la expresión de sistemas para incrementar la resistencia a medios estresantes como: altas temperaturas, altas concentraciones de agentes oxidativos, esta función también se ha observado en el factor  $\sigma^E$  de *E. coli* y *S. typhimurium*, en el caso de *Photobacterium* se requiere para vivir a altas presiones y bajas temperaturas, condiciones que se dan en su hábitat (fondo marino).

Como estos factores ( $\sigma^E$  y  $\sigma$  AlgU) son muy similares pueden ser

intercambiables [Schurr *et al.*, 1996], éstos reconocen secuencias similares de ADN (promotores). La secuencia de -35 y -10 de los promotores activados por  $\sigma^E$  muestra una región conservada, particularmente en la región -35 (Fig. 7) y puede ser comparado con los promotores dependientes de AlgU, incluyendo *algD*, *algR* y *algU* (Fig. 7).

	-35	16/17pb	-10	+1
$\sigma^E$ consenso	<b>GA</b>	<b>ACTT</b>	<b>TCTGA</b>	5/6 pb
<i>Pa algU</i> P1	GAGAACTTTT	TGCAAGAAGCCCCGAGTCTATCTTGGCA		
<i>Pa algU</i> P3	TGGA	ACTTTCTTAGACGCATCGGTTCCAAAGCAGGA		
<i>Pa algR</i>	GGGCACTTTT	CGGGCCTAAAGCGAGTCTCAGCGTCG		
<i>Pa algD</i>	CGGA	ACTTCCCTCGCAGAGAAAACATCCTATCACCG		
<i>Ec rpoH</i> P3	TTGA	ACTTGTGGATAAAAACACGGTCTGTATAAAACA		
<i>Ec htrA</i>	CGGA	ACTTCAGGCTATAAAACGAATCTGAAGAACA		
<i>Ec rpoE</i>	CGGA	ACTTTACAAAAACGAGACACTCTAACCCCTTGG		
<i>St rpoE</i>	CGGA	ACTTTACGAAACATAGACACTCTAACCTGTTG		
<i>St htrA</i>	CGGA	ACTTCGCGTTATAAAATGAATCTGACGTACAC		
<i>Pa rpoH</i>	AGGA	ACTTATACACCCGCTTCGAGTCAGATATCCGA		

Figura 7. Secuencias de promotores que dependen de la actividad  $\sigma^E$  y  $\sigma$  AlgU. Estos promotores tienen secuencias canónicas, principalmente la región -35 es la más conservada, estos factores pueden ser intercambiados. *Pa*, *P. aeruginosa*; *Ec*, *E. coli*; *St*, *S. typhimurium*; [Schurr *et al.*, 1996; Deretic *et al.*, 1994].

### 3.7.3 Regulación de la transcripción del operón *alg* en *P. aeruginosa*.

En *P. aeruginosa* el operón *alg* es controlado a partir del promotor *algD*; como se mencionó anteriormente, este promotor tiene una fuerte activación transcripcional en cepas mucoides [Deretic *et al.*, 1987]. El promotor *algD* posee una estructura compleja, ya que se han descrito

varios elementos reguladores que participan en su activación (Fig. 8): El factor  $\sigma$  AlgU es el responsable del inicio de la transcripción de este operón [Martin *et al.*, 1994; Hershberger *et al.*, 1995]. AlgU además de iniciar la transcripción de *algD*, es requerido para iniciar la transcripción de *algC*, *algB*, *algR* y su propio promotor.

Además de AlgU, existen dos reguladores positivos de respuesta AlgR y AlgB, que pertenecen al grupo de proteínas de transducción de señales de dos componentes, estas incrementan la transcripción de *algD* [Deretic *et al.*, 1989; Goldberg y Dahnke, 1992].

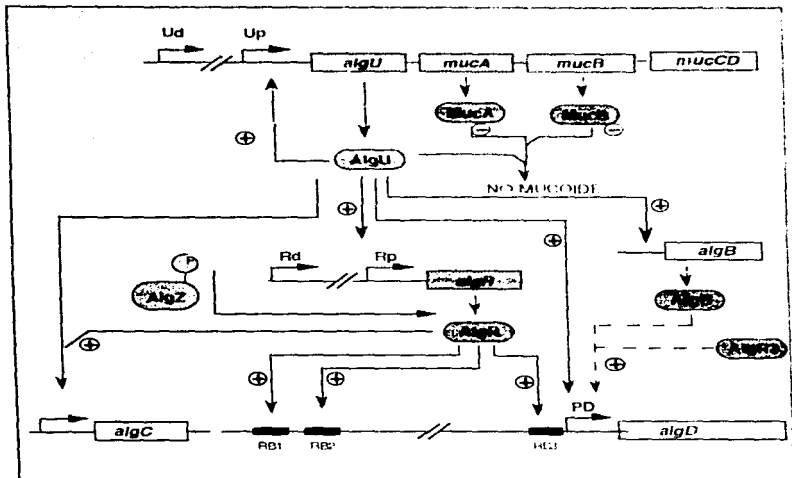
AlgR se une a tres sitios en el promotor *algD* (fig. 8), que contienen las secuencias ACCGTTGTC, pero sólo su forma fosforilada activa la transcripción de este gen [Kato y Chakrabarty, 1991; Mohr *et al.*, 1991; Mohr y Deretic, 1992; Deretic *et al.*, 1992]. La proteína sensora histidín-cinasa responsable de la fosforilación de AlgR se sugiere que es AlgZ y suponen que uno de los factores que sensa AlgZ es la osmolaridad. Se propone que en condiciones de alta osmolaridad, AlgZ fosforila a AlgR, que a su vez activa la transcripción del operón *alg* [Yu *et al.*, 1997]. Como dos de los tres sitios de reconocimiento de AlgR, en el promotor *algD*, se encuentran lejos del inicio de la transcripción (a -500 pb), se postula que se requiere del doblamiento del ADN para que ésta se inicie [Deretic *et al.*, 1994]. Para que ocurra el doblamiento de ADN se propone la participación de las proteínas AlgR3 [Kato *et al.*, 1990] e IHF [Mohr y Deretic, 1992]. Inserciones en *algR* bloquean la expresión de *algD*. Existen sitios similares en el promotor *algC* y hay evidencias de que AlgR también activa la transcripción de *algC*; [Fujiwara *et al.*, 1993].

El otro regulador de respuesta AlgB, también aumenta la transcripción de *algD*, sin embargo, hasta el momento no se conoce de

qué manera lo hace. Se sabe que AlgB se requiere para aumentar la producción de alginato, pero no es esencial para la activación transcripcional de *algD*, ya que se ha observado que mutantes en *algB* no disminuye significativamente la transcripción de *algD*. Para el caso de AlgB, la proteína que la fosforila (proteína sensora), así como los factores ambientales que ésta sensa aún no han sido identificados.

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





**Figura 8.** Circuito regulador que controla la transcripción del operón *algD* y la expresión de mucoidia en *P. aeruginosa*. En la parte superior de la cascada reguladora se encuentran agrupados en un operón los genes *algU* *mucA* *mucB* *mucCD*. *algU* codifica para el factor sigma AlgU ( $\sigma$  AlgU). *mucA* y *mucB*, cuyos productos regulan negativamente la actividad de AlgU, controlando la conversión del fenotipo mucoso. Dos promotores, el distal (Ud) y proximal (Up), controlan la expresión de *algU*. La transcripción de *algR* también se realiza por un promotor distal y proximal. El operón *algD* se transcribe a partir de un solo promotor, el distal. La expresión del operón *algD*, depende del factor  $\sigma$  AlgU, junto con el regulador positivo AlgR. El factor  $\sigma$  AlgU, también es requerido para transcribir su propio promotor, además de *algR*, *algB* y *algC*. La intervención de AlgR en la transcripción del operón *algD* no está claro postulándose también la participación de AlgR [Modificado de Martin et al., 1994].  
 Genes en rectángulo.  
 Proteínas en ovalos.

#### IV. ANTECEDENTES.

La ruta de biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa* y *A. vinelandii* son muy similares. *A. vinelandii* contiene secuencias de ADN homólogas a algunos genes de *P. aeruginosa* involucrados en la biosíntesis y regulación de alginato como *algD*, *alg8*, *alg44*, *algL* *algA* y *algR* [Campos *et al.*, 1996; Lloret *et al.*, 1996; Martínez-Salazar *et al.*, 1996; Mejía *et al.*, en revisión ].

Algunos de los genes homólogos secuenciados de *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* involucrados en la biosíntesis de alginato muestran gran porcentaje de identidad y similitud, tanto en genes estructurales como genes reguladores (p. e. *algD*, *mucABCD* [Campos *et al.*, 1996; Martínez-Salazar *et al.*, 1996]). Ambas bacterias, se encuentran filogenéticamente muy cercanas, ambas especies pertenecen al linaje Azomonas-azotobacteriaceae. Por lo que no es de extrañarse que la ruta de biosíntesis de alginato sea muy similar en estos organismos, que tengan secuencias homólogas e incluso guarden un arreglo similar en la organización de los genes que hasta el momento se han encontrado.

Los genes estructurales que se han encontrado hasta el momento (*algD*, *alg8*, *alg44*, *algL* *algA*), están en un solo cósmido, denominado pMSD 675 [Campos *et al.*, 1996; Lloret *et al.*, 1996; Mejía *et al.*, en revisión]. Esto se ha realizado por técnicas de hibridación de ADN-ADN, utilizando como sondas los genes *algD*, *alg8*, *alg44*, *algL* *algA* y *algR* de *P. aeruginosa*, para buscar sus homólogos en un banco genómico de *A. vinelandii*. El banco genómico de *A. vinelandii* ATCC 9046 está construido en el cósmido pCP13.

Los genes estructurales de la biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa* están agrupados en forma de un operón, transcribiéndose a través del promotor *algD*, mientras que en *A. vinelandii*, no parecen estar agrupadas en un solo operón, por la existencia de cepas que tienen mutaciones en genes que están hacia arriba de *algL* y *algA*, sin embargo, estos genes se expresan, de esta manera no se tiene un efecto polar en los genes que están hacia abajo de el gen mutado como en el caso de *P. aeruginosa*.

Con base en que no existe un efecto polar sobre *algLA*, cuando se hacen mutaciones sobre algunos genes que están hacia arriba de estos, se pensó que en *A. vinelandii* existía cuando menos un promotor más que transcribiera los genes estructurales de la biosíntesis de alginato. Sin embargo, se publicó la secuencia del gen *algJ* de *A. vinelandii*; [Rehm, 1996] y en el análisis de dicha secuencia se encontró una región que tenía similitud con secuencias de reconocimiento para un factor sigma (promotor).

Con lo anterior se planteo ver si los genes *algJ* y *algG* se encuentran en la región donde ya se han localizado los otros genes estructurales y determinar si el promotor de *algJ* también transcribe al operón *algLA*.

## **V. OBJETIVOS**

Determinar si los genes *algJ* y *algG* se localizan en la región *alg* del genoma de *A. vinelandii*.

Comprobar que el operón *algLA* inicia su transcripción a partir de un promotor diferente al promotor *algD*.

Determinar si los genes *algJ* y *algG* se transcriben a partir del promotor que se encuentra hacia arriba de *algJ*.

## **VI. MATERIALES Y METODOS.**

En el desarrollo de la biología,  
como en el desarrollo de varias ciencias,  
el concepto es más importante que el método.  
Las técnicas son únicamente las sirvientas  
de las ideas. Ellas no tienen gran poder en estas.

Alexis Carrel (Modificado).

## 6.1 CEPAS Y PLASMIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

CEPA	CARACTERISTICAS	REFERENCIA
ATCC9046	Cepa silvestre de <i>A. vinelandii</i> . Nal <sup>r</sup> . Mucoide.	colección
RSD1	Mutante derivada de la ATCC9046, tiene integrado en su cromosoma al plásmido pMSDX7, interrumpiendo el gen <i>algD</i> . Amp <sup>r</sup> . Nal <sup>r</sup> . No mucoide.	Campos <i>et al.</i> , 1996
UW136	Inserción de una secuencia, interrumpido el gen <i>algU</i> . Rif <sup>r</sup> . No mucoide	Martinez-Salazar <i>et al.</i> , 1996
LA21	Inserción del Mini_Tn5 <sub>lac</sub> Z1 sobre la región 5' del gen <i>algJ</i> . Km <sup>r</sup> . Nal <sup>r</sup> . No mucoide.	Mejia <i>et al.</i> , en revisión.
<b>PLAMIDOS</b>		
pMSD675	Cosmido conteniendo un fragmento de 25 Kb del cromosoma de <i>A. vinelandii</i> , incluyendo los genes <i>algD</i> , <i>algL</i> y <i>algA</i> . Tc <sup>r</sup> .	Campos <i>et al.</i> , 1996
pMSA5-5	Cosmido conteniendo un fragmento de 20 Kb del cromosoma de <i>A. vinelandii</i> , incluyendo los genes <i>algL</i> y <i>algA</i> . Tc <sup>r</sup> . Nal <sup>r</sup> .	Lloret <i>et al.</i> 1996
pMSDX7	Plásmido que contiene 594 pb de el gen <i>algD</i> que codifica del aminoácido 137 a 337 de la enzima GDP-manosa deshidrogenasa, derivado del pSK <sup>r</sup> . Amp <sup>r</sup> .	Campos <i>et al.</i> , 1996
pBHR541	Contiene una clona de 1.5 Kb de ADN de <i>A. vinelandii</i> , conteniendo al gen <i>algJ</i> . Amp <sup>r</sup> .	Rehm, 1996.
pBR60	Contiene un fragmento de 1.8 Kb. de ADN de <i>A. vinelandii</i> , conteniendo el gen <i>algG</i> . Amp <sup>r</sup> .	Rehm <i>et al.</i> , 1996.
pDA4033	Contiene un fragmento de ADN de <i>P. aeruginosa</i> el cual incluye el gen <i>algA</i> .	Darzens <i>et al.</i> , 1986
PKK3535	Contiene los genes que codifican para los ARN ribosomales de <i>E. coli</i> . Amp <sup>r</sup> , Tets <sup>r</sup> , Thr <sup>r</sup> .	Wheaton

## 6.2 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

ENZIMA	SECUENCIA QUE RECONOCE	SOLUCIÓN AMORTIGUADORA			TEMPERATURA	LABORATORIO
<i>Bam</i> H I	G↓GATCC	Tris-HCl MgCl <sub>2</sub> Ditiotreitolo KCl BSA	pH 8.5	200 mM 100 mM 10 mM 1000 mM 100 µg/ml	30°C	Amersham
<i>Eco</i> R I	G↓AATTC	Tris-HCl MgCl <sub>2</sub> Ditiotreitolo NaCl BSA	pH 7.5	500 mM 100 mM 10 mM 1000 mM 100 µg/ml	37°C	Amersham
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT	Tris-HCl MgCl <sub>2</sub> Ditiotreitolo NaCl BSA	pH 7.5	100 mM 100 mM 10 mM 500 mM 100 µg/ml	37°C	Amersham
<i>Nde</i> I	C↓AATAG	Tris-acetato Mg-acetato Ditiotreitolo K-acetato	pH 7.9	330 mM 100 mM 5 mM 660 mM	37°C	Amersham
<i>Sal</i> I	G↓ITCGAC	Tris-HCl MgCl <sub>2</sub> Ditiotreitolo NaCl BSA	pH 7.5	500 mM 100 mM 10 mM 1000 mM 100 µg/ml	37°C	Amersham
<i>Sph</i> I	GCATG↓C	Tris-HCl MgCl <sub>2</sub> Ditiotreitolo NaCl BSA	pH 7.5	500 mM 100 mM 10 mM 1000 mM 100 µg/ml	37°C	Amersham
<i>Xho</i> I	C↓ITCGAC	Tris-HCl MgCl <sub>2</sub> Ditiotreitolo NaCl BSA	pH 7.5	500 mM 100 mM 10 mM 1000 mM 100 µg/ml	37°C	Amersham

Los medios y soluciones utilizados en este trabajo se encuentran en el apéndice.

### **6.3 PURIFICACION DE ADN PLASMIDICO POR LISIS ALCALINA.**

En 5 ml de medio (LB más el antibiótico de selección correspondiente para cada plásmido) se inoculó una colonia de *E. coli*, que porta el plásmido de interés y se incubó a 37°C en agitación (200 rpm) toda la noche. Las células se obtuvieron al centrifugar en un tubo eppendorf de 1.5 ml. a 10,000 rpm. por 2 min, con el uso de una microcentrifuga eppendorf modelo 5415 C. Se resuspendió la pastilla de células en 1 ml. de solución I. Se hizo otra centrifugación. La pastilla se resuspendió en 150 µl de solución I con lisozima (4 mg/ml) se dejó a temperatura ambiente por 10 min. Después se adicionaron 350 µl de solución II, se puso en hielo por 10 min. A continuación se agregaron 250 µl de solución III, dejándolo en el hielo por 20 min. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. Se obtuvo el sobrenadante y se le adicionó un volumen de cloroformo, se mezcló manualmente por inversión. Enseguida se centrifugó a 14,000 rpm. por 2 min. Se tomó la fase acuosa (fase superior), y se le agregó un volumen de cloroformo, se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min, repitiéndose dos veces. Para precipitar el ADN se tomó la fase acuosa de la última extracción y se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol, dejándolo de 7 a 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó durante 15 min. a 12,000 rpm. La pastilla se lavó 3 veces con 1 ml. de etanol al 70%. Posteriormente la pastilla se secó y resuspendió en 30 µl de solución amortiguadora TE 10/1 más 5 µl de ARNasa y se incubó a 37°C por 1hr. Se tomaron 3 µl para verificar la purificación del ADN y la digestión del ARN, por electroforesis en un gel de agarosa.

### **6.4 PURIFICACION DE ARN TOTAL DE *A. vinelandii*.**

Se inocularon 50 ml. de medio BS-modificado y el antibiótico correspondiente para cada cepa y se incubó a 29°C en agitación (150 rpm) por 24, 36 y 48 hrs. Se recuperan las células por centrifugación. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se centrifugaron 2 ml del subcultivo a 10,000 rpm por 2 min. Se desechó el sobrenadante para lavar la pastilla celular resuspendiéndola en 1 ml. de MgSO<sub>4</sub> 10mM, se volvió a centrifugar. Se repitieron los lavados hasta que la pastilla celular ya no se observó mucosidad. Para realizar la lisis celular, se resuspendió la pastilla en 40 µl de DEPC\* al 0.1%, en seguida se agregaron 3 µl de



DEPC\* al 0.5%, 200  $\mu$ l de acetona helada, se mezcló manualmente por inversión y se centrifugó a 10,000 rpm. por 2 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 30  $\mu$ l DEPC al 0.1%, luego se adicionó 10  $\mu$ l de DEPC al 0.5% con lisozima (10mg/ml), se incubó a 37°C por 10 min. En seguida se agregaron 2  $\mu$ l DEPC al 0.5% con proteinasa K (100 $\eta$ g/ml), se dejó en hielo durante 10 min. La extracción del ARN se hizo añadiendo 3.5  $\mu$ l de DEPC al 0.5%, 200  $\mu$ l de fenol (precalentado a 70°C), 150  $\mu$ l de cloroformo, se mezcló manualmente por inversión y se agregaron 120  $\mu$ l de DEPC al 0.1%. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos. Después se tomo la fase acuosa y se le agregó 1 ml de etanol absoluto, se dejó a -20°C por 1 hr. Después se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min, se desecho el sobrenadante. La pastilla secó y resuspendió en 50-100  $\mu$ l de DEPC al 0.1%. Para verificar la extracción de ARN se hizo por electroforesis en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes y se almacenó a -20°C.

## **6.5 ELECTROFORESIS.**

### **6.5.1 ELECTROFORESIS DE ADN**

Para la realización de electroforesis se hicieron geles de agarosa al 1% con solución amortiguadora de acetatos 1X. Los pozos del gel fueron cargados con 3  $\mu$ l de muestra más 1  $\mu$ l de colorante. En cada gel, se utilizó un pozo para poner 1  $\mu$ l (100 $\eta$ g/ $\mu$ l) de marcador de peso molecular (ADN del fago  $\lambda$  digerido con *Hind* III), que sirvió para calcular el tamaño de las bandas de ADN y su concentración. La electroforesis se corrió a 75 volts por 3hrs. en solución amortiguadora de acetatos a 1X. Después el gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml) durante 30 min, en seguida se enjuaga con agua por 5 min y se observó en el transiluminador de luz UV Sigma modelo T 1202.

### **6.5.2 ELECTROFORESIS DE ARN.**

La electroforesis de ARN se hizo en condiciones desnaturalizantes. Se preparó un gel desnaturalizante de la siguiente manera: en un matraz erlenmeyer estéril, se colocaron 0.5 g de agarosa, 10 ml de solución amortiguadora MAE 5X y 30.5 ml de agua, se fundió la agarosa en el horno de microondas. Cuando tuvo una temperatura de 60°C. aprox, se agregaron 9 ml. de formaldehído al 37%, se mezcló y vertió al molde para su gelificación a temperatura ambiente por 1 hr. Las muestras se trataron de la siguiente manera: en un tubo eppendorf

de 0.5 ml se depositaron 1.5  $\mu$ l de DEPC al 0.1%, 3  $\mu$ l de ARN de la extracción, 2  $\mu$ l de solución amortiguadora MAE 5X, 3.5  $\mu$ l de formaldehído al 37 %, 10  $\mu$ l de formamida, se incubaron a 55°C por 15 min. Después se pasaron al hielo 5 min, posteriormente se adicionaron 2  $\mu$ l de colorante y se colocaron en el gel. La tinción se hizo como se describió anteriormente.

## 6.6 DIGESTION DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCION

Para la digestión de 1  $\mu$ g de ADN se requirió de dos unidades de enzima, donde una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima necesaria para digerir 1  $\mu$ g de ADN a la temperatura adecuada y con la solución amortiguadora de reacción correspondiente. Para calcular la concentración aproximada de ADN que se obtuvo en cada purificación se realizaron electroforesis (como se describe en la sección 6.5.2), para hacer los cálculos correspondientes y tomar la cantidad necesaria, para tener la concentración que se necesitó digerir. En un tubo eppendorf de 0.5 ml. se colocó la muestra de ADN a digerir, después se agregó agua estéril (la cantidad necesaria para tener un volumen final de 25 $\mu$ l. enseguida se adicionaron 2.5  $\mu$ l de solución amortiguadora de reacción, concentrada diez veces (10X) y la enzima correspondiente, se incubó a la temperatura indicada. Para parar la reacción se hizo con un impulso térmico a 65°C por 5 min Se revisó la digestión en un gel de agarosa por electroforesis.

## 6.7 PURIFICACION DE BANDAS DE ADN.

Para la obtención de las bandas de ADN de nuestro interés, primero se hizo la purificación del plásmido, después se hicieron digestiones con enzimas de restricción. Después las bandas fueron separadas en un gel de agarosa al 1% con amortiguador de acetatos 1X, por electroforesis. Se tiñó el gel y en el transiluminador de luz UV se visualizaron las bandas de ADN, ahí mismo se obtuvo la banda de interés, se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se centrifugó por 30 segundos. Para limpiar la banda se hizo lo siguiente: se maceró con una espátula la agarosa que contenía el ADN, se pasó por jeringa insulínica. Después se le agregaron 50  $\mu$ l de solución amortiguadora TE 10/1, 5  $\mu$ l de NaCl 5M y 200  $\mu$ l de fenol. Se agitó con vortex, se pasó inmediatamente en hielo seco durante 20 min. En seguida se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min. Se tomó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo, se le adicionó un volumen de fenol-cloroformo 25:24. Después se

centrifugó a 14,000 rpm por 3 min. Se tomó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo, se adicionó un décimo de NaCl 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min. Por último se secó y resuspendió la pastilla en 25µl de agua destilada estéril.

## **6.8 MARCAJE RADIOACTIVO DE SONDAS.**

Se marco con el "kit Rediprime" (Amersham), esto se realizó conforme a las instrucciones del fabricante con nucleótido radiactivo [ $\alpha$   $^{32}$ P]dCTP.

Para separar el nucleótido radiactivo que no se incorporó en la reacción de marcado, se realizó por cromatografía en columna, la resina que se utilizó para preparar la columna fue sephadex G-75. La columna se hizo con una jeringa insulínica (1 ml.), en la parte de abajo se colocó pelo de ángel o fibra de vidrio para evitar que se saliera la resina. Enseguida se procedió a llenar la jeringa con la resina que previamente fue hidratada con un mínimo de 24 horas. Con una pipeta pasteur se llenó hasta 95 U o 950 µl aproximadamente, evitando dejar burbujas de aire. Después se equilibro la columna con solución amortiguadora de columna, se le adicionó esta solución hasta que la que salió por debajo de la columna tuvo un pH de 8.0. Una vez equilibrada, se dejó salir toda la solución amortiguadora. La mezcla donde se llevó a cabo la reacción de marcado se llevo a un volumen de 300 µl con solución amortiguadora de columna y se puso en la columna, en un primer tubo eppendorf de 1.5 ml se colectaron los 300 µl de solución, se agregaron otros 600 µl de solución amortiguadora a la columna, se colectaron en un segundo tubo, en este tubo sale el ADN marcado, finalmente se agregaron 300 µl de solución amortiguadora que son colectados en un tercer tubo, aquí salió el nucleótido radioactivo que no se incorporó en el ADN.

## **6.9 HIBRIDACION DE ADN-ADN (Tipo "Southern Blot").**

**TRANSFERENCIA DEL ADN A LA MEMBRANA DE NITROCELULOSA (Hybond C extra Amersham)**

Para transferir el ADN a la membrana de nitrocelulosa, se hizo una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Después el gel fue tratado para desnaturalizar el ADN, primero se incubó el gel en 200 ml. de solución I, se puso en agitación suave por 15 min, se desechó la solución y se repitió el tratamiento con la misma solución. Después fue

tratado dos veces con 200 ml. de solución II, dejándolo en agitación por 20 min en cada tratamiento. Posteriormente se incubó dos veces con solución III por 30 min en agitación. Luego se enjuago el gel con 200 ml de solución amortiguadora SSC 6X por 1min. Después se formó el sistema de transferencia de la siguiente manera: En un recipiente se colocó solución amortiguadora SSC 6X, encima del refractario se puso un vidrio atravesado, enseguida del vidrio se puso papel 3M humedecido en SSC 6X, quedando los bordes, en contacto con la solución amortiguadora, después se colocó el gel, se le puso parafilm en las orillas del gel para evitar que se mueva y que la solución pase unicamente através del gel, a continuación se colocó la membrana que previamente fue hervida en agua destilada por 10 min y enjuagada en SSC 6X, posteriormente se colocaron dos pedazos de papel 3M, cortados a la medida del gel, finalmente se pusieron servitoallas y un objeto de 1/2 kg. de peso. Se dejó el sistema de transferencia de 12 a 14 hrs. Para fijar el ADN a la membrana, se desmontó el sistema, se marcó la entrada de los pozos y la ubicación de la membrana con respecto al gel. Después se colocó la membrana en el horno Vacuum oven modelo 5831, se dejó de 2 a 3 hrs. a 80°C, con vacío a 5 mm deHg. Se almacenó a -20°C hasta su utilización.

#### HIBRIDIZACION.

Para realizar la hibridización, primero se requiere hacer una prehibridización. En un tubo de hibridización, se colocó la membrana con 5 ml. de solución amortiguadora de hibridización, se incubó en el horno de hibridización Robbins Scientific modelo 1000 a 42°C de 8 a 12 hrs. Después se desechó la solución, se le puso nuevamente 5 ml. de la solución amortiguadora y la sonda marcada, se dejó hibridando de 12 a 14 hrs. a la misma temperatura. Después se lavó la membrana, para retirar la marca inespecífica, de la siguiente manera: se retiró la sonda del tubo de hibridización, se añadieron 50 ml. de solución 1 previamente calentada a 42°C, se incubó en el horno por 15 min, se desechó la solución y se repitió el lavado con la solución 1, duplicando el tiempo de incubación. Después se pasó la membrana a una charola de plástico, se agregaron 500 ml. de solución 2 precalentada a 42°C, se incubó por 30 min. a la misma temperatura. Finalmente se lavó con 500 ml. de solución 3, se incubó por 30 min. Se escurrió el filtro y se acomodó en un cassette de exposición (Okamoto), con una placa fotográfica (Kodak X-OMAT-ARS), se expuso en un ultracongelador a -70°C. El tiempo de exposición dependió de la intensidad de hibridización.

Posteriormente se revelo la placa, dejándola un minuto en el revelador y un minuto en el fijador, después se enjuaga con agua.

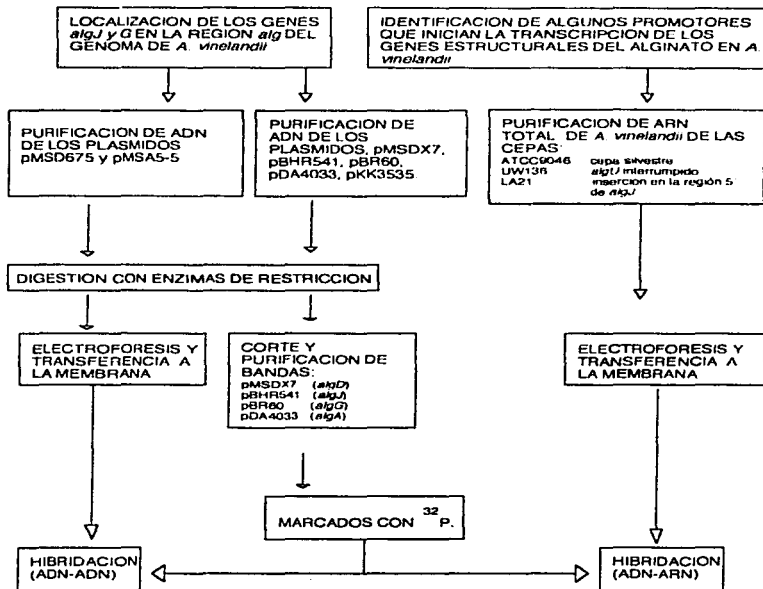
#### **6.10 HIBRIDIZACION DE ARN-ADN. (Tipo "dot blot")**

##### **TRANSFERENCIA DEL ARN A LA MEMBRANA DE NYLON (Hybond N+ Amersham)**

La transferencia se hizo con un aparato (Slott blot), éste tiene una serie de pozos, para colocar las muestras. Este aparato se conectó a un sistema de vacío para absorber la solución amortiguadora desnaturizante en la que se encontraba el ARN.

Procedimiento: Se purificó el ARN y se calculó su concentración en el espectrofotómetro Milton Roy Spectronic modelo 601, a 260 nm. Se hicieron los cálculos, para tener 40 µg de ARN por cepa. Los 40 µg de ARN fueron colocados en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se llevo a un volumen de 80 µl con solución amortiguadora desnaturizante, se homogenizó la solución, se centrifugó brevemente e incubó a 65°C por 15 min, enseguida se pasó a hielo, dejándolo 5 min, después se centrifugó brevemente. Posteriormente, la membrana se corto a la medida del aparato y se humedeció durante 15 min. con SSC 10X, se colocó en el dispositivo. Después los 40 µg de ARN de cada cepa fueron depositados en cuatro pozos del aparato, de la siguiente manera: se colocaron 40 µl de la solución en el primer pozo, 20 µl en el segundo, y 10 µl en el tercero, para tener 20, 10, 5, de ARN respectivamente en los pozos. Cuando se terminó de absorber el amortiguador desnaturizante, se desmontó el dispositivo, para marcar la membrana ubicando los pozos de cada cepa. La fijación del ARN a la membrana se hizo con NaOH 0.4 N, se colocaron 10 ml. aprox. de NaOH sobre un vidrio, a continuación se colocó la membrana (la parte donde quedo depositado el ARN quedó hacia arriba, para evitar el contacto directo con el NaOH), se dejó durante 10 min, después se enjuagó en SSC 2X por un minuto. Finalmente se secó la membrana y se almacenó a -20°C hasta que se ocupó. La hibridización se hizo según el protocolo de hibridización tipo "Southern".

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## **VII. RESULTADOS Y DISCUSION.**

**...yo busco comprender, no entender...**

**Jacques Monod**

**IDENTIFICACION DE ALGUNOS PROMOTORES QUE INICIAN LA TRANSCRIPCION DE LOS GENES ESTRUCTURALES PARA LA BIOSINTESIS DEL EXOPOLISACARIDO ALGINATO EN *Azotobacter vinelandii*.**

**7.1 OBTENCION DE LOS FRAGMENTOS DE ADN QUE SE UTILIZARON COMO SONDAS EN LAS HIBRIDACIONES.**

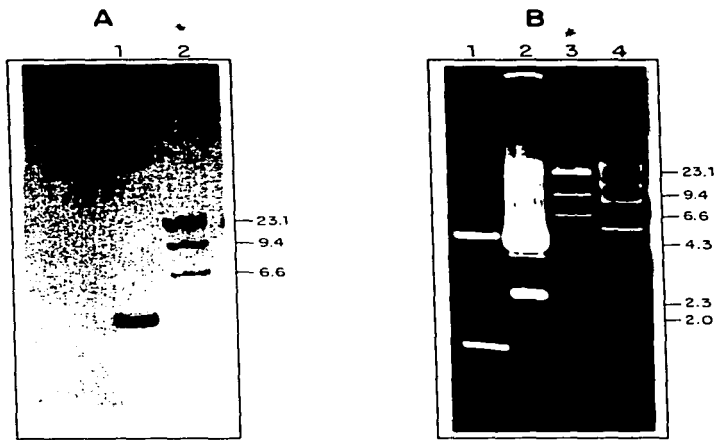
En la figura 9 se muestra la electroforesis de la purificación y digestión con endonucleasas de restricción de los plásmidos de donde se obtuvieron las sondas utilizadas en la realización de las hibridaciones (tipo "Southern" y "dot blot"). Las enzimas de restricción, que se utilizaron en la digestión de los plásmidos, para obtener los fragmentos deseados se muestran en la tabla IV.

**TABLA IV.** Fragmentos de los genes utilizados como sondas en las hibridaciones.

SONDA	TAMAÑO(pb)	SITIOS DE RESTRICCION	ORIGEN (PLASMIDO)
<i>algD</i>	594	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	pMSDX7
<i>algJ</i>	1500	<i>Bam</i> H I- <i>Nde</i> I	pBHR541
<i>algG</i>	1200	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	pBR60
<i>algA</i> *	496	<i>Sst</i> I- <i>Sal</i> I	pDA4033

\**algA* de *P. aeruginosa*.





**Figura 9.** Electroforesis de las digestiones de los plásmidos de donde se obtuvieron los fragmentos para utilizarlos como sondas (**A**). Carril 1) pBR60 digerido con *Hind* III; carril 2)  $\lambda$  digerido con *Hind* III; (**B**). Carril 1) pBHR 541 digerido con *Nde* I/*Bam* HI; carril 2) pMSDX9; 3) carril  $\lambda$  digerido con *Hind* III; carril 4) pDA4043.

\*Marcador de peso molecular.

## 7.2 Localización de los genes *algJ* y *algG* en la región *alg* del genoma de *A. vinelandii*.

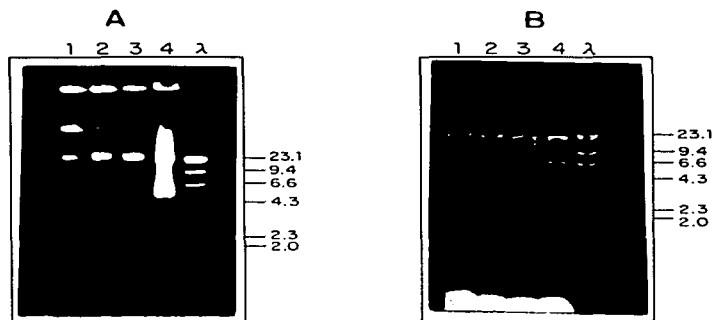
Para determinar que los genes *algJ* y *algG* forman parte del grupo de genes biosintéticos del alginato ubicados en la región *alg* del genoma de *A. vinelandii*, se usaron fragmentos internos de ambos genes (provenientes de los plásmidos pBHR 541 y pBR 60) [Rehm, 1996; Valla, 1996], marcados radioactivamente con [ $\alpha$   $^{32}$ P]dCTP y utilizados como sondas en la hibridación contra el ADN de los plásmidos pMSD675, pMSA55 (Fig10).

El plásmido pMSD675 contiene un fragmento de 25 kb (kilopares de bases) del genoma de *A. vinelandii*, el cual incluye la región donde se encuentran agrupados los genes estructurales requeridos en la biosíntesis del alginato (región *algDA*) [Campos *et al.*, 1996; Lloret *et al.*, 1996], en medio de estos genes (*algD* y *algA*) se han localizado los genes *algB*, *alg44*, *algL*, *algF* (Fig. 12,A) [Campos *et al.*, 1996; Lloret *et al.*, 1996; Mejía *et al.*, en revisión]. El plásmido pMSA55 contiene un fragmento de ADN genómico de *A. vinelandii* el cual incluye el operón *algLA* y carece de la región de donde se encuentra el gen *algD* (Fig. 12,B) [Lloret *et al.*, 1996], la ausencia del gen *algD* fué demostrada por análisis de "Southern blot" [Campos *et al.*, 1996]. Ambos plásmidos (pMSD675 y pMSA55) se originaron en la elaboración del banco genómico de la cepa ATCC 9046 (cepa silvestre de *A. vinelandii*), basado en el cósmido pCP13.

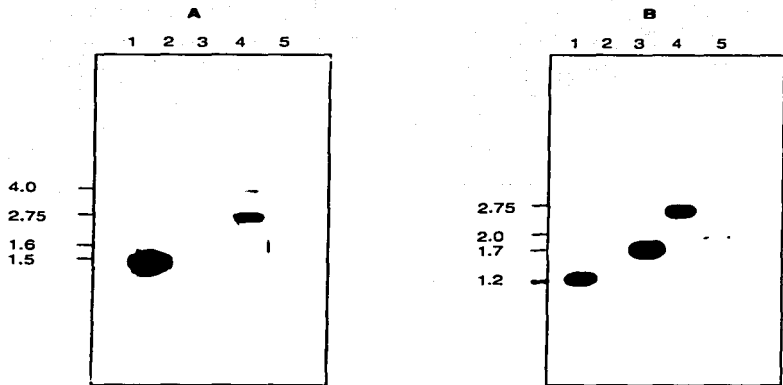
Los resultados obtenidos, como se puede observar en la figura 11, ambos genes hibridaron con el plásmido pMSD675 que tiene la región *algDA*, esto demuestra que estos genes se encuentran dentro de la región *alg* del genoma de *A. vinelandii*, región donde se encuentran agrupados los genes biosintéticos del alginato. Con los resultados de la

hibridación del gen *algG* con los plásmidos pMSD675 y pMSA55 nos sugiere lo siguiente:

1) El gen *algJ* no se encuentra formando parte del operón *algLA*. Esto se determinó por no detectar señal de hibridación en el plásmido pMSA55 cuando se hibridó con este gen (Fig. 11.A), como se menciona antes, ya se había observado que el plásmido pMSA55 expresa el operón *algLA* [Lloret *et al.*, 1996]. 2) El gen *algG* se encuentra hacia abajo de *algJ*, debido a que, *algJ* únicamente hibridó con el plásmido pMSD675 (Fig. 11.A), mientras que el gen *algG* hibridó con ambos plásmidos. Como se mencionó antes el plásmido pMSD675 tiene la región desde *algD* hasta *algA* (Fig. 12.A), mientras que el plásmido pMSA55 carece de la región donde se encuentra el gen *algD*.



**Figura 10.** Electroforesis de las digestiones de los plásmidos pMSA55 y pMSD 675, digestiones realizadas con enzimas de restricción. (A) plásmidos sin digerir; carril 1) pMSA55; carril 2) pCC 27 (Plásmido no utilizado en este trabajo); carril 3) pMSD 675; carril 4) pBHR 541; carril 5) marcador de peso molecular ( $\lambda$ -Hind III). (B) carril 1) pMSA55 digerido con *Eco* RI; carril 2) pCC 27 digerido con *Eco* RI (Plásmido no utilizado en este trabajo); 3) pMSD 675 digerido con *Eco* RI; carril 4) pMSD 675 digerido con *Xho* I; carril 5) marcador de peso molecular ( $\lambda$ -Hind III).



**Figura 11.** Detección de los genes *algJ* y *algG*. Hibridación tipo "Southern" de los plásmidos pMSA55 y pMSD 675 con: (A) el gen *algJ*; (B) el gen *algG*, los plásmidos fueron digeridos previamente con endonucleasas de restricción. Carril 1) controles positivos; carril 2)  $\lambda$  (*Hind* III); carril 3) pMSA55 digerido con *Eco* RI; carril 4) pMSD 675 digerido con *Eco* RI; carril 5) pMSD 675 digerido con *Xho* I.

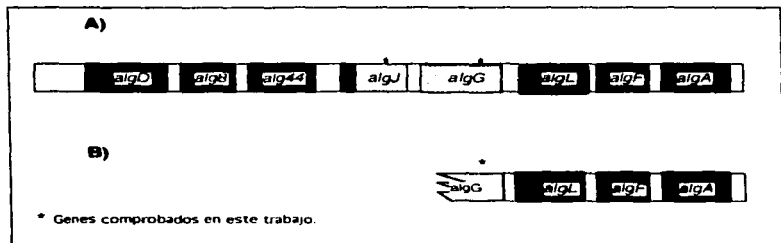


Figura 12. Fragmento del genoma de *A. vinelandii* que portan los plásmidos: A) pMSD 675, B) pMSA55.

### 7.3 IDENTIFICACION DE TRES PROMOTORES QUE INICIAN LA TRANSCRIPCION DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE LA BIOSINTESIS DEL ALGINATO.

#### 7.3.1 Localización de los promotores *algD* y *algA*.

Para determinar la existencia de los promotores que transcriben a los genes *algD* y *algA* se hicieron hibridaciones "tipo dot blot" de ARN total de las cepas ATCC 9046, RSD1 y la UW 136 de *A. vinelandii* (Fig. 14), usando como sondas los genes *algD* de *A. vinelandii* y *algA* de *P. aeruginosa* previamente marcados con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP.

La cepa ATCC 9046 es la cepa silvestre de *A. vinelandii*. La cepa RSD1 es una mutante en el gen *algD* en la que el vector que codifica

para la resistencia a ampicilina, interrumpe el gen [Campos *et al.*, 1996]. La cepa UW 136 es una mutante en el gen *algU* (gen que codifica para el factor  $\sigma$  AlgU), esta mutación se originó por la inserción de una secuencia que interrumpe al gen [Martínez-Salazar *et al.*, 1996]. Los probables ARNm de estas cepas se muestran en la figura 14.

Los resultados que se obtuvieron, como se puede observar en la figura 15.A presenta señal de hibridación en el ARN de la cepa ATCC 9046 y RSD1 con el gen *algD*, mientras que en la cepa UW 136 no se observó ninguna señal de hibridación. En lo que se refiere a los resultados obtenidos en la hibridación contra el gen *algA* se tiene una señal similar en las tres cepas (ATCC 9046, RSD1 y UW 136), figura 15.B.

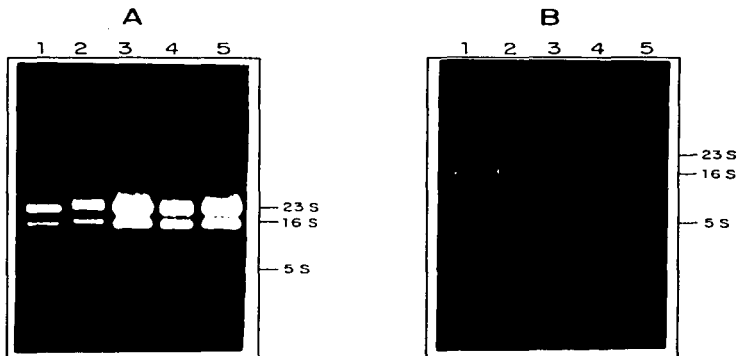
En la hibridación con el gen *algD* se esperaba que hubiera hibridación en la cepa ATCC 9046 por ser la cepa silvestre, por lo tanto produce el ARNm específico del gen *algD* (Fig. 14.A). En la cepa RSD1 se desconocía si hibridaría porque tiene interrumpido el gen *algD*, como no se conocía en que parte del gen estaba la inserción, se ignoraba si el ARNm de *algD* interrumpido podría ser detectado. Nuestros resultados sugieren que el ARNm del gen *algD* interrumpido si puede ser detectado por experimentos tipo Northern en la cepa RSD1 (Fig. 15.A). En la cepa UW 136 se esperaba que no hubiera hibridación, porque el gen *algU* que codifica para el factor  $\sigma$  AlgU, se encuentra mutado por la inserción de una secuencia [Martínez-Salazar *et al.*, 1996]. El factor  $\sigma$  AlgU se requiere para el inicio de la transcripción de *algD*, apartir del promotor que se encuentra hacia arriba de este gen, promotor determinado en la secuencia del gen *algD* [Campos *et al.*, 1996]. Los resultados de la figura 15.A confirma esto por la ausencia de hibridación en la cepa UW 136.

En lo que se refiere a la hibridación contra el gen *algA*,

nuevamente se esperaba que hibridara con la cepa silvestre (ATCC 9046) y con la cepa RSD1 en caso de existir otro promotor diferente a *algD*. En lo que se refiere a la cepa UW 136 no se sabía si hibridaría, porque se desconocía si se requería del mismo factor ( $\sigma$  AlgU) para el inicio de la transcripción del promotor que transcribe a este gen, sin embargo, en nuestros resultados se detectó una señal de hibridación (Fig 15,B). La hibridación fué posible por la existencia del ARNm específico de *algA*, este ARNm fué sintetizado a partir de un promotor diferente al de *algD*, confirmado en la cepa UW 136. El promotor que esta arriba de *algD* no es funcional en la cepa UW 136 por la ausencia del factor  $\sigma$  AlgU. Con los resultados obtenidos con las cepas UW 136 y RSD1 cuando se hibridó con el gen *algA* se demostró lo siguiente:

La transcripción de el gen *algA* y posiblemente otros genes biosintéticos del alginato en esta región no dependen del promotor *algD*, si no que la transcripción de éstos es realizada a partir de un promotor diferente y que además no depende de la actividad del factor  $\sigma$  AlgU.





**Figura 13. (A)** Electroforesis de la purificación del ARN total de *A. vinelandii*. Carril 1) HB 101 (*E. coli*); carril 2) ATCC 9046; carril 3) RSD1; carril 4) LA 21; carril 5) UW 136; **(B)** después de realizarse los calculos correspondientes para tratar de igualar las concentraciones de cada una de las cepas para su fijación en la membrana. Carril 1) ATCC 9046; carril 2) RSD1; carril 3) LA 21; carril 4) UW 136; 5) HB 101 (*E. coli*).

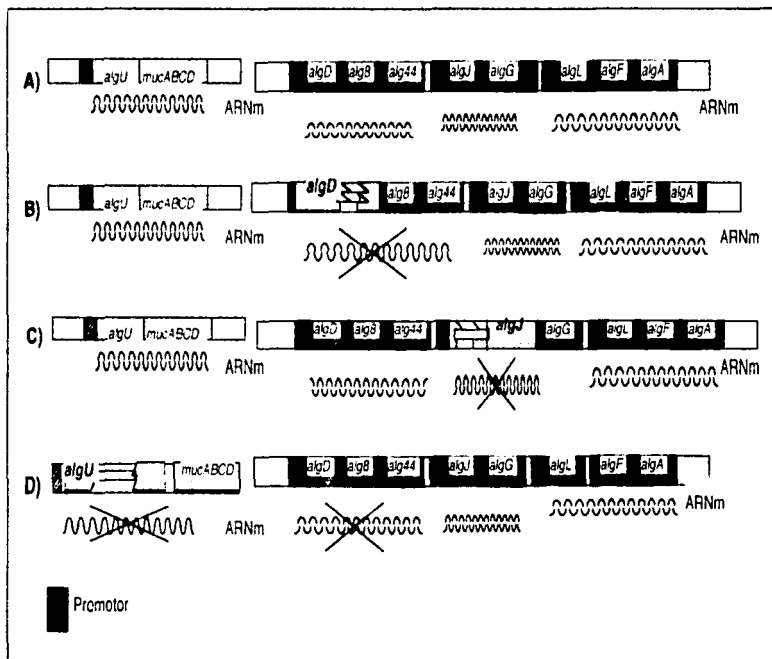
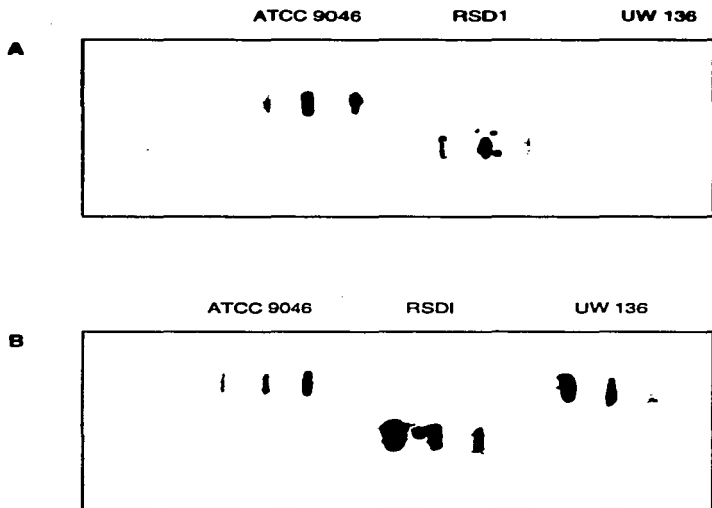


Figura 14. Características de los ARNm producidos en las diferentes cepas de *A. vinelandii* utilizadas en las hibridaciones tipo "dot blot". A) ATCC9046, cepa silvestre; B) RSD1, *algD* interrumpido; C) LA21, *algJ* interrumpido; D) UW 136, *algU* interrumpido.



**Figura 15.** Hibridación del ARN total de *A. vinelandii* de las cepas ATCC 9046, RSD1 y UW 136 con: (A) el gen *algD*; (B) el gen *algA*.

### 7.3.2 Identificación del promotor *algJ*.

Para determinar si los genes *algJ* y *algG* son transcritos a partir del promotor *algD* se llevaron a cabo experimentos de hibridación tipo "dot blot", usando el ARN total de las cepas ATCC 9046 mucóide (silvestre); RSD1 no mucóide por la interrupción del gen *algD* [Campos *et al.*, 1996], LA 21 no mucóide por la inserción de un transposón por arriba del gen *algJ* [Mejía *et al.*, sometido] y la UW 136 que tampoco produce alginato por la interrupción del gen *algU* [Martínez-Salazar *et al.*, 1996].

En los resultados de la hibridación con los genes *algJ* y *algG*, se obtuvo lo siguiente:

Cuando se hibridó con el gen *algJ* hubo una señal fuerte en la cepa UW 136, mientras que en la cepa silvestre se presentó una señal de hibridación muy tenue (Fig. 16). En la hibridación contra el gen *algG*, también se tiene una señal fuerte en la cepa UW 136 y muy tenue en las cepas ATCC 9046 mientras que en la LA21 no hubo señal de hibridación con ningún gen, (Fig.16). Estos resultados confirman que, estos genes no son transcritos a partir del promotor *algD* si no que el inicio de su transcripción es a partir de otro promotor. Este promotor al igual que el promotor que transcribe al operón *algLA* no dependen de la actividad del factor  $\sigma$  AlgU, como es el caso del promotor *algD*.

Los resultados de la hibridación tipo "Southern" con el plásmido pMSA55, también sugieren fuertemente que el promotor que transcribe *algJG* es distinto al que transcribe *algD* ya que el operón *algLA* se expresa en este plásmido y el gen *algJ* no está contenido en este plásmido (Fig. 12,B).

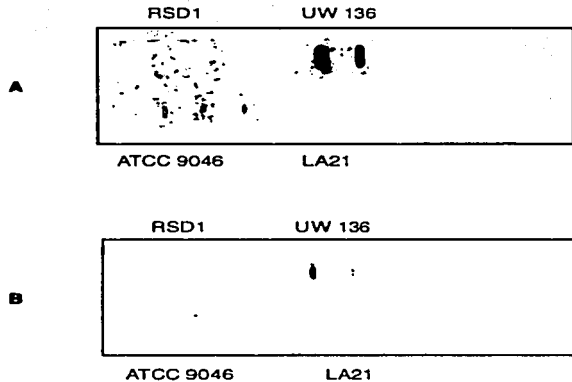
La comprobación de este promotor y el que inicia la transcripción del operón *algLA*, con estas técnicas de hibridación ADN-ARN se basa en

la expresión de los genes *algD*, *algJ*, *algG* y *algA*.

La forma de producir el alginato, es muy similar en la vía biosintética entre *P.aeruginosa* y *A. vinelandii* e incluso hasta en el arreglo físico de los genes (genes que se han identificado hasta el momento, Fig. 6 y Fig. 12). De los genes homólogos que se han secuenciado en ambos microorganismos muestran un alto porcentaje de identidad (Tabla V) observando que la vía biosintética, el arreglo físico y la secuencia de nucleótidos de estos genes está conservada en estos microorganismos. Donde se empiezan a descubrir diferencias es en el arreglo transcripcional de estos genes cuyos productos son requeridos en la vía de biosíntesis de alginato, donde en *A. vinelandii* estos genes están constituidos por más de un operón, estos promotores dependen de diferentes factores  $\sigma$  alternativos para el inicio de su transcripción. Por lo tanto parece ser más compleja la regulación genética de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* que en *P. aeruginosa*.

**Tabla V.** Porcentaje de identidad de los productos de los genes homólogos entre *A. vinelandii*-*P. aeruginosa*; [Campos *et al.*, 1996; Lloret *et al.*, 1996; Martínez-Salazar *et al.*, 1996; Rehm, 1996; Valia *et al.*, 1996].

Genes homólogos	Porcentaje (%)
<i>algD</i> - <i>algD</i>	73
<i>algJ</i> - <i>algE</i>	52
<i>algG</i> - <i>algG</i>	66
<i>algU</i> - <i>algU</i>	93
<i>mucA</i> - <i>mucA</i>	64.4
<i>mucB</i> - <i>mucB</i>	63.9



**FIGURA 16.** Hibridación del ARN total de *A. vinelandii* de las cepas ATCC 9046, RSD1, LA 21, UW 136 contra los genes **(A)** *algG*; **(B)** *algJ*.

## VIII. CONCLUSIONES

Los genes *algJ* y *algG* forman parte del grupo de genes biosintéticos en la región *alg* del genoma de *A. vinelandii*.

El patrón de hibridización de ADN de los genes *algJ* y *algG* con el plásmido pMSD 675 que contiene el grupo de genes del alginato y con el que carece del gen *algD* (pMSA55), nos muestra semejanzas en el arreglo de estos genes en el genoma de *A. vinelandii* (Fig. 17) con los de *P. aeruginosa*, *algD*, *algJ*, *algG*, *algL* y *algA*.

En *A. vinelandii* la transcripción de los genes estructurales no dependen de un solo promotor, como en *P. aeruginosa*, sino que éstos son transcritos al menos por tres promotores, donde para su transcripción, únicamente el promotor que se encuentra en *algD* depende del factor  $\sigma$  AlgU.

Los promotores que se encuentran arriba de *algJ* y *algL*, no dependen del factor  $\sigma$  AlgU para el inicio de su transcripción.

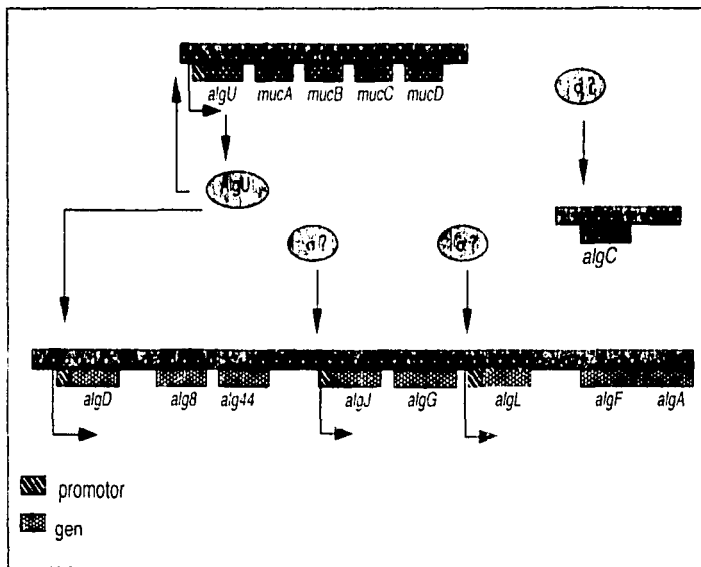


Figura 17. Mapa físico y organización transcripcional de los genes que codifican para las enzimas de la vía de biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*.



## REFERENCIAS

- Annisson, G., and L. Couperwhite. 1986. Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Zotobacter vinelandii*. *App. Microb. Biotec.* 25:56-61.
- Atkins, E. D. T. Mackie, W., Parker, K. D., and Smolko, E. E. 1971. Crystalline Structures of poly-L-guluronic Acids. *polymer Lett.* 9:311-316.
- Boucher, J. C., J. Martínez-Salazar, M. J. Schurr, M. Mudd, H Yu 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. Shinabarger, 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-B.
- Boyd, A. and A. M. Chakrabarty. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of its alginate exopolysaccharide. *J. Ind. Microb.* 15:162-168.
- Bruck, D. T., Smith W. D., Madigan T. M. 1984. *Biology of microorganisms*. Prentice-Hall.
- Campos, M. E., Martínez-Salazar, J., Lloret, L., Moreno, S., Nuñez, C., Espin, G., and Soberón-Chávez, G. 1996. Cloning and characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 178:1793-1799.
- Chakrabarty, A. M. 1991. Molecular genetics and environmental regulation of alginate biosynthesis. *Appl. Phycology Forum.* 8: 1-6.
- Chitnis, C. E., and D. E. Ohman. 1993. Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure. *Mol. Microbiol.* 8:583-590.
- Chu, L., T. B. May, A. M. Chakrabarty and T. K. Misra. 1991. Nucleotide sequence and expression of the *algE* gene involved in alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 107: 1-10.
- Darzens, A., B. Frantz, R. I. Vanags and A. M. Chakrabarty. 1986. Nucleotide sequence analysis of the phosphomannose isomerase gene (*pmi*) of *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with the correspondig *Escherichia coli* gene *manA*. *Gene* 42:293-302.
- Deretic, V., J. F. Gill and A. M. Chakrabarty. 1987. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: nucleotide sequence and transcriptional regulation of the *algD* gene. *Nucleic Acid research.* 15: 4567-4581.
- Deretic, V., R. Diksit, W. M. Konyecsi, T. Misra, A. M. Chakrabarty and T. K. Misra. 1989. The *algR* gene, wich regulates mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, belongs to a class of environmentally responsive genes. *J. Bacteriol.* 171: 1278-1283.

- Deretic, V., J. R. Gonovan, W. M. Konyecsi and D. W. Martin. 1990. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: Mutations in the *muc* loci affect transcription of the *algR* and *algD* genes in response to environmental stimuli. *Mol. Microbiol.* **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., D. W. Martin, M. J. Schurr, M. H. Mudd, N. S. Hibler, R. Curcic and J. C. Boucher. 1993. Conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioTechnology.* **11**: 1133-1136.
- 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.
- Dixit, V., M. Arthur, and G. Gitnick. 1993. A morphological and evaluation of transplanted isolated encapsulated hepatocytes following long-term transplantation in Gunn rats. *Biomater Artif Cells Immob Biotechnol.* **21**: 119-133.
- Ertesvag, H., H. K. Hoidal, I. K. Hais, A. Rain, B. Dosath and S. Valla. 1995. A Family of modular type mannanuronic C-5-epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Microbiol.* **16**: 719-731.
- Franklin, M. J. and D. E. Ohman. 1993. Identification of *algF* in the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* which is required for alginate acetylation. *J. Bacteriol.* **175**: 5057-5065.
- Franklin, M. J., C. E. Chitnis, P. Gacesa, A. Sonesson, D. C. White, and D. E. Ohman. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* AlgG is a polymer level alginate C5-mannuron epimerase. *J. Bacteriol.* **176**: 1821-1830.
- Fujiwara, M., and Nagumo, T. 1992. The effect of the content of D-mannuronic acid and L-guluronic blocks in alginates on antitumor activity. *Carbohydr. Res.* **224**: 343-347.
- Fujiwara, S., N. Zielinski, and A. M. Chakrabarty. 1993. Enhancer-like activity of AlgR1-binding site in alginate gene activation: positional, orientation and sequence specificity. *J. Bacteriol.* **175**: 5452-5459.
- Gill, J. F., V. Deretic, and A. M. Chakrabarty. 1986. Overproduction and assay of *Pseudomonas aeruginosa* phosphomannose isomerase. *J. Bacteriol.* **167**:611-615.
- Goldberg, J. B. and T. Dahnke. 1992. *Pseudomonas aeruginosa* AlgB, which modulates the expression of alginate, is a member of the NtrC subclass of prokaryotic regulator. *Mol. Microbiol.* **6**: 59-66.
- Goldberg, J. B., K. Hatano and G. B. Peir. 1993. Synthesis of lipopolisaccharide O ide chain by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 requires the enzyme phosphomannomutase. *J. Bacteriol.* **175**: 1605-1611.

- González López., V. Salmeron, M. V. Martínez-Toledo, F. Ballesteros and A. Ramos Cormenzona. 1985. Production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in chemically-defined media and dialysed soil media. *Soil Biol. Biochem.* **18**: 119-120.
- Haug, A., B. Larsen, and O. Smidsrod. 1974. Uronic acid sequence in alginate from diferent sources. *Carbohydr. Res.* **32**: 217-225.
- Hershberger, C. D., R. W. Ye, M. R. Parsek, S. D. Xie and A. M. Chakrabarty. 1995. The *algU* gene of *Pseudomonas aeruginosa*, a key regulator involved in alginate biosynthesis, encodes an alternative  $\sigma$  factor ( $\sigma^E$ ). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:7941-7945.
- Kato J., T. K. Misra and A. M. Chakrabarty. 1990. AlgR3, a protein resembling eukariotic histone H1, regulates alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2887-2891.
- Kato J., and A. M. Chakrabarty. 1991. Purification of the regulatory protein AlgR1 and its binding in the far upstream region on the *algD* promoter in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1760-1764.
- Kennedy, c., and A. Toukdarian. 1987. Genetics of Azotobacters: Applications to Nitrogen Fixati6n and related Aspects of metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 227-258.
- Krieg, R. N. and J. G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Baltimor. Williams & Wilkins.
- Lemoigne, M., and H. Girard. 1943. Reserves lipidiques  $\beta$ -hydroxy-butyriques chez *Azotobacter choococum*. *C. R. Acad. Sci.* **217**: 557-588.
- 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.
- Lin, L. P., and H. L. Sadoff. 1968. Encystament and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of  $\beta$ -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* **95**: 2336-2343
- Liu, H. W., F. A. Olosu and P. L. Chang. 1993. Expression of human factor IX by microencapsulated recombinant fibroblasts. *Hum. Gene Ther.* **4**: 291-301
- Lloret, L., R. Barreto, M. E. Campos, S. Moreno, J. M. Martínez-Salazar, G. Espín, R. León and G. Sober6n Ch6vez. 1996. Genetic analysis of the transcription arrangement of *Azotobacter Vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters. *Mol. Microbiol.* **21**:449-457.
- Loperfido, B., and H. L. Sadoff. 1973. Germination of *Azotobacter vinelandii* cysts: sequence of macromolecular synthesis and nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* **1113**: 841-846.
- Maharaj, R., T. B. May, S. K. Wang and A. M. Chakrabarty. 1993. Sequence of *algB* and *alg 44* genes involved in the synthesis of alginate by *pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* **136**: 267-269.

- Maldonado, R., I. Jiménez and J. Cassadeus. 1994. Changes in ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *J. Bacteriol.* **176**: 3911-3919.
- Manna, A. C. and Das, H. K. 1993. Determination of the size of the *Azotobacter vinelandii* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 719-722.
- Martin, D. W., M. J. Schurr, H. Yu and V. Deretic. 1994. Analysis of promoters controlled by the putative sigma factor AlgU regulating conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: relation to  $\sigma^E$  an response. *J. Bacteriol.* **176**: 6888-6996.
- Marínz-Salazar J. M., S. Moreno, R. Najera, J. C. Boucher, G. Espín, G. Soberón-Chavez and V. Deretic. 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.* **178**: 1800-1808.
- May, T. B., Dean S., Romilla M., Junichi K., Lien C., James D. D., Siddartha R., Nicolette A. Z., Alan B., Rony 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.
- Mejía-Ruiz, H., S. Moreno, J. Guzman, G. Soberón-Chávez, G. Espín. 1997. Cloning and characterization of algK from *Azotobacter vinelandii*. *Fems Microbiol. Letter.* (Submitted).
- Mohr C. D., N. S. Hiblar 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*. *Bioche. Biophys. Res. Commun.* **189**: 837-844.
- Morris, J. V. 1987. New and modified polysaccharides. En: R. King Y P. Cheetham, Ed. *Food Biotechnology*. Elsevier Appl Sci. NY, pp 193-248.
- Nagpal, P., M. A. Reddy and H. K. Das. 1989. Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **171**: 3133-3138.
- Núñez López, C. 1995. Identificación de genes regulatorios de la biosíntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de maestría. UACPY-CCH UNAM, México.
- Otterlei, M., Ostgard, K., Skjak-Break, G., Smidsrod, O., Soon-Shiong, P., and Espevik, T. 1991. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *J. Immunother* **10**: 286-291.
- Pindar, D. and C. Bucke. 1975. The biosynthesis of alginic acid in *Azotobacter vinelandii*. *J. Biochem.* **152**: 617-622.

- Rehm, B. H. A., G. Boheim, J. Thomassen and U. K. Winkler. 1994. Overexpression of *algE* in *Escherichia coli*: subcellular localization, purification and ion channel properties. *J. Bacteriol.* **176**: 5639-5647.
- Rehm, B. H. A. 1996. The *Azotobacter vinelandii* gene *algJ* encodes an outer membrane protein presumably involved in the synthesis of alginate. *Microbiol.* **142**:873-880.
- Sadoff, H. L. 1975. Encystment and Germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol Rev.* **39**(4): 516-539
- Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E. F., 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Savelkoul, H. F., Van Ommen, R., Vossen, A. C. Breedand, E. G., Coffman, R. L. and van Oudenaren, A. 1994. Modulation of systemic cytokine level by implantation of alginate encapsulated cells. *J. Immunol. Meth.* **170**: 185-196.
- Shiller, N. L., S. R. Monday, C. M. Boyd, N. T. Keen and D. E. Ohman. 1993. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase (*algL*): Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 4780-4789.
- Shinabarger, T. B. May, A. Boyd, M. Ghosh and A. M. Chakrabarty. 1993. Nucleotide sequence and expression of the *Pseudomonas aeruginosa* *algF* gene controlling acetylation of alginate. *Mol. Microbiol.* **9**: 1027-1035.
- Schilctman, D. A., A. Kavanaugh-Black, S. Shankar and A. M. Chakrabarty. 1994. Energy metabolism and alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: role of the tricarballylic acid cycle. *J. Bacteriol.* **176**: 6023-6029.
- Schurr, M. J., Martin D. W., Mudd, M. H., Hibler, N. S., Boucher, J. C. and Deretic V. 1993. The *algD* promoter: regulation of alginate production by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cell Mol. Biol Res.* **39**: 371-376.
- Schurr, M. J., Martinez-Salazar J. M., Yu H., Boucher, J. C. and Deretic V. 1996. Control of *AlgU*, a member of the  $\sigma$ -E-like family of stress sigma factors, by the negative regulators *MucA* and *MucB* and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* **178**: 4997-5004.
- Sirkiae, T., Salonen, H., Veski, P., Juertjenson, H. and Mervola, M. 1994. Biopharmaceutical evaluation of new prolonged-release press-coated ibuprofen tablets containing sodium alginate to adjust drug release. *Int. J. Pharm.* **107**: 179-187.
- Soom-Shiong, P., Hertz, R. E., Merideth, N., Yao, Q. X., Yow Z., Zheng, T., Murphy, M., Moloney, M. K., Schmehl, M., Harris, M., Mendez, R., Mendez, R., and Sanfor, P. A. 1994. Insulin independence in a type 1 patient diabetic after encapsulated islet transplantation. *Lancet.* **343**: 950-951.
- Stokke, B. T., Smiderod, O., Bruheim P., and Skjak-Braek, G. 1991. Distribution of uronate residues in alginate chains in relations to alginate gelling properties. *Macromolecules* **24**: 4637-4645.

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

Tinoco V., J. R. 1993. Obtención de alginatos bacterianos por fermentación líquida de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de maestría. UACPyP-CCH UNAM, México.

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

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

Ye, R. W., N. A. Zielinski and A. M. Chakrabarty. 1994. Purification and characterization of phosphomannomutase/phosphoglucomutase from *Pseudomonas aeruginosa* involved in biosynthesis of both alginate and lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 176: 4851-4857.

Yu, H., Mudd, M., Boucher, J. C., Schurr, M. J., and Deretic, V., 1997. Identification of the *algZ* gene upstream of the response regulator *algR* and its participation in control of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179: 187-193.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## APENDICE (medios de cultivo y soluciones)

### MEDIOS DE CULTIVO

#### LURIA BROTH (LB).

Agua destilada		900 ml.
Peptona de caseína	(Difco)	10 g.
Extracto de levadura	(Difco)	5 g.
Cloruro de sodio	(Baker)	10 g.

Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 5N, se aloró a 1 Lt. y se esterilizó en autoclave. Cuando se utilizó como medio sólido se agregaron 15 g/l de agar bacteriológico (Difco).

#### PEPTONA-LEVADURA (PY).

Peptona de caseína	(Difco)	5 g.
Extracto de levadura	(Difco)	3 g.

Se disolvieron en un litro de agua destilada y se esterilizó en autoclave. Cuando se utilizó como medio sólido se agregaron 15 g/l de agar bacteriológico (Difco).

#### BURK-SACAROSA (BS)

Agua destilada	777 ml.
Sacarosa al 20%	100 ml.
Solución amortiguadora de fosfatos	100 ml.

Se esterilizó en autoclave, después se le agrago las sales, con las siguientes cantidades de soluciones madre:

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 ml.
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 ml.
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1 ml.
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1 ml.
NaNO <sub>3</sub>	1 ml.

No esterilizar todo junto por que se precipitan las sales.

#### Soluciones madre:

Reactivo		Cantidad
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	(Baker)	7.3 g/l.
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	(Baker)	5.0 g/l
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	(Baker)	160.0 g/l
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	(Baker)	0.2 g/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(Baker)	18.3 g/l
Sacarosa		250.0 g/l

#### Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(Baker)	8.0 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(Baker)	2.0 g/l

### 6.3 PURIFICACION DE ADN PLASMIDICO POR LISIS ALCALINA.

Solución I	Sacarosa	(Sigma)	20 %
	EDTA	(Baker)	50 mM
	Tris-HCl	(Sigma)	50 mM
		pH7.6	
Solución II	SDS	(Bio-rad)	1 %

	<b>NaOH</b>	<b>(Baker)</b>	<b>0.2 M</b>
<b>Solución III</b>	<b>Acetato de potasio</b>	<b>(Sigma)</b>	<b>60 ml.</b>
	<b>Acido acético glacial</b>	<b>(Merck)</b>	<b>11.5 ml.</b>
	<b>Agua destilada</b>		<b>28.5 ml.</b>

La concentración final es de 3 M con respecto al potasio y 5 M para el acetato.

-Solución amortiguadora TE (Tris EDTA) : 10/1 (Tris-HCl pH7.5 10 mM/EDTA 1 mM).

-ARNasa (Sigma). Se disolvió ARNasa pancreática (ARNasa A) a una concentración de 10mg/ml. en Tris-HCl pH7.5 10mM, NaCl 15mM. Después se incubó a 100°C por 15 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se alícuotó y almacenó a -20°C.

<b>Cloroformo</b>	<b>(Baker)</b>
<b>Etanol</b>	<b>(Merck)</b>
<b>Isopropanol</b>	<b>(Baker)</b>
<b>Lisozima</b>	<b>(Sigma)</b>

#### **6.4 PURIFICACION DE ARN TOTAL DE *A. vinelandii*.**

<b>Proteinasas K</b>	<b>(Sigma)</b>
<b>Mg SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>(Baker)</b>
<b>* Dietil pirocarbonato (DEPC)</b>	<b>(Sigma)</b>

#### **6.5.1 ELECTROFORESIS DE ADN**

Solución amortiguadora de acetatos concentrada 10 veces (10X).  
para 1 lt.

<b>Reactivo</b>		<b>Cantidad</b>
<b>Tris Base</b>	<b>(Sigma)</b>	<b>48.4 g.</b>
<b>Acido acético glacial</b>	<b>(Merck)</b>	<b>22.48 ml.</b>
<b>EDTA dihidratado</b>	<b>(Baker)</b>	<b>37.22 g.</b>

se disolvieron en agua destilada y se esterilizó por filtración.

Marcador de peso molecular, se utilizó ADN del fago λ (Boehringer), digerido con la enzima de restricción Hind III.

#### **COLORANTES.**

<b>Reactivo</b>		<b>Cantidad</b>
<b>Solución amortiguadora 6X</b>		
<b>Azul de bromofenol</b>	<b>(Bio-rad)</b>	<b>0.25%</b>
<b>Xilen cianol FF</b>	<b>(Bio-rad)</b>	<b>0.25%</b>
<b>Ficolil tipo 400; farmacia</b>	<b>(Sigma)</b>	<b>15%.</b>

Se preparó con agua destilada y fué almacenada a temperatura ambiente

Bromo de etidio (Bio-rad). Se preparó una solución madre (10 mg/ml), con agua destilada y se puso en un frasco color ámbar, se almacenó a temperatura ambiente. Para teñir los geles se usó a una concentración de 5µg/ml.



### 6.5.2 ELECTROFORESIS DE ARN.

Solución amortiguadora MAE (MOPS, acetato de sodio y EDTA). Concentrado 5 veces (5X), 100 ml.

Reactivo		pH	Cantidad (gr.)	Concentración final
MOPS*	(Sigma)	7.0	4.18	0.2 M
Acetato de sodio	(Sigma)		0.41	50 mM
EDTA	(Baker)	8.0	0.18	5 mM

Se preparo con agua destilada, se esterilizó por filtración. Fue almacenada a 4°C.  
 \*(3-[n-Morfolino] ácido propanesulfónico)

Colorante:

Glicerol	(Baker)	50%
EDTA	(Baker)	1 mM
Azul de bromofenol	(Bio-rad)	0.4%
Xilen cianol	(Bio-rad)	0.4%

### 6.8 MARCAJE RADIOACTIVO DE SONDAS.

Solución amortiguadora de columna:

Reactivo		Concentración		Cantidad
Tris-HCl	(Sigma)	1.0 M	pH 8.0	10 ml.
NaCl	(Baker)	5.0 M		20 ml.
EDTA	(Baker)	0.25 M		10 ml..
SDS	(Bio-rad)	10 %		1 ml.
NaN <sub>3</sub>	(Sigma)	1.0 M		1 ml.

Se llevó a 1 lt. con agua destilada.  
 Sephadex G-75 (Pharmacia)

### 6.9 HIBRIDACION DE ADN-ADN (Tipo Southern).

Solución I	Reactivo		Cantidad	Concentración
	HCl concentrado	(Baker)	21.55 ml.	0.25 N
	Agua destilada		978.44 ml.	
		pH=1.0		
Solución II	NaOH	(Baker)	20.00 g/lt.	0.5 M
	NaCl	(Baker)	87.66 g/lt.	1.5 M
		pH=13		
Solución III	NaCl	(Baker)	87.66 g/lt.	1.5 M
	Tris Base	(Sigma)	60.55 g/lt.	0.5 M
		pH=7.5-8.0 con HCl.		

Solución amortiguadora SSC concentrada 20 veces (20 X).

NaCl	(Baker)	175.3g/lt.	0.15 M
Citrato de sodio	(Merck)	88.2 g/lt.	0.15 M

Se ajusto el pH a 7.0 con NaOH y esterilizó por filtración.  
 Papel 3M (filtro watmamn #1) (Sigma)  
 Parafilm (Sigma)

## HIBRIDIZACION.

### Solución amortiguadora de hibridización:

Reactivo	Concentración	Volumen	Concentración final
Formamida (Sigma)		2.5 ml.	50 %
Denhardt	50 X	0.25 ml.	5 X
SSC	20 X	1.25 ml.	6 X
SDS	10 %	50 µl.	0.1 %
EDTA (Baker)	0.5 M pH 8.0	10 µl.	1 mM.
Tris-HCl (Sigma)	1 M pH 7.4	50 µl.	0.01 mM.
*ADN <sub>tit</sub> (Sigma)	10 mg/ml.	50 µl.	0.1 mg/ml.
Agua destilada		840 µl.	

\*El ADN de timo de ternera (tit), se desnaturizó con calor, colocándolo en un tubo eppendorf de 1.5 ml. con el agua y se incubó a 95°C por 10 min.

Reactivo Denhardt concentrado 50 veces (50 X), 500 ml.

Ficoll tipo 400 (Sigma) 5 g.

Polivinilpirrolidona (Sigma) 5 g.

Albumina de suero de bovino Fracción V (Sigma) 5 g.

Se disolvieron estos compuestos en agua destilada, esterilizó por filtración y se almacena a -20°C.

### SOLUCIONES DE LAVADO.

Solución 1. SSC 2X, SDS 0.1%. Para 500 ml:

SSC 20 X 50 ml.

SDS 10 % 5 ml.

Se aforó con agua destilada.

Solución 2. SSC 0.1 X, SDS 0.1 %. Para 1000 ml:

SSC 20 X 5 ml.

SDS 10 % 10 ml.

Se aforó con agua destilada.

Solución 3. SSC 0.1 X, Para 100 ml:

SSC 20 X 5 ml.

Se aforó con agua destilada.

Revelador (Kodak)

Fijador (Kodak)

## 6.10 HIBRIDIZACION DE ARN-ADN.

### TRANSFERENCIA DEL ARN A LA MEMBRANA DE NYLON (Hybon N+ Amersham)

Solución amortiguadora desnaturizante:

Sol. amortiguadora MAE 5X 100 µl

Formaldehído al 37 % (Baker) 162 µl

Formamida (Sigma) 500 µl.