

03088



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

9
24

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR

CARACTERIZACION DEL GEN *algK* de
AZOTOBACTER VINELANDII.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

M. EN B. CLAUDIO HUMBERTO MEJIA RUIZ

JULIO DE 1997,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Tesis: "Caracterización del gen *algK* de *Azotobacter vinelandii*"

RESUMEN.-

Los pasos moleculares de la vía biosintética del alginato producido por bacterias están siendo estudiados en *Pseudomonas aeruginosa* y *Azotobacter vinelandii*. En *P. aeruginosa* tales estudios obedecen a razones clínicas, debido a que el alginato, es un factor virulento de su estado patogénico en los pacientes con fibrosis quística. En *A. vinelandii*, su estudio está encaminado a la obtención del polímero para consumo humano. Partiendo de la cepa mucóide constitutiva de *A. vinelandii* ATCC 9046, hemos obtenido, por mutagénesis al azar con el transposón Tn5 la cepa LA 21 incapaz de producir alginato e incapaz de enquistarse. La mutación *alg::Tn5* ha interrumpido el gen *algK*, el cual es esencial para la biosíntesis del alginato. *algK* se encuentra dentro de una región de genes estructurales *alg*, homólogos a *P. aeruginosa*, de los cuales también han sido clonados y secuenciados *alg8*, *alg44* y parte de *algJ*. La construcción de las mutantes no polares *alg8::ΩKm*, *alg44::ΩKm* y *algK::ΩKm*, y los respectivos ensayos de complementación, han sugerido que cada uno de estos genes es esencial para la biosíntesis del alginato. Ensayos de "Primer extension" y "Slot blot" sugieren fuertemente que *alg8*, *alg44*, *algK* y *algJ* se transcriben desde un promotor diferente a *algD*, lo que indica que la organización transcripcional de este agrupamiento génico es diferente al reportado en *P. aeruginosa*. El análisis de la secuencia de aminoácidos, predicha para Alg8, ha indicado que se trata de una β-glicosil transferasa embebida en la membrana interna, cuya estructura secundaria muestra 4 α-helices transmembranales, con una horquilla (loop) citoplásmica en donde los sitios catalíticos llevan a cabo su función de polimerizar los residuos GDP-manurónicos. Alg44, por su parte, es una proteína de membrana interna con un solo segmento transmembranal; su región amino terminal, orientada al citoplasma, presenta un motivo de unión a GTP/ATP, lo que sugiere que puede formar una subunidad con Alg8, activando al polimanurónico para que sea transportado hacia el periplasma. AlgK presenta un péptido señal típico de la lipoproteína periplásmicas, con sitio de corte para la peptidasa señal tipo II. Se especula que el papel de AlgK sea el de ayudar a que otras proteínas, como la de el canal iónico AlgJ, para que sean translocadas a la membrana externa. Finalmente, un estudio de microscopía electrónica, sobre el enquistamiento de la cepa LA 21, ha indicado que dada la nula producción de alginato, la estructura del microquiste no se forma en estas células.

Ella ELO

VoBo.

Dra. E. Guadalupe Espín Ocampo (Tutor)

Tesis: "Caracterización del gen *algK* de *Azotobacter vinelandii*"

ABSTRACT

At present, the Molecular Biology of bacterial alginate biosynthesis pathway is being studied in both *Pseudomonas aeruginosa* and *Azotobacter vinelandii*. In *P. aeruginosa* these studies obey to health reasons, alginate production is a virulence factor when *P. aeruginosa* invades the lungs of cystic fibrosis patients. In *A. vinelandii* the studies are focus to produce the polysaccharide for human consume. In this work, we characterized *A. vinelandii* LA21 a non-mucoid, non encysting mutant isolated after random Tn5 mutagenesis of mucoid strain ATCC 9046. The *alg::Tn5* mutation interrupted the *algK* gene, which is essential for alginate biosynthesis. *algK* is located inside the structural alginate gene cluster. We also cloned and sequenced *alg8*, *alg44*, *algK* and part of *algJ*, and constructed *alg8:: Ω Km*, *alg44:: Ω Km*, and *algK:: Ω Km* mutants. Complementation analysis indicated that each gene is essential for alginate biosynthesis. Primer extension and Slot blot experiments, indicated that *alg8*, *alg44*, *algK* and *algJ* constitute an operon transcribed from a promoter different to *PalgD*. The aminoacid sequence analysis of Alg8 strongly suggested that this protein is a β -glycosyl transferase located in the inner membrane. Its secondary structure shows that spans the cytoplasmic membrane four times, and has a large cytoplasmic loop, which contain three catalytic sites, where the polymerization of GDP-mannuronic residues is likely to occur. On the other hand, Alg44 is an inner membrane protein, which spans the membrane once. Its amino-terminal region is oriented to the cytoplasm and contain a GTP/ATP motif. It is proposed that Alg44 is a subunit of Alg8 needed to translocate the polymannuronic chain to the periplasm. The AlgK aminoacid sequence shows a signal peptide typical of gram-negative periplasmic lipoproteins, with a cutting site for the Signal peptidase type II. We propose that AlgK helps to incorporate AlgJ in outer membrane. Finally, an electron microscopy study showed that the microcyst structure in LA 21 cells is not formed, due to a lack of alginate.

Edda Yre FFO

VoBo.

Dra. E. Guadalupe Espín Ocampo (Tutor)

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE LA DRA. E. GUADALUPE ESPIN-OCAMPO (TUTOR), DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR, DENTRO DE LAS INSTALACIONES DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA.

EL COMITE TUTORAL QUE ASESORO EL PROYECTO ESTUVO INTEGRADO POR:

DRA. ELDA GUADALUPE ESPIN OCAMPO

**DR. ALEJANDRO ALAGON CANO
DR. FERNANDO VALLE BAHEZA**



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**PROYECTO ACADEMICO DE
ESPECIALIZACION, MAESTRIA Y DOCTORADO
EN BIOTECNOLOGIA**

M. en B. Claudio Humberto Mejía Ruiz.
P r e s e n t e.


Por este conducto me permito informarle que la Comisión Académica acordó asignarle el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Doctor en Biotecnología.

Presidente	Dr. Edmundo Calva Mercado
Secretario	Dra. Elda Guadalupe Espin Ocampo
Vocal	Dr. Mario Soberón Chávez
Vocal	Dra. Alicia González Manjarres
Vocal	Dr. Edgardo Escamilla Marban
Suplente	Dr. José Luis Puente García
Suplente	Dr. Enrique Merino Pérez

Sin mas por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor. a 29 de mayo 1997


Dr. Alejandro Alagón Cano
Coordinador de Docencia



AGRADECIMIENTOS.-

A mi esposa Claudia, por su amor y por estar siempre conmigo.

A mis hijos, por darme la oportunidad de ser Padre.

A mis Padres por su cariño, aliento y oraciones.

A mis compañeros de laboratorio, por permitirme compartir los éxitos y fracasos (...a mis amigos les adeudo los enfados...).

A los demás compañeros del IBt quienes conocieron mi trayectoria y me apoyaron.

A ti Lupita por la dedicación que me brindaste y por la paciencia que has mostrado ante mis limitaciones.

A todos mis maestros investigadores, quienes me ayudaron a formarme para servir mejor a mi país.

A Pedro Saucedo, Eduardo Juárez y Maricela Izquierdo por su amistad y trabajo.

Especialmente a la Biol. Soledad Moreno León y a la M. en C. Josefina Guzmán Aparicio, por su apoyo técnico en la realización de este proyecto.

A María, Madre de Dios.

A todos ¡GRACIAS!

...haced que todas las cosas vayan a Dios.

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ANGLISISMOS:

Primer extension:

Slot blot:

Polylinker:

Cluster:

Loop:

Turn:

PHB:

IHF:

ATP:

GTP:

HCA:

RBS:

GRAS:

FAL:

RI:

Kb:

pb:

ΔG:

h:

°C:

kDa

M

μ

Extensión de la transcripción.

Hibridación RNA-DNA en Rendija.

Sitio de clonación múltiple.

Agrupamiento de genes.

Rizo (segmento de una proteína).

Vuelta (torción de la estructura secundaria).

Polihidroxibutirato.

Factor de Integración al Hospedero.

Adenosin-trifosfato.

Guanin-trifosfato.

Análisis de Cluster Hidrofóbico.

Sitio de Unión a Ribosoma.

Generalmente Reconocido Como Seguro.

Fase Abierta de Lectura (ORF).

Repetidas Inversas o palíndromo.

Kilo base: mil pares de bases.

Pares de bases.

Energía libre de un enlace químico.

Hora.

Grados centígrados o Celsius.

Kilo daltones.

Mol.

micras (micrómetros).

INDICE:

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
GENERALIDADES	4
<i>Biosíntesis de Alginato en Bacterias</i>	
<i>Función Biológica del Alginato en Bacterias</i>	
<i>Genética de la Biosíntesis de Alginato en Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Genética de la Biosíntesis de Alginato en Azotobacter vinelandii</i>	
<i>Particularidades de la Genética de A. vinelandii</i>	
ANTECEDENTES	20
IUSTIFICACION	20
OBJETIVOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
<i>Cepas y Plásmidos</i>	
<i>Medios de Cultivo</i>	
<i>Manipulación de DNA: Subclonaciones de regiones silvestres y mutadas</i>	
<i>Transformaciones</i>	
<i>Hibridación Southern, Slot Blot y Primer extension.</i>	
<i>Análisis de complementación</i>	
<i>Secuenciación</i>	
<i>Análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes identificados.</i>	
<i>Construcción de mutantes alg8, alg44 y algK.</i>	
<i>Estudio microscópico de la mutante LA 21.</i>	
RESULTADOS	30
<i>Caracterización y subclonación de la región interrumpida por el transposón Tn5::mob en el genoma de la cepa LA 21.</i>	
<i>Subclonaciones, Secuenciación y Mapa de restricción de la región 3' de algD.</i>	
<i>Análisis de la Secuencia: Identificación de los genes alg8, alg44, algK y algJ</i>	
<i>Caracterización de las cepas JG8 y JG44 (alg8::Km y alg44::Km).</i>	
<i>Construcción y caracterización de la cepa JG21 (algK::Km).</i>	
<i>Organización Transcripcional del operón alg8-44-K-J:</i>	
<i>Predicciones de Estructuras Secundarias y Modelos Topológicos.</i>	
<i>Estudio microscópico del enquistamiento en LA 21.</i>	
DISCUSION	39
PERSPECTIVAS	41
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFIA	43
APENDICE I	51

RESUMEN.-

Los pasos moleculares de la vía biosintética del alginato producido por bacterias están siendo estudiados en *Pseudomonas aeruginosa* y *Azotobacter vinelandii*. En *P. aeruginosa* tales estudios obedecen a razones clínicas, debido a que el alginato en ellas, es un factor virulento de su estado patogénico en los pacientes con fibrosis quística. En *A. vinelandii*, su estudio está encaminado a la obtención del polímero para consumo humano. Partiendo de la cepa mucoide constitutiva de *A. vinelandii* ATCC 9046, hemos obtenido, por mutagénesis al azar con el transposón Tn5 la cepa LA 21 incapaz de producir alginato e incapaz de enquistarse. La mutación *alg::Tn5* ha interrumpido el gen *algK*, el cual es esencial para la biosíntesis del alginato. *algK* se encuentra dentro de una región de genes estructurales *alg*, de los cuales también han sido clonados y secuenciados *alg8*, *alg44* y parte de *algJ*. La construcción de las mutantes no polares *alg8::ΩKm*, *alg44::ΩKm* y *algK::ΩKm*, y los respectivos ensayos de complementación, han sugerido que cada uno de estos genes es esencial para la biosíntesis del alginato. Ensayos de "Primer extension" y "Slot blot" sugieren fuertemente que *alg8*, *alg44*, *algK* y *algJ* se transcriben desde un promotor diferente a *algD*, lo que indica que la organización transcripcional de este agrupamiento génico es diferente al reportado en *P. aeruginosa*. El análisis de la secuencia de aminoácidos, predicha para Alg8, ha indicado que se trata de una β-glicosil transferasa embebida en la membrana interna, cuya estructura secundaria muestra 4 α-helices transmembranales, con una horquilla (loop) citoplásmica en donde los sitios catalíticos llevan a cabo su función de polimerizar los residuos GDP-manurónicos. Alg44, por su parte, es una proteína de membrana interna con un solo segmento transmembranal; su región amino terminal, orientada al citoplasma, presenta un motivo de unión a GTP/ATP, lo que sugiere que puede formar una subunidad con Alg8, activando al polimanurónico para que sea transportado hacia el periplasma. AlgK presenta un péptido señal típico de la lipoproteínas periplásmicas, con sitio de corte para la peptidasa señal tipo II. Se especula que el papel de AlgK sea el de ayudar a que otras proteínas, como la de el canal iónico AlgJ, para que sean translocadas a la membrana externa. Finalmente, un estudio de microscopía electrónica, sobre el enquistamiento de la cepa LA 21, ha indicado que dada la nula producción de alginato, la estructura del microquiste no se forma en estas células.

INTRODUCCION.-

El alginato esta clasificado como un polisacárido lineal no ramificado, conformado por unidades de ácido D- α -Manurónico y su C-5 epímero el ácido L- β -Gulurónico. Unidos por enlaces β -(1-4), los residuos manurónicos (M) y los residuos gulurónicos (G) forman cadenas de secuencias alternas G-M (Tabla 1; Larsen and Haug, 1971). El alginato es el tercer polisacárido con mayor demanda en la industria. Su consumo alcanza anualmente cerca de 33 millones de toneladas, con un precio en el mercado que oscila entre los 5 y 12 dólares por kg (Valla, 1992). Actualmente, el alginato para consumo industrial se obtiene a partir de algas marinas cafes (Phaeophitas), principalmente de los géneros *Macrocystis*, *Sargasum*, *Fucus* y *Ascophylum*. La industria alimenticia, por ejemplo, lo utiliza como estabilizante, espesante y viscosificante. La propiedad del alginato de formar geles termoirreversibles, es utilizada para inmovilizar enzimas o células en procesos fermentativos (Smidsrød and Skjåk-Bræk, 1991). Aunque los alginatos comerciales se obtienen de macroalgas marinas, existen algunas especies bacterianas que también lo producen como un polisacárido extracelular, que hace las veces de cápsula (Pindar and Bucke, 1975; Pugashetti *et al.*, 1983). La más apropiada de las especies bacterianas para obtener alginatos con fines de consumo humano, es *Azotobacter vinelandii* (Brivonese and Sutherland, 1989; Pindar and Bucke, 1975; Larsen and Haug, 1971). No obstante, la genética molecular de la biosíntesis del alginato en esta especie apenas empieza a ser estudiada (Ertesvag *et al.*, 1995; Campos *et al.*, 1996; Lloret *et al.*, 1996). Como revisaremos en detalle otra de las especies productoras de alginato es *Pseudomonas aeruginosa*, cuyo estado patogénico-mucoide se ha estudiado bastante a nivel molecular (Darzins and Chakrabarty, 1984; May, *et al.*, 1991; Chakrabarty, 1991), habiendo sido utilizado inicialmente como modelo de genética molecular en el estudio de la biosíntesis del alginato en *A. vinelandii*.

Recientemente se han intensificado los estudios, genéticos y fisiológicos, de la vía biosintética del alginato producido por estas bacterias (Chakrabarty 1994; Campos *et al.*, 1996). En el caso de, *A. vinelandii*, aunque no ha sido clasificado como un microorganismo GRAS (de las siglas en ingles: *General Recognition As Secure*), no se le ha relacionado con ningún padecimiento humano, a diferencia de *P. aeruginosa*. Por ende, se plantea que *A. vinelandii* es un organismo apropiado para obtener este polímero por métodos fermentativos, con fines de consumo humano, y como la mejor alternativa para sustituir al obtenido de algas.

En los últimos años, nuestro grupo de trabajo se ha encaminado a la identificación de los mecanismos moleculares de la biosíntesis del alginato que tienen lugar en *A. vinelandii*, así como los procesos bioquímicos y genéticos con los que la producción del polisacárido está estrechamente relacionado. El presente trabajo aporta evidencias sobre la presencia de los genes estructurales *alg8*, *alg44*, *algK* y *algJ* de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*, localizados en el mismo grupo de genes biosintéticos y donde *algD* encabeza el grupo (Campos *et al.*, 1996). Por razones de estudio, este grupo que contiene al menos 10 genes, lo he dividido en dos regiones: la primera parte le llamaré Región I (que comprende los genes descritos aquí y van desde *algD* hasta *algJ*) y la segunda región se mencionará como Región II (no descritos en este trabajo). Además, se presentan evidencias de que la Región I contiene una tercera unidad transcripcional dentro de esta agrupación, diferente a las dos anteriormente descritas (*palgD* y *palgLA*; Campos *et al.*, 1996; Lloret *et al.*, 1996, respectivamente), con un ordenamiento estructural similar al del operón de genes *algD-algA* en *P. aeruginosa* (Darzins and Chakrabarty, 1984; Deretic *et al.*, 1987; Chitnis and Ohman, 1993). Específicamente se presenta la caracterización definitiva de la mutación Tn5::*alg* en la cepa LA 21, la secuencia nucleotídica de la Región I abajo del gen *algD*, su estudio transcripcional, el análisis de complementación de las mutantes construidas, el análisis computacional de las secuencias deducidas de aminoácidos para cada uno de las Fases Abiertas de Lectura (FAL) (del inglés "Open Reading frame" u "ORF") y el diseño de un modelo topológico para una de las proteínas codificadas por el primer FAL de esta región.

GENERALIDADES.-

Biosíntesis del Alginato en Bacterias.-

En 1975, Pindar y Bucke describieron los pasos biosintéticos del alginato en una cepa de *A. vinelandii*. Estos investigadores encontraron que las enzimas que participan en la biosíntesis son bastante similares a las reportadas en el alga marina *Fucus gardneri*. No obstante, el sustrato inicial de la biosíntesis de alginato en algas es D-manosa, mientras que en *A. vinelandii* es D-fructosa. La mayor parte del alginato que producen los cultivos en matraz de *A. vinelandii* se sintetizan al final de la fase exponencial (Sutherland, 1985). Cuando la única fuente de carbono en el medio de cultivo es sacarosa (figura 1), una invertasa (EC 3.2.1.26) produce D-glucosa y D-fructosa. La glucosa sigue la vía Entner-Doudoroff, en donde dos triosas son condensadas para formar fructosa 1-6 bifosfato y entonces la hexosa difosfatasa genera fructosa 6-P (Anderson *et al.*, 1987). Posteriormente, la fructoquinasa (EC 2.7.1.4) fosforila, a la D-fructosa para formar fructosa-6-P, que sirve como sustrato para que la fosfomanosa isomerasa (PMI; EC 5.3.1.8) genere manosa-6-P y la fosfomanomutasa (PMM; EC 5.4.2.8), mueva el grupo fosfato al carbono 1, originando manosa-1-P, la cual es activada por la enzima GDP-manosa pirofosforilasa con el difosfo nucleótido GDP (GMP; EC 2.7.7.13) produciendo GDP-manosa. La enzima GDP-manosa deshidrogenasa (GMD; EC 1.1.1.132), dependiente de NAD⁺, se encarga de llevar a cabo una doble oxidación, formando 2NADH+H⁺, mientras que el sustrato GDP-manurónico es polimerizado a nivel de la membrana citoplásmica, formando la cadena de ácido polimanurónico (poli-M) (Pindar and Bucke, 1975; Pace and Righelato, 1980). En este proceso, algunos residuos manurónicos sufren acetilación por una acetiltransferasa (acetilasa) periplásmica y luego el polímero es exportado de la célula (Skjåk-Bræk, *et al.*, 1985; Horan, *et al.*, 1983). Una vez fuera de la célula, algunos residuos manurónicos no acetilados del poli-M, son convertidos a su C-5 epímero, el L-β-ácido gularónico por la Polimanurónico C-5 epimerasa extracelular, produciendo así el alginato (Haug and Larsen, 1971; Skjåk-Bræk and Larsen, 1985). No hay evidencia de la existencia en bacterias de ácidos gularónicos activados (GDP-gularónicos), que pudieran ser incorporados a la cadena naciente o al poli-M formado (Pugashetii, *et al.*, 1983).

Las actividades GMD-polimerasa se localizaron a nivel de membrana interna, mientras que la actividad acetilasa se localizó a nivel del espacio periplásmico (Pindar and Bucke 1975; Skjåk-Bræk, *et al.*, 1985). Por su parte, las

enzimas de los pasos iniciales PMI, PMM y GMP, únicamente se han detectado en el citoplasma (Pindar and Bucke, 1975; Pace and Righelato, 1980). Cabe mencionar que cuando *A. vinelandii* utiliza D-glucosa como única fuente de carbono, el alginato se forma a partir de los productos de la degradación de la glucosa (gliceraldehído 3-P), lo cual se ha explicado que ocurre debido a que la enzima fosfoglucoasa isomerasa esta sujeta a inhibición competitiva por el 6-fosfogluconato, en la vía Entner-Doudoroff cuyas enzimas están activas en estas condiciones y cuando la célula sintetiza alginato (figura 1) (Anderson, *et al.*, 1986).

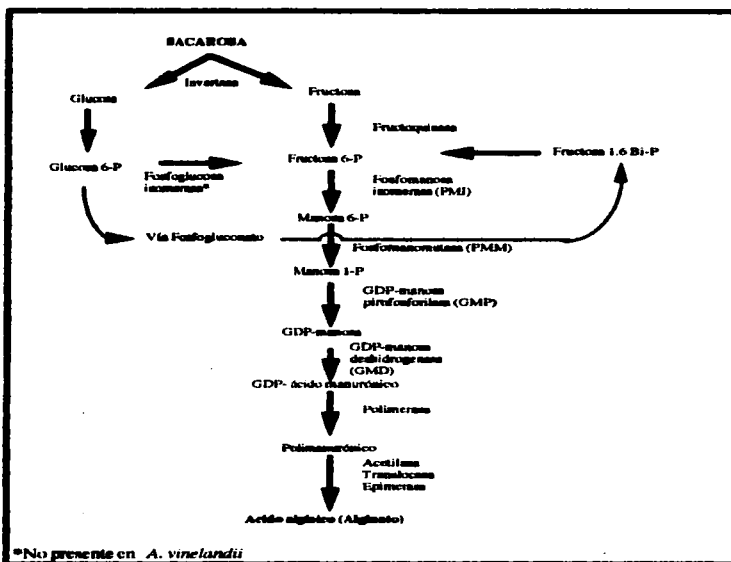


Figura 1.- Vía biosintética del alginato en bacterias. La enzima limitante de la biosíntesis es GDP-manosa deshidrogenasa (GMD) la cual cataliza la doble oxidación del difosfo nucleótido manosa para producir los monómeros activados que serán polimerizados y formarán la cadena polimanurónica precursora del alginato. *La enzima fosfoglucoasa isomerasa no está presente en *A. vinelandii*, por lo que la glucosa 6-P sigue la vía del fosfogluconato.

lipopolisacáridos (Annison and Couperwhite, 1986; Sadoff, 1975; Page and Sadoff, 1975). El proceso de enquistamiento, ha sido bastante estudiado por varios investigadores desde hace mas de 20 años (Sadoff, 1975; Page and Sadoff, 1975; Page and Sadoff, 1976). Semejante a la esporulación en *Bacillus subtilis*, el enquistamiento de *A. vinelandii* es un fenómeno morfológico de diferenciación celular, en la cual la célula modifica su estructura para resistir a condiciones adversas como la desecación (Atkinson and Fisher, 1991). En la actualidad, el proceso de esporulación de *B. subtilis* se ha estudiado bastante a nivel molecular (Stragier, 1991), mientras que el estudio del enquistamiento en *A. vinelandii*, solo alcanza niveles bioquímicos y fisiológicos (Sadoff, 1975, Ruppen *et al.*, 1983). En nuestro laboratorio, alternativamente al estudio del alginato, hemos generado algunas cepas mutantes en la vía del alginato que presentan fenotipos con defectos en el enquistamiento, la participación específica de los productos génicos en este proceso está siendo caracterizada.

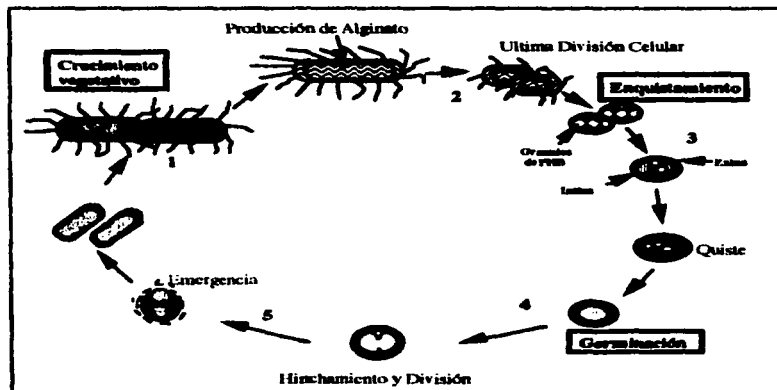


Figura 2.- Ciclo de Vida de *Azotobacter vinelandii*. 1 fase de crecimiento vegetativo; 2 Última división vegetativa y engrosamiento de la capsula (asociación del alginato a iones divalentes como el Ca^{2+}). 3 Formación de la extina y la intina y aparición del quiste maduro. 4 Proceso de germinación, degradación del PEIB y síntesis de DNA. 5 Emergencia de dos células vegetativas a partir de cada quiste.

Aparte de la producción de alginatos y su peculiar facultad de fijar nitrógeno mediante tres nitrogenasas diferentes, *A. vinelandii* acumula poli- β -hidroxibutirato (PHB), como polímero de reserva (Kennedy and Toukdarian, 1987; Sadoff, 1975; Sutherland, 1990), produce además, sideróforos y puede sintetizar hormonas de crecimiento de plantas, como giberelinas, citocininas y auxinas (Gonzalez-López, *et al.*, 1986). La producción de PHB en *A. vinelandii* está íntimamente relacionada con la síntesis del EPS, debido a que ambos polímeros participan activamente en el proceso de enquistamiento (Wyss, *et al.*, 1961). Se ha visto que la acumulación de PHB inicia al final de la fase exponencial, un poco después de que la producción del alginato empieza (Brivonese and Sutherland, 1989). Ambos dependen de las concentraciones de oxígeno: el primero se acumula en condiciones de limitación de oxígeno, mientras que el alginato aumenta su producción cuando el oxígeno está en su máximo nivel, sugiriendo que existe un fino balance redox entre los dos polímeros (Brivonese and Sutherland, 1989). Se ha visto también, que la depolimerización del PHB está vinculado al proceso de germinación, mismo que da origen a las células vegetativas una vez que las capas exina e intina del microquiste se han permeabilizado (Wyss, *et al.*, 1961; Sadoff, 1975).

Como ya se mencionó, otra de las especies bacterianas que producen alginato es *P. aeruginosa* (May, *et al.*, 1991; Pugashetti, *et al.*, 1983). El alginato producido en esta especie, a diferencia del generado por *A. vinelandii*, no presenta bloques M o G, sólo forma diadas de tales residuos y el polímero que produce siempre es en forma alternada (ver Tabla 1). En forma similar a *A. vinelandii*, esta bacteria presenta esencialmente los mismos pasos biosintéticos y participan las mismas enzimas (Pugashetti, *et al.*, 1983; Fialho, *et al.*, 1990). Sin embargo, su fenotipo mucoso solo se presenta en los aislados de pulmón de pacientes crónicos con fibrosis quística, donde las condiciones del pulmón enfermo, favorecen la infección (Deretic, *et al.*, 1990). Esta diferencia, debe ser considerada como básica, sobre todo en el estudio de los mecanismos iniciales, que regulan la biosíntesis del alginato en cada una de éstas bacterias.

Genética de la Biosíntesis del Alginato en Pseudomonas aeruginosa.

Los genes de la vía biosintética del alginato en *P. aeruginosa*, han sido casi totalmente identificados, y prácticamente caracterizados (Pugashetti, *et al.*, 1983) (figura 3). Los productos de los genes *algA* y *algC* (PMI-GMP y PMM, respectivamente), que catalizan los tres primeros pasos de la biosíntesis de

alginato, están también incluidos en el metabolismo general de los carbohidratos y por ello pueden encontrarse en muchas bacterias. Sin embargo, la enzima que cataliza el cuarto paso, GMD, se considera específica para la biosíntesis del alginato tanto en algas como en las bacterias productoras de alginato (Fialho, *et al.*, 1990; Deretic, *et al.*, 1987).

Genes Biosintéticos. A la fecha, se han clonado los principales genes que participan en la biosíntesis del alginato y la mayoría de sus productos génicos ya han sido caracterizados (Darzins and Chakrabarty, 1984; Deretic, *et al.*, 1990; Franklin and Ohman, 1993; Zielinski, *et al.*, 1991). Un grupo de genes biosintéticos, localizados en el minuto 34 del mapa genómico de *P. aeruginosa*, funciona a manera de operón (Chitnis and Ohman, 1993) (figura 3). En este grupo de genes, concentrados en 18.5 kb, se han identificado a la fecha 11 genes biosintéticos: *algD*, *alg8*, *alg44*, *algE*, *algG*, *algX*, *algL*, *algI*, *algJ*, *algF*, y *algA*. de los cuales se ha descrito la secuencia nucleotídica de cada uno de ellos, y la función que realizan sus respectivos productos, con excepción de *algX*, *alg8*, y *alg44*.

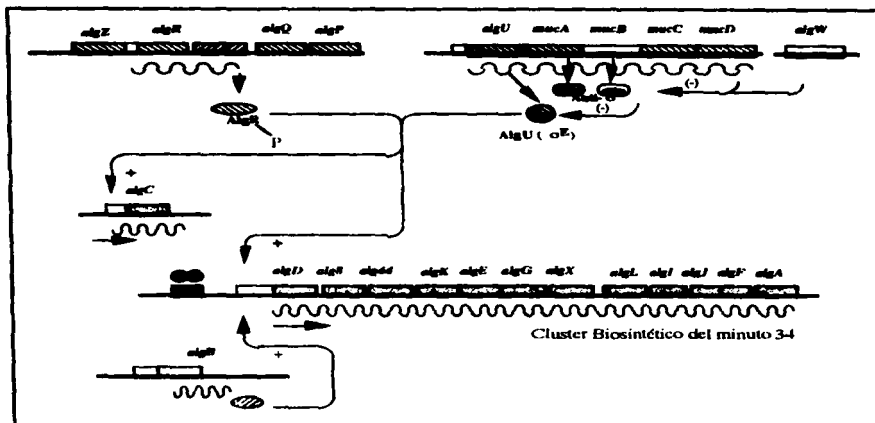


Figura 3.- Modelo de regulación genética de la biosíntesis de alginato en *Pseudomonas aeruginosa*. El gen *algD* es donde se inicia la transcripción (líneas curvas) de todo el operón biosintético. Genes biosintéticos: Genes Reguladores: Promotor: Sitio de unión a activadores transcripcionales:

Como se observa en la figura 3, el primer gen transcrito del operón biosintético es *algD*, el cual codifica para GMD, un polipéptido de 48 kDa. Según la secuencia nucleotídica del gen *algD* es el único gen de este grupo que presenta un promotor complejo (*palgD*). Aunque existen algunos otros genes del cluster con promotores homólogos, la activación de *palgD* promueve la expresión de todo el operón de genes *alg* (Deretic, *et al.*, 1987; Chitnis and Ohman, 1993). Elementos que funcionan en *cis* y en *trans* participan en la transcripción de *algD* junto con los demás genes *alg* del operón. Los sitios -40, -391 y -468 arriba del inicio de la transcripción, por ejemplo, se han identificado como sitios en los cuales se pega el activador transcripcional AlgR. Por otro lado, se han caracterizado sitios de unión de proteínas similares a las IHF (Histon-like Integration Host Factor) de *Escherichia coli* que aunque no se ha identificado exactamente una IHF en *P. aeruginosa* se puede deducir que ésta existe y que su participación es esencial (Wozniak, 1994). Actualmente se sabe que también esta presente un promotor que responde al factor σ^E , el cual es codificado por el gen *algU*, primero de un grupo de genes reguladores que analizaremos mas adelante (Martin *et al* 1993).

Analizando el operón biosintético de *P. aeruginosa*, los siguientes dos genes son *alg8* y *alg44*. Mutaciones en cada uno de ellos, manifiestan fenotipos no mucoides (Wang, *et al.*, 1987). Las secuencias de ambos genes han sido publicadas; *alg8*, por su parte, predice un polipéptido de 56.8 kDa, mientras que *alg44* uno de 34.3 kDa. Los autores proponen que sus productos génicos participan en la polimerización del alginato, y que al menos Alg8, tiene una alta probabilidad de ser encontrado en la membrana citoplásmica, aunque no se ha concluido su caracterización (Maharaj, *et al.*, 1993). Recientemente, Saxena y col., (1995) presentaron un análisis de regiones hidrofóbicas (no-transmembranales) por HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) de proteínas sin aparente homología lineal, e incluyen el producto de *alg8* como miembro de una familia de glicosil transferasa β -1,4 del tipo procesiva (polimeriza mas de un monómero a la vez), junto con NodC de *Azorhizobium caulinodans*. No obstante, Alg44 a la fecha no se le ha encontrado similaridad significativa.

El siguiente gen del operón es *algE*. La secuencia de este gen, también ha sido reportada y su proteína madura ha sido caracterizada, estimándose su peso molecular en 54.0 kDa (Chu, *et al.*, 1991; Rehm *et al.*, 1994). El análisis preliminar del amino-terminal, mostró que contiene un péptido señal y una región hidrofóbica, típica de las proteínas con localización en la membrana externa, localización que posteriormente fue demostrada utilizando anticuerpos específicos. Concluyendo que AlgE se asemejaba a las porinas y que podría participar en la exportación del alginato (May, *et al.*, 1991). Recientemente, Rehm y col., (1994) sobreexpresaron en *E. coli*, una proteína AlgE recombinante, que fue incorporada espontáneamente en bicapas lipídicas planares, formándose canales iónicos con una conductancia de 0.76 nS en presencia de 1M de KCl, determinándose una Km de 0.75 M. Estos datos sugirieron que AlgE, forma un canal iónico por el que pueden pasar aniones del tipo polimanurónico.

El quinto gen caracterizado del operón biosintético, es *algG*, el cual codifica para una proteína cuya función es epimerizar el carbono 5 de algunos de los residuos manurónicos no acetilados del poli-M (Chitnis and Ohman, 1990). Franklin y col. (1994), lograron caracterizar AlgG. En su trabajo, purificaron dos proteínas al tratar de sobreexpresar *algG*, una de 60 kDa y otra más de 55 kDa. Al caracterizar ambas proteínas, concluyeron que la primera es precursora de la segunda, y que esta última se localiza a nivel de periplasma, siendo la responsable de convertir a nivel de poli-M, algunos residuos manurónicos no acetilados, en su C-5 epímero el ácido β -gulurónico, la última modificación que sufre la cadena antes de ser exportada como alginato (Boyd and Chakrabarty,

1995). Aunque, en *P. aeruginosa* la epimerasa es periplásmica (Franklin *et al.*, 1994), en *A. vinelandii*, existe una familia de estas enzimas con actividad extracelular (Ertesvåg *et al.*, 1994), y otra homóloga a la epimerasa periplásmica de *P. aeruginosa* (Rehm *et al.*, 1996).

Inmediatamente después del extremo 3' de *algG*, se encuentra el gen *algX*, inicialmente identificado como *alg60* por medio de una mutación que confirió un fenotipo no mucoide a la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* (Wang, *et al.*, 1987; May, *et al.*, 1991). En ese entonces los intentos por sobreexpresar *alg60* fueron inconclusos. Sin embargo, recientemente Monday y Schiller (1996) publicaron la caracterización de una mutación unos cientos de bases arriba de *algL* o sea afectando a *algX*. El fenotipo mucoide en la mutante *algX* solo se restableció cuando ambos genes fueron alineados en *trans*, indicando que ambos son esenciales para la biosíntesis del alginato (figura 3). No obstante, el producto de *algX*, una proteína de aproximadamente 53 kDa, permanece a ser caracterizada debido a que su función bioquímica aún se desconoce (Monday and Schiller, 1996).

Como se indicó en el párrafo anterior, el siguiente gen *algL* ya ha sido caracterizado. En 1993, aparecieron una serie de publicaciones sobre este gen y su producto, una alginato liasa o alginasa (E.C. 4.2.2.3), debido muy probablemente, al interés clínico del estudio del alginato en *P. aeruginosa*, ya que la actividad de esta enzima, aislada de diferentes especies bacterianas, contrarresta los padecimientos de los enfermos crónicos de fibrosis quística (Boyd, *et al.*, 1993; Murata *et al.*, 1993; Gacesa and Goldberg, 1993). Por su parte, Schiller y col. (1993), al clonar *algL* sobreprodujeron una proteína de 39 kDa, con probable localización periplásmica. Ellos encontraron, que en cepas mucoides de *P. aeruginosa*, la expresión de *algL* era regulada por la proteína AlgB, lo cual puede significar, que aunque el alginato se produce por la actividad de las enzimas codificadas en los genes del operón biosintético, la expresión de *algL* desde su propio promotor, no impide la formación del polímero, antes bien, favorece sus características, al regular su longitud mediante la β -eliminación de los enlaces 4-O-glicosídicos de la cadena de alginato. Además, los estudios de complementación en *trans*, demostraron que tanto *algL*, como el gen que le precede *algX*, son esenciales para el fenotipo mucoide en *P. aeruginosa* (Monday and Schiller 1996).

Recientemente se clonaron y caracterizaron dos genes cuyos productos participan en la acetilación del polimanurónico dentro del grupo de genes biosintéticos del operón en cuestión (Franklin and Ohman 1996). Los productos de *algI* y *algJ* junto con *algF*, el cual anteriormente se había demostrado que codificaba para una acetiltransferasa, no son genes esenciales para la biosíntesis del alginato en *P. aeruginosa*. Cada uno de los genes ha sido mutagenizado afectando polarmente a *algA* último gen del agrupamiento biosintético. Sin embargo, cuando se transfiere a *algA* en *trans* con un promotor fuerte la producción de alginato se restablece, tanto con residuos manurónicos como gularónicos, pero no con radicales acetilados. El producto de *algF* por su parte, genera un polipéptido de 24.5 kDa el cual es procesado para rendir una proteína de 19.5 kDa (Shinabarger, *et al.*, 1993; Franklin y Ohman, 1993). Los productos de *algI* y *algJ* son proteínas de 58.7 kDa y 43.1 kDa respectivamente, mucho mayores que *AlgF*. La proteína *AlgI* es homóloga (21% de identidad) a *DltB* (No. de Acc. X73124) de *B. subtilis*, la cual participa en el transporte de la D-alanina. Por su parte, *AlgJ* es homóloga (30% idéntica) a *AlgX*, cuyo gen codificador se localiza en este mismo grupo biosintético. Ambas enzimas esperan ser caracterizadas (Franklin and Ohman 1996 y Monday and Schiller 1996).

Finalmente, la enzima que participa en el primero y tercer paso de la vía biosintética del alginato, es codificada por el último gen del operón, *algA*. *AlgA* es una proteína de 53 kDa, que tiene una doble función; primero cataliza la formación de manosa 6-P a partir de fructosa 6-P, y después activa la manosa 1-P para producir GDP-manosa y PPI. Ambas actividades fueron confirmadas en un cepa mutante de *E. coli*, *manA*, después de sobreexpresar la proteína, bajo el promotor *Tac*, y purificarla (Darzins, and Chakrabarty 1985; May, *et al.*, 1991; Gill *et al.*, 1986).

De los genes biosintéticos, como se puede observar en la figura 3, el único que esta fuera del operón es *algC*. Se ha visto que su producto *AlgC* (PMM), un polipéptido de 51 kDa, también participa en otras funciones metabólicas, como en la síntesis de lipopolisacáridos. Por tal motivo, la proteína *AlgC*, esta presente en cepas mucoides y no-mucoides de *P. aeruginosa*, de aquí que parezca lógica la exclusión de *algC* del grupo biosintético, y por lo mismo, una mutante *algC* no es complementada por ningún gen del agrupamiento del minuto 34, ni del minuto 9 (Goldberg, *et al.*, 1993; Zielinski, *et al.*, 1992). Su promotor es complejo, similar a los de *algD*, *algR* y *algE*, tiene una larga región-5' líder no traducida de 244 pb importante para la transcripción eficiente del RNAm de *algC* (Fujiwara and Chakrabarty, 1994). La expresión de *algC* es inducida por osmolaridad y es

activada por AlgR (Zielinski, *et al.*, 1991; Zielinski, *et al.*, 1992). Independientemente de su participación en la biosíntesis de alginato, en el cual presenta el mayor pico de actividad enzimática semejante a las demás enzimas al final de la fase exponencial (Leitao and Sa-Correia, 1994), es un factor de virulencia al menos en la infección de ratones (Goldberg *et al.*, 1995).

Durante la escritura de la tesis, se publicó la caracterización del gen *algK* de *P. aeruginosa* (Aarons *et al.*, 1997). Este gen ubicado al extremo 3' de *alg44* codifica para una lipoproteína periplásmica de 53 kDa, anclada a la membrana externa mediante un enlace thiol que se forma en el residuo C-28 de AlgK una vez que la peptidasa señal tipo II corta entre los residuos G-27 y C-28. Su función no es muy clara pero los autores consideran que sirve como facilitador para traslocar el alginato a través del periplasma y canalizarlo al poro que forma AlgE.

Genes Reguladores. Existen otros dos grupos de genes *alg*, los cuales son de naturaleza reguladora. El grupo *algRQP* (también llamados *algR1*, *algR2* y *algR3* respectivamente), localizado en el minuto 9 del mapa genómico de *P. aeruginosa* y el grupo *algU-mucA-mucB-mucC-mucD*, ubicado en el minuto 69 (Figura 3). Y un gen regulador aislado *algB*, que se encuentra cercano al grupo *algRQP*. Además, últimamente se han identificado cuatro genes más *algW*, *algZ*, *algH* y *ndk* que juegan un papel regulador sobre la biosíntesis del alginato en esta bacteria. Como veremos a continuación los productos de al menos 6 de estos genes, participan activamente en la formación del fenotipo mucoso, típico de la patogenicidad de *P. aeruginosa* (May *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1993a).

Se ha observado que la biosíntesis del alginato está estrictamente controlada en *P. aeruginosa* (figura 3). Al parecer, los genes que poseen promotores como *algD* (el cual se toma como modelo), son activados sincrónicamente por los productos de varios genes reguladores. Uno de estos productos es AlgR, el cual es un regulador de respuesta de la superfamilia del sistema de dos componentes (Deretic, *et al.*, 1989). La secuencia nucleotídica de *algR*, comparte una alta similitud con la de otros genes reguladores de respuesta como *ompR*, *nitC* y *spo0A*, entre otros (Deretic, *et al.*, 1989). Hay evidencias que indican que *algR* se autorregula, sin embargo, la participación que tiene su producto es mucho más complicado (Mohr, *et al.*, 1990). Se ha visto, que los niveles de AlgR solo bajan al 50% en una cepa no mucosa, a diferencia de una cepa mucosa (Deretic and Konyecsni 1989). No obstante, en cepas mucosas AlgR fosforilado (AlgR-P) se

pega a tres sitios diferentes de *palgD*, conocidos como RB1, RB2 y RB3. Los primeros dos sitios de pegado, son secuencias palindrómicas, inusualmente lejanas al punto de inicio de la transcripción (-533 a -332), mientras que la secuencia del tercero el sitio RB3, muestra dos mismatches a diferencia de los otros dos y se presenta en posición invertida cercana al sitio de inicio de la transcripción (-50 a -30) (Mohr, *et al.*, 1992). Al parecer, al pegarse las proteínas AlgR-P a cada uno de los tres sitios RB, interactúan entre sí, activando de esta forma la expresión de *algD*. Una activación semejante, se ha descrito en otros promotores como los de *glnA* y *nif*, miembros de la familia regulada por NtrC (Mohr, *et al.*, 1990). La activación de *palgD* responde a la fuente de nitrógeno o a la osmolaridad para manifestar el fenotipo mucoide (Mohr *et al.*, 1990; Mohr *et al.*, 1991; Schurr *et al.*, 1993).

Por su parte, el producto de *algP*, presenta homología con proteínas similares a las histonas (Deretic and Konyecsni, 1990), y hay evidencia de que participa en el doblamiento ("folding") de *palgD*, para activar la transcripción de este gen, y por consecuencia la de todo el operón biosintético del minuto 34 (Konyecsni and Deretic, 1991).

algQ el cual se localiza hacia arriba de *algP*, codifica para un polipéptido de 18 kDa producido constitutivamente (figura 3). AlgQ es una cinasa que inicialmente se pensó era la responsable de fosforilar a AlgR. Sin embargo, se ha demostrado que esto no sucede. Además, recientemente se encontró que AlgR también es fosforilado por moléculas de menor tamaño como el carbamoil fosfato o el acetil fosfato y una protein-cinasa similar a CheA la cual participa en la regulación de la quimiotaxis de *Salmonella typhimurium*. Al parecer, tanto AlgP como AlgQ participan en la activación de *palgD*. Se ha visto que AlgQ también regula los niveles de la Succinilcoenzima A sintetasa (Scs), una enzima del ciclo de ácidos tricarbóxicos, y de la Nucleósido difosfato kinasa (Ndk), enzima incluida en la síntesis de nucleosidos trifosfatos (Schlichtman *et al.* 1995). Scs y Ndk forman un complejo en *P. aeruginosa*. Una inserción en *algQ* fue capaz de sintetizar lentamente alginato tanto a 37°C como a 30°C. Esta observación fue útil para identificar otro gen llamado *algH* que al ser interrumpido en el fondo genético de una cepa *algQ* dejó de producir alginato bajo ambas condiciones de temperatura y no producir Ndk. La proteína AlgH por lo tanto, puede sustituir parcialmente a AlgQ a 37°C (Schlichtman *et al.*, 1995).

En dos artículos publicados en fechas recientes (Baynham and Wosniak 1996; Yu *et al.*, 1997), se describió el gen *algZ*, justo hacia arriba del extremo 5' del gen *algR*. Los investigadores sugieren que AlgZ es la contra-parte de AlgR, o sea, una fosfoquinasa que fosforila a AlgR para que este pueda unirse al promotor de *algD* e iniciar la transcripción del operón biosintético.

AlgB, otra proteína reguladora de 50 kDa, está involucrada en la modulación de la expresión de los niveles de alginato en la célula, y es miembro de la subclase de reguladores procarióticos como NtrC, los cuales también responden a estímulos ambientales al igual que AlgR (Goldberg and Ohman, 1987). Mutantes *algB* producen bajos niveles de alginato. *algB* se encuentra localizado en el minuto 19, relativamente cercano al grupo de genes reguladores *algRQP* (Deretic and Konyecsni, 1989; Deretic and Konyecsni, 1990; Mohr, *et al.*, 1991). Al parecer, AlgB participa en la activación de *algD*, aunque no se ha demostrado como sucede y como ya se mencionó sobre *algL* (Goldberg and Dahnke, 1992).

Otros cinco genes reguladores, están organizados en un segundo agrupamiento: *algU-mucA-mucB-mucC-mucD*. AlgU es una proteína de 27.5 kDa y se ha visto que guarda cierta similitud con el factor sigma H de *B. subtilis* (Martin *et al.*, 1993a) y σE de *E. coli* (Deretic, *et al.*, 1994). La proteína AlgU o σE actúa sobre *palgD* contribuyendo a la inducción de la transcripción del operón biosintético (Martin, *et al.*, 1993b; Martin, *et al.*, 1993c; Schurr, *et al.*, 1993) (figura 3). Los productos de *mucA* y *mucB* funcionan como factores antisigma al desactivar AlgU, ya que al originar mutantes *mucAB* producen un fenotipo mucoso constitutivo sobre la cepa no mucosa 8830. Este tipo de mutaciones, pueden ser encontradas en cepas aisladas de pacientes con fibrosis quística, o en cepas mucoides de *P. aeruginosa* obtenidas en laboratorios por inducción con antibióticos. Los genes *algU-mucA-mucB*, fueron identificados inicialmente como *algN-algS-algT*, respectivamente (Flynn and Ohman, 1988).

El gen *algW*, por su parte, está presente en una región cercana al agrupamiento génico que encabeza *algU*. *algW* fue aislado en base a su capacidad de suprimir la mucoidia y reducir la transcripción de *algD*. AlgW tiene homología con DegP (HtrA) una serina proteasa periplásmica que inactiva proteínas anormales de esta región y ayuda a resistir condiciones de stress oxidativo y de calor. Una mutación en *algW* produjo una cepa sensible a calor, a peróxido de hidrógeno y a paraquat, fenotipo similar a una mutación sobre *mucD*

excepto con paraquat, contra quien no mostró sensibilidad. Así AlgW y MucD, actúan sobre los reguladores de AlgU, o indirectamente, eliminando señales fisiológicas en un ambiente adverso (Boucher *et al.*, 1996).

Nota: En el transcurso de la escritura de esta tesis aparecieron dos trabajos en los cuales los autores asocian las actividades de las proteínas FumC y SodA (una fumarasa y una superóxido dismutasa respectivamente) junto con la proteína reguladora Fur, todas dependientes de hierro, con los niveles de alginato en *P. aeruginosa* (Hassett, *et al.*, 1997a; Hassett, *et al.*, 1997b).

Genética de la biosíntesis de alginato en Azotobacter vinelandii.

Los aspectos bioquímicos de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*, se encuentran bastante caracterizados desde hace más de 15 años, mientras que los mecanismos moleculares, empiezan a ser conocidos gracias a los trabajos realizados en nuestro laboratorio (Mejía-Ruiz, 1994; Campos-Torres, *et al.*, 1993) y a los de un grupo de investigadores noruegos (Erstevag *et al.*, 1996). A la fecha, se han identificado la mayoría de los genes descritos en *P. aeruginosa*, y su caracterización respectiva, se esta llevando a cabo (ver Antecedentes). Las preguntas formuladas por nuestro grupo, van encaminadas a entender los mecanismos genéticos que tienen lugar dentro de la célula, ya para controlar y sintetizar cada uno de los polímeros que produce; el alginato y el PHB, ya para determinar cual es su papel en el proceso de enquistamiento (Stevenson *et al.*, 1966). Sutherland (1992), sugirió que si se pretende obtener una cepa mutante hiperproductora de alginato el primer paso que habría que dar sería el de obtener una mutante PHB- de *A. vinelandii*. Esto, en teoría, facilitaría que la fuente de carbono se canalizara sólo a la producción del alginato. La corroboración de una hipótesis semejante, implica un estudio experimental de los pasos biosintéticos de ambos metabolitos, y el análisis estructural de los genes que codifican para tales enzimas.

Durante la década pasada uno de los obstáculos en el estudio de la genética molecular en *A. vinelandii* fue su característica poliploide (Nagpal, *et al.*, 1989; Maldonado, *et al.*, 1992; Manna and Das, 1993). Ahora, esta dificultad ha desaparecido por el uso de nuevas metodologías como la genética reversa y la obtención de mutantes con marcadores seleccionables como el transposón Tn5 y sus derivados (Mejía-Ruiz, 1994). Tales técnicas mutagénicas han propiciado la obtención de cepas mutantes altamente estables, propiedad interesante para fines fermentativos a gran escala (Kennedy and Toukdarian, 1987).

Particularidades Genéticas de A. vinelandii.

A. vinelandii es una especie aerobia estricta, no obstante, puede fijar nitrógeno atmosférico mediante tres diferentes sistemas de nitrogenasas, característica que la hace única entre las especies que realizan esta función, y por la cual se ha estudiado con especial interés a nivel molecular (Kennedy and Toukdarian, 1987). Las células de *A. vinelandii* poseen cierta variedad morfológica, un tamaño de 8 a 10 μ (una célula de *E. coli* mide solo 1.2 μ), pudiéndose presentar individualmente o en diadas, con formas irregulares, baciliformes o esféricas (Weiss, 1975). Bajo el microscopio electrónico las células vegetativas de *A. vinelandii*, son alargadas y con un conspicuo nucleosoma. Se observa también, una membrana interna definida, el periplasma y la membrana externa, en la cual se forman invaginaciones o vejigas que funcionan como núcleos de nitrogenasas (Page, 1980).

Dentro de sus particularidades genéticas, podemos decir que la poliploidía de *A. vinelandii* hace referencia a sus dimensiones (Maldonado *et al.*, 1992; Nagpal *et al.*, 1993), ya que dentro del quiste, cuyo tamaño es de alrededor de 1-2 μ , se ha determinado que existe sólo una cuarta parte del total de copias del genoma (10 copias). Aunque existen pocos datos sobre su sistema de replicación, se podría comparar con el de los plásmidos multicopias. Por otro lado, *A. vinelandii* se ha considerado una bacteria naturalmente competente, debido a su facilidad para incorporar DNA extraño, cuando las condiciones son adversas (Page and Sadoff, 1976). En el laboratorio, existen tratamientos sencillos con los que la bacteria puede introducir DNA por simples mecanismos de transformación o transducción. En estudios de complementación de mutantes, aunque existen pocas cepas reportadas con plásmidos nativos (Maia *et al.*, 1988), hay suficiente evidencia de que puede mantener plásmidos multicopias de amplio rango de hospedero, o cósmidos extranjeros con cargas moleculares hasta de 50 kb, siempre y cuando se conserve la presión selectiva (Kennedy *et al.*, 1986; Campos *et al.*, 1996; Vazquez *et al.*, 1994). El contenido de G+C en el DNA de *A. vinelandii* alcanza un 66.5% típico del grupo Pseudomonadas-Azomononas al cual pertenece (Fialho *et al.*, 1990). Mientras tanto, su logitud es similar a la del genoma de *E. coli*; aproximadamente 4.5 megabases, o sea que debe esperarse que contenga más de 4000 genes (Manna and Das, 1993). El uso de codones para el promedio de sus genes, muestra una predisposición de G+C de 65.9 mol%, 56.3 mol% y 86.6 mol% en la primera, segunda y tercera posición respectivamente (Bibb *et al.*, 1984).

ANTECEDENTES.-

Durante los últimos años, hemos venido trabajando en la detección de los genes que participan en la biosíntesis del alginato en *A. vinelandii*. A partir del genoma de dos cepas de *A. vinelandii*, la cepa mucoide constitutiva ATCC 9046 y la no mucoide UW 136, se lograron construir sendos bancos de genes en los cuales con ayuda de probadores de *P. aeruginosa*, se identificaron cinco cósmidos que contienen, entre otros, los genes *algA*, *algD*, *algC*, *algR*, *algU*, *mucA* y *mucB* (Deretic, *et al.*, 1993). En la actualidad se ha caracterizado *algD* y su promotor por medio de la secuenciación de esta región y de la fusión transcripcional *algD::lacZ* (Campos, *et al.*, 1996). Además, se está subclonando y caracterizando las regiones vecinas de los genes *algF* y *algR* y un potencial locus regulador (*muc588*). Aquí, se describe la caracterización de una región de 4200 pb abajo del extremo 3' de *algD*, partiendo de la mutante LA 21 que contiene una inserción del transposón Tn5::mob en esta región (Mejía-Ruiz, 1994).

JUSTIFICACION.-

El agrupamiento de genes biosintéticos para el alginato en *A. vinelandii*, a mostrado una organización transcripcional diferente al encontrado en *P. aeruginosa* (Campos, *et al.*, 1996; Lloret, *et al.*, 1996). Las tres unidades transcripcionales, con al menos dos diferentes regiones reguladoras o promotores identificados hasta ahora, hablan de un mecanismo más complejo de regulación, probablemente debido a que las condiciones estrictas de vida libre de esta bacteria, pueden resultar vitales para su subsistencia y, por ello, durante su evolución ha desarrollado el proceso de enquistamiento en el cual sabemos que el alginato toma parte activa y es esencial. Esta regulación podría compararse a la complejidad reguladora que toman lugar en el proceso de esporulación en *B. subtilis* (Stragier, 1991), organismo con el que alguna vez se ha homologado por el proceso de diferenciación morfológica que también sufre *A. vinelandii* (Sadoff, 1975). De esta forma, nuestro grupo, últimamente ha acumulado una serie de evidencias y observaciones que han enriquecido los conocimientos de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*, tanto en los aspectos de regulación y expresión génica como en los propios pasos biosintéticos. Estos conocimientos, ahora, pueden ser reunidos con los aportados por los estudios de las condiciones nutricionales para la obtención del polisacárido a nivel fermentativo. En este

contexto, y junto con la importancia del polímero en las diversas industrias mencionadas arriba, resulta indispensable definir todos los mecanismos reguladores por los cuales cada una de las unidades transcripcionales de este agrupamiento génico biosintético son controlados y coordinados, y como repercuten en el ciclo de vida de *A. vinelandii* (Moreno *et al.*, 1997). De la misma forma, es necesario, caracterizar cada uno de los productos de los genes incluidos en esta región: *alg8*, *alg44* y *algK* específicamente en sus papeles moleculares de tiempo y espacio (Mejía-Ruiz *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 1997).

OBJETIVOS.-

General.-

En nuestro grupo estamos estudiando la genética molecular de la biosíntesis del alginato en *A. vinelandii*, dado que se ha encontrado evidencia de que participan en este proceso las mismas proteínas que en *P. aeruginosa*, una de las estrategias que hemos diseñado ha sido la obtención de mutantes específicas con defectos en la producción del polisacárido. Los fenotipos observados en las cepas mutantes han sugerido que se han interrumpido genes reguladores y/o estructurales de la biosíntesis por lo que subsecuentemente se ha procedido a su caracterización mediante las herramientas de la Genética Reversa y la Biología Molecular.

Particulares.-

Ya que hemos avanzado en la obtención de mutantes de *A. vinelandii*, el objetivo específico de este proyecto ha sido: Caracterizar la mutación *algK::Tn5* causante del fenotipo no mucóide en la cepa LA 21 de *Azotobacter vinelandii*. Para llevar a cabo este, los objetivos particulares propuestos aquí son los siguientes:

- a) Localizar el sitio exacto de la inserción del transposón;
- b) Secuenciar y caracterizar los genes que se encuentran en la región de la mutación *algK::Tn5*.
- c) Determinar si existe un efecto polar de la inserción sobre los genes contiguos.
- d) Determinar si la transcripción de los genes localizados en esta región es dependiente del promotor de *algD*.

Con estos objetivos se ha logrado avanzar en el conocimiento de la biosíntesis del alginato en *A. vinelandii*.

MATERIAL Y MÉTODOS.-

Cepas y Plásmidos.

Las cepas de *A. vinelandii* y *E. coli* y los plásmidos utilizados en la realización de este trabajo se listan en la Tabla 2.

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

CEPAS	FENOTIPO/GENOTIPO	REFERENCIA
<i>A. vinelandii</i> ATCC 9046	Mucoide (Alg+)	ATCC
UW 136	Rif ^r No-mucoide (<i>algU</i> -)	Kennedy, C. 1992
LA 21	Km ^r .No-mucoide (<i>alg::Tn5mob</i>)	Mejía-Ruiz, 1994
RSD1	<i>algD::lacZ</i> derivada de ATCC 9046	Campos, <i>et al</i> 1996
JG8	<i>alg::Ω</i> -Km No-mucoide	Este trabajo
JG44	<i>alg::Ω</i> -Km No-mucoide	Este trabajo
JG21	<i>alg::Ω</i> -Km No-mucoide	Este trabajo
<i>E. coli</i> HB101	<i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i>	Boyer and Roullan -Dussoix, 1969.
DH5-α	<i>lacZ</i> -, <i>recA</i>	GIBCO BRL
PLASMIDOS		
pHP45Ω	Km ^r ::Ω Km ^r	Felay, R., 1987
pBluescript II KS+	Cb ^r <i>lacZ</i>	Stratagene.
pBR329	Tet ^r , Cm ^r y Apr ^r	Covarrubias and Bolivar. 1982.
pMSD27	<i>algD</i>	Campos, <i>et al</i> 1996
pMSD675	pCP13 con un fragmento de 25 kb (<i>algD</i> , <i>algL</i> - <i>algA</i>) Tcr	Campos, <i>et al</i> 1996
pRSD1	Similar a pMSD675 pero con la mutación <i>algD::lacZ</i>	Campos, <i>et al</i> 1996
pRK2013.	RK2 tra Nm ^r ligado al replicón Col E1	Figurski and Helinski 1979.
pSUP5011	Tn5::Mob, Km ^r , Tcr	Simon, 1984
pAH3.6	fragmento <i>EcoRI</i> de 3.6 kb clonado en pBluescript II KS	Este trabajo
pSMU	fragmento <i>EcoRI</i> de 11 kb <i>alg::Tn5</i> en pBR329 Tcr y Apr ^r	Este trabajo
pAHB	fragmento <i>PstI</i> de 0.61 kb clonado en pBluescript II KS	Este trabajo
pAHJ	fragmento <i>PstI</i> de 0.63 kb clonado en pBluescript II KS	Este trabajo
pAHD	fragmento <i>PstI</i> de 0.20 kb	Este trabajo

pAHC	clonado en pBluescript II KS fragmento <i>PstI-EcoRI</i> de 0.49 kb	Este trabajo
pAHS	clonado en pBluescript II KS fragmento <i>EcoRI-PstI</i> de 1.1 kb	Este trabajo
pJG8	clonado en pBluescript II KS de pMSD27 <i>alg::Km</i> Ω	Este trabajo
pJG44	de pAHB <i>alg::Km</i> Ω	Este trabajo
pJG21	de pAH3.6 <i>alg::Km</i> Ω	Este trabajo

Medios de Cultivo.

Las conjugaciones (cruzas) se realizaron inoculando cultivos frescos de la cepa de *A. vinelandii* ATCC 9046, en 50 ml de medio líquido Burk (Kennedy, *et al.*, 1986) suplementado con 2% de sacarosa, libre de sales de nitrógeno (BS). Las cepas silvestre y mutantes se conservaron en medio PY (peptona extracto de levadura), el cual ha sido descrito anteriormente para cepas fijadoras de nitrógeno como *Rhizobium etli* (Noel, *et al.*, 1984), suplementado con 0.1 % de sacarosa (PYS). Cuando fue necesario agregar antibióticos en el medio, éstos se aplicaron en las siguientes concentraciones: Acido Nalidíxico (Nal) 30 µg/ml; Kanamicina (Km) 2-20 µg/ml; Tetraciclina (Tc) 10 µg/ml; Rifampicina (Rif) 10 µg/ml; Carbenicilina (Cb) 200 µg/ml y Ampicilina (Ap) 100 µg/ml). Las condiciones de crecimiento para los cultivos líquidos fueron: 230-280 rpm; 30°C, por 24 a 72 h. El medio de cultivo utilizado para la inducción de enquistamiento consistió de Amortiguador Burk (medio Burk sin sacarosa y amortiguador fosfatos pH7.0) + n-Butanol (BBB), como única fuente de carbono, según lo reporta Page y Sadoff (1975). Medio CM fue utilizado para transformaciones en *A. vinelandii*, este medio es similar a BS con la excepción de que no se le agregan sales de hierro ni de molibdeno (Kennedy and Toukdarian 1989). Los cultivos de *E. coli* DH5-α o HB101, para las cruzas, las extracciones de DNA y las transformaciones se realizaron en medio Luria (LB) suplementados con los antibióticos respectivos. Las condiciones para cultivos líquidos fueron: temperatura 37°C, agitación 250 rpm y tiempo de incubación 8 a 16 h.

Manipulación de DNA: Subclonaciones de regiones silvestres y de la mutación.

Para extraer el DNA de las cepas de *A. vinelandii* se utilizó el protocolo reportado por Campos y col., (1996): cultivos de 48 h en medio BSM se

centrifugaron a 6000 rpm por 20 minutos y se lavaron en amortiguador TE 50/20 resuspendiéndolas en un volumen de 4.5 ml del mismo amortiguador. Se añadió 0.5 ml de lizosima a una concentración de 10 mg/ml, incubándolas 30 minutos a 37°C. Después se les agregó 0.5 ml de una solución de proteasa a 10 mg/ml, incubándolas 30 minutos a 37°C. Posteriormente se les añadió 0.5 ml de una solución de SDS al 10%, dejándolas incubar 15 minutos a 37°C. 1 ml de NaCl 5M se agregó al tubo y se mezcló para incubarse 10 minutos a 65°C; después se le añadió 0.8 ml de una solución de CTAB/NaCl previamente incubada a 65°C y se continuó incubando por 20 minutos más. A continuación, se realizaron extracciones con soluciones de Cloroformo-Isoamílico 24:1, Fenol-Cloroformo-Isoamílico 24:24:1 en dos ocasiones con un volumen igual al de la mezcla. Después de las extracciones se le agregó a la mezcla un 0.6 volumen de Isopropanol para precipitar, se centrifugó el DNA y fue resuspendido en 1 ml de etanol 70% para lavarlo en tres ocasiones. Finalmente, se dejó secar el botón por 5 minutos y se resuspendió el DNA en 150 µl de TE con 15 µl de una solución de RNasa a 10 mg/ml incubándose durante una hora a 37°C y almacenando a -20°C.

Las extracciones de DNA plasmídico desde las cepas de *E. coli* se realizaron de acuerdo a las especificaciones del kit de QIAGEN por columnas Midi-100 o por el método de lisis alcalina (mini-prep) (Sambrook *et al.*, 1989).

Los fragmentos de DNA obtenidos por digestiones específicas de enzimas de restricción comerciales (Amersham o Boehringer), con *EcoRI* a partir primeramente de pMSD675 y después con *PstI* desde pAH3.6 (figura 6), fueron recuperados de geles de agarosa y extraídos por resina GLASS-MILK (Geneclean / Bio 101) para ligarlos a vectores como pBluescript II KS, para fines de secuenciación y pBR329 cuando el fragmento era de un tamaño mayor de 10 kb, no soportable por pBluescript II KS (tabla 2), en cada caso las subclonaciones se realizaron siguiendo las metodologías de Sambrook y col. (1989).

Transformaciones.

Los fragmentos de DNA ligados mediante la T4 DNA ligasa (Boehringer), fueron utilizados para transformar células competentes de *E. coli*, preparadas por shock de calcio (Ca₂ 50 mM), según protocolo de Sambrook y col., (1989) o con células DH5-α, obtenidas comercialmente de GIBCO-BRL. Cuando fue necesario transformar células de *A. vinelandii*, se prepararon según las indicaciones reportadas por Page y Sadoff (1976). Brevemente, se realizaron subcultivos de la cepa ATCC 9046 o UW 136 de *A. vinelandii*, resembrando 2

veces en medio CM agar a 30°C por 48 h cada subcultivo. Luego se cosecharon las células, resuspendiéndolas en 1 ml de CM e inoculando 40 ml de CM, para incubarlas por 48 h a 30°C y 280 rpm. Se recuperaron las células por centrifugación (6000 rpm a RT 15 minutos), y se lavaron en un volumen de $MgSO_4$ 10 mM para eliminar el polisacárido. Las células, se resuspendieron en 2 ml de CM mas 16 mM de $MgSO_4$, se mezclaron suavemente 100 μ l de células y 10-30 μ g de DNA. La mezcla finalmente se incubó en medio CM agar a 30°C por 48 h, para finalmente recolectar el tapete de células en 1 ml de BS, y platear alicuotas de la mezcla diluida (en $MgSO_4$ 10 mM) sobre medio selectivo.

Hibridación Southern, "Slot blot" y "Primer extension".

Quando fue requerido los DNAs de las mutantes fueron hibridados de acuerdo a los métodos descritos por Sambrook y col., (1989), contra sondas de DNA del transposón Tn5::Mob, el cósmido pMSD675 (*algD-L-A*) o los plásmidos pD27 (*algD*) y pAH3.6 (tabla 2). El marcado radioactivo con ^{32}P se llevó a cabo mediante el kit Multi-Prime (Amersham LIFE-SCIENCE). En el caso de los análisis "Slot blot" y los ensayos para determinar el inicio de la transcripción ("Primer extension"), el RNA total fue extraído por el método de Barry y col. (1992).

Análisis de Complementación.

El análisis funcional de las mutaciones obtenidas, se llevó a cabo con ensayos de complementación, mediante cruza triparentales entre cada una de las cepas mutantes, la cepa HB101 de *E. coli* con el plásmido ayudador (helper) pRK2013 (Tc^r) y la cepa de *E. coli* S17.1 con el cósmido pMSD675 (Tc^r) conteniendo un fragmento de 25 kb de DNA de *A. vinelandii* (tabla 2). Cultivos de 16 h de cada una de las cepas fueron esparcidos en medio agar-LB e incubados a 30°C durante toda la noche. Las cruza fueron entonces cosechadas y resuspendidas en 1 ml de NaCl al 0.9% para tomar alicuotas de 100 ml, y esparcirlas en medio agar-BS con Tc y Km. Colonias con fenotipo mucoide fueron aisladas, identificando en cada caso, el tipo de mutación ocurrido.

Secuenciación.

Diseño de oligonucleótidos. Con el fin de secuenciar la región 3' del gen *algD*, presente en pAH3.6 y sus fragmentos *PstI* subclonados (ver tabla 2 y figura 6), se utilizaron primeramente oligonucleótidos comerciales T3, T7, KS y SK del vector pBluescript II KS. Posteriormente, se diseñaron los oligos que se presentan en la tabla 3 para conectar las secuencias de cada subclona y construir dicha región. Los oligonucleótidos diseñados que se muestran en la Tabla 3, fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El diseño de los oligonucleótidos fue realizado tomando en consideración su TM, un tamaño de ± 20 monómeros, y un contenido de GC arriba del 50%. La figura 6 también muestra gráficamente la localización y orientación de los oligos.

Tabla 3.- Oligonucleótidos diseñados para fines de secuenciación y para estudios de inicio de la transcripción.

PARA SECUENCIA:	REGIÓN	TM
H1 (5'-TGCACCAGCGCCTGCAG-3')	<i>algK</i> (3')	58oC
H2 (5'-TAATCTCGCTCCTGCAG-3')	<i>algI</i> (5')	52oC
H3 (5'-TTGCGCGCCTTGGTGAAGTTGTC-3')	<i>alg44</i> (3')	60oC
H4 (5'-TACCACGACTTCGCCAAGGTCAA-3')	<i>alg44</i> (3')	58oC
H5 (5'-GGTCGAGGTTGCTCTTCG-3')	<i>algI</i> (interna)	57oC
H6 (5'-GGAATTTGAAGCGGCCGAG-3')	<i>alg8</i> (interna)	56oC
H7 (5'-GGCTTAAGCATGCTCTTGG-3')	<i>alg8</i> (5')	52oC
H8 (5'-GCCACATGCCCGACGAAG-3')	<i>alg8</i> (3')	60oC
H9 (5'-CGGCAAGCGCGACGGAC-3')	<i>alg8</i> (3')	60oC
XHO (5'-GCTGTTCCGCGTTC AACATC-3')	<i>algK</i> (interna)	55oC
PARA ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL:	REGIÓN	TM
PEJ (5'-CCAAATTGCGATCGGGACC-3')	<i>algI</i>	55oC
TRE (5'-GCGTTGCTTCCTACTCAT-3')	<i>algI</i>	54oC
H7.1 (5'-GGATCGAACACCTGCGG-3')	<i>alg8</i>	56oC
H44 (5'-GTTGCGCTTCCGACTCG-3')	<i>alg44</i>	56oC
ORF1 (5'-GGCGAGGCGTCCAGCGCCAT-3')	<i>algK</i>	58oC

Primer extensión. El análisis transcripcional de los FALs identificados se realizó según Sambrook y col., (1989), obteniendo RNA total de las cepas LA 21, ATCC 9046 y UW136, después de 48 horas de cultivo en medio BS suplementado con

extracto de levadura (DIFCO). Transcriptasa reversa AMV (Boehringer) fue utilizada en los análisis de primer extension sobre el RNA total extraído de las cepas de *A. vinelandii*, con el fin de buscar los inicios de la transcripción e identificar los posibles promotores responsables de generar el RNAm de cada uno de las FALs identificadas.

Análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes identificados.

Una vez obtenida la secuencia, fue ensamblada con ayuda de los programas GeneConstruction y GeneWorks. Los análisis contra el banco de datos GenBank/EMBL fueron realizados con diferentes "Paginas de Internet", (NCBI, Expassy Tools, TMPred-ISREC SERVER: ver Apéndice I), y mediante el Wisconsin Computer Package. El mismo procedimiento, se llevó a cabo para la predicción de estructuras secundarias de los productos génicos correspondientes, con el fin de formular modelos topológicos (ver apéndice 1).

Construcción de mutantes alg8, alg44 y algK.

Con el objeto de determinar el carácter esencial de los genes identificados se construyeron mutantes mediante la cointegración de un cassette de kanamicina derivado del plásmido pHP45 Ω (Felay, 1987: tabla 2). Este casete (Km:: Ω , Km_r) pertenece a una familia de interposones con diferentes marcadores de resistencia. Los genes codificadores de resistencia tienen en sus regiones flanqueantes y en orientación invertida, señales de terminación de la traducción y la transcripción, seguidos de "polylinkers"(sitios de clonación múltiple). Una vez insertado el interposón en el DNA blanco, y según la orientación en la que sea insertado, puede generar un efecto polar sobre los genes downstream. Utilizando esta característica las construcciones de las mutaciones *alg8*::Km, *alg44*::Km y *algK*::Km se realizaron mediante digestiones parciales de los plásmidos pMSD27 y pAH3.6. El casete de kanamicina de pHP45 Ω , extraído con endonucleasas específicas (figura 10), fue ligado con los fragmentos de DNA parciales de pMSD27 y pAH3.6. Posteriormente, el producto de la ligación se utilizó para transformar las células competentes de la cepa de *E. coli* DH5- α . Las colonias transformantes obtenidas en medio selectivo LB Km, fueron aisladas para extraerles DNA plasmídico por lisis alcalina y mediante un análisis de restricción e hibridaciones utilizando como sonda radiactiva el casete de kanamicina, se identificaron los plásmidos que contenían en orientación adecuada el casete.

denominando a las construcciones pJG8, pJG44 y pJG21. DNAs de estas cepas fueron extraídos para transformar células competentes de la cepa mucoide ATCC 9046 y obtener por recombinación homóloga la mutación *alg8::ΩKm*, *alg44::ΩKm* y *algK::ΩKm* sobre el genoma de *A. vinelandii*, de esta manera se pudieron obtener las cepas mutantes JG8, JG44 y JG21 (Tabla 2).

Estudio microscópico de la mutante LA 21.

Preparaciones de células inducidas a enquistamiento con N-Butanol (Page and Knosp 1989), tanto de la cepa ATCC 9046 como de la mutante LA 21 y la cepa no mucoide UW136, fueron tratadas por el método descrito en Mejía y col., (1997b) con el objetivo de observar al microscopio electrónico, la estructura típica de los quistes (microquistes). Igualmente, el tratamiento y la cuantificación del enquistamiento fueron realizados por la metodología descrita anteriormente (Wyss *et al.*, 1961).

RESULTADOS.-

Caracterización y subclonación de la región interrumpida por el transposón Tn5::mob en el genoma de la cepa LA 21.

La caracterización preliminar de la región interrumpida en el genoma de LA 21, realizada mediante análisis estructurales por hibridación tipo southern y análisis funcionales por ensayos de complementación, sugirieron que el Tn5 había afectado una región de genes estructurales de la biosíntesis de alginato en esta cepa, produciendo un fenotipo no mucoide. La inserción del transposón se localizó en un fragmento *EcoRI* de 3.6 kb, justo al extremo 3' del gen *algD* subclonado en pMSD27, cuyo fragmento *PstI* de 5.5 kb comparte secuencia con el fragmento *EcoRI* de 3.6 kb (Mejía-Ruiz, 1994).

Con la evidencia de que la inserción había afectado una región de genes *alg* afuera de *algD*, el primer trabajo consistió en subclonar el fragmento *EcoRI* de 3.6 kb en pBluescript II KS dando lugar al plásmido pAH3.6 y, por otro lado, clonar la correspondiente región con la mutación *algK::Tn5* a partir del cromosoma de la cepa LA 21, en el vector pBR329, con lo cual se originó el plásmido pSMJ (Tabla 2 y Figura 5). Posteriormente, pAH3.6 fue utilizado como sonda radiactiva para hibridar los DNA genómicos digeridos con *EcoRI* y *PstI*, tanto de LA 21, como el de la cepa padre ATCC 9046 y del cósmido pMSD675 (Figura 4). La hibridación nos dijo que un fragmento *PstI*, de aproximadamente 650 pb, contenía el transposón en el DNA de LA 21, ya que (como se observa en la figura 4) una banda nueva aparecía en el carril la cual era de un peso igual a la suma de 555 pb correspondiente al sitio *PstI* del extremo del Tn5, más el fragmento silvestre que se calculó en 300 pb, si se considera que el transposón estaba prácticamente a la mitad de este fragmento *PstI*. Dicho fragmento compartía tamaño con otros dos fragmentos *PstI* contenidos en pAH3.6. Para identificar cual de los fragmentos *PstI* era el que contenía al transposón, se realizó una doble digestión *PstI/XhoI* en el DNA de pAH3.6 y observamos que la banda superior del triplete *PstI* había desaparecido y dos nuevas bandas estaban presentes, una de alrededor de 150 pb y otra de 480 pb (datos no mostrados). Esta banda era la misma que se movía en la hibridación contra pAH3.6, o sea, que el transposón estaba dentro de este fragmento que contenía el único sitio *XhoI* en pAH3.6. transposón (figura 4). Mas adelante, como se presenta en la siguiente sección, el sitio exacto de la inserción fue localizado por secuencia.

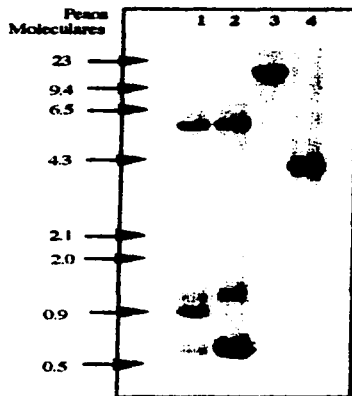


Figura 4.- Hibridación tipo Southern de los DNAs de las cepas LA 21 y ATCC 9046 contra la sonda radiactiva pAH3.6. El marcador de Pesos Moleculares (λ HindIII) se expresa en kilobases (kb). Carril 1: LA 21 *Pst*I; Carril 2: ATCC 9046 *Pst*I; Carril 3: LA 21 *Eco*RI; Carril 4: ATCC 9046 *Eco*RI. Se observa en el carril 1 una banda de aproximadamente 0.9 kb, correspondiente al fragmento silvestre *Pst*I de 0.630 kb fraccionado en dos por el sitio *Pst*I de cada uno de los extremos del transposón calculado a 0.555 kb (ver texto).

Subclonaciones, secuenciación y Mapa de restricción de la región 3' de algD.

En paralelo a las hibridaciones y con el fin de secuenciar la región 3' de *algD*, se llevaron a cabo las subclonaciones del plásmido pAH3.6, el cual fue digerido con *Pst*I y luego religado para dar lugar a los plásmidos pAHC, con un fragmento *Pst*I-*Eco*RI de 0.5 kb y pAHS con un fragmento *Eco*RI-*Pst*I de 1.1 kb. Similarmente, se subclonaron en pBluescript II KS dos fragmentos internos *Pst*I, uno de 0.63 kb y uno de 0.2 kb cada uno, dando lugar a los plásmidos pAHB, pAHJ y pAHD, respectivamente, con ellos se estableció el mapa de restricción que aparece en la figura 5.

Cada una de las subclonas fueron secuenciadas en ambas orientaciones (ambas bandas del DNA de doble cadena), con oligonucleótidos diseñados

GCAAGCCGGTCAACCCAGCGGGTGCCTTCACCCGGGCAAGCTGCTGTTCAGCTGGACAGCCCTGGCCCTGGCCA 1875
K P V T Q Q G A F H R G K L L F Q L D S L G L A M

TGCAGCTGGATTCAGGTTCCGCAACCTCGACCCGGAAAGCGCCGCAACCGCTTGCAGTTCACCGTTCGGCCG 1950
D V E F Q V R N L D P E S G R T G C Q F H G L G A

CACCGGAGATTCACCCCTTGGCCAGATGATCACTCGCACCTGAGCGCCGAGTTCGTACCCCTCGCCGATGTGA 2025
R E I S T L R L E I T S H L S G E L V T V T V G D V I

TCTGCAACCCCTCGACGGGACAACTTCACCGAAGGGGGCCGAAGGGCAAGGCCCTGGCCAGCAGATCGATGTTCC 2100
C T L Q R D N F T E G R A R A R A W P S R S H P E

AACGCTCGCCCGGTCACTTCAGCTTGGCGATCTTCATCTGTCGGCCCTCGCCGCTTCGGCCGTATCGCCTAAGC 2175
R L R A V S P S L A I P I V G L G A F G L I D K Q

AGCTTACGACCTCTACTTCGTCACCCATGCCGAGTCGGGCAATGGTCAACGCTGCCAGCATGGAAGTGACCATCC 2250
L Y D L Y F V T H A E S G M V S V P S M E V T M P

CCCGGAAAGCCACCGTCCAAAGCCCTGCTCGCCCGGACGCGCTGGTCCGCAACCGTCCCGGATGCCAGCTTCT 2325
R E G T V Q S L V G P D G L V A N G A P I A S P S

CCCGCTCCATGCTGGAAATGCTCAAGGGCCACCTGAGCGAGGACGACTCAACCCCGGCAACGGTTCGAGAAGCTGT 2400
A S M L E M L K G H L S E E Q L N P A N V E K L F

TCACCCGGCAGATGAAGGGCAACCTGACCAAGCCCGTCCGATTCGAAAGTGGTCCGCCAGCCGCTGGCCAGGCG 2475
T R Q M K G T L T T S P C D C K V V A Q R V A O D G Q

AGTTCGGCTCCAAAGCCGAGGTGATTTTCAGCTTCTGCCCGGCAAGCCCGCGCTACCGTTCGAGAGCCCGTTC 2550
F A S K G Q V I F E L L P R D A A A T V E A R F R

GCTACCCAGACTTCGCCAAAGGTCAAAGCCCGGCAACCCAGGTCACTTTCAGCGTTCGCCGCGAGGACCAAGCCCGCC 2625
Y H D F A K V K P G Q V T F S V P G E D Q P R R

GCGCCCGGATTCGTCAGCACCCGCCCTGCAGAAATGAAGGACTGTCCAGCGGATATCCCGTGTCTCAATCCAGCCGAAAC 2700
G R I V S T A L Q N E G L S S D I R V L I Q P E Q

AGCCCTTGGACAGACCGCCCTGGCCCGGACCCGVTGGAAAGTGGTTCATCGACACAGCCCGCTTCTACGACTGGCTGA 2775
P L D S A L A G Q P E V E V V I D H G P S T W L I

TCGACAAGCCCGTCAACCCCGGACTCTGA ^{RBS} FAGCA CACCTCAGTTGAACCTGACCAAGCCCGCTGCTGCTCTCGCCG 2850
D K A V T A G L * V N L T K P L L L S A

CTGGCCGGCTGACCCGCTTCGCCCAACCTCGCACCTTCGCCGACCCAGCTTCGCGGAAGGACCCCTGCAAGCCCGCC 2925
L A G L T A C A N L D L P D Q R L A K E A G C C T G C A A G C C C G C

GACATCCAGCAGCCCGGACGGGATTCCTCGTCAACTCGCCGACATGGGCTTCACCGAGGCGCCAGCTGGCCCTGCC 3000
D T Q T A E R H F R Q L A D M G F T E A Q L G L A

GACATCGAGTTGCCACGGGCTGATCCCGAGCAGCTGCCCAAGGCGGAACAGACCTACCGCATGGCCCTGGAACCC 3075
D M Q L A S G D P E Q L R K A E Q T Y R M A L D A

TCGCGCGGCAAGCCCGCTGGCCCAAGCTGCGCTTACAAGCCGACCCAGCAGCGGAAGGAAAGCCGAG 3150
S P G C G G C C A A G C C C G C T G C C A A G C T G C C T A C A A G C C G A C C A G C G A A A A G C C G A G

GCCGCCAGTTCGCTCAGGATGCCCTGCGCCCGGAGGATGGCGTCTGCTGCCCGCTGGCGATGCTTTACTTG 3225
A A Q L L S L D A F A A G E D G V L L P L A M L Y L T

AAGAACC CGCAGAGCTTCGCCGAGCTCAGCCTG CAGCAACCCATCGATCAGTGGCCGCGCCGCGGACATCCCCAG 3300
K N P Q T F P D V S L Q Q R I D Q W R A A G H P Q

GCGGACATCGCACAGATCGTGGTCTACCGCACCCAGGGCACCTACGACCAAGCACCTGGACGACATCGGCGGATC 3375
A D I A Q I V Y R T T Q G T Y D Q H L D D I E R I

TCCAGCAGCCCGCTCGCCGAGCAGCAGGACTCTCTCGTTCGAGCTAGCCACCGTCTATCTTCAAGCCCGGACCCAGAA 3450
C Q Q R L A E H S D C Y V E L A T V Y L Q A R P E

TGGACCCAGAACCCCGCTCAGGGCCTGGTGCACAACGCTCATGGCCGCTCATGGCCCGCTTCGCGCGGGCGGA 3525
W T R T A C T A C R A W C N S S W P L M A A H R A G G

GTGTCAGCCCAACTGGTTCAGCGAAGTCCGCGCGTCTCTTCCAAACCCGCTGCTCGCCAGTTCGAAACGAAAAGACC 3600
V S A Q L V T E V A G V L S N P L L G Q S N E K T

CCCCAGACCATGCTCGAAGAAATGCCGCCGCCGCTGGGTCAGTCTGCCGCGTTCGTACTACGACTTTCGCCGC 3675
 A Q T M L E E I A P P P G S V W R V L I Y D F P G
 ACCGGGACACCGGACAGATGCTCGACTCCTCCCGTGGCCCGTCCGCCGCCAGCCCGGACCCGATCTGTTCCTC 3750
 T G D T D T D M L D Y L A W P C A A Q P A A D L L L
 GGTGGCTTACTAGGAAGCAAGCTTCTCCACGAGCCCGTTCAGCCGAGGAATATTTCATCAAGGCCCGCC 3825
 G R L Y Y E G K L L P Q D P F F K A E E Y F I K A R
 GCCACGAAAAACGCCCACTACTACTCTGGGTGAGATCTPATGCCGCCGGTTCTCTCCGGGAGGTCTACCCGCG 3900
 A T E N S A H Y Y L G Q I Y R R G F L G E V Y P Q
 AAGGCCGTTCGACAGCCTTCTGACCGCGCCGCCGCCGCCGAGCCGCGACTAAGCCCTCCGCCAGCTGTATC 3975
 K A V D S L L M V M L Q A S A D Y A L A Q L Y
 TCCCAAGGTCGGGATCCGCATCGACCTGAGCCAAAGCCCTACGCTCTTCGACAGCTTCGCCGTTTCGCAAGGCC 4050
 S Q G R G I R I D L A N A Y V F A R L A M L T Q G R
 CCGGATCCGAGCCCTGCTTCAAGAAATAAAGGCTAAATCTCCCTCCTGCAGAACGTAACCCGGGTGAAACAGATG 4125
 P D S E P L L Q E I K A N L A P A E R T R G E Q M
 CTCCACCGGACAGCAGCAGCTCGTTACCGCGGTGTGGCAGACCTTCGACCGGACTCGAACCATCGAAATCAATG 4200
 L H A E Q Q A R Y G V W Q T S T Q L Q A M Q N Q
 RBS
 GAGSCAATTAGTAGGATAGCCATAAGCCCGGGACTGGCCCTGGGACCCACTTCTGCTGCTGCAATCCGC 4275
 M S R K Q R I S A G L G L G A S L L C C N P L
 TGTTCGCAAGCCCGTGGGTCCCGATCCCAATTTCCGGCATGGAAGTGAAGGTCACCCGCCAGTCCGGAAGACGACC 4350
 F A G P V G P D R N F G M E V K V T A Q S E D D R
 GTGACCTGGACA CCGCGCGGTGACCCGAGGGTATCCCCCTCGACTTCGCGCCCTGGTCTGACCGCCAGC 4425
 D L D T R S G G D A C C G A G G I A L D L R P W V Y G Q R
 CGGGCAACTGGGAGCCATGGTGAATCTCCAGGCGGTCCGCCGCCACCGCATCGAAACCGCCACCCGATC 4500
 G N W M L Q A V A A T D I E T D T D P
 CCAACGAA GAACCGGGGGCGATCCCGGAAACGGCTTCAGCCCGGACAGCAGCCCGGACCCGGACAAGAGCTACC 4575
 N E E P G G D P A N G F S R D S S R D P D K S Y L
 TCCCCCTGCGCGAATTCGCCCACT 4601
 A L R E F G P A

Figura 6.- **Secuencia nucleotídica** de la Región I del cluster biosintético abajo del gen *algD*. En primer plano se presenta la región de repetidas inversas (RIs), 12 nucleótidos después del codon de termino TAA de *algD*. Posteriormente se señala la zona consenso -10, -35 típico de los promotores que reconoce σ_B , de *Bacillus subtilis* y mas adelante, señalado con una flecha invertida el inicio de la transcripción G +1 para *alg8* el cual fue identificado por análisis de primer extension. Encuadrados se observan los sitios de unión a ribosoma (RBS). Los codones de inicio de cada gen se presentan circulados. Las regiones de las α -helices transmembranales son mostradas encerradas en rectangulos largos. De la misma forma, los sitios catalíticos (Asp: D) conservados entre las β -glicosil transferasas son presentados en triángulos. Una región péptido señal, aparentemente no traducida, homóloga a la reportada en *alg8* de *P. aeruginosa* se presenta subrayada. Con doble subrayado se encuentran los motivos encontrados en Alg44, el del amino terminal, motivo de unión a GTP/ATP, y en la porción carboxilo terminal el motivo de unión a Zinc en algunas carboxipeptidasas. Finalmente en tercer plano se observa con el simbolo ∇ el sitio exacto de la inserción del transposón Tn5::mob dentro del gen *algK*.

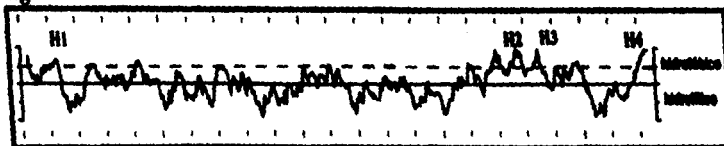
Análisis de la secuencia: Identificación de los genes *alg8*, *alg44*, *algK* y *algJ*.

Identificación de las FAL's: *alg8*, *alg44*, *algK* y *algJ*. El análisis inicial de la secuencia cruda de DNA obtenida (figura 6), fue comparada contra el banco de datos GenBank/EMBL mediante un análisis BLASTX. La información generada nos indicó que teníamos una región homóloga a los genes *alg8*, *alg44*, y *algE* de *P. aeruginosa* (Maharaj *et al.*, 1993; Rehm *et al.*, 1994); este último recientemente identificado en *A. vinelandii* como *algJ* (Rehm, 1996). Además, entre *alg44* y *algJ* se encontró una FAL a la que empezamos a caracterizar e inicialmente le llamamos *algM*. Recientemente apareció la publicación de su homólogo en *P. aeruginosa*, el cual ha sido denominado *algK* (Aarons *et al.*, 1997) y por lo tanto ahora será mencionado como tal también en *A. vinelandii*

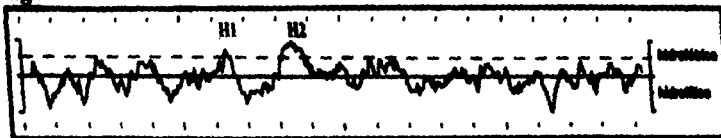
La homología reportada en BLAST para *alg8*, la primera FAL identificada en orden transcripcional después de *algD*, mostró una identidad del 85% a nivel de nucleótidos, con *alg8* de *P. aeruginosa* (figura 8a), tomando en cuenta la metionina de la secuencia deducida que mas se asemejaba en tamaño a Alg8 (Maharaj *et al.*, 1993). Esta FAL comprende 1478 nucleótidos y hay 114 nucleótidos entre *algD* y *alg8*. La secuencia de aminoácidos deducida predice una proteína de 492 residuos con un peso molecular estimado (MW) de 51.8 kDa y un punto isoeléctrico de 9.98. Alg8 de *P. aeruginosa* es similar en tamaño (493 residuos) y regiones (5 dominios α -helices transmembranales) a la de *A. vinelandii*. No obstante, trabajos experimentales posteriores, mostraron claras evidencias de la presencia de un promotor entre *alg8* y *algD*, el cual iniciaba la transcripción a partir del nucleótido 161 dentro del marco de lectura original, lo cual nos proporcionó evidencias para sugerir que *alg8* podía codificar una proteína mas corta (de 50.4 kDa), o sea sin el péptido señal y que por lo tanto presenta solo 4 dominios transmembranales (figura 6 y 7).

Adelante de *alg8*, y separada de esta por sólo 35 nucleótidos, se encuentra la segunda región codificadora *alg44* con 1169 residuos. *alg44* predice una proteína de 389 aminoácidos con un peso molecular de 42.7 y un punto isoeléctrico de 12.06 y exhibe un 59.3% de identidad con 292 residuos alineados de los 316 que comprende a Alg44 de *P. aeruginosa* (figura 8b). El análisis de regiones transmembranales, predice que Alg44 tiene dos α -helices con alta posibilidad de ser transmembranales, una entre los residuos 160 y 179 y la segunda entre los residuos 214 y 235 (figura 6 y 7), con las regiones amino terminal y carboxilo terminal orientadas al citoplasma. Fuera del alineamiento de estructuras primarias con su homóloga de *P. aeruginosa*, Alg44 no presentó ningún otro alineamiento considerable entre las proteínas reportadas en el banco de datos SwissProt.

Alg8



Alg44



AlgK

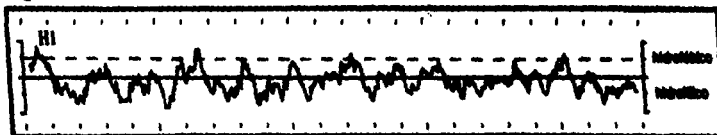


Figura 7.- Perfiles hidropáticos de las proteínas Alg8, Alg44 y AlgK. Las regiones de α -hélices (H), en cada uno de los perfiles son calculadas por el índice del segmento hidrofóbico acto por arriba de 1.6 según Klotz & Doolittle (1979).

Por su parte, el tercer FAL identificado por secuencia en esta región, *algK*, inicia con un codón GTG (una valina) y presenta un péptido señal típico del procesamiento de ciertas lipoproteínas periplásmicas con un sitio de corte A-CA procesada por la peptidasa señal de tipo II (Pugsley 1993). El peso molecular estimado para AlgK es de 50.9 con un punto isoeléctrico (PI) de 5.54, si la proteína se procesa en este supuesto sitio de corte, entonces el peso de la proteína madura sería de 49.27 kDa y su PI de 5.44. Una región transmembranal entre los residuos 3 a 21 (péptido señal) predice este procesamiento postraduccional (figura 6 y 7). AlgK de *A. vinelandii* tiene una identidad del 55.86% con su homóloga de *P. aeruginosa* (figura 8c).

El cuarto FAL identificado, es homólogo a *algE* de *P. aeruginosa*, en *A. vinelandii* se le ha denominado *algI* ya que este ha sido caracterizado recientemente por Rehm (1996), quien demostró que codifica para una proteína de membrana externa con funciones de canal iónico cuyo papel es exportar la cadena polimannurónica acetilada (ver pagina 12).

Por otro lado, con el fin de precisar el sitio exacto de la inserción, la clona pSMJ fue secuenciada utilizando el oligonucleótido XHOI. El Tn5::mob se localizó a 424 nucleótidos antes del codón de término TAG de *algK*, correspondiente la región central de la proteína predicha (AlgK), justamente entre los aminoácidos G-318 y K-319 (figura 6).

Caracterización de las cepas JG8 y JG44 (alg8::ΩKm y alg44::ΩKm).

Con el efecto de determinar si los genes *alg8* y *alg44* eran esenciales para la biosíntesis del alginato, se construyeron por genética reversa las cepas JG8 que llevan el casete de Km, tanto en orientación polar como en no polar y, JG44 (no polar) a partir de la cepa ATCC 9046 de *A. vinelandii* (*alg8::ΩKm* y *alg44::ΩKm*, respectivamente) (figura 9). Los fenotipos no mucoides de las muantes no polares JG8 y JG44, sugirieron que los genes *alg8* y *alg44* codifican para proteínas esenciales en la biosíntesis del alginato en *A. vinelandii*.

a) **Complementaciones.**- El análisis de complementación de la cepa JG8 con el plásmido pMSD675, restableció la producción de alginato a niveles similares a los de la cepa padre ATCC 9046 (Tabla 4). De igual manera, cuando JG8 se complementó con el cósmido pRSD1 (derivado de pMSD675 [*algD::lacZ*]; Tabla 2), se restableció la mucoidía. Ambos resultados sugieren que *alg8* es transcrito desde su propio promotor. Por su parte, la mutación no polar de la cepa JG44 (*alg44::ΩKm*), que como ya se mencionó, también presenta un

fenotipo claramente no mucoide, restableció la mucoidia cuando se complementó, tanto con el cósmido pMSD675 y como con pRSD1.

b) "Slot blot".- Como se mencionó oportunamente, en la cepa UW136 de *A. vinelandii* no se detecta RNAm de *algD*, ya que esta cepa contiene una secuencia de inserción (IS) que inactiva a *algU* (Martinez *et al.*, 1996). Con el fin de determinar si el promotor que transcribe al gen *alg8* es independiente de *AlgU*, se realizó un análisis de "Slot blot" con RNAs de las cepas UW 136, RSD1 y ATCC 9046 contra una sonda radiactiva de *alg8*, representado por el fragmento interno *EcoRI* de 110 pb. Los resultados del "Slot blot" observados en la figura 8a, indican que existen transcritos de *alg8* en ambas cepas RSD1 y UW136. Estos datos apoyan las observaciones anteriores de que existe un promotor independiente de *algD* que transcribe a *alg8* (figura 10a). Una sonda de *alg44* no hibridó con el RNAm de la cepa JG8 (con el casete de Km en orientación polar) sugiriendo que el promotor de *alg8* también transcribe a *alg44*.

c) "Primer extension".- Con el objeto de identificar que tipo de promotor transcribe a *alg8*, y caracterizar la organización transcripcional de los genes identificados abajo de éste, se buscaron los posibles inicios de la transcripción de cada uno de ellos mediante ensayos de *primer extension* (Tabla 3). Los análisis de "Primer extension" utilizando el oligonucleótido H7.1 sobre el RNAm de *alg8* (ver Figura 10b), nos indicaron la presencia de un promotor cuyo inicio de la transcripción +1 corresponde al nucleótido 161 (Guanina: figura 6), y cuya región -10 y -35 presentó homología con la región consenso de los promotores que reconoce σ_B de *B. subtilis*. Este factor sigma se ha relacionado con la regulación de genes expresados en condiciones de estrés y durante la esporulación (Boylan *et al.*, 1993). σ_B tiene su homólogo en *E. coli* y se le denomina σ_S . Un análisis similar de *primer extension* en *alg44* utilizando el oligonucleótido H44 (Tabla 3) no predijo ningún inicio de la transcripción arriba de 200 bases a partir de su codón de inicio ATG.

Construcción y caracterización de la cepa JG21 (algK:: Ω Km).

El fenotipo no mucoide originado por la mutación *alg::Tn5* en LA 21, sugirió que *algK* codifica para una proteína esencial para la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*. Con el fin de determinar su carácter esencial, se construyó la mutación no polar *algK:: Ω Km* generando la mutante JG21 (figura 9), la cual presentó un fenotipo no mucoide similar al de la cepa LA 21. El casete de km de JG21 fue localizado por análisis de restricción en el sitio *BglII* de *algK*, o sea a 90 bases abajo del sitio donde se ubicó la inserción del Tn5.

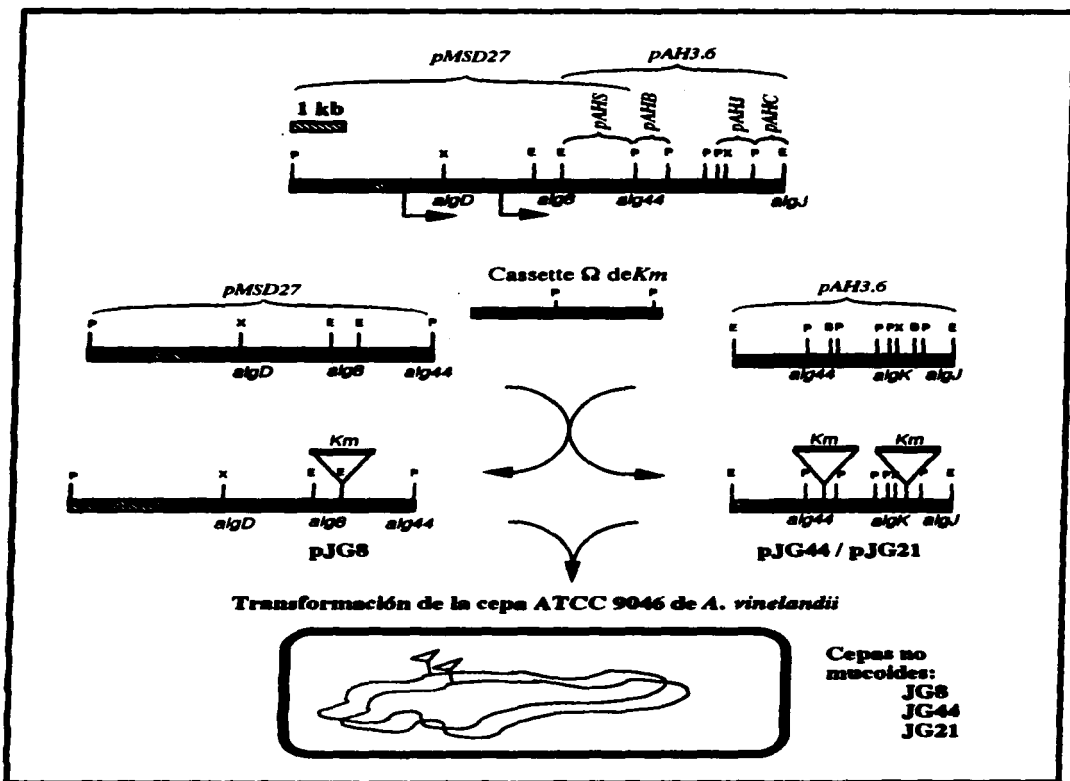


Figura 9.- Construcción de mutantes. DNAs de los plásmidos pMSD27 y pAH3.6 fueron digeridos parcialmente en los sitios *EcoRI* y *BglII*. Cassettes de kanamicina fue ligado en los plásmidos abiertos y posteriormente se transformó en la cepa ATCC 9046 produciendo las mutantes JG8, JG44 y JG21, resistentes a Km, las cuales presentaron fenotipos no muscoides. P=*PstI*; E=*EcoRI*; X=*XhoI*; B=*BglII*.

Análisis de primer extension para determinar la presencia de un promotor para *algK* (Tabla 3), analizado hasta 300 bases nucleotídicas por arriba del propuesto codón de inicio GTG, no indicó la presencia de algún promotor que lo transcribiera independientemente. Estos datos sugieren que el promotor que transcribe a *alg8* puede también transcribir a *algK*.

En un intento por determinar la existencia del promotor $\sigma 70$ arriba de *algJ*, identificado por análisis de secuencia (Rehm, 1996), realizamos un análisis de primer extension sobre este gen, diseñando estratégicamente dos oligonucleótidos (TRE y PEJ; ver Tabla 3 y figura 5). Los resultados no presentaron ninguna extensión en la zona 5' de *algJ*, lo que sugiere que también este gen puede ser transcrito desde *alg8*, junto con *alg44* y *algK* en una sola unidad transcripcional.

Organización Transcripcional del operón alg8-alg44-algK-algJ:

En resumen, los datos aportados por los análisis de "Slot blot" y "Primer extension" apoyan que existe un promotor que transcribe a al menos *alg8* y *alg44*. Para determinar si *algK* también era transcrito desde el promotor de *alg8*, se realizó un análisis de "Slot blot" utilizando el inserto *PstI* de 0.49 kb de pAHC (figura 10a), como sonda radiactiva y RNAs de las cepas ATCC 9046, LA 21, JG21 y JG8. De esta manera se pudo determinar que: 1) La mutación de la cepa LA 21 es polar debido a que no transcribe a *algJ*; 2) La mutante JG21 es no polar ya que hay presencia de transcritos que hibridan contra pAHC; y 3) *alg8*, *alg44*, *algK* y al menos *algJ* forman un operón (figura 11).

Predicciones de Estructuras Secundarias y Modelos Topológicos.

Los alineamientos BLAST realizados para Alg8, no revelaron ninguna homología significativa con proteínas del banco de datos SwissProt (ver Apéndice I), a excepción de la encontrada con su homóloga Alg8 de *P. aeruginosa*. No obstante, los análisis de hidropatía realizados para Alg8 de *A. vinelandii*, en los servidores ISREC SERVER (basado en el algoritmo de Kite and Doolittle, 1982), DAS y TMpred-Heidelberg en Internet (apéndice 1), mas los datos experimentales de completación e inicio de la transcripción, sugieren la existencia de dos versiones de Alg8: una versión larga, que predice 5 α -helices transmembranales, de dimensiones similares a las de su homóloga de *P. aeruginosa*, aparentemente transcrita desde el promotor de *algD*; y una versión corta, con sólo 4 α -helices transmembranales, la cual obedece a los datos experimentales, que indican que hay un inicio de la transcripción dentro de la FAL de la versión larga, y cuya transcripción, obviamente, es independiente de *PalgD*. En ambos casos, las

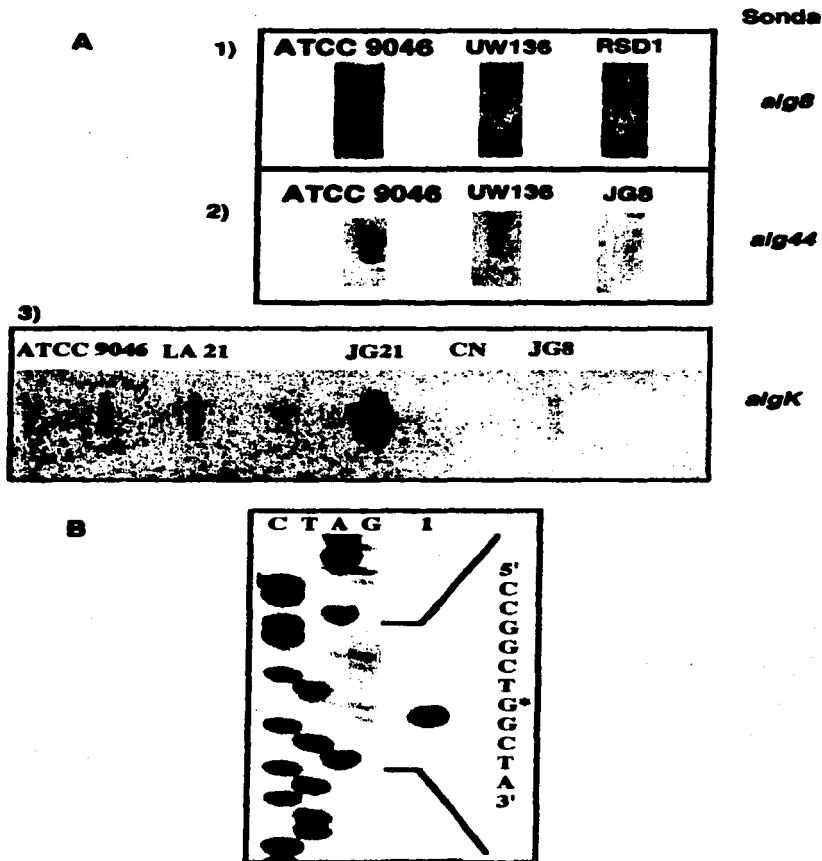


Figura 10.- A 1) Slot blot de los RNAs de las cepas ATCC 9046 RSD1 y UW13, contra una sonda radiactiva del fragmento EcoRI de 120 pb interno a *alg8*. 2) Slot blot realizado contra una sonda radiactiva del fragmento PstI de *alg44* (pAHB). 3) Slot blot de los RNAs totales de las cepas de *A. vinelandii* ATCC 9046, LA 21, JG21, Control Negativo (CN) y JG8, contra una sonda radiactiva de *algK* (fragmento PstI interno de 200 pb). Explicación en el texto. B) Análisis de "primer extension" para identificar el inicio de la transcripción del gen *alg8*, el cual se observó en el nucleótido 116 (G) de la secuencia analizada (ver texto y figura 7).

orientaciones de los segmentos transmembranales, permiten que se forme un largo segmento (loop) entre los residuos 29 y 348 (figura 12) con localización citoplásmica.

Con el fin de aclarar el mecanismo de polimerización del alginato en *A. vinelandii*, reunimos todos los datos arriba mencionados y diseñamos el modelo topológico de la figura 12. En este modelo, consideramos que Alg8 de *A. vinelandii*, según un análisis similar de HCA practicado en su secuencia, conserva los mismos dominios y sitios catalíticos (S1, S2 y S3), mismos que por razones funcionales, deben estar localizados en el segmento citoplásmico ya que es aquí donde los monómeros GDP-manurónicos están disponibles. A su vez, consideramos que Alg8 de *P. aeruginosa*, es una β -glicosil transferasa procesiva (con 3 sitios catalíticos bien definidos; Saxena *et al.*, 1995), la cual, según Maharaj y col. (1993), participa en la polimerización del alginato. Toda la información arriba mencionada es coherente con el modelo propuesto aquí.

Por otro lado, un alineamiento entre Alg8 y la secuencia de aminoácidos de NodC (una β -1,4 glicosil transferasa reportada también por Saxena y col., 1995), de *Azorhizobium caulinodans*, mostró que los residuos Asp (D) también estaban conservados dentro de un segmento citoplásmico (datos no presentados). Todos estos elementos apoyan el modelo topológico propuesto para Alg8, definiéndola como una Manurosil transferasa con dominios hidrofóbicos transmembranales dentro de la membrana citoplásmica, cuyos sitios catalíticos (S1, S2 y S3) están orientados hacia el citoplasma (figura 12).

El análisis de hidropatía practicado para Alg44 de *P. aeruginosa*, muestra dos posibles regiones transmembranales: uno entre los residuos 42 a 62 y otro entre el 157 y 178. Alg44 de *A. vinelandii*, predice también dos segmentos transmembranales: el primero entre los residuos 160 al 179 y el segundo entre el 214 y el 235. Sin embargo, un análisis DAS (Apendice 1) predice que los segmentos transmembranales en ambas protefñas, se reducen a uno (entre los residuos 164 y 179), lo que sugiere que las regiones amino terminal están orientadas hacia el citoplasma y las regiones carboxilo terminal se orientan hacia el periplasma. La búsqueda de dominios característicos de protefñas realizado con el programa MOTIFS (-MIS=1), encontró dos motivos comunes y conservados en las dos Alg44: uno en el residuo 62 del amino terminal, relacionado con el sitio de unión a ATP/GTP (Gx4GKS) de una gran variedad de protefñas procarióticas y eucarióticas. El segundo motivo, lo presenta justo en el residuo 182 o sea orientado en el espacio periplásmico: esta región es similar al sitio de pegado al zinc de ciertas carboxipeptidasas, con ejemplos en una gran variedad de organismos, de las cuales las mejor caracterizadas son las de origen pancreático

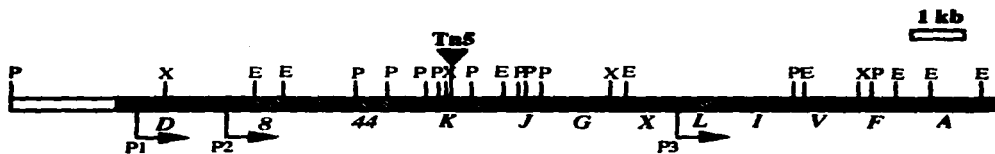


Figura 11.- Organización transcripcional del cluster biosintético *alg* en *A. vinelandii*. *algD* (D) es transcrito desde un promotor complejo (P1), por al menos dos diferentes factores sigma (σD y σE). *alg8* (8) y al menos *alg44* (44) y *algK* (K) son transcritos desde P2 donde la región -10, -36 tiene alta similitud con el factor sigma σB de *B. subtilis*. P3 por su parte realiza el trabajo de transcribir por lo menos los últimos 5 genes de este agrupamiento. P=XhoI; E=EcoRI; X=XhoI. ■■■■ Genes identificados y caracterizados en nuestro laboratorio. ■■■■ Genes caracterizados por otros grupos.

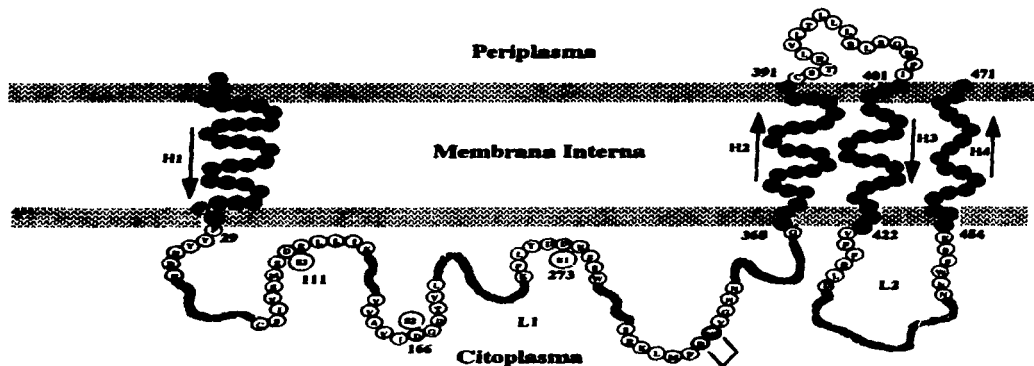


Figura 12.- Modelo topológico diseñado para representar la orientación de Alg5 en la membrana citoplásmica de la célula de *A. vinelandii*. Los 4 segmentos transmembranales (H1, H2, etc.) mantienen el Loop citoplásmico (L1) y dentro de este la posición de los sitios catalíticos (S1, S2 y S3) los cuales realizan la polimerización de los monómeros de ácido manurónico en forma procesiva.

humano, aunque ha sido aislada una carboxilasa de *Streptomyces griseus*, de la cual se desconoce su localización celular (Narahashi, 1990). La ausencia del motivo de unión a ATP/GTP en la secuencia de Alg8 y la evidencia de que se requieren 3 M de ATP por cada ácido urónico en la cadena de alginato (Sutherland 1990), sugieren que Alg44 podría estar formando una subunidad con Alg8 para la polimerización.

Estudio microscópico del enquistamiento en LA 21.

La figura 13a muestra una célula de ATCC 9046 con las capas de exina (ex) e intina (in) propias de una célula enquistada (Sadoff, 1975). También se puede observar la presencia de hebras de alginato en el borde de la célula, indicando que estas capas se componen en gran parte de este polímero. En la parte central se observan gránulos de polihidroxibutirato (PHB), típicos de una célula de *A. vinelandii* que ha completado su ciclo de vida y que potencialmente está preparada para germinar. La figura 13b presenta una célula de la cepa LA 21 la cual fue sometida al mismo tratamiento de enquistamiento con N-butanol por 48 horas, en esta caso no hay formación de intina ni exina (tampoco hebras de alginato) y por lo mismo, el cuerpo de resistencia no se ha formado. No obstante, la formación de PHB se observa incrementada, a diferencia de la célula de ATCC 9046. El índice de enquistamiento, formulado como la frecuencia de germinación de células sometidas a procesos de desecación después de inducirlas a enquistamiento, son mostradas en la Tabla 4: en ella se observa que en LA 21 no se produjeron quistes de resistencia a la desecación.

Tabla 4.- Determinación de alginato y enquistamiento de las cepas padre y mutantes.

Cepa	Alginato (mg/mg prot)	% de Enquistamiento
ATCC 9046	2.430	3.0
LA21	0.005	<0.0001
UW 136	0.001	<0.0001
JG8	0.000	ND
JG44	0.001	ND
JG21	0.003	ND

ND = No determinado.

Finalmente, en la figura 14, y a manera de resumen, se presenta un modelo de todas las proteínas biosintéticas del alginato identificadas hasta la fecha y los pasos sugeridos para la obtención del polisacárido. En esta figura se puede

observar la posible relación entre Alg8 y Alg44, formando un complejo para la polimerización de los residuos manurónicos, y el transporte activado por GTP o ATP. En el periplasma, la lipoproteína AlgK se postula que participa en la incorporación a la membrana externa del canal iónico AlgJ, y que por este se canaliza la cadena polimanurónica. Por su parte, se observa también la participación de AlgF y AlgI como proteínas que acetilan ciertos residuos manurónicos del polisacárido naciente y, finalmente, una epimerasa extracelular (AlgE) convierte algunos residuos manurónicos en su epímero el ácido gulurónico, dándole la conformación definitiva a la molécula de alginato.

DISCUSION.-

La inserción del Tn5 en la Región I del grupo de genes biosintéticos *alg*, nos permitió identificar y caracterizar tres genes esenciales para la obtención del alginato. El fenotipo no mucoso de la mutante no polar JG21, homóloga a LA 21, es una fuerte evidencia del carácter esencial de *algK*. Este gen, recientemente caracterizado en *P. aeruginosa*, ha sido propuesto a codificar una lipoproteína periplásmica que contribuye a la conducción del polimanurónico hacia el canal iónico que forma AlgJ. La ausencia de un residuo Asp en la posición +2, después del sitio de corte en Cys (+1), predice que el anclaje a su parte lipídica es en la cara periplásmica de la membrana externa. De la misma forma, las particularidades funcionales de la mayoría de las lipoproteínas bacterianas, descritas hasta la fecha, mencionan que su papel está más vinculado al acarreo de péptidos esenciales y su incorporación en alguna de las membranas donde llevan a cabo su función, como es el caso de la lipoproteína PulS, que incorpora a PulD, una porina de membrana externa que excreta el homopolisacárido pululanasa (Hardie *et al.*, 1996); por lo que en el caso de AlgK transportaría al canal iónico AlgJ y de esta manera podría realizarse la excreción del alginato.

Los análisis de "Primer extension" para *alg8*, indican que hay transcripción desde su propio promotor, dependiente según su región -10, -35, de un homólogo a σB e independiente de *PalgD*. Sin embargo, no se descarta que exista transcripción desde *PalgD*, ya que el análisis de la secuencia nucleotídica es compatible con un RNAm que contiene a *algD* y a *alg8*. Sin embargo, la proteína Alg8 codificada en este mensajero sería más grande. Esto implica, por lo tanto, dos formas distintas de que la proteína Alg8 se incorpore a la membrana citoplásmica, y cumpla su función de glicosil transferasa o polimerasa. Independientemente de como se lleve a cabo la transcripción, la proteína generada es compatible con el modelo topológico propuesto para Alg8, ya que en caso de la versión larga, se añadiría una α -hélice transmembranal, a la región amino

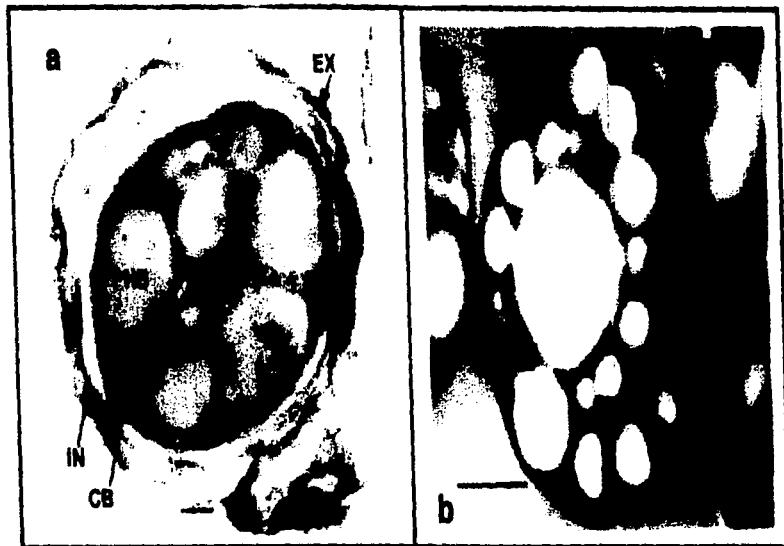


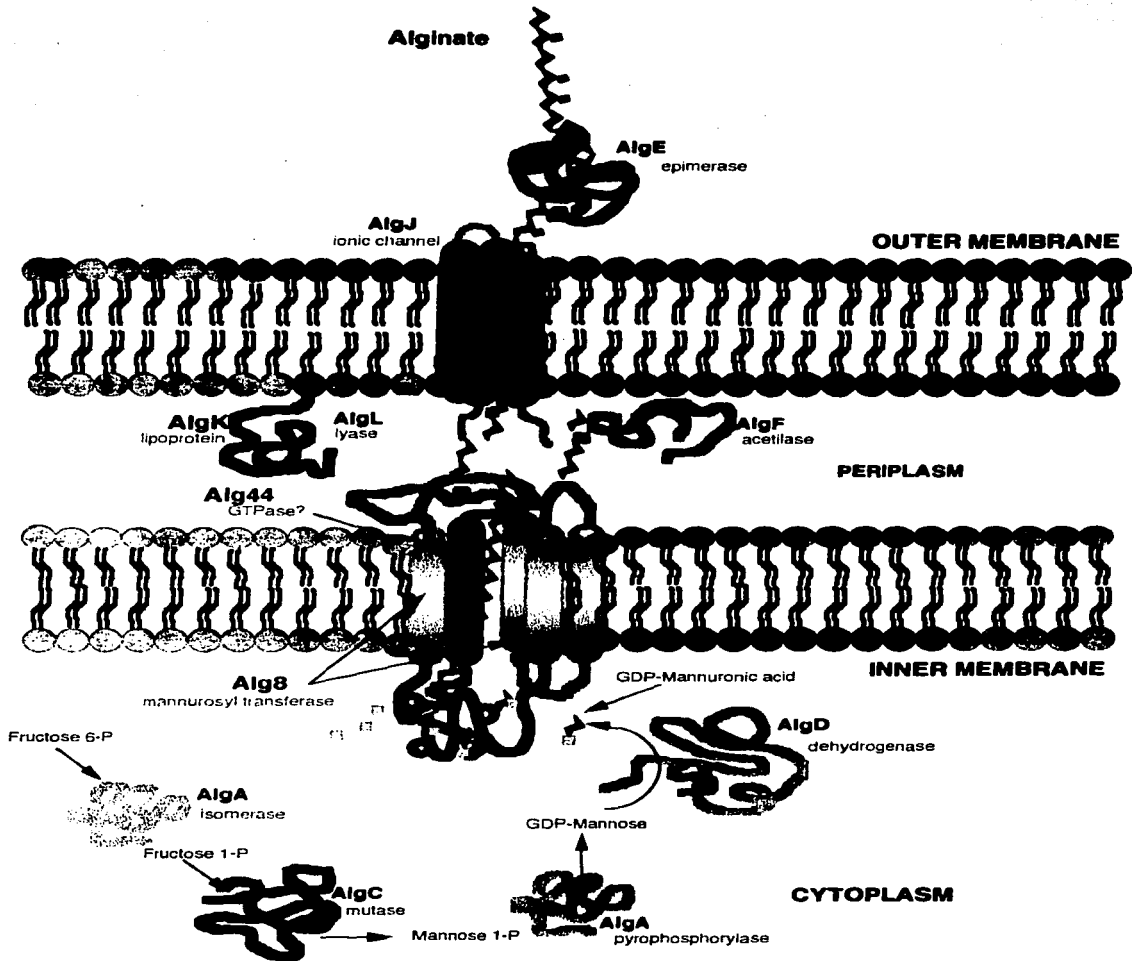
Figura 13.- Microscopía electrónica de las células de *A. vinelandii* ATCC 9046 y LA 21. a) muestra una célula de la cepa ATCC 9046 donde se puede apreciar la estructura en formación de las capas exina (EX) e intina (IN) rodeando el cuerpo central (CB). Dentro de la célula se observan granulos de PHB. b) Una célula de la cepa mutante LA 21 del mismo tiempo de tratamiento (48 hr) para inducción a enquistamiento como se sometió a ATCC 9046. En ella están ausentes tanto las hebras de alginato como las capas de intina y exina, los granulos blancos son formaciones de PHB. La barra — indica 0.4 μ .

terminal sin afectar la orientación de los sitios catalíticos dentro del segmento citoplásmico, lo que permite estar en contacto con las unidades a polimerizar.

El análisis de la estructura secundaria realizado por Saxena y col. (1995), para Alg8 de *P. aeruginosa*, y los alineamientos realizados con su homóloga de *A. vinelandii*, predicen que ambas son β -glicosil transferasas del tipo procesivas. La adquisición del *software* HCA utilizado por estos colegas, y amablemente transferido vía correo electrónico (FTP) por B. Henrissat, nos permitió realizar el análisis HCA a Alg8 de *A. vinelandii*, indicándonos que sus estructuras secundarias (dominios) también están conservadas.

No obstante el carácter esencial, de la proteína Alg44, no fue posible obtener un alineamiento significativo con alguna proteína de los bancos de datos (SwissProt, Prosite, etc). Los análisis BLASTP no produjeron calificaciones significativas para relacionarla con alguna familia de proteínas. Sin embargo, la búsqueda de patrones específicos entre familias de proteínas, realizada mediante el programa Motifs del Wisconsin Package, sugieren que Alg44 puede ser una subunidad ATPasa o GTPasa de Alg8, ya que presenta una región transmembranal desde el residuo 164 al 179, con su porción amino terminal orientada hacia el citoplasma, precisamente donde el motivo de unión a GTP/ATP de Alg44 está presente. Curiosamente, Alg44 de *P. aeruginosa* también conserva este motivo y además el segundo motivo en su región carboxilo terminal (orientado al periplasma), el cual es un sitio de unión a zinc típico de ciertas carboxipeptidasas, lo que nos sugiere que esta proteína podría ser catalizada por este metal para realizar su papel. La ausencia de un motivo para sitio de unión a GTP/ATP en Alg8, refuerza la idea de que Alg44 puede ser una subunidad que participa en el transporte activo de la cadena polimánurónica (figura 13).

La tercera fase abierta de lectura o FAL, la cual codifica para una lipoproteína periplásmica, inicia su región codificadora con un codón GTG (una valina), lo cual es poco común entre los genes de *A. vinelandii*. Igualmente poco común es su codón de término TAG, el cual es el menos usado y el más débil de los tres, entre los codones de término de muchas bacterias gram negativas (Farabaugh, 1996). Sin embargo, se puede observar que en la misma fase abierta de lectura, 5 codones más adelante y sobrelapándose con el codón de inicio ATG de *algJ* hay un codón más fuerte TGA. El gen homólogo *algK* en *P. aeruginosa* presenta un sitio de unión a ribosoma (RBS: del inglés Ribosome Binding Site, figura 6) muy débil, si consideramos el carácter esencial de este gen, lo cual no fue aclarado para esta bacteria (Aarons, *et al* 1997). En cambio, en *A. vinelandii*, el RBS está bien definido; lo que está de acuerdo con su requerimiento traduccional.



CONCLUSIONES.-

- 1) La organización de genes *alg* de la Región I en *A. vinelandii* (genes *alg* vecinos de *algD*), identificados por secuencia, es esencialmente similar al arreglo de los mismos en el genoma de *P. aeruginosa*.
- 2) Las diferencias que presenta la Región I de *A. vinelandii* con respecto a la de *P. aeruginosa*, son de tipo funcional: es una segunda unidad transcripcional independiente de *PalgD*, la cual inicia su transcripción en *alg8* e incluye por lo menos a los siguientes tres genes: *alg44*, *algK* y *algJ*.
- 3) Hemos mostrado evidencias estructurales de que Alg8 puede funcionar como una β -glicosil transferasa polimerizadora de residuos manurónicos y Alg44 como una potencial subunidad de Alg8 que promueve el transporte activo del polimanurónico.
- 4) Proponemos que AlgK es una lipoproteína esencial, unida a la membrana externa por el lado periplásmico, que muy probablemente participa en la incorporación de AlgJ en la membrana externa.
- 5) Para *algJ*, el último gen de la Región I, experimentalmente no se observó ningún inicio de la transcripción como se predijo. Por lo tanto, es probable que sea transcrito en forma de operón desde *alg8*.
- 6) La inserción del Tn5 en el genoma de la cepa LA 21 de *A. vinelandii*, interrumpió un gen esencial y afectó polarmente otros genes *alg*, por lo cual esta cepa presenta un fenotipo no mucóide. Así mismo, el fenotipo de las mutantes no polares construídas de cada gen identificado, son evidencia del carácter esencial de estos, ya que los fenotipos observados en las respectivas cepas son no mucóides.
- 7) La cepa LA 21, mutagenizada con el Tn5, es incapaz de formar las capas de intina y exina, por lo cual no puede llevar a cabo el proceso de enquistamiento.

BIBLIOGRAFIA.-

- Anderson, A. J., A. J. Hacking and E. A. Dawes. 1987. Alternative pathways for the biosynthesis of alginate from fructose and glucose in *Pseudomonas mendocina* and *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microb.* **133** pp 1045-1052.
- Annison, G. and I. Couperwhite. 1986. Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Microb. Biotech.* **25** pp 55-61.
- Aarons, S. J., I. W. Sutherland, A. M. Chakrabarty and M. P. Gallagher. 1997. A novel gene, *algK*, from the alginate biosynthetic cluster of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* **143**. 641-652.
- Atkinson, M. R. and S. H. Fisher. 1991. Identification of genes and gene products whose expression is activated during nitrogen-limited growth in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173** pp 23-27.
- Baynham, P.J. and D. J. Wosniak. 1996. Identification and characterization of AlgZ, an AlgT-dependent DNA-binding protein required for *Pseudomonas aeruginosa* *algD* transcription. *Mol. Microbiol.* **22** pp 97-108.
- Bibb, M. J., P.R. Findlay and M.W. Johnson. 1984. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene.* **30** pp 157-166.
- Boucher J. C., J. Martinez-Salazar, M. J. Schurr, M. H. 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** pp 511-523.
- Boyd, A. and A. M. Chakrabarty. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *J. Ind. Microb.* **15** pp162-168.
- Boyd, A., M. Ghosh, T. B. May, D. Shinabarger, R. Keogh and A. M. Chakrabarty. 1993. Sequence of the *algL* gene of *Pseudomonas aeruginosa* and purification of its alginate lyase product. *Gene.* **131** pp 1-8.
- Boylan, S. A., A. R. Redfield and C. W. Price. 1993. Transcription factor σB of *Bacillus subtilis* controls a large stationary-phase regulon. *J. Bacteriol.* **175** pp 3957-3963.
- Boyer, H. B. and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41** pp 459-472.
- Brivonese, A. C. and I. W. Sutherland. 1989. Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Appl. Microb. Biotech.* **30** pp 97-102.
- Campos, M. E., J. M. Martinez-Salazar, L. Lloret, S. Moreno, C. Nuñez, G.

- Espfn, and G. Soberón-Chávez. 1996. Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol* **178** pp1793-1799.
- Chakrabarty, A. M. 1994. Molecular Genetics and Environmental Regulation of Alginate Biosynthesis. *Apply Phycology*. (Forum) **8** pp1-6.
- Chitnis, C. E. and D. E. Ohman 1990. Cloning of *Pseudomonas aeruginosa algG*, wch controls alginate structure. *J. Bacteriol*. **172** pp 2894-2900.
- Chitnis, C. E. and D. E. Ohman. 1993 Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure. *Mol. Microb*. **8** pp 583-590.
- Chu, L., T. B. May, A. M. Chakrabarty and T. K. Misra 1991. Nucleotide sequence of the *algE* gene involved in alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*. **107** pp 1-10.
- Covarrubias L., and Bolivar F. 1982. Construction and characterization of new cloning vehicles: plasmid pb329, a new derivative of pbr328 lacking the 482-base-pair inverted duplication. *Gene* (1982) **17**: 79-89
- Darzens, A. and A.M. Chakrabarty 1984. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. **159** pp 9-18.
- Deretic, V., J. F. Gill and A. M. Chakrabarty. 1987. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: nucleotide sequence and transcriptional regulation of the *algD* gene. *Nucleic Acids Res*. **15** pp 4567-4581.
- Deretic, V., R. Dikshit, W. M. Konyecsni, A. M. Chakrabarty and T. A. Misra. 1989. The *algR* gene, which regulates mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, belongs to a class of environmentally responsive genes. *J. Bacteriol*. **171** pp 1278-1263.
- Deretic, V. and W. M. Konyecsni. 1989. Control of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: transcriptional regulation of *algR* and identification of the second regulatory gene, *algQ*. *J. Bacteriol*. **171** pp 3680-3688.
- Deretic, V. and W. M. Konyecsni. 1990. A procaryotic regulatory factor with a histone H1-like carboxy-terminal domain: Clonal variation of repeats within *algP*, a gene involved in regulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. **172** pp 5544-5554.
- Deretic, V., J. R. W. Govan, W. M. Konyecsni and D. W. Martin. 1990. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: mutations in the *muc* loci affect transcription of the *algR* and *algD* genes in respons to environmental stimuli. *Mol. Microb*. **4** pp 182-196.
- Deretic, V., C. D. Mohr and D. W. Martin. 1991. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: signal transduction and histone-like elements in the regulation of bacterial virulance. 1991. *Mol. Microb*. **5** pp 1577-1583.

- Deretic, V., M. J. Schurr., J. C. Boucher and D. W. Martin. 1994. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: Environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J. Bacteriol.*
- Ertesvåg, H., B. Doseth, B. Larsen, G. Skjåk-Bræk, and S. Valla. 1994. Cloning and expression of an *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase gene. *J. Bacteriol.* **176** pp 2846-2853.
- Ertesvåg, H., H. K. Hoidal, I. K. Hals, A. Rian, B. Doseth and S. Valla. 1995. A family of modular type mannuronan C-5-epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacte vinelandii*. *Mol. Microbiol.* **16** pp 719-731.
- Farabaugh, P. J. 1996. Programmed translational frameshifting. *Microbiol. Rev.* **60** pp 103-134.
- Fellay, R., J. Frey and H. Krisch. 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. *Gene* **52** pp 147-154.
- Fialho, A. M., N. A. Zielinski, W. F. Fett, A. M. Chakrabarty and A. Berry. 1990. Distribution of alginate gene sequences in the *Pseudomonas* rRNA homology group I-Azomonas-Azotobacter lineage of superfamily B prokaryotes. *Appl. Env. Microb.* **56** pp 436-443.
- Flynn, J. L. and D. E. Ohman. 1988. Cloning of genes from mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with control spontaneous conversion to the alginate producing phenotype. *J. Bacteriol.* **170** pp 1352-1360.
- Figursky, D. H. and D. R. Helinsky. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent of plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** pp 1648-1652.
- Franklin, M. J., C. E. Chittnis, P. Gacesa, A. Sonesson, D. C. White and D. E. Ohman. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* AlgG is a polymer level alginate C5 mannuronan epimerase. *J. Bacteriol.* **176** pp 1821-1830.
- Franklin, M. 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** pp 5057-5065.
- Fujiwara, S. and A. N. Chakrabarty. 1994. Post-transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa algC* gene. *Gene.* **146** pp 1-5.
- Gill, J. F., V. Deretic and A. M. Chakrabarty. 1986. Overproduction and assay of *Pseudomonas aeruginosa* phosphomannosa isomerase. *J. Bacteriol.* **167** pp 611-615.
- Gacesa, P., and J. B. Goldberg. 1993. Heterologous expression of an alginate lyase gene in mucoid and no-mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* **138** pp 1665-1670.
- Goldberg, J.B., M.J. Coyne, A.N. Neely and I.A. Holder. 1995. Avirulence of a *Pseudomonas aeruginosa algC* mutant in a burned-mouse model of

- infection. *Infect Immun.* **63** pp 4166-4169.
- Goldberg, J. B. and D. E. Ohman. 1987. Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa algB* mutants: Role of *algB* in high-level production of alginate. *J. Bacteriol.* **169** pp 1593-1602.
- Goldberg, J. B. K. Hatano and G. B. Pier. 1993. Synthesis of Lypopolysaccharide O side chains by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 requires the enzyme phosphomannomutase. *J. Bacteriol.* **175** pp 1605-1611.
- Goldberg, J. B. and T. Dahnke. 1992. *Pseudomonas aeruginosa* AlgB, which modulates the expression of alginate, is a member of the NtrC subclass of prokaryotic regulators. *Mol. Microbiol.* **6** pp 59-66.
- González-Lopez, J., Salmerón, V., Martínez-Toledo M., Ballesteros, F. and A. Ramos Cormenzana. 1986. Production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC12837 in chemical defined media and dialyzed soil media. *Soil Biol. Biochem.* **18** pp 119-120.
- Hardie, K. R., S. Lory, and A. P. Pugsley. 1996. Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO, J.* **15**: 978-988.
- Hassett, D. J., M. L. Howell, U. A. Ochsner, M. L. Vasil, Z. Johnson, and G. Dean. 1997a. An operon containing *fumC* and *sodA* encoding fumarase C and manganese superoxide dismutase is controlled by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: *fur* mutants produce elevated alginate levels. *J. Bacteriol.*, **179** pp 1452-1459.
- Hassett, D. J., M. L. Howell, P. A. Sokol, M. L. Vasil, and G. Dean. 1997b. Fumarase C activity is elevated in response to iron deprivation and in mucoid, alginate producing *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of *fumC* and purification of native FumC. *J. Bacteriol.*, **179** pp 1442-1451.
- Haug, A. and B. Larsen. 1971. Biosynthesis of alginate. Part II. Polymannuronic acid C-5 epimerase from *Azotobacter vinelandii* (Lipman). *Carbohydr. Res.* **17** pp 297-308.
- Horan, N.J., T. R. Jarman and E. A. Dawes. 1983. Studies on some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *J. General Microb.* **129** pp 2985-2990.
- Kennedy, C., R. Gamal, R. Humphrey, J. Ramos, K. Bringle and D. Dean. 1986. The *nifH*, *nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: Characterization by Tn5 mutagenesis and Isolation from pLAFRI gene banks. *Mol. Gen. Genet.* **205** pp 318-325.
- Kennedy, C. and A. Toukdarian. 1987. Genetics of Azotobacters: Applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* **41** pp 227-258.
- Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.*

1 pp 220-225.

- Larsen, B. and A. Haug. 1971. Biosynthesis of alginate. Part I. Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*, Carbohydr. Res. **17** pp 287-296.
- Leitao, J.H. and I. Sa-Correia. 1994. Growth-phase-dependent alginate synthesis, activity of biosynthetic enzymes and transcription of alginate genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Arch. microbiol. **163** pp217-222.
- Lloret, L., R. Barreto, R. León, S. Moreno, J. Martínez-Salazar, G. Espín and G. Soberón-Chavez. 1996. Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes identification of two independent promoters. Mol. Microbiol. **21** pp
- Maharaj, R., T. B. May, S-K. Wang and A. M. Chakrabarty. 1993. Sequence of the *alg8* and *alg44* genes involved in the synthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. Gene. **136** pp 267-269.
- Maia, M., Sánchez, J. M. and G. R. Vela. 1988. Plasmids on *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **170** pp 1984-1985.
- Maldonado, R., A. Garzón. D. R. Dean and J. Casadesus. 1992. Gene dosage analysis in *Azotobacter vinelandii*. Genetics **132**, pp 869-878.
- Manna, A. C. and H. K. Das. 1993. Determination of the size of the *Azotobacter vinelandii* chromosome. Mol. Gen. Genet. **241** pp 719-722.
- Martin, D. W., B. W. Holloway and V. Deretic. 1993a. Characterization of a locus Determining the mucoid status of *Pseudomonas aeruginosa*: AlgU shows sequence similarities with a *Bacillus* sigma factor. J. Bacteriol. **175** pp 1153-1164.
- Martin, D. W., M. J. Schurr, M. H. Mudd, J. R. W. Govan, B. W. Holloway and V. Deretic. 1993b. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. Proc. Natl. Acad. Sci. **90** pp 8377-8381.
- Martin, D. W., M. J. Schurr, M. H. Mudd and V. Deretic. 1993c. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* into the alginate producing form: Inactivation of *mucB* causes conversion to mucoidy. Mol. Microbiol. **9** pp 497-506.
- Martinez-Salazar, J. M., S. Moreno, R. Nájera, J. C. Boucher, G. Espín, G. Soberón-Chávez, 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** pp
- May B. T., D. Shinabarger, R. Maharaj, J. Kato, L. Chu, J. de Vault, S. Roychoudhury, N. A. Zielinski, A. Berry, R. K. Rothmel, T. K. Misra and A. M. Chakrabarty. 1991. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. Clin. Microb. Rev. **4** pp 191-206.

- Mejía-Ruiz, C. H. 1994. Obtención de mutantes de *Azotobacter vinelandii* con defectos en la producción de alginatos. Tesis de Maestría en Biotecnología. Instituto de Biotecnología UNAM. Mex.
- Mejía-Ruiz, C. H., J. Guzmán, S. Moreno, G. Soberón-Chávez, and G. Espín. 1997a. The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis and they constitute an *algD*-independent operon. *Gene*. *in press*.
- Mejía-Ruiz, C. H., S. Moreno, J. Guzmán, R. Nájera, R. León, G. Soberón-Chávez, and G. Espín. 1997b. Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant which is impaired in alginate excretion and encystment. *FEMS Microbiol. submitted*.
- Mohr, C. D., D. W. Martin, W. N. Konyecsni, J. R. W. Govan, S. Lory and V. Deretic. 1990. Role of the Far-upstream sites of the *algD* promoter and the *algR* and *rpoN* genes in environmental modulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **172** pp 6576-6580.
- Mohr, C. D., N. S. Hibler and V. Deretic. 1991. AlgR, a response regulator controlling mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, Binds to the FUS sites of the *algD* promoter located unusually Far Upstream from the mRNA start site. *J. Bacteriol.* **173** pp 5136-5143.
- Mohr, C. D., J. H. J. Leveau, D. P. Krieg, N. S. Hibler and V. Deretic. 1992. AlgR-Binding Sites Within the *algD* promoter make up a set of inverted repeats separated by a large intervening segment of DNA. *J. Bacteriol.* **174** pp 6624-6633.
- Monday, S. R. and N. L. Schiller. 1996. Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: the role of AlgL (alginate lyase) and AlgX. *J. Bacteriol.* **178** pp. 625-632.
- Moreno, S. J. Guzmán, R. Nájera, G. Soberón-Chávez, G. Espín. 1997. The alternative sigma factor AlgU (an homologue of *Escherichia coli* σE) is essential for encystment in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol. submitted*.
- Murata, K., T. Inose, T. Hisano, S. Abe, Y. Yonemoto, T. Yamashita, M. Takagi, K. Sakaguchi, a Kimura and T. Imanaka. 1993. Bacterial alginate lyase: Enczymology, genetics and application. *J. Ferm. and Bioeng.* **76** pp 427-437.
- Nagpal, P., M. A. Reddy and H. K. Das. 1989. Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **171** pp 3133-3138.
- Narahashi, Y. 1990. The amino acid sequence of zinc-carboxypeptidase from *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.* **107** pp 879-886.
- Pace, G. W. and R. C. Righelato. 1980. Production of extracellular microbial polysaccharides. *Adv. Biochem. Eng.* **15** pp 41-70.
- Page, W. and O. Knosp. 1989. Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Env.*

- Microbiol. **55**, pp 1334-1339.
- Page, W. and H. L. Sadoff. 1975. Relationship between calcium and *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **122** pp 145-151.
- Page, W. and H. L. Sadoff. 1976. Physiological factors affecting transformation in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **125** pp 1080-1087.
- Pindar, D. F. and C. Bucke. 1975. The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. Biochem. Journal. **152**, pp 617-622.
- Pugashetti, B. K., L. Vadas, H. S. Prihar and D. S. Feingold. 1983. GDP-manosa dehydrogenase and biosynthesis of alginate-like polysaccharide in a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **153** pp 1107-1110.
- Rehm, B.H.A., G. Boheim, J. Tommassen, and U. K. Winkler. 1994. Overexpression of *algE* in *Escherichia coli*: Subcellular localization, purification, and ion channel properties. **176**, pp 5639-5647.
- Rehm, B.H.A. 1996. The *Azotobacter vinelandii* gene *algJ* encodes an outer-membrane protein presumably involved in export of alginate. Microbiol. **142** pp 873-880.
- Rehm, B.H., H. Ertesvag, and S. Valla. 1996. A new *Azotobacter vinelandii* C-5 epimerase gene (*algG*) is part of an *alg* gene cluster physically organized in a manner similar to that in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **178** pp 5884-5889.
- Ruppen, M.E., G. Garner, H.L. Sadoff. 1983. Protein turnover in *Azotobacter vinelandii* during encystment and germination. J. Bacteriol. **156** pp. 1243-1248.
- Sadoff, H. 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. Bacteriol. Rev. **39** pp 516-539.
- Sammbrook, L. Fritsch, E. F. and T. Maniatis 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saxena, I. M., R. M., Brown Jr, M. Fevre, R. A. Geremia, and B. Henrissat. 1995. Multidomain architecture of β -glycosyl transferase: Implications for mechanism of action. J. Bacteriol. **177**, pp 1419-1424.
- Schiller, N. L., S. R. Monday, C. M. Boyd, N. T. Keen and D. E. Ohman. 1993. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* Alginate Lyase gene (*algL*): cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **175** pp 4780-4789.
- Schurr, M. J., D. W. Martin, M. H. Mudd, N. S. Hibler, J. C. Boucher and V. Deretic. 1993. The *algD* promoter: Regulation of alginate production by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Cell. Mol. Biol. Res. **39** pp 371-376.
- Schlichtman, D., M. Kubo, S. Shankar and A. M. Chakrabarty. 1995. Regulation of nucleoside diphosphate kinase and secretible virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: Roles of *algR2* and *algH*. J. bacteriol. **177** pp

FROM THE LIBRARY OF THE
 NATIONAL ARCHIVES
 COLLEGE PARK, MARYLAND

2469-2474.

- Shinabarger, D., T. B. May, A. Boyd, M. Ghosh and A. M. Chakrabarty. 1993. Nucleotide sequence and expression of the *Pseudomonas aeruginosa algF* gene controlling acetylation of alginate. *Mol. Microbiol.* **9** pp 1027-1035.
- Simon, R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by in vitro constructed Tn5-Mob transposon. *Mol. Gen. Genet.* **196** pp 413-420.
- Skjåk-Bræk, G., B. Larsen and H. Grasdalen 1985. The role of O-acetyl groups in the biosynthesis of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Carbohydr. Res.* **145** pp 169-174.
- Skjåk-Bræk, G. and B. Larsen. 1985. Biosynthesis of alginate: purification and characterization of mannuronan C-5-Epimerase from *Azotobacter vinelandii*. *Carb. Res.* **139** pp 273-283.
- Smidsrød, O., G. Skjåk-Bræk and K. I. Draget 1991. First advanced course on alginates and their applications. Norway.
- Stevenson, L. H. and M. D. Scolofsky. 1966. Cyst formation and poly- β -hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *J. Bacteriol.* **91** pp 304-310.
- Stragier, P. 1991. Dances with sigmas. *J. EMBO* **10** pp 3559-3566.
- Sutherland, I. W. 1985. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Ann. Rev. Microb.* **39** pp 243-270.
- Sutherland, I. W. 1990. *Biotechnology of microbial exopolysaccharides.* Cambridge University Press.
- Valla, S. 1992. Comunicación Personal.
- Vazquez, A., B. Shen, K. Negaard, S. Iismaa & B. Burgess. 1994. Overexpression of ferredoxin I in *Azotobacter vinelandii*. *Protein Expr Purif* **5**: 96-102.
- Wang, S., I. Sa-Correia, A. Darzins and A. M. Chakrabarty. 1987. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate (*alg*) gene Region II. *J. Gen. Microb.* **133** pp 2303-2314.
- Wyss, O., G. M. Neumann and M. D. Scolofsky. 1961. Development and germination of the *Azotobacter* cyst. *J. Bioph. and Bioch. Cyt.* **10** pp 555-565.
- Wozniak, D. J. 1994. Integration host factor and sequences downstream of the *Pseudomonas aeruginosa algD* transcription start site are required for expression. *J. Bacteriol.* **176** pp 5068-5076.
- Yu, H., M. Mudd, J. C. Boucher, M. J. Schurr and V. Deretic. 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** pp 187-193.
- Zielinski, N. A., A. M. Chakrabarty and A. Berry. 1991. Characterization and

regulation of the *Pseudomonas aeruginosa algC* gene encoding phosphomannomutase J. Biol. Chem. **266** pp 9754-9763.

Zielinski, N. A., R. Maharaj, S. Roychoudhury, C. E. Danganan, W. Hendrickson and A. M. Chakrabarty. 1992. Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Environmental regulation of *algC* promoter. J. Bacteriol. **174** pp 7680-7688.

APENDICE I

Direcciones consultadas en las paginas de Internet.

1) Análisis BLAST (X):

<http://www.genome.ad.jp/SIT/BLAST.html>

<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/protein-search.html>

(BLAST-BEAUTY)

2) Predicción de estructuras secundarias:

<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/>

<http://www.pasteur.fr/other/biology/english/analysis-tools-uk.html#predict-struct>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/#submission>

<http://www.biokemi.su.se/~server/DAS/>

Definición de Topología*.

- The topology of integral membrane proteins with transmembrane helices describes the orientation of the helices with respect to the membrane:

OUT: first residue (N-term) starting extra-cytoplasmic, i.e. outside of the membrane.

IN: first residue starting intra-cytoplasmic, i.e. inside.

* http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/Dtab/phd_htmktop.html

The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis and they constitute an *algD*-independent operon

**Humberto Mejía-Ruiz, Josefina Guzmán, Soledad. Moreno, Gloria Soberón-Chávez, Guadalupe Espin*.
Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3,
Cuernavaca 62250 Morelos, México**

Key words: transcription analysis, alginate polymerase gene

* Corresponding author. Tel: (52) (73) 291644. Fax (52) (73) 172388
E-mail: espin@ibt.unam.mx

Abbreviations: aa, amino acid(s); bp, base pair(s); kb, kilobase(s); kDa, kilodalton; BS (medium), Burk's sucrose (medium); nt, nucleotide(s); ORF, open reading frame; Km, kanamycin; R, resistant/resistance; A., *Azotobacter*; A.,, *Azorhizobium*; B., *Bacillus*; P., *Pseudomonas*.

Abstract

A 2.8 kb DNA region located immediately downstream of *algD* contains the *A. vinelandii* *alg8* and *alg44* genes, whose sequences are highly homologous to those of the corresponding *Pseudomonas aeruginosa* genes. These genes occur on a transcript that does not include *algD*, and are transcribed from a promoter different to those transcribing *algD*; this is the fourth promoter described within the alginate biosynthetic gene cluster. *alg8* and *alg44* mutants were constructed and shown to be completely impaired in alginate production. Alg8 shares 28.20% identity and 38.09% similarity to *Azorhizobium caulinodans* NodC, a glycosyl transferase catalyzing the formation of β -1,4 linkages. A topological model is predicted which supports the idea of Alg8 being the polymerase responsible for alginate synthesis.

1. Introduction

Azotobacter vinelandii is a soil bacterium which undergoes a differentiation process to form desiccation resistant cysts. Alginate is a linear copolymer composed of β -1,4-linked D-mannuronic and its C-5 epimer L-guluronic acid. The study of alginate biosynthesis in *A. vinelandii* has basic and biotechnological significance. Since alginate is an industrial polymer, *A. vinelandii* can be used for the production of defined alginates by fermentation. Production of alginate causes a mucoid phenotype and is essential for cyst formation (Campos et al., 1996). The alginate biosynthetic pathway in *A. vinelandii* has been elucidated (Pindar and Bucke, 1975). Fructose-6-P is converted through the action of four enzymatic steps to GDP-mannuronic acid, the polymerase activated substrate; the resultant polymannuronic acid is modified by an O-acetylase, secreted and converted to alginate by an extracellular epimerase (Pindar and Bucke, 1975; Haug and Larsen, 1971). A similar pathway operates in *Pseudomonas aeruginosa*, another alginate producing bacterium (May and Chakrabarty, 1994). In *P. aeruginosa* all known genes whose products participate in the synthesis (*algA*, *algD*), modification (*algF* *algI* *algJ* *algL* *algG*), and export (*algE*) of alginate are clustered (May et al., 1991), and organized in a polycistronic operon transcribed from the *algD* promoter (Chitnis and Ohman, 1993; Franklin and Ohman, 1996), except for *algC* whose product catalyzes the second enzymatic step in alginate synthesis. Transcription from the *algD* promoter is dependent on the AlgU sigma factor (Martin et al., 1993). *algB* and *alg44*, whose functions are unknown, are also located within this cluster between *algD*

and *algE*. They encode proteins with a high content of hydrophobic residues suggesting a membrane location. These two proteins have been proposed to be involved in alginate polymerization (Maharaj et al., 1993).

Hydrophobic cluster analysis (HCA) of several glycosyl transferases revealed the presence of two conserved domains named A and B (Saxena et al., 1995). Domain A was present in all the sequences analyzed. Two polar Asp residues are conserved in domain A, while in domain B, which is present only in processive glycosyl transferases, a single conserved Asp residue is present, along with the sequence motif QXXRW. These two domains are present in *P. aeruginosa* Alg8 (Saxena et al., 1995).

A. vinelandii has a cluster of alginate biosynthetic genes similar to that of *P. aeruginosa* (Campos et al., 1996; Lloret et al., 1996; Rehm et al., 1996), but it is organized in at least two transcriptional units: one including *algD* transcribed from p1, a σ^D type promoter, and p2, a putative AlgU (σ^E) promoter (Campos et al., 1996). The other operon contains the *algL* and *algA* genes (Lloret et al., 1996). In this study we report the presence of *alg8* and *alg44* downstream of *algD*, and show that inactivation of these genes abrogates alginate production. We also report evidence for the presence of a promoter that allows transcription of *alg8* and *alg44*. This represents the third operon within the alginate biosynthetic gene cluster. Evidence is presented suggesting that Alg8 is a glycosyl transferase. Also, we constructed a model of Alg8 as a transmembrane protein with a long cytoplasmic loop containing the three Asp residues conserved in processive glycosyl transferases.

2. Materials and Methods.

2.1. Microbiological procedures.

The bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *A. vinelandii* strains were routinely grown in BS medium (Kennedy et al., 1986) at 30 °C. *A. vinelandii* transformation was performed as reported by Bali et al., (1992). Triparental matings were performed as reported previously (Kennedy et al., 1986).

Alginate production was determined in liquid cultures by measuring its dry weight. A 10 ml sample of the culture was centrifuged at 12000 rpm for 10 min. 2 ml of isopropanol were added to the supernatant to precipitate the alginate, the precipitate was filtered and dried. All measurements were done in triplicate.

2.2. Nucleic acids procedures.

DNA isolation and cloning, Southern blotting, slot blot hybridization of RNA, and primer extension were performed by standard procedures (Sambrook et al., 1989). Plasmids pAHS, pAHB and pAH3.6 were used to determine the *alg8* and *alg44* nucleotide sequence using a Thermosequenase sequencing kit (U.S. biochemical). Primer extension was carried out with RNA extracted from strain ATCC 9046 which was grown for 48 h in BS medium, with the oligonucleotide underlined in Fig. 2.

2.3. Construction of strains JG8 and JG44.

Plasmid pMSD27 (Fig. 1) which carries a 5.5 kb *Pst*I DNA fragment including *algD* and *alg8*, was used to construct an *alg8::Km* mutation. A 2 kb fragment containing a kanamycin-resistant gene (*km*) from plasmid pHP45 Ω -Km (Fellay et. al., 1987) was used to replace a 165 bp *Eco*R1 fragment corresponding to *alg8*. The resultant plasmid was named pJG8 (Fig. 1). Plasmid pAH3.6 (Fig. 1) was used to introduce the same 2 kb kanamycin fragment into the *Bgl*II site within *alg44*, to create an *alg44::km* mutation, the resulting plasmid is pJG44 (Fig.1). These plasmids which are unable to replicate in *A. vinelandii* were introduced into strain ATCC 9046, and kanamycin resistant transformants were selected. Strains JG8, and JG44 were isolated and the site of the Km cassette was confirmed by Southern blot analysis (data not shown).

3. Results and discussion

3.1. Nucleotide sequence of the *alg8* and *alg44* genes.

In order to identify additional genes required for alginate synthesis, we sequenced the *A. vinelandii* region downstream of *algD*, which was subcloned from plasmid pMSD675 (Table 1), on plasmid pBluescript II KS+ to give plasmids pAH3.6, pAHS and pAHB (Fig. 1). These plasmids together with pMSD27 were used to sequence 2834 nt. Two *orfs* homologous to *P. aeruginosa* *alg8* and *alg44* (Maharaj et al., 1993) were revealed (Fig. 2); *alg8* initiates 113 nt downstream of the TAA *algD* stop codon, while *alg44* starts 36 nt downstream of the *alg8* stop codon. Comparison of deduced

amino acid sequences with their homologous *P. aeruginosa* protein sequences revealed that Alg8 and Alg44 display 77.82% and 59.31% identity respectively, with the corresponding *P. aeruginosa* products.

3.2. Alginate production of *alg8* and *alg44* mutants.

In order to determine whether *alg8* and *alg44* were involved in alginate production in *A. vinelandii*, two mutant strains (JG8 and JG44) derived from ATCC 9046 mucoid strain carrying *alg8* and *alg44* mutations (Fig. 1) were constructed by reverse genetics as described in Methods. Both strains showed a non-mucoid phenotype, and do not produce alginate (Table 2), suggesting that their gene products are essential for alginate synthesis.

3.3. Transcriptional organization of *alg8* and *alg44*.

As expected, pMSD675, which carries the alginate gene cluster from *algD* to *algA*, restored mucoidy to strains JG8 and JG44 (Table 2). Plasmid pRSD1 a derivative of pMSD675 carrying an *algD* mutation (LLoret et al., 1996) also restored alginate production to these strains. (Table 2), suggesting that these genes can be transcribed from a different promoter to those of *algD*, although lack of polarity of the *algD* mutation in pRSD1 cannot be ruled out.

We have recently shown that the nonmucoid strain UW136 carries an insertion sequence which inactivates *algU* (Martinez et al., 1996), and that in this strain *algD* mRNA is undetectable (LLoret et al., 1996). Thus, if a

promoter located downstream of *algD* transcribes *alg8* and possibly *alg44*, *alg8* mRNA should be present in strain UW136. RNAs isolated from strains ATCC 9046, and UW136 were hybridized with the 165 bp *EcoRI* fragment internal to *alg8*. Both strains display *alg8* mRNA (Fig. 3A), supporting the idea that *alg8* can be transcribed from a different promoter to that of *algD*, and that this promoter does not depend on AlgU for its transcription. *alg8* mRNA was also detected in the *algD* mutant strain RSD1 (Fig. 3A). RNA isolated from strains ATCC 9046 and UW136 but not from JG8, hybridized with an *alg44* probe (Fig. 3B), indicating the absence of a promoter between *alg8* and *alg44*.; these data indicate that in *A. vinelandii* *alg8* and *alg44* can occur on a transcript that does not include *algD*. However, since no obvious signals for transcription termination are present between *algD* and *alg8*, transcription of *alg8* and *alg44* from the *algD* promoters can not be ruled out.

3.4. Identification of the *alg8* mRNA start site.

The presence of a promoter upstream of *alg8* was confirmed by primer extension analysis (Fig 3C). A mRNA start site was found 22 nucleotides upstream of the second ATG codon (Fig.2); this is the fourth promoter described within the alginate biosynthetic gene cluster; thus in *A. vinelandii* the transcriptional organization of the *alg* gene differs significantly from that of *P. aeruginosa*. The presence of a Shine-Dalgarno sequence upstream of the third but not the second ATG codon suggested to us that the third ATG codon is the translational start of the *alg8* gene (Fig 2). In *Bacillus subtilis* the consensus nucleotide sequence AGGTTTAA_N₁₄-

GGGTAT is recognized by RNA polymerase containing sigma factor σ^B (Engelman et al., 1995). The five underlined bases have been shown to be very important for promoter activity (Ray et al., 1985). A DNA sequence **AGGCTTAAN₁₅-GGCCAC** similar to that of promoters recognized by RNA polymerase containing σ^B is present at the *alg8* -10 and -35 region sequences. Similar to the *E. coli* σ^S , *B. subtilis* σ^B , is involved in the induction of genes during stationary phase and in response to various stress factors (Boylan et al., 1993; Mulvey et al., 1990; Schellhorn and Hassan, 1988; Engelmann et al., 1995). These data agrees with the observation that in *A. vinelandii* alginate is synthesized mainly during stationary phase (unpublished results).

3.5. Analysis of the Alg8 and Alg44 proteins deduced from DNA sequences.

Alg8 is a 51.6 kDa protein with a pI of 9.74 while Alg44 is a 42.4 kDa protein with a pI of 6.77. Alg8 and Alg44 hydrophobicity profiles, were analyzed by the method of Kyte and Doolittle (1982). This analysis suggested that Alg8, is located in the membrane. Besides *P. aeruginosa* Alg8 and Alg44, we found no extended identity between these proteins and any other protein in the GenBank (release 95), or EMBL (release 95) databases. Nevertheless, alignment of Alg8 with some glycosyl transferases showed 28.20% identity and 38.09% similarity to *Azorhizobium caulinodans* NodC, an *N*-acetylglucosamyl-transferase forming β -1,4 bonds in Nod factor synthesis (Geremia et al., 1994). The presence of two conserved domains in processive glycosyl transferases such as NodC was demonstrated by hydrophobic cluster analysis (HCA);

these domains were also shown to be present in *P. aeruginosa* Alg8 (Saxena et al., 1995). Moreover, three polar (Asp) conserved residues and a QXXRW motif present in these domains, which are presumably involved in the formation of β -linkages, are also conserved in *A. vinelandii* Alg8 (Fig. 2), suggesting that Alg8 is a processive glycosyl transferase involved in alginate polymerization.

3.6. Topological model.

We created a topological model of Alg8 based on the hydrophobicity profile, and the predicted transmembrane α -helices (ISREC server). The model shows that Alg8 may be a polytopic cytoplasmic membrane protein, which spans the membrane four times with a large cytoplasmic loop encompassing amino acid residues 29 to 348 (Fig.4). The three putative catalytic Asp residues mentioned above are located in the large cytoplasmic loop (Fig 4). A similar analysis of NodC predicted a polytopic protein with four transmembrane α -helices and a big cytoplasmic loop containing the catalytic Asp residues (data not shown).

A mechanism of the polymerization reaction, for processive glycosyl transferases transferring multiple sugar residues to acceptor, where three active sites bind three nucleotide diphosphosugars with the subsequent formation of two glycosidic bonds, has been proposed (Saxena et al., 1995). The three putative catalytic sites in the Alg8 protein are located in the large cytoplasmic loop (Fig.4), suggesting that the polymerization reaction must take place in the cytoplasm, where GDP-mannuronic acid is available.

4. Conclusions

- (1) The *A. vinelandii alg8* and *alg44* have been sequenced and the encoded proteins are highly homologous to the corresponding proteins of *P. aeruginosa*.
- (2) Insertion of a Km^R cassette in either gene abrogates alginate synthesis.
- (3) The *alg8* and *alg44* are present on a transcript that does not include *algD*
- (4) The *alg8* and *alg44* are transcribed from a promoter different to those transcribing *algD*, that resembles those promoters recognized by the *B. subtilis* αB .

Acknowledgements

This work was supported by grant IN212096 from DGAPA UNAM. C. H. Mejía-Ruiz would like to thank CONACyT (#87822) and PADEP (#030306) for financial support during work on his PhD. We thank Arturo Ocadiz for technical support.

References

- Bali, A., Blanco, G., Hill, S. and Kennedy, C. (1992) Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1711-1718.
- Boylan, S. A., Redfield, A. R., and Price, C. W. (1993) Transcription

- factor σ^B of *Bacillus subtilis* controls a large stationary-phase regulon. *J. Bacteriol.* 175, 3957-3963.
- Campos, M.E., Martínez-Salazar, J. M., Lloret, L., Moreno, S., Núñez, C., Espín, G. and Soberón-Chávez, G. (1996) Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 178, 1793-1799.
- Chitnis, C. E. and Ohman, D. E. (1993) Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure. *Mol. Microbiol.* 8, 583-590.
- Engelmann, S., Lindner, C. and Hecker, M. (1995) Cloning, nucleotide sequence, and regulation of *katE* encoding a σ^B -dependent catalase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177, 5598-5605.
- Fellay, R., Frey, J and Krisch, H. (1987) Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* 52, 147-154.
- Franklin, M. J. and Ohman, D. E. (1996) Identification of *algI* and *algJ* in the *Pseudomonas aeruginosa* alginate biosynthetic gene cluster which are required for alginate O-acetylation. *J. Bacteriol.* 178, 2186-2195.
- Geremia, R. A., Mergaert, P., Geelen, D., van Montagu, M. and Holsters, M. (1994) The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosamyl transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2669-2673.
- Haug, A. and Larsen, B. (1971) Biosynthesis of alginate. II. Polymannuronic acid C-5 epimerase from *Azotobacter vinelandii*.

Carbohydr. Res. 17, 297-308.

- Kennedy, C., Gamal, R., Humphey, R., Ramos, J., Brigle, K. and Dean, D. (1986) The *nifH*, *nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: characterization by Tn5 mutagenesis and isolation from pLARF1 gene banks. Mol. Gen. Genet. 205, 318-325.**
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. J. Mol. Biol. 157, 105-132.**
- Lloret, L., Barreto, R., Campos, M. E., Martínez-Salazar, J. M., Moreno, S., Espín, G. and Soberón-Chávez, G. (1996) Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two promoters. Mol. Microbiol. 21,449-457.**
- Maharaj, R., May, T. B., Wang, S. and Chakrabarty, A. M. (1993) Sequence of the *algB* and *alg44* genes involved in the synthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 136, 267-269.**
- Martin, D. W., Holloway, B. W. and Deretic, V. (1993) Characterization of a locus determining the mucoid status of *Pseudomonas aeruginosa*: AlgU shows sequence similarities with a *Bacillus* sigma factor. J. Bacteriol. 175, 1153-1164.**
- Martínez-Salazar, J. M., Moreno, S., Nájera, R., Boucher, J. C., Espín, G., Soberón-Chávez, G. and Deretic, V. (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. and Chakrabarty, A. M. (1994) *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. Trends. Microbiol. 2, 151-157.**

- May, T.B., Shinabarger, D., Maharaj, R., Kato, J., Chu, L., DeVault, J. D., Roychoudhury, S., Zielinsky, N. A. Berry, A., Rothmel, R. K., Misra, K. T. and Chakrabarty A. M. (1991) Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. Clin. Microbiol. Rev. 4, 191-206.
- Mulvey, M. R., Switala, J., Borys, A., and Loewen, P. C. (1990) Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172, 6713-6720.
- Pindar, D. F. and Bucke, C. (1975) The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. Biochem. J. 152, 617-622.
- Ray, C., Hay, R. E., Carter, H. L. and Moran, C. P. Jr. (1985) Mutations that affect utilization of a promoter in stationary-phase *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 163, 610-614.
- Rehm, H. A., Ertesvag, H. and Valla, S. (1996) A new *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase gene (*algG*) is part of an *alg* gene cluster physically organized in a manner similar to that in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 178, 5884-5889.
- Sadoff, H. L. (1975) Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. Bacteriol. Rev. 39, 516-539.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y.
- Saxena, I. M., Brown, R. M., Fevre, M., Geremia, R. A. and Henrissat, B. (1995) Multidomain architecture of β -glycosyl transferases: Implications for mechanism of action. J. Bacteriol. 177, 1419-1424.
- Schellhorn, H. E., and Hassan, H. M. (1988) Transcriptional regulation of *katE* in *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol. 170, 4286-4292.

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

Strains	Relevant characteristics	Source/ Reference
ATCC 9046	Highly mucoid <i>A. vinelandii</i>	Collection
UW136	<i>algU</i> nonmucoid <i>A. vinelandii</i>	Martinez et al., 1996
RSD1	<i>algD</i> nonmucoid <i>A. vinelandii</i>	Campos et al., 1996
JG8	<i>alg8::Km</i> derivative of ATCC 9046	This work
JG44	<i>alg44::Km</i> derivative of ATCC 9046	This work
Plasmids		
pMSD27	Plasmid containing <i>A. vinelandii</i> <i>algD</i> and <i>alg8</i>	Campos et al., 1996
pAH3.6	pBluescript II KS; <i>A. vinelandii</i> <i>alg44</i>	This work
pAHB	pBluescript II KS; <i>A. vinelandii</i> <i>alg</i>	This work
pAHS	pBluescript II KS; <i>A. vinelandii</i> <i>alg</i>	This work
pHP45Ω-Km	Km resistant	Fellay et al., 1987
pJG8	Derivative of pMSD27 carrying a disrupted <i>alg8</i> gene	This work
pJG44	Derivative of pAH3.6 carrying a disrupted <i>alg44</i> gene	This work
pSMD675	Cosmid containing 25 kb of <i>A. vinelandii</i> DNA including the <i>algD</i>, <i>algL</i> and <i>algA</i> genes	Campos et al., 1996
pRSD1	Derivative of pSMD675 carrying a disrupted <i>algD</i> gene	Lloret et al., 1996

Table 2. Alginate production and mucoidy

Strain	Mucoidy	Alginate* mg/ml
ATCC 9046	++	1.37 ± 0.1
JG8	-	0.001
JG8/pSMD675	+	0.55 ± 0.04
JG8/pRSD1	+	0.8 ± 0.02
JG44	-	0.001
JG44/pSMD675	+	N.D†.
JG44/pRSD1	+	N.D.

*Alginate was determined in liquid cultures incubated 24 h in BS.

† not determined

Legends to figures

Fig. 1. Physical-genetic map of the *algD*, *alg8* and *alg44* region in *A. vinelandii*, and plasmids constructed in this work. Arrows indicate direction of transcription. Letters are restriction sites: E, *EcoRI*; P, *PstI*; B, *BglI*.

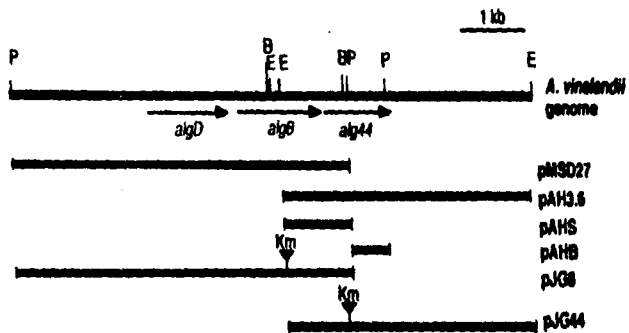
Fig. 2. DNA sequence of *alg8* and *alg44* and the deduced amino acid sequences. Asterisk (*) denotes a stop codon. The *algD* stop codon is indicated. The oligonucleotide used as primer for the identification of the mRNA start site is underlined. Arrow shows the identified mRNA start site. Shine-Dalgarno is boxed. The putative start methionine is circled. The conserved Asp residues and the common motif in processive glycosyl transferases are underlined. The DDBJ/EMBL/GenBank accession number for this sequence is Y08819.

Fig. 3. Slot-blot and primer extension analysis. (A) Slot blot of (1) *alg8* and (2) *alg44* mRNAs of different *A. vinelandii* strains. 10 μ g of total RNA were loaded into each slot. The *EcoRI* fragment used as *alg8* probe and the *PstI* fragment used as *alg44* probe were isolated from plasmids pMSD27 and pAHB respectively (Fig. 1). Primer extension (B) of the *alg8* gene in strain ATCC 9046 The *alg8* sequence ladder GATC was produced with the same oligonucleotide used for the primer extension which is undelined in Fig. 2.

Fig. 4. Transmembrane topology model of Alg8 based on its amino acid sequence. The structure shown consist of 4 α -helices (H1-H4), and 2 cytoplasmic loops (L1-L2). The three putative catalytic sites with the Asp

residues (D) are indicated (S1,S2 and S3).

The possible transmembrane α -helices were predicted by ISREC server (http://ulrec.unil.ch/software/TMPRED_form.html).



A

ATCC 9046

UW136

RSD1



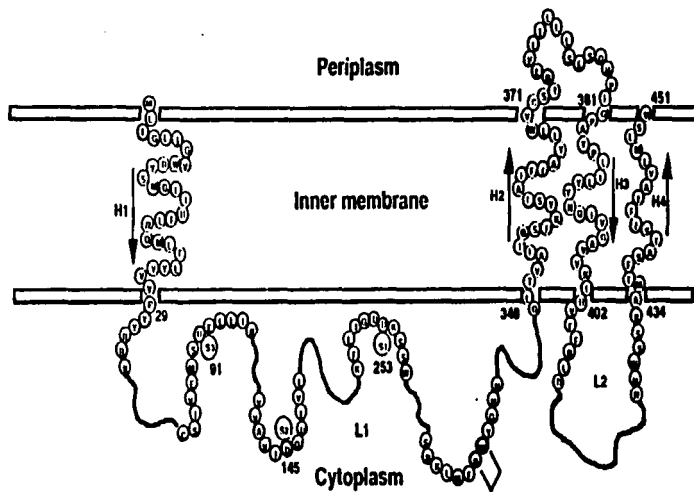
B

ATCC 9046

UW136

JG8





Title: Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant, and transcription analysis of the *algK*, *algJ* and *algG* genes

Authors: Humberto Mejía-Ruiz, Soledad Moreno, Josefina Guzmán, Rebeca Nájera, Renato León, Gloria Soberón-Chávez, and Guadalupe Espín*

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

***Corresponding author: Phone: (52) (73) 291644. Fax: (52) (73) 172388.**

Electronic mail address: espin@ibt.unam.mx

Abstract

Random Tn5 mutagenesis over *Azotobacter vinelandii* mucoid strain ATCC 9046 produced strain LA21, a non-mucoid, non-encysting mutant, carrying the Tn5 insertion within a gene homologous to *algK* from *Pseudomonas aeruginosa* encoding a periplasmic protein. *algK*, *algJ* and *algG* were shown to be transcribed as part of the *palg8-alg44-algK-algJ-algG* operon. A non-polar *algK* mutant was constructed and showed a non-mucoid phenotype, indicating that *algK* is essential for alginate production.

Key words: alginate/*algK* /transcription analysis

1. Introduction

Azotobacter vinelandii is a soil bacterium which forms metabolically dormant cysts (19). *A. vinelandii* mucoid strains produce the extra cellular polysaccharide alginate, which is essential for the encystment process, since it is a component of the cyst intine and exine layers (15).

In *A. vinelandii*, alginate is synthesized from fructose-6-P which is converted to GDP-mannuronic acid through four enzymatic steps; this is the activated substrate for polymerization, the resultant polymannuronic acid is secreted and modified by an *O*-acetylase and an extra cellular C-5-epimerase to give the final product alginate (6, 16). In *Pseudomonas aeruginosa* the alginate biosynthetic gene cluster is organized in the polycistronic operon *palgD-8-44-E-G-60-L-X-I-J-F-A* transcribed from the *algD* promoter (3)

A cluster of alginate biosynthetic genes similar to that described in *P. aeruginosa* has been characterized in *A. vinelandii* (2, 9, 12, 18). However this cluster is organized in at least three transcriptional units. One of them

includes *palgD* (2), the other two including *palg8-alg44* and *palgL-algA* respectively (9,12). Alg8 was proposed to be a glycosyltransferase involved in alginate polymerization (12) AlgJ the homologous of *P. aeruginosa* AlgE is an outer-membrane alginate-pore (17). Recently the *P. aeruginosa* *algK* gene coding a protein which is processed to give a mature protein located in the periplasm was described (1). Based on the position of the *alg8*, *alg44*, *algK* and *algE* genes in *P. aeruginosa*, which is similar to the genetic arrangement of other polysaccharide export systems, AlgK was proposed to act as a facilitator to translocate alginate across the periplasm (1).

We report here the isolation and characterization of strain LA21, which carries an *algK::Tn5* mutation. We show that *algK* is located between *alg44* and *algJ*, and together with *algJ* and *algG* is transcribed from the *alg8* promoter. The *algK* mutation was shown to severely reduce alginate production, and to impair encystment.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and media

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *A. vinelandii* was grown in PY medium (peptone 5.0 g/l, yeast extract 3.0 g/l), or Burk's nitrogen-free salts with 2% sucrose (BS) or 0.2% *n*-butanol BB (7) at 30°C.

2.2. Alginate determination

Bacterial strains were grown on liquid BS medium for 24 h, 100 ml culture samples were centrifuged and washed with 10 ml of 0.85% Na Cl solution. Alginate was precipitated from the supernatants of cultures and washed cells with two volumes of isopropanol, and its concentration determined by

the modified carbazole method (8)

2.2. *Tn5* mutagenesis

Mobilizable suicide plasmid pSUP5011, carrying *Tn5::mob* (20) was transferred by conjugation into *A. vinelandii* strain ATCC 9046. Matings were done on PY plates incubated overnight at 30°C. The cells were resuspended in liquid BSKm. Samples were plated on BSKmNal plates after two days of shaking incubation at 30°C, *A. vinelandii* kanamycin resistant derivatives were isolated.

2.3 Nucleic acid procedures

DNA isolation and cloning, RNA dot blotting, and Southern blot procedures were carried out as described (10). DNA sequencing was done with the Thermosequenase kit (United States Biochemical), according to the manufacturer's instructions.

2.4. Mapping of the *Tn5* insertion site

Total DNA from strain LA21 was digested with *EcoRI*, ligated into pBR329, and transformed into *E. coli* DH5 α , one transformant resistant to Km was isolated and shown to contain a pBR329 derivative carrying an 11 kb *EcoRI* fragment including the *Tn5*. This plasmid (pSMJ), and oligonucleotide (Fig. 2) were used to determine the exact *Tn5* insertion site by nucleotide sequencing.

2.5. Construction of JG21 mutant

To construct an *algK::Km* mutation, the Ω kanamycin cassette from *Bam*HI digested pHP45 Ω -Km, was inserted into the *Bgl*II site of *algK* in pAH3.6, resulting in plasmid pJG21 (Fig. 1) with the cassette in the same orientation as that of the *algK* transcription. Strain ATCC 9046 was transformed with plasmid pJG21 selecting for integration of the *algK::km* mutation into the

genome by homologous recombination resulting in strain JG21. The integration of the mutation was confirmed by Southern blot analysis.

2.6. Resistance to desiccation and electron microscopy

Bacterial cultures were grown for 18 h on BS and then transferred to BB plates. After 5 days cells were removed from the surface of the agar plate, washed three times with phosphate buffer at pH 7.2 at 4°C, fixed with 2% glutaraldehyde during 2 h at 4°C and washed with phosphate buffer. Further fixation with 2% osmium tetroxide for 2 h at 4°C was carried out. Following fixation cell suspensions were washed before dehydrating by passing through a graded ethanol series. After exposure to propylene oxide, samples were included in Epon 812 resin which was polymerized during 24 h at 65°C. Ultrathin sections were cut, incubated with uranyl acetate, washed with distilled water, and treated with lead citrate, washed again and observed. Appropriate samples of the cultures induced for encystment were used for desiccation assays which were carried out as described (2),

3. Results and discussion

3.1. Isolation of strain LA21

Random Tn5 mutagenesis of strain ATCC 9046 was carried out as described in materials and methods, 2500 Km^r derivatives were isolated and screened for non-mucoid phenotypes. None of these insertion mutants showed a clear non-mucoid phenotype in the first screening, but after 4 successive passes in BS plates containing 2, 4, 8, and 16 µg/ml of Km, a clearly non-mucoid strain, named LA21, was isolated.

3.2. Strain LA21 carries an algK::Tn5 mutation

Cosmid pMSD675 previously shown to contain the *A. vinelandii* alginate

biosynthetic gene cluster (2, 9) restored alginate production in strain LA21 (Table 2). Southern blot analysis (data not shown) was used to map the Tn5 insertion downstream *alg44* within a 3.6 kb *EcoRI* (12) (Fig 1). Plasmid pAH3.6 (13), was used to sequence 1.9 kb of *A. vinelandii* DNA downstream *alg44*. DNA sequence revealed the presence of two open reading frames, ORF1 showed 55.85% identity to *P. aeruginosa* AlgK (Fig. 2) (1). *orf-2* is *A. vinelandii* *algJ* (see Fig. 1) (17). The exact Tn5 insertion site was mapped (see materials and methods), within *algK* between the codons encoding amino acids 237 and 238 (Fig. 2).

A signal peptide with the consensus pattern for cleavage and lipidation associated with lipoproteins processed by leader peptidase II (14) between aminoacids 17 and 18 amino acids is present in *A. vinelandii* AlgK (Fig. 2).

3. 3. Evaluation of the polarity of the *algK::Tn5* insertion

Polarity of the *algK::Tn5* mutation on *algJ*, *algG* and *algL* was tested. Total RNA isolated from strains ATCC 9046 and LA21, was hybridized with *algJ* and *algG* probes (Fig. 3). Transcription of both *algJ* and *algG* in strain LA21 is abrogated. Polarity on *algL* was tested by determining alginate lyase activity, this was similar in both ATCC 9046 and LA21 (Table 2). These data indicate that *algK*, *algJ* and *algG* are transcribed from a promoter different to that transcribing *algL*.

3.4. *algK* is transcribed from the *alg8* promoter

We recently showed that *alg8* and *alg44* can be transcribed from an *algD* independent promoter (12). RNA from JG8 (an ATCC 9046 derivative carrying a polar *alg8::km* mutation) did not hybridize with an *algK* probe (Fig. 3), indicating that *algK* is transcribed from the *alg8* promoter. Taken together these data indicate that *algK* forms part of the *palg8-44-K-J-G* operon. This

organization implies that synthesis of the proteins involved in polymerization and alginate export is coordinately controlled.

3.5. Effect of an *algK:: Ω -Km* non-polar mutation on alginate production.

Due to polarity of *algK* mutants the essentiality of AlgK for alginate production was not demonstrated in *P. aeruginosa* (1). The non-mucoid phenotype of LA21 strain could be due to the polar effect of the *algK::Tn5* mutation. We constructed an *algK* non-polar mutation. It has been previously shown that in *A. vinelandii*, the insertion of the Ω cassette into *modE* with same orientation as the direction of transcription, produces non-polar mutations which allow transcription of downstream genes in the same operon (13). We constructed, as described in methods strain JG21, an ATCC 9046 derivative carrying the Ω -Km cassette within *algK* in a non-polar orientation. We show here that transcription of *algJ* is not affected in strain JG21 (Fig. 3). This result together with the fact that JG21 showed a non-mucoid phenotype (Table 2) indicated that *algK* is essential for alginate production.

3.6. Alginate production by *algK* mutants

Compared with non-mucoid strain JG8, an *algB* mutant in which alginate production is completely abrogated, some alginate can be detected in liquid cultures of strains LA21 and JG21 (Table 2). These phenotypes are in agreement with the proposed roles for AlgK in alginate translocation, and AlgB in alginate synthesis (12).

3. 7. Resistance to desiccation and ultrastructure analysis of cysts

A. vinelandii cysts are coated by two layers, of which alginate is a component. We determined whether the alginate produced by LA21 was sufficient for encystment. Strains ATCC 9046 and LA21 were induced to

encyst as described in methods. 10% of the ATCC 9046 cysts were viable after desiccation, whereas less than one in 10^{-6} colonies of LA21 were recovered, indicating a failure of strain LA21 to encyst. Electron microscopic examination of the cyst structures formed by strains LA21 and ATCC 9046 (Fig. 4) shows that, in strain ATCC 9046, the small rounded cells are coated by the exine and the intine layers. No coat was observed in strain LA21. Thus alginate produced by strain LA21 is not sufficient for encystment and further confirm that alginate is a major component of the cyst coat.

Acknowledgements

This work was supported by grant IN212096 from DGAPA UNAM.

H.M.R. thanks Filiberto Sánchez, and CIATEJ A.C. for technical and financial support.

References

- (1) Aarons, S.J., Sutherland, I.W., Chakrabarty, A.M. and Gallagher, M.P. (1997) A novel gene, *algK*, from the alginate biosynthetic cluster of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* 143, 641-652.
- (2) Campos, M.E., Martínez-Salazar, J.M. LLloret, L., Moreno, S., Núñez, C., Espín, G. and Soberón-Chávez, G. (1996) Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 178, 1793-1799.
- (3) Chitnis, C.E. and Ohman, D.E. (1993) Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure *Mol. Microbiol.* 8, 583-590.
- (4) Fellay, R., Frey, J. and Krisch, H. (1987) Interposon mutagenesis of soil

- and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* 52, 147-154.
- (5) Figurski, D. and Helinski, R.D. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 1648-1652.
 - (6) Haug, A. and Larsen, B. (1971) Biosynthesis of alginate. II. Polymannuronic acid C-5 epimerase from *Azotobacter vinelandii*. *Carbohydr. Res.* 17, 297-308.
 - (7) Kennedy, C., Gamal, R., Hummprey, R., Ramos, J., Brigle, K. and Dean, D. (1986) The *nifH nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: Characterization by Tn5 mutagenesis and isolation from pLARF1 gene banks. *Mol. Gen. Genet.* 205, 318-325.
 - (8) Knutson, C.A. and Jeanes, A. (1968) A new modification of the carbazole reaction: application to heteropolysaccharides. *Anal. Biochem.* 24, 470-481.
 - (9) Lloret, L., Barreto, R., Campos, M.E., Martínez-Salazar, J.M., Moreno, S., Espín, G. and Soberón-Chávez. G. (1996). Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters. *Mol. Microbiol.* 21, 449-457.
 - (10) Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 - (11) May, T.B. Chakrabarty, A.M. (1994) *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends Microbiol.* 2,151-157.
 - (12) Mejía-Ruiz, C.H., Guzmán, J., Moreno, S., Soberón-Chávez, G. and Espín, G.

- (1997) The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate biosynthesis and they constitute an *algD*-independent operon. Gene. accepted
- (13) Mouncey, N.J., Mitchell, L.A. and Pau, R. (1995) Mutational analysis of genes of the mod locus involved in molybdenum transport, homeostasis, and processing in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 177, 5294-5302.
- (14) Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage site. Protein Engineering. 10, 1-6.
- (15) Page, W.J. and Sadoff, H.L. (1975) Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 122, 145-151.
- (16) Pindar, D.F. and Bucke, C. (1975) The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. Biochem. J. 152, 617-622.
- (17) Rehm, H.A. (1996) The *Azotobacter vinelandii* gene *algJ* encodes an outer-membrane protein presumably involved in export of alginate: cloning, sequencing and expression. Microbiol. 142, 873-880.
- (18) Rehm, H.A., Ertesvag, H. and Valla, S. (1996) A new *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase gene (*algG*) is part of an *alg* gene cluster physically organized in a manner similar to that in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 178, 5884-5889.
- (19) Sadoff, H.L. (1975) Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. Bacteriol. Rev. 39, 516-539.
- (20) Simon, R., Prierer, U. and Puhler, A. (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Biotechnol. 1, 784-791.

TABLE 1. Strains and plasmids used in this work.

Strain	Relevant characteristics	Source or reference
<i>A. vinelandii</i>		
ATCC 9046	Highly mucoid.	Collection
LA21	<i>algK::Tn5</i> derivative of ATCC 9046.	This work
JG21	<i>algK::km</i> derivative of ATCC 9046	This work
JG8	<i>alg8::km</i> derivative of ATCC 9046	(12)
<i>E. coli</i>		
S17.1	<i>recA</i>, <i>tra</i> genes of plasmid RP4 integrated into the chromosome.	(22)
DH5α		GIBCO BRL
Plasmids		
pSUP5011	pBR325 <i>Tn5</i> <i>mob</i>.	(22)
pRK2013	ColE1-<i>tra</i> (RK2)-Kmr	(5)
pMSD675	Cosmid clone with the <i>A. vinelandii</i> alginate biosynthetic gene cluster	(2)
pAH3.6	pBluescript II KS with the 3.6 kb <i>EcoRI</i> fragment including <i>alg44</i> and <i>algK</i>	(13)
pJG21	pAH3.6 derivative carrying an <i>algK::km</i>	This work
pAHC	pBluescript II KS with the 0.49 kb <i>EcoRI</i> -<i>PstI</i> fragment <i>algJ</i> probe	This work
pAHD	pBluescript II KS with the 0.2 kb <i>PstI</i> fragment <i>algK</i> probe	This work
pBR60	plasmid with 1.8 kb containing <i>algG</i>	S. Valla
pSMJ	pBR329 with the <i>algK::Tn5</i> mutation	This work
pHP45Ω-Km		(4)

Table 2. Alginate production and mucoidy

Strain	Mucoidy	Genotype	Alginate (mg/mg of protein) ^a	Alginate lyase ^b
ATCC 9046	++	<i>algK</i> ⁺	2.6	11.3±0.5
LA21	-	<i>algK::Tn5</i>	0.0053	8.0±0.6
LA21/pMSD675	++	<i>/algK</i> ⁺	2.8	N.D. ^c
JG21	-	<i>algK::Ω-Km</i>	0.0036	N.D.
JG8	-	<i>alg8::Ω-Km</i>	<0.001	N.D.

^a All values are the mean of three determinations with a standard deviation below 10%.

^bAlginate lyase activity was determined as previously described (9), and is expressed as the mean diameter of alginate hydrolysis-halo after 48 h of growth.

^c Not determined

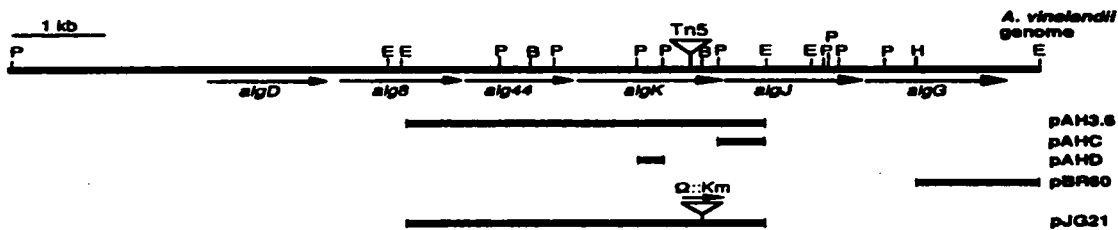
Legends to figures.

Figure 1. (A), Physical map of the *alg* region from strain LA21. And, (B) the plasmids used for the Slot blot analysis, and mutagenesis. Restriction sites E, *EcoRI*; P, *PstI*; X, *XhoI*; B, *BglI*.

Figure 2. Nucleotide sequence of the *A. vinelandii algK* and *algJ* genes and deduced amino acid sequence of its gene products. The oligonucleotides used as primers for the identification of the Tn5 insertion site are underlined. The exact site of the Tn5 insertion is shown with an arrow. Shine-Dalgarno sequences are shown. Signal peptide is boxed. The nucleotide sequence reported here has been deposited in the EMBL database under accession number X98863 (updated).

Figure 3. Slot blot analysis of *algJ*, *algG* and *algK* mRNAs of different *A. vinelandii* strains. 10 μ g of total RNA were loaded into each slot. The *algJ*, *algG* and *algK* probes were isolated from plasmids shown in Fig. 1.

Figure 4. Electron micrographs of encystment in: a), ATCC 9046 and b), LA21. (EX) exine, (IN) intine, (CB) central body, (PHB) poly- β -hydroxybutyrate granules. Scale bar. 0.4mm.



TCGACAAGGCCGTGACCGCCGACTCTGAGAGGACACCTCAGGTGAACCTGACCAAGCCCTCTCTCTCGGGC 75
 D K A V T A G L * *sigK* → (V) N L T K P L L L S A

CTGGCGGCTGACCGCTCGCCCAACTCGACCTGCCCCGACCAAGCTCTGGCGAAGGAAGCCCTGCAACCGGGC 150
L A G L T A C A N L D L P D Q R L A K E A L Q R G

GACACCAGACCGCCGAGCGGCTTTCCGTAACCTGCGCGACATGGGCTTCAACGAGGCCACGCTCGGCTGGCC 225
 D T Q T A E R H F R Q L A D M G F T E A Q L G L A

GACATGCACTGGCCAGCGGTGATCCCGACAGCTGCGCAAGGGCGAACAAGACTACCGCATGGGCTGGGACGCC 300
 D M Q L A S G D P E Q L R K A E Q T Y R M A L D A

TCGCCGGGGCCAAAGCCCGCTGGGCAAGCTGCTGGCTACAAGCCGACAGGAGCGAGGGCGAAAGCCGCGAG 375
 S P R A K A R L G K L L A Y K P T S S E A E K R E

GCGGCCAGTTGCTCAGCGATGCTTCCGCCCGCGGAGGATGGGCTGCTGCTGCCCTGGGATGCTTACTTG 450
 A A Q L L S D A F A A G E D G V L L P L A M L Y L

AAGAACCAGCAGCTTCCCGCAGCTCAGCCTGCAGCAACGCATCGATCAGTGGCGCCCGCGGAGCATCCCCAG 525
 K N P Q T F P D V S L Q Q R I D Q W R A A G H P Q

GCGGACATCGCAAGATCTGCTGCTACCGCACCCAGGGCACCTACGACGAGCACTGGACGACATCGAGCGGATC 600
 A D I A Q I Y V Y R T Q G T Y D Q N L D I E R I

TGGCAGGCGCCTCGCCGAGCAGCGACTGCTACTGCGAGTACGACCGCTATCTTCAAGGGCGACAGAA 675
 C Q Q R L A E H S D C Y V E L A T V Y L Q A R P E

TGGACCAGAACGACCGCTGCAGGCGCTGGTGCACAGCTCATGGCCGCTCATGGCCGCTCATGGCCGGGGCGGA 750
 W T R T T A C R A W C N S S W P L M A A H R A G G

GTGTGAGGCAACTGGTGCAGGAAGTCGCCCGGCTGCTCTCAACCCGCTGCTCGGCCATCGAAACGAAAGACC 825
 V S A Q L Y T E V A G V L S N P L L L G Q S N E K T

GCCCAGACCATGCTCGAGGAATCGCCCGCCGCTGGGTCACTGGCGGCTTCTGATCTACGACTTTCCCGGC 900
 A Q T M L E E I A P P P G S V W R V L I Y D F P G

ACCGGCGACACCGACAGATGCTGACTACTCGCTGGCGTGGCCGTCGCGCCGCGAGCGCCGATCTGTTGCTC 975
 T G D T D Q M L D Y L A W P C A A Q P A A D L L L

GGTCCGCTCTACTACGAAAGCAAGCTGCTTCCACAGGACCGTTCAAGGCCGAGGAATTTTCAAGGCCCGCC 1050
 G R L Y A E Y G K L L P Q D P F K A E E Y F I K A R

GCCACGAAAACAGCGCCCACTACTACTGGTCCAGATCTATCGCCCGGTTTCTCGGCGAGGTCTACCCGCGAG 1125
 A T E N S A H Y Y L G Q I Y R R G F L G E V Y P Q

AAGGCGTGCACAGCTGCTGACCCGCGCCCGCGCGGCGGCGAGCGCGGACTACGCTCTCGCCAGCTGTAC 1200
 K A V D S L A A R G G Q A S A D Y A L Q L Y

TCCAGGTCGCGGCATCCGATCGACCTGGCCACCGCTACGCTTCCGCACTGCTCGCCGTTTTCAGAGCCCGC 1275
 S Q G R G I R I D L A N A Y V F A R L A V L Q G R

CCGGATCCGAGCCCTGCTCAGGAAATAAGGGTAATCTCGCTCTGCAAGCGTACCCGGGTGAAACGATG 1350
 P D S E P L L Q E I K A N L A P A E R T R G E Q M

CTGACGCGGAAACAGCGCTGTTACGGCGTGTGGCAGACTCGACGCGAGCTGCAAGCCATGCAAAATCAATAG 1425
 L H A E Q Q A R Y G V W Q T S T Q L Q A M Q N Q *

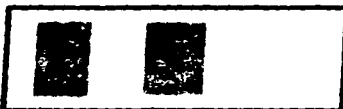
GAAGCATTTAGTAGGAAGCAACGCATAAAGCGGGGACTGGGCTGGGAGCCAGTCTGCTCTGCTGCAATCCGC 1500
sigJ → (M) S R

ATCC 9046 LA21 JG21



algJ

ATCC 9046 LA21



algG

ATCC 9046 JG8



algK

