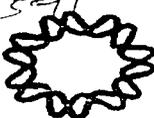




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

00591

2

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Caracterización y estudio del sistema regulador de
dos componentes GacS/A en la biosíntesis de
polímeros en *Azotobacter vinelandii*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA:

Q.F.B. MIGUEL CASTAÑEDA LUCIO

Cuernavaca, Morelos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mt 281154

Agosto del 2000



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.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO
DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCION DE LA
DRA. ELDA GUADALUPE ESPIN OCAMPO**

DEDICATORIAS

A mis padres y a mi hermana, por su apoyo, su confianza y, sobre todo por gran su cariño.

A Elga, por su apoyo, su confianza, su infinita paciencia y cariño.

A mi pequeño Miguel, que me cambió maravillosamente mi perspectiva de la vida.

A la familia Lucio Ronquillo, por constituirse en mi familia adoptiva en los primeros tiempos de esta aventura.

A todos mis amigos.

A todos mis maestros, y a todos quienes contribuyeron de alguna manera en mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo por compartir conmigo su gran experiencia y conocimiento, peso sobre todo, por su confianza y su apoyo en los buenos y en los malos tiempos.

A los integrantes de mis comités tutorales: Dra. Alicia González, Dra. Gloria Soberón, Dr. Fernando Valle, y un agradecimiento especial al Dr. José Luis Puente, por las valiosas contribuciones que, de principio a fin, aportó al desarrollo de este proyecto.

Al jurado de tesis integrado por: Dra. Esperanza Martínez, Dra. Guadalupe Espín, Dr. Edmundo Calva, Dr. Miguel Ángel Cevallos, Dr. Enrique Merino, Dr. Guillermo Gasset y Dr. Mario Soberón.

A la M. en C. Josefina Guzmán, a la Bióloga Soledad Moreno y la Bióloga Rebecca Nájera, por sus invaluable aportaciones experimentales a este trabajo.

A Judith Sánchez, por ser una excelente colaboradora, y por darme la oportunidad de dirigir su tesis de licenciatura.

A todos mis compañeros de laboratorio (mas que compañeros, amigos todos), en especial a la Dra. Cinthia Niñez, por haberme ayudado a dar mis primeros pasos en este proyecto.

A los Sres. Eduardo Juárez y Mariela Izquierdo por su invaluable labor, y por su eterna sonrisa de "buenos días".

A DAEP, por su apoyo económico para desarrollar este trabajo.

Y por último, a la U.N.A.M.

INDICE

I RESUMEN	iv
I ABSTRACT	v
II INTRODUCCION	1
Ciclo de vida de <i>Azotobacter vinelandii</i>	1
Función biológica del alginato y del PHB en <i>Azotobacter vinelandii</i>	1
Aplicaciones del alginato y PHB	3
a) Composición del alginato	4
b) Aplicaciones del alginato	4
c) Composición y aplicaciones del PHB	5
Biosíntesis del alginato	5
Genética molecular de la biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i>	7
a) Genes Estructurales	7
b) Genes reguladores	8
Biosíntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	9
Génetica molecular de la biosíntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	9
Regulación de la biosíntesis de PHB	10
Sistemas reguladores de dos componentes	11
a) Primer componente	11
b) Segundo componente	12
c) Mecanismo de transducción	13
III ANTECEDENTES	15
IV OBJETIVO INICIAL	16
V RESULTADOS I	16
Mutagénesis del pSMU588	16
Subclonación y secuenciación de la región afectada por el transposón	17
Análisis de la secuencia nucleotídica del locus <i>muc588</i>	18
Construcción de las mutantes JM1 y JM2	24
Producción de alginato en las mutantes JM1 y JM2	25

VI OBJETIVOS II	27
Objetivo general	27
Objetivos Particulares	27
VII RESULTADOS II	28
El efecto regulador negativo del pSMU588 se debe a <i>gacS</i>	28
El gen <i>algD</i> es regulado a nivel transcripcional por GacS	28
Estudio del papel de <i>gacS</i> en el proceso de diferenciación morfológica de <i>A. vinelandii</i>	31
Regulación de la producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) por GacS	32
GacS regula a nivel transcripcional la biosíntesis de PHB	33
Caracterización del gen que codifica el segundo componente del sistema GacS/A de <i>A. vinelandii</i>	34
GacA regula positivamente la biosíntesis de alginato	36
GacA regula a nivel transcripcional el gen <i>algD</i>	38
La cepa JM3 tiene una mayor sensibilidad a luz ultravioleta	38
VIII DISCUSION	40
IX CONCLUSIONES	47
X PERSPECTIVAS	48
XII APENCICES	49
a) Materiales y métodos	49
Cepas bacterianas y plásmidos	49
Medios y condiciones de cultivo	
Cruzas para transferencia de plásmidos por conjugación. y transformación de <i>A. vinelandii</i>	51
Mutagénesis del cósmido pSMU588	51
Ensayos de supresión de mucoidia y selección del pSMU588-21	52
Cuantificación de la producción de alginato	52

Cuantificación del contenido de PHB	52
Ensayos de enquistamiento	53
Microscopía electrónica	53
Manipulaciones de ADN y ARN	53
Análisis de secuencias	54
Cuantificación de la actividad de β -galactosidasa	55
Amplificación del gen <i>gacS</i> de <i>A. vinelandii</i>	55
Amplificación del gen <i>gacA</i> de <i>A. vinelandii</i>	55
Construcción de las cepas JM1, JM2 y JM3	56
Construcción de las cepas WI12-1, WI12-2 y WJM3	56
Ensayos de sensibilidad a luz ultravioleta	56
b) Artículo Publicado	56
c) Bibliografía	57

I RESUMEN

Azotobacter vinelandii produce dos polímeros: el polisacárido extracelular alginato y el poli-éster intracelular poli- β -hidroxibutirato (PHB). El cósmido pSMU588, de la biblioteca genómica de *A. vinelandii*, disminuye la mucoidia y por lo tanto la producción de alginato en la cepa mucoide de *A. vinelandii* ATCC 9046. El pSMU588 se mutagenizó al azar con el transposón miniTn5/*lacZ*1 seleccionándose, por su incapacidad de disminuir mucoidia, en la cepa ATCC 9046, el cósmido mutante pSMU588-21. Al ser secuenciado el locus responsable de la disminución de mucoidia se encontró un una fase abierta de lectura (*fal*) cuya secuencia hipotética de aminoácidos mostró 65% de identidad con GacS de *Pseudomonas*, esta proteína es una cinasa transmembranal que pertenece a un sistema regulador de dos componentes, cuyo regulador de respuesta (GacA) es un activador global que controla varios productos de metabolismo secundario y factores de virulencia. Al *fal* se le llamó de igual forma *gacS*. El gen *gacS* se clonó generando el plásmido pMC15; también se construyó una cepa con una mutación no polar en *gacS*. El pMC15 y la mutación en *gacS* reducen significativamente tanto la producción de alginato, como la transcripción de *algD*, un gen que codifica una enzima clave en la biosíntesis del alginato. La mutación en *gacS* también reduce la acumulación de PHB y afecta el enquistamiento. De igual forma, caracterizamos el gen que codifica el par regulador de GacS. Usando el gen *gacA* de *Pseudomonas*, identificamos el gen homólogo en *A. vinelandii*. La proteína predicha a partir de *gacA* de *A. vinelandii* mostró 87 % de identidad con GacA de *Pseudomonas*. Junto a *gacA*, se identificó un homólogo al gen *uvrC* de *Pseudomonas*. En mutantes *gacA*, como era esperado, se disminuyó la producción de alginato y la transcripción del gen *algD*. En conjunto, los datos anteriores indican que el sistema global *gacS/A* regula la síntesis de polímeros en *A. vinelandii*.

I ABSTRACT

Azotobacter vinelandii produces two polymers: the extracellular polysaccharide alginate and the intracellular polyester poly- β -hydroxybutyrate (PHB). A cosmid clone (pSMU588), from an *A. vinelandii* gene library diminished alginate production in *A. vinelandii* mucoid strain ATCC 9046. The nucleotide and predicted amino acid sequence of the locus responsible for the mucoidy suppression revealed 65% identity to *Pseudomonas* GacS, a transmembrane sensor kinase of the two-component regulators, whose cognate response regulator, GacA, is a global activator regulating several products and virulence factors. Plasmid pMC15 harboring *gacS*, and a strain carrying a *gacS* non-polar mutation were constructed. Either pMC15 and the *gacS* mutation significantly reduced alginate production and transcription of *algD*, the gene coding for the key enzyme GDP-mannose dehydrogenase of the alginate biosynthetic pathway. We found that the *gacS* mutation also reduced PHB accumulation and impaired encystment. We also characterized the *gacA* gene encoding the GacS cognate response regulator GacA. We used the *Pseudomonas gacA* to identify the *A. vinelandii gacA* homologue. The predicted *gacA* protein showed 82% identity to *Pseudomonas* GacA. Downstream of *gacA*, a homologue of the *Pseudomonas uvrC* gene was also identified. A strain carrying a *gacA* mutation was constructed as expected, the *gacA* mutation impaired alginate and PHB production as well as transcription of *algD*. Taken together, these data indicate that the *gacSA* global system regulates polymer synthesis in *A. vinelandii*.

II INTRODUCCION

Azotobacter vinelandii es una bacteria gram negativa, de vida libre, fijadora de nitrógeno, cuyo género presenta una característica poco común entre bacterias y más aún entre gram negativas. Bajo condiciones adversas, *A. vinelandii* tiene la capacidad de diferenciarse morfológicamente generando formas celulares latentes resistentes a la desecación (quistes). El desarrollo de un proceso de diferenciación exitoso está relacionado con la producción de los biopolímeros alginato y poli- β -hidroxibutirato. En nuestro grupo existe interés en comprender, a nivel molecular, la producción de ambos biopolímeros así como su papel en el proceso de diferenciación, además, el uso industrial que en potencia tienen ambos biopolímeros, genera un interés adicional en su estudio.

Ciclo de vida de *Azotobacter vinelandii*

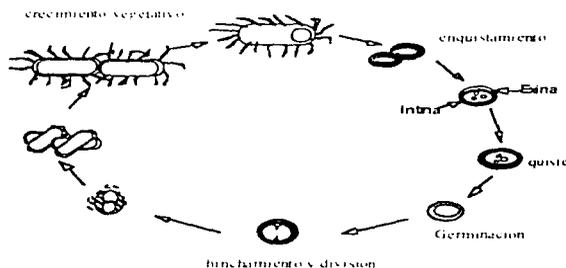


Fig. 1 . Ciclo de vida de *Azotobacter vinelandii*. Ver detalles en el texto

A. vinelandii presenta dos fases en su ciclo de vida, una fase de crecimiento vegetativo y una fase de vida latente (Fig.1). La célula vegetativa de *A. vinelandii* es de tipo bacilar con flagelos peritricos que posibilitan su movilidad. Actualmente se desconocen las condiciones ambientales que determinan el término de la fase vegetativa y el inicio del proceso de diferenciación. En el laboratorio, bajo condiciones propicias para la fijación de nitrógeno, el proceso de diferenciación puede inducirse con β -hidroxibutirato ó n-butanol. Una vez inducidas, las células pierden su movilidad y se presenta una última división celular que genera dos células esféricas de menor tamaño, las cuales se cubren por dos capas llamadas intina y exina,

constituidas principalmente de alginato, una vez que termina este proceso, se generan las células diferenciadas denominadas quistes. Los quistes maduros son células de 1.5 micras de largo X 2 micras de ancho constituidos por un cuerpo central o basal, que en su interior contiene gránulos del polímero de reserva poli- β - hidroxibutirato (PHB), y envolviendo al cuerpo basal a manera de cubierta, se encuentran las capas de intina y exina (Fig. 2). Bajo condiciones favorables, el quiste inicia un proceso de germinación con el hinchamiento del cuerpo central, posteriormente se presenta la ruptura de la exina, y finalmente emergen dos células que adquieren nuevamente movilidad (Saddof, 1975., Wyss *et al.*, 1961).



Fig. 2. Quiste maduro de *A. vinelandii*. EX., exina, IN., intina, CB., cuerpo basal., PHB., poli- β -hidroxibutirato.

Función biológica del alginato y del PHB en *Azotobacter vinelandii*

Como se mencionó, el alginato es esencial en la biogénesis del quiste maduro, ya que la intina y la exina contienen 13 y 32 % de alginato en peso seco, respectivamente (Lin y Saddoff, 1969), por lo que mutantes no productoras de alginato son incapaces de formar quistes maduros (Mejía-Ruiz *et al.*, 1997).

A. vinelandii produce alginato también en condiciones de crecimiento vegetativo; en estas circunstancias se cree que es importante en la adhesión de la bacteria a superficies (Costerton *et al.*, 1987., Clementi, 1997), o actuando como una barrera contra la difusión de oxígeno o metales pesados (Fyfe y Govan, 1983., Clementi, 1997).

El PHB es un poli-éster que pertenece a la familia de los polihidroxicanoatos (PHA's) los cuales son sintetizados por más de 90 géneros bacterianos como reserva de carbono y energía. En *A. vinelandii*, Stevenson y Sokolofsky (1996) han sugerido que el PHB podría funcionar como fuente de carbono y energía para desarrollar el proceso de enquistamiento, estableciendo una correlación directa entre la cantidad de PHB acumulado en etapas previas al enquistamiento y el porcentaje de quistes formados en el cultivo. Los lípidos son los productos celulares más importantes del metabolismo del β -hidroxibutirato durante el enquistamiento, por lo que la síntesis de lípidos esenciales y típicos del enquistamiento, tal como las 5-n-alkilpironas, el 5-n-tricosil resorcinol y derivados galactosidos de 5-n-alkilresorcinol, podría estar relacionada con la disponibilidad de PHB (Reuch y Sadoff, 1981., Su *et al.*, 1981).

Por otra parte se cree que la señal fisiológica que desencadena el proceso de diferenciación podría ser la depolimerización del poli- β -hidroxibutirato. De esta forma, la adición al medio de cultivo de β -hidroxibutirato o bien de n-butanol, que genera β -hidroxibutirato, al metabolizarse produciría una situación similar a la depolimerización del PHB (Reuch y Sadoff, 1983., Gama *et al.*, 2000) lo cual dispararía el proceso de diferenciación.

Aplicaciones del alginato y PHB.

a)Composición del alginato.

Los alginatos son una familia de heteropolímeros compuesta por monómeros de ácido gulurónico (G) y ácido manurónico (M) unidos por enlaces β (1-4). La distribución y contenido de los monómeros es variable, pudiéndose encontrar cadenas con secuencias alternas (-M-G-M-G-M-) o bien con bloques de monómeros alternados (-M-M-M-G-G-G-M-M-M-), donde el número de monómeros en los bloques es irregular (Haug *et al.*, 1971) (Fig 3). En presencia de calcio u otros cationes divalentes, los alginatos tienen la capacidad de formar geles termoirreversibles. Al interactuar los residuos de ácido gulurónico con los cationes, éstos forman puentes entre cadenas de alginato que generan estructuras diméricas, las cuales a su vez pueden, agregarse unas a otras generando una estructura de gelificación que se conoce como "caja de huevo" (Steginsky *et al.*, 1992., Clementi, 1997). La variabilidad en la distribución y contenido de ácido gulurónico y ácido manurónico es importante, ya que esto permite tener alginatos con diferente

capacidad de gelificación: un alginato con alto contenido de ácido gulurónico genera geles rígidos y resistentes, en tanto un alginato con un contenido bajo de éste ácido produce geles suaves y elásticos (Clementi, 1997).

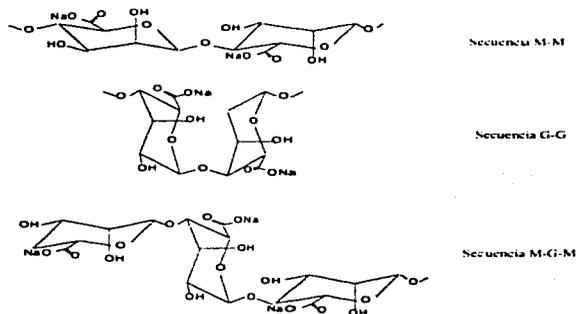


Figura 3. A) Estructura de los bloques homopoliméricos manurónicos (M) y gulurónicos (G). B) Bloques heteropoliméricos manurónicos-gulurónicos (M-G), los cuales constituyen la molécula de alginato (Clementi F., 1997).

b) Aplicaciones del alginato.

En la industria alimentaria y farmacéutica, los alginatos se usan como aditivos capaces de viscosificar, estabilizar, emulsionar y gelificar soluciones acuosas. Actualmente, se está estudiando su uso en recubrimiento y protección de heridas, así como en tecnologías de inmovilización de células y enzimas (Clementi, 1997).

En la actualidad, los alginatos usados en la industria se extraen de algas cafées del género *Laminaria*, *Macrocystis* y *Ascophyllum*. Aunque se tiene conocimiento general sobre la proporción ácido manurónico/ácido gulurónico (M/G) de los alginatos provenientes de cada especie de alga, la composición está siempre sujeta a variaciones ambientales y a la edad del tejido del cual se extrae. Lo anterior genera una gran variación en la calidad del alginato de algas usado comercialmente. Ante esta situación, la producción de alginatos de origen bacteriano con calidad uniforme se presenta

como una alternativa interesante (Rhem y Valla, 1997). Los alginatos producidos por *A. vinelandii* tienen una composición muy similar a la de los alginatos de mejor calidad de extraídos de algas, por lo que *A. vinelandii* se ha perfilado como el mejor candidato para producir alginato por medios biotecnológicos (Clementi, 1997).

c) Composición y aplicaciones del PHB.

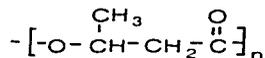


Fig. 4. Estructura química de poli-β-hidroxibutirato

El poli-β-hidroxibutirato es un homopolímero constituido por monómeros de β-hidroxibutirato (Fig 4). Desde el punto de vista biotecnológico, los poli-hidroxicanoatos son compuestos muy interesantes, ya que pueden formar plásticos con propiedades semejantes a las del polipropileno y el polietileno, con la ventaja de ser plásticos biodegradables provenientes de una fuente renovable (Dawes, 1990). A pesar de lo anterior su explotación comercial en la actualidad es limitada, ya que se tienen rendimientos bajos con altos costos; sin embargo, es probable que en un futuro los estudios sobre éstos polímeros permitan obtener materiales plásticos con características específicas para ciertos usos con costos razonables de producción (Steinbüchel y Valentin, 1995).

Biosíntesis del alginato

Desde mediados de la década de los setentas se conoce las rutas biosintéticas del alginato tanto en *A. vinelandii* (Fig. 5) como en algas, encontrándose, en general, actividades enzimáticas similares (Pindar y Buck, 1975)

En la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*, los azúcares de seis carbonos (a excepción de la fructosa) son usados como fuente de carbono, y se metabolizan a piruvato por la vía Entner-Doudoroff. Posteriormente, el piruvato ingresa al ciclo de ácidos tricarbóxicos y finalmente por gluconeogénesis se sintetiza fructosa 6-P (Gacesa, 1998). La fructosa 6-P se utiliza como sustrato por la fosfomanosaisomerasa (PMI) para generar manosa-6P, ésta a su vez se convierte a manosa-1-P por la fosfomanosa mutasa (PMM).

En el siguiente paso biosintético, la manosa 1-P se activa vía GTP por la GDP-manosa pirofosforilasa (AlgA), generando GDP-manosa,

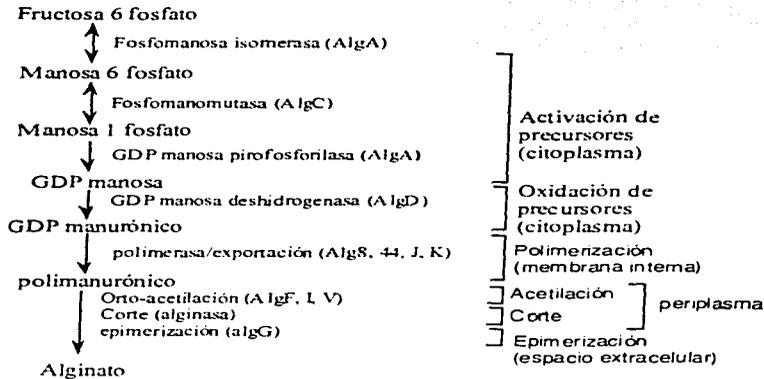


Fig. 5. Ruta biosintética del alginato en *Azotobacter vinelandii* (Gacesa, 1998).

la que posteriormente se oxida a ácido manurónico por la enzima GDP-manosa deshidrogenasa (GMD). En *P. aeruginosa*, una bacteria productora de alginato, filogenéticamente muy cercana a *A. vinelandii*, la síntesis de ácido GDP-manurónico es el paso crítico en la producción de alginato, ya que el ácido manurónico además de ser el precursor directo del polímero es también precursor de la GDP-ramnosa (Rocchetta *et al.*, 1999), un metabolito usado en la síntesis de lipopolisacáridos. Una situación similar, se creó ocurre en *A. vinelandii*, por lo que la GDP-manosa deshidrogenasa (AlgD) puede ser un punto importante en la regulación de la biosíntesis del alginato.

El ácido manurónico se polimeriza en la membrana interna formando ácido polimanurónico. Algunos residuos del polímero se acetilan por una aciltransferasa, y se exporta fuera de la célula. Una vez fuera algunos residuos no acetilados se epimerizan a ácido gulurónico por la enzima C-5 epimerasa, y se produce así el alginato.

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

a) Genes Estructurales

Varias especies del género *Pseudomonas* producen alginato, la más estudiada al respecto ha sido *P. aeruginosa*, ya que el alginato es un factor de virulencia importante en los procesos infecciosos en los que interviene (May y Chakrabarty, 1994., Deretic *et al.*, 1994). En *P. aeruginosa*, a excepción del gen que codifica para la fosfomanosa mutasa, todos los genes biosintéticos se encuentran agrupados a manera de operón.

En *A. vinelandii*, los genes que codifican las enzimas involucradas en la síntesis de alginato han sido caracterizados casi en su totalidad, a diferencia de lo reportado en *P. aeruginosa*, en *A. vinelandii* los genes biosintéticos se encuentran agrupados en cuatro unidades transcripcionales (Fig. 6).

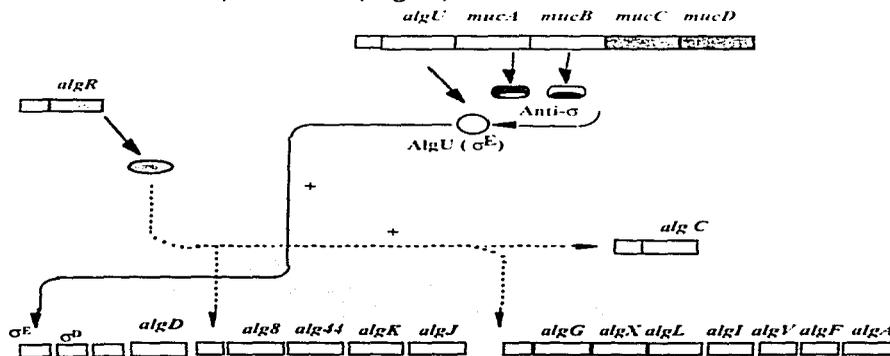


Fig. 6. Genes involucrados en la biosíntesis y regulación de alginato en *Azotobacter vinelandii*

El gen *algD*, que codifica la GDP-manosa deshidrogenasa (GMD), se transcribe a partir de tres posibles promotores: uno de ellos (P1) es σ^E dependiente, el segundo promotor (P2) presenta una secuencia consenso típica de los promotores σ^{70} , mientras que la

naturaleza del tercer promotor a la fecha se desconoce (Campos *et al.*, 1996).

Mejia-Ruiz *et al.* (1997a,1997b) describieron el operón integrado por los genes *alg8*, *alg44*, *algK* y *algJ*. El gen *alg8* codifica para una glucosil transferasa que ha sido relacionada con el proceso de polimerización. El producto de *alg44* se presume puede estar implicado en el transporte del ácido polimanurónico hacia el espacio periplásmico. El gen *algK* codifica una lipoproteína esencial para la síntesis de alginato, que muy probablemente participa en la incorporación de AlgJ en la membrana. AlgJ por su parte, es un canal iónico codificado por el último gen del operón que participa en la exportación del ácido polimanurónico hacia el exterior de la célula. Este operón presenta un inicio de transcripción cuya posible región promotora tiene una secuencia consenso similar a la de promotores σ^B de *Bacillus subtilis*.

Existe otro operón que incluye los genes *algGXLVIFA*. El gen *algG* codifica para la epimerasa que convierte algunos residuos no acetilados del ácido polimanurónico a ácido gulurónico. Los productos de los genes *algXVIF* están involucrados en el proceso de acetilación. Por último, el gen *algA* codifica la enzima bifuncional fosfomanosa isomerasa/GDP-manosa pirofosforilasa (GMP/PMI). En este operón se han encontrado dos inicios de transcripción cuya posible región promotora no presenta un consenso similar a los de promotores ya caracterizados (Vazquez *et al.*, 1999), aunque se sabe que su transcripción no depende de σ^E (Lloret *et al.*, 1996).

La enzima fosfomanomutasa (PMM) la codifica el gen *algC* en *P. aeruginosa*. En *A. vinelandii* existe un gen homólogo que al igual que en *P. aeruginosa*, se encuentra fuera de la región genómica donde se localizan los otros genes *alg*. Actualmente se está estudiando su región reguladora (Gaona, 2000).

b) Genes reguladores

En *A. vinelandii* los genes *algU*, *mucA*, *mucB*, *mucC* y *mucD* están organizados transcripcionalmente a manera de operón Fig. 6 (Martínez-Salazar *et al.*, 1996). Un operón similar se ha descrito en *P. aeruginosa* (Boucher *et al.*, 1996). En ambas bacterias, *algU* codifica para un factor sigma similar al factor sigma E (σ^E) involucrado en la respuesta a estrés por calor en *Escherichia coli* (Deretic *et al.*, 1994). En *A. vinelandii* este factor sigma promueve la transcripción

del gen *algD* a partir del promotor P1 (Moreno *et al.*, 1999). Los genes *mucA*, *mucB*, *mucC* y *mucD* son reguladores negativos de la biosíntesis del alginato (Martínez-Salazar *et al.*, 1996, León *et al.*, 2000). Estudios realizados en *P. aeruginosa*, demostraron que MucA y MucB actúan como factores anti-sigma secuestrando a σ^E , mediante una interacción proteína-proteína (Schurr *et al.* 1996). MucD en ambas bacterias tienen similitud con proteasas serínicas (Boucher *et al.*, 1996). Del gen *mucC* se conoce poco, sólo se sabe que tiene similitud con el *orf4* de *Photobacterium* sp. cepa SS9, del que de igual forma se desconoce su función (Martínez-Salazar *et al.*, 1996., Boucher *et al.*, 1996).

El gen *algR* codifica para un regulador de respuesta de un sistema de transducción de señales de dos componentes. Mutaciones en este gen disminuyen 50% la producción de alginato en *A. vinelandii*, a diferencia de lo observado en *P. aeruginosa*, donde un gen homólogo es esencial para la producción de alginato. En *P. aeruginosa*, AlgR controla la transcripción del gen *algD*, situación que no ocurre en *A. vinelandii*. A la fecha el mecanismo por el cual *algR* controla la síntesis de alginato se desconoce (Núñez *et al.*, 1999).

Biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*.

En la biosíntesis de PHB están involucradas tres actividades enzimáticas (Manchak y Page, 1994) (Fig.7). La primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima β -cetotilasa para dar acetoacetil-CoA. El acetoacetil-CoA formado se reduce por la acetoacetil-CoA reductasa, utilizando NADPH y produciendo D(-)- β -hidroxibutiril-CoA, que finalmente se polimeriza por la actividad de PHB sintasa.

Génética molecular de la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*.

Los genes que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis del PHB se están caracterizando en nuestro grupo. Ya se ha caracterizado los genes *phbA* y *phbB*. El gen *phbA* codifica para la β -cetotilasa, en tanto el gen *phbB* codifica para la acetoacetil-CoA reductasa. Se tiene evidencia genética de que el gen que codifica para la PHB sintasa (*phbC*) se encuentra en el mismo locus (Cruz, 2000). Un fragmento de DNA que contiene, posiblemente, estos tres

genes es capaz de reestablecer, por complementación heteróloga, la producción de PHB en una mutante *phbC* de *Ralstonia eutrofa* (Gerngross *et al.*, 1994., Cruz, *et al.*, 2000). Aún no se sabe si los tres genes están formando un operón como se ha observado en otras bacterias productoras de PHB (Schubert *et al.*, 1991).

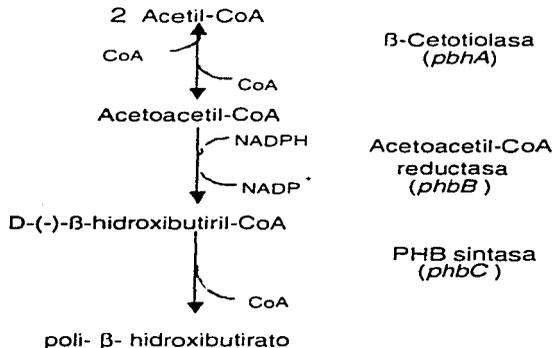


Fig. 7. Biosíntesis del poli-β-hidroxibutirato en *A. vinelandii*.

Regulación de la biosíntesis de PHB.

En general, en las bacterias productoras de PHB acumulan el polímero en respuesta a una limitación para su crecimiento, principalmente la falta de algún nutriente como nitrógeno, fósforo, magnesio u oxígeno, en presencia de un exceso de fuente de carbono y energía (Anderson y Dawes, 1990).

Por estudios realizados en *A. vinelandii* y en *Azotobacter beijerinckii*, se ha propuesto que el control de la síntesis de PHB se presenta principalmente a nivel post-traduccional, mediante la modificación alostérica de las enzimas de la vía (Senior y Dawes, 1973., Manchak y Page, 1994). Un punto de control importante es la actividad de la enzima β-cetotiolasa, que se activa cuando la relación acetil-Coa/CoA es alta, situación que se puede dar cuando se

acumula NADH o NADPH como respuesta a la baja concentración de oxígeno en el medio. Estas condiciones también favorecen la actividad de la acetoacetil-CoA reductasa.

Aunque en otras bacterias existen otros niveles de regulación en la biosíntesis de PHB (Miyake *et al.*, 1997., Miyamoto *et al.*, 1998., Schembri *et al.*, 1995), en el género *Azotobacter*, a la fecha, no se ha reportado otro tipo de regulación más que el descrito.

Sistemas reguladores de dos componentes.

En bacterias, los sistemas reguladores de dos componentes son el principal mecanismo mediante el cual contienen y responden a cambios o señales del medio ambiente. Estos sistemas están formados por dos proteínas: una proteína con capacidad de detectar dichas condiciones o señales, y una proteína reguladora que en la mayoría de los casos, es un regulador transcripcional, cuya actividad es controlada por la primera.

a) Primer componente.

El primer componente del sistema es una proteína que tiene actividad de cinasa. A estas proteínas regularmente se les conoce como cinasas histidínicas. Con algunas excepciones, estas proteínas presentan en la parte amino terminal dos dominios transmembranales (TM1 y TM2), que flanquean una porción de la proteína que se sitúa en el periplasma; a esta región se la ha llamado dominio de entrada y se la ha involucrado funcionalmente en la detección de las señales ambientales. La región citoplásmica de la proteína tiene varios motivos conservados que tienen relación directa con el proceso de fosforilación; a estos motivos, en su conjunto, se les conoce como módulo transmisor. El módulo transmisor comprende las cajas H, N, D/F, y G. La caja H contiene una histidina, la cual es el residuo donde se fosforilan esta clase de proteínas. Los motivos N, D/F, y G están involucrados en diversos puntos del mecanismo de fosforilación (Parkinson y Koffoid, 1992) (Fig. 8A)

Existen cinasas histidínicas que presentan variaciones en el contenido de éstos dominios. Algunas de ellas son proteínas citoplásmicas que no tienen dominios transmembranales. También existen Cinasas histidínicas que presentan dominios adicionales (Ishige *et al.*, 1994): RcsC y ArcB son ejemplos típicos de estos casos. RcsC presenta, además de los dominios ortodoxos, un dominio

similar al dominio de fosforilación de los segundos componentes de estos sistemas (Stout y Gottesman, 1990). ArcB, además de tener todos los dominios presentes en RcsC, tiene un tercer dominio de fosforilación en su porción carboxilo terminal, distinto a los dos dominios anteriores (Fig. 8B) (Georgellis *et al.*, 1997).

b) Segundo componente

Los segundos componentes son llamados reguladores de respuesta y están constituidos por dos dominios: el dominio de fosforilación se encuentra en extremo amino terminal y se conoce como módulo receptor (donde el aminoácido susceptible a ser fosforilado es un residuo de ácido aspártico); el segundo dominio se conoce como dominio de salida y generalmente se pega a DNA (Fig 8).

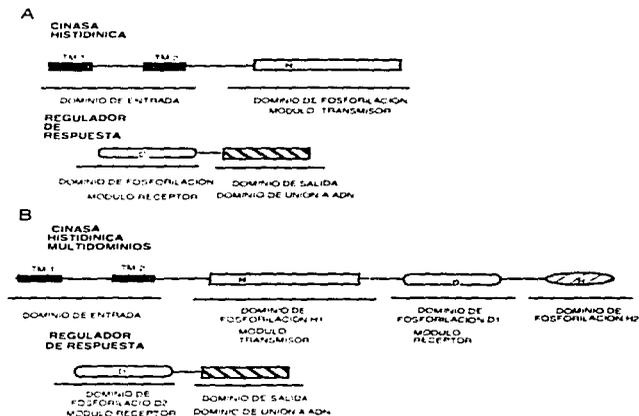


Fig. 8. Organización estructural de los miembros de sistemas reguladores de dos componentes. A) Sistemas con cinasas histidínicas típicas B) Sistemas con cinasas histidínicas multidomínios.

c) Mecanismo de transducción.

Por estudios en los sistemas NtrC/B y EnvZ/OmpR de *Escherichia coli* se ha propuesto el siguiente mecanismo:

Una vez que la señal se detecta, un residuo de histidina del dominio transmisor de la cinasa histidínica se fosforila, utilizando ATP como donador de fosfato. Se tienen evidencias de que las cinasas histidínicas, en condiciones fisiológicas, se encuentran en forma de dímero, y que la fosforilación se da por un mecanismo transmolecular donde cada molécula fosforila a su pareja en el dímero (Yang y Inouye, 1991., Ninfá *et al.*, 1993., Swanson *et al.*, 1993) (Fig 9A).

Con el dominio transmisor fosforilado, el fosfato se transfiere al dominio receptor del regulador de respuesta; al respecto se sabe que esta transferencia la cataliza el regulador de respuesta más que por la cinasa histidínica. La fosforilación del dominio receptor del regulador de respuesta genera cambios conformacionales en la proteína, que posibilitan su unión a la región promotora de sus genes blanco (Mizuno y Mishima, 1990., Stock *et al.*, 1995) .

La inactivación del regulador de respuesta se puede dar de varias formas, en algunos casos, la labilidad intrínseca del enlace del fosfato determina el periodo de actividad del regulador de respuesta (Stock *et al.*, 1995). Existen sistemas en los cuales la cinasa histidínica también puede defosforilar a su regulador de respuesta (Weihong *et al.*, 1998) y, por último, existen sistemas con fosfatasas accesorias que modulan también la actividad de su regulador de respuesta (Biat y Eisenbach, 1994).

En los sistemas con cinasas multidominios, actualmente se está entendiendo la manera en el cual se transduce la señal. Las características estructurales de estas cinasas histidínicas están en estrecha relación con su función. Según el modelo propuesto por Georgellis *et al.* (1997) basado en trabajos realizados con el sistema ArcB/A, una vez que ocurre la fosforilación del dominio transmisor (H1), el fosfato se transfiere al residuo de ácido aspártico del dominio receptor (D1), del cual, a su vez es transferido a la histidina del tercer dominio de fosforilación (H2), ubicado en el carboxilo terminal. Finalmente, se trasfiere al regulador de respuesta ArcA. Recientemente, este grupo ha reportado que al aumentar la concentración de ArcB, ésta tiene también la capacidad, *in vitro*, de defosforilar a ArcA, mediante un mecanismo inverso de transferencia de fosfatos D1<-H2<-ArcA, en el cual no interviene el dominio transmisor de ArcB (Georgellis *et al.*, 1998) (Fig 9B).

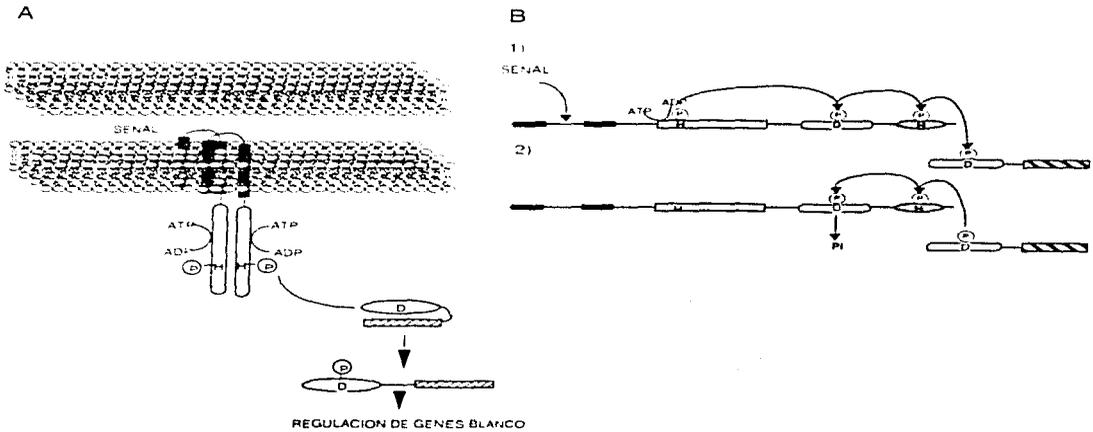


Fig. 9. Mecanismo de transducción de señales en sistemas de dos componentes con A) Cinasas típicas y, B) Cinasas multidominios, 1) fosforilación y, 2) defosforilación.

II ANTECEDENTES

El estudio de la regulación de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* es un área interesante y novedosa de investigación. Por los estudios realizados en nuestro grupo (Mejía-Riuz *et al.*, 1997., Nuñez *et al.*, 1999 y Vazquez *et al.*, 1999), sabemos que en *A. vinelandii* existen diferencias sustanciales con respecto a la regulación reportada en *P. aeruginosa* (Deretic *et al.*, 1994).

La producción de alginato confiere un fenotipo mucoide a las colonias de *A. vinelandii*. Con la finalidad de encontrar genes reguladores negativos de la biosíntesis del alginato, se transfirieron los cósmidos del banco genómico de la cepa UW136 (*algU*) a la cepa mucoide ATCC 9046 (cepa silvestre). De esta forma, por su capacidad de suprimir la mucoidia, y por ende la producción de alginato, se seleccionaron los cósmidos pSMU588, pSMU865 y pSMU986 (Tabla 3). Los cósmidos seleccionados se hibridaron contra sondas de genes reguladores conocidos en *P. aeruginosa*. El pSMU588 no mostró señal de hibridación alguna, lo cual sugería que este cósmido contenía reguladores aún no descritos de la síntesis de alginato. Al locus contenido en este cósmido se le llamó *muc588* (Martínez-Salazar *et al.*, 1996).

CEPA	PRODUCCION DE ALGINATO*
ATCC9046	151.9 ± 7.5
ATCC9046/pCP13	159.0 ± 9.6
ATCC9046/pSM986	57.1 ± 3.2
ATCC9046/pSMU588	52.9 ± 4.2
ATCC9046/pSMU865	44.4 ± 3.2

Tabla 1. Efecto de los cósmidos supresores de mucoidia en la producción de alginato en la cepa ATCC 9046 *A. vinelandii* (modificado Salazar et. al. 1996).

*Producción de alginato en mg de alginato por mg de peso húmedo

IV OBJETIVO INICIAL

Con los antecedentes anteriores, en primera instancia se resolvió identificar y caracterizar el gen o genes responsables del efecto regulador negativo que, sobre la biosíntesis de alginato, ejerce el cósmido pSMU588.

V RESULTADOS I

Mutagénesis del pSMU588

Con el objetivo de caracterizar el locus *muc588*, el pSMU588 se mutagenizó al azar usando el transposón miniTn5/*acZ1* (de Lorenzo *et al.*, 1990); se generaron, 20 mutaciones independientes en el cósmido.

Los cósmidos mutantes se transfirieron uno a uno a la cepa mucoide ATCC 9046. Se observó que el cósmido mutante pSMU588-21, era incapaz de abatir la mucoidia en la cepa ATCC 9046. Una vez que fué corroborada la presencia del transposón, mediante hibridación tipo "Southern", se determinó cuantitativamente el efecto regulador del pSMU588-21 (Tabla 2). Este resultado sugería fuertemente que el transposón afectaba un locus responsable de la supresión de mucoidia.

CEPA	PRODUCCION DE ALGINATO ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)
ATCC 9046	1660 \pm 38
ATCC 9046/pSMU588	660 \pm 25
ATCC 9046/pSMU588-21	1320 \pm 68

Tabla 2. Efecto de los cósmidos pSMU588 y pSMU588-21 en la producción de alginato en la cepa ATCC 9046 de *Azotobacter vinelandii*.

Subclonación y secuenciación de la región afectada por el transposón.

Mediante la comparación del patrón de restricción del cósmido silvestre con el mutante y por hibridación del cósmido mutante contra el transposón, se determinó que el transposón se insertó en

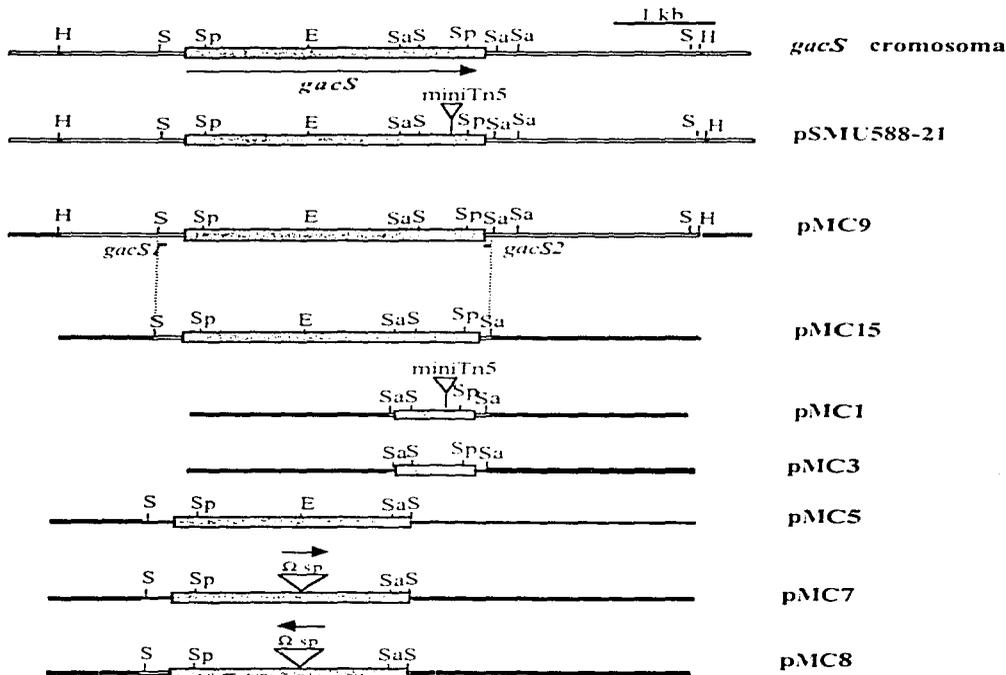


Fig.10. Mapa físico de los plásmidos construidos en el estudio del gen *gacS*. Las flechas indican la dirección de la transcripción. Los cassettes que confieren resistencia a *sp* están representados por triángulos invertidos. Los oligonucleótidos con los cuales se amplificó *gacS* se esquematizan con líneas. Abreviaturas E, *Eco* RI; H, *Hind*III; S, *Sma*I; Sa, *Sal*I; Sp, *Sph*I.

un fragmento *SaI* de 0.8 kb. El fragmento que contiene el transposón así como el fragmento silvestre correspondiente, fueron subclonados en pBluescriptIIKS⁻, y se generaron las clonas pMC1 y pMC3, respectivamente (Fig.10). Ambas clonas se secuenciaron, y la secuencias nucleotídicas obtenidas se compararon contra el banco de datos Gene Bank, usando el algoritmo BLASTN. La comparación mostró que el transposón había afectado un gen homólogo a *lemA*, un gen de *Pseudomonas syringae* que codifica para una proteína detectora de un sistema de transducción de señales de dos componentes.

El alineamiento entre la secuencia del pMC3 y *lemA* nos reveló que la región secuenciada correspondía al extremo 3' de una fase abierta de lectura (*faI*) putativo, y que se tenía secuenciado aproximadamente del nucleótido 2000 al término del gen (aprox. nucleótido 2700), teniendo poco más de 50 pb hacia abajo del posible codón de término. De acuerdo al análisis anterior, faltaban por secuenciar aproximadamente 2 kb hacia el extremo 5' del *faI* hipotético. Por mapeo de restricción se localizó un fragmento *SmaI* de 2.5 kb, que contiene parte del fragmento *SaI* de 0.8 kb. Este fragmento se clonó en pBluescriptIIKS⁻, y se generó el plásmido pMC5 (Fig. 10). Una vez determinada la secuencia nucleotídica del pMC5, se empató con la secuencia nucleotídica del pMC3, teniendo así 3 kb de secuencia nucleotídica del locus afectado por el transposón.

Análisis de la secuencia nucleotídica del locus *muc588*

Al analizar las 3 kb de secuencia nucleotídica, se encontró *unfaI* del tamaño esperado (2.7 kb)(Fig 11), cuyo producto hipotético presentó aproximadamente 65 % de identidad con las siguientes proteínas: LemA de *Pseudomonas syringae* (Hrabak y Willis,1992), ApdA de *Pseudomonas Fluorescens* (Corbell y Loper, 1995), RepA de *Pseudomonas viridiflava* (Liao et al., 1994), y PheN de *Pseudomonas tolaasii* (Han et al., 1997). Todos los reguladores anteriores, a excepción de ApdA de *P. fluorescens*, controlan la producción de factores de virulencia esenciales en procesos infecciosos que estas bacterias realizan en diversos tejidos vegetales. En *P. Fluorescens*, ApdA controla la biosíntesis de antibióticos (Tabla 3). De igual forma, la secuencia aminoacídica predicha también mostró identidad significativa con ExpS de *Erwinia carotovora* (Eriksson et al., 1998), RpiC de *Xanthomonas campestris*

pv. campestris (Tang *et al.*, 1991), y BarA de *Escherichia coli* (Ishige *et al.*, 1994). Los reguladores RpfC y ExpS controlan la expresión de genes de virulencia, en tanto, BarA es esencial para iniciar el proceso infeccioso del tracto urinario en cepas uropatogénicas de *E. coli* (Zhang y Normak, 1996).

De forma general, mutaciones en *lemA*, *pheN*, *repA*, *apdA*, *rpfC* y *expS* generan fenotipos pleiotrópicos, con deficiencias notables en la producción de metabolitos secundarios (Tabla 3).

Recientemente se ha determinado llamar *gacS* (del inglés "global antibiotic and cyanide control") a los genes funcionalmente homólogos *lemA*, *pheN*, *repA* y *apdA*; en consonancia con esto, al *fal* localizado en el locus *muc588* se le llamó *gacS*.

BACTERIA (REGULADOR)	REGULACION	% ID
<i>Pseudomonas syringae</i> (GacS)	Producción de Proteasas y Fitotoxinas*	65
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (GacS)	Producción de Antibióticos, HCN, y proteasas	65
<i>Pseudomonas oleovorans</i> (GacS)	Antibióticos, Proteasa, HCN y Homoserin-lactonas	65
<i>Pseudomonas toolassii</i> (PheN)	Producción de Proteasas y Fitotoxinas*	65
<i>Pseudomonas viridiflava</i> (RepA)	Proteasas, Pectato liasa y glucogalacturonidasa*	65
<i>Erwinia carotovora</i> (ExpS)	Pectato liasa, Pectina liasa celulasa y proteasa*	55
<i>Escherichia coli</i> (BarA)	Sideróforos y receptores para complejos de sideróforos*	35
<i>Salmonella typhimurium</i> (BarA)	Expresión de genes de invasividad*	35
<i>Xanthomonas campestris</i> (RpfC)	Proteasas, Pectato liasa, amilasa y goma xantana*	25

Tabla 3. Identidades y regulación realizada por homólogos a GacS de *A. vinelandii*. * los productos regulados son factores de virulencia.

AAGCCGAGTTCGGAAAGCCGAGTTCGGACCCGTCAGCCACAGCCGGAACCTATGATAGCCCGAAAGCCCTGCAGCC 75
CATCATCCGGAAATCGGGCCACTTACATTCCAAATGGTATTGAGAAACCCCTCTATTTCGGCCGTCGGGTCGTGCGCT 150
ACACTCACTGCCTTCGCCAAATTCCTTCACGGAGAAATCGGGTGTTCACCGACTTCAGCATCAAGACCCCGAATCGCC 225

ATGCTCACCCCTGCTGCCAGTTCGCCCTGCTGGCAGTGGTCTCTGGGTATCTEATTTTCACCTGGCCAGCAGTTCGCCGAG 300
M[→]L T L L P S C L L A L V L G I Y F T W Q Q L A E

ATGCCCGCCAACTGCTGGGACCCGCTCAGTGTGATGCTGTGAGAACTGCTCTCCCTGCCCTCTCCGCCCTGGCG 375
M H G N L V G R G Q L I V S Q L A P L A A P A L A

CAGAACTACCAACAATCCCTTCACGGGTATCCCAAACCCGGTACTGGATCAGACCCGACATCCGTGGGGTGAAGCTTT 450
Q N Y H N R L Q R I A N R V L D Q T D I R A V S F

CTCGACAGCCAACTGGGCCCATCTGTGCATCCCGGCGAGCCCTCAACGGCCCGCTGCGGCCCCAGGACCCCGACC 525
L D S E L G T I V H A G P S L N G P L P P Q D P T

CAACTGACCATGGTTCGCCGACAACAGCGCCACCCACCTGCTGATGCCGGTGGTCTGGCTTACCACCGAAGCTGCCC 600
Q L T M V R D N S A T H L L M P V L G Y H Q N L A

AAGCCGAGTTCGGAAAGCCGAGTTCGGACCCGTCAGCCACAGCCGGAACCTATGATAGCCCGAAAGCCCTGCAGCC 675
S G S N D R D D H L L G W I A L E I S H H N A L L

CAGGCTACCCCAACCTGCTGGCCAGCCCTGCTGCTGATCCTCTCCGTGCTGCTGTCAGCCGCTTCTCTCCGCCCTG 750
Q G Y R N L L A S L L L I L S V L L V S A F L A L

CCCGTGGGGCGCTCGATCAGCGATCCCGCTCCGGCCGATCCAGCAGGGCGTGTCCGAACTGGCCGACCCCGCATCTG 825
R V G R S I S D P L R R I Q Q G V S Q L R D G H L

GAAACCCGCTGCCATCCCTGGCCAGCCAGAACTGGACGAGTGGGGCGTGGCATCAACCGCATGGCGAAGTC 900
E T R L P S L R S H E L D E L A A G I N R M A E V

ATCGACCCGCGCCAGGAGATCCAGAACAGCATCGAACAGCCACCGAAGCAGCTGCCCGCAGAACTGGAAACC 975
M Q H A Q E E M Q N S I D Q A T E D V R Q N L E T

ATCGAGATCCAGAACATCGAACTGGACATCGTGGCCCGCGAAGCCCTGGAGCGAGCCCGATCAAAATCCGAAITC 1050
I E I Q N I E L D M V R R E A L E A S R I K S E F

CTCGCCACATGAGCCAGCGATCCGCCACCCCGCTCAACCGCATCATCGTTCACCAAACCTGTTCGAGAAATCC 1125
L A N M S H E I R T P L N G I I G F T N L L Q K C

GAGCTGACGGCCGGCCAGGACGACTACCTGAAACACCATCCAGAACTCCGGCCAGAGTCTCCGCGCAGAGTCTGCTTCGACATCATCAAC 1200
 E L T P R Q H D Y L N T I O K S A D S L L D T I N

GAGATCTTCGACTTCTCGAAGATCGAGGCCCGCCAGCTGCTTCTGGAACACACCCCGCTTCACCTTCGCGGAATCTC 1275
 E I L D F S K I E A G K L V L E H T P F N L R E L

ATCCAGGACACCTTCACCATCTCTCCCGCCGACCCGACGCGAGCCACCTCGAACTCTTCAGCCCTGATATATATCC 1350
 I Q E D T L T I L A P A A H A K H L E L V S L P R

GACAGCCCGCTCGCGCTGAAAGCGGATCCCGCAGCGCTCCGCGAGTTCCTTCACCAACCTTGATCAGCAACCGCATC 1425
 D T P L A L N G D P O R L R Q V L T H L I S N A I

AAGTTCACCAACGAGGGCACCATCCCGCTCCCGCCCATGCTGCTGACATCCCGGAGGAGTTCGCGCACTTCGCGG 1500
 K F T N E G T I A V R A M V E D I G E E F A Q L P

ATCAGGCTGCAGGACACCGGCATCGGCCCTGTCCTCCAGAAAGACTTCGAAAGCCCTGCTTCAGCCGCTTCAGCCAGGCC 1575
 I S V H D T G I G L S Q E D L N A L F Q A F S Q A

GACAATTCCTTGACCGCCAGGGCGGGCCACCGGCTCTGCTCTGATCTCCAGGCTCTGATGAGAGCAGATG 1650
 D N S L T R Q A G G T G L G L V T S K R L I E Q M

CCGCGCGAGATACCGCTCAAGACCGTCCCGCCGAGCGCTCTGCTGCTTCGATACGGCTCTCCCTCCCGCTTCGAC 1725
 G G E I G V N S V P G E G S E F W I R L S L P L D

GATCAGCGGAGGAGCGAGCGCCCGGACCCCGCTCCACCGCCACCGCTGCGCGCTGCTTCGAAAGAACAGCACTCGCC 1800
 D H S E D E P P T A L H G H R V A L L E Q H E L A

CCGCAGTCGATCCAGCACCGAGTTCGAGGACTCGCGCCCTGGAGTACAGCCCTTCGCGGAACTCGACAGCCCTGCTG 1875
 R Q S I Q H Q L E D C G L E V Q P F A E L D S L L

CCGCGTTCGCGCCGACCGCACGAGGAGGAGCGCGCGCTTCGCGCTTCGCGCTTCGCGGCTGACCAGCGCGGACACC 1950
 A G V A A A R Q E E R P V G L A V L G V T S R D T

AGCGCGGAGAACTTCGCGCCAGCCATCCCGGACCTCGAAACCGCTTCGCGTTCGAACTTCGCGCTTCGCGCGCCACC 2025
 S A E E L A Q R I A D L E R L G C K C L V L C P T

ACCGACAGATGTTCTACCGGAGCTCTCTCCCGGAGCGGACAGTCCAGTTCGAGAGGAGCGCGCGGACCGCGAC 2100
 T E Q M F Y Q E V L P E A Q I Q L Q S K P A H R D

AAGCTGCGAGGCGCGCTTCGCGGAACTGCTCACCCCGCAGCGGACCGCTTCGCGAGACACTCGCGCGCTTCGCGAAC 2175
 K L Q A A L G E L L T P Q P T G S Q T L G P L G N

salt
 ▼

CCGCGCGCGCGCTTCGCTCTCGCTCGAGCGAAGCCCGGCAACCTTCGCTGCTGCTGACAGACCGCTTCGCGGACATG 2250
 R A P R L L C V D D N P A N L L L V Q T L L G D M

GSTGGGCGGTCACTGTGGCCGACCGCCACCGCGGTGGAGCCGCGCGACGGGAAAGCCTTCGACCTGATC G A A V T V A D S G H A A V E A A Q R E R F D L I	2325
SmaI ↓	
TTCATGGACGTCAGAGATCCCGCGAAGGACCGCCGCAACCAACCGGATTCGCCAGTGGGACCGGACG F M D V Q M P G M D G R Q A T R A I R O W E A G Q	2400
miniTn5/lacZ1 ▲	
CCGGACACGGCCATACCGCATCCGCCCTGACCGCCCGCCGAGCCGCTGGCCAAAGAAAGCGCCGCCCTGCTCCAG P E Q R H T P I A L T A H A L A N E R R A L L Q	2475
ACCGCCATGGACGACATCAATGACCAACCGATGCAACGAGCGCCAGITGGCTGACGCTGCTGGCAATGACCGCC S G M D D Y M T K P I N E R Q L A Q V V H K W T R	2550
Nar I ↓	
CTGCACTGGCTCTGCGCCCGCCCGACGCGTCCACCGAGGTCCAGCCCGGCTGCAATGGCCACCTCAAGCTCGTG L H L R S P G A Q Q V H E V Q P A S I G H L S V L	2625
Sph I ↓	
GACTGGAGGAGGCCCTCCGCTGGCCCGCGCAACCGCGACTTGGCCCGCGACATGCTGGAGCTGCTGCTGGCC D S E E G L R L A A G K P D L A A D M L S M L L A	2700
TCGCTGGATCCGACCGCCAGCCGATCCACTACCGACCGTCCGGACCGGACCGCCCGGCTGATGGAAACAGTG S L D A D R Q A I H Q A R R D G D R A A L I E R V	2775
CATCGCCCTGACCGCCGCCACCGCTACCTGGCGGTTCGCCAGTTCGGCCCGCCGCTCCGACGACAGCGAAACCGTG H R L H G A T R Y C G V P Q L R A A C Q H S E T L	2850
CTCAAACACCAAGCTCCCGCCCGCCCGATACCGCCCTGGACGACCTGACCGCCCGCCATTTCTGGCCCTGGCGCGG L K Q H A P A A D T A L D E L D A A I L R L A G E	2925
Nar I ↓	
CCGAAATTCGGCCCGCTGGCGCGAAACCGGACCGCCGACCGGTGCGA A K F G A	2969

Fig 11. Secuencia nucleotídica de la región que contiene el gen *gacS* y su correspondiente secuencia aminoacídica deducida. Los codones de inicio y término se encuentran subrayados. El inicio de la traducción se indica con una flecha. El sitio de la inserción del miniTn5/lacZ1 se ilustra con un triángulo invertido.

Todas las proteínas reguladoras con las que presenta identidad GacS de *A. vinelandii* son cinasas histidínicas, que pertenecen a sistemas de transducción de señales de dos componentes. Estas proteínas son cinasas histidínicas multidominios similares a ArcB, las cuales además de tener los dos dominios transmembranales (TM1 y TM2) y el dominio transmisor (H1), presentan dos dominios adicionales de fosforilación (D1 y H2).

Gacs B:	WLETFVAC IFAWLGNT TNGLEHG GQNGGHA LAHAAHA	71
Gacs A:	WLETFVAC IFAWLGNT TNGLEHG GQNGGHA LAHAAHA	71
Gacs B:	IQFNHLIC RIAITLDT DKAQKLOT DDMIAHGP TMSIDPES	100
Gacs A:	IQFNHLIC RIAITLDT DKAQKLOT DDMIAHGP TMSIDPES	99
Gacs B:	QDLSTST IAPFLLMVF GQKLEST IAAFDNLG KVALDHHG	142
Gacs A:	QDLSTST IAPFLLMVF GQKLEST IAAFDNLG KVALDHHG	142
Gacs B:	ALLRNSIF ACILLLEL ATALAKK GFEKHEE IICAVDIE	200
Gacs A:	ALLRNSIF ACILLLEL ATALAKK GFEKHEE IICAVDIE	199
Gacs B:	GLEKRFPL GKHLDHAK GGNRAKLG NADHLELI DQKHEVRN	246
Gacs A:	GLEKRFPL GKHLDHAK GGNRAKLG NADHLELI DQKHEVRN	247
Gacs B:	LETEIGNIE ELANFALF AGRDSDLA INDEEPTL NDEGTELL	300
Gacs A:	LETEIGNIE ELANFALF AGRDSDLA INDEEPTL NDEGTELL	297
Gacs B:	QSETRTQI INKIDISA ELLEDEI LITSEPKR LAKNDFPHL	350
Gacs A:	QSETRTQI INKIDISA ELLEDEI LITSEPKR LAKNDFPHL	347
Gacs B:	RLIDDELIT IAPAHAK INCEVWET PLAKHDI ELPQLEHNS	400
Gacs A:	RLIDDELIT IAPAHAK INCEVWET PLAKHDI ELPQLEHNS	397
Gacs B:	NAHTEEGT DAKWLIDF DEKFC IEVYDIE IEFKNAKPAH	450
Gacs A:	NAHTEEGT DAKWLIDF DEKFC IEVYDIE IEFKNAKPAH	347
Gacs B:	SAHLEDFG ITDLEGLI SELEGGGE IMVNGR GEFKDFL	500
Gacs A:	SAHLEDFG ITDLEGLI SELEGGGE IMVNGR GEFKDFL	497
Gacs B:	HAHREIE DEELGKA ALDHIAR CAHEDDC GICEFNL	550
Gacs A:	HAHREIE DEELGKA ALDHIAR CAHEDDC GICEFNL	546
Gacs B:	ELINQAA IETVFLA VGVVLES PEPDHEED DELEKRV	600
Gacs A:	ELINQAA IETVFLA VGVVLES PEPDHEED DELEKRV	596
Gacs B:	LETHRALP GANNQTS LGAKTKE LGALHIA PAKVKEP	650
Gacs A:	LETHRALP GANNQTS LGAKTKE LGALHIA PAKVKEP	646
Gacs B:	ELGRAPL QDLEPWL DOTLEHG AKVAKHY AAVAQEA	700
Gacs A:	ELGRAPL QDLEPWL DOTLEHG AKVAKHY AAVAQEA	696
Gacs B:	ELLNVOH EMDFQTF AKVAKHY QDLEPWL AKVAKHY	749
Gacs A:	ELLNVOH EMDFQTF AKVAKHY QDLEPWL AKVAKHY	746
Gacs B:	ELGDDYD IEPDEHOL AKVAKHY AKVAKHY AKVAKHY	799
Gacs A:	ELGDDYD IEPDEHOL AKVAKHY AKVAKHY AKVAKHY	796
Gacs B:	LVIDHEGL RAAKFELA AKMLHIA LKTRAKY ARKQVHF	848
Gacs A:	LVIDHEGL RAAKFELA AKMLHIA LKTRAKY ARKQVHF	846
Gacs B:	IEPDEHOL TEGDF FLR AKVAKHY AKVAKHY AKVAKHY	898
Gacs A:	IEPDEHOL TEGDF FLR AKVAKHY AKVAKHY AKVAKHY	896
Gacs B:	IAFAHAA	907
Gacs A:	IAFAHAA	902

Fig 12. Alineamiento entre las proteínas Gacs de *P. syringae* y *A. vinelandii*. Los motivos involucrados en el evento de fosforilación se encuentran enmarcados; los residuos susceptibles a ser fosforilados están señalados con un asterisco. Los dominios transmembranales están subrayados. Los residuos idénticos están sombreados.

Analizando la secuencia nucleotídica del pMC1, pudimos determinar que la mutación generada por el miniTn5/acZ1, en el pSMU588 se debió únicamente a un fenómeno de inserción y no a otros eventos moleculares, frecuentes en este tipo de mutaciones como las ablaciones o las duplicaciones.

La figura 12 muestra un alineamiento entre GacS de *A. vinelandii* con GacS de *P. syringae*: como se puede ver, en ambas proteínas existen los dominios antes descritos.

Construcción de la mutantes JM1 y JM2.

Una vez que se determinó que *gacS* era posiblemente el responsable del efecto regulador del pSMU588, se planteó generar una mutante cromosomal ATCC 9046 *gacS* para determinar el efecto de la mutación en la producción de alginato.

Como primer paso en la construcción de la mutante antes descrita, la fracción del gen *gacS* contenido en el pMC5 se interrumpió con el cassette Ω_{sp} el cual confiere resistencia a espectinomicina (Fellay *et al.*, 1987). Las inserciones del Ω_{sp} se realizaron de tal forma que *gacS* y el gen de resistencia se transcribieran en la misma dirección y en dirección contraria, generando los plásmidos pMC7 y pMC8 (Fig. 10). En *A. vinelandii*, cuando los cassettes Ω se insertan de tal forma que éste y el gen que se interrumpe se transcriban en la misma dirección, se generan mutaciones no polares, ya que no son respetados los terminadores transcripcionales de los cassettes Ω (Mouncey *et al.*, 1995).

Los plásmidos pMC7 y pMC8 se transformaron en la cepa de *A. vinelandii* ATCC 9046 y se seleccionaron transformantes resistentes, a espectinomicina en las que probablemente se presentó un fenómeno de doble recombinación homóloga. Después, se probó por hibridación tipo "Southern", la presencia de las mutaciones. El carácter polar y no polar de las mutaciones se probó por hibridación ARN/ADN tipo "slot blot". A la mutante que presenta la mutación no polar se le llamó JM1 y a la que porta la mutación polar se le denominó JM2 (Fig 13).

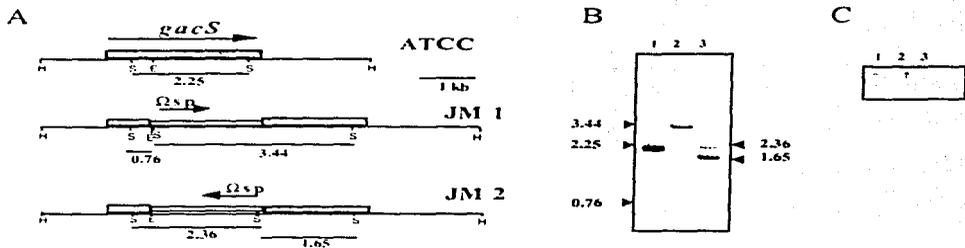


Fig 13. Construcción de las mutantes JM1 y JM2. A) Mapa físico de la inserción polar y no polar del cassette Ω_{sp} en el gen $gacS$. B) Hibridación tipo "Southern" de ADN genómico de las cepas ATCC 9046 (carril 1), JM1 (carril 2) y JM2 (carril 3) contra un fragmento interno *SphI* de 2.0 kb del gen $gacS$. C) Hibridación ARN-ADN tipo "Slot blot" con ARN total de las cepas ATCC 9046 (1), JM1 (2) y JM2 (3) contra un fragmento *SalI* de 0.6 kb ubicado al extremo 3' del gen $gacS$.

Producción de alginato en las mutantes JM1 y JM2.

El locus donde se encontró el gen $gacS$, se seleccionó originalmente como un locus regulador negativo. Por lo anterior, esperábamos que la mutación del gen $gacS$, en el cromosoma de la cepa silvestre ATCC 9046, aumentara la producción de alginato. Contrario a lo esperado, la producción del polímero en ambas mutantes tanto en medio Burk sacarosa (BS) sólido, como en medio BS líquido, se encontraba seriamente afectada. En medio sólido, la producción de alginato disminuyó tres veces, en tanto en medio líquido la producción se encontró prácticamente abatida (se disminuyó 60 veces) Tabla 4.

CEPA	MEDIO BS SOLIDO (mg/mg proteína)	MEDIO BS LIQUIDO (mg/mg proteína)
ATCC 9046	1.246 ± 0.150	2.177 ± 0.450
JM2	0.465 ± 0.053	0.036 ± 0.002
JM1	0.411 ± 0.025	0.019 ± 0.003

Tabla 4. Efecto en la producción de alginato de las mutaciones polar y no polar del gen *gacS* en la en la cepa ATCC 9046 de *Azotobacter vinelandii*.

VI OBJETIVOS II

Con los resultados anteriores se plantearon nuevas preguntas: ¿regula GacS de manera dual la biosíntesis de alginato?, ¿finalmente, que genes de la biosíntesis de alginato están regulados por GacS?, ¿esta regulación es de tipo transcripcional?, ¿existe relación entre *gacS* y el proceso de diferenciación morfológica?, ¿que gen codifica el segundo componente de GacS?, de acuerdo a los cuestionamientos anteriores, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Estudiar el papel del sistema regulador de dos componentes GacS/A en la biosíntesis de alginato y en el proceso de diferenciación morfológica en *A. vinelandii*.

Objetivos Particulares

- a) Confirmar que el efecto regulador negativo del pSMU588 se debe a *gacS*.
- b) Determinar posibles blancos finales de regulación entre los genes de la biosíntesis de alginato.
- c) Explorar si existe relación entre *gacS* y el proceso de diferenciación morfológica.
- d) Caracterizar el gen que codifica el segundo componente del sistema GacS/A en *A. vinelandii*.

VII RESULTADOS II

El efecto regulador negativo del pSMU588 se debe a *gacS*.

Los datos de producción de alginato en las mutantes *gacS* (JM1 y JM2) evidencian que *gacS* regula positivamente la síntesis de alginato. Sin embargo, el locus *muc588* fue seleccionado originalmente como un locus regulador negativo, por lo que cabía la posibilidad de que el efecto regulador negativo se debiera a otro gen, y que la incapacidad reguladora del pSMU588-21 respondiera más a un efecto polar de la mutación que a la interrupción de *gacS*.

El gen *gacS* se amplificó por PCR y se clonó en el vector pKT230. El plásmido generado, llamado pMC15 (Fig.10), se transfirió a la cepa de *A. vinelandii* ATCC 9046 y se observó que tenía un efecto aun mayor que el pSMU588: este hecho nos permitió concluir que cuando se introducen, en un plásmido, copias extras del gen *gacS*, tiene capacidad de regular negativamente la producción de alginato (Tabla 5).

CEPA	PRODUCCION DE ALGINATO ($\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.)
ATCC 9046	1246 \pm 15
ATCC9046/pSMU588	666 \pm 39
ATCC9046/pMC15	16 \pm 1.8

Tabla. 5. Efecto regulador de plásmidos que contienen el gen *gacS*, sobre la producción de alginato en la cepa ATCC 9046.

El gen *algD* es regulado a nivel transcripcional por GacS

El gen *algD* codifica la enzima GDP-manosa deshidrogenasa, cuya actividad compromete precursores metabólicos, compartidos con la síntesis de lipopolisacáridos, hacia la biosíntesis de alginato, (Rocchetta *et al.*, 1999) por lo que se puede esperar que este gen y su producto constituyan un punto importante en la regulación en la producción de alginato. Anteriormente, Campos *et al.* (1996) habían determinado la existencia de correlación entre la transcripción de *algD* y la producción de alginato. Por los argumentos, anteriores se

exploró la posibilidad de que *gacS*, via su regulador de respuesta, regulara la transcripción de *algD*, para lo cual se construyeron mutantes *gacS* con carácter polar y no polar (WI12-1 y WI12-2, respectivamente) en el fondo genético de la cepa WI12, que contiene una fusión transcripcional cromosómica *algD-lacZ*. (Campos *et al.*, 1996). La construcción de las mutantes WI12-1 y WI12-2 se realizó de manera similar a lo descrito para las mutantes JM1y JM2.

Al cuantificar la transcripción del gen *algD-lacZ* en la mutante WI12-1, crecida en medio BS líquido, se encontró que la transcripción del gen *algD-lacZ* se afecta severamente al estar ausente el gen *gacS* (Fig 14). Un efecto similar se observó en la mutante WI12-2 (datos no mostrados).

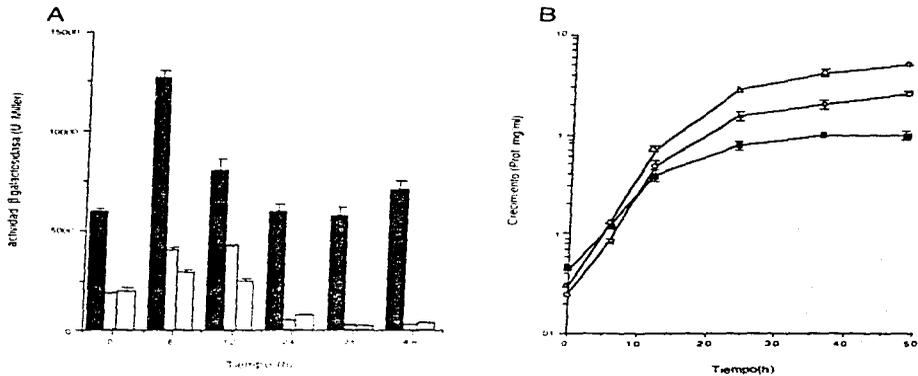


Fig.14. A) Actividad β -galactosidasa y B) Crecimiento de las cepas WI12 (barras negras y cuadrados), WI12-1(barras grises y triángulos), y WI12/pMC15 (barras blancas y círculos).

Una vez que probamos que cuando *gacS*, también regula negativamente la síntesis del polímero, nos dimos a la tarea de probar que la regulación negativa, de igual forma, se realiza controlando transcripcionalmente el gen *algD*. Para ello medimos la transcripción de *algD-lacZ* en la cepa WI12 en presencia del pMC15 y encontramos como era esperado, una disminución significativa en la transcripción del gen *algD-lacZ* (Fig 14).

Como se mencionó el gen *algD* presenta tres inicios de transcripción: un primer inicio (P2) corresponde a un promotor σ^E dependiente, otro inicio de transcripción (P1) presenta un consenso que corresponde a un posible promotor σ^{70} y un tercer inicio (P3) que no presenta secuencia consenso obvia en su posible región promotora. Para confirmar los resultados obtenidos con la fusión transcripcional *algD-lacZ*, se realizó un experimento de "Primer extension" del gen *algD* con ARN de las cepas ATCC 9046, JM1 y ATCC 9046/pMC15. En las dos últimas se encontró que a las 48 h de crecimiento, están ausentes los tres inicios de la transcripción del gen *algD*, lo cual concuerda con la medición de la transcripción de *algD-lacZ* en este tiempo y condiciones de cultivo (Fig. 15).

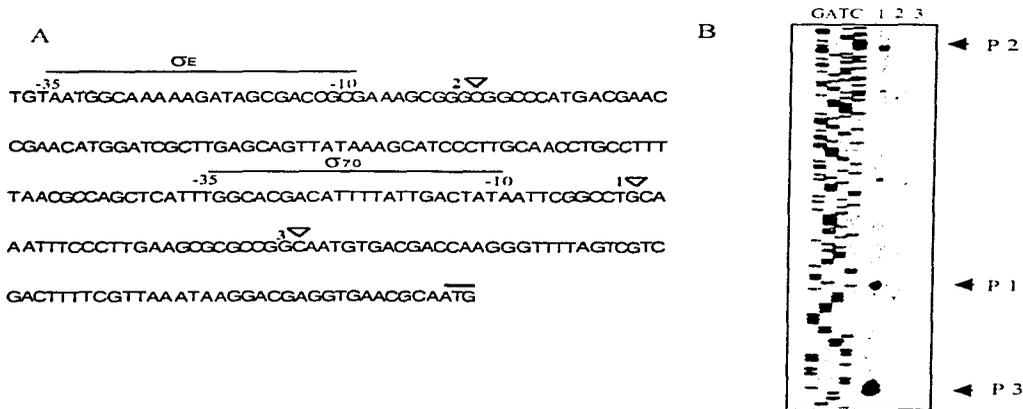


Fig.15. Inicios de transcripción del gen *algD*. A) Secuencia de ADN de la región reguladora del gen *algD*. Los triángulos indican los inicios de transcripción, el codón de inicio ATG está indicado con una barra. B) Inicios de transcripción de *algD* en las cepas ATCC 9046 (carril 1), JM2 (carril 2) y ATCC 9046/pMC15 (carril 3).

Estudio del papel de *gacS* en el proceso de diferenciación morfológica de *A. vinelandii*.

Con la finalidad de establecer si *gacS* está relacionado con el proceso de diferenciación morfológica, se evaluó la capacidad de diferenciación de las mutantes *gacS* (JM1 y JM2). Los ensayos mostraron que las mutantes JM1 y JM2 son incapaces de diferenciarse (Tabla 6); sin embargo, quedaba por aclarar si el control se daba a través de regular la síntesis de alginato, o bien si *gacS* regulaba otros productos génicos esenciales para el enquistamiento. Una respuesta parcial al planteamiento anterior se dio al cuantificar la producción de alginato en medio de inducción de enquistamiento (Burk con *n*-butanol como fuente de carbono): se encontró que las mutantes *gacS*, en este medio, no producen alginato (Tabla 6), por lo que la incapacidad de diferenciación que presentan las mutantes, probablemente se deba a la falta de alginato. Aún así, no podemos descartar la posibilidad de que GacS este regulando de manera paralela otros productos necesarios en el desarrollo del proceso de diferenciación.

CEPA	ALGINATO ($\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.)		ENQUISTAMIENTO (%)
	BS	BB	
ATCC 9046	1246 \pm 15	1717 + 11	7.2
JM1	411 + 25	38 + 2.8	<0.0001
JM2	465 + 53	29 + 3.5	<0.0001

Tabla 6. Producción de alginato en medio Burk (sólido) teniendo como fuente de carbono sacarosa (BS) o butanol (BB) y porcentaje de enquistamiento de las cepas ATCC 9046, JM1 y JM2.

A la fecha, en nuestro laboratorio se han caracterizado tres genes esenciales para el proceso de enquistamiento, y cuya función la realizan de manera independiente a la producción de alginato. Estos genes son: *algU*, *algR* y *aldH1*, el primero codifica para el factor σ^E (Moreno *et al.*, 1999); el segundo para un regulador de respuesta de un sistema de dos componentes (Nuñez *et al.*, 1999), y el tercero una aldehído deshidrogenasa involucrada en el metabolismo del *n*-butanol (Gama *et al.*, 2000). Se exploró la posibilidad de que alguno

de estos genes se regulará transcripcionalmente por *gacS*; en los dos primeros casos por "Primer extension" (datos no mostrados) y en el último mediante una fusión transcripcional *aldH1-lacZ* (datos no mostrados). Los resultados negativos obtenidos mostraron que ninguno de ellos está regulado transcripcionalmente por GacS.

Regulación de la producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) por GacS

Al observarse al microscopio óptico las mutantes JM1 y JM2 (ATCC 9046 *gacS*, no polar y polar respectivamente), es notoria la disminución de gránulos de PHB; ante esta observación, se cuantificó la producción de PHB en la mutante JM1, y se encontró que la acumulación de PHB esta disminuida aproximadamente de 7 a 8 veces con respecto a la cepa silvestre (Tabla 7). Paralelamente, se realizaron estudios de microscopía electrónica en las mismas cepas, confirmando la observación hecha en el microscopio óptico en relación al tamaño y número de gránulos de PHB (Fig 16).



Fig.16. Micrografías electrónicas de células de *Azotobacter vinelandii* crecidas en medio Burk Sacarosa durante 48 hrs. A) Cepa ATCC 9046, B) cepa JM2 y C) Cepa ATCC 9046/pMC15. Las flechas señalan los gránulos de PHB. La barra indica una escala de 0.4 μ m.

El efecto regulador negativo que *gacS* ejerce en la producción de alginato, cuando se introduce en un plásmido, se presenta de manera similar en la producción de PHB (Tabla 7).

CEPAS	PHB ($\mu\text{g}/\text{mg prot.}$)
ATCC 9046	413.1 \pm 17.8
ATCC 9046/pMC15	48.5 \pm 0.5
JM2	49.6 \pm 0.9

Tabla 7. Producción de PHB en las cepas ATCC 9046, ATCC 9046/pMC15 y JM2.

GacS regula a nivel transcripcional la biosíntesis de PHB.

En estudios previos de la forma en que se regula la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*, se reporta que la regulación se da principalmente a nivel post-traducciona, controlando la actividad de las enzimas biosintéticas (Manchak y Page., 1994). Propusimos determinar si GacS controla a nivel transcripcional o a nivel post-traducciona la producción de PHB. Para contestar la pregunta anterior, se transfirió la mutación *gacS:: Ω sp* al genoma de la cepa AJ2 (Cruz, 2000), una derivada de la cepa UW136 con una fusión transcripcional cromosómica *phbB-lacZ*; a la mutante se le llamó AJ2-2, y en ella pudimos determinar que la transcripción de *phbB* se disminuye en proporciones similares en las que se disminuye la producción de PHB en ausencia de *gacS*. Este hecho, nos indica que en *A. vinelandii* GacS regula a nivel transcripcional la síntesis de PHB (Tabla 8). Aunque no se descarta la posibilidad de que también exista regulación post-traducciona.

CEPAS	Act. β -Galactosidasa (U. Miller)
AJ2	1630 \pm 103.6
AJ2-2	360 \pm 29.3

Tabla 8. Transcripción del gen *phbB* en las cepas AJ2 y AJ2-2. La transcripción se determinó midiendo la actividad β -galactosidasa de la enzima codificada por el reportero *lacZ* de la fusión transcripcional *phbB-lacZ*.

Caracterización del gen que codifica el segundo componente del sistema GacS/A de *A. vinelandii*.

Una vez caracterizado el gen que codifica el primer componente del sistema de transducción de señales de dos componentes GacS/A, en *A. vinelandii*, nos propusimos caracterizar el gen que codifica el segundo componente del sistema.

Ya que el producto hipotético de *gacS* presenta identidades altas con la proteínas detectoras de los sistemas GacS/A reportadas en varias especies del género *Pseudomonas*, se partió de la hipótesis de que el gen que codifica para el segundo componente del sistema GacS/A en *A. vinelandii* debería ser un gen homólogo a los descritos en *Pseudomonas*. Se amplificó por PCR el gen *gacA* de *P. aeruginosa* (Reimmann *et al.*, 1997), el cual se usó como sonda para rastrear por hibridación el gen en el banco genómico de la cepa UW136. De esta forma, se seleccionó el cósmido pSMU1886. Mediante mapeo por restricción, se determinó que posiblemente el gen homólogo se encontraba contenido en un fragmento *SaI* de 0.8 kb, de la misma forma se localizó un fragmento *Clal* de 2 kb, que contenía el segmento *SaI* I antes descrito. Ambos fragmentos se clonaron, generando los plásmidos pSAFA1 y pSAFA2 respectivamente (Fig. 20). El pSAFA1 se secuenció y la secuencia nucleotídica se comparó contra el banco de datos GeneBank, confirmando así, que se había clonado un homólogo a los genes *gacA* de *Pseudomonas*. Cuando se alineó la secuencia contra los genes *gacA* reportados, se observó que ésta se truncaba aproximadamente a 20 pares de bases del posible codón de término. Para completar la secuencia del *fal* se secuenció la parte faltante, usando el pSAFA2 como template. Con 0.8 kb secuenciados se realizó un análisis posterior, encontrándose un *fal* de 0.65 kb. (Fig. 17). El producto hipotético del *fal* presentó 87% de identidad con *GacA* de *P. aeruginosa* (Reimmann *et al.*, 1997)(Fig 18).

ACCGCGTTCGCCACCTCCGAGGTGGCTGGCGGATCTCTCTGACAGTTCGGCCCCCGGAAAGCCATTCCAGGCGAG 75
gacA
 GTCGCTCGTAGTCTGTGTCGGACACGGAAAGCGAGGTGTCTCTGATTAGGCTTCTTGTGTCATGATGATCAGCATCTG 150
M I R V L V V D D H D L
EcoRV
 GTCCGCGCTGGCATCACCCGGATCTCTGGCGATATCGAGCGCCCTCCAGCTTCGTCGGACAAAGCCAGCTCCCGGGAA 225
 V R A G I T R M L A D I D G L Q V V G Q G S S G E
 GAGCCGCTGAGAAAGCCCGCGGATCTCAAGCCGATGTGATCTGATTCGATGTCAGATGCCCGGCGATGCCCGCC 300
 E A L K K A R D L K P D V I L M D V K M P G I G G
XhoI
 CTCGAGGAGACTCCCAAGCTCCAGCCGACGCAATCCCGACATCAAGGTGATGCCGCTGACAGGCTGTCCGAGGAGGAC 375
 L E A T R K L Q R S N P D I E V I A V T V C E E D
 CCGTTCGCCACCGCTCTCATGTCAGGCCCGGCGGCGGCTGGCTACTGTGACCAAGGCGCGCGCTCTCCGAGGAGATGGTC 450
 P F P T R L M Q A G A A G Y L T K G A A L D E M V
StuI
 CAGGCCATTTCGCCAGTCTTCGCGCGGCAATGGCTATATCAGGCCCGCAATTCGCCAGCAAGTGGCTCTGAAAGCC 525
 Q A I R Q V F A G H R Y I S P Q I A Q Q L A L K A
 TTCCAGCCGACAGAGAGCGGTCTCTCCCTTCGGATCTCTCTCTCCGAGCGGAGATCCAGATCCCGCTGATGATGCC 600
 F Q P Q Q S G S P F D L L S E R E I Q I A L M I A
 AATTCCGAGAAAGTTCAGAGCCATTTCGGACAAAGCTCTGTCTCTCCGAGAGACCTGAAACAACCTACCCCTACCC 675
 N C E K V Q S I S D K L C L S P K T V N T Y R Y R
SalI
 ATCTTCGAGAAACTTTCGCATCACAGCCGAGGTGGAGCTGCCGCTATTTCGGCGTGGACACCGCATGGTTCGAGCCA 750
 I F E K L S I N S D V E L A L L A V R H G M V D A
PvuII → uvrC
 TTCAGGTGATGGGAAATGCCCTGCAGCGTGGCGCTTTCTTGGCTCACTGACAGGATTCATCCCGGCTCTACCGGAT 825
 S S . M G N A F D G A A F L A H C S S H P G S T G
 GCTGGATACAAAGCGGAGCTGCTCTACGTCCGGAGGCCAAGAATCTCAGGAAAGCCCTTGTCCAGCTATTTCGG 900
 C W I A K A S C S T S G R P R I S G N A C P A I S

Fig 17. Secuencia nucleotídica de la región genómica que contiene el gen *gacA* y el inicio del gen *uvrC* con su correspondiente secuencia aminoacídica deducida. Los inicios de la traducción se indican con flechas.

GacAAv	MIRVLVVDH	DLVRAGITRM	LADIDGLQVV	QGGSSGEEAL	KHARDLKPVD	50
GacAPa	MIKVLVVDH	DLVRTGITRM	LADIEGLQVV	QADCGEDCL	KLARELKPVD	50
GacAAv	ILM [*] IVRMFGI	GGLEATRKLQ	RSNPDIK [*] VIA	VTVCEEDPFP	TRLMQAGAAG	100
GacAPa	VLMDV [*] KMFGI	GGLEATRKL	RSQPDIKVVV	VTVCEEDPFP	TRLMQAGAAG	100
GacAAv	YLTKGAALDE	MVQAIQVFA	GIRYISPOIA	QQLALKAFOP	QSGSPFDLL	150
GacAPa	YMTKGAGLEE	MVQAIQVFA	GORYISPOIA	QQLALKSFOP	QOHDSPFDSL	150
GacAAv	SEREIQIALM	IANCEKVQSI	SDKLCLSPKT	VNTYRYRIFE	KLSINSDVEL	200
GacAPa	SEREIQIALM	IANCHKVQSI	SDKLCLSPKT	VNTYRYRIFE	KLSITSDVEL	200
GacAAv	ALLAVRHGMV	DASS				14
GacAPa	ALLAVRHGMV	DAAS				14

Fig 18. Alineamiento entre las proteínas GacA de *P. aeruginosa* y *A. vinelandii*. Los residuos involucrados en el evento de fosforilación se encuentran marcados, el residuo susceptible de ser fosforilado esta señalado con un asterisco, el dominio de unión a ADN esta subrayado. Los residuos similares en ambas proteínas estan sombreados.

GacA regula positivamente la biosíntesis de alginato

Con el objetivo de construir mutantes *gacA* se mutó el gen *gacA*, contenido en el pSAFA2, mediante la inserción del cassette Ω gentamicina (Ω gm) que confiere resistencia a gentamicina (Alexeyev *et al.*, 1995), generando el plásmido pSAFA3(Fig.19). Posteriormente, usando el plásmido pSAFA3 se construyó la mutante ATCC 9046 *gacA* (JM3).

La mutante JM3 presenta un fenotipo no mucoide en placa, a diferencia de la mutante JM2 (ATCC 9046 *gacS*) que es parcialmente mucoide en estas condiciones de crecimiento. Al cuantificarse la producción de alginato en la mutante JM3, en medio BS líquido, de acuerdo con la observación anterior, no se detectaron cantidades significativas de alginato (Tabla 9).

Para descartar un posible efecto de polaridad, se complementó la mutante JM3 con el plásmido pSAFA4, un derivado del pKT230 que contiene el gen *gacA*, amplificado por PCR.

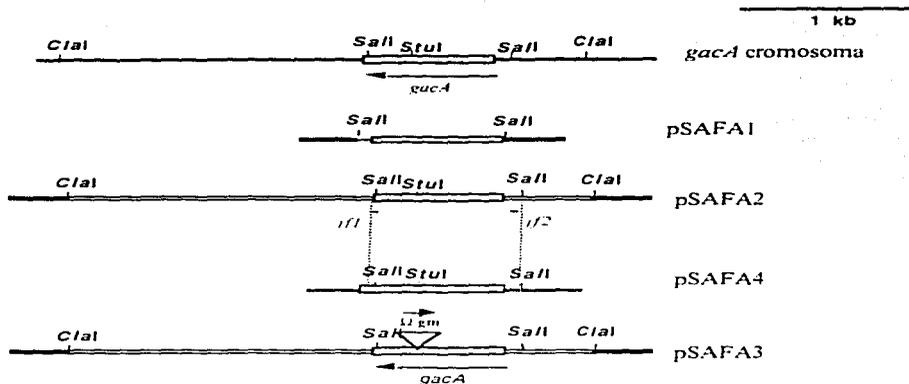


Fig.19. Mapa físico de los plásmidos construidos en el estudio del gen *gacA*. Las flechas indican la dirección de la transcripción. Los cassettes que confieren resistencia a gm están representados por triángulos invertidos. Los oligonucleótidos con los cuales se amplificó *gacA* se indican con líneas.

El pSAFA4 fue capaz de restaurar la producción de alginato en la mutante JM3, por lo que pudimos concluir que el fenotipo de la mutante se debe únicamente a la ausencia de *gacA* (Tabla 9).

CEPA	PRODUCCION ALGINATO ($\mu\text{g}/\text{mg prot.}$)
ATCC 9046	2380 + 357
ATCC 9046/pKTT230	1600 + 100
JM3	ND
JM3/pSAFA4	2350 + 165

Tabla 9 . Efecto de la mutación del gen *gacA* en la producción de alginato en la cepa ATCC9046 de *A. vinelandii*.

GacA regula a nivel transcripcional el gen *algD*

Si GacA forma parte de la cascada de regulación en la que interviene GacS, su blanco final de regulación debe ser él mismo. Para probar lo anterior, se mutó el gen *gacA* en el fondo genético de la cepa WI12 (ATCC 9046 *algD-lacZ*) (Campos *et al.*, 1996), y se generó así la mutante WJM3. Como era esperado, la transcripción del gen *algD* en la mutante WJM3 se afectó de manera similar a lo observado en las mutantes *gacS* (cepa WI12-1) (Tabla 10).

CEPA	ACT. β -GALACTOSIDASA (U. Miller)
WI12	5700 + 200
WI12/pKT230	4700 + 620
WJM3	110 + 20
WJM3/pSAFA4	4600 + 620
WI12-1	120 + 10

Tabla 10 . Efecto de la mutación del gen *gacA* en la transcripción del gen *algD*
La transcripción se determinó midiendo la actividad β -galactosidasa de la enzima codificada por el reportero *lacZ* de la fusión transcripcional *algD-lacZ*.

La cepa JM3 tiene un mayor sensibilidad a luz ultravioleta (UV)

Al analizar la secuencia de la región donde se encuentra *gacA*, encontramos que, el codón de término de *gacA*, sobrelapa con el codón de inicio de un gen homólogo a los genes *uvrC*. Una situación similar se ha reportado en las bacterias donde se encuentran *gacA* o sus homólogos (Reimann *et al.*, 1997; Eriksson *et al.*, 1998). El gen *uvrC* codifica para una exonucleasa que participa en los procesos de reparación de daños en el ADN causados por luz ultravioleta (Moolenaar *et al.*, 1987). Por lo anterior, probamos la sensibilidad a UV de la mutante JM3, que como ya se describió tiene una mutación en *gacA*, la cual probablemente es polar sobre genes que estén

siendo cotranscritos con *gacA*. Como era esperado, la mutante presentó mayor sensibilidad a UV que la cepa silvestre; por otra parte, el plásmido pSAFA4 fue incapaz de restaurar la resistencia a UV (Fig. 19).

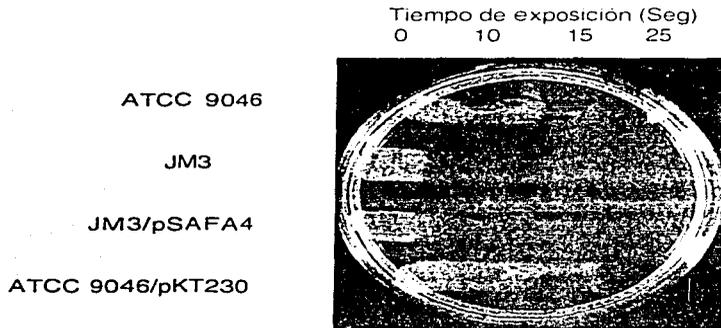


Fig. 19. Sensibilidad a luz ultravioleta de las cepas ATCC 9046, JM3 y ATCC 9046/pSAFA4 de *A. vinelandii*.

VIII DISCUSION

En este trabajo, al estudiarse el locus *muc588*, se caracterizó el gen *gacS* en *A. vinelandii*, el cual codifica para una cinasa histidinica que presenta identidades altas con cinasas del par GacS/A descrito en varias especies del género *Pseudomonas*. Las proteínas homólogas a GacS/A también se han descrito en las bacterias fitopatógenas *Erwinia carotovora* (ExpS) y *Xanthomonas campestris* (RpfC). En *E. coli*, el sistema BarA/UvrY es un par regulador homólogo a los pares GacS/A que ha sido relacionado con procesos infecciosos de la bacteria en vías urinarias (Zhang y Normak, 1996; Georgellis, 2000). Recientemente, se reportó un par homólogo en *Salmonella typhimurium*, que fué llamado BarA/SirA, y que controla la expresión de genes de invasividad esenciales en la patogénesis de la bacteria (Altier *et al.*, 2000). Como podemos ver, este sistema regulador de dos componentes está ampliamente distribuido en bacterias gram negativas; regula productos de metabolismo secundario que en la mayoría de los casos son factores de virulencia. En bacterias no patógenas, asociadas a plantas, donde ha sido reportado, el sistema regula la producción de metabolitos secundarios importantes en la relación bacteria-planta; como ejemplos de este caso, tenemos a *P. fluorescens* y *P. aurefaciens* donde el sistema GacS/A regula la producción de antibióticos que inhiben el crecimiento de hongos patógenos de plantas con las que establecen interacción. El sistema GacS/A de *A. vinelandii* reportado en este trabajo es un caso interesante, ya que es el primero reportado en una bacteria de vida libre.

El pSMU588 se seleccionó originalmente por su capacidad de disminuir la producción de alginato en la cepa ATCC 9046. Al ser caracterizado el locus regulador contenido en el cósmido, se encontró que el gen *gacS* era el responsable del efecto regulador observado. Estos datos, en conjunto con la disminución de la producción de alginato en mutantes *gacS* sugieren que GacS ejerce un efecto regulador dual sobre la síntesis de alginato: el efecto regulador positivo podría estar mediado por la activación, que por fosforilación, llevaría a cabo GacS sobre su regulador de respuesta, el cual, a su vez activaría la transcripción de sus genes blanco. La regulación negativa podría estar mediada por la defosforilación que GacS realizaría sobre su regulador de respuesta, lo cual posiblemente ocurriría al tener una mayor concentración de GacS. Una mayor concentración de GacS se daría como consecuencia de aumentar su dosis génica, lo cual, se consigue al introducir los

plásmidos supresores. Con la anterior hipótesis, se puede dar una explicación al aumento del efecto regulador de *gacS* al ser clonado en un vector con un mayor número de copias (clona pMC15) (Tabla 6). La Figura 21 esquematiza la posible regulación dual realizada por GacS sobre *algD*.

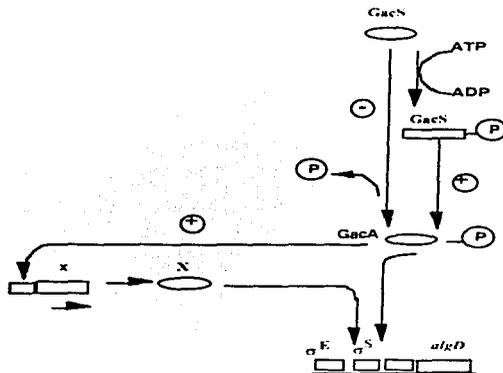


Fig.21. Modelo hipotético de regulación del gen *algD* por el sistema GacS/A en *A. vinelandii*.

La hipótesis anterior se apoya en los trabajos de Georgellis *et al.* (1997), quienes trabajando con ArcB, la molécula prototipo de estas cinasas multidomínios, han propuesto un modelo de transferencia intramolecular, de fosfato H1->D1->H2->D2, como mecanismo molecular a través del cual éstos sistemas regulan positivamente la actividad de su regulador de respuesta (Fig.9B). Recientemente, éste grupo ha reportado que esta clase de histidíncinasas multidomínios, al aumentar su concentración, tienen también la capacidad *in vitro* de defosforilar a su regulador de respuesta, mediante un mecanismo inverso de transferencia de fosfatos D1-<H2-<D2, en el cual no interviene el dominio H1 (Georgellis *et al.*, 1998). A la fecha, no han sido reportadas las condiciones *in vivo* que permitan observar los efectos de esta regulación negativa mediada por la defosforilación del regulador de respuesta, por lo que no ha sido definida la relevancia *in vivo* de este hecho.

En nuestro caso, también habría que aclarar si el aumento de la concentración de la cinasa es una condición fisiológica que se da normalmente en la bacteria o bien es un artificio generado por la introducción de *gacS* en multicopia.

En *A. vinelandii*, GacS forma parte de una cascada de regulación la cual controla a nivel transcripcional la biosíntesis de alginato, regulando específicamente el gen *algD*. Como se mencionó, este gen codifica para una enzima clave en la canalización de metabolitos comunes con otras vías hacia la síntesis de alginato. El gen *algD* presenta tres inicios de transcripción, que corresponden a promotores de diferente naturaleza. En la mutante JM2, no se detectó inicio de transcripción alguno del gen *algD*, lo cual sugiere que GacS es necesario, en el tiempo y condiciones de cultivo probadas, para iniciar la transcripción de *algD* a partir de los sitios mencionados. Un hecho similar al anterior se ha reportado en *P. fluorescens*, donde GacS regula la expresión de genes con promotores de diferente naturaleza. Algunos genes son regulados por GacS controlando los niveles del factor σ^S ; sin embargo, existen otros productos regulados por GacS cuyos genes no requieren de σ^S para su expresión (Whistler *et al.*, 1998).

La cinética transcripcional de la fusión *algD-lacZ* (Fig. 14) en mutantes *gacS* muestra que la transcripción de éste gen no depende de GacS en la fase de crecimiento exponencial. Contrario a lo observado, en fase estacionaria, donde GacS es esencial para transcribir el gen *algD*. Experimentos preliminares de "Primer extension" recientemente realizados, mostraron que a las ocho horas de cultivo (fase de crecimiento exponencial) el gen *algD* se transcribe a partir de los promotores P2 y P3 en las mutantes *gacA* y *gacS*, mientras que a las 24 horas (fase pre-estacionaria) y 48 horas de cultivo (fase estacionaria) no existe transcripción del gen *algD* a partir de ninguno de sus promotores, tal como ya había sido observado. Otro dato relevante, obtenido en este experimento, es que en la cepa silvestre, en fase de crecimiento exponencial, *algD* no se transcribe a partir del promotor P1, mientras que en fase pre-estacionaria y estacionaria aumenta de manera creciente su transcripción a partir de este promotor, lo cual sugiere fuertemente que el promotor P1, que se consideraba σ^{70} dependiente, sea un promotor de tipo σ^S . Los datos anteriores sugieren que GacS y GacA son necesarios para transcribir el gen *algD* en fase pre-estacionaria y estacionaria, pero son prescindibles en fase de crecimiento exponencial; posiblemente en esta fase de crecimiento la transcripción

de *algD* sea estimulada por reguladores independientes al sistema GacS/A. Es muy factible que al igual que en *P. fluorescens*, el sistema GacS/A en *A. vinelandii* regule promotores σ^S dependientes: quedaría por aclarar si en *A. vinelandii* al igual que en *P. fluorescens*, el sistema GacS/A regula este tipo de promotores indirectamente, controlando transcripcionalmente a *rpoS* (Whistler *et al.*, 1998).

Una regulación como la descrita, implicaría probablemente el uso de intermediarios que estarían bajo el control de un regulador de mayor jerarquía, en este caso GacS. Reportes en *P. aeruginosa* y *P. aurefaciens* muestran que GacS/A controlan la producción de metabolitos secundarios, modulando el sistema de regulación conocido como "Quorum sensing" (Reimmann *et al.*, 1997.. Chancey *et al.*, 1999). Estos hallazgos apuntalan la idea de que el sistema GacS/A es un regulador global de alta jerarquía del metabolismo secundario, por lo que no sería extraño que la regulación del alginato y PHB, efectuada por GacS/A en *A. vinelandii*, estuviera mediada por otros reguladores que a su vez se regularan por el sistema GacS/A.

De acuerdo con el carácter de regulador global de GacS, encontramos que GacS en *A. vinelandii* regula también la biosíntesis de PHB. La disminución de la transcripción del gen *phbB* en la mutante *gacS*, muestra que la regulación se da a nivel transcripcional, lo cual es un hecho relevante ya que este hallazgo rompe con la idea que se tenía desde los años setentas de que la producción de PHB en *A. vinelandii* se regula solo a nivel post-traduccional, controlando la actividad de las enzimas biosintéticas. La morfología de la mutante JM2 (ATCC 9046 *gacS*), mostrada por microscopía electrónica, sugiere que existen problemas en la estructuración de los gránulos de PHB, por lo que cabe la posibilidad de que GacS, además de regular los genes biosintéticos estuviera regulando la producción de fasinas, unas proteínas que intervienen en la formación del gránulo generando un ambiente hidrofóbico que favorece la síntesis del poli-éster (Wieczorek *et al.*, 1995).

Recientemente, se reportó en *Pseudomonas sp.* 61-3 el gen *phbR*; que regula positivamente la síntesis de polihidroxialcanoatos (Matsusaki *et al.*, 1998). En *Pseudomonas sp.* 61-3, *phbR* se encuentra físicamente junto a los genes biosintéticos y regula a nivel transcripcional la producción del poli-éster. En *A. vinelandii*, se encontró un gen homólogo a *phbR* que, al igual que en *P. aeruginosa*, regula positivamente la biosíntesis de PHB (Segura y Espín, 2000). Ante este hecho, sería interesante explorar la

posibilidad de que la regulación realizada por GacS, sobre *phbB*, este mediada por PhbR.

Los resultados obtenidos en los ensayos de enquistamiento y la cuantificación de alginato en medio de inducción (Burk con Butanol como fuente de carbono), sugieren que la incapacidad de diferenciación de las mutantes *gacS* se debe a la falta de alginato, aunque los resultados de estos experimentos no descartan la posibilidad de que, de manera paralela estén afectados otros productos esenciales para el enquistamiento. Por lo anterior, se probó si alguno de los genes esenciales para el enquistamiento conocidos a la fecha y cuya función se da de manera independiente a la producción de alginato (*algR*, *algU* y *aldH1*), están regulados transcripcionalmente por GacS y no se encontró tal evidencia. Posiblemente, cuando se tenga un conocimiento más amplio del proceso de diferenciación, se pueda dar una mejor respuesta a ésta pregunta.

Al caracterizar el gen que codifica para el segundo componente del sistema GacS/A, encontramos que en *A. vinelandii* existe un gen homólogo a los genes *gacA* reportados en otras bacterias (Rich *et al.* 1994., Reimmann *et al.*, 1997). Al igual que otros genes *gacA*, el gen *gacA* en *A. vinelandii* no se encuentra en la región cromosómica en la que se ubica *gacS*. Los fenotipos similares de las mutantes *gacS* y *gacA* así como el hecho que compartan los mismos blancos finales de regulación en la biosíntesis de alginato y PHB (Peralta, 2000), evidencian genéticamente que *gacA* codifica el par regulador de GacS.

La mutante ATCC 9046 *gacA* (JM3) presenta un fenotipo no mucoide en placa, a diferencia de la mutante ATCC 9046 *gacS* (JM2) la cual es parcialmente mucoide en estas condiciones de crecimiento. Lo anterior nos permite hipotetizar que, bajo estas condiciones, posiblemente se puede presentar una activación de GacA por vías alternas a GacS. Esto podría ocurrir mediante la fosforilación de GacA por otras cinasas o bien por pequeñas moléculas donadoras de fosfato, tal como acetil fosfato. Fosforilaciones similares por estas moléculas se han reportado en el sistema EnvZ/OmpR en *E. coli* (Lukat *et al.*, 1992).

La sensibilidad a UV de la mutante JM3 puede ser explicada por el efecto polar de la mutación sobre *uvrC*. Como se mencionó *gacA* y *uvrC* se encuentran sobrepuestos, probablemente, formando un

operón, arreglos similares se han descrito en varias especies del género *Pseudomonas*, *E. coli*, *S. Typhimurium* y *E. carotovora*. En *E. carotovora*, mutaciones polares en el gen *expA* (homólogo a *gacA*), generan una mayor sensibilidad a UV, y una disminución notable en la producción de exoenzimas. Al complementar estas mutantes con el gen *expA*, se reestablece la producción de exoenzimas pero no la resistencia a UV (Eriksson *et. al.*, 1998). En este caso, el fenotipo de sensibilidad a UV se ha explicado, al igual que en *A. vinelandii*, por el efecto polar de la mutación sobre el gen *uvrC*. Eriksson *et al* (1998), explican el hecho de que *expA* y *uvrC* se encuentren en el mismo operón en relación a patogenicidad; proponen que la respuesta de defensa del hospedero a la invasión bacteriana podría comprender la producción de sustancias que dañen el ADN bacteriano, por lo que tendría sentido tener genes de un sistema reparador de ADN junto a genes que controlen virulencia. En nuestro caso, *A. vinelandii* no es una bacteria patógena y presenta el mismo arreglo génico, por lo que creemos que la explicación anterior no se puede generalizar. En *A. vinelandii* la producción de polímeros está relacionada con situaciones desfavorables que finalmente llevan a la bacteria a diferenciarse. En tal situación, podría existir daño en el DNA y sería ventajoso tener relacionados transcripcionalmente genes que ayuden a contender con ambas situaciones.

IX CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió a nuestro grupo reportar un par de genes cuyos homólogos no habían sido relacionados con la regulación de alginato y del PHB en bacteria alguna; además de reportar la primera regulación documentada de PHB a nivel transcripcional en *A. vinelandii*. Por otra parte, se generaron datos, aunque no concluyentes, que podrían ayudar a comprender la regulación realizada por sistemas de dos componentes con cinasas multidominios. En general, las aportaciones de este estudio al modelo de trabajo de nuestro grupo se resumen en la Fig. 22. A continuación se puntualizan las conclusiones más relevantes de este trabajo:

- El efecto regulador del locus *muc588* contenido en el pSMU588 se debe al gen *gacS*.
- GacS es un regulador positivo de la biosíntesis de alginato y PHB.
- Cuando se introducen en un plásmido copias extras de *gacS*, éste tiene la capacidad de regular negativamente la biosíntesis de alginato y PHB.
- GacS regula transcripcionalmente al gen *algD*, el cual codifica para una enzima clave en la biosíntesis del alginato.
- En *A. vinelandii*, la producción de PHB está regulada a nivel transcripcional por GacS; dicho control se ejerce regulando la transcripción del gen biosintético *phbB*.
- Es muy probable que el efecto regulador de *gacS*, en el proceso de diferenciación morfológica, se deba al control que *gacS* ejerce sobre la biosíntesis de alginato.
- Existe en *A. vinelandii*, un gen homólogo a los genes *gacA* reportados en varias especies del género *Pseudomonas*, del cual tenemos evidencias genéticas, que codifica para el par regulador de GacS.
- La mayor sensibilidad a UV de la mutante ATCC 9046 *gacA* (JM3), es muy probable que se deba al efecto polar de la mutación, sobre el gen *uvrC*.

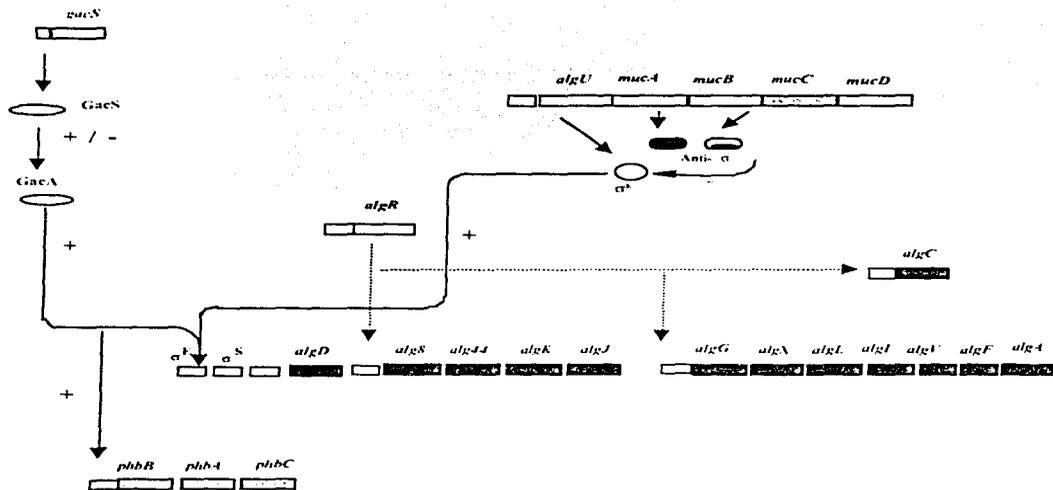


Fig. 22. Modelo de regulación de biopolímeros en *A. vinelandii*.

X PERSPECTIVAS

- Expresar y purificar a GacS y a GacA, para demostrar que GacS tiene la capacidad tanto de fosforilar como de defosforilar a GacA.
- Definir el papel de los residuos de fosforilación de GacS en la regulación negativa, y determinar si existe concordancia con los datos generados *in vitro* en el sistema ArcB/A.
- Determinar si la regulación de GacS/A sobre la producción de alginato y PHB se da de manera directa o indirecta.
- En caso de existir regulación indirecta encontrar los intermediarios de esta vía de regulación.
- Confirmar que: en *A. vinelandii* el sistema GacS/GacA regula promotores de tipo σ^s , y determinar, si esta regulación se da controlando los niveles del factor σ^s .

XII APENDICES

a) MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas y plásmidos usados en este trabajo se describen en la Tabla 1.

Tabla 1.- Cepas y plásmidos usados en este trabajo.

Cepas	Fenotipo/Genotipo	Referencia
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
ATCC 9046	Cepa silvestre, mucóide	Colección ATCC
UW 136	cepa no mucóide, <i>algU</i>	Bishop y Brill, 1977
AJ2	UW136, <i>phbB-lacZ</i>	Cruz, 2000
JM1	Mutante no polar ATCC 9046 <i>gacS</i>	Este Trabajo
JM2	Mutante polar ATCC 9046 <i>gacS</i>	Este Trabajo
JM3	Mutante polar ATCC 9046 <i>gacA</i>	Este Trabajo
W112-1	Mutante no polar W112 <i>gacS</i>	Este Trabajo
WJM3	Mutante polar W112 <i>gacS</i>	Este Trabajo
W112-2	Mutante no polar W112 <i>gacS</i>	Este Trabajo
WJM3	Mutante polar W112 <i>gacA</i>	Este Trabajo
W112	ATCC 9046, <i>algD-lacZ</i>	Campos, <i>et al.</i> , 1996
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>SupE44, ΔlacU169, hsdR17, recA1, endA1, gy</i>	Gibco BRL
SI7.1	<i>rA96, thi-1, recA1</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
SI7.1 λ pir	<i>thi pro hsd (r m) recA::RP4-2-Tc::Mu</i> <i>Kmr::Tn7 Tp' Sm'</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAOI	Cepa Silvestre	Holloway <i>et al.</i> , 1979
Plásmidos		
pSMS588	Cósmido que contiene el gen <i>gacS</i>	Martinez-Salazar <i>et al.</i> , 1996
pSMU1886	Cósmido que contiene el gen <i>gacA</i>	Este Trabajo
pKT230	Vector de clonación	Bagdasarian <i>et al.</i> , 1982
pUTminiTn <i>5lacZ1</i>	Plásmido que alberga el miniTn <i>5lacZ1</i> , solo replicable en cepas λ pir	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
pBluescriptI λ IKS ⁻	Vector de clonación	Stratagene
pMC1	derivado del pBluescriptI λ IKS ⁻ , contiene un	Este trabajo

pMC3	fragmento <i>SalI</i> , con la mutación generada por el miniTn5 <i>lacZ1</i> en el gen <i>gacS</i> derivado del pBluescriptIIKS ⁺ , contiene un fragmento silvestre <i>SalI</i> de 0.8 kb que corresponde a la región afectada por la transposición	Este trabajo
pMC5	pBluescriptIIKS ⁺ , que contiene un fragmento <i>SmaI</i> de 2.5 kb que corresponde a la posible región promotora y parte del gen <i>gacS</i>	Este trabajo
pMC9	pBluescriptIIKS ⁺ , que contiene un fragmento <i>HindIII</i> de 9.0 kb que alberga al gen <i>gacS</i>	Este trabajo
pMC15	Derivado del pKT230, contiene el gen <i>gacS</i> y su posible región promotora amplificado por PCR	Este trabajo
pMC7	Derivado del pMC5, contiene una mutación polar en el gen <i>gacS</i> generada por la inserción de cassette Ω sp en un sitio único <i>EcoRI</i>	Este trabajo
pMC8	Derivado del pMC5, contiene una mutación no polar en el gen <i>gacS</i> generada por la inserción de cassette Ω sp en un sitio único <i>EcoRI</i> .	Este trabajo
pSAFA1	Derivado del pBluescriptIIKS ⁺ , contiene un fragmento <i>SalI</i> de 0.8 kb en el que se encuentra parte del gen <i>gacA</i> y su posible región promotora	Este trabajo
pSAFA2	pBluescriptIIKS ⁺ , que contiene un fragmento <i>ClaI</i> de 2.0 kb en el que se encuentra íntegro el gen <i>gacA</i> y su posible región promotora	Este trabajo
pSAFA3	Derivado del pKT230, contiene el gen <i>gacA</i> y su posible región promotora	Este trabajo
pSAFA4	Derivado del pSAFA3 con una mutación por inserción en el gen <i>gacA</i> generada por la ligación del cassette Ω gm. en un sitio único <i>SalI</i>	Este trabajo

Medios y condiciones de cultivo

Los cultivos de *A. vinelandii* se realizaron en medio Burk Sacarosa (BS), cuya composición es la siguiente (g/l): K₂HPO₄, 0.8; KH₂PO₄, 0.2; Sacarosa, 0.2; Na₂SO₄, 0.183; MgCl₂·6H₂O 0.16; FeSO₄·7H₂O, 0.005; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.0002; CaCl₂·2H₂O, 0.073. El pH se ajustó a 7.2.

P. aeruginosa se creció en medio PIA (*Pseudomonas isolation agar*), DIFCO.

Para la cuantificación de alginato y de PHB se utilizaron cultivos crecidos durante 48 h, en matraces de 125 o 250 ml que contienen un volumen de medio que corresponde a una quinta parte de volumen total del matraz. Todos los cultivos se incubaron a una temperatura de 30 °C con una velocidad de agitación de 200 rpm.

Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en matraces de 125 ml con 25 ml de medio o de 250 ml con 50 ml de medio en incubadora con agitación a 200 rpm.

Los antibióticos utilizados para *A. vinelandii* y *E. coli* fueron (en µg/ml): Acido Nalidíxico (Nal) 10 y 20 ; Ampicilina (Ap), no utilizado y 200; Espectinomina (Sp), 100 y 100; Kanamicina (Km), 3 y 30; Rifampicina (Rif), 10 y no utilizado; Tetraciclina (Tc), 30 y 20, Gentamicina (Gm) 2 y 10., Estreptomina (Sm) 2 y 20.

Cruzas para transferencia de plásmidos por conjugación y transformación de *A. vinelandii*

Las cruzas triparentales se realizaron utilizando el plásmido ayudador pRK2013 (Figurski y Helinski, 1979) y se seleccionaron en medio Burk sacarosa con el antibiótico requerido. La transformación de *A. vinelandii* se llevó a cabo con células competentes preparadas en BS sin fierro ni molibdeno (Page y Tigerstrom, 1978).

Mutagénesis del cósmido pSMU588

Para llevar a cabo la mutagénesis al azar del pSMU588, se realizaron cruzas biparentales entre la cepa receptora de *E. coli* S17 (Rif^r) /pSMU588 (Tc^r) y la cepa donadora de *E. coli* S17.1(λ pir Ap^r)/pUTminiTn5/acZ1 (Km^r), la cual alberga el trasposón miniTn5/acZ en un vector suicida que solamente se replica en cepas λ pir. Las cepas padres se inocularon en 5 ml de LB y se incubaron de 8 a 12 horas. De estos cultivos se tomaron 200 µl y se mezclaron. Se inocularon 200 µl de la mezcla en LB sólido sin antibiótico y se incubaron toda la noche. Posteriormente, el tapete de crecimiento celular se levantó y se resuspendió en NaCl 0.85 %. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones de 1X10⁰ a 1X10⁻³, de las cuales se inocularon 200 µl sobre LB Tc³⁰Km³⁰Rif⁴⁰ y se incubaron toda la noche. Al día siguiente, se probó la sensibilidad a Ap en cada una de las colonias seleccionadas; las colonias Ap^r se descartaron ya que

posiblemente presentaban un fenómeno de cointegración (de Lorenzo *et al.*, 1990).

Entre las cepas Tc^cKm^rRif^rAp^s pudieron presentar dos eventos de transposición: la transposición del pSMU588 y la inserción del transposón en el cromosoma de la cepa S17.1. Para seleccionar el primer evento, los cósmidos presentes en las cepas Tc^cKm^rRif^rAp^s fueron transferidos a la cepa DH5 α (Nal^r) de la siguiente manera: se inoculó la cepa receptora en 5ml de LB y se incubó toda la noche; al día siguiente se inocularon 100 μ l de este cultivo en LB sólido sin antibiotico y sobre ésta se sembraron, una a una, las colonias donadoras y se incubaron toda la noche. Al día siguiente se transfirió la zona de crecimiento de las cepas donadoras a medio selectivo LB Tc³⁰Km³⁰Nal²⁰, seleccionando las cepas DH5 α a las que se transfirieron los cósmidos que sufrieron un evento de transposición.

Ensayos de supresión de mucoidia y selección del pSMU588-21

Los cósmidos mutantes generados en el proceso de mutagénesis fueron transferidos por conjugación a la cepa mucoide ATCC9046 de *A. vinelandii*, siguiendo el protocolo reportado por Martínez-Salazar *et al.* (1996). Una vez transferidos se observó el efecto de los cósmidos mutantes sobre la mucoidia. Para comprobar el efecto anterior se cuantificó la producción de alginato. Ensayos similares se realizaron con el plásmido pMC15.

Cuantificación de la producción de alginato

La producción del polisacárido se midió después de precipitar el alginato con isopropanol y mediante la cuantificación espectrofotométrica de ácidos urónicos a 530 nm, de acuerdo a lo reportado (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973).

Cuantificación del contenido de PHB

La cuantificación del contenido celular de PHB se realizó por el método de Law y Slepecky (1961), mediante la separación del polímero por digestión con hipoclorito de sodio, su conversión a ácido

crotónico por tratamiento con ácido sulfúrico a 95 °C durante 10 minutos, y su cuantificación espectrofotométrica a 235 nm.

Ensayos de enquistamiento

Para lograr la formación de quistes de *A. vinelandii*, se utilizó *n*-butanol como inductor del proceso de diferenciación, según el método reportado por Stevenson y Socolofsky (1966). Las células de un cultivo crecido 18 horas en medio Burk con sacarosa 2% se cosecharon, se lavaron 2 veces con MgSO₄ 10 mM y se sembraron en placas de medio Burk con *n*-butanol 0.2 % como única fuente de carbono. Al cabo de cinco días, se recogieron las células de estos cultivos y se resuspendieron en MgSO₄, 10 mM. Se transfirieron alícuotas de esta suspensión conteniendo aproximadamente 10⁶ células, a filtros Millipore HA de 0.45 µm y se secaron a 30 °C por cinco días. Se determinó, por cuenta viable, tanto el número de células colocadas en los filtros, como el porcentaje de células resistentes a desecación (quistes) que se resuspendieron de los filtros secos.

Microscopía electrónica

Para la microscopía electrónica, las células se fijaron en glutaraldehído 2% y en tetraóxido de osmio; se deshidrataron con soluciones graduales de etanol, se trataron con óxido de propileno y se incluyeron en Epon 812, según lo reportado por Mejía *et al.* (1997).

Manipulaciones de ADN y ARN

Los procedimientos estándar para purificación de ADN total y de plásmidos, digestiones con enzimas de restricción, electroforesis en geles de agarosa, purificación de ADN de geles de agarosa, ligación de ADN y transformación de *E. coli*, se realizaron según lo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Las secuencias de ADN se determinaron por el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). La purificación de ARN se realizó según lo reportado por Barry *et al.* (1992). Los ensayos de extensión de primeros, para la identificación del inicio de transcripción, se realizaron con 50 µg de ARN purificado de cultivos crecidos por 48 h en medio BS. La reacción de extensión de primeros se realizó de la siguiente manera:

Reacción de marcaje con gama ATP (P^{32}), del oligonucleótido algD1: Esta reacción se llevó a cabo con 1 U de la enzima polinucleótido cinasa (Boehringer), y 20 picomoles del oligonucleótido, el volumen de reacción fue de 20 μ l. Se incubó por 1 hora a 37 °C.

Reacción de extensión: Se utilizó el sistema de Amersham y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se utilizaron, en la reacción, las siguientes cantidades: ARN, 50 μ g, NaCl 2.5 M, 1.76 μ l, Tris HCl 1M, 0.66 μ l, oligonucleótido marcado (P^{32}), 5 picomoles, inhibidor de enzimas degradadoras de ARN, 25 U (Boehringer), DTT 10 mM, 3.7 μ l, desoxirribonucleótidos (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) 40mM, 2 μ l y 10 U de la enzima Transcriptasa reversa RAV2 (Amersham). El ARN, junto con el cloruro de sodio, la solución de TrisHCl y los oligonucleótidos, se desnaturalizaron a una temperatura de 55°C/3'. Posteriormente se le añadió el resto de los reactivos, ajustando la reacción a un volumen de 40 μ l. La extensión se realizó a 42°C durante 1 hora. El ADN copia (cADN), resultante de la reacción de la transcriptasa reversa, se precipitó con 10 μ l de acetato de amonio 10M y 100 μ l de etanol por un período mínimo de 3 horas (o toda la noche). Después de centrifugar, el cADN, se lavó 2 veces con etanol al 70%. El cADN se resuspendió en un volumen de 8 μ l. Simultáneamente, se realizó una secuencia nucleotídica, usando el mismo primer para identificar el sitio de inicio de la transcripción.

Análisis de secuencias

Las secuencias se compararon con las bases de datos GeneBank y SWISS PROT utilizando algoritmos BLASTN y BLASTX versiones 1.4 y 2.0 (Altschul *et al.*, 1990). Las comparaciones específicas con un gen o proteína en particular se realizaron con el programa Gene Works 2.5 (IntelliGenetics, Inc.) Para el ensamblaje de secuencias, determinación de sitios de restricción, predicción de secuencias aminoacídicas y otros análisis fue usado el programa Gene Works 2.5.

Cuantificación de la actividad de β -galactosidasa

Se centrifugó un volumen adecuado de cultivo de las cepas W112 y derivadas, desarrolladas en medio BS a los tiempos indicados. Las células se lavaron con solución de $MgSO_4$ 10mM hasta que estuvieron libres de alginato. La cuantificación de β -galactosidasa se realizó por el método de Miller (1972), con algunas modificaciones en la etapa de lisis celular (Ferrari, *et al.*, 1985). El paquete celular se resuspendió en 1 ml de $MgSO_4$ 10 mM. Se tomó una cantidad adecuada de células, se trataron con lisozima (0.01%), y se incubaron a 37 °C durante 5 minutos. Enseguida se le adicionó tritón X100 (0.1%) y se determinó la actividad de β -galactosidasa según Miller. Las unidades reportadas son unidades Miller que equivalen a los nmoles de orto-nitrofenol generados cada minuto a 28 °C /mg de proteína. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Amplificación del gen *gacS* de *A. vinelandii*

El gen *gacS* de *A. vinelandii* se amplificó por PCR, usando el plásmido pMC9 como template, con los oligonucleótidos *gacS1* y *gacS2* (Tabla 2). Las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización, 95°C/1 minuto; alineamiento, 63°C/1 minuto; extensión, 72°C/2 minutos, 20 ciclos; con un último ciclo de extensión, 72°C/10 minutos. El producto resultante, se clonó en pKT230, para dar origen al plásmido pMC15.

Amplificación del gen *gacA* de *A. vinelandii*

El gen *gacA* de *A. vinelandii* se amplificó por PCR, usando como template el plásmido pSAFA2, con los oligonucleótidos: *jf1* y *jf3* (Tabla 2). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: temperatura de desnaturalización, 94°C/45 segundos; temperatura de alineamiento 65°C/45 segundos; y temperatura de extensión de 72°C/1.30 minutos, 20 ciclos. Posteriormente se le dio un ciclo más de extensión a 72°C/10 minutos. El producto resultante, se clonó en pKT230, para dar origen al plásmido pSAFA4.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en la amplificación por PCR de los genes *gacA* y *gacS*

Secuencia del oligonucleótido 5'-3'	Oligonucleótidos usados en la amplificación de	
	<i>gacS</i>	<i>gacA</i>
AAGCGGAGCTCGAGCCGTCAGG	<i>gacS1</i>	----
GGCGGCATCGACCATGCCGTGGCG	<i>gacS2</i>	----
TTGCCACCTCCCGGGTGG	----	<i>jf1</i>
GGTTGCCACCTCGCAGG	----	<i>jf3</i>

Construcción de las cepas JM1, JM2 y JM3

En los tres casos, se transformó la cepa ATCC 9046 con los plásmidos pMC7, pMC8 y pSAFA3, y se seleccionaron transformantes resistentes a espectinomicina, en el caso de las cepas JM1 y JM2, y resistentes a gentamicina para la cepa JM3. En las transformantes seleccionadas se presentó un evento de doble recombinación homóloga, que fué confirmado por hibridación tipo "Southern Blot".

Construcción de las cepas WI12-1, WI12-2 y WJM3

Se transformó la cepa WI12 con los plásmidos que pMC7, pMC8 y pSAFA3, y se seleccionaron transformantes resistentes a espectinomicina en el caso de las cepas WI12-1 y WI12-2; en tanto para la cepa WJM3 se seleccionaron transformantes resistentes a gentamicina. El evento de doble recombinación homóloga en las transformantes se confirmó por hibridación tipo "Southern Blot".

Ensayos de sensibilidad a luz ultravioleta

Se inocularon en placas de medio BS, después de ser lavadas con $MgSO_4$ 10 mM, cantidades similares de bacterias crecidas por 48 hrs en medio BS líquido. Posteriormente, las placas inoculadas se expusieron 0, 10, 15 y 25 segundos a luz ultravioleta generada por una lámpara germicida de 15 Watts. Una vez irradiadas, las placas se incubaron en oscuridad por 48 horas.

b) ARTICULO PUBLICADO

The GacS Sensor Kinase Regulates Alginate and Poly- β -Hydroxybutyrate Production in *Azotobacter vinelandii*

MIGUEL CASTAÑEDA, JOSEFINA GUZMÁN, SOLEDAD MORENO, AND GUADALUPE ESPÍN*

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos 62250, México

Received 11 November 1999; Accepted 14 February 2000

Azotobacter vinelandii produces two polymers: the extracellular polysaccharide alginate and the intracellular polyester poly- β -hydroxybutyrate (PHB). A cosmid clone (pSMU588) from an *A. vinelandii* gene library diminished alginate production by *A. vinelandii* mucoid strain ATCC 9046. The nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of the locus responsible for the mucoid suppression revealed 65% identity to *Pseudomonas* GacS, a transmembrane sensor kinase of the two-component regulators, whose cognate response regulator, GacA, is a global activator regulating several products and virulence factors. Plasmid pMC15, harboring gacS, and a strain carrying a gacS nonpolar mutation were constructed. Either pMC15 or the gacS mutation significantly reduced alginate production and transcription of *algD*, the gene coding for the key enzyme GDP-mannose dehydrogenase of the alginate biosynthetic pathway. We found that the gacS mutation also reduced PHB accumulation and impaired encystment. Taken together, these data indicate that in *A. vinelandii* the gacS: global system regulates polymer synthesis.

Azotobacter vinelandii is a nitrogen-fixing soil bacterium that undergoes differentiation to form desiccation-resistant cysts and produces two polymers of industrial importance: alginate and poly- β -hydroxybutyrate (PHB). Both polymers are involved in the encystment process; alginate is a component of the cyst capsule (28), and PHB accumulation correlates with the frequency of cyst formation (30).

A. vinelandii has been shown to possess an alginate biosynthetic gene cluster (2, 16, 20, 25, 32), organized in three operons, one of which transcribes *algD* encoding a GDP-mannose dehydrogenase, which converts GDP-mannose to GDP-mannuronic acid, the substrate for alginate polymerization. The *algC:umac:ABC* cluster controls alginate production. AlgU is a σ^70 homolog (19). The *umacA* and *umacB* genes code for negative regulators of AlgU activity. In strain ATCC 9046, transcription of the *algD* gene is initiated at three sites, one of which is AlgU dependent (2). AlgU activity was shown to be involved in the

encystment process independent of its role in alginate synthesis (23).

Three enzymes are involved in PHB biosynthesis in *A. vinelandii*: a β -ketothiolase, an acetoacetyl-coenzyme A reductase and a PHB synthetase (18). PHB synthesis in *A. vinelandii* was shown to be regulated at the level of the β -ketothiolase activity (18). The genes encoding the enzymes participating in PHB synthesis in *A. vinelandii* have not been reported.

Members of our group have previously reported the identification of cosmid pSMU588 from a gene bank of nonmucoid strain UW136, which reduced alginate production in *A. vinelandii* ATCC 9046 (19). The characterization of pSMU588 reported here allowed us to identify a regulatory gene homologous to *Pseudomonas* gacS, coding for a sensor kinase of the two-component regulatory systems. This study also provides evidence for GacS playing a role as a regulator of alginate and PHB synthesis in *A. vinelandii*.

TABLE 1. Polymer production and encystment in *A. vinelandii* strains*

Strain	Alginate production (μ g/mg of protein)		BIP	PHB production (μ g/mg of protein)	Encystment (%)
	Liquid	Solid			
ATCC 9046	1,667 \pm 11	1,246 \pm 15	1,717 \pm 11	413.1 \pm 17.8	7.2 \pm 1.5
ATCC 9046 pSMU588	666 \pm 39	ND ^b	ND	ND	ND
ATCC 9046 pSMU588-21	1,320 \pm 68	ND	ND	ND	ND
ATCC 9046 pMC15	16 \pm 1.8	ND	ND	48.5 \pm 0.5	ND
JM1	19 \pm 1.5	411 \pm 25	38 \pm 2.8	ND	<0.0001
J542	36 \pm 2.3	465 \pm 53	29 \pm 3.5	49.6 \pm 0.9	ND

* Alginate production was determined as previously described (21), all determinations were done in triplicate. PHB production was determined as previously described (29), in cells grown for 48 h in Burk's liquid medium supplemented with 2% sucrose. Values are means \pm standard errors of the means.

^b BS, Burk's medium supplemented with 2% sucrose as the carbon source.

^c BB, Burk's medium supplemented with 0.2% *n*-butanol as the carbon source

^d ND, not determined.

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apd. Postal 510-3, Cuernavaca Morelos 62250, México. Phone: 52-73-291644. Fax: 52-73-172388. E-mail: espin@ibt.unam.mx.



FIG. 1. Electron micrographs of *A. vinelandii* cells grown for 48 h in Burk's medium supplemented with 2.0% sucrose. (A) Strain ATCC 9046; (B) strain JM2; (C) strain ATCC 9046 pMC15. Arrows indicate small PHB granules. Bars, 0.4 μ m.

Identification of the locus responsible for the suppression of mucoidy. An *In5-lacZ* (ϕ) mutagenesis of plasmid pSMU588 was carried out to identify the locus responsible for the reduction of alginate. A pSMU588::*mmi-In5-lacZ* derivative that no longer suppressed mucoidy was isolated and named pSMU588-21. Alginate production of ATCC 9046 carrying this plasmid was determined and the results are shown in Table 1.

We determined 3 kb of nucleotide sequence around the *mmi-In5-lacZ* insertion. DNA sequence analysis revealed one open reading frame encoding a polypeptide of 908 amino acid residues, sharing similarity with transmembrane sensor kinases belonging to signal transduction proteins of the family of two-component regulators (12). Among those with the highest identity (65%) was GaeS (previously called LemA), which is present in the following *Pseudomonas* species: *P. syringae* (13), *P. viridiflava* (15), *P. fluorescens* (5), *P. autotolicum* (3), and *P. solanace* (11). In *P. syringae*, GaeS and its cognate response regulator, GaeA, are required for the production of the toxin syringomycin and for extracellular proteases (27); in *P. viridiflava*, GaeS controls protease, pectate lyase and alginate production (15); and in *P. fluorescens*, GaeS controls antibiotic production (5). A *gaeS* homolog, *ppfA*, which regulates the production of virulence factors, has been reported in the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* (8). In *P. aeruginosa* and *P. autotolicum*, GaeA, the GaeS cognate response regulator, has been shown to be a global activator regulating several products and virulence factors via acyl-L-homoserine lactones (3, 26).

The *A. vinelandii* GaeS amino acid sequence contains specific motifs typical of the AreB subfamily, histidine protein kinases that are characterized by containing, in addition to the two transmembrane domains and the orthodox transmitter III domain, a response regulator D1 domain and a second phosphorylatable histidine, H2 (9, 14). The exact location of the *mmi-In5-lacZ* mutation within *gaeS* was mapped between codons encoding amino acids 735 and 736.

Plasmid pMC15. To rule out the possibility that plasmid pSMU588-21 no longer suppressed alginate production due to a polar effect of the *gaeS*::*mmi-In5-lacZ* insertion rather than to the lack of the *gaeS* gene product, oligonucleotides *gaeS*1 (5'-TAGCCGGATCCGAGCCGTCAGGG-3') and *gaeS*2 (5'-ACGGTCGCCCTCCGAGTTCGCGTGG-3') were used to isolate by PCR a fragment containing the *gaeS* gene flanked by the ATG codon (200 bp upstream) and the stop codon (20 bp downstream); this fragment was cloned into plasmid pKT230 (1). The resultant plasmid, pMC15, was found to have a much stronger effect on alginate production (Table 1), confirming the negative effect of *gaeS* on alginate production and ruling out the possibility of a polar effect.

Construction and characterization of *gaeS* mutants. Sensor kinases of the two-component regulatory systems usually act as positive regulators by phosphorylating the cognate response regulator. To investigate a positive role of *gaeS* on alginate biosynthesis, ATCC 9046 derivatives carrying *gaeS* mutations were constructed. In *A. vinelandii* the insertion of 41 cassettes into genes with the same orientation as the direction of transcription produces nonpolar mutations which allow transcription of the downstream genes in the same operon (21, 24). Plasmid pMC5, a pBluescript KS(-) plasmid which carries a 2.5-kb *Sma*I DNA fragment including *gaeS*, was used to construct *gaeS*::1-Sp mutations. A 2-kb fragment containing a spectinomycin resistance gene (1-Sp) from plasmid pHP4512-Sp (7) was inserted into the unique *Eco*RI site present within *gaeS*. Plasmids pMC7 and pMC8 with the cassette inserted in both orientations were selected and introduced into strain ATCC 9046. Sp^r transformants were selected. Strains JM1 and

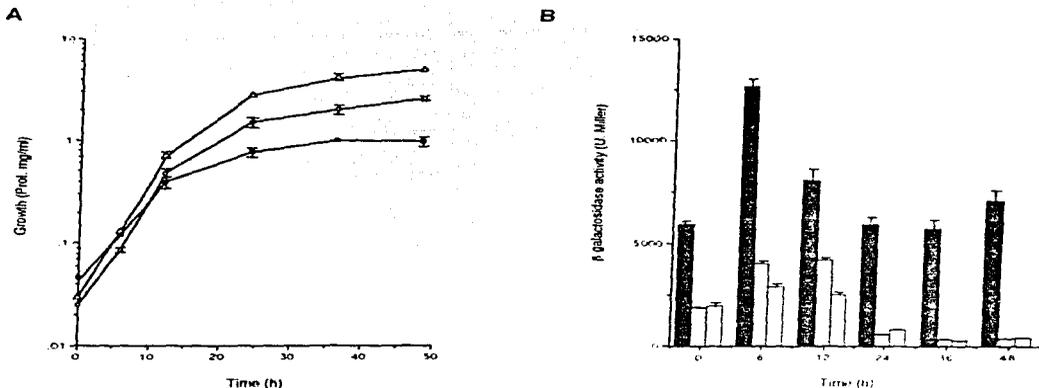


FIG. 2. Growth (A) and β galactosidase activity (B) on Burk's medium supplemented with 2% sucrose are shown for the strains W112 (grey bars and black bars), W112 (triangles and grey bars), and W112 pMC15 (circles and white bars). Prof., protein.

JM2 were isolated and were shown, by Southern blot analysis, to carry the *gacS*:: λ -Sp nonpolar and polar mutations, respectively (data not shown). RNA isolated from strains JM1, JM2, and ATCC 9046 were hybridized with a 700-bp fragment corresponding to the 3' end of *gacS*. Hybridization of RNA from the wild type with that of the *gacS* nonpolar JM1 mutant but not with that of the JM2 polar mutant was observed (data not shown). Both *gacS* mutant strains produced threefold less alginate than the parental strain, ATCC 9046, when grown on solid medium (Table 1). When cultures of these mutants were grown on liquid medium, a 30- to 60-fold reduction in alginate production was detected. These data indicate that the negative effect on alginate production observed is due to the lack of the *gacS* gene product and not to a polar effect.

GacS also controls PHB production. PHB granules were visible in cells of wild-type ATCC 9046 under a light microscope; however, no PHB granules were observed in cells of strains JM1 or JM2. PHB accumulation in these strains was determined. As shown in Table 1, either a *gacS* mutation or plasmid pMC15 caused a significant reduction in PHB accumulation. Electron microscopic examination of cultures of ATCC 9046, JM2, and ATCC 9046 pMC15 was carried out as described previously (21), and the results are shown in Fig. 1. In contrast to the wild-type ATCC 9046, where big PHB granules are observed, strain JM2 and ATCC 9046 pMC15 appear to contain numerous very small PHB granules and disorganized or amorphous white structures that appear to contain PHB. These observations indicate that GacS also regulates PHB accumulation.

The effect of the *gacS* mutation on alginate and PHB production indicates that GacS plays a positive role in the regulation of polymer synthesis in *A. visuelandii*. This role is likely due to the kinase activity of GacS that results in phosphorylation of GacA, leading to activation of alginate and PHB genes. On the other hand, in the presence of the *gacS* gene cloned

into the pKT230 vector, with a copy number of 15 to 20 (4), the synthesis of these polymers is significantly reduced. A similar observation was reported for the *Escherichia coli* histidine protein kinase ResC, which, together with ResA, positively regulates synthesis of colanic acid, a component of the capsule conferring resistance to desiccation in *E. coli* (31). Cells carrying a multicopy *resC* plasmid were shown to reduce the level of colanic acid (10). However, the negative effects observed when two-component regulatory systems are present on multicopy plasmids do not necessarily reflect a natural situation; thus, the reduced alginate level may represent an artifact.

The *algD* gene is a target of signal transduction by GacS. *algD*, the gene encoding GDP-mannose dehydrogenase, the key enzyme in the alginate biosynthetic pathway, seems to be highly regulated, since its transcription can initiate from three different sites, p1, a σ^{70} type of promoter (2); p2, controlled by σ^{70} (23); and p3. We determined whether the effect of GacS on alginate biosynthesis was exerted on the transcription of the *algD* gene by measuring the β -galactosidase activity of strain W112, an ATCC 9046 derivative carrying an *algD*::*lacZ* gene fusion (in the presence and absence of plasmid pMC15), as well as of strain W112-1, a W112 derivative carrying the *gacS*:: λ -Sp nonpolar mutation. The β -galactosidase activity was measured as reported by Miller (22); 1 U corresponds to 1 nmol of *O*-nitrophenyl- β -D-galactoside hydrolyzed per min per μ g of protein. Protein was determined by the Lowry method (17). All measurements were done in triplicate. The β -galactosidase activity was measured during growth on Burk's medium supplemented with 2% sucrose (Fig. 2A). In both the W112-1 and W112 pMC15 strains the β -galactosidase activity was reduced (Fig. 2B). We determined which of the *algD* promoters was regulated by GacS. Primer extension of *algD* on RNA isolated from strains JM1 and ATCC 9046 pMC15 was performed as previously described (2). No primer extension products were detected with RNA from these strains grown for

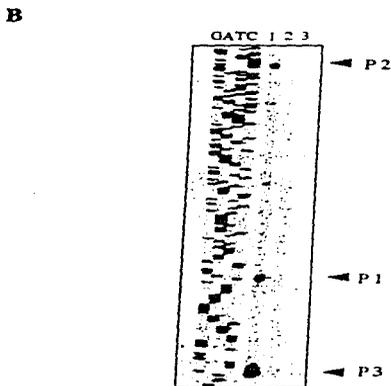


FIG. 3. Primer extension analysis of *algD* transcription. (A) DNA sequence of the 5' end of *algD*. Triangles indicate the start sites of *algD* transcription. The ATG initiation codon is overlaid. (B) Primer extension of the *algD* gene in strains ATCC 9420 (lane 1), JM1 (lane 2), and ATCC 9420 P1C15 (lane 3).

48 h in liquid Burk's medium supplemented with 2% sucrose (Fig. 3). This result is in agreement with the low β -galactosidase activity level detected under the same conditions. These data show that, in regulating alginate synthesis GaeS exerts influence on transcription of *algD* from its three promoters. Similarly, in *Pseudomonas fluorescens* GaeS and GaeA regulate gene expression by influencing the σ^2 levels in addition to being required for expression of genes not regulated by σ^2 (35). Thus, the GaeSA system controls expression from promoters recognized by different sigma factors. In this regard, it is possible that the putative σ^{23} *algD* promoter, P1, may instead be a σ^2 -dependent promoter.

GaeA must mediate signal transduction between GaeS and *algD*. Members of our group have identified in the *A. vinlandii* chromosome a gene homologous to *gacA* (M. Castañeda, J. Sánchez, and G. Espin, unpublished results). Whether GaeA directly interacts with the *algD* promoter region remains to be determined. In *P. aurifaciens*, GaeA functions upstream of the PhzR regulator, in the signal transduction pathway that

regulates antibiotic synthesis via acyl-homoserine lactones (3); thus, it is possible that in *A. vinlandii* other regulatory proteins mediate signal transduction between GaeS, GaeA, and *algD*.

It is difficult to speculate on the target of signal transduction by GaeS in PHB biosynthesis, since regulation of the *A. vinlandii* *phb* biosynthetic genes is presently unknown. The *A. vinlandii* *gacS* mutation caused a PHB leaky phenotype and affected the size of the PHB granules. Similarly, in *Ralstonia eutropha*, *phbP*, a locus causing a PHB leaky phenotype, encodes a PHB-binding protein that determines the size of polyhydroxyalkanoic acid granules (34). Thus, *gacS* could be involved in the control of a gene homologous to *phbP*.

Effect of the *gacS* mutation on encystment. Alginate has been shown to be essential for the formation of mature cysts (2). As shown above, strain JM1 produces some alginate on plates of Burk's medium supplemented with 2% sucrose, and strains producing similar or lower levels of alginate are still able to form cysts (23). We analyzed the encysting capacity of strain JM1, measuring desiccation resistance of cultures induced for encystment as previously described (2). A reduction of more than 1,000-fold in encystment frequency was observed in the *gacS* mutant JM1 (Table 1). However under encysting conditions, i.e., in *n*-butanol plates, alginate production by strain JM1 was very low. Thus, as is the case with other mutants impaired in alginate production, strain JM1 is unable to form desiccation-resistant cysts. GaeS may affect this differentiation process exclusively via its effect on alginate biosynthesis; however, whether this global regulator is required for expression of other genes involved in encystment remains to be investigated.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence determined in this study has the GenBank accession no. AF197912.

This work was supported by grant 27767 from CONACYT. M. Castañeda thanks CONACYT and PADEFUNAM for financial support during his Ph.D. studies.

We thank G. Soberón, D. Segura, and C. Nuñez for helpful discussions. We acknowledge R. Natera for technical support.

REFERENCES

1. Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Ruckert, F. C. H. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey, and K. N. Timmis. 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, *RS1* 1000 derived vectors, and a host vector system for gene cloning in *Escherichia coli*, p. 327-347.
2. Campos, M. E., J. M. Martínez-Salazar, L. Euforé, S. Moreno, C. Sunez, G. Espin, and G. Soberón-Chavez. 1996. Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinlandii* J. Bacteriol. 178:1737-1740.
3. Chancey, S. L., D. W. Wood, and L. S. Pierson III. 1996. Two component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 62:2244-2249.
4. Christopher, F., and K. Franklin. 1985. Broad host range cloning vectors for gram-negative bacteria, p. 165-184. In D. M. Glover (ed.), DNA cloning, vol. 1. IRL Press, Washington, D.C.
5. Corbett, N., and J. E. Loper. 1998. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf5-1. J. Bacteriol. 177:2316-2326.
6. De Lorenzo, V., M. Herrero, V. Jakubzik, and K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. J. Bacteriol. 172:668-672.
7. Feilley, R., J. Frey, and H. Krsch. 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. Gene 52:313.
8. Frederick, L., B. Bennett, and A. K. Handa. 1997. Identification of a pathogenesis locus, *gpaI*, in *Erwinia carotovora* that encodes a two component sensor/regulator protein. Mol. Plant Microbe Interact. 7:255-263.
9. Georgellis, D., A. S. Lineh, and E. C. C. Lin. 1997. *In vitro* phosphorylation study of the ArcA two component system of *Escherichia coli* J. Bacteriol. 179:3429-3435.
10. Gracia, E., G. P. Phoenix, and G. R. Drapeau. 1992. The *rsbB* gene, a positive regulator of colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli*, is also an activator of *hsz* expression. J. Bacteriol. 174:3362-3371.

11. Han, H. P., Arzall, and K. Johnstone, 1997. Spontaneous duplication of *lecA* by element within a two component sensor/regulator gene causes phenotypic switching in colonies of *Pseudomonas fluorescens*: cause of brown blotch disease of mushrooms. *Mol. Microbiol.* 25:211-218.
12. Hirsch, J. A., and E. J. Silhavy (eds.), 1995. Two component signal transduction. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. Hrabak, E. M., and D. K. Willis, 1992. The *limA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* on lettuce is a member of a family of two component regulators. *J. Bacteriol.* 174:3011-3020.
14. Ishige, K., S. Nagasawa, S. Tokishita, and T. Mizuno, 1994. A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J.* 13:5195-5202.
15. Liao, C. H., D. E. MacCullum, and W. E. Fehl, 1994. Molecular characterization of two gene loci required for production of the key pathogenicity factor pectate lyase in *Pseudomonas candelarii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:391-400.
16. Lloret, L., R. Barreiro, R. Leon, S. Moreno, J. Martinez-Salazar, G. Espin, and G. Soberon-Chavez, 1996. Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Leizobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters. *Mol. Microbiol.* 21:425-437.
17. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
18. Manohak, J., and W. J. Page, 1994. Control of polyhydroxybutyrate synthesis in *Acetobacter vinelandii* strain UW1. *Microbiol.* 140:953-963.
19. Martinez-Salazar, J. M., S. Moreno, R. Najera, J. C. Houchet, G. Espin, G. Soberon-Chavez, and V. Deretic, 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgE1 and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Leizobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.* 178:3380-3389.
20. Mejia-Ruiz, H., J. Guzman, S. Moreno, G. Soberon-Chavez, and G. Espin, 1997. The *Leizobacter vinelandii* *algE* and *algB4* genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algE* independent promoter. *Gene* 199:271-277.
21. Mejia-Ruiz, H., S. Moreno, J. Guzman, R. Najera, R. Leon, G. Soberon-Chavez, and G. Espin, 1997. Isolation and characterization of an *Leizobacter vinelandii* *algE* mutant. *J.EMS Microbiol. Lett.* 156:101-109.
22. Miller, J. H., 1972. Experiments in molecular genetics, p. 431-435. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
23. Moreno, S., J. Guzman, R. Najera, G. Soberon-Chavez, and G. Espin, 1998. Role of the alternative sigma factor AlgE1 in encumbrance of *Leizobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 180:2766-2769.
24. Murray, N. J., E. A. Mitchell, and R. Pau, 1995. Mutational analysis of genes of the *mod* locus involved in multidrug transport, homeostasis, and processing in *Leizobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 177:5294-5302.
25. Rehm, H. A., H. Lertschwager, and S. Yalla, 1996. A new *Alc* *Leizobacter mannurani* C-5 epimerase gene (*alg61*) is part of an *alc* gene cluster physically organized in a manner similar to that in *P. aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 178:5884-5889.
26. Reimmann, C., M. Beyeler, A. Lath, H. Winteler, M. Foghno, A. Lardunski, and D. Haas, 1997. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butylhomoserine lactone and the formation of the virulence factors protease, cyanide, and lipase. *Mol. Microbiol.* 24:309-319.
27. Rich, J. J., T. G. Kinscherf, T. Kitten, and D. K. Willis, 1994. Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *limA* sensor in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176:2408-2425.
28. Sadoff, H. L., 1978. Encumbrance and germination in *Leizobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev.* 40:516-539.
29. Segura, D., and G. Espin, 1998. Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli* *psfP* affects poly- β -hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Leizobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 180:4790-4798.
30. Stevenson, L. H., and M. D. Socolofsky, 1986. Cyst formation and polyhydroxybutyrate accumulation in *Acetobacter*. *J. Bacteriol.* 91:302-310.
31. Stuart, V., and S. Gottesman, 1980. RexB and RexC: a two component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:804-809.
32. Vazquez, A., S. Moreno, J. Guzman, A. Alvarado, and G. Espin, 1999. Transcriptional organization of the *Leizobacter vinelandii* *algCMLBFA* genes: characterization of *algE* mutants. *Gene* 232:217-222.
33. Whistler, C. A., N. A. Corbett, A. Sarrigueta, W. Ream, and J. E. Loper, 1998. The two component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary phase sigma factor sigma₅₄ and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 180:6635-6641.
34. Wierzbicki, R., A. Pries, A. Steinbuechel, and E. Mayer, 1995. Analysis of a 24 kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Methylobacterium extorquens*. *J. Bacteriol.* 177:2425-2435.

c) REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alexeyev M. F., I. N. Shokolenko, and T. P. Croughan.**1995.Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and un vitro deletion/insertion mutagenesis.*Gene*.160:63-67
- Altier, C. M. Suyamoto, A.I. Ruiz, K.D. Burnham, and R. Maurer.**2000.Characterization of two novel genes affecting *Salmonella* gene expression.*Mol. Microbiol*.35:635-646
- Aitschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman.** 1990 Basic local alignment search tool.*J Mol Biol* 215:403-10
- Anderson, A. J., and E. A. Dawes.**1990.Ocurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54:450-472.
- Bagdasarian M., Lurz R., Ruckert B., Franklin F.C., Bagdasarian M.M., Frey J., Timmis K.N.**1981.Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors.and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*.*Gene*.16:237-47.
- Barry, T. S. Geary, S. Hannify, C. MacGearait, M. Shallo. D. Heery, F. Gannon and R. Powell.** 1992. Rapid mini-preparation of total RNA from bacteria. *Nucleic. Acid. Res.* 20: 4940
- Bishop, P. E. and W. J. Brill.** 1977. Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutant strains unable to fix nitrogen. *J. Bacteriol.* 130: 954-956.
- Blat, Y., and M. Eisenbach.**1994.Phosphorilation dependent binding of the chemiotaxis signal molecule CheZ.*Biochemistry*.33:902-906.
- Blumenkrantz, N. and G. Asboe-Hansen.** 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54:484-489.
- Boucher, C. J., J. Martínez-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 serin protease HtrA. *J. Bacteriol.* 178: 511-523.
- Campos, M. E., J. M. Martínez-Salazar, L. LLoret, S. Moreno, C. Nuñez, G. Espín, and G. Soberón-Chávez.** 1996. Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 178:1793-1799.
- Chancey, S. T., Wood, D. W., and L. S. Pierson 3rd.**1999.Two component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2294-2299.
- Clementi, F.** 1998. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit. Rev. Biotech.* 17:327-361.
- Corbell, N and J.E. Loper.**1995. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* P15.*J. Bacteriol.*177:6230-6236.
- Costerton, W. J., K. J. Cheng, G. G. Gessey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Disgupta and T. J. Marrie.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease.*Ann. rev. Microbiol.* 41: 435-464.

- Cruz T.** 2000. Caracterización del gen *phbB* de *Azotobacter vinelandii* involucrado en la producción del poliéster natural poli- β -hidroxibutirato. Tesis de licenciatura. Instituto de Biotecnología UNAM.
- Dawes, E. A.** 1990. Novel microbial polymers: an introductory overview. In *Novel Biodegradable Microbial Polymers* ed. Dawes, E. A. pp3-16. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, V. Jakubzik, and K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172:6568-6572.
- Deretic, V., M. J. Schurr, J. C. Boucher, and D. W. Martin.** 1994. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: Environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J. Bacteriol.* 176:2773-2780.
- Eriksson, R. B. A., R. A. Andersson, M. Pirhonen, and E. T. Palva.** 1998. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora subsp. carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:743-752.
- 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* 52:147-154.
- Ferrari E., S. M. Howard and J. Hoch.** 1985. Effect of sporulation mutations on subtilisin expression, assayed using a subtilisin- β -galactosidase gene fusion. In J.A. Hoch and P. Setlow (ed.), *Molecular biology of microbial differentiation*. American Society for Microbiology, Washington D.C. 180-184.
- Figursky, D. H. and D. R. Helinski.** 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.
- Fyfe, J. A. M. and J. R. W. Govan.** 1983. Synthesis regulation and biological function of bacterial alginate. In: *Progress in Industrial Microbiol.* Vol. 18, pp. 45-83, Bushell, M.E. Ed., Elsevier Amsterdam.
- Gacesa, P.** 1998. Bacterial alginate biosynthesis: recent progress and future prospects. *Microbiology.* 144:1133-1143
- Gama, S., Moreno, S. Moreno., J. Guzmán., D. Segura., and G. Espín.** 2000. Role of the aldehyde dehydrogenase AldA in encyement induction by n-butanol in *Azotobacter vinelandii*. Datos no publicados
- Gaona, G.** 2000. Función y regulación transcripcional del gen *algC* en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*. Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología UNAM.
- Georgellis, D. O.** Comunicación personal
- Georgellis, D., O. Kwon., P. De Wolf., and E. C. C. Lyn.** 1988. Signal decay through a reverse Phosphorelay in the Arc two component system. *J. Biol. Chem.* 273:32864-32869
- Georgellis, D., A. S. Linch., and E. C. C. Lyn.** 1997. In vitro phosphorylation study of the Arc two component system of *Escherichia coli*. *179:5497-5435.*

- Gerngross, T. U., K. D. Snell, O. P. Peoples, and A. J. Sinskey.** 1944. Overexpression and purification of the soluble polyhydroxyalkanoate synthase from *Alcaligenes eutrophus*: Evidence for a required posttranslational modification for catalytic activity. *Biochemistry*. **33**: 9311-9320.
- Han, B., P. Arnab., and K. Johnstone.** 1997. Spontaneous duplication of 661 bp element whitin a two component sensor regulator gene causes phenotypic switching in colonies of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of mushrooms. *Mol. Microbiol.* **25**:211-218
- Haug, A., B. Larsen and O. Smidsrod.** 1974. Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carb. Res.* **32**:217-225
- Holloway, B.W., V. Krishnapillai, and A. F. Morgan.** 1979. Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev.* **43**:73-102.
- Hrabak, E. M., and D.K. Willis.** 1992. The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *J. Bacteriol.* **174**: 3011-3020.
- Ishige, K., S. Nagasawa, S. Tokishita, and T. Mizuno.** 1994. A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J.* **13**:5195-5202.
- Law, J. H., and R. A. Slepecky.** 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* **82**:33-36.
- León, R., C. Nuñez., J. Guzmán., G. Espín, and G. Soberón-Chavez.** 2000. Role of *Azotobacter vinelandii mucA* and *mucC* gen products in alginate production . Artículo sometido a revisión
- Liao, C. H., D. E. MacCullus, and W. F. Fett.** 1994. Molecular characterization of two gene loci required for production of the key pathogenicity factor pectate lyase in *Pseudomonas viridiflava*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**:391-400.
- Lin, L. P. y Sadoff, H. A.** 1969. Chemical composition of *A. vinelandii* cysts. *J. Bacteriol.* **100**: 480-486.
- LLoret, L., R. Barreto, R. León, S. Moreno, J. Martínez-Salazar, G. Espín, and G. Soberón-Chávez.** 1996. Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters. *Mol. Microbiol.* **21**:449-457.
- Lukat, G.S., W.R. McCleary, J. M. Mottonen, A. M. Stock, and J. B. Stock.** 1991. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phopho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:718-722.
- Manchak, J., and W. J. Page.** 1994. Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology.* **140**:953-963.
- Martínez-Salazar, J., 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 negative regulators MucA MucB MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their role in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.* **178**:1800-1808.
- Matsusaki, H., S. Manji, K. Taguchi, M. Kato, T. Fukui, and Y. Doi.** 1998. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *J. Bacteriol.* **180**: 6459-6467

ESTÁ
TESA
NO
DEBE
SER
LA
PRIMERA

May, T., and A. M. Chakrabarty. 1994. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. Trends Microbiol. 2:151-157.

Mejía-Ruiz, 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 can be transcribed from an *algD*-independent promoter Gene. 199:271-277.

Mejía-Ruiz, 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. FEMS Microbiol. Lett. 156: 101-106.

Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics, p. 431-435. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Miyake, M., K. Kataoka, M. Shirai, and Y. Asada. 1997. Control of poly- β -hydroxybutyrate synthase mediated by acetyl phosphate in cyanobacteria. J. Bacteriol. 179:5009-5013.

Miyamoto, C. M., W. Sun, and E. A. Meighen. 1998. The LuxR regulator protein controls synthesis of polyhydroxybutyrate in *Vibrio harveyi*. Biochim. Biophys. Acta. 1384(2):356-364.

Mizuno, T., and S. Mizushima. 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. Mol. Microbiol. 4:1077-1082.

Moolenaar, G. F., C. A. van Sluis, C. Backendorf, and P. van de Putte. 1987. Regulation of the *Escherichia coli* excision repair gene *uvrC*. Overlap between the *uvrC* structural gene and the region coding for a 24 kD protein. Nucl. Acids Res. 15:4273-4289.

Moreno, S., J. Guzmán, R. Nájera, G. Soberón-Chávez, and G. Espín. 1998. Role of the alternative σ^f factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 180: 2766-2769.

Mouncey, N. J. L.A. Mitchell, and R. Pau. 1995. Mutational analysis of genes of the *mod* locus involved in molybdenum transport, homeostasis and processing in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 122:5294-5302.

Ninfa, E. G., A. Stock, S. Mowbray, and J. Stock. 1993. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NR_{II}, o NtrB): transphosphorylation between subunits. J. Bacteriol. 175: 7024-7032.

Núñez C., S. Moreno, G. Soberón-Chávez and G. Espín. 1999. The *Azotobacter vinelandii* Response Regulator AlgR is Essential for Cyst Formation. Journal of Bacteriology. 181.1: 141-148.

Page, W. J. and M. von Tigerstrom. 1978. Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. Can. J. Microbiol. 24:1590-1594.

Parkinson J. S and Kofoid E. C. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. Annu. Rev. Genet. 26: 71-112.

Peralta M. 2000. Estudio de la regulación de la síntesis de poli- β -hidroxibutirato por el sistema de dos componentes GacS/GacA en *Azotobacter vinelandii*. 2000. Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología UNAM.

- Pindar, D. F., and C. Bucke.** 1975. The biosynthesis of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* **152**:617-622.
- Rehm, H. and Valla, S.** 1996. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **48**: 281-288.
- Reimann, C., M. Beyeler, A. Latifi, H. Winteler, M. Foglino, A. Lazdunski, and D. Haas.** 1997. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol. Microbiol.* **24**: 309-319.
- Reush R.N. and H.L. Sadoff.** 1981. Lipid metabolism during encystment of *A. vinelandii*. *J. Bacteriol.* **145**: 889-895.
- Reush R.N. and H.L. Sadoff.** 1983. Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cysts membrane. *Nature.* **302**:269-270.
- Rich J. J., T. G. Kinscherf, T. Kitten, and D. K. Willis.** 1994. Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* **176**:7468-7475.
- Rocchetta, H. L., L. L. Burrows, and J. S. Lam.** 1999. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:523-553.
- Sadoff, H. L.** 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev.* **39**:516-539.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.
- Schembri, M., R. Bayly, and J. Davies.** 1995. Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes. *J. Bacteriol.* **177**:4501-4507.
- Schubert, P., N. Krüger, and A. Steinbüchel.** 1991. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic operon: identification of the N terminus of the poly(3-hydroxybutyrate) synthase and identification of the promoter. *J. Bacteriol.* **173**:168-175.
- Schurr, M. J., H. Yu, J. M. Martínez-Salazar, J. C. Boucher, and V. Deretic.** 1996. Control of AlgU, a member of the σ^E -like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* **178**:4997-5004.
- Segura, D. and G. Espín.** 2000. Datos no publicados
- Senior, P. J., and E. A. Dawes.** 1971. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **125**:55-66.
- Simon R., J. Quandt., and W. Klipp.** 1989. New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in gram-negative bacteria. *Gene.* **80**:161-169.
- Steinbüchel A., and H. E. Valentin.** 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**:219-228.

Stenginsky, C. A., J. M. Buale, H. G. Floss, and R.M. Mayer. 1992. Structural determination of alginate and the effect of calcium binding as determined by high field n.m.r. *Carb. Res.* **225**:11-26.

Stevenson, L. H. and M.D. Sokolofsky. 1966. Cyst formation and poly- β -hydroxybutic acid accumulation in *Azotobacter*. *J. Bacteriol.* **91**: 304-310.

Stock, J. B., M. G. Surette, M. Levit, and P. Park 1995. Two-component signal transduction systems: Structure-function relationships and mechanisms of catalysis. p. 25-51 in *Two-Component Signal Transduction*. Hoch, J. A., and T. J. Silhavy, eds. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Stout V. and S. Gottesman. 1990. RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:659-69.

Su, Ch-J. R. N. Reush and H. L. Sadoff. 1981. Isolation and characterization of several unique lipids from *Azotobacter vinelandii* cysts. *J. Bacteriol.* **147**: 80-90.

Swanson R. V., R. B. Bourret., and M. I. Simon. 1993. Intermolecular complementation of the kinase activity Of CheA. *Mol. Microbiol.* **8**:435-441.

Tang JL, Y.N. Liu, C.E. Barber, J.M. Dow, J.C. Wootton, and M.J. Daniels. 1991. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol Gen Genet.* **226**:409-17.

Vázquez, A., S. Moreno, J. Guzmán, A. Alvarado y G. Espín. 1999. Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *alg* *GXLVIFA* genes: characterization of *algF* mutants. *Gene.* **232**: 217-219.

Weihong, H., F.D. Russo, K.K. Bernd, and T.J. Silhavy. 1998. Mutations that alter the kinase and phosphatase activities of the two-component sensor EnvZ. *J. Bacteriol.* **180**:4538-46.

Whistler, C. A., N. A. Corbell, A. Sarniguet, W. Ream, and J. E. Loper. 1998. The two component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor sigmaS and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* **180**: 6635-6641.

Wieczoreck, R., A. Pries, A. Steinbuchel, and F. Mayer. 1995. Analysis of a 24-kiloDalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **177**:2425-2435.

Wyss, O., M. G. Newmann, and M. D. Socolofsky. 1961. Development and germination of the *Azotobacter* Cyst. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**:555-565.

Yang, Y., and M. Inouye. 1991. Intermolecular complementation between two defective mutant signal-transducing receptors of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:11057-61.

Zhang J. P. and S. Normark. 1996. Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science.* **273**:1234-1236.

