

03081 7  
209

1998.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Estudio de la función del regulador de respuesta AlgR en el proceso de enquistamiento y en la biosíntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*.

T E S I S 209

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA

M. EN B. CINTHIA E. NUÑEZ LOPEZ

Cuernavaca Morelos, Diciembre 1998.

NUÑEZ LOPEZ, CINTHIA ERNESTINA.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

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

## INDICE

	pg
<b>I. RESUMEN</b>	v
<b>I. ABSTRACT</b>	vi
<b>II. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES</b>	
Ciclo de vida de <i>Azotobacter vinelandii</i>	1
Características y estructura del alginato	1
Proceso de enquistamiento: Bioquímica y principales eventos metabólicos	4
Germinación	7
Bioquímica y genética de la biosíntesis de alginato	8
Regulación de la biosíntesis de alginato en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
Regulación de la biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i>	16
<b>III. OBJETIVOS</b>	18
<b>IV. MATERIALES Y METODOS</b>	
Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	20
Medios y condiciones de cultivo	20
Cruzas para transferencia de plásmidos por conjugación y transformación de <i>A. vinelandii</i>	21
Cuantificación de la producción de alginato	21
Ensayo de enquistamiento	21
Microscopía electrónica	21
Manipulación de AND y ARN	22
Cuantificación de la actividad de $\beta$ -galactosidasa	22
Amplificación del gen <i>fimS</i> de <i>P. seruginosa</i>	23
Amplificación del gen <i>algR</i> de <i>A. vinelandii</i>	23
Construcción del plásmido pMSR1507	24

## V. RESULTADOS

Clonación y secuencia del gen <i>algR</i> de <i>A. vinelandii</i>	25
El gen <i>fimS</i> no está presente en <i>A. vinelandii</i>	28
Construcción de las mutantes <i>algR</i> de <i>A. vinelandii</i>	29
<i>algR</i> no es indispensable para la biosíntesis de alginato	30
AlgR no se requiere para la transcripción de <i>algD</i>	31
El gen <i>algR</i> de <i>A. vinelandii</i> es funcional en <i>P. aeruginosa</i>	32
Efecto de la mutación <i>algR</i> sobre el enquistamiento	33
Complementación de la mutante <i>algR</i>	34
Análisis transcripcional de <i>algR</i>	35
El plásmido pMSR1506 suprime el enquistamiento en la cepa ATCC9046	36

VI. DISCUSION	37
---------------	----

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	41
---------------------------------	----

### APENDICE (artículo publicado)

The *Azotobacter vinelandii* response regulator AlgR is essential for cyst formation. (1999). Cinthia Núñez, S. Moreno, G. Soberón-Chávez and G. Espín. J. of Bacteriol. 181 (1):

## I. RESUMEN

*Azotobacter vinelandii* produce un exopolisacárido llamado alginato, el cual es esencial para el proceso de enquistamiento que lleva a cabo esta bacteria. En *Pseudomonas aeruginosa* y en *A. vinelandii*, el factor sigma AlgU ( $\sigma^E$ ) es esencial para la producción de alginato, ya que se requiere para la transcripción de *algD*, gen que codifica para una enzima clave de esta ruta biosintética. En *P. aeruginosa*, el regulador de respuesta AlgR, miembro del sistema de transducción de señales de dos componentes, también es esencial para la biosíntesis de alginato, al activar la transcripción de *algD*; *fimS* está localizado inmediatamente corriente arriba de *algR* y se propone que codifica su pareja molecular histidín-cinasa. En el presente trabajo se clonó y caracterizó el gen *algR* de *A. vinelandii*. La secuencia deducida de aminoácidos, de la proteína codificada por este gen, muestra un 79% de identidad con su homólogo de *P. aeruginosa*. El análisis de la secuencia nucleotídica corriente arriba del gen *algR*, y ensayos de hibridación tipo Southern indicaron que *fimS* no se encuentra en *A. vinelandii*. La inactivación del gen *algR* resultó en una disminución del 50% en la producción de alginato, sin afectar el nivel de transcripción del gen *algD*, y en una incapacidad de la célula para diferenciarse y producir quistes maduros. La microscopía electrónica, de los quistes formados por la mutante *algR*<sup>-</sup>, reveló que el proceso de enquistamiento es bloqueado en la etapa de la formación de la exina, un evento temprano en dicho proceso. En *P. aeruginosa*, la transcripción de *algR* se abate en cepas *algU*<sup>-</sup>. En contraste, en *A. vinelandii* sólo se observa una reducción en la cantidad de transcritos de *algR*, lo que indica un efecto indirecto del factor sigma AlgU sobre la transcripción de *algR*. Todos estos resultados indican que la regulación de la producción de alginato en *A. vinelandii* y especialmente el papel que juega AlgR, en este proceso, difieren significativamente de lo reportado para *P. aeruginosa*. Estas diferencias pueden ser debidas al hecho de que, en *A. vinelandii*, el alginato posee un papel fundamental en el proceso de enquistamiento, al formar parte estructural de la cubierta que envuelve al quiste, una función que no existe en *P. aeruginosa*.

## I. ABSTRACT

*Azotobacter vinelandii* produces the exopolysaccharide alginate which is essential for the encystment process. In *Pseudomonas aeruginosa*, as well as in *A. vinelandii*, AlgU, the  $\sigma^E$  factor is required for the transcription of *algD*, which encodes a key enzyme for alginate biosynthesis. The *P. aeruginosa* response regulator AlgR, activates the transcription of *algD*. *fimS*, located upstream of *algR*, is proposed to encode the AlgR cognate sensor kinase. We have cloned and characterized the *A. vinelandii* *algR* gene; the deduced amino acid sequence of the protein encoded by this gene shows 79% identity with its *P. aeruginosa* homolog. Sequence analysis around the *algR* gene revealed the absence of a gene homologous to *P. aeruginosa* *fimS*. Inactivation of *A. vinelandii* *algR* diminished alginate production by 50%, but did not affect *algD* transcription and completely impaired the capacity to form mature cysts. Electron microscopy, of the cyst structures formed by the *algR* mutant, revealed that the encystment process is blocked at the step of exine formation. The transcriptional regulation of the *A. vinelandii* *algR* gene differs from its *P. aeruginosa* counterpart. Taken together, our results indicate that the regulation of alginate production in *A. vinelandii* and specifically the role of AlgR in this process, differs significantly from that of *P. aeruginosa*. These differences could be due to the fact that, in *A. vinelandii*, alginate plays a role in encystment, a function not found in *P. aeruginosa*.

## II. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

**Ciclo de vida de *A. vinelandii*.** *Azotobacter vinelandii* es una bacteria del suelo, gram negativa, aerobia estricta y fijadora de nitrógeno. El género *Azotobacter* se distingue de otros géneros de la misma familia, por su capacidad de diferenciarse y formar estructuras de resistencia a la desecación denominadas quistes. Las condiciones ambientales que disparan este proceso de diferenciación aún no han sido identificadas. Sin embargo, en el laboratorio, este proceso de diferenciación se lleva a cabo en condiciones diazotróficas, bajo la inducción con *n*-butanol o con  $\beta$ -hidroxibutirato y dura de tres a cinco días (Sadoff 1975).

La representación esquemática del ciclo de vida de *A. vinelandii* se muestra en la Figura 1. La célula vegetativa de *A. vinelandii* es de tipo bacilar y móvil a través de flagelos peritricos. Bajo la inducción con *n*-butanol, la bacteria pierde su movilidad y sufre una última división celular dando lugar a dos células esféricas y de menor tamaño. Conforme avanza la diferenciación, la célula inicia la síntesis de una capa externa llamada exina y, posteriormente, de una interna llamada intina. Este proceso morfogenético resulta en la formación de quistes maduros de un tamaño de 1.5 por 2 micras de ancho. Las partes que constituyen un quiste maduro son: un cuerpo central o cuerpo basal, en el que se pueden observar gránulos de un polímero de reserva, el polihidroxibutirato (PHB) y, envolviendo el cuerpo central, se encuentran la exina y la intina compuestas ambas del polisacárido alginato, principalmente (ver más adelante). Cuando las condiciones vuelven a ser favorables el quiste maduro entra en la etapa de germinación, observándose hinchamiento del cuerpo central, ruptura de la exina y la emergencia de dos células que adquieren nuevamente movilidad (Sadoff 1975).

**Características y estructura del alginato.** Alginato es un término general que se refiere a un grupo de polisacáridos naturales que, actualmente, se extraen de algas marinas caféas. Los alginatos poseen una amplia aplicación industrial como agentes espesantes, estabilizantes y gelificantes. Su uso como matrices inmovilizantes también se está investigando ampliamente (Clementi 1998).



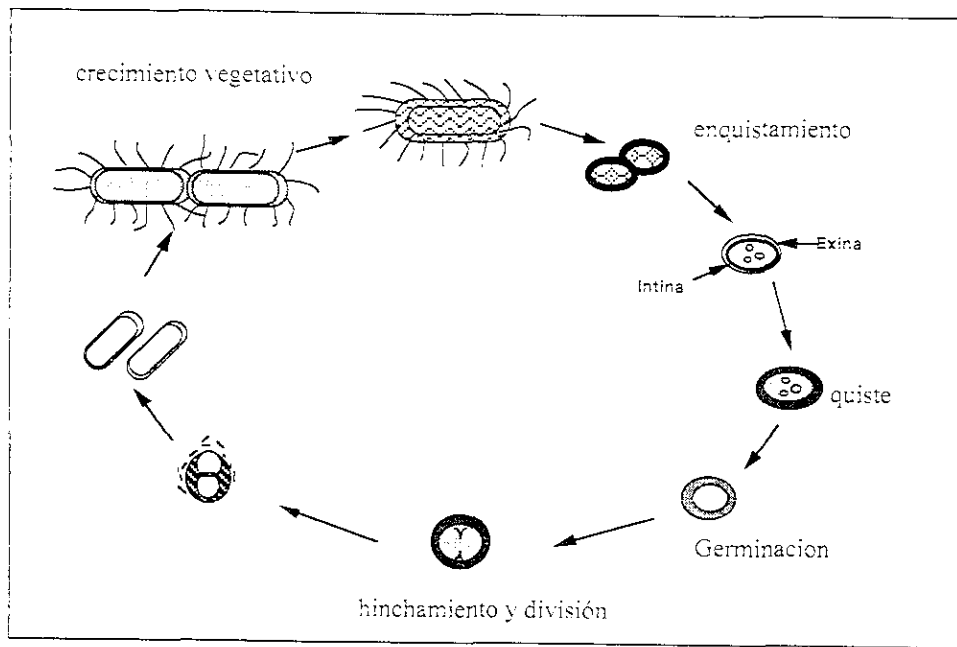


Figura 1. Ciclo de vida de *A. vinelandii*.

Todos los alginatos comerciales producidos actualmente se derivan de algas. La síntesis de alginatos por bacterias se descubrió inicialmente en el patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* (Linker y Jones, 1964, 1966) y en *A. vinelandii* (Gorin y Spencer, 1966).

El alginato es un polímero lineal compuesto de residuos de ácido  $\beta$ -D manurónico (M) y de su epímero (C5) el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G), unidos por enlaces  $\beta$ -(1-4). Los residuos M y G están organizados en bloques a lo largo de la cadena del polímero alginato, formando regiones homo y heteropoliméricas; mientras que la primera contiene bloques M o bloques G, la última está compuesta de ambos monómeros arreglados en secuencias alternadas, compuestas de dímeros MG y residuos GGM- y MMG (Figura 2). El alginato posee la propiedad de formar geles en presencia de cationes divalentes, como  $\text{Ca}^{2-}$ , experimentando un cambio conformacional lo que resulta en una dimerización y agregación de las cadenas de alginato. La fuerza y rigidez de las estructuras formadas depende en gran medida de la proporción M/G; alginatos con una proporción baja de M/G forman geles más rígidos y resistentes, mientras que una proporción alta resulta en un gel suave pero elástico (Clementi 1998).

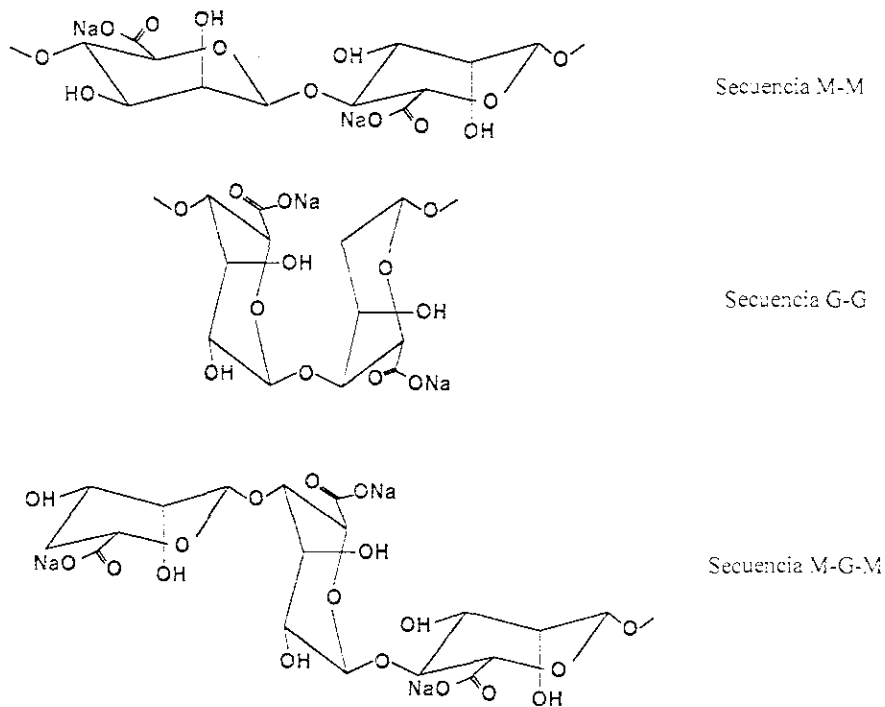


Figura 2. Estructura de los bloques homopoliméricos M- y G- y los bloques heteropoliméricos MG-, los cuales constituyen la molécula de alginato (tomado de Clementi 1998).

La composición y la distribución de bloques, a lo largo de la cadena del polímero, depende de la variedad del alga de la cual se deriva el alginato. Los residuos M y G suelen hallarse en bloques homopoliméricos con secuencia M- y G- y en secuencias heteropoliméricas con secuencias alternadas MG-. Los alginatos comerciales se clasifican por su alto contenido de residuos M o residuos G, característica que llega a depender, incluso, de las condiciones ambientales durante el cultivo del alga (Haug *et al.*, 1974).

Existen algunas diferencias entre el alginato algal y el bacteriano, lo que redundaría en las propiedades del polímero. Los alginatos bacterianos se encuentran acetilados en residuos M, y como consecuencia, su propiedad gelificante se ve afectada (Roller y Dea, 1992). Los alginatos bacterianos derivados del género *Azotobacter*, son los únicos que muestran la estructura de bloques típica de los alginatos algales, bloques M- y G-, y secuencias alternadas MG-. Los alginatos de *P. aeruginosa* contienen

residuos únicos de ácido L-gulurónico, careciendo de los bloques homopoliméricos G-.

De manera similar a otros polisacáridos actualmente producidos por procesos fermentativos, los alginatos bacterianos pueden ser productos de fermentación con un alto potencial industrial (Sutherland, 1994; Vandamme *et al.*, 1996).

Debido a que el alginato producido por *A. vinelandii* es similar en estructura al alginato algal, existe un gran interés en obtener este polímero por procesos fermentativos a partir de esta bacteria.

**Proceso de enquistamiento: Bioquímica y Principales Eventos Metabólicos.** Se ha reportado que, en el laboratorio, los quistes maduros de *A. vinelandii* son viables por más de diez años cuando se mantienen en tierra deshidratada, lo que sugiere que la resistencia a la desecación de los quistes maduros, es un atributo de sobrevivencia en la naturaleza (Vela, 1974).

La composición química de las células vegetativas de *A. vinelandii*, del quiste completo, de la exina y de la intina están indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química de las células vegetativas, el quiste, y de los componentes del quiste.

Material celular	Porcentaje de peso seco			
	Célula vegetativa	Quiste	Intina	Exina
Carbohidratos	28	45	44	32
Proteínas	52	26	9.1	28
Lípidos	9.2	16	36	28
Cenizas	7.1	8.8	4.1	3.2

El fraccionamiento del quiste en sus diferentes partes fue posible gracias al uso de agentes quelantes como el EDTA y a sus diferencias en densidades, de tal forma que la composición química de cada parte pudo ser analizada.

El alginato constituye el 13% y el 32% del peso seco de la exina e intina, respectivamente. La exina contiene alginato rico en poligulurónicos

lo que la hace más rígida, mientras que la intina contiene un alginato con altas proporciones de polimanurónico, similar al encontrado en células vegetativas. La capacidad del EDTA o de otros agentes quelantes para romper la cubierta del quiste es debida, en parte, a su capacidad de remover los cationes divalentes de los bloques poligulurónicos de la exina (Lin y Sadoff 1969-b).

Además del alginato, las cubiertas del quiste poseen otros carbohidratos como glucosa, manosa, ramnosa y xylosa; la proteína encontrada en la exina es tres veces mayor que la hallada en la intina, sin embargo la naturaleza de tales proteínas aún no ha sido estudiada (Lin y Sadoff, 1969);

Como se mencionó con anterioridad, el crecimiento de *A. vinelandii* en presencia de  $\beta$ -hidroxibutirato o *n*-butanol como únicas fuentes de carbono, resulta en la formación de quistes maduros. Dado que el  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) es producto de la depolimerización del polihidroxibutirato (PHB), y el butanol puede ser convertido en BHB o en otros productos de oxidación de PHB, se ha sugerido que una señal que podría disparar el proceso de enquistamiento sería la movilización del PHB que se encuentra acumulado, ya que la adición de estos compuestos resulta en una condición similar a su depolimerización masiva (Reush y Sadoff, 1981). Stevenson y Sokolofsky (1966) han sugerido que el PHB podría funcionar como fuente de carbono y energía para el proceso de enquistamiento, y establecieron una correlación directa entre la cantidad de polímero acumulado en etapas previas al enquistamiento y el porcentaje de quistes formados en un cultivo (Figura 3). Además, conforme un cultivo envejece, la acumulación de PHB en el citoplasma alcanza el nivel más alto. Posteriormente, el contenido de PHB disminuye gradualmente al avanzar la maduración de los quistes. Por otro lado, Reush y Sadoff (1981) demostraron que la acumulación de PHB precede a, y es necesaria para, la formación de lípidos esenciales durante el proceso de enquistamiento, entre ellos, el 5-n-tricosilresorcinol (AR1) y el 5-n-alkylresorcinol (AR2).

Los lípidos son los productos celulares más importantes del metabolismo de BHB durante el enquistamiento y constituyen el 16% del peso seco del quiste maduro. Su y colaboradores (1981), reportaron la síntesis de nuevos lípidos esenciales durante el enquistamiento, entre ellos las 5-n-alkilpironas, el 5-n-tricosilresorcinol (AR1) y derivados

galactósidos de 5-n-alkylresorcinol (AR2). Estudios de distribución mostraron que AR1 y AR2 se encuentran en la exina y en el cuerpo central en iguales cantidades, encontrándose sólo trazas en la intina. El análisis de la composición de la membrana interna y externa del cuerpo central del quiste indicó que estos nuevos lípidos remplazan los fosfolípidos encontrados normalmente en las membranas de células vegetativas. Según el modelo propuesto por Reush y Sadoff (1983), los alquilresorcinoles y las alquilpironas constituyen estructuras membranales muy viscosas y más hidrofóbicas, lo que contribuye a las propiedades de resistencia del quiste.

En la Figura 3 se ilustran, cronológicamente, algunos eventos morfológicos, bioquímicos y metabólicos del proceso de enquistamiento en *A. vinelandii*.

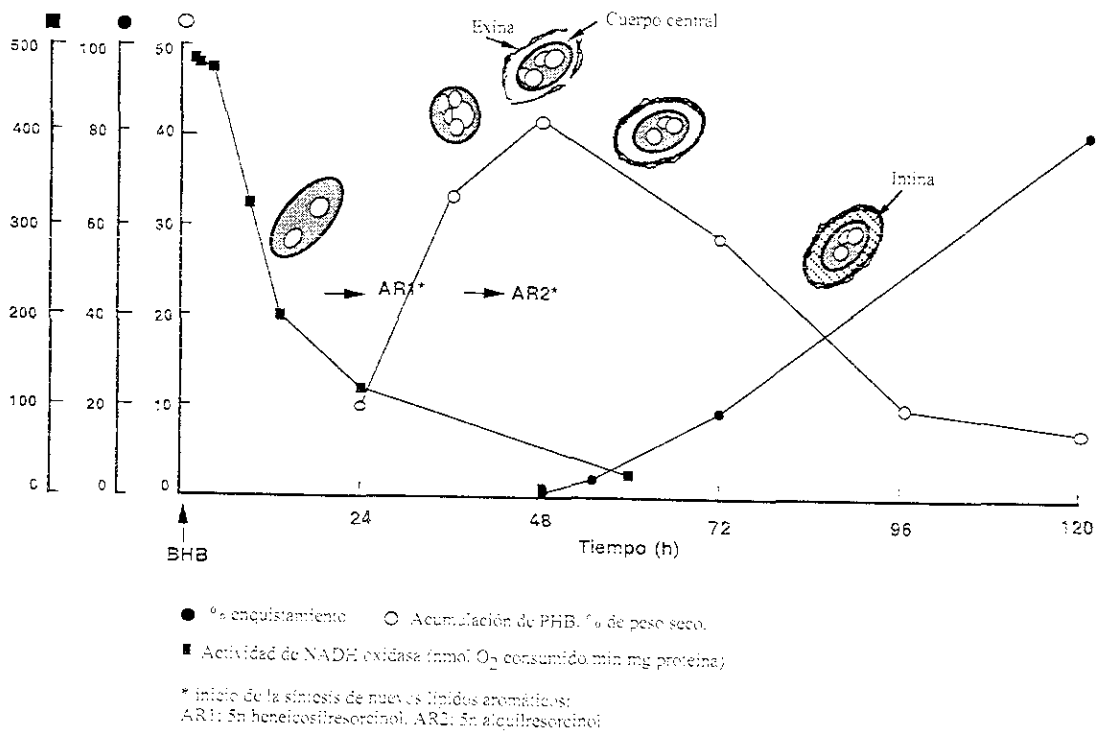


Figura 3. Esquema de algunos eventos metabólicos y morfológicos durante el proceso de enquistamiento inducido con  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB). Obsérvese que la exina aparece en etapas más tempranas que la intina.

Por otro lado, existen cambios significativos en la actividad respiratoria de células inducidas a enquistamiento, el consumo de oxígeno cae de 12 a 0.75 nmoles,  $\text{min}^{-1}$ ,  $\text{ml}$  de cultivo $^{-1}$ , tres horas después de haber iniciado el enquistamiento. Paralela a ello, en la membrana suceden cambios importantes en la cantidad y naturaleza de los citocromos, la cantidad de citocromo *b,c* y *a1* disminuyen, mientras que aumenta la cantidad de citocromo *o*; el citocromo oxidasa *d* disminuye gradualmente, hasta su completa desaparición de la membrana al cabo de 22 horas (Stockall y Edwards, 1985).

La fijación de nitrógeno cae a niveles no detectables al cabo de tres horas, coincidiendo con la caída en el consumo de oxígeno. La actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa también se abate en las primeras nueve horas de haberse inducido el enquistamiento. Concomitante con estos eventos, está la inducción de enzimas necesarias para el metabolismo de BHB (la BHB deshidrogenasa), para la gluconeogénesis (la aldolasa y la fructosa 1,6 difosfatasa) y para la vía del glyoxilato (la isocitrato liasa y la malato sintasa) (Hitchins y Sadoff, 1973).

La síntesis de ADN cesa justo antes de la última división celular, esto es de las cuatro a las seis horas; pero la síntesis de ARN continúa hasta doce horas después de la inducción de enquistamiento (Sadoff *et al.*, 1971).

Resultados derivados de estudios de pulso y caza, aunado a la aparición de nuevas actividades enzimáticas, indican que la síntesis de proteínas continúa a lo largo del proceso de enquistamiento. Ruppen y colaboradores (1983), demostraron que esto es logrado a través de la degradación y reutilización de las mismas proteínas, lo que asegura el suplemento de aminoácidos y la síntesis de proteínas necesarias en circunstancias en donde no existe fijación de nitrógeno.

**Germinación.** La germinación de quistes de *A. vinelandii* implica una serie de cambios metabólicos, indispensables para la formación de células vegetativas activas. La germinación tiene lugar en condiciones aeróbicas y en presencia de fuentes de carbono como glucosa, sacarosa o acetato. Este proceso dura aproximadamente ocho horas. Inmediatamente después de agregar el germinante (p. ej. glucosa), las células empiezan a respirar y a producir  $\text{CO}_2$ . Esto es seguido por síntesis de proteínas y ARN, en un período de cuatro horas. Este hecho indica que el quiste debe poseer

todas las enzimas necesarias para el metabolismo de glucosa, para la formación de ATP y para la síntesis de macromoléculas (Loperfido y Sadoff, 1973). Aun cuando los quistes poseen altas concentraciones de PHB, hay resultados que indican que este poliéster no es movilizado durante la germinación. Ruppen y colaboradores (1983), encontraron que la degradación y reutilización de proteínas es esencial para que se lleve a cabo la germinación. Por otro lado, hay evidencias que indican la existencia de ARN mensajeros estables en el quiste, lo que permite la síntesis de proteínas aún en ausencia de síntesis de ARN (Sadoff 1975).

El crecimiento celular, durante la germinación, inicia a las cuatro horas, concomitante con la síntesis de ADN y la fijación de nitrógeno; dicho crecimiento termina con la emergencia de dos células móviles (Loperfido y Sadoff, 1973) (Figura 1).

**Bioquímica y genética de la biosíntesis de alginato.** Aun cuando el alginato posee una función bien clara durante el proceso de enquistamiento que sufre *A. vinelandii*, este polisacárido se sintetiza también en fase de crecimiento vegetativo, en donde se postula es el responsable de la adhesión celular a superficies (Costerton *et al.*, 1987) y actúa como un sistema de intercambio iónico con alta selectividad por  $\text{Ca}^{++}$  (Fyfe y Govan, 1983).

La ruta para la biosíntesis de alginato ha sido descrita para *A. vinelandii* (Pindar y Bucke, 1975). El punto de partida es la fructosa-6-fosfato (Figura 4). Estudios de rastreo de marca radioactiva (precursores de 6-carbonos marcados con  $^{14}\text{C}$ ), establecieron que los azúcares de seis carbonos se oxidan a través de la vía de Entner-Duodoroff y que el piruvato resultante es finalmente canalizado a la biosíntesis de alginato (Lynn y Sokatch, 1984). El análisis más detallado de los patrones de productos radioactivos en el alginato indicaron que el piruvato, derivado de la oxidación de los azúcares, primero entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) antes de iniciar la síntesis de la fructosa-6-fosfato y del alginato (Narbad *et al.*, 1988).

La fructosa-6-fosfato se convierte, a través de cuatro reacciones enzimáticas en ácido GDP-manurónico, el cual es el sustrato de polimerización (ver Figura 4). El ácido polimanurónico resultante se excreta y es modificado por una O-acetilasa y una C-5 epimerasa

extracelular para dar, el producto final, alginato (Gacesa 1998). Existe una ruta similar en *P. aeruginosa*.

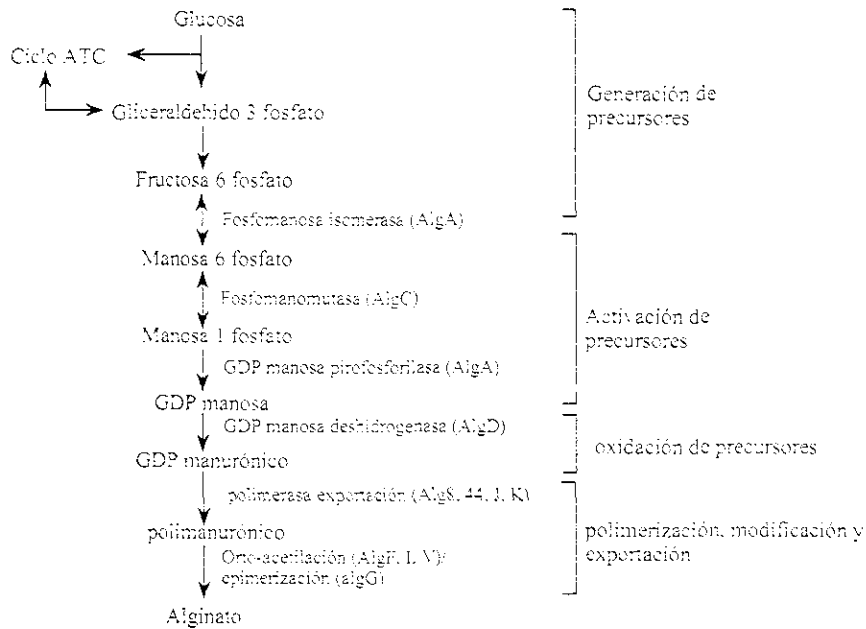


Figura 4. Ruta para la biosíntesis de alginato. Entre paréntesis se indica el producto de los genes estructurales en *A. vinelandii* que participan en esta vía. El producto del gen *algA* es la enzima bifuncional fosfomanosa isomerasa-GDP-manosa pirofosforilasa (tomado de Gacesa 1998).

La genética molecular de la biosíntesis de alginato ha sido muy estudiada en *P. aeruginosa* (Deretic *et al.*, 1994; May y Chakrabarty 1994), debido a que el alginato es el principal factor de virulencia en infecciones pulmonares de pacientes con fibrosis quística (Govan 1988). En *A. vinelandii*, existen importantes avances en el estudio de la genética de la biosíntesis de alginato (Gacesa 1998). Estos estudios han sido motivados por el papel que éste polisacárido juega en el proceso de diferenciación y por el potencial que posee *A. vinelandii* de ser usada en la producción de alginato para fines industriales, como ya se señaló con anterioridad (Clementi 1998).

Tanto en *A. vinelandii* como en *P. aeruginosa*, todos los genes biosintéticos, excepto *algC*, se encuentran agrupados en una sola región del cromosoma (Campos *et al.*, 1996; Lloret *et al.*, 1996; Mejía *et al.*, 1997-a,



1997-b; Rhem *et al.*, 1996). En *P. aeruginosa*, éste grupo de genes está organizado en un operón policistrónico, el cual se transcribe a partir de un solo promotor localizado corriente arriba de *algD* (Chitnis y Ohman, 1993). El producto del gen *algD* codifica para la enzima GDP-manosa deshidrogenasa, la cual participa en una etapa clave en la biosíntesis de alginato. Contrario a lo que sucede en *P. aeruginosa*, el mismo grupo de genes estructurales en *A. vinelandii* está organizado en tres operones, uno de los cuales transcribe *algD* (Campos *et al.*, 1996; Lloret *et al.*, 1996; Mejía *et al.* 1997-a, 1997-b;) (ver figura 5).

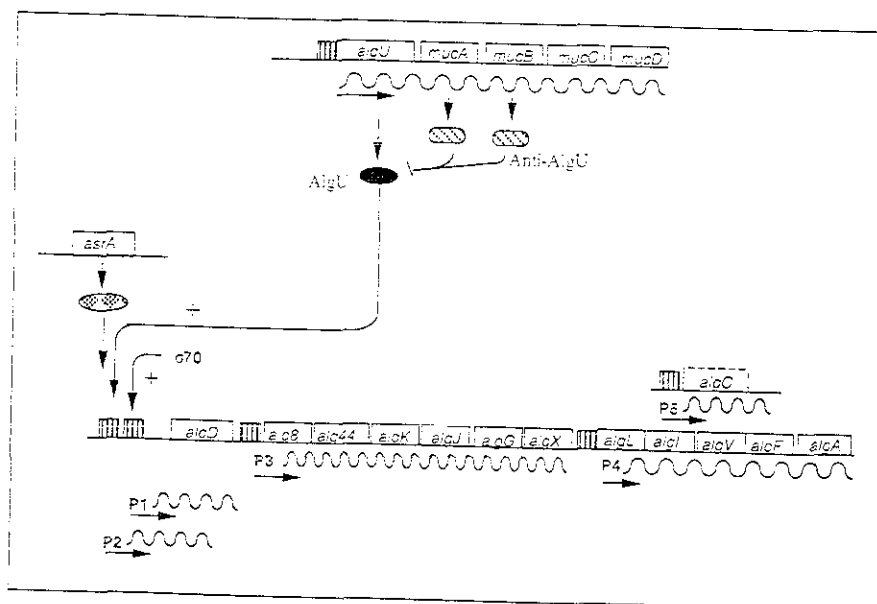


Figura 5. Genes estructurales y reguladores de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*. El gen *algC* se identificó por ensayos de hibridación tipo "Southern" usando como sonda el homólogo en *P. aeruginosa*. El resto de los genes ya han sido secuenciados (Campos *et al.*, 1996; Mejía Ruiz, *et al.*, 1997 a y b; Martínez-Salazar *et al.*, 1996; Castañeda y Espín, 1998. Vazquez *et al.*, 1998).

### Regulación de la biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa*.

- Regulación por el operón *algUmucABCD*. La regulación de la biosíntesis de alginato es compleja e involucra el producto de genes específicos y de otros cuya actividad es más general. Los cinco genes *algU* (*algT*), *mucA* (*algN*), *mucB*, *mucC* y *mucD*, localizados en el minuto 68 del cromosoma de *P. aeruginosa*, constituyen el "switch" molecular más

importante que controla la conversión entre formas no mucoides (no productoras de alginato) y mucoides (productoras de alginato) de *P. aeruginosa*. (Figura 6) (Schurr *et al.*, 1996; Deretic *et al.*, 1994; Wozniak 1994).

*algU* codifica para un factor sigma, similar al factor alternativo sigma E de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Deretic *et al.*, 1994; Hershberger *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1994) el cual es indispensable para el crecimiento de *E. coli* a altas temperaturas, ya que, bajo estas condiciones transcribe el gen que codifica para el factor  $\sigma^{32}$ , el cual participa en la resistencia al calor, y el gen *htrA*, que codifica para una serin proteasa encargada de eliminar proteínas periplásmicas anormales (Erickson y Gross 1989; Hiratsu *et al.*, 1995; Rouviere *et al.*, 1995). De forma análoga, AlgU también se requiere para la completa resistencia de *P. aeruginosa* ante estrés oxidativo y estrés calórico, además de ser esencial para la biosíntesis de alginato (Schurr *et al.*, 1994; Wozniak y Ohman, 1994). De esta manera, el gen *algU* está sujeto a una compleja regulación y es inducible por choque calórico extremo (55°C/15 min.) (Schurr *et al.*, 1995).

El producto del gen *mucA* es una proteína de membrana interna, que se une directamente al factor sigma AlgU, regulando negativamente su función (Deretic *et al.*, 1994; Schurr *et al.*, 1994 y 1996; Yu *et al.*, 1997). El gen *mucB* codifica para una proteína periplásmica que también controla negativamente a AlgU; la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa*, productoras de alginato poseen mutaciones en estos dos genes; estas mutaciones provocan un aumento en la actividad de AlgU, con el subsecuente aumento en la producción de alginato. Mathee y colaboradores (1997) propusieron un mecanismo que trata de explicar el control de la actividad de AlgU. En este modelo, la proteína periplásmica MucB, interactúa con la proteína membranal MucA, quien se une e inhibe directamente la actividad del factor sigma AlgU. Al detectar cierta señal periplásmica, MucB deja de contactar a MucA, situación que resulta en la liberación y en el aumento en la actividad del factor sigma AlgU. Hay evidencias que sugieren, fuertemente, que dicha señal periplásmica es la presencia de proteínas anormales, o proteínas inmaduras de membrana externa. Boucher y colaboradores (1996) encontraron que los genes *mucD* y *algW* regulan negativamente la biosíntesis de alginato; ambos genes

codifican para proteasas similares a HtrA, encargada de eliminar proteínas anormales en el espacio periplásmico, durante el choque calórico.

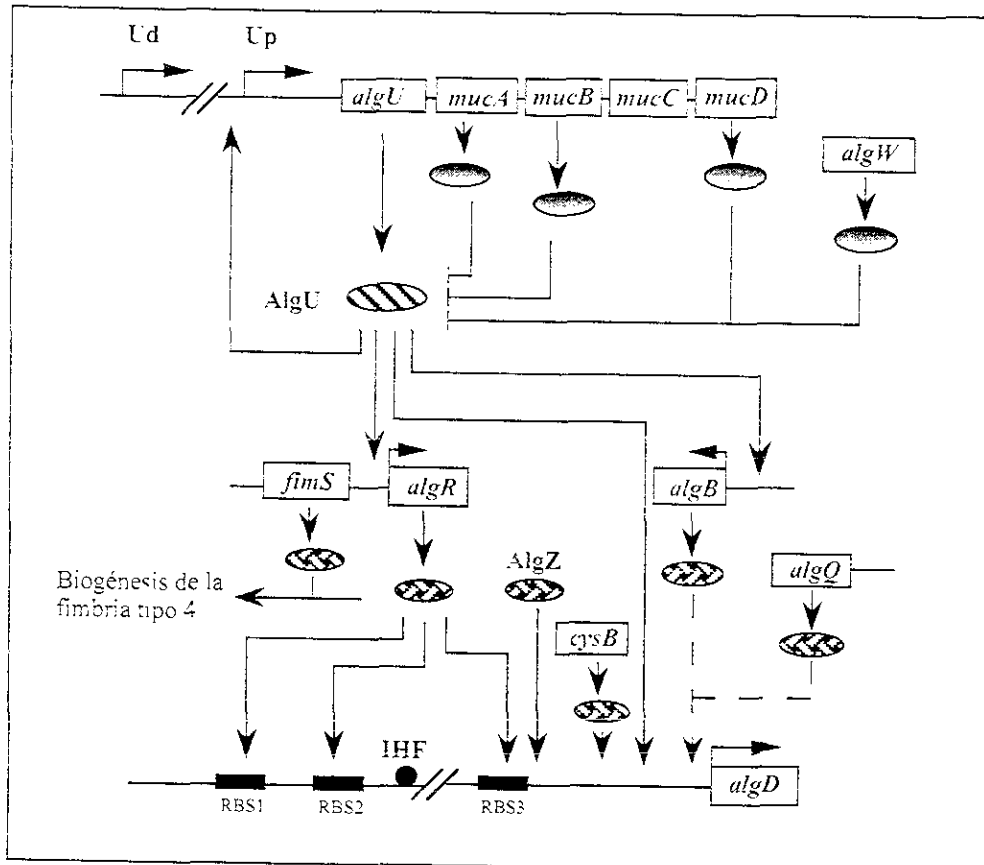


Fig. 6.- Circuito regulador que controla la transcripción de *algD* y la expresión de mucoidía en *Pseudomonas aeruginosa*. Hasta arriba de la cascada reguladora se encuentra el grupo de genes *algU*, *mucABCD* que controlan la conversión de esta bacteria al fenotipo mucóide. Por lo menos dos promotores, *Ud* (distal) y *Up* (proximal), controlan la expresión de *algU*. El gen *algD* parece ser transcrito de un solo promotor. La expresión de *algD* es absolutamente dependiente de dos factores: del factor sigma *AlgU* y del regulador de respuesta *AlgR*, el cual se une a los sitios *RBS1*, *RBS2* y *RBS3*. Las líneas discontinuas indican que la manera en que *AlgB* y *AlgQ* regulan la transcripción de *algD*, aún no ha sido aclarada (modificado de Martin *et al.*, 1994).

La función del gen *mucC* aún no ha sido esclarecida totalmente, hay resultados que sugieren un papel de regulador negativo sobre la biosíntesis

de alginato sólo en condiciones elevadas de temperatura y osmolaridad, y en los fondos genéticos *mucA* o *mucB* (Boucher *et al.*, 1997).

Un aumento en la actividad de AlgU resulta en un aumento en la producción de alginato, debido a una acción directa sobre la transcripción de los genes estructurales *alg* (entre ellos *algD*), y sobre otros dos genes reguladores que pertenecen al sistema de transducción de señales de dos componentes, *algR* y *algB* (Figura 6) (Deretic *et al.*, 1989; Wozniak y Ohman, 1991).

- El Sistema de transducción de señales de dos componentes. Para sobrevivir, la bacteria debe adaptarse a su cambiante entorno y el sistema regulador de dos componentes es clave en este proceso. Este sistema está compuesto de una proteína sensora, la histidín-cinasa, y una proteína reguladora de respuesta. La proteína sensora está localizada generalmente en la membrana citoplásmica, en donde detecta el estímulo externo y transduce la información al regulador de respuesta. El regulador de respuesta, el cual normalmente es un regulador transcripcional que controla la expresión de un grupo de genes relacionados, media la adecuada respuesta celular ante dicho estímulo (Hoch y Silhavy, 1995; Parkinson y Kofoid, 1992).

La fosforilación y la defosforilación de proteínas es una particularidad del flujo de información en este sistema. El sensor se puede autofosforilar, a partir de ATP, en un residuo conservado de histidina y subsecuentemente transferir el grupo fosfato a un residuo aspártico conservado en el regulador de respuesta. Esta fosforilación convierte al regulador de respuesta en una molécula transcripcionalmente activa. En algunos casos, la cinasa sensora puede defosforilar el residuo fosforilado del regulador de respuesta, ejerciendo también un control negativo sobre éste último (Hoch y Silhavy, 1995).

- Regulación por elementos del sistema de transducción de señales de dos componentes: Los pares sensor-regulador. FimS-AlgR y KinB-AlgB. Los genes *algR* y *algB* codifican para reguladores de respuesta que controlan positivamente la biosíntesis de alginato. Se ha demostrado que AlgR se une a tres sitios, llamados RBS (AlgR binding site), en la región promotora de *algD*, activando la transcripción a partir del promotor dependiente de AlgU (Mohr *et al.*, 1992). Dos de estos sitios RBS se encuentran muy por arriba del inicio de la transcripción: el sitio RBS1

región del -400 al -380, ambos contienen la secuencia consenso ACCGTTTCGTC. El tercer sitio de unión de AlgR, el RBS3, contiene la secuencia gCCGTTtGTC (las letras minúsculas denotan bases no conservadas con respecto a los sitios RBS1 y RBS2) y comprende los nucleótidos -36 al -45, encontrándose más próximo del sitio de inicio de la transcripción, pero en sentido opuesto a los dos primeros sitios RBS. Se postula que estos tres sitios de unión a AlgR participan en el doblamiento de *palgD*, activando su transcripción. En concordancia con esta propuesta, se encontró que el factor de integración del hospedero IHF, proteína que participa en el doblamiento del ADN, es necesaria para la transcripción de *algD* (Wozniak 1994; Delic-Attree *et al.*, 1996). La inactivación de *algR* resulta en un abatimiento en la producción de alginato (Deretic *et al.*, 1989), lo que la hace esencial para esta ruta biosintética.

El gen *fimS* (también llamado *algZ*), localizado río arriba de *algR*, codifica para una proteína histidín-cinasa atípica, del sistema de transducción de señales de dos componentes. FimS, junto con AlgR y el factor sigma AlgU, participan en la biogénesis de la fimbria tipo 4, que permite un tipo de movimiento en *P. aeruginosa* denominado "twitching-motility" (Witchurch *et al.*, 1997). Este tipo de movimiento es necesario para la invasión de superficies durante la infección y se encuentra en un número importante de bacterias patógenas (Strom y Lory 1993). Existen evidencias genéticas que sugieren que FimS es la proteína sensora pareja de AlgR durante el "twitching-motility". Por otro lado, se demostró que FimS está involucrada en la regulación de la biosíntesis de alginato, bajo ciertas condiciones. La inactivación de *fimS* en una cepa *mucA* de *P. aeruginosa*, resulta en un incremento en los niveles de éste polisacárido en condiciones de crecimiento, que no permiten la expresión de mucoidía en la cepa parental *fimS*<sup>-</sup> (condiciones de baja osmolaridad). Este dato sugiere que FimS juega un papel de regulador negativo de la producción de alginato, a través de regular negativamente la actividad de la proteína AlgR (Yu 1997).

El gen *algB* codifica para una proteína reguladora de respuesta de la familia de NtrC y es necesaria para altos niveles de producción de alginato (Wozniak Ohman, 1991; Goldberg y Dhanke 1992). Aun cuando modula la expresión de *algD*, su efecto es indirecto ya que no hay evidencias de unión de AlgB a *palgD* y, hasta el momento, no se han identificado los

elementos necesarios de tal modulación. Por otro lado, estudios de fosforilación *in vitro* y el arreglo transcripcional de *kinB*, indicaron que este gen codifica para la proteína pareja sensora histidín-cinasa de AlgB (Ma *et al.*, 1997). Sin embargo, hay reportes que indican que las formas no fosforiladas de los reguladores de respuesta AlgB y AlgR, pueden activar la transcripción de *algD* (Ma *et al.*, 1998). Dado que, por lo general, los reguladores de respuesta en el sistema de transducción de señales de dos componentes necesitan fosforilarse para ser activos (Stock *et al.*, 1989), se sugiere que la razón de esa falta de fosforilación se debe a la sobreexpresión de los genes *algR* y *algB*, debido al incremento en la actividad del factor sigma AlgU (Ma *et al.*, 1998). Esta sobreexpresión resulta en un incremento en la cantidad de las proteínas AlgR y AlgB, circunstancia en la cual, se ha reportado, que otros reguladores de respuesta no necesitan ser fosforilados para activar la transcripción de los genes blanco. La sobreexpresión del regulador de respuesta PilR, en la ausencia de su pareja sensora PilS permite la transcripción de su blanco de regulación *pilA* (Boyd y Lory 1996). Otro ejemplo es el de la proteína UhpA de *E. coli*, la cual es un regulador de respuesta, que participa en la transcripción de *uhpT*, que codifica para una proteína del sistema de transporte de azúcar-fosfatos. La actividad de UhpA es modulada por dos proteínas de membrana, histidín-cinasas, UhpB y UhpC. La sobreexpresión de la proteína silvestre UhpA, en una mutante *uhpBC*, o altos niveles de expresión de la proteína mutante UhpAD54N (la cual no puede ser fosforilada), resultan en una activación normal del gen *uhpT*; esto no se observa cuando hay una sola copia de *uhpA* ( Webber y Kadner, 1995, 1997).

Alternativamente, se ha propuesto que AlgR y AlgB pudieran tener actividades específicas que dependan de su estado de fosforilación: no fosforilados regularían positivamente la biosíntesis de alginato y, fosforilados, participarían en otros eventos celulares ( p. ej. AlgR en el "twitching-motility" anteriormente descrito) (Ma *et al.*, 1998).

- Otros genes reguladores de la biosíntesis de alginato. AlgQ (también llamado AlgR2) es otra proteína reguladora de esta ruta biosintética a 37°C. Interesantemente se encontró que mutaciones *algQ*, resultan en un abatimiento en la producción de alginato, debido a una disminución en la transcripción de *algD* (Deretic and Konyecsny, 1989;

disminución en la transcripción de *algD* (Deretic and Konyecsny, 1989; Kato *et al.*, 1989). Además se observó una disminución en la actividad de dos enzimas, la succinil coenzima A sintetasa (Scs), del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), y la enzima cinasa de nucleótidos difosfato (Ndk) las cuales forman un complejo enzimático en *P. aeruginosa*. Estos resultados indican que AlgQ mantiene un funcionamiento adecuado del ciclo de los ácidos tricarbónicos (Schlichtman *et al.*, 1994 y 1995); sin embargo, la manera exacta en la que AlgQ controla la síntesis de alginato, y si esto se relaciona con el control de la actividad de las enzimas Scs y/o Ndk, aún sigue sin esclarecerse.

Se han descrito otras proteínas que se unen directamente al promotor de *algD*, afectando positivamente su actividad; entre ellas está CysB, que es un activador transcripcional de la familia de LysR y participa en la síntesis de cisteína (Delic-Attree *et al.*, 1997); y AlgZ (diferente a la proteína FimS posible pareja molecular histidín-cinasa de AlgR), una proteína que se une a *palgD*, de manera dependiente de AlgU, activando su transcripción (Figura 6) (Baynham *et al.*, 1996).

**Regulación de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*.** Como se señaló anteriormente, el grupo de genes estructurales en *A. vinelandii* está organizado, al menos, en 3 operones uno de los cuales transcribe *algD* (Campos *et al.*, 1996; Lloret *et al.*, 1996; Mejía *et al.*, 1997-a, 1997-b) (ver Figura 5). La transcripción de *algD* inicia a partir de, al menos dos promotores: un promotor  $\sigma^D$  (p1) y un promotor dependiente de AlgU (p2). La transcripción de los otros dos operones del grupo de genes biosintéticos no es dependiente de AlgU (Lloret *et al.*, 1996; Mejía *et al.*, 1997-a).

El operón *algU-mucABCD* ha sido caracterizado (Martínez-Salazar *et al.*, 1996). Estos genes parecen ser funcionalmente equivalentes a aquellos de *P. aeruginosa*, pues la inactivación de *algU* abate la producción de alginato y la transcripción de *algD* a partir del promotor *algDp2*. La introducción de un plásmido con los genes *mucABCD* a la cepa ATCC 9046 (sobreproductora de alginato) también elimina la transcripción del promotor *algDp2* y disminuye la producción de alginato (Moreno *et al.*, 1998), debido a una disminución en la actividad de AlgU. A pesar de que, bajo estas condiciones, no se eliminó la producción de alginato, los niveles

enquistamiento, ya que la cepa resultante, ATCC 9046/*mucABCD*, fue incapaz de formar quistes maduros. Estos resultados demostraron que la actividad de AlgU es esencial para el enquistamiento, independientemente de su papel en la síntesis de alginato (Moreno *et al.*, 1998). Este hallazgo es muy importante, pues la genética molecular del proceso de enquistamiento nunca había sido abordada, y el reporte de la participación del factor sigma alternativo AlgU, abre amplias posibilidades para la continuidad de este estudio.

En el proyecto de investigación de Doctorado de M. Castañeda (1998), se encontró que el producto del gen *asrA* regula positivamente el proceso de enquistamiento y la biosíntesis de alginato. Esta última a través de regular, por lo menos, la transcripción del gen estructural *algD*. El gen *asrA* codifica para una proteína membranal, histidín-cinasa que pertenece al sistema de transducción de señales de dos componentes. Su homólogo en varias especies de *Pseudomonas*, denominado *lemA*, participa en el control global del metabolismo secundario (Hrabak y Willis, 1993; Corbel y Loper, 1995) . Se están haciendo estudios necesarios para esclarecer si su efecto es o no a través del factor sigma AlgU.



### III. OBJETIVOS

Las condiciones ambientales que disparan el proceso de enquistamiento en *A. vinelandii* aún no han sido identificadas. Sin embargo, de manera general, la diferenciación morfológica en bacterias sucede como una respuesta ante estímulos externos. El sistema de transducción de señales de dos componentes permite a la bacteria tener una respuesta de adaptación a su medio, por tal razón es común encontrarlo en los procesos que regulan la diferenciación celular en bacterias, como el par sensor-regulador KinA-Spo0A en *Bacillus subtilis* durante la esporulación, o el par DivJ y DivK en *Caulobacter crescentus* (Hoch y Silhavy, 1995)

El alginato se produce durante el proceso de enquistamiento, para formar parte estructural de las cubiertas del quiste. Las características del alginato encontrado en la intina y exina difieren significativamente; este hecho sugiere que debe existir una sincronía entre la biosíntesis del alginato y el proceso de diferenciación, a través de mecanismos comunes de regulación. El hallazgo de que AlgU regula el proceso de enquistamiento de manera independiente a su papel sobre la síntesis de alginato apoya esta propuesta (Moreno, *et al.*, 1998).

Existen evidencias de la presencia del gen que codifica para el regulador de respuesta AlgR en bacterias de la familia Azotobacteriaceae, pero nunca antes se había demostrado su funcionamiento en *A. vinelandii*. En el presente trabajo nos propusimos caracterizar la posible función del regulador de respuesta AlgR en el control del proceso de enquistamiento y en la biosíntesis de alginato; así como explorar la posibilidad de que AlgR sea parte de un mecanismo de regulación común, entre ambos eventos.

Por los motivos antes señalados, se plantearon los siguientes objetivos:

#### **Objetivo general**

Estudiar la función de la proteína reguladora de respuesta AlgR en la biosíntesis de alginato y en el proceso de enquistamiento en *A. vinelandii*.

## Objetivos particulares

- Construcción de una mutante *algR* en *A. vinelandii*.
- Caracterización de la mutante *algR* en cuanto a su capacidad de enquistarse y de producir alginato.

#### IV. MATERIALES Y METODOS

**Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.** Las cepas de *A. vinelandii*, utilizadas en este trabajo, fueron: ATCC 9046, cepa mucoide productora de alginato; la AEIV que es medianamente mucoide (Svein valla); la UW136 (Bishop y Brill, 1977), cepa no mucoide, *algU*; la WI12, derivada de la ATCC 9046, contiene una fusión *algD-lacZ* en el cromosoma, (Campos *et al.*, 1996). SMU88, derivada no mucoide de la ATCC 9046, lleva una mutación *algU::Km*.

Cepas de *P. aeruginosa*: PAO1, cepa silvestre no mucoide; FRD810, *algR::Sm<sup>r</sup>*, no mucoide; 8852, *algR<sup>r</sup>*, no mucoide.

*E. coli* DH5 $\alpha$  fue usada para el aislamiento y mantenimiento de plásmidos.

Plásmidos utilizados: pAD1039, cósmido que lleva ADN cromosomal de *P. aeruginosa*, incluyendo *algR* (A. Chakrabarty); pBluescriptSK<sup>+</sup> y pUC18, utilizados para subclonación de ADN (Stratagene).

**Medios y condiciones de cultivo.** Los cultivos de *A. vinelandii* se realizaron en Burk Sacarosa (BS), cuya composición es la siguiente (g/l): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2; Sacarosa, 0.2; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.183; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0.16; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.005; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.0002; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 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, se utilizaron cultivos crecidos durante 48 h, en placas del medio de cultivo correspondiente. Estas placas se inocularon con 300  $\mu$ l de un cultivo de 24 horas desarrollado en medio líquido (preinóculo). Todos los cultivos se incubaron a una temperatura de 30°C.

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  $\mu$ g/ml): ácido nalidíxico 10 y 20 ; ampicilina, no utilizado y 200; espectinomomicina, 100 y 100; kanamicina, 3 y no utilizado; rifampicina, 10 y no utilizado; tetraciclina, 30 y 20.

Para *P. aeruginosa*, la cantidad usada de antibiótico fue (en µg/ml): estreptomycin, 200; tetraciclina, 200.

**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 seleccionando en medio Burk sacarosa, suplementado con tetraciclina y/o espectinomicina. La transformación de *A. vinelandii* se llevó a cabo con células competentes preparadas en BS, sin fierro ni molibdeno (Page y Tigerstrom, 1978).

**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, de acuerdo a lo reportado (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973).

**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 al 2%, se cosecharon, se lavaron dos veces con MgSO<sub>4</sub> 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 10 mM de MgSO<sub>4</sub>. Se transfirieron alícuotas de esta suspensión, conteniendo aproximadamente 10<sup>6</sup> 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 y colaboradores (1992). Los ensayos de extensión de iniciadores, para la identificación del inicio de transcripción, se realizaron con 50 µg de ARN, purificado de cultivos crecidos por 48 horas en medio BS. La reacción de extensión de iniciadores se realizó de la siguiente manera:

Reacción de marcaje con gama ATP ( $P^{32}$ ), del oligonucleótido ATR2: 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 µl. Se incubó por 1 hora a 37°C.

Reacción de extensión: Se utilizó el sistema de Amersham, siguiéndose las instrucciones del fabricante. Se utilizaron, en la reacción, las siguientes cantidades, ARN, 50 µg; NaCl 2.5 M, 1.76 µl; Tris HCl 1M, 0.66 µl; oligonucleótido marcado (P32), 5 picomoles; inhibidor de enzimas degradadoras de ARN, 25 U (Boehringer), DTT 10 mM, 3.7µl, desoxiribonucleótidos (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) 40mM, 2 µl y 10 U de la enzima Transcriptasa reversa (Amhersham). El ARN junto con el cloruro de sodio, la solución de TrisHCl y los oligonucleótidos, se desnaturalizaron a una temperatura de 55°C por 3'. Posteriormente, se le añadió el resto de los reactivos, ajustando la reacción a un volumen de 40 µl. 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 µl de acetato de amonio 10M y 100 µl de Etanol por un período mínimo de 3 horas (o toda la noche). Después de centrifugar, el cADN se lavó dos veces con etanol al 70%. El cADN se resuspendió en un volumen de 8 µl. Simultáneamente, se realizó una secuencia nucleotídica, usando el mismo iniciador para identificar el sitio de inicio de la transcripción.

**Cuantificación de la actividad de β-galactosidasa.** Se centrifugó un volumen adecuado de cultivo de las cepas WI12 y WIR1, desarrolladas en medio BS a los tiempos indicados. Las células se lavaron

con solución 10mM de MgSO<sub>4</sub>, 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<sub>4</sub> 10 mM. Se tomó una cantidad adecuada de células y se trataron con lisozima (0.01%), incubándose a 37°C durante 5 minutos. Enseguida se le adicionó tritón X100 (0.1%) y se continuó con la determinación de β-galactosidasa según Miller. Las unidades reportadas son unidades Miller, que equivalen a los nmoles de orto-nitrofenol generados cada minuto a 28°C por mg de proteína. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

**Amplificación del gen *fimS* de *P. aeruginosa*.** El gen *fimS* de *P. aeruginosa* se amplificó por PCR, usando como templete ADN cromosomal de la cepa PAOI, digerido con *EcoRI*, y los oligonucleótidos: *fimS*-5'ACTCTGTCGATGCCTATCCG y *fimS*-3'TAGCGTAGACAGGTGTAGTGC. Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes. Temperatura de desnaturalización, 94°C/1 minuto, temperatura de alineamiento 65°C/ 1 minuto, y temperatura de extensión de 72°C/ 3 minutos, 30 ciclos. Posteriormente, se le dió un ciclo más de extensión a 72°C/15 minutos. El producto resultante fué de 1054 nt y comprende los codones de los aminoácidos 1 al 348, del gen *fimS*.

**Amplificación del gen *algR* de *A. vinelandii*.** El gen *algR* de *A. vinelandii*, se clonó por PCR usando el plásmido pMSR1506 como templete y los oligonucleótidos: *algR*-5'AAGCTTGTGCAGCTTCTTGCCGGTGATGCC y *algR*-3'AAGCTTCGACGGATTGGCGCGGATGATAGC. Las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización, 95°C/1 minuto; alineamiento, 63°C/45 segundos; extensión, 72°C/2 minutos/ 20 ciclos; posteriormente un último ciclo de extensión, 72°C/10 minutos. El producto resultante, de 1458 nt, se clonó en pKS<sup>+</sup>, para dar origen al plásmido pSF12. En el polienlazador de esta construcción se clonó un casete Ω Sp (Fellay, *et al.*, 1987), como marcador de selección de un evento de recombinación sencilla, debido a que la resistencia a Ampicilina (conferida por el vector pKS<sup>+</sup>) no es un buen marcador de selección en *A. vinelandii*.

**Construcción del plásmido pMSR1507.** Para construir un plásmido derivado del pMSR1506 que llevara una mutación *algR::Sp*, se transfirió por conjugación el plásmido pMSR1506 de la cepa WIR12 (*algR::Sp*) a la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . La selección de un plásmido en el que la mutación cromosomal, *algR::Sp*, se transfiriera por doble recombinación homóloga al plásmido pMSR1506, se realizó seleccionando transconjugantes de *E. coli*, tetraciclina resistentes (resistencia del vector pCP13), espectinomicina resistentes. La mutación *algR::Sp* en el plásmido pMSD1507 se confirmó por patrón de restricción (datos no mostrados).

## V. RESULTADOS

Clonación y secuencia del gen *algR* de *A. vinelandii*. En 1990, Fhialo y colaboradores reportaron la existencia de secuencias homólogas al gen *algR* de *P. aeruginosa* en el cromosoma de *A. vinelandii*. En base a ensayos de hibridación tipo "Southern" realizados en el laboratorio, usando como sonda el gen *algR* de *P. aeruginosa*, se encontró que el cósmido pMSD1506, derivado de un banco genómico de la cepa de *A. vinelandii* ATCC 9046, contenía un fragmento *EcoRI* de 1.5 kb con secuencias homólogas a *algR*. La banda *EcoRI* de 1.5 kb y una banda *PstI* de 2 kb que sobrelapa al primer fragmento, fueron subclonadas en los plásmidos pUC18 y pKS para dar origen a los plásmidos pCNR1 y pCNR2, respectivamente (Figura 7). Estos plásmidos fueron utilizados para determinar la secuencia nucleotídica del gen *algR* (Figura 8).

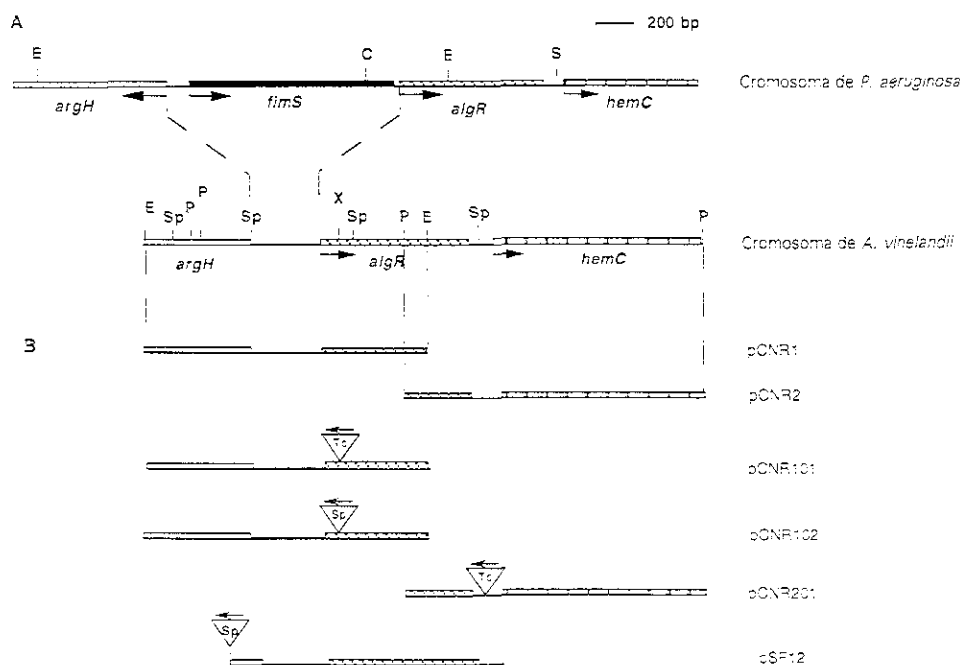


Figura 7. A) Comparación de la región cromosomal que contiene el gen *algR* de *P. aeruginosa* y *A. vinelandii*. B) Mapa físico de los plásmidos construidos en el presente trabajo. Las flechas indican el sentido de la transcripción. Los casetes de resistencia están representados por triángulos invertidos. Abreviaturas: C, *Clal*; E, *EcoRI*; P, *PstI*; S, *SmaI*; Sp, *SphI*; X, *XhoI*.



GAATTCGATG GCGAAATCGC GGTCCGACAC GCCGTCCAGC GAGTTGCCGC 50  
*Eco RI*  
CGACGGCCTC GAAGCCGAGC AGCCGGCAGG TGATCTCGCG CTGGATCGGG 100  
TAGGTGGTGC CGGCCAGGGC GCGCGAGCCG AGCGGCATGC GGTTGACCCG 150  
CTTGCGGCAG TCGACCAGCC GCTCGTGGTC GCGCGCGAGC ATCTCGAACC 200  
AGGCCAGCAG GTGATGGCCG AAGGTCACCG GCTGGGCGGT CTGCAGGTGG 250  
GTGAAGCCGG SCATGATCAC CTCGGCATGA CGCTCGGCCT GCTCCAGCAG 300  
GCCCTGCTGC AGGCGGGTGA TCTCGCCGAG GATGGTGTCT ATCTCGTCGC 350  
GCAGCCACAG GCGGATGTCG GTGGCCACCT GATCGTTGCG CGAGCGGCCG 400  
GTGTGCAACT TCTTGCCGGT GATGCCGATG CGTTCGGTCA GCGCGCCTC 450  
GATGTTTATG TGCACGTCTT CCAGATCGAC GCGCCAGTCG AACTGTCCGG 500  
CCTCGATTTT GCTCTGGATC TGTTTTAGGC CGTCGATGAT CGCGTCGCGC 550  
TCGGCGGGCG TCAGCACGCC GGCCTGCTCC AGCATGCTGG CGTEGGCGAT 600  
GGAGCCCATG ATGTCGTGGC GATAAAGGCG CTTGTGAAG TCGACGGAGG 650  
CGGTGAAGCG GCGCACGAAG GCGTCGACCG GCTCGCTGAA GCGGCCGCC 700  
CAGGACTGGT TGGTTTTCTC GGCCTCATG GCGTTCTCTC GGCTGCTGCG 750  
CAGATACGGC CGGCCCGGA AGCGGCCGGC GGGGTGGATG GACAAGAGTG 800  
CGGGATGAT AGCAGGTCC GCGGGAAAAC CCCGCAGGCC CGCCAGCCGC 850  
ATCGCTGCGG GCACGCGATG CAATTTCTCC CGGTGCGGAC<sup>-35</sup> CGTGACGCTG 900  
TCACTCCGGC TGTT<sup>-10</sup>CTACGCT AATTGTT<sup>-1</sup>GTC CGGACTGACG CGGGAAGCCG 950  
AAGCAACATG AATGTTCTGA TCGTCGACGA CGACCCTCAG GCCAAGGAGC 1000  
ACCTCAGCCG TCTGGTGAGT GAGCTCGATG GCTATCGCGT GCTCGAGCCT 1050  
TCGGCCGGCA ACGGCGAGGA GGCACTGACC CTGATCGACA GCTTGAAACC 1100  
GGATATCGTG TTGCTGGATA TCCGCATGCC TGGGCTGGAT GGCTGACAGG 1150  
TGGCCGCCCG ACTGTGCGAG CGCGAGGCCT CGCCAGCCCT GATCTTCTGC 1200  
ACGAGCGCCG ACGAGTTCGC CGTGTGCGCG TTGCAGAACG GCGAGGTCCG 1250  
CTATCTGCTC AAGCCGGTGC GCCAGGAGCC GTTGCGCGAG GCCCTGCAGA 1300  
AGGCCAGCG CCCCACCCGT ACCCAACTGG CCGCGCTGAC CCGTCCGCCG 1350  
GCGACGGACG GCAATGTGCC GCGCACCCAT ATCAGTGCCC GTACCCGCCG 1400  
GGGCATCGAA CTGGTTCCGG TGGACAAGGC GATCTTCTTC ATCGCCGACC 1450  
ACAAGTACGT GACCTTGCCT CACGAGAGTG GCGAAGTGCT GCTGGACGAG 1500  
CCGTTGAAGG CCCTGGAGGA CGAATTCGGC GACCGCTTCG TCGCATCCA 1550  
TCGCAATGCG CTGGTCCGCC GCGACCGCAT CGAGCGGCTG CAACGAACCG 1600  
*Eco RI*

continuación.....

```
CGCTCGGGCA TTTCCAGCTC TACCTGCGCG GCCTCGGGCA CGCCGCGCTG 1650
ACCGTGAGCC GACGACACGT CGCCGGGGTG CGCAAGCTGA TGCACAATCA 1700
ACTGGCCTCC TGAGGGCGCC GGGGGTTGCC GCCGTACCCC CTGCGAACCG 1750
ATGGGGTGCT TATTTACTAC TATCCGGATG GGCCGCCAGG GCGGCATGCC 1800
ATCCGGGGCG GACTGCCAG TTCGCGGCC GATCCTGCTA TCATCCGCGC 1850
CAATCCGTGG TCCTGGAATG CCCATGCCCC GCGAGATCCG CATAGCCACC 1900
CGCAAGAATG CCCTGGCCCT GTGGCAGGCC GAATATGTCA AGGCGCGCCT 1950
GGAGCAGGCC CATCCGGGAC TGGCGGTGAG CCTGGTGCCG ATGGTCAGCC 2000
GCGGCGACAA GCTGCTCGAC GCGCCGCTGG CGAANATCGG CGGCAAGGGT 2050
CTGTTCGTGN AGGAACTGGA GACGCCCTGC TGGAGAACGC GGCCGACATC 2100
GCCGTGCACT CGATGAAGGA CGTGCCGATG GAGTTTCCCG AAGGGCTCGG 2150
CCTGTATTGC ATCTGCGAGC GCGAGGACCC GCGCGACGCC TTCGTCTCCA 2200
ATGCCTTCGC CAGCCTCGAC GAACTGCCGG CCGGCAGCCT GATCGGCACT 2250
TCCAGCCTGC GTCGCCAGGC CCAGTTGCTG GCACGCCGGC CGGACCTGAA 2300
GATCCAGTTC CTGCGCGGCA ACGTGAATAC CCGCCTGGTC AAGCTGGACG 2350
CCGGCGAGTA CGACGCCATC ATCCTCGCCG CCGCCGGTCT GATCCGCCTC 2400
GGTTTCGAGG GACGCATCCG TTCCCGCATC GCCATCGCCG ACAGCTTGCC 2450
GGCCGGCGGC CANGGCGCGG TGGGCATCGA GTGCCGACG GCCGACCGGG 2500
AGATCCAGGC CCTGCTCGCC CCGCTCGACC ACGCGCCGAC CGCCCTCCGG 2550
GTCGGTGCCG AGCGTGCCTT GAACAAGCGC CTCAACGGTG GCTGCCAGGT 2600
GCCCATCGCC TGCTATGCCG AGCTGGAGGA CGGCCAGTTG TGGCTGCGTG 2650
GCCTGGTCCG CCAGCCGGAC GGCCGCCTGC TGCTGCGCGC TGAGGCCCGT 2700
GCTCCCGCCG ATGAAGCCGA GCGCTCGGCG TTCGGGTGGC CGAAGCGTTG 2750
CTGGCCCAGG GCGCGCANGC GATTCTGGCG GCGGTCTACG GCGAANGCGA 2800
ACGGCCGTGA CGGTACGGTC GGACGCCGGC GGGTGGCGCC TGCTGCTCAC 2850
CCGTCCGCC GAAGAATGCG CCGTTCTGGC CGATTGCCTG AGCGAAGCGG 2900

GCATCTGCAG 2910
PstI
```

Figura 8. Secuencia nucleotídica de la región cromosomal de *A. vinelandii* que contiene el gen *algR*. Los inicios de traducción de los genes *argH*, *algR* y *hemC* se indican con flechas. El codón de término de *algR* se indica con doble línea, y su inicio de transcripción con -1. Las inserciones con casetes de resistencia, dentro del *algR* y 80 pb río abajo de su extremos 3', están representadas por triángulos invertidos.

El gen *algR* codifica para una proteína de 251 aminoácidos y muestra un 79% de identidad con su homólogo de *P. aeruginosa*. Como otros reguladores de respuesta que son fosforilados, la proteína AlgR de *A. vinelandii*, contiene residuos altamente conservados y que participan en esta reacción de fosforilación, el residuo aspártico 8, aspártico 54 y lisina 102. (Figura 9).

		*				
A. v.	MNVLIIVDDDP	QAKHLSRLV	SELDGYRVLE	PSAGNGEERL	TLIDSLKPGDI	50
P. a.	MNVLIIVDDDP	LARERLARLV	GLDGYRVLE	PSASNGEERL	TLIDSLKPGDI	50
Consensus	MNVLIIVDDDP	.A.E.L.RLV	.LDGYRVLE	PSA.NGEERL	TLIDSLKPGDI	50
		*				
A. v.	VLLDIRMPGL	DGLQVAARLC	EREASPALIF	CTSADEFVAVS	ALQNGEVGYL	100
P. a.	VLLDIRMPGL	DGLQVAARLC	EREAPPVAVIF	CTADEFVAVS	AFQVSAVGYL	100
Consensus	VLLDIRMPGL	DGLQVAARLC	EREA.PA.IF	CT..DEFA..	A.Q...VGYL	100
		*				
A. v.	LKPVQRQEPLE	EALQKAQRPT	RQQLAALTRP	PAIDGNVPR	HISARTRRGI	150
P. a.	VKPVRSIEDLA	EALAKASRPN	RVQLAALTKP	PASGSGSPRS	HISARTRRGI	150
Consensus	.KPVRE.L.	EAL.KA.RP.	R.QLAAL.T.P	PA..G..PR.	HISARTR.RGI	150
A. v.	ELVFDRAIF	FIADHKYVTL	RHESGEVLLD	EPLKALEDEF	GDRFVRIHRN	200
P. a.	ELIPLREVIIF	FIADHKYVTL	RHAQGEVLLD	EPLKALEDEF	GERFVRIHRN	200
Consensus	EL.P....IF	FIADHKYVTL	RH..GEVLLD	EPLKALEDEF	G.RFVRIHRN	200
A. v.	ALVARRIER	LQRTPLGHFQ	LYLRGLGDPA	LTVSRRHVAG	VRKLMHQCLA	250
P. a.	ALVARERIER	LQRTPLGHFQ	LYLKGLOGDA	LTVSRRHVAG	VRRLMHQL--	248
Consensus	ALVAR.RIER	LQRTPLGHFQ	LYL.GL...A	LTVSRRHVAG	VR.LMH....	250
A. v.	S					251
P. a.	-					248
Consensus	.					251

Figura 9. Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos del gen *algR* de *A. vinelandii* (A.v.) con la de su homólogo en *P. aeruginosa* (P.a.). Los residuos Asp<sup>8</sup>, Asp<sup>54</sup> y Lys<sup>102</sup>, involucrados en el evento de fosforilación de AlgR se indican con asteriscos. Los alineamientos fueron realizados con el programa Gene Works 2.5. Los residuos idénticos se encuentran sombreados.

El gen *fimS* no está presente en *A. vinelandii*. En *P. aeruginosa*, la región de 1.3 kb, localizada entre *argH* y *algR*, fue recientemente caracterizada y mostró la existencia del gen *fimS* (Witchurch, *et al.*, 1997). Existen evidencias genéticas que sugieren fuertemente que dicho gen codifica para la proteína sensora histidín-cinasa, pareja de AlgR. De manera independiente, y casi simultáneamente, se encontró que FimS también participa en la regulación de la biosíntesis de alginato en cepas *mucaA* de *P. aeruginosa* sólo bajo ciertas condiciones (Yu *et al.*, 1997).

El análisis de los 1000 pb río arriba de *algR* en *A. vinelandii* (fragmento *EcoRI* de 1.5 kb) indicó la presencia del gen *argH* en esta region, al igual que en *P. aeruginosa*. Sin embargo, encontramos que *fimS* no está presente en las vecindades de *algR* (Figura 7 y 8). Ensayos de hibridación tipo "Southern", utilizando ADN digerido con *EcoRI* derivado de las cepas ATCC 9046, AEIV y UW136 indicaron que en las tres cepas de *A. vinelandii* está conservada la región del fragmento *EcoRI* de 1.5 kb, que contiene el extremo 3' de *argH* y el 5' de *algR*. Por otro lado, un fragmento de 1054 nucleótidos, correspondientes a la parte estructural del gen *fimS* de *P. aeruginosa*, no hibridó con ADN cromosomal de *A. vinelandii*, aun bajo condiciones de baja astringencia, sugiriendo la ausencia de este gen en *A. vinelandii* (datos no mostrados).

**Construcción de las mutantes *algR* de *A. vinelandii*.** El plásmido pCNR1 lleva clonado el fragmento *EcoRI* de 1.5 kb, el cual contiene el extremo 5' del gen *algR*. Este plásmido se utilizó para construir las mutantes por inserción en el gen *algR*. En el sitio único *XhoI*, localizado dentro del gen *algR*, se clonó un casete  $\Omega$ -Tc o un casete  $\Omega$ -Sp (Fellay, *et al.*, 1987). Esto se realizó rellinando los extremos cohesivos, que deja la endonucleasa *XhoI*, con la enzima Klenow, y ligando en su lugar los casetes liberados con la enzima *SmaI*. Los plásmidos resultantes, pCNR101 y pCNR102 (Figura 7), incapaces de replicarse en *A. vinelandii*, se usaron para introducir la mutación *algR*::Tc en el cromosoma de la cepa ATCC 9046 y la mutación *algR*::Sp en la cepa WI12. Se seleccionó la transformante resistente a tetraciclina, ATR8 y la transformante resistente a espectinomicina, WIR12, las que fueron confirmadas por hibridación tipo Southern (Figura 10 y datos no mostrados, respectivamente).

El plásmido pCNR2 se utilizó para introducir un casete  $\Omega$ -Tc en el sitio único *SphI*, localizado 80 pb por abajo del codón de término TGA de *algR*. El plásmido resultante, pCNR201 (Figura 7) fue transformado en la cepa ATCC 9046, seleccionándose transformantes resistentes a tetraciclina; la cepa así obtenida se le llamó ATR9, y se utilizó para descartar un posible efecto polar sobre genes localizados río abajo de *algR* (ver más adelante).

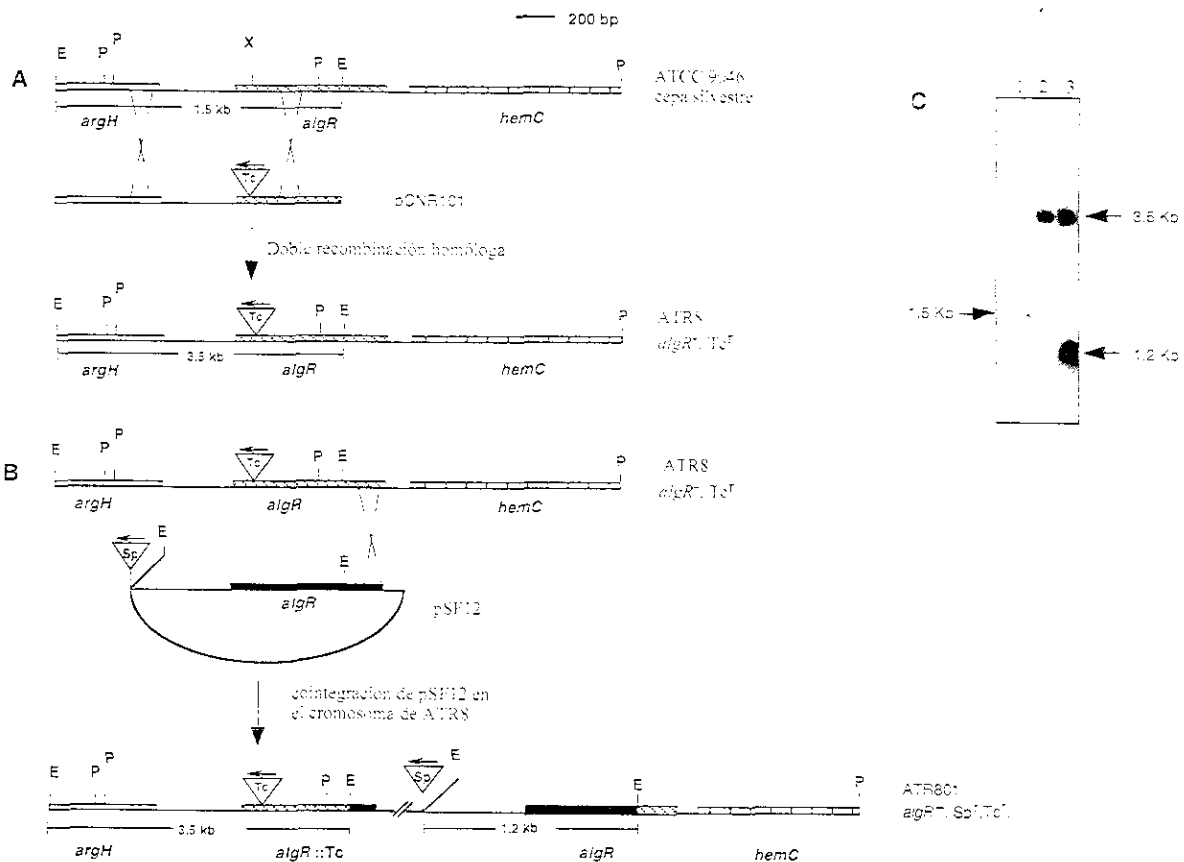


Figura 10. A) Inactivación del gen *algR* de *A. vinelandii*, en la cepa ATCC 9046, por inserción de un casete de resistencia. B) Integración del plásmido pSF12 en el cromosoma de la cepa ATR8. C) Autoradiografía de la hibridación tipo "Southern" del ADN genómico digerido con *EcoRI*, de 1), ATCC 9046; 2), ATR8; 3), ATR801.

*algR* no es indispensable para la biosíntesis de alginato. Para determinar si AlgR estaba involucrada en la regulación de la biosíntesis de alginato, se realizó la cuantificación de este polisacárido en la cepa ATR8 y se comparó con los valores exhibidos por la cepa parental ATCC 9046 (Tabla 2). Contrario a lo que se observa en *P. aeruginosa*, en donde la inactivación de *algR* resulta en un abatimiento de la producción de alginato, nosotros encontramos que, en *A. vinelandii*, la mutación en *algR* sólo disminuye en un 50%, aproximadamente, los niveles de este polisacárido. Esto indica que AlgR juega un papel de regulador positivo sobre esta ruta, aunque no es indispensable.

Tabla 2. Producción de alginato y frecuencia de enquistamiento en diferentes cepas de *A. vinelandii*.

Cepa	Genotipo	Alginato( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)		% enquistamiento
		BS <sup>a</sup>	BB <sup>b</sup>	
ATCC 9046	silvestre	3612 $\pm$ 624	2648 $\pm$ 322	5.16 $\pm$ 1.7
ATR8	<i>algR::Tc</i>	1357 $\pm$ 92	920 $\pm$ 20	0.004 $\pm$ 0.002
ATR801	ATR8/ <i>algR</i> <sup>+</sup>	4171 $\pm$ 292	N.D. <sup>c</sup>	1.19 $\pm$ 0.13
ATR9	<i>algR</i> <sup>+</sup> Tc	N.D.	N.D.	1.05 $\pm$ 0.19
WI12	<i>algD::lacZ</i>	259 $\pm$ 45	1121 $\pm$ 148	5.21 $\pm$ 1.0

<sup>a</sup> Medio sólido Burk's suplementado con 2% de sacarosa como fuente de carbono. <sup>b</sup> Medio sólido Burk's suplementado con 0.2% de *n*-butanol como fuente de carbono. <sup>c</sup> No determinado.

**AlgR no se requiere para la transcripción de *algD*.** En *P. aeruginosa*, AlgR activa la transcripción de *algD*, a partir de su único promotor dependiente de AlgU; además, se ha visto que para lograrlo se une a tres sitios (sitios RBS) en la región del promotor *algD* (Mohr 1991, Mohr 1996). Nosotros determinamos, mediante ensayos de extensión de iniciadores, que la transcripción de *algD*, tanto en la cepa ATCC 9046 como en su derivada *algR*<sup>-</sup>, es idéntica. La transcripción de *algD* inicia a partir de los dos promotores previamente reportados, AlgU (p2) y  $\sigma^D$  (p1), pero, además, a partir de otro tercer inicio localizado 62 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio ATG (Figura 11). En éste tercer inicio de la transcripción de *algD*, no encontramos secuencias consenso en las regiones -10 y -35, similares a promotores ya conocidos (Figura 11).

Por otro lado, confirmamos que la mutación *algR* no tiene efecto sobre la transcripción de *algD*, comparando los niveles de actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la cepa WI12 (*algD-lacZ*) y de su derivada *algR*<sup>-</sup>, WIR12. Ambas cepas, la WI12 y la WIR12, mostraron niveles de  $\beta$ -galactosidasa similares (9.9  $\pm$  0.1 y 11.4  $\pm$  0.9 U/ $\mu\text{g}$  de proteína, respectivamente) después de 24 horas de crecimiento en medio BS. De esta manera, confirmamos que la transcripción de *algD* no es afectada por la mutación *algR*.

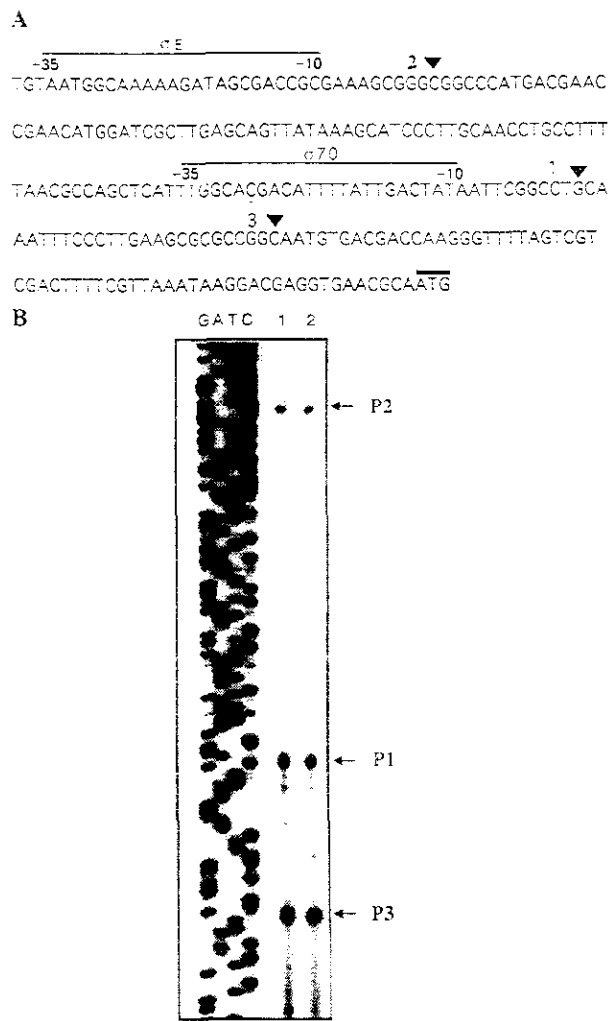


Figura 11. Ensayo de extensión de iniciadores para identificar los inicios de transcripción del gen *algD* en la cepa ATCC 9046 y su derivada *algR* ATR8. A) Secuencia nucleotídica de la región 5' de *algD*. Las flechas indican los sitios de inicio de la transcripción. El codón de inicio ATG está señalado con una línea por arriba. B) Ensayo de "extensión de iniciadores" del gen *algD* en la cepa ATCC 9046 (línea 1) y ATR8 (línea 2).

El gen *algR* de *A. vinelandii*, es funcional en *P. aeruginosa*. El cósmido pMSR1506, el cual lleva el gen *algR* de *A. vinelandii*, se transfirió por conjugación a dos mutantes *algR* de *P. aeruginosa*, la FRD810 y la 8852. Como control positivo usamos el plásmido pAD1039, el cual lleva el gen *algR* de *P. aeruginosa* en el mismo vector. El plásmido pMSR1506 restableció, de manera parcial, la producción de alginato en ambas cepas (Tabla 3). Estos datos indican que la proteína AlgR de *A. vinelandii* es capaz de funcionar como un activador transcripcional del promotor de *algD* en *P. aeruginosa*.

Tabla 3. Complementación de mutantes *algR* de *P. aeruginosa* con (*P.a.*) *algR* de *A. vinelandii* (*A.v.*).

Cepa	Genotipo	Mucoidía	Alginato <sup>a</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)
FRD810	<i>algR</i> -	-	$51.8 \pm 3$
FRD810/pAD1039	/P.a. <i>algR</i>	++	$7607 \pm 1082$
FRD810/pMSR1506	/A.v. <i>algR</i>	+	$648 \pm 74$
FRD810/pCP13	/vector	-	$113 \pm 24$
8852	<i>algR</i> -	-	$28 \pm 8$
8852/pAD1039	/P.a. <i>algR</i>	++	$9218 \pm 1400$
8852/pMSR1506	/A.v. <i>algR</i>	+	$1434 \pm 162$
8852/pCP13	/vector	-	$10.3 \pm 1.3$

<sup>a</sup> El alginato fue determinado en células crecidas en medio sólido PIA durante 48 horas.

**Efecto de la mutación *algR* sobre el enquistamiento.** Por otro lado, se evaluó el posible papel de AlgR sobre el proceso de enquistamiento. Se midió la resistencia a la desecación de los cultivos inducidos a enquistamiento con *n*-butanol. Se observó una reducción de más de mil veces en la frecuencia de enquistamiento en la mutante *algR* ATR8 (Tabla 2).

Probamos si la incapacidad de la cepa ATR8 para enquistarse se debía al 50% de reducción en la producción de alginato. Para tal fin, se cuantificó la producción de alginato en condiciones de enquistamiento para la cepa ATR8 y para la W112 (en esta cepa, la actividad del producto del gen *algD* se encuentra reducida debido a la fusión transcripcional *algD-lacZ*). En la Tabla 2 se puede observar que la cepa ATR8 es incapaz de enquistarse aun cuando, bajo condiciones de enquistamiento, produce cantidades similares de alginato a las producidas por la cepa W112.

La microscopía electrónica de los cultivos inducidos a enquistamiento, tanto de la cepa ATCC 9046 como de la cepa *algR* ATR8, se muestra en la Figura 12. En la cepa ATCC 9046 se puede observar la morfología de un quiste maduro, la cual ha sido descrita previamente (ver Introducción); se puede observar el cuerpo central con varios granulos de PHB y rodeado de dos capas, la intina y la exina. No se pudo observar ningún quiste maduro en las preparaciones de la cepa *algR* ATR8; el



cuerpo central sólo se ve rodeado por una incipiente capa de exina, la cual no llega a conformarse totalmente, mientras que no se observan rastros de la intina. La exina es la primera capa del quiste que se estructura, por lo que este fenotipo nos indica que el proceso de enquistamiento, en la mutante ATR8, se detiene en las etapas tempranas del proceso de diferenciación.

Para descartar la posibilidad de que la incapacidad de enquistarse se debiera a un efecto polar de la mutación en *algR*, la cepa ATR9, la cual lleva una inserción del casete  $\Omega$ -Tc 80 nt abajo del codón de término de *algR*, se sometió a ensayos de enquistamiento. Esta cepa exhibe valores normales en su frecuencia de enquistamiento.

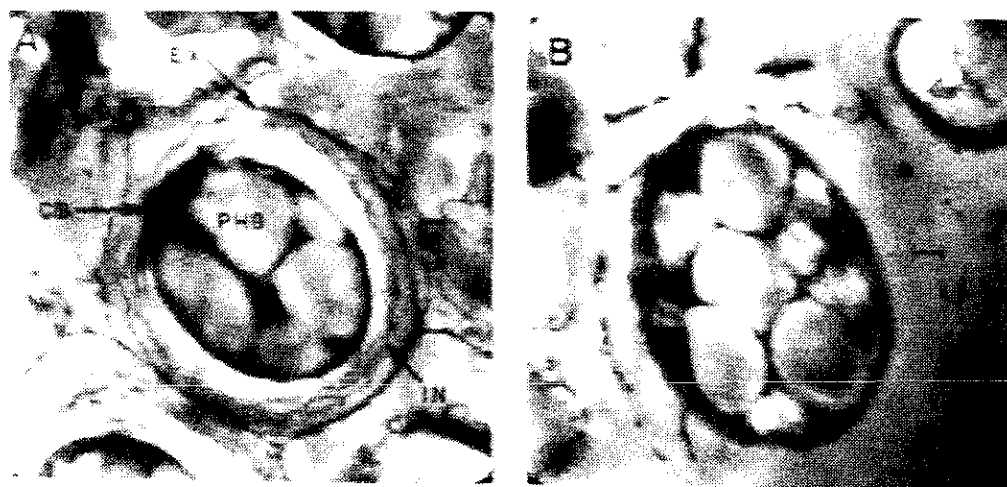


Figura 12. Micrografías electrónicas de los quistes formados por las cepas ATCC 9046 (A) y ATR8 (B). Abreviaturas: EX, exina; IN, intina; CB, cuerpo central; PHB, poli- $\beta$ -hidroxibutirato. Barras, 0.4 micras.

**Complementación de la mutante *algR*.** Para confirmar que *algR* regula positivamente el proceso de enquistamiento, se complementó la mutante ATR8 con el plásmido pSF12 (*algR*<sup>+</sup>, Sp<sup>r</sup>). Este plásmido, que no se replica en *A. vinelandii*, se introdujo por transformación a la mutante ATR8 y se seleccionó una transformante resistente a espectinomicina, la cual llevaba cointegrado una copia del gen *algR* en el cromosoma, dicha cointegración se confirmó por hibridaciones tipo "Southern"; a la cepa se le denominó ATR801 (Figura 10) y se enquistó de manera similar a la cepa silvestre ATCC 9046 (Tabla 2).

**Análisis transcripcional de *algR*.** El sitio de inicio de transcripción de *algR* se determinó por ensayos de extensión de iniciadores. En la cepa ATCC 9046 se identificó un sitio único de inicio de transcripción, 30 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio de la traducción. No se reconocieron secuencias consenso similares a promotores ya reportados en las regiones -10 y -35 (Figura 13 A). En contraste a lo observado en *P. aeruginosa* (Wozniak 1994), la transcripción de *algR* no se abate en las mutantes *algU*<sup>-</sup>, SMU88 (derivada de la ATCC9046, *algU*::Km<sup>r</sup>) y UW136 (mutante natural *algU*). Sin embargo, las mutaciones parecen reducir la transcripción de *algR* (Figura 13 B, carriles 1 y 2).

A

```

                                +1
CCGTGACGCTGTCACTCCGGCTGTCTACGCTAATTGTTCTCCGGACTGAC
CGGGGAAGCCGAAGCAACATGAATGTTCTGATCGTCCGACGACGACCTCA
GGCCAAGGAGCACCTCAGCCGTCTGGTGAAGTGAAGCTCGATGSCATCGCG
TGCTCGAGCC

```

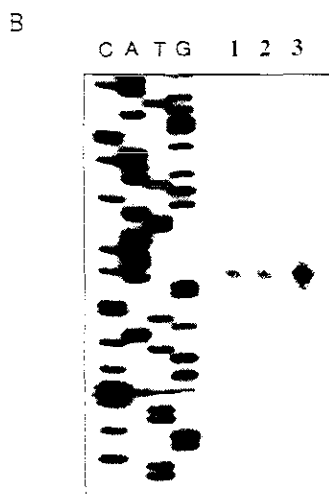


Figura 13. Autorradiografía de los ensayos de extensión de iniciadores del gen *algR* para identificar el sitio de inicio de la transcripción en las cepas ATCC 9046, SMU88 y UW136. A) Secuencia nucleotídica de la región 5' de *algR*. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. El codón de inicio ATG, está marcado por una línea por arriba. La secuencia complementaria de donde se diseñó el oligonucleótido usado en el ensayo de "Extensión de iniciadores" está subrayada. B) Ensayo de "extensión de iniciadores" del gen *algR* en las cepas SMU88(línea 1), UW136 (línea 2) y ATCC 9046 (línea 3).

El plásmido pMSR1506 suprime el enquistamiento en la cepa ATCC 9046. El plásmido pMSR1506, el cual posee una copia del gen *algR*, reduce la producción de alginato y suprime el enquistamiento en la cepa ATCC 9046 (Tabla 4). La reducción en la producción de alginato por este plásmido pudiera ser la razón de su efecto sobre el enquistamiento, ya que la biosíntesis de este polisacárido se reduce alrededor de 5 veces. En *P. aeruginosa*, se reportó que la sobreexpresión del gen *algR* resulta en una disminución de los valores de alginato (Deretic y Konyecsni, 1989). Para investigar si el efecto negativo del plásmido pMSR1506, en la producción de alginato y en el enquistamiento, era debido a *algR*, se construyó el plásmido pMSR1507, un derivado del pMSR1506 con una mutación *algR::Sp* (ver materiales y métodos).

Tabla 4. Efecto del plásmido pMSR1506 en la producción de alginato y en el enquistamiento en *A. vinelandii*

Cepa	Alginato ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)		% enquistamiento
	BS <sup>a</sup>	BB <sup>b</sup>	
ATCC 9046	3612 $\pm$ 624	2648 $\pm$ 322	5.6 $\pm$ 1.7
ATCC 9046/pMSR1506	440 $\pm$ 50	265 $\pm$ 25	0.003 $\pm$ 0.001
ATCC 9046/pMSR1507	215 $\pm$ 10	327 $\pm$ 35	0.002 $\pm$ 0.0008
ATCC 9046/pCP13	3070 $\pm$ 57	2141 $\pm$ 270	6.4 $\pm$ 1.3

<sup>a</sup> Medio sólido Burk's suplementado con 2% de sacarosa como fuente de carbono. <sup>b</sup> Medio sólido Burk's suplementado con 0.2% de *n*-butanol como fuente de carbono.

El plásmido pMSD1507 posee el mismo efecto sobre el enquistamiento y la biosíntesis de alginato que el pMSR1506, lo que indica que su efecto negativo no es debido al gen *algR* y sugiere la existencia de otro *locus* en esta región cromosomal que participa en la regulación de ambos procesos.

## VI. DISCUSION

En el presente trabajo se clonó y caracterizó el gen *algR* de *A. vinelandii*. Encontramos un 79% de identidad con el regulador de respuesta AlgR de *P. aeruginosa*, que junto con AlgU, es requerido para la activación transcripcional del operón de la biosíntesis de alginato encabezado por *algD*. En *A. vinelandii*, *algD* es transcrito a partir de tres promotores, uno de los cuales (p2), es dependiente de AlgU (Campos *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 1998). Nuestros resultados muestran que, en contraste con lo que sucede en *P. aeruginosa*, la proteína AlgR de *A. vinelandii* no se requiere para la activación transcripcional de *algD*. Este hallazgo es consistente con la falta de secuencias consenso para la unión de AlgR (RBS), dentro del promotor de *algD* en *A. vinelandii* (Campos *et al.*, 1996). Por tal razón, proponemos que existe un regulador diferente de AlgR que activa la transcripción a partir del promotor de *algD* dependiente de AlgU (p2); de manera similar, en *P. aeruginosa*, la transcripción de *algR* depende de AlgU pero no de AlgR (Wozniak, 1994); así pues, hay promotores reconocidos por AlgU que no son activados por AlgR, lo que indica la existencia de otros reguladores transcripcionales con capacidad de interactuar con la AlgU-RNA polimerasa.

La complementación parcial de las mutantes *algR* de *P. aeruginosa*, indican que la proteína AlgR de *A. vinelandii* es capaz de unirse a las secuencias RBS presentes en el promotor *algD* de *P. aeruginosa* y de interactuar con la AlgU-RNA polimerasa. Este dato sugiere que los genes regulados por AlgR, en *A. vinelandii*, pudieran contener secuencias RBS similares a las halladas en *P. aeruginosa*.

Aun cuando AlgR no se requiere para la transcripción de *algD* en *A. vinelandii*, la producción de alginato en la mutante *algR* se reduce en un 50%, implicando que AlgR debe ejercer un control sobre otros genes biosintéticos o genes reguladores de la producción de alginato. Existen evidencias que indican la presencia de genes reguladores o biosintéticos (además de *algD*) que están bajo el control de AlgU (Moreno *et al.*, 1998). Así pues, dichos genes pudieran estar controlados por AlgR.

La mutante ATR8 posee una incapacidad para enquistarse; el proceso de enquistamiento parece estar bloqueado en la etapa de la organización de la exina. En un trabajo reciente, se reportó que el enquistamiento es abatido

por el plásmido pSMU865, el cual contiene los genes *mucABCD*, los cuales codifican para reguladores negativos de la actividad de AlgU (Martínez-Salazar, *et al.*, 1996, Moreno *et al.*, 1998). Sin embargo, en este caso, el enquistamiento logra avanzar aún más, ya que los quistes formados poseen una exina claramente organizada pero que carecen de intina.

La transcripción de *algR* se reduce en cepas mutantes *algU*, indicando un efecto indirecto de AlgU sobre la transcripción de *algR*. Esto concuerda con la ausencia de secuencias de reconocimiento para AlgU dentro del promotor de *algR*. Este hecho indica la existencia de otro factor sigma, involucrado en la regulación de la producción de alginato y del proceso de enquistamiento. Esto, y el hecho de que el proceso de diferenciación logra avanzar menos en una mutante *algR* que en la cepa ATCC 9046/*mucABCD*, pudiera indicar que el requerimiento de AlgU para el enquistamiento pudiera deberse, en parte, a su efecto positivo sobre la transcripción de *algR*.

Dado que ambas proteínas, AlgU y AlgR, son esenciales para el enquistamiento, es posible que AlgR active genes de enquistamiento cuyos promotores también son reconocidos por AlgU. Los genes blanco de regulación, tanto de AlgR como de AlgU durante el proceso de enquistamiento permanecen sin identificar. Sin embargo, el requerimiento de AlgR y/o de AlgU para la transcripción de dichos genes nos podrá permitir su completa identificación.

Reush y Sadoff (1981), reportaron que la cepa OP de *A. vinelandii*, incapaz de producir alginato, sintetiza los alquil resorcinol AR1, mas no sus derivados galactósidos AR2. Estudios posteriores indicaron que esta cepa (padre de la cepa UW136, que actualmente tenemos en el laboratorio) es incapaz de sintetizar alginato debido a una mutación en el gen *algU* (Martínez-Salazar *et al.*, 1996). Este hecho indica que el factor sigma AlgU, y probablemente en conjunción con AlgR, está involucrado en la síntesis de estos nuevos lípidos estructurales de membrana (Reush y Sadoff 1983), a los cuales se les atribuye parte de las propiedades de resistencia del quiste.

En *P. aeruginosa*, *algR* está flanqueado por el gen *fimS*, el que se ha propuesto codifica para la pareja histidín-cinasa de AlgR, y por el gen *hemC* (Figura 6). La caracterización de la región flanqueante de *algR* en *A. vinelandii*, nos permitió identificar al gen *argH* inmediatamente al extremo

5' y al gen *hemC* inmediatamente al extremo 3' (Figura 6). El gen *fimS* no está presente en las vecindades de *algR*, pero aún más, los resultados de hibridación tipo "Southern" indican la ausencia del gen *fimS* en el cromosoma de *A. vinelandii*. En *P. aeruginosa*, el par sensor-regulador FimS-AlgR, del sistema de transducción de señales de dos componentes, participa en la biogénesis de la fimbria tipo 4 (Witchurch *et al.*, 1997); ésta fimbria está involucrada en la adhesión celular y en el "twitching-motility" en varias bacterias patógenas, como *Dichelobacter nodosus*, *Moraxella bovis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, y *Vibrio cholerae* (Strom y Lory, 1993). *A. vinelandii* es una bacteria de vida libre no patógena y, hasta el momento, no hay reportes de que posea fimbrias tipo 4. Este hecho puede ser la razón de la ausencia de *fimS* en el cromosoma de *A. vinelandii*.

Estudios recientes mostraron que en *P. aeruginosa*, no es necesaria la fosforilación de AlgR y AlgB para la biosíntesis de alginato (Ma, 1998). La fosforilación es esencial para la actividad de la mayoría de los reguladores de respuesta hasta ahora estudiados (Stock *et al.*, 1989). Una excepción es la forma no fosforilada de DegU, en *Bacillus subtilis*, la cual activa los genes tardíos de competencia, *comC* y *comG*, mientras que su forma fosforilada se requiere para la expresión de genes de enzimas degradativas (Msadek 1995). De manera similar, se postula que, en *P. aeruginosa*, la forma no fosforilada de AlgR está involucrada en la producción de alginato, mientras que su forma fosforilada participa en el movimiento celular denominado "twitching-motility" (Ma, *et al.*, 1998).

Otra hipótesis propuesta, con la que se trata de explicar la falta de fosforilación de AlgR es que, en cepas mucoides, que es en donde estas formas no fosforiladas son activas, no son cepas silvestres pues contienen mutaciones en el gen *mucA*, lo que resulta en una alta actividad de AlgU. Cepas mucoides de *P. aeruginosa* pudieran tener niveles elevados de estos reguladores de respuesta, que dispensan la necesidad de ser fosforilados (Ma, *et al.*, 1998).

Cepas silvestres de *A. vinelandii* (*mucA*<sup>-</sup>), producen niveles de alginato similares a los producidos por las mutantes *mucA*<sup>-</sup> de *P. aeruginosa*; este hecho, además de indicar que la regulación de la biosíntesis de alginato en ambas bacterias difiere significativamente, sugiere que en *A. vinelandii*, el gen *algR* no se encuentra sobreexpresado, como sucede en *P.*

*aeruginosa*. Un punto interesante sería esclarecer si AlgR necesita ser fosforilada para activar la transcripción de los genes de alginato y del proceso de enquistamiento en *A. vinelandii*. Actualmente, se está trabajando en mutar el residuo Asp<sup>54</sup>, sitio propuesto de fosforilación de AlgR, para resolver esta cuestión. Si los resultados finales muestran que AlgR necesita fosforilarse para ser activo, entonces la búsqueda de una posible proteína histidín-cinasa pareja molecular de AlgR, es fundamental para disectar el modelo de regulación de la producción de alginato y, sobre todo, del proceso de enquistamiento.

Finalmente, mientras tratábamos de complementar la mutante *algR* con el cósmido pMSR1506, detectamos un efecto inhibitorio de éste plásmido sobre la biosíntesis de alginato y el enquistamiento. La inhibición en el proceso de enquistamiento puede ser debida a la drástica disminución en la producción de alginato. Tenemos evidencias que indican que esta inhibición no es debida a *algR* y que debe existir otra región cromosomal, cercana a este gen, que controla ambos procesos. Dicha región cromosomal, una vez identificada, será caracterizada, para determinar que genes son los responsables de ese fenotipo.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bali, A., G. Blanco, S. Hill, and C. Kennedy. 1992. Excretion of ammonium by a nifL mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. Appl. Environ. Microbiol. 58:1711-1718.
- 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.
- Baynham, P. J. and D. Wozniak. 1996. Identification and characterization of AlgZ, an AlgT-dependent DNA-binding protein required for *Pseudomonas aeruginosa* algD transcriptio. Mol. Microbiol. 22:97-108.
- Bishop, P. E. and W. J. Brill. 1977. Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutant strains unable to fix nitrogen. J. Bacteriol. 130: 954-956.
- 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.
- Boucher, C. J., M.J. Schurr, H. U, D. W. Rowen and V. Deretic. 1997. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: role of *mucC* in the regulation of alginate production and stress sensitivity. Microbiology. 143: 3473-3480.
- Boyd, J., and S. Lory. 1996. Dual function of PilS during transcriptional activation of the *Pseudomonas aeruginosa* pilin subunit gene. J. Bacteriol. 178: 831-839.
- 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.
- Castañeda M. y G.Espín. 1998. Papel del gen *asrA* en la biosíntesis de alginato y en el proceso de diferenciación morfológica en *A. vinelandii*. Datos no publicados.
- Chitnis, C. E., and D. E. Ohman. 1993. Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure. Mol. Microbiol. 8:583-590.
- Clementi, F. 1998. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. Crit. Rev. Biotech. 17:327-361.



- 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.
- Darzins, A., and A. M. Chakrabarty. 1984. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 159:9-19.
- Delic-Attree, I., B. Toussaint, A. Froger, J.C. Willison and P. M. Vignais. 1996. Isolation of an IHF-deficient mutant of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid isolate and evaluation of the role of IHF in *algD* gene expression. *Microbiology.* 142:2785-2793.
- Deretic, V., R. Dikshit, W. M. Konyecsni, A. M. Chakrabarty, and T. K. Misra. 1989. The *algR* gene which regulates mucoidy in *P. aeruginosa* belongs to a class of environmentally responsive genes. *J. of Bacteriol.* 171: 1278-1283.
- Deretic, V. and W. M. Konyecsni. 1989. Control of mucoidy in *P. aeruginosa*: Transcriptional regulation of *algR* and identification of the second regulatory gene, *algQ*. *J. of Bacteriol.* 171: 3680-3688.
- 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.
- Erickson, J. W. and C. A. Gross. 1989. Identification of the  $\sigma^E$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternative sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Gene dev.* 3:1462-1471.
- 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.
- Ferrary E., S. M. Howard and J. Hoch. 1985. Effect of sporulation mutations on subtilisin expression, assayed using a subtilisin- $\beta$ -galactosidase gene fusion. In J.A. Hoch and P. Setlow (ed.), *Molecular biology of microbial differentiation*. American Society for Microbiology, Washintong D.C. 180-184.
- Fialho, A. M., N. A. Zielinski, W. F. Fett, A. M. Chakrabarty, and A. Berry. 1990. Distribution of alginate gene sequences in the *Pseudomonas* rRNA homology group I-Azomonas-Azotobacter lineage of superfamily B procaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:436-443.

- 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. Microbiol. 144:1133-1143.
- Goldberg J. B. and T. Dahnke.** 1992. *Pseudomonas aeruginosa* AlgB, which modulates the expression of alginate, is a member of the NtrC subclass of prokaryotic regulators. Mol. Microbiol. 6:59-66.
- Govan, J. R. W.** 1988. Alginate biosynthesis and other unusual characteristics associated with the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis, p. 67-96. In E. Griffiths, W. Donachie, and J. Stephen (ed.), Bacterial infections of respiratory and gastrointestinal mucosae. IRL Press, Oxford.
- Gorin, P. A. J. y J. F. T. Spencer.** 1966. Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. Can. J. Chem. 44:993-998.
- Hanahan, D.,**1983. Studies on transformation of *E. coli*. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Haug, A., B. Larsen and O. Smidsrod.** 1974. Uronic acid sequence in alginate from different sources. Carb. Res.32:217-225.
- Hershberger, C. D., R. W. Ye, M. R. Parsek, Z. D. Xie, and A. M. Chakrabarty.** 1995. The *algT* (*algU*) gene of *Pseudomonas aeruginosa*, a key regulator involved in alginate biosynthesis, encodes an alternative  $\sigma$  factor ( $\sigma^E$ ). Pro. Natl. Acad. Sci. USA 92:79-41.
- Hiratsu, K., M. Amekuro, H. Nashimoto, H. Shinagawa and K. Makino.** 1995. The *rpoE* gene of *Escherichia coli*, which encodes  $\sigma^E$ , is essential for bacterial growth at high temperature. J. Bacteriol. 177:2918-2922.
- Hitchins, V. and H. L. Sadoff.** 1973. Sequential metabolic events during encystment of *A. vinelandii*. J. Bacteriol. 113: 1273-1279.
- Holloway, B. W.** 1955. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 13:572-581.
- Hoch, J. A. and T. J. Silhavy.** 1995. Two component signal transduction (eds.). American society Microbiology Press, Washintong, D.C.
- Hrabak, E. M. and D. K. Willis.** 1993. Involvement of the *lemA* gene in production of syringomycin and protease by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Mol. Plant Microbe interact. 6:368-375.

- Kato, J., L. Chu, J. D. DeVault, K. Kimbara A. M. Chakrabarty and T. K. Misra. 1989. Nucleotide sequence of a regulatory region controlling alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of the *algR2* gene. *Gene*. 84: 31-38.
- Kennedy, C., R. Gamal, R. Hummprey, J. Ramos, K. Brigle, and D. Dean. 1986. The *nifH*, *nifM*, and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: Characterization by Tn5 mutagenesis and isolation from pLARF1 gene banks. *Mol. Gen. Genet.* 205:318-325.
- Lin, L. P. y Sadoff, H. A. 1969. Chemical composition of *A. vinelandii* cysts. *J. Bacteriol.* 100: 480-486.
- Lin, L. P. y Sadoff, H. A. 1969-b. Preparation and ultrastructure of the outer coats of *A. vinelandii* cysts. *J. Bacteriol.* 98: 1335-1341.
- Linker, A. y R. S. Jones. 1964. A polysaccharide resembling alginic acid from a *Pseudomonas* microorganism. *Nature*. 204:187-188.
- Lipinska, B., S. Sharma, and C. Georgopoulos. 1988. Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a  $\sigma^{32}$ -independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res.* 16:10053-10067
- 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.
- Loperfido, B. y H. L. Sadoff. 1973. Germination of *Azotobacter vinelandii* cysts: sequence of macromolecular synthesis and nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 113: 841-846.
- Lowry, D. Rosenbrough, N., Fair, A. and Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lynn, A. R. and Sokatch, J. R. 1984. Incorporation of isotope from specifically labelled glucose into alginates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 158: 1161-1162.
- Ma, S., D. J. Wozniak and D. E. Ohman. 1997. Identification of the histidin protein kinase KinB in *Pseudomonas aeruginosa* and its phosphorylation of the Alginate Regulator AlgB. *The J. Biol. Chem.* 272:17952-17960.
- Ma, S., U. Selvaraj, D. E. Ohman, R. Quarless. D. J. Hassett, and D. J. Wozniak. 1998. Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 180:956-968.
- Martin, D. W., M. J. Schurr, H. Yu, and V. Deretic. 1994. Analysis of promoters controlled by the putative sigma factor AlgU regulating conversion to mucoidy

in *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to  $\sigma^E$  and stress response. J. Bacteriol. 176: 6688-6696.

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.

Mathee K., C. J. Mepherston and D. Ohman. 1997. Posttranslational control of the *algI(algU)*-Encoded s22 for expression of the alginate regulon in *Pseudomonas aeruginosa* and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (*algN*). J. Bacteriol. 179:3711-3720.

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.

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

Mohr, C. D., J. H. J. Leveau, D. P. Krieg, N. S. Hibler, and V. Deretic. 1992. AlgR binding sites within the *algD* promoter make up a set of inverted repeats separated by a large intervening segment of DNA. J. Bacteriol. 174: 6624-6633.

Mohr, C. D., D. W. Martin, W. N. Konyecsni, J. R. W. Govan, S. Lory, and V. Deretic. 1990. Role of the far-upstream sites of the *algD* promoter and the *algR* and *rpoN* genes in environmental modulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Mol. Biol. 172: 6576-6580.

Mohr C. D., S. K. Sonstebly, and V. Deretic. 1994. The *Pseudomonas aeruginosa* homologs of *hemC* and *hemD* are linked to the gene encoding the regulator of mucoidy *algR*. Mol. Gen. Genet. 242, 177-184.

- Moreno, S. , J. Guzmán, R. Nájera, G. Soberón-Chávez, and G. Espín. 1998. Role of the alternative  $\sigma^E$  factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 180: 2766-2769.
- Msadek, T., F. Kunst, and G. Rapoport. 1995. A signal transduction network in *Bacillus subtilis* includes the DegS DegU and ComP ComA two component systems. p447-471. In J. A. Hoch and T. J. Shilavy (ed). Two-component signal transduction. ASM Press. Washington, D. C.
- Narbad, A., N. J. Russell and P. Gacesa. 1988. Radiolabelling patterns in alginate of *Pseudomonas aeruginosa*: synthesized from specifically-labelled  $^{14}\text{C}$  monosaccharide precursors. Microbis. 54, 171-179.
- Page, W. J., and H. L. Sadoff. 1975. Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 122: 145-151.
- Page, W. J. and M. von Tigerstrom. 1978. Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. Can. J. Microbiol. 24:1590-1594.
- Pindar, D. F., and C. Bucke. 1975. The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. Biochem. J. 152:617-622.
- Reush R.N. and H.L. Sadoff. 1983. Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cysts membrane. Nature. 302:269-270.
- Reush R.N. and H.L. Sadoff. 1981. Lipid metabolism durins encystment of *A. vinelandii*. J. Bacteriol. 145: 889-895.
- Rehm, H. A., Ertesvag,H., and Valla, S. 1996. A new *A. vinelandii* mannuronan C-5 epimerase gene (*algG*) is part of an alg gene cluster physically organized in a manner similar to that in *P. aeruginosa*. J. Bacteriol. 178, 5884-5889.
- Roller, S. and I. C. M. Dea. 1992. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. Crit. Rev. Biotechnol. 12(3):261-277.
- Rouviere P. E., A. De las Peñas, J. Meccas, C.Z. Lu, K. E. Rudd and C. Gross. 1995. *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor  $\sigma^E$ , in *Escherichia coli*.
- Ruppen M. E., G. Grarner and H. L. Sadoff. 1983. Protein turnover in *Azotobacter vinelandii* during encystment and germination. J. Bacteriol. 156: 1243-1248.
- Sadoff, H. L. 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. Bacteriol. Rev. 39:516-539.
- Sadoff H.L., E. Berke and B. Loperfido. 1971. Physiological studies of encystment in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 105: 185-189.
- 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.
- Schlictman D., A. Kavanaugh-Black, S. Shankar and A. M. Chakrabarty. 1994. Energy metabolism and alginate biosynthesis in *P. aeruginosa*: role of the tricarboxylic acid cycle. J. Bacteriol. 176:6023-6029.
- Schlictman D., M. Kubo, S. Shankar and A. M. Chakrabarty. 1995. Regulation of nucleoside diphosphate kinase and secretable virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: roles of *algR2* and *algH*. J. Bacteriol. 177:2469-2474.
- Schurr, M. J., D. W. Martin, M. H. Mudd, and V. Deretic. 1994 Gene cluster controlling conversion to alginate-overproducing phenotype in *Pseudomonas aeruginosa*: functional analysis in a heterologous host and role in the instability of mucoidy. J. Bacteriol. 176:3375-3382.
- Schurr, M. J., H. Yu, J. C. Boucher, N.S. Hibler and V. Deretic. 1995. Multiple promoters and induction by heat shock of the gene encoding the alternative sigma factor AlgU ( $\sigma^E$ ) which controls mucoidy in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 177: 5670-5679.
- Schurr, M. J., H. Yu, J. M. Martínez-Salazar, J. C. Boucher, and V. Deretic. 1996. Control of AlgU, a member of the  $\sigma^E$ -like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. J. Bacteriol. 178:4997-5004.
- Stevenson, L. H. and M.D. Sokolofsky. 1966. Cyst formation and poly- $\beta$ -hydroxybutic acid accumulation in *Azotobacter*. J. Bacteriol. 91: 304-310.
- Stock J. B., A. J. Ninfa and A. Stock. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol. Rev. 53: 450-490.
- Stockall A. M. and C. Edwards. 1985. Changes in respiratory activity during encystment of *Azotobacter vinelandii*. J. of Gen. Microbiol. 131: 1403-1410.
- Strom M. S. and S. Lory. 1993. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. Ann. Rev. Microbiol. 47:565-96.
- 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.
- Sutherland, I. W. 1994a. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. Biotech. Adv. 12:393-448.
- Vandamme, E. J., Bruggeman G., S. De Baets, and P.T. Vanhooren 1996. Useful polymers of microbial origin. Agro-Food Industry Hi-Tech. 7(5): 21-25.

- Vazquez, A., S. Moreno, J. Guzmán, A. Alvarado y G. Espín. 1998. The *Azotobacter vinelandii* *algXLIJFA* operon: its transcriptional organization and characterization of an *algF* mutant. In preparation.
- Vela G. L. 1974. Survival of *A. vinelandii* in dry soil. *Appl. Microbiol.* 28:77-79.
- Wang, Q. P. and J. M. Kaguni. 1989. A novel sigma factor is involved in expression of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171:4248-4253.
- Webber C. A., and R. J. Kadner. 1995. Action of the receiver and activator modules of UhpA in transcriptional control of the *Escherichia coli* sugar phosphate transport system. *Mol. Microb.* 15: 883-893.
- Webber C. A., and R. J. Kadner. 1997. Involvement of the amino-terminal phosphorylation module of UhpA in activation of *uhpT* transcription in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 24: 1039-1048.
- Whitchurch, C. B., R. A. Alm, and J. S. Mattick. 1996. The alginate regulator AlgR and an associated sensor FimS are required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9839-9843.
- Wozniak, D. J. 1994. Integration host factor and sequences downstream of the *Pseudomonas aeruginosa* *algD* transcription start site are required for expression. *J. Bacteriol.* 176: 5068-5076.
- Wozniak, D. J., and D. E. Ohman. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* AlgB a two component response regulator of the NtrC-family, is required for *algD* transcription. *J. Bacteriol.* 173:1406-1413.
- Wozniak, D. J., and D. E. Ohman. 1994. Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes *algR*, *algB* and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by *algT*. *J. Bacteriol.* 176: 6007-6014.
- Wyss, O., M. G. Newmann, and M. D. Socolofsky. 1961. Development and germination of the *Azotobacter* Cyst. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10:555-565.
- Xie, Z., C. D. Hershberger, S. Shankar, R. W. Ye, and A. M. Chakrabarty. 1996. Sigma factor-anti-sigma factor interaction in alginate synthesis: inhibition of AlgT by MucA. *J. Bacteriol.* 178:4990-4996.
- Yu, H., M. Mudd, J. C. Boucher, M. J. Schurr, and V. Deretic. 1997. Identification of the *algZ* gene upstream of the response regulator *algR* and its participation in control of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179:187-193

APENDICE

Articulo aceptado



**The *Azotobacter vinelandii* response regulator AlgR is essential for cyst formation.**

Cinthia Núñez, Soledad Moreno, Gloria Soberón-Chávez, and Guadalupe Espín\*

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

\* Corresponding author. Mailing address:

Departamento de Microbiología Molecular

Instituto de Biotecnología UNAM

Apdo Postal 510-3 Cuernavaca, Morelos 62250, México.

Phone 52-73-291644

Fax 52-73-172388

Electronic mail [espin@ibt.unam.mx](mailto:espin@ibt.unam.mx)

## Abstract

*Azotobacter vinelandii* produces the exopolysaccharide alginate which is essential for the encystment process. In *Pseudomonas aeruginosa*, as well as in *A. vinelandii*, the  $\sigma^E$  factor encoded by *algU* is required for transcription of *algD* which encodes a key enzyme of the alginate biosynthetic pathway. The *P. aeruginosa* response regulator AlgR activates transcription of *algD*. *fimS*, located upstream *algR*, is proposed to encode the AlgR cognate sensor kinase. We have cloned and characterized the *A. vinelandii algR* gene; the deduced amino acid sequence of the protein encoded by this gene shows 79% identity with its *P. aeruginosa* homolog. Sequence analysis around the *algR* gene revealed the absence of a *fimS* homolog. Inactivation of *A. vinelandii algR* diminished alginate production by 50%, but did not affect *algD* transcription, and completely impaired the capacity to form mature cysts. Electron microscopy of the cyst structures formed by the *algR* mutant revealed that the encystment process is blocked at the step of exine formation. The transcriptional regulation of *A. vinelandii algR* gene and the AlgR role in alginate production, differs significantly from its *P. aeruginosa* counterpart. These differences could be due to the fact that, in *A. vinelandii*, alginate plays a role in encystment, a function not found in *P. aeruginosa*.

## Introduction

*Azotobacter vinelandii* is a soil bacterium that undergoes a process of cellular differentiation to form metabolically dormant cysts resistant to desiccation (for review, see reference 34). Mucoid strains of *A. vinelandii* produce the extracellular polysaccharide alginate, a linear copolymer of D-mannuronic and its C-5 epimer L-guluronic acid. Alginate is a major component of the intine and exine layers of the cysts (31), and is essential to the encystment process, since non-mucoid strains fail to form cysts (2, 23, 29).

The pathway for alginate biosynthesis has been elucidated in *A. vinelandii* (32). In this pathway, fructose-6-P is converted by four enzymatic reactions to GDP-mannuronic acid which is the substrate for polymerization. The resultant polymannuronic acid is secreted and modified by an O-acetylase and an extracellular C-5-epimerase to give the final product alginate (32). A similar pathway operates in *P. aeruginosa* (21).

The genetics of this process is well known in *P. aeruginosa* (7, 21) where alginate is an important virulence determinant and a major factor contributing to the intractability of *P. aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients (11). In *A. vinelandii* there are important advances in the study of the genetics of alginate synthesis (for review, see reference 10). These studies have been motivated by the role that this polysaccharide plays in the differentiation process and by the potential of this bacterium to be used in the production of alginate for industrial purposes.

In *A. vinelandii*, as in *P. aeruginosa*, all the alginate biosynthetic genes, except *algC*, are clustered (2, 16, 22, 23, 33). In *P. aeruginosa* this cluster is organized in a polycistronic operon transcribed from a promoter located upstream *algD* (3). In contrast, the *A. vinelandii* biosynthetic gene cluster is organized into three operons one of which transcribes *algD* (2, 16, 22, 23).

In *P. aeruginosa*, transcription from the *algD* promoter is affected by the products of several regulatory genes. The *algU* encoded, alternative sigma factor, which is similar to the *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*  $\sigma^E$  factor (7, 13, 19), is required for *algD* transcription (36, 41). The products of the *mucA* and *mucB* genes counteract AlgU by suppressing its function (7, 36, 37, 43). The *algR* (5) and *algB* genes (40) encode for response regulators belonging to the superfamily of two-component signal transduction elements. AlgR has been shown to bind to three sites (named RBS) within the *algD* promoter region and to activate transcription from the AlgU dependent promoter (26), therefore inactivation of *algR* abrogates alginate production (5). Another gene, *fimS* (also called *algZ*), which is located upstream of *algR* and encodes a protein involved in twitching motility (39), has been proposed to be the cognate AlgR sensor kinase, also involved in the control of alginate biosynthesis under certain conditions (44). Non-phosphorylated AlgB and AlgR response regulators were recently shown to be active as positive regulators of alginate synthesis (18).

In *A. vinelandii*, *algD* is transcribed from at least two promoters

which are recognized by RNA polymerase with two different sigma factors: p1 recognized by  $\sigma^{70}$ , and p2 recognized by the alternative  $\sigma^E$  factor (AlgU). The *algU-mucABCD* operon has been characterized (20). These genes seem to be functionally equivalent to those of *P. aeruginosa*, since inactivation of *algU* abrogated alginate production, and introduction into strain ATCC 9046 of a plasmid containing functional *mucABCD* genes abrogated transcription from the *algDp2* promoter and diminished alginate production (29). AlgU activity has been shown to be essential for encystment, independent of its role in alginate synthesis (29).

Transcription of the other two operons of the alginate biosynthetic cluster are AlgU-independent (16, 22).

Evidence for the presence of *algR* in bacteria of the Azotobacteriaceae family was previously reported (9). In this study, we report the cloning and sequence of the *A. vinelandii* *algR* gene, and show that its inactivation diminishes alginate production by 50%, but does not affect transcription of *algD*; in addition, inactivation of *algR* was shown to completely impair the encystment process.

## Materials and Methods

**Microbiological procedures.** Bacterial strains and plasmids used are listed in Table 1. Media and growth conditions were as follows: *A. vinelandii* was grown at 30°C in Burk's nitrogen-free salts supplemented with sucrose 2% (15). *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  strain was grown on LB medium (24) at 37°C. Antibiotic concentrations used ( $\mu$ g/ml) for *A. vinelandii* and *E. coli*, respectively, were: tetracycline 20 and 20;

kanamycin 5 and not used; rifampicin 20 and not used; ampicillin not used and 100; nalidixic acid 20 and not used; spectinomycin, 100 and 100.

Triparental and biparental matings were carried out as previously reported (15). *A. vinelandii* transformation was carried out as described by Bali et al. (1).

$\beta$ -galactosidase activity was measured as reported by Miller (24); one unit corresponds to 1 nM of o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside hydrolyzed per min per  $\mu$ g of protein. Protein was determined by the Lowry method (17). All measurements were done in triplicate.

Alginate production was determined as previously described (23); all determinations were done in triplicate.

Encystment induction, desiccation resistance assays as well as electron microscopy studies were carried out as previously described (2, 23).

**Nucleic acid procedures.** RNA and DNA isolation and cloning, Southern blotting, and nick translation procedures were carried out as described (35). Plasmids pCNR1 and pCNR2 (Fig. 1) were used to determine the nucleotide sequence reported in this study. DNA sequencing was done with the Taq FS DNA polymerase and fluorescent-dideoxy terminators using a cycle sequencing method. Primer extension analysis of *algR* was carried out with 50  $\mu$ g of RNA isolated from bacterial cultures grown 48 h in BS medium. Primer extension of *algD* was carried out as previously described (2) Reactions were performed with a primer extension system (Amersham) as instructed by the manufacturer. The *P. aeruginosa fimS*

probe was amplified by PCR using PAO1 chromosomal DNA as a template as well as oligonucleotides *fimS*-5' ACTCTGTCGATGCCTATCCG and *fimS*-3' TAGCGTAGACAGGTGTAGTGC.

**Construction of plasmid pSF12.** The *A. vinelandii algR* gene was cloned by PCR using plasmid pMSR1506 as a template as well as oligonucleotides *algR*-5' AAGCTTGTGCAGCTTCTTGCCGGTGATGCC and *algR*-3' AAGCTTCGACGGATTGGCGCGGATGATAGC. The resulting 1458 nt PCR product was cloned in pBluescript SK+. The resultant plasmid was used to introduce a spectinomycin resistance cassette into the vector polylinker to produce plasmid pSF12 (Fig. 1 and 2).

**Construction of ATR8, ATR9 and WIR1 strains.** The 1.5-kb *EcoRI* fragment containing the *algR* 5' end was cloned into plasmid pUC18, and the resultant plasmid pCNR1 was used to introduce into the unique *XhoI* site, either a 2.0 kb *SmaI* fragment containing a  $\Omega$ -tetracycline cassette or a  $\Omega$ -spectinomycin cassette (8). The resultant plasmids pCNR101 and pCNR102 (Fig. 1B), were unable to replicate in *A. vinelandii* and were used to introduce the *algR:Tc* mutation into strain ATCC 9046 and the *algR::Sp* mutation into strain W12. ATR8, a tetracycline resistant transformant, and WIR1, a spectinomycin resistant transformant, were selected and confirmed by Southern blot analysis to carry the *algR* mutations (Fig. 2, and data not shown for WIR1).

Plasmid pCNR2 (Fig. 1) was used to introduce the  $\Omega$ -tetracycline cassette into the unique *SphI* site located 80 nt downstream the TGA stop codon of the *algR* gene. The resultant plasmid pCNR201 (Fig. 1) was

transformed into ATCC 9046, rendering strain ATR9.

**Isolation of plasmid pMSR1507.** To isolate a pMSR1506 derivative carrying an *algR*::Sp mutation, we transferred by conjugation plasmid pMSR1506 from strain WIR1 to *E. coli*. Selection of a plasmid derivative, in which transfer of the *algR*::Sp mutation from the WIR1 chromosome to plasmid pMSR1506 had occurred by recombination, was carried out by isolating *E. coli* transconjugants resistant to tetracycline and spectinomycin. One Sp Tc transconjugant was shown by restriction analysis and Southern blotting to contain a pMSR1506 with the *algR*::Sp mutation (data not shown). This plasmid was named pMSR1507.

## Results

**Cloning and sequencing of the *A. vinelandii algR* gene.** It has been previously reported that *A. vinelandii* has DNA sequences homologous to *P. aeruginosa algR* (9). The *algR* gene was cloned from strain ATCC 9046 on the basis of its homology to the corresponding *P. aeruginosa* gene. Southern blot analysis with an internal fragment of the *P. aeruginosa algR* gene used as a probe, led to the identification of cosmid pMSR1506 carrying a 1.5 kb *EcoRI* fragment with *algR* homologous sequences. The 1.5 kb *EcoRI* and a 2.0 kb *PstI* fragment were subcloned in plasmids pUC18 and pBluescript, yielding plasmids pCNR1 and pCNR2 respectively (Fig. 1), which were used to determine the *algR* nucleotide sequence.

The *A. vinelandii algR* sequence (Accession number AF077237), codes for a 251 amino acid polypeptide sharing 79% identity with its *P. aeruginosa* counterpart. As with other response regulators that are



phosphorylated, *A. vinelandii* AlgR contains two highly conserved aspartate residues Asp<sup>8</sup> and Asp<sup>54</sup> (Fig. 3).

**The *fimS* gene is not present upstream of *algR* in *A. vinelandii*.** In *P. aeruginosa*, a 1.5 kb region located between *argH* and *algR* was recently characterized and shown to contain *fimS*, whose product is involved in twitching motility (39) (see Fig. 1). FimS has also been postulated to be the AlgR cognate sensor kinase involved in regulation of alginate production under certain conditions (44). Analysis of 1000 nt of the DNA sequence upstream of the first ATG of *algR* in *A. vinelandii* revealed the presence of *argH* but the absence of a gene homologous to *fimS* (Fig. 1). Southern blot hybridization of *EcoRI*-digested DNA from *A. vinelandii* strains AEIV and UW136, with the 1.5 kb *EcoRI* fragment containing the 3' end of *argH* and the 5' portion of *algR* as probe revealed a 1.5 kb *EcoRI* fragment (data not shown), indicating conservation of this region among different *A. vinelandii* strains. A 1054 nt fragment corresponding to *P. aeruginosa fimS*, encompassing codons for amino acids 1 to 348, did not hybridize with the *A. vinelandii* chromosome even under low stringency conditions (data not shown), suggesting the absence of an *fimS* homolog in *A. vinelandii*.

**Characterization of an *algR* mutant.** To determine whether the *algR* gene was involved in alginate regulation in *A. vinelandii*, strain ATR8 carrying an *algR*::Tc mutation was constructed as described in Methods. In contrast to *P. aeruginosa*, where *algR* mutations totally abrogate alginate production, we found that in *A. vinelandii* the *algR* mutation only

diminished alginate production by 50% (Table 2).

**AlgR is not required for *algD* transcription.** In *P. aeruginosa* AlgR activates transcription of *algD* from its AlgU dependent promoter and has been shown to bind to three sites (RBS sites) upstream of *algD* (25, 26). We determined, by primer extension, *algD* transcription in ATCC 9046 as well as in the *algR* mutant. Transcription of *algD* initiates from the two previously reported promoters, AlgU (p2) and  $\sigma^{70}$  (p1), and also from a third initiation site located 62 nt upstream the ATG start codon (Fig. 4). No consensus sequences similar to known promoters were found around the -10 and -35 region of this transcription initiation site.

We confirmed that the *algR* mutation has no effect on *algD* transcription, by comparing the  $\beta$ -galactosidase activity of strain WI12, an ATCC 9046 derivative carrying an *algD::lacZ* gene fusion, with that of WIR1, a WI12 derivative carrying the *algR::Sp* mutation. As expected, the *algR* and wild type strains presented similar  $\beta$ -galactosidase activities ( $9.9 \pm 0.1$  and  $11.4 \pm 0.9$  U/ $\mu$ g of protein, respectively) that were determined after 24 h growth in BS medium, thus confirming that *algD* transcription is not affected by the *algR* mutation.

**The *A. vinelandii* *algR* gene is functional in *P. aeruginosa*.** Cosmid pMSR1506 was transferred by conjugation into two *P. aeruginosa* *algR* mutants, FRD810 and 8852. As a positive control, we used plasmid pAD1039 carrying the *P. aeruginosa* *algR* in the same vector. Plasmid pMSR1506 partially restored alginate production to both strains (Table 3). These data imply that the *A. vinelandii* AlgR protein is functional as an

activator of the *algD* promoter in *P. aeruginosa*.

**Effect of the *algR* mutation on encystment.** We studied encystment in the *algR* mutant strain ATR8. We measured desiccation resistance of cultures induced for encystment with *n*-butanol. A reduction of more than 1000-fold in encystment frequency was observed in the *algR* mutant ATR8 (Table 2).

We tested whether the failure of strain ATR8 to encyst was caused by the 50% decrease in alginate production. Alginate production under encystment conditions was determined for ATR8 and WI12. Table 2 shows that strain ATR8 is unable to form desiccation resistant cysts despite the fact that under encysting conditions it produced similar alginate levels to the encysting strain WI12.

Electron microscopy of the cultures of the *algR* mutant induced for encystment is shown in Fig. 5. The morphology of a mature cyst as has been described elsewhere (42) is observed in the wild type strain ATCC 9046, *i.e.* the central body is surrounded by two capsule like layers, the intine and the exine. No mature cysts were seen in the *algR* mutant where the central body was surrounded by an incipient exine, and no intine layer was observed. Since the exine is the first layer to be formed, this phenotype indicates that the encystment process stopped at an early stage in the differentiation process.

To rule out the possibility that the encystment defective phenotype was caused by polarity of the *algR* mutation, strain ATR9, that carries a Sp cassette 80 nt downstream the *algR* TGA stop codon, was constructed

as described in Methods. This strain was found to encyst. (Table 2).

**Complementation of the *algR* mutation.** To confirm that the *algR* mutation caused the cyst-defective phenotype, we constructed plasmid pSF12, a pSK derivative carrying the *A. vinelandii algR* gene (Fig. 2). This plasmid, which is unable to replicate in *A. vinelandii*, was transformed into ATR8 mutant. A transformant ATR801, resistant to spectinomycin, carrying plasmid pSF12 integrated into the chromosome, was selected. Integration of the plasmid was confirmed by Southern blot analysis (Fig. 2C). Strain ATR801 produced alginate in a manner similar to the wild type ATCC 9046 and was able to encyst. Encystment of ATR801 was reduced 4 times relative to the wild-type, however in our experience differences in encystment below 10 times are not significant (Table 2).

**Transcription analysis of *algR*.** The mRNA start site for the *algR* gene was determined by primer extension (Fig. 6). A unique start site, 30 nt upstream the ATG codon, was found in strain ATCC 9046 (Fig. 6B line 3). No consensus for known bacterial promoters was found at the -10 and -35 promoter *algR* region (Fig. 6A). In contrast to *P. aeruginosa* (41), *algR* transcription is not abrogated in *algU* mutants SMU88 and UW136 (Fig. 6B, lines 1 and 2).

**Plasmid pMSR1506 suppressed encystment in strain ATCC 9046.** Plasmid pMSR1506, harboring a copy of the wild type *algR* gene, was found to reduce mucoidy and suppress encystment in wild type ATCC 9046 strain (Table 4). The reduction in alginate production by plasmid pMSR1506 could be the cause for the cyst defective phenotype. When

overexpressed, *P. aeruginosa algR* has a negative effect on alginate synthesis (6). To investigate whether the negative effect of the pMSR1506 on alginate production and encystment was due to *algR*, plasmid pMSR1507, a pMSR1506 derivative carrying an *algR::Sp* mutation, was isolated as described in Methods. This plasmid has the same effects on encystment and alginate production in ATCC 9046 (Table 4). Thus, the negative effect is not caused by *algR*.

## Discussion

In this report we have cloned and characterized the *algR* gene from *A. vinelandii*. We found a high degree of homology with the *P. aeruginosa algR* coding the response regulator AlgR which, together with AlgU, is absolutely required for activation of the alginate biosynthetic operon controlled by the *algD* promoter. AlgU is the alternative sigma factor required for transcription of *algD* in *P. aeruginosa*. In *A. vinelandii*, *algD* is transcribed from three promoters one of which, p2, is an AlgU-dependent promoter (2, 29). Our results show that in contrast to *P. aeruginosa*, the *A. vinelandii* AlgR is not required for activation of *algD* transcription from any of its promoters, including the p2 AlgU-dependent promoter. Partial complementation of *P. aeruginosa algR* mutants with the *A. vinelandii algR* gene, however, implies that *A. vinelandii* AlgR can bind the RBS sequences present upstream of the *P. aeruginosa algD* promoter and can interact with AlgU-RNA polymerase. This finding is consistent with the lack in *A. vinelandii* of sequences homologous to *P. aeruginosa* RBS (2). We propose

that a transcriptional regulator other than AlgR activates transcription of *algD* from the AlgU-dependent promoter.

In *P. aeruginosa*, transcription of *algR* is dependent on AlgU but not on AlgR (41); similarly, transcription of the *A. vinelandii* *algD* from the p2 promoter depends on AlgU, but not on AlgR; thus, there are promoters recognized by AlgU that are not activated by AlgR.

Although AlgR does not appear to be required for transcription of *algD* in *A. vinelandii*, alginate production in the *algR* mutant is reduced by 50%, implying that AlgR may exert some control on other alginate biosynthetic or regulatory genes. Our previous studies have shown that an unidentified biosynthetic or regulatory alginate gene, other than *algD*, is under control of AlgU (29). Thus, the above mentioned *alg* gene could be activated by AlgR.

The ATR8 mutant reported here has a cyst defective phenotype; encystment in ATR8 seems to stop at the step of exine organization. We previously showed that encystment is also impaired when plasmid pSMU865, carrying the *mucABCD* genes coding for negative regulators of AlgU activity, is introduced into the ATCC 9046 strain (20, 29). However, in this case, encystment proceeds a step further, since cyst structures formed by ATCC 9046/pSMU865 lack the intine layer but show a well-structured exine. Both the AlgU and AlgR proteins are essential for encystment, so it is a possibility that AlgR could activate genes involved in the encystment process whose promoters are recognized by AlgU. The putative AlgR requirement for transcription of genes involved in

encystment may facilitate the identification of such genes. Transcription of *algR* is not abrogated in the *algU* mutant strains, accordingly, the *algR* promoter does not have AlgU consensus sequences. This indicates the potential existence of another sigma factor involved in alginate and encystment control.

In *P. aeruginosa*, the *algR* gene is flanked by the *hemC* gene located immediately downstream (28) and the *fimS* gene coding for the putative cognate sensor kinase of AlgR, which is located immediately upstream of *algR* and is involved in twitching motility (39). The *argH* gene is located upstream *fimS* (Fig. 1). Our characterization of the *algR* flanking regions in *A. vinelandii* identified the *hemC* gene immediately downstream of the *algR* and the *argH* gene 230 nt upstream of the *algR* (Fig. 1). No ORFs or other recognizable features are found within these 230 nt. Thus, *fimS* was not present upstream *algR*; we also found that sequences homologous to *fimS* were not present elsewhere in the *A. vinelandii* chromosome. Type 4 fimbriae is associated with twitching motility and is found in some pathogenic bacteria (38), there is no evidence that *A. vinelandii* possesses type 4 fimbriae, therefore this may be the reason for the absence of *fimS* in this bacterium. The cognate sensor kinase of AlgR remains unidentified in *A. vinelandii*.

It was recently shown that in *P. aeruginosa*, phosphorylation of neither AlgR nor AlgB is needed for alginate production (18). Phosphorylation is essential for the activity of most RR so far studied; an exception is the non-phosphorylated RR DegU that activates the late

competence genes *comC* and *comG*, whereas phosphorylated DegU is required for the expression of genes encoding degradative enzymes (30). Similarly, it was postulated that in *P. aeruginosa*, non-phosphorylated AlgR is involved in alginate production while the phosphorylated AlgR may play a role in twitching motility (39).

Another hypothesis proposed to explain the lack of AlgR phosphorylation is that mucoid strains containing non-phosphorylated RR are not typical wild-type strains but carry mutations in the *muca* gene and synthesize high levels of AlgU. Thus, mucoid *P. aeruginosa muca* strains may have elevated levels of RR that bypass the need for phosphorylation.

Whether phosphorylation of the *A. vinelandii* AlgR is necessary for activation of its target cyst promoters remains to be investigated. Further studies will help to clarify the role of RR such as AlgR in signal transduction and its interaction with AlgU-RNA polymerase.

Finally, while trying to complement the *A. vinelandii algR* mutants with the cosmid pMSR1506, we detected an inhibition in alginate production and encystment caused by this plasmid. Inhibition of encystment could be a consequence of the reduction in alginate. However, we have previously shown that strains that produce alginate similar to ATCC 9046/pMSR1506 are able to encyst (29). We provided evidence indicating that this inhibition is not caused by *algR* itself. Thus, other loci that participate in alginate and encystment control lie in the *algR* chromosomal region.



## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant IN212096 from DGAPA-PAPIIT UNAM. C.N. wishes to thank CONACYT and PADEP-UNAM for financial support during her PhD studies. We thank Rebeca Nájera and Josefina Guzmán for technical support, and A. Chakrabarty, D.J. Wozniak, and J. Goldberg for providing the *P. aeruginosa algR* plasmid and strains.

## References

1. **Bali, A., G. Blanco, S. Hill, and C. Kennedy.** 1992. Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1711-1718.
2. **Campos, M. E., J. M. Martínez-Salazar, L. LLoret, S. Moreno, C. Núñez, G. Espín, and G. Soberón-Chávez.** 1996. Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **178**:1793-1799.
3. **Chitnis, C. E., and D. E. Ohman.** 1993. Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure. *Mol. Microbiol.* **8**:583-590.
4. **Darzins, A., and A. M. Chakrabarty.** 1984. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **159**:9-19.
5. **Deretic, V., R. Dikshit, W. M. Konyecsni, A. M. Chakrabarty, and T. K. Misra.** 1989. The *algR* gene which regulates mucoidy in *P. aeruginosa* belongs to a class of environmentally responsive genes. *J. of Bacteriol.* **171**:1278-1283.
6. **Deretic, V. and W.M. Konyecsni.** 1989. Control of mucoidy in *P. aeruginosa*: Transcriptional regulation of *algR* and identification of the second regulatory gene, *algQ*. *J. of Bacteriol.* **171**:3680-3688.
7. **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.
8. **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.
  9. **Fialho, A. M., N. A. Zielinski, W.F. Fett, A. M. Chakrabarty, and A. Berry.** 1990. Distribution of alginate gene sequences in the *Pseudomonas* rRNA homology group I-Azomonas-Azotobacter lineage of superfamily B procaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:436-443.
  10. **Gacesa, P.** 1998. Bacterial alginate biosynthesis, recent progress and future prospects. *Microbiol.* **144**:1133-1143.
  11. **Govan, J. R. W.** 1988. Alginate biosynthesis and other unusual characteristics associated with the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis, p. 67-96. *In* E. Griffiths, W. Donachie, and J. Stephen (ed.), *Bacterial infections of respiratory and gastrointestinal mucosae.* IRL Press, Oxford.
  12. **Hanahan, D.,**1983. Studies on transformation of *E. coli.* *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
  13. **Hershberger, C. D., R. W. Ye, M. R. Parsek, Z. D. Xie, and A. M. Chakrabarty.** 1995. The *algT (algU)* gene of *Pseudomonas aeruginosa*, a key regulator involved in alginate biosynthesis,

encodes an alternative  $\sigma$  factor ( $\sigma^E$ ). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:79-41.

14. **Holloway, B.W.** 1955. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* **13**:572-581.
15. **Kennedy, C., R. Gamal, R. Hummprey, J. Ramos, K. Brigle, and D. Dean.** 1986. The *nifH*, *nifM*, and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: Characterization by Tn5 mutagenesis and isolation from pLARF1 gene banks. *Mol. Gen. Genet.* **205**:318-325.
16. **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.
17. **Lowry, D., N. Rosenbrough, A. Fair, and R. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
18. **Ma, S., U. Selvaraj, D. E. Ohman, R. Quarless, D. J. Hassett, and D. J. Wozniak.** 1998. Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol* **180**:956-968.
19. **Martin, D. W., M. J. Schurr, H. Yu, and V. Deretic.** 1994. Analysis of promoters controlled by the putative sigma factor AlgU regulating conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*:

- relationship to  $\sigma^E$  and stress response. J. Bacteriol. **176**:6688-6696.
20. **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.
  21. **May, T., and A. M. Chakrabarty.** 1994. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. Trends Microbiol. **2**:151-157.
  22. **Mejía-Ruíz, H, J. Guzmán, S. Moreno, G. Soberón-Chávez, and G. Espín.** 1997. 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.
  23. **Mejía-Ruíz, H, S. Moreno, J. Guzmán, R. Nájera, R. León, G. Soberón-Chávez, and G. Espín.** 1997. Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant. FEMS Microbiol. Lett. **156**:101-106.
  24. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics, p. 431-435. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
  25. **Mohr, C. D., N. S. Hibler, and V. Deretic.** 1991. AlgR a response regulator controlling mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to the FUS sites of the *algD* promoter located unusually far upstream from the RNA start site. J. Bacteriol. **173**:5136-5143.

26. **Mohr, C. D., J. H. J. Leveau, D. P. Krieg, N. S. Hibler, and V. Deretic.** 1992. AlgR binding sites within the *algD* promoter make up a set of inverted repeats separated by a large intervening segment of DNA. *J. Bacteriol.* **174**:6624-6633.
27. **Mohr, C. D., D. W. Martin, W. N. Konyecsni, J. R. W. Govan, S. Lory, and V. Deretic.** 1990. Role of the far-upstream sites of the *algD* promoter and the *algR* and *rpoN* genes in environmental modulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **172**:6576-6580.
28. **Mohr C.D., S. K. Sonsteby, and V. Deretic.** 1994. The *Pseudomonas aeruginosa* homologs of *hemC* and *hemD* are linked to the gene encoding the regulator of mucoidy *algR*. *Mol. Gen. Genet.* **242**:177-184.
29. **Moreno, S., J. Guzmán, R. Nájera, G. Soberón-Chávez, and G. Espín.** 1998. Role of the alternative  $\sigma^E$  factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **180**:2766-2769.
30. **Msadek, T., F. Kunst, and G. Rapoport.** 1995. A signal transduction network in *Bacillus subtilis* includes the DegS DegU and ComP ComA two component systems. p447-471. *In* J. A. Hoch and T. J. Shilavy (ed). Two-component signal transduction. ASM Press. Washington, D. C.
31. **Page, W. J., and H. L. Sadoff.** 1975. Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **122**:145-151.

32. **Pindar, D. F., and C. Bucke.** 1975. The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* **152**:617-622.
33. **Rehm, H.A., Ertesvag,H., and Valla, S.** 1996. A new *A. vinelandii* mannuronan C-5 epimerase gene (*algG*) is part of an *alg* gene cluster physically organized in a manner similar to that in *P. aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **178**:5884-5889.
34. **Sadoff, H. L.** 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev.* **39**:516-539.
35. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
36. **Schurr, M. J., D. W. Martin, M. H. Mudd, and V. Deretic.** 1994. Gene cluster controlling conversion to alginate-overproducing phenotype in *Pseudomonas aeruginosa*: functional analysis in a heterologous host and role in the instability of mucoidy. *J. Bacteriol.* **176**:3375-3382.
37. **Schurr, M. J., H. Yu, J. M. Martínez-Salazar, J. C. Boucher, and V. Deretic.** 1996. Control of AlgU, a member of the  $\sigma^E$ -like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* **178**:4997-5004.
38. **Strom M.S. and S. Lory.** 1993. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**:565-596.
39. **Whitchurch, C. B., R. A. Alm, and J. S. Mattick.** 1996. The

- alginate regulator AlgR and an associated sensor FimS are required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**:9839-9843.
40. **Wozniak, D. J., and D. E. Ohman.** 1991. *Pseudomonas aeruginosa* AlgB a two component response regulator of the NtrC-family, is required for *algD* transcription. J. Bacteriol. **173**:1406-1413.
  41. **Wozniak, D. J., and D. E. Ohman.** 1994. Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes *algR*, *algB* and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by *algT*. J. Bacteriol. **176**:6007-6014.
  42. **Wyss, O., M. G. Newmann, and M. D. Socolofsky.** 1961. Development and germination of the *Azotobacter* Cyst. J. Biophys. Biochem. Cytol. **10**:555-565.
  43. **Xie, Z., C. D. Hershberger, S. Shankar, R. W. Ye, and A. M. Chakrabarty.** 1996. Sigma factor-anti-sigma factor interaction in alginate synthesis: inhibition of AlgT by MucA. J. Bacteriol. **178**:4990-4996.
  44. **Yu, H., M. Mudd, J. C. Boucher, M. J. Schurr, and V. Deretic.** 1997. Identification of the *algZ* gene upstream of the response regulator *algR* and its participation in control of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **179**:187-193.



Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this work

Strain/plasmid	Relevant characteristics	Source/reference
<i>A. vinelandii</i>		
ATCC 9046	Highly mucoid	ATCC
UW136	Natural <i>algU</i> mutant strain, nonmucoid	20
AEIV	Mucoid	Svein Valla
ATR8	ATCC 9045 with a polar <i>algR::Tc</i> mutation	This work
ATR801	ATR8 derivative, <i>algR</i> +, <i>Sp<sup>r</sup></i>	This work
ATR9	ATCC 9045 with a Tc mutation downstream <i>algR</i>	This work
SMU88	ATCC9046 with a <i>algU::Km</i> mutation	29
WI12	ATCC 9046; <i>algD-lacZ</i>	2
WIR1	WI12 with an <i>algR::Sp</i> mutation	This work
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type	14
FRD810	<i>algR::Sm<sup>r</sup></i> non-mucoid	41
8852	<i>algR</i> , non-mucoid	4
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	12
Plasmids		
pCP13	RK2-derived cosmid vector; T <sup>r</sup> K <sup>m<sup>r</sup></sup>	4

pAD1039	Cosmid containing <i>P. aeruginosa</i> DNA including <i>algR</i> , derived from pCP13. Tcr	A. Chakrabarty
pMSR1506	Cosmid containing 25 kb of <i>A. vinelandii</i> DNA including <i>algR</i> , derived from pCP13. Tcr	This work
pMSR1507	pMSR1506 derivative carrying an <i>algR::Sp</i> mutation	This work
pCNR1	pUC18 derivative carrying a 1.5 kb <i>EcoRI</i> fragment containing 5' <i>algR</i> end	This work
pCNR101	pCNR1 derivative containing an <i>algR::Tc</i> mutation	This work
pCNR102	pCNR1 derivative containing an <i>algR::Sp</i> mutation	This work
pCNR2	pBluescriptSK+ derivative carrying a 2 kb <i>PstI</i> fragment containing 3' <i>algR</i> end and <i>hemC</i>	This work
pCNR201	pCNR2 derivative containing a tetracycline cassette ligated into the unique <i>SphI</i> site located 80 nt downstream the <i>algR</i> TGA stop codon	This work
pSF12	pBluescript SK+ derivative carrying the entire <i>algR</i> gene amplified by PCR. It contains a spectinomycin cassette ligated into the polylinker	This work
pBluescriptSK+	Plasmid used for subcloning DNA to be sequenced. Apr	Stratagene
pUC18	Plasmid used for subcloning DNA to be sequenced. Apr	Stratagene

Table 2. Alginate production and encystment in different *A. vinelandii* strains

Strain	Genotype	Alginate( $\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein)		Encystment (%)
		BS <sup>a</sup>	BB <sup>b</sup>	
ATCC 9046 wild type		3612 $\pm$ 624	2648 $\pm$ 322	5.16 $\pm$ 1.7
ATR8	<i>algR::Tc</i>	1357 $\pm$ 92	920 $\pm$ 20	0.004 $\pm$ 0.002
ATR801	ATR8/ <i>algR</i> +	4171 $\pm$ 292	N.D. <sup>c</sup>	1.19 $\pm$ 0.13
ATR9	<i>algR</i> +	N.D.	N.D.	1.05 $\pm$ 0.19
W112	<i>algD::lacZ</i>	259 $\pm$ 45	1121 $\pm$ 148	5.21 $\pm$ 1.0

<sup>a</sup> Burk's medium supplemented with 2% of sucrose as carbon source.

<sup>b</sup> Burk's medium supplemented with 0.2% of *n*-butanol as carbon source.

<sup>c</sup> Not determined.

Table 3 Complementation of *P. aeruginosa algR* mutants by *A. vinelandii algR*

Strain	Genotype	Mucoidy	Alginate production <sup>a</sup> µg/mg of protein
FRD810	<i>algR</i> <sup>-</sup>	-	51.8 ± 3
FRD810/pAD1039	<i>P. a. algR</i> <sup>+</sup>	++	7607 ± 1082
FRD810/pMSR1506	<i>A. v. algR</i> <sup>+</sup>	+	648 ± 74
FRD810/pCP13	/vector	-	113 ± 24
8852	<i>algR</i> <sup>-</sup>	-	28 ± 8
8852/pAD1039	<i>P. a. algR</i> <sup>+</sup>	++	9218 ± 1400
8852/pMSR1506	<i>A. v. algR</i> <sup>+</sup>	+	1434 ± 162
8852/pCP13	/vector	-	10.3 ± 1.3

<sup>a</sup> Alginate was determined in cells grown 48 h on solid PIA medium.

Table 4. Effect of plasmid pMSR1506 on alginate production and encystment in *A. vinelandii*.

Strain	Alginate production <sup>a</sup>		Encystment (%)
	BS <sup>b</sup>	BB <sup>c</sup>	
ATCC 9046	3612 ± 624	2648 ± 322	5.6 ± 1.7
ATCC 9046/pMSR1506	440 ± 50	265 ± 25	0.003 ± 0.001
ATCC 9046/pMSR1507	215 ± 10	327 ± 35	0.002 ± 0.0008
ATCC 9046/pCP13	3070 ± 57	2141 ± 270	6.4 ± 1.3

<sup>a</sup> Alginate production expressed in µg/mg of protein.

<sup>b</sup> Burk's medium supplemented with 2% of sucrose as carbon source.

<sup>c</sup> Burk's medium supplemented with 0.2% of *n*-butanol as carbon source.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
 LIBRARY  
 1982 MAR 14 11:15 AM  
 1000 S. BURNING WOODS  
 BERKELEY, CA 94720

## Legends to figures.

**Figure 1.** (A) Comparison of the *P. aeruginosa* and *A. vinelandii* chromosomal *algR* region. (B) Physical map of the plasmids constructed in this study. Arrows indicate the direction of transcription. Antibiotic resistance cassettes are represented by inverted triangles Abbreviation: C, *Clal*; E, *EcoRI*; P, *PstI*; S, *SmaI*, Sp, *SphI*; X, *XhoI*.

**Figure 2.** (A) Insertional inactivation of the *algR* gene in *A. vinelandii* ATCC 9046. (B) integration of plasmid pSF12 into the ATR8 chromosome. (C) Southern blot hybridization of total genomic DNA digested with *EcoRI* endonuclease with plasmid pCNR1 as probe. 1, ATCC 9046; 2, ATR8; 3, ATR801.

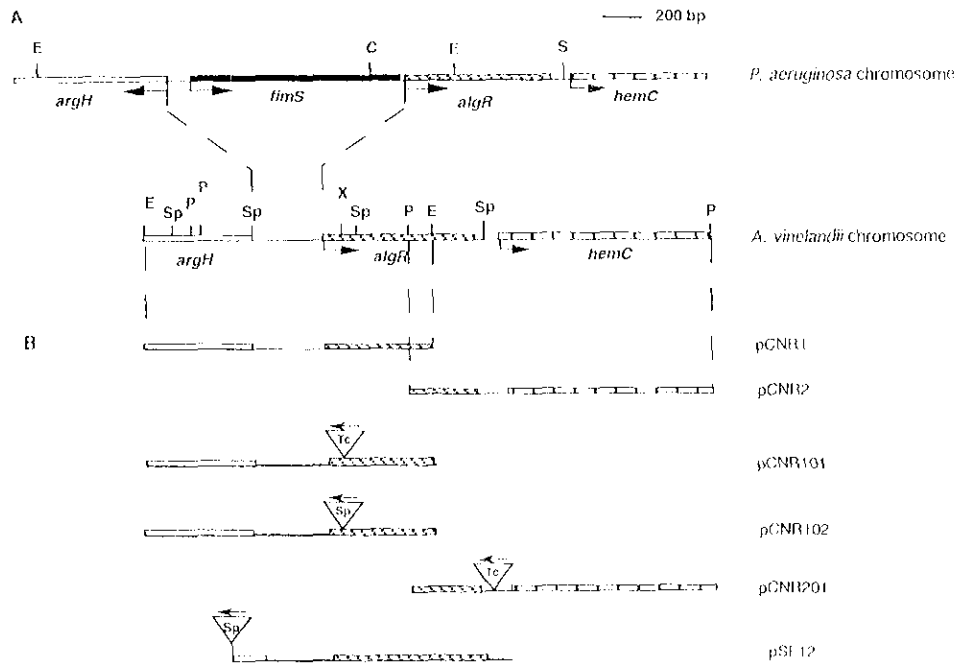
**Figure 3.** Alignment of the predicted amino acid AlgR sequence from *A. vinelandii* (A.v.) and its homolog from *P. aeruginosa* (P. a.). Identical residues are shaded and the conserved Asp<sup>8</sup> and Asp<sup>54</sup> residues are marked (\*).

**Figure 4.** Primer extension analysis of *algD* transcription in ATCC 9046 and ATR8 strains. (A) DNA sequence of the 5' end of *algD*. Arrows indicate the start sites of *algD* transcription. The ATG initiation codon is overlined. (B) Primer extension of the *algD* gene in strains ATCC 9046 ( line 1) and ATR8 ( line 2).

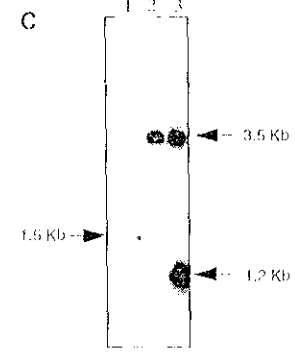
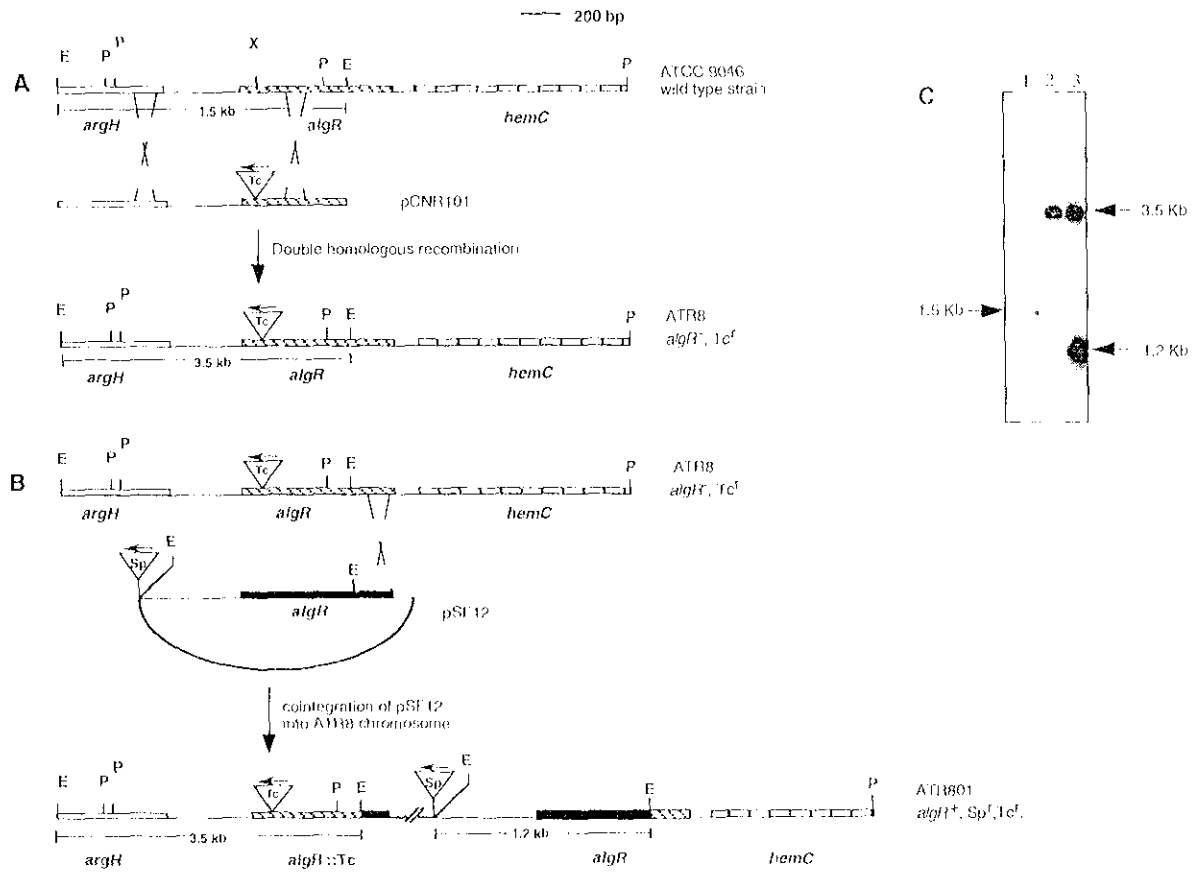
**Figure 5.** Electron micrographs of the cysts formed by strains ATCC 9046 (A) and ATR8 (B) are shown. Abbreviations: EX, exine; IN, intine; CB, central body; PHB, poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. Bars, 0.4  $\mu$ m.

**Figure 6.** Primer extension analysis of *algR* transcription in strains ATCC 9046, SMU88 and UW136. (A) DNA sequence of the 5' end of *algR*. The arrow indicates the start site of *algR* transcription. The ATG initiation codon is overlined. The complementary sequence where the oligonucleotide used for primer extension

analysis was generated, is underlined. (B) Primer extension of the *algR* gene in strains SMU88 ( line 1), UW136 ( line 2) and ATCC 9046 (line 3).







		*					
A. v.	MNVLIVDDDP	QAREHLSRLV	SELDGYRVLE	PSAGNGEEAL	TLIDSLKPD		50
P. a.	MNVLIVDDEP	LARERLARLV	QQLDGYRVLE	PSASNGEEAL	TLIDSLKPD		50
Consensus	MNVLIVDD.P	.A.E.L.RLV	.LDGYRVLE	PSA.NGEEAL	TLIDSLKPD		50
		*					
A. v.	VLLDIRMPGL	DGLQVAARLC	EREASPALIF	CTSADEFVVS	ALQNGEVGYL		100
P. a.	VLLDIRMPGL	DGLQVAARLC	EREAPPAVIF	CTADEFVALE	AFQVSAVGYL		100
Consensus	VLLDIRMPGL	DGLQVAARLC	EREA.PA.IF	CT..DEFA..	A.Q...VGYL		100
		*					
A. v.	LKPVROEPLR	EALQKAQRPT	RTQLAALTRP	PATDGNVPR	HISARTRGI		150
P. a.	VKPVRSEDLA	EALKKASREN	RVQLAALTKP	PASGGSGPRS	HISARTRGI		150
Consensus	.KPV.R.E.L.	EAL.KA.RP.	R.QLAAL.T.P	PA..G..PR.	HISARTR.GI		150
A. v.	ELVFDKAIIF	FIADHKVYTL	RHSCEVLLD	EPLKALEDEF	GRFVRIHRN		200
P. a.	ELIPIEEVIF	FIADHKVYTL	RHQGEVLLD	EPLKALEDEF	GERFVRIHRN		200
Consensus	EL.P....IF	FIADHKVYTL	RH..GEVLLD	EPLKALEDEF	G.RFVRIHRN		200
A. v.	ALVARDRIER	LQRTPLGHFQ	LVLRLGDAA	LTVSRRHVAG	VRKLMHNQLA		250
P. a.	ALVAKERIER	LQRTPLGHFQ	LYLKGLDGDA	LTVSRRHVAG	VRRLMHQL--		248
Consensus	ALVAR.RIER	LQRTPLGHFQ	LYL.GL...A	LTVSRRHVAG	VR.LMH....		250
A. v.	S						251
P. a.	-						248
Consensus	.						251



