

PsrA, RpoS y RsmA FORMAN PARTE DE UNA CASCADA DE REGULACIÓN QUE CONTROLA LA SÍNTESIS DE ALGINATO Y PHB EN *A. vinelandii*.

Miguel Cocotl¹, Soledad Moreno¹, Josefina Guzmán¹, Miguel Castañeda² y Guadalupe Espin¹. Instituto de Biotecnología, UNAM¹. Apdo. postal 510-3. Tel. (777) 329-1629. CICM, BUAP². mcy@ibt.unam.mx

Palabras clave: Regulación, alginato, PHB.

Introducción. En *Azotobacter vinelandii* el sistema de doble componente GacS/GacA regula la síntesis de alginato y de PHB de manera indirecta a través del sistema postranscripcional Rsm y de RpoS. El sistema Rsm esta formado por una proteína llamada RsmA, que se une a los sitios de unión a ribosoma evitando la traducción de los mismos, y *rsmB* el cual es un RNA no codificante que titula a RsmA antagonizando su efecto. En *A. vinelandii* uno de los promotores del gen clave en la síntesis de alginato, *algD*, y uno de los dos promotores del operón *phbBAC* son RpoS dependiente además que la traducción de los ARN mensajeros de *algD* (1) y *phbB* son controlados negativamente por RsmA. PsrA es un gen regulador que pertenece a la familia TetR el cual reconoce las secuencias palindromicas C/GAAAC N₂₋₄ GTTTG/C, en *Pseudomonas spp.* participa en la activación transcripcional del gen *rpoS* además de que regula negativamente su propia expresión. En *A. vinelandii* se encuentra un gen que presenta un 73% de identidad con *psrA*, además el gen *rpoS* presenta la secuencia palindrómica de unión a dicha proteína (2).

Metodología. La producción de alginato se cuantificó por el método espectrofotométrico del Carbazol; en tanto la acumulación de PHB se midió convirtiendo el PHB a ácido crotónico. Los qPCR se realizaron según lo reportado por Noguez *et al.*, 2008, mientras que los ensayos tipo EMSA según Kojic and Venturi, 2002.

Resultados y discusión. Por los antecedentes hipotetizamos que PsrA al igual que RpoS y RsmA participan en la regulación de la síntesis de PHB y alginato en *A. vinelandii*. Para confirmarlo se cuantifico la síntesis de los polímeros en la cepa mutada en el gen *psrA*, y se comparo con la cepa silvestre y con las cepas mutadas en los genes *rsmA* y *rpoS*. Con respecto a la síntesis de alginato, la mutante *rpoS* incrementa en casi 3 veces la producción del polímero mientras que la mutación en *rsmA* lo aumenta en un 70% comparada con su cepa padre, sin embargo, la mutante en *psrA* tiene una síntesis menor que la cepa silvestre. Con respecto a la producción de PHB, la mutante en RpoS incremento un 40% su síntesis al igual que la mutante en *rsmA* que lo hizo en un 15% mientras que la mutante en PsrA no mostró un cambio significativo con respecto a la cepa silvestre. Estos datos sugerían que PsrA podría regular de manera parcial a RpoS, por ello se cuantifico, a través de qPCR, la expresión de *rpoS* en la cepa mutada en *psrA* y se comparó con la cepa silvestre, los resultados indicaron que la expresión de *rpoS* se redujo

en un 60% comparada con la cepa padre, posteriormente se purifico la proteína PsrA y se realizaron ensayos tipo EMSA con la region promotora de *rpoS* en donde se evidenció que PsrA se une a su región promotora, lo que indica una regulación directa. Por otra parte, la similaridad del fenotipo de las mutantes en *rsmA* y de *rpoS* sugería que podría existir una relación entre ellos. A través de qPCR, se encontró que RpoS regula la expresión de RsmA, ya que su expresión se redujo hasta en un 75% en la mutante en *rpoS*, de esta forma, RpoS estaría regulando de forma positiva la expresión de la proteína represora del sistema Rsm, así pues en la mutante en *rpoS* al disminuirse el transcrito de *rsmA* provocaría un aumento en la producción de los polímeros. Posteriormente se realizó el primer extensión de RsmA que confirmo tener un promotor dependiente de RpoS. De esta forma, PsrA estaría regulando parcialmente la síntesis de alginato y PHB a través de RpoS quien a su vez regula la expresión de RsmA.

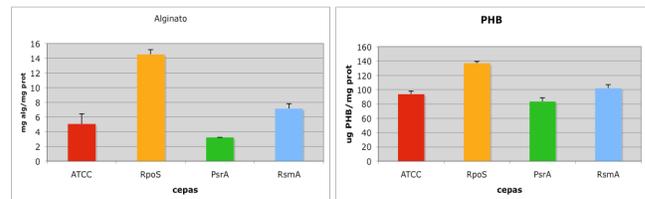


Fig. 1 Cuantificación de alginato y PHB en las mutantes *rpoS*, *rsmA* y *psrA* comparado con la cepa silvestre (ATCC).

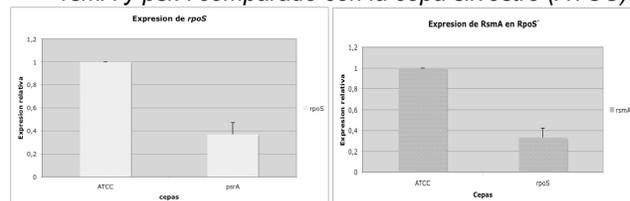


Fig. 2 Expresión relativa de *rpoS* en la mutante en *PsrA* y de *rsmA* en la mutante *RpoS*.

Conclusiones. PsrA regula parcialmente la síntesis de alginato, PHB regulando directamente la transcripción de RpoS el cual a su vez regula la expresión de RsmA de manera positiva.

Bibliografía.

- Manzo J., Sanchez E., Velazquez C., Cocotl M., Montes L. A., Goiz Y., Carreno R., Fuentes L., Nunez C., Segura D., Espin G., Castaneda M. (sometido). The GacS/A RsmA/B signal transduction pathway, involved in alginate production, controls the *algD* gene expression in *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol.
- Kojic, M., Aguilar, C., and Venturi, V. 2002. TetR family member *psrA* directly binds the *Pseudomonas rpoS* and *psrA* promoters. J Bacteriol 184: 2324 – 2330.