



REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ALGINATOS POR EL SISTEMA DE CONTROL POST-TRANSCRIPCIONAL RsmA/B EN *Azotobacter vinelandii*

Claudia Velázquez¹, Eva Sánchez¹, Miguel Cocotl¹, Luis Montes¹, Ricardo Carreño¹, Cinthia Nuñez², Guadalupe Espín² y Miguel Castañeda¹.

¹Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, micasta@siu.buap.mx

Instituto de Ciencias, BUAP, Edif. 76 3er Nivel, Ciudad Universitaria, Puebla, Pue. CP 72570, Fax: (222) 2444518.

²Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología UNAM, Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Mor. CP 62250 Fax (777) 3172388.

Palabras clave :alginatos, regulación, *Azotobacter*.

Introducción. *Azotobacter vinelandii* es una bacteria de suelo, fijadora de nitrógeno que posee un metabolismo secundario bastante versátil, entre otros metabolitos produce una familia de exopolisacáridos de interés biotecnológico e industrial conocidos genéricamente como alginatos.

GacS/A es un sistema de transducción de señales de dos componentes común en eubacterias γ , es considerado como un regulador global de metabolismo secundario. En *A. vinelandii* GacS/A regula la síntesis de alginatos controlando la transcripción del gen *algD* (1). Este gen codifica para la GDP-Manosa deshidrogenasa, una enzima clave en la síntesis del polímero. El gen *algD* genes posee una región reguladora compleja con tres promotores distintos, siendo uno de ellos σ^S dependiente. En fase estacionaria GacA es esencial para transcribir al gen *algD* a partir de sus tres promotores, el hecho anterior solo puede explicarse parcialmente por el control transcripcional que GacS/A ejerce sobre *rpoS* (σ^S). En algunas bacterias el sistema GacS/A controla a su vez a un sistema de control post-transcripcional conocido como Rsm o Csr (2). Estos sistemas están constituidos por un elemento proteico y uno o más RNA's reguladores. La proteína reguladora está codificada por el gen *rsmA* (*csrA*), los RNA's reguladores están codificados a su vez por los genes *rsmB*. RsmA se une a sus RNAs blancos de regulación bloqueando su traducción, en tanto RsmB es un RNA regulador que contrarresta la actividad de RsmA. En estudios previos encontramos e iniciamos la caracterización del sistema Rsm en *A. vinelandii*. En este trabajo presentamos resultados que hacen evidente la importancia del sistema Rsm en la síntesis de los alginatos en *A. vinelandii*.

Metodología. Las técnicas de manipulación de ácidos nucleicos, PCR, construcción de mutantes por genética reversa se llevaron a cabo por métodos convencionales descritas en la referencia (1).

Resultados y discusión. Los genes *rsmA* y *rsmB* se clonaron en un vector de amplio rango de hospedero. La sobre-expresión del gen *rsmA* disminuyó drásticamente la

producción de alginato en la cepa silvestre, en tanto el plásmido que porta al gen *rsmB* fue capaz de restaurar la síntesis de alginatos en una mutante AE IV*gacA*. El hecho anterior sugería que RsmB se encontraba río abajo de GacA en la cascada de señalización, lo cual quedó demostrado mediante el uso de una fusión transcripcional *rsmB-gusA*. Para establecer si esta regulación se da de manera directa se realizaron ensayos de pegado entre GacA con la región reguladora del gen *rsmB*. Por otra parte, se estableció la cinética transcripcional del gen *rsmB*, observando su expresión máxima en la fase estacionaria de la curva de crecimiento. En estudios similares encontramos que la expresión del gen también se ve influenciada por la fuente de carbono y por la diazotrofia. Se generaron mutantes *rsmB* en las que presentaron alteraciones en la síntesis del polímero, así como en su capacidad de para crecer en diferentes fuentes de carbono. El sistema GacS/A controla la síntesis de los alginatos regulando la expresión del gen *algD*, por lo que medimos la expresión de este gen en la mutante *rsmB*. El sistema Csr en *Escherichia coli* controla el metabolismo de carbono, por lo que en *A. vinelandii* cabe la posibilidad de que la regulación que Rsm ejerce sobre la producción de alginatos también se establezca controlando los flujos de carbono, ante esto, medimos la actividad de algunas enzimas importantes en la canalización de la fuente de carbono hacia la síntesis de los alginatos.

Conclusiones. El sistema Rsm actúa como intermediario en la regulación que GacS/A ejerce en la producción de alginatos en *A. vinelandii*.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado con fondos del proyecto SEP-CONACYT P46625-Q.

Bibliografía

1. Castañeda, M., J. Sánchez, S. Moreno, C. Nuñez and G. Espín. 2001. The global regulators GacA and σ^S form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 183:6787-6793.
2. Romeo T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* 29:1321-30