

CARACTERIZACION DEL GEN *algC* Y ESTUDIO DE SU REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN *Azotobacter vinelandii*

Gerardo Gaona^{1*}, Cinthia Núñez¹, Joanna B. Goldberg², Rebeca Nájera¹,
Josefina Guzmán¹, Guadalupe Espín¹ y Gloria Soberón-Chavez¹

¹Departamento de Microbiología Molecular. Instituto de Biotecnología, UNAM.
Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62250, México. Tel: 3-29-16-29.

²Department of Microbiology, University of Virginia. Charlottesville, VA 22908, USA.

*Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila.
Saltillo, Coahuila 25000, Tel: 4-15-53-92, Fax 4-15-95-34, E-mail: jggaona@mail.uadec.mx

Palabras Clave: *Azotobacter*, *alginato*, *fosfomanomutasa*.

Introducción. En *Azotobacter vinelandii*, existen importantes avances en el estudio de la genética molecular de la biosíntesis de alginato. 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. En *A. vinelandii* se han descrito 12 genes estructurales que participan en la vía de síntesis de alginato y están organizados en 3 operones, uno de los cuales transcribe *algD*. Todos los genes estructurales, excepto *algC*, se encuentran agrupados una misma región del cromosoma. En *A. vinelandii*, *algC* es el único gen estructural que no había sido caracterizado y constituye el objetivo del presente trabajo. La caracterización del gen *algC* y el estudio de su regulación transcripcional nos permitirá proponer un modelo más completo de regulación de la producción de alginato en *A. vinelandii*.

Metodología. Las técnicas de purificación, clonación, secuenciación e hibridación de ácidos nucleicos así como las de transformación, complementación y cuantificación de alginato y ramnolípidos se llevaron a cabo por métodos convencionales que se describen en las referencias 1 – 3.

Resultados y discusión. El gen *algC* de *A. vinelandii* se aisló rastreando un banco genómico de esta cepa usando como sonda un fragmento de 600 pb del gen *algC* de *Pseudomonas aeruginosa*. Se identificó el cósmido que contiene el gen *algC* y se subclonó un fragmento *EcoRV* de 1.2 kb que fue secuenciado. La secuencia nucleotídica obtenida muestra un 80% de identidad con su homólogo de *P. aeruginosa* que codifica para una proteína con actividad fosfomanomutasa. Se construyó una mutante *algC::gusA* usando el minitransposón Tn5SSGusA que contiene el gen reportero β -glucuronidasa. La mutación *algC::gusA* abate la producción de alginato en *A. vinelandii*, lo cual demuestra que el gen *algC* codifica para una enzima que participa directamente en la biosíntesis de alginato expresando actividad fosfomanomutasa. Para confirmar lo anterior, se transfirió el cósmido pSMC67 que contiene el gen *algC* aislado de *A. vinelandii* a la mutante *algC::gusA* y como resultado se restauró la producción de alginato. La mutante *algC::gusA* es no mucóide, no móvil, carece de flagelos y en

cultivos líquidos se observa aglutinación lo que nos sugiere que esta cepa carece de lipopolisacárido (LPS) o que la estructura de éste es defectuosa. Lo anterior fue confirmado por estudios del LPS mediante PAGE que muestran que esta cepa mutante no produce LPS al igual que la mutante *algC* de *P. aeruginosa*. Se ha reportado que en *P. aeruginosa* el gen *algC* codifica para una enzima con actividad fosfomanomutasa que además expresa actividad fosfoglucomutasa necesaria para la biosíntesis de glucosa y ramnosa empleadas en la formación del lipopolisacárido y ramnolípidos. Para determinar si AlgC de *A. vinelandii* expresa también actividad fosfoglucomutasa se transfirió el cósmido pSMC67 a la mutante *algC* AK1012 de *P. aeruginosa* PAO1. Se encontró que la cepa AK1012 complementada produjo niveles de ramnolípidos similares a la de la cepa silvestre PAO1, demostrando así que AlgC de *A. vinelandii* es capaz de generar los precursores necesarios para la biosíntesis de ramnolípidos. El análisis de la región promotora y del inicio de transcripción del gen *algC* reveló la presencia de dos inicios, uno de los cuales muestra secuencias consenso correspondientes al factor sigma E (AlgU) codificado por el gen regulador *algU*. La fusión transcripcional *algC::gusA* se transfirió a diferentes cepas mutantes de *A. vinelandii*. La expresión de *algC::gusA* en la mutante *algU* es muy baja mostrando con ello que el promotor dependiente de AlgU contribuye mayormente a la inducción de la expresión de *algC*.

Conclusiones. Demostramos que el gen *algC* de *Azotobacter vinelandii* codifica una enzima bifuncional que participa tanto en la producción de alginato como en la síntesis de lipopolisacárido, expresando actividades fosfomanomutasa y fosfoglucomutasa.

Bibliografía.

1. Núñez, C., León, R., Guzmán, J., Espín, G., Soberón-Chavez, G. (2000). Role of *Azotobacter vinelandii* *mucA* and *mucC* products in alginate production. *J. Bacteriol.* (182): 6550-6556.
2. Olvera, C., Goldberg, J. B., Sánchez, R., Soberón-Chavez, G. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene product participates in rhamnolipids biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* (179): 85-90.
3. Moreno, S., Nájera, R., Guzmán, J., Soberón-Chavez, G., Espín, G., (1998). Role of alternative sigma factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* (180): 2766-2769.