

PAPEL DE LOS REGULADORES GacA Y PhbR EN LA SÍNTESIS DEL POLIESTER POLIHIDROXIBUTIRATO EN *Azotobacter vinelandii*.

Martin Peralta, Josefina Guzmán y Guadalupe Espín

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM. Apdo. Post.510-3, Cuernavaca Morelos. C.P. 62250. Fax 0173172388. manny@ibt.unam.mx.

Palabras claves: polihidroxitirato, GacS/GacA, AraC/XylS.

Introducción: El polihidroxitirato (PHB) es un poliéster natural producido por *Azotobacter vinelandii*, el cual es utilizado por la célula como materia de reserva y energía. Este polímero es sintetizado a partir del operón biosintético *phbBAC*, río arriba se encuentra el gen divergente *phbR* que codifica para un activador transcripcional (PhbR) de la familia AraC/XylS (1). En nuestro laboratorio se ha logrado demostrar la relación del regulador de respuesta GacA en la biosíntesis de PHB y de alginato en *A. Vinelandii*. (2). Por esta razón es importante estudiar el efecto del regulador de respuesta GacA y del activador transcripcional PhbR sobre la transcripción de *phbR* y del operón *phbBAC* en *A. vinelandii*.

Metodología. Se construyó la cepa UWG en *A. vinelandii* (*gacA*-) para cuantificar el efecto de esta mutación en la producción de polihidroxitirato, en comparación con la cepa silvestre (UW136) y las mutantes DS268 (*phbR*-) y AJ2 (*phbB*-). También se determinó el efecto de la mutación *gacA*- sobre la transcripción del gene *phbB*, a través de ensayos de β -galactosidasa, utilizando una cepa con la fusión transcripcional *phbB::lacZ* (AJ2). Para confirmar los estudios anteriores, se realizaron experimentos de extensión del iniciador y de mapeo con nucleasa S1 con la finalidad de identificar los sitios de inicio de la transcripción en la región regulatoria del operón *phbBAC* y *phbR*, así como el efecto de las mutantes UWG(*gacA*-), DS268 (*phbR*-) sobre los inicios de transcripción conservados.

Resultados y Discusión: Los resultados muestran que el operón *phbBAC* se transcribe a partir de dos promotores P_{B1} y P_{B2} , reconocidos por los factores σ^S y σ^{70} , respectivamente. También logramos comprobar que el regulador de respuesta GacA controla positivamente a nivel transcripcional la síntesis de P_{B1} teniendo como intermediario al factor σ^S . Se determinó que la proteína PhbR sobrelapa es capaz de activar la transcripción del promotor P_{B1} debido a que sobrelapa su caja -35. Al igual que la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS, PhbR parece reconocer cinco posibles motivos repetidos directos de 18 pb (5'GTGTCACCAAnnnnCANTA3') en la región reguladora del operón *phbBAC*, dos de estas secuencias se encuentran sobrelapadas con el promotor P_{B2} (Fig.1). En cuanto a la transcripción de *phbR* se ha identificado la existencia de dos sitios de inicio de

transcripción (P_{R1} y P_{R2}), desapareciendo P_{R2} en una mutante *GacA*-. Un dato interesante es la presencia de un sitio de unión a PhbR sobre la región promotora -10 de P_{R2} con esta información y con la complementación de otros datos obtenidos podríamos pensar que la transcripción del operón puede seguir un modelo de activación-represión similar al que se presenta en AraC y MelR.

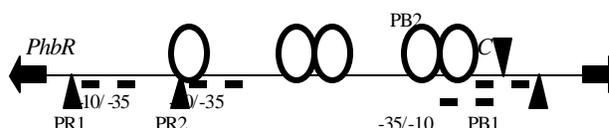


Figura 1. Región regulatoria del operón *phbBAC*. Las flechas indican los sitios de inicio de transcripción con sus promotores correspondientes y los óvalos representan los monómeros de PhbR que se unen a los posibles sitios de unión del activador transcripcional.

Conclusiones. El operón biosintético *phbBAC* se transcribe a partir de dos promotores (P_{B1} y P_{B2}) y es regulado positivamente a nivel transcripcional por el regulador de respuesta GacA, teniendo como posible intermediario el factor σ^S . PhbR reconoce posibles motivos repetidos directos en la región regulatoria del operón de 18 pb (5'GTGTCACCAAnnnnCANTA3') y aumenta la transcripción de P_{B1} , reprimiendo en una forma parcial al segundo promotor P_{B2} . Los niveles de expresión de los transcritos P_{B1} y P_{B2} en una mutante PhbR- concuerdan con la reducción de PHB en un 50%. En una mutante *GacA*- la disminución de los transcritos P_{B1} y P_{B2} corroboran la expresión nula de la actividad β -galactosidasa obtenidos en una fusión transcripcional *phbB::lacZ*.

Agradecimientos. M.P.G agradece el apoyo donado por CONACyT (Beca de Doctorado).

Bibliografía.

- (1). Gallegos, M., Schleif, R., Bairoch, Hoffmann, K., and Ramos, J. (1997). AraC/XylS Family of Transcriptional Regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 161 (4): 393-410.
- (2). Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., and Espín, G. (2000). The GacS Sensor Kinase Regulates Alginate and poly- β -Hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 182(9):2624-2628.