

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA ATPASA F₀F₁
DE “STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE” : BLANCO DE
ACCIÓN DE ANTIMICROBIANOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Antonio Javier Martín Galiano

Bajo la dirección de la Doctora:

Adela González de la Campa

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-1702-0

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA ATPasa F₀F₁
DE *Streptococcus pneumoniae*.
BLANCO DE ACCIÓN DE ANTIMICROBIANOS

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
BIOLOGÍA POR

ANTONIO JAVIER MARTÍN GALIANO

DIRECTOR:

Dra. ADELA GONZÁLEZ DE LA CAMPA

CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III

MADRID 2003

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. BIOLOGÍA DE <i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
1.1.1. Características generales de <i>S. pneumoniae</i>	2
1.1.2. Características genómicas de <i>S. pneumoniae</i>	3
1.2. IMPORTANCIA CLÍNICA DE <i>S. pneumoniae</i>	4
1.2.1. Patología de <i>S. pneumoniae</i>	4
1.2.2. Biología celular y molecular de la infección.....	6
1.2.3. Diagnóstico.....	9
1.2.4. Antibioterapia y resistencias.....	10
1.2.5. Vacunación.....	11
1.3. LAS ATPasas DE PROTONES BACTERIANAS	12
1.3.1. Las ATPasas de protones tipo F.....	12
1.3.1.1. Características y funcionamiento de las ATPasas F_0F_1	12
1.3.1.2. El operón <i>atp</i>	16
1.3.2. Comparación entre las ATPasas de tipo F y las de tipo V y A.....	18
1.4. ADAPTACIÓN DE LOS ESTREPTOCOCOS A LA ACIDIFICACIÓN DEL MEDIO	20
1.4.1. Incremento de la actividad ATPasa en respuesta a la acidificación.....	21
1.4.2. La respuesta de tolerancia al ácido.....	22
1.4.3. Respuesta cruzada a otros tipos de estrés.....	23
1.5. LOS FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS DE TIPO AMINO-ALCOHOL	24
1.5.1. El uso de la optoquina en el diagnóstico.....	24
1.5.2. Bases moleculares de la resistencia a optoquina.....	25
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS	30

3.2. MEDIOS DE CULTIVO	31
3.3. ENZIMAS Y REACTIVOS	32
3.3.1. <i>Enzimas</i>	32
3.3.2. <i>Reactivos</i>	32
3.3.2.1. <i>Compuestos antimicrobianos</i>	32
3.3.2.2. <i>Productos químicos</i>	32
3.3.2.3. <i>Productos radioactivos</i>	33
3.3.2.4. <i>Oligonucleótidos</i>	33
3.4. CULTIVO DE BACTERIAS, TRANSFORMACIÓN GENÉTICA Y PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	35
3.4.1. <i>Cultivos de bacterias</i>	35
3.4.2. <i>Transformación genética</i>	35
3.4.3. <i>Pruebas de susceptibilidad a compuestos antimicrobianos</i>	36
3.5. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DEL DNA	36
3.5.1. <i>Extracción de DNA cromosómico</i>	36
3.5.2. <i>Aislamiento y purificación de plásmidos</i>	36
3.5.3. <i>Electroforesis</i>	37
3.5.4. <i>Hibridación de DNA</i>	37
3.5.5. <i>Construcción de plásmidos</i>	37
3.6. AMPLIFICACIÓN POR PCR, DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	38
3.7. PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA	39
3.7.1. <i>Extracción de RNA total</i>	39
3.7.2. <i>Ensayo de "primer extension"</i>	39
3.7.3. <i>Hibridación de RNA: "northern blot"</i>	40
3.7.4. <i>Hibridación de RNA: "slot blot"</i>	40
3.8. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	41
3.8.1. <i>Expresión de proteínas bajo el control del promotor ϕ10 del fago T7</i>	41
3.8.2. <i>Cuantificación de la cantidad de proteína</i>	41
3.9. METODOS BIOQUÍMICOS	41

3.9.1. Preparación de extractos crudos y fracciones de membrana.....	41
3.9.2. Ensayo de actividad ATPasa.....	42
3.9.3. Ensayo de medición de actividad CAT.....	42
3.10. MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS.....	43
3.10.1. Preparación de antisuero.....	43
3.10.2. Ensayo "western blot".....	43
3.11. PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL OPERÓN <i>atp</i> DE <i>S. pneumoniae</i>.....	46
4.1.1. Clonación del operón <i>atp</i> de <i>S. pneumoniae</i> en <i>E. coli</i>	46
4.1.2. Secuenciación del operón <i>atp</i> de <i>S. pneumoniae</i>	48
4.1.3. Análisis de la secuencia de nucleótidos.....	51
4.1.3.1. Características generales.....	51
4.1.3.2. Preferencia en la utilización de codones.....	53
4.1.4. Análisis de las secuencias de aminoácidos.....	55
4.1.4.1. Cálculos de homologías.....	55
4.1.4.2. Comparación de las subunidades de <i>S. pneumoniae</i> y las de <i>E. coli</i> . Localización de estructuras secundarias y residuos implicados en estructura y función.....	56
4.1.4.2.1. Subunidad c.....	56
4.1.4.2.2. Subunidad a.....	56
4.1.4.2.3. Subunidad b.....	57
4.1.4.2.4. Subunidades del sector F_1	57
4.2. EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL OPERÓN <i>atp</i> EN <i>E.coli</i>.....	59
4.2.1. Hiperexpresión e identificación de las subunidades.....	59
4.2.2. Actividad ATPasa en cepas superproductoras.....	62
4.3. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN <i>atp</i>.....	62
4.3.1. Determinación del lugar de inicio de transcripción del operón <i>atp</i>	62
4.3.2. Determinación del tamaño del mRNA del operón <i>atp</i>	63

4.4. ACTIVACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL OPERÓN <i>atp</i> EN RESPUESTA A LA ACIDIFICACIÓN	64
4.4.1. <i>Actividad ATPasa F₀F₁</i>	64
4.4.2. <i>Cantidad de proteína</i>	66
4.4.3. <i>Niveles de mRNA</i>	67
4.4.4. <i>Actividad del promotor <i>atp</i></i>	68
4.5. RESPUESTA DE TOLERANCIA AL ÁCIDO EN <i>S. pneumoniae</i>	69
4.5.1. <i>Determinación del pH óptimo de la ATPasa de protones</i>	69
4.5.2. <i>Análisis de supervivencia tras reto a pH letal</i>	70
4.5.2.1. <i>Determinación del pH letal</i>	70
4.5.2.2. <i>Cuantificación de supervivientes a pH letal</i>	71
4.5.3. <i>Relación entre la respuesta de tolerancia al ácido y la fase de crecimiento</i>	72
4.6. ACTIVIDAD DE LA MEFLOQUINA Y COMPUESTOS RELACIONADOS SOBRE LA ATPasa F₀F₁	72
4.6.1. <i>Inhibición del crecimiento bacteriano</i>	72
4.6.2. <i>Inhibición de la actividad ATPasa</i>	74
4.6.3. <i>Caracterización de mutaciones implicadas en resistencia a mefloquina</i>	76
4.7. ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO PARA OBTENCIÓN DE MUTANTES	78
4.7.1. <i>Obtención de mutantes de resistencia mediante PCR, a partir de DNA de una cepa sensible</i>	78
4.7.2. <i>Caracterización de los mutantes</i>	80
4.8. CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS CLÍNICOS ATÍPICOS DEL GRUPO <i>viridans</i>	82
4.8.1. <i>Sensibilidad a antimaláricos</i>	82
4.8.2. <i>Análisis de la secuencia</i>	82
4.8.3. <i>Confirmación del orden génico por hibridación de DNA</i>	85
4.8.4. <i>Confirmación del orden génico por PCR</i>	86
4.8.5. <i>Confirmación de presencia en los aislados clínicos de un gen específico de estreptococos <i>viridans</i></i>	87

5. DISCUSIÓN.....	89
5.1. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL OPERÓN <i>atp</i>.....	90
5.2. HIPEREXPRESIÓN DEL OPERÓN <i>atp</i> EN <i>E. coli</i>.....	91
5.3. RESPUESTA A LA ACIDIFICACIÓN.....	92
5.3.1. <i>Incremento de la expresión de la ATPasa F₀F₁</i>	92
5.3.2. <i>Actividad del promotor del operón <i>atp</i></i>	93
5.3.3. <i>Capacidad acidúrica y respuesta de tolerancia al ácido</i>	96
5.4. MUTANTES DE RESISTENCIA A MEFLOQUINA Y NUEVOS DERIVADOS.....	98
5.4.1. <i>Actividad antimicrobiana de la mefloquina y sus derivados</i>	98
5.4.2. <i>Modelo de interacción entre las subunidades c y a en <i>S. pneumoniae</i></i>	99
5.5. AISLAMIENTO DE MUTANTES POR PCR Y TRANSFORMACIÓN.....	101
5.6. CARACTERIZACIÓN DE DOS AISLADOS CLÍNICOS DEL GRUPO VIRIDANS SENSIBLES A OPTOQUINA.....	104
6. CONCLUSIONES.....	107
7. BIBLIOGRAFÍA.....	110

ANEXO 1. ARTÍCULOS PUBLICADOS

Figura	Página
1	Fotografía al microscopio electrónico de cadenas de <i>S. pneumoniae</i> 2
2	Mapa de infección de neumococo..... 6
3	Esquema tridimensional de una ATPasa F_0F_1 14
4	Funcionamiento de una ATPasa F_0F_1 15
5	Prueba de sensibilidad a optoquina.....25
6	Mapa de restricción del operón <i>atp</i> , organización génica deducida de la secuencia de nucleótidos e insertos incluidos en los plásmidos..... 47
7	Secuencia de nucleótidos del operón <i>atp</i> de <i>S. pneumoniae</i> y secuencias polipeptídicas deducidas.....48
8	Distribución de valores CAI en el genoma de <i>S. pneumonaie</i> TIGR4.....54
9	Perfiles de hidrofobicidad de las subunidades del sector F_0 de <i>S. pneumoniae</i>59
10	Identificación de las subunidades de la ATPasa de membrana mediante tinción con azul de Coomasie.....60
11	Identificación de las subunidades de la ATPasa F_0F_1 de <i>S. pneumoniae</i> mediante marcaje radioactivo y autorradiografía, y pesos moleculares de las subunidades.....61
12	Secuencia de la región 5' del operón <i>atp</i> y determinación del punto de inicio la transcripción.....63
13	Determinación del tamaño del mRNA del operón <i>atp</i> 64
14	Actividad ATPasa en extractos crudos y comparación con la actividad en membranas en relación con el pH extracelular.....65
15	Incremento de la cantidad de subunidades α y β en respuesta a la disminución del pH del medio.....66
16	Incremento de la concentración del mRNA del operón <i>atp</i> en respuesta a la acidificación.....67
17	Incremento en la actividad del promotor <i>atp</i> dependiente de la disminución del pH extracelular68
18	Crecimiento de <i>S. pneumoniae</i> a diferentes pH.....69
19	Determinación del pH óptimo de la ATPasa F_0F_1 de <i>S. pneumoniae</i> 70
20	Determinación del pH letal de <i>S. pneumoniae</i> 71
21	Respuesta de tolerancia al ácido de <i>S. pneumoniae</i> 71
22	Relación entre la respuesta de tolerancia al ácido y la fase de crecimiento..... 72
23	Estructuras químicas de los fármacos antimaláricos y los compuestos derivados de la mefloquina utilizados en este trabajo.....73

24	Relación entre la IC ₅₀ y la CMI en cepas de <i>S. pneumoniae</i> Mfl ^R para mefloquina y fármacos relacionados.....	75
25	Relación entre la IC ₅₀ y la CMI en <i>S. pneumoniae</i> MJQ4 para mefloquina y fármacos relacionados.....	76
26	Localización de los productos de PCR utilizados para la obtención de mutantes, de las regiones secuenciadas y de las mutaciones presentes en las cepas Cip ^R , Rif ^R y Str ^R	79
27	Secuencia intergénica y genes <i>atpC</i> y <i>atpA</i> de los aislados clínicos atípicos 1162/99 y 1174/97. Comparación con R6, <i>S. mitis</i> y <i>S. oralis</i>	84
28	Hibridación con sondas de los genes <i>spr1284</i> y <i>atpCA</i>	86
29	Perfil de amplificación por PCR de R6, aislados clínicos y cepa tipo de <i>S. mitis</i>	87
30	Estructura genética de la región <i>atp</i> de <i>S. pneumoniae</i> y estreptococos viridans.....	87
31	Hibridación con la sonda del gen <i>ant</i>	88
32	Resumen de los incrementos observados en actividad ATPasa F ₀ F ₁ , cantidad de las subunidades α y β , niveles de mRNA específicos del operón <i>atp</i> y de actividad del promotor <i>atp</i> en respuesta a la acidificación	94
33	Comparación de promotores de genes activados en respuesta a pH ácido.....	95
34	Modelo espacial de la interacción entre las subunidades <i>c</i> y <i>a</i> de la ATPasa F ₀ F ₁ de <i>S. pneumoniae</i>	101

Tabla	Página
I Características de las ATPasas de protones.....	19
II Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.....	30
III Vectores plasmídicos utilizados en este trabajo.....	31
IV Plásmidos recombinantes obtenidos o utilizados en este trabajo.....	31
V Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	33
VI Tabla de referencia de valores w para codones del genoma completo y de los 52 genes de proteínas ribosómicas.....	53
VII Características de los genes del operón <i>atp</i> y relación con la estequiometría del complejo.....	55
VIII Homología entre las secuencias polipeptídicas deducidas de las subunidades de la ATPasa F_0F_1 de <i>S. pneumoniae</i> y de otras bacterias a distancia filogenética creciente.....	55
IX Residuos del sector F_0 de <i>S. pneumoniae</i> conservados en <i>E. coli</i> con función asignada.....	58
X Sensibilidad de <i>S. pneumoniae</i> a antimaláricos de tipo amino-alcohol.....	74
XI Mutaciones en <i>atpC</i> y <i>atpA</i> que confieren resistencia cruzada a antimaláricos de tipo amino-alcohol.....	77
XII Obtención de cepas resistentes por transformación con productos de PCR obtenidos a partir de DNA de una cepa sensible.....	80
XIII Características de los mutantes obtenidos por PCR.....	81
XIV Resistencia de aislados clínicos y cepas control a compuestos antimaláricos.....	82

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADP	Difosfato de adenosina
Ap ^R	Resistente a ampicilina
APS	Persulfato amónico ("ammonic persulphate")
ATP	Trifosfato de adenosina
ATR	Respuesta de tolerancia al ácido ("acid tolerance response")
BSA	Seroalbúmina bovina ("bovine seroalbumin")
C + Y	Medio con extracto de levadura
CAI	Índice de adaptación de codones ("codon adaptation index")
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
CCCP	Carbonil-cianida-m-clorofenil hidrazona
CI ₅₀	Concentración inhibitoria del 50% de la actividad
Cip	Ciprofloxacina
Cip ^R	Resistente a ciprofloxacina
Cm ^R	Resistente a cloranfenicol
CMI	Concentración mínima inhibitoria
cpm	Cuentas por minuto
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
DCCD	Di-ciclo-hexil-carbodiimida
DMSO	Dimetil-sulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DOC	Deoxicolato sódico
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato
ELISA	Ensayo de absorción inmunológica ligada a enzima (enzyme-linked immunosorbent assay)
g	Aceleración de la gravedad
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltons
M	Molar
Mfl	Mefloquina
Mfl ^R	Resistente a mefloquina
min	Minutos
Mm	Masa molecular
mM	Milimolar
Nc	Número efectivo de codones

ng	Nanogramos
nt	Nucleótidos
OD	Densidad óptica ("optical density")
Opt	Optoquina
Opt ^R	Resistente a optoquina
ORF	Marco abierto de lectura ("open reading frame")
P _i	Fosfato inorgánico
pb	Par de bases
PBS	Solución tamponadora de fosfato ("phosphate buffer solution")
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pHi	pH intracelular
pmol	picomol
Qin	Quinina
Qin ^R	Resistente a quinina
RBS	Región de unión al ribosoma ("ribosome binding site")
r ²	Coeficiente de correlación
Rif ^R	Resistente a rifampicina
SDS	Lauril sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS ("polyacrylamide gel electrophoresis")
SEM	Error estándar de la media ("standard error of the mean")
Str ^R	Resistente a estreptomicina ("streptomycin resistance")
TCA	Ácido tricloroacético ("trichloroacetic acid")
Tc ^R	Resistente a tetraciclina
TEMED	N-N-N'-N'-tetrametil-etilendiamina
THYE	Medio Todd-Hewitt con extracto de levadura
ufc	Unidad formadora de colonia
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BIOLOGÍA DE *Streptococcus pneumoniae*

1.1.1. Características generales de *S. pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae, neumococo, es una bacteria patógena oportunista que habitualmente forma parte de la flora comensal de la nasofaringe humana. Fue descubierta simultáneamente por Sternberg en Estados Unidos y Pasteur en Francia en 1881. Es una bacteria Gram-positiva con forma esférica, de 0,5 a 1,25 μm de diámetro, que crece en forma de cadenas o parejas (Fig. 1). Es oxidasa y catalasa negativo. Sus múltiples auxotrofías lo convierten en un parásito obligado con complejos requerimientos nutricionales que coinciden en gran medida con los del ser humano (Tomasz, 1964), que es su único hospedador. Por esta razón, los medios de cultivo en los que crece son ricos en vitaminas y aminoácidos. Uno de sus requerimientos específicos es la colina, presente en los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de su pared celular. El neumococo presenta α -hemólisis cuando crece en medio agar-sangre debido a la producción de neumolisina, que hidroliza la hemoglobina dando lugar a un pigmento verdoso. Sus colonias tienen típicamente forma de huso y son ligeramente umbilicadas debido a la acción de la autolisina sobre la colina de la pared celular, que causa la desintegración de la célula mediante un proceso denominado autólisis. Las colonias son blancas por la ausencia de pigmentos.

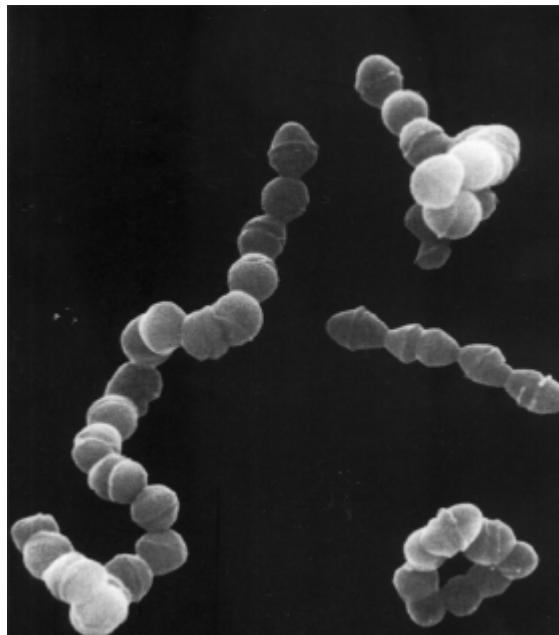


Figura 1. Fotografía al microscopio electrónico de cadenas de *S. pneumoniae*. Adaptado de ©1993, Massachusetts Medical Society. Philips, D. M. Images in clinical medicine, *Streptococcus pneumoniae*. N. Engl. J. Med., 1993; 329-427

S. pneumoniae es una bacteria que experimenta competencia natural, la cual se produce de manera transitoria durante la fase exponencial de crecimiento (Tomasz and Hotchkiss, 1964). La entrada en estado de competencia supone la activación de la síntesis de un grupo de proteínas y la inhibición de la síntesis de la mayoría que son sintetizadas habitualmente por la célula (Morrison and Baker, 1979; Rimini *et al.*, 2000). Este cambio del perfil proteico conlleva cambios fisiológicos por los que la célula adquiere nuevas propiedades, siendo la más relevante la capacidad de captar DNA exógeno e introducirlo en el cromosoma mediante recombinación homóloga. Este fenómeno permitió demostrar que el DNA era el vehículo de la herencia (Avery *et al.*, 1944).

La entrada en competencia depende de la acumulación extracelular del péptido estimulador de la competencia (Havarstein *et al.*, 1995). Este péptido, de 17 aminoácidos (aa), resulta del procesamiento y transporte del producto del gen *comC* por parte del complejo de membrana ComAB (Hui and Morrison, 1991; Pestova *et al.*, 1996). Cuando la concentración extracelular del péptido estimulador llega a cierto umbral, que varía según las propiedades del medio como son el pH (Tomasz and Mosser, 1966) y la concentración de calcio (Trombe *et al.*, 1992), el péptido activa el receptor de tipo histidina-kinasa ComD que a su vez fosforila al regulador ComE, constituyendo ambos un sistema de dos componentes (Havarstein *et al.*, 1996; Pestova *et al.*, 1996). ComE fosforilado activa la transcripción del gen *comX*, que codifica un factor sigma alternativo que dirige la transcripción de genes específicos de competencia (Lee and Morrison, 1999). Los productos de estos genes son enzimas que llevan a cabo los procesos que permiten la adquisición del DNA exógeno (captación e internalización) y la recombinación entre dicho DNA y el cromosoma. Los operones que codifican los genes específicos de competencia tienen en su promotor la secuencia consenso 5'-TACGAATA-3 (Campbell *et al.*, 1998) que es reconocida por ComX.

1.1.2. Características genómicas de *S. pneumoniae*

Aunque muchas de las características del genoma de neumococo ya se habían analizado en un estudio de un conjunto de secuencias cortas que cubría el 95% del genoma (Baltz *et al.*, 1998), se han realizado análisis más precisos como consecuencia de la reciente publicación de las secuencias genómicas completas de dos cepas de *S. pneumoniae*: TIGR4 de serotipo 4 (Tettelin *et al.*, 2001) y la cepa de laboratorio R6 derivada de un serotipo 2 (Hoskins *et al.*, 2001). También se ha secuenciado más del 90% del genoma de una cepa de serotipo 19F (Dopazo *et al.*, 2001). De estos trabajos se deduce que el cromosoma único y circular de *S. pneumoniae* tiene un tamaño ligeramente superior a 2 Mpb con un número estimado de genes que podría superar los 2.000 aunque no se conoce el número exacto por existir más de 400 marcos abiertos de lectura (ORFs) con un tamaño inferior a 100 codones que podrían no ser genes reales. El contenido en G+C es del 40% en todas las cepas

secuenciadas. Se han asignado funciones al 55–64% de los genes y aproximadamente el 20% no presenta homólogos en las bases de datos. Están ausentes muchos genes implicados en la síntesis de vitaminas, diversos cofactores, y de ciertos aminoácidos que ya se añadían empíricamente a los medios sintéticos de neumococo. Tampoco existen genes del citocromo c ni de enzimas del ciclo de Krebs, lo que está en consonancia con el metabolismo fermentativo homoláctico de esta bacteria y explica su incapacidad para sintetizar los aminoácidos que derivan de intermediarios de dicho ciclo. Es notable la presencia de muchas secuencias de inserción y transposasas que ocupan más del 3,5% del genoma, más que en ningún otro organismo con genoma secuenciado. Destaca también la presencia de gran número de secuencias cortas intercaladas en el genoma denominadas elementos RUP y BOX (en TIGR4 hay 108 elementos RUP y 127 elementos BOX), que han sido asociadas a control de transcripción, y que podría compensar la ausencia del factor de terminación de transcripción Rho (Hoskins *et al.*, 2001). Especialmente importante es la presencia de un gran número de transportadores de carbohidratos (que incluye transportadores para muchos tipos distintos de mono-, di- y polisacáridos) y de una compleja red de conversión enzimática para incorporar a todos ellos a la ruta glicolítica. A pesar de que hay relativamente pocos transportadores para cationes y aniones, sí que existen varios para el transporte de hierro y fósforo, cuya captación es importante para la patogénesis de neumococo.

1.2. IMPORTANCIA CLÍNICA DE *S. pneumoniae*

1.2.1. Patología de *S. pneumoniae*.

S. pneumoniae es uno de los patógenos humanos más importantes a escala mundial, causando una mortalidad infantil anual de 3 millones de casos (Greenwood, 1999). Es uno de los agentes etiológicos principales de neumonía lobular, meningitis, bacteriemia, otitis media y sinusitis, además de causar ocasionalmente otros síndromes como conjuntivitis, artritis séptica, osteomielitis (normalmente en vértebras), endocarditis, pericarditis y mastoiditis.

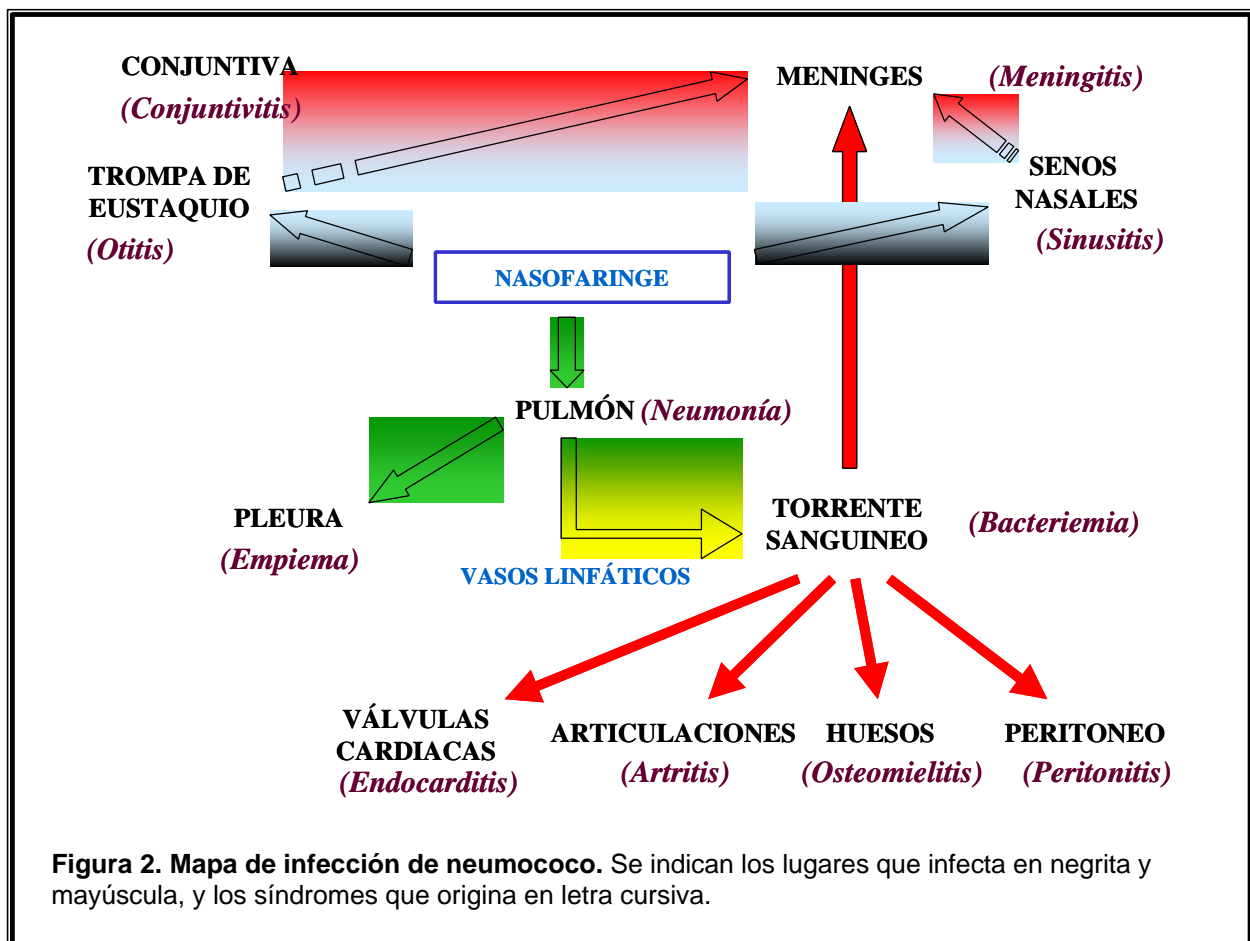
La gran mayoría de los aislados clínicos poseen cápsula, desarrollándose anticuerpos frente a ella durante la infección. Los diferentes tipos de cápsula definen a los distintos serotipos, conociéndose en la actualidad 90 (Henrichsen, 1995), existiendo una respuesta cruzada de reconocimiento del mismo antisuero frente a los aislados pertenecientes a un mismo serotipo. *S. pneumoniae* puede colonizar al individuo en su primer día de vida para pasar a formar parte de la flora comensal de su nasofaringe (Gundel and Schwarz, 1932). El porcentaje de portadores para uno o más serotipos es del 40%, siendo superior en niños y disminuyendo en personas de edad avanzada (Austrian, 1986). Aunque el número de portadores disminuye con la vacunación, éstos son especialmente importantes para el mantenimiento de cepas virulentas o resistentes a antibióticos ya que pueden ser transmitidas a individuos pertenecientes a grupos de riesgo o adquirir nuevas resistencias de

microorganismos cercanos filogenéticamente. La transmisión ocurre preferentemente a través de pequeñas gotas de saliva que se dispersan por el aire a distancias cercanas, pero suficiente para pasar de cama en cama dentro de un hospital, y a través de contacto con manos contaminadas con secreciones (Schaechter *et al.*, 1993). Después de una exposición exógena, y si hay predisposición a la enfermedad, los primeros síntomas pueden aparecer entre 24 horas y tres días (Evans and Brachman, 1991).

El grueso de los casos clínicos se produce sobre todo en las zonas templadas del planeta entre noviembre y abril, con un pico en febrero, (Gray *et al.*, 1980). Los grupos de riesgo incluyen niños (especialmente menores de 2 años), ancianos (mayores de 70 años), personas con alteraciones congénitas o adquiridas del sistema inmunológico (especialmente con defectos en la formación de anticuerpos y componentes tempranos del sistema de complemento), alcohólicos, enfermos pulmonares, cardíacos y diabéticos e individuos mal nutridos (sobre todo si conviven en aglomeraciones humanas como son los albergues de indigentes, campos militares o prisiones) (Mandell *et al.*, 1995).

Bajo determinadas circunstancias, el neumococo puede moverse desde la nasofaringe a otros nichos ecológicos (Fig. 2). Cuando su capacidad virulenta supera la capacidad defensiva del huésped puede desarrollar patologías, un fenómeno restringido generalmente en la práctica a 23 serotipos (Klugman and Feldman, 2001). Puede alcanzar los senos nasales y la trompa de Eustaquio causando sinusitis y otitis media, respectivamente, lo que es muchas veces propiciado por la acumulación de moco por una enfermedad vírica previa (generalmente gripe) o alérgica, ya que de otro modo suele producirse una eliminación inmediata del microorganismo. Si llega al pulmón puede causar neumonía lobular, una de las principales causas de mortalidad en la época pre-antibiótica y que aún mantiene un 5% de mortalidad entre los pacientes. Una complicación grave de la neumonía se produce cuando el microorganismo alcanza la pleura y comienza a dividirse, causando un síndrome denominado empiema que precisa de una terapia intensa. A través de roturas en la discontinuidad del epitelio de la nasofaringe o pulmonar puede llegar a los vasos linfáticos locales, posteriormente al conducto linfático torácico y alcanzar desde ahí el torrente sanguíneo a la altura de la vena subclavia del cuello. Una vez en la sangre existe riesgo de septicemia que puede ser fatal especialmente en individuos con pérdida de la función del bazo (Hosea *et al.*, 1981). Por el sistema circulatorio puede alcanzar diversos nichos ecológicos entre los que destacan las meninges para causar meningitis, un síndrome altamente dependiente de la reacción inflamatoria mediada por citoquinas inflamatorias como $TNF\alpha$, que también daña la barrera hematoencefálica (Sharief *et al.*, 1992). Sin embargo, también puede producirse meningitis mediante el paso directo de neumococo desde la nasofaringe a través de fracturas craneales o discontinuidades de la duramadre (Hand and Sanford, 1970). Es importante resaltar que el neumococo es el principal agente causante de meningitis en adultos excepto en las epidemias

causadas por *Neisseria meningitidis* (Luby, 1992). Otros lugares potencialmente alcanzables a través del torrente sanguíneo son el endocardio y el pericardio, las articulaciones, el peritoneo y otros tejidos blandos.



1.2.2. Biología celular y molecular de la infección

Un factor esencial para la colonización de neumococo es la adherencia, que se produce mediante proteínas denominadas adhesinas a receptores glucídicos presentes en las células epiteliales del tracto respiratorio y en el endotelio del portador (unión de tipo lectina). La capacidad de adhesión depende del hospedador, del serotipo, de la fase fenotípica (fenotipo opaco/ transparente) (Cundell *et al.*, 1995b) y de la densidad celular (Tuomanen and Masure, 1997) de la población bacteriana. Se ha demostrado que la administración de receptores solubles bloquea la adhesión y la patogenicidad (Tuomanen and Masure, 1997). El neumococo puede reconocer 5 receptores glucídicos distintos por medio de 5 adhesinas diferentes. Estos receptores son los siguientes: N-acetil-glucosamina (β 1-3) galactosa (epitelio bucal), ácido siálico-galactosa (β 1-4) N-acetil-glucosamina (epitelio bronquial y conjuntiva), N-acetil-galactosamina (β 1-4) galactosa (epitelio alveolar y endotelio vascular), N-acetil-galactosamina (β 1-3) galactosa (epitelio alveolar y endotelio vascular) y

N-acetil-glucosamina (epitelio alveolar y endotelio vascular activados). Mutantes en las enzimas piruvato oxidasa y metionin-sulfóxido reductasa tienen alterada la adhesión a los 5 tipos de receptores glucídicos. El producto de la piruvato oxidasa, el acetil-fosfato, funciona como segundo mensajero donando el grupo fosfato a sistemas de dos componentes que podrían estar involucrados en la regulación de la adhesión (Spellerberg *et al.*, 1996). La implicación de la metionin-sulfóxido reductasa se asocia con el mantenimiento de los residuos de metionina de las adhesinas en un estado reducido y así conservar su función biológica (Wizemann *et al.*, 1996).

Otro factor importante en la fase de colonización es el equilibrio existente entre los niveles de IgA del hospedador y la proteasa de la IgA1 de neumococo (Kilian *et al.*, 1996).

Durante el avance de la infección es importante la actividad de tres proteínas de neumococo: neuraminidasa, neumolisina y autolisina. La neuraminidasa corta en residuos de ácido siálico de glicoesfigolípidos, los cuales se encuentran en gran cantidad en las células epiteliales del pulmón. La neuraminidasa actuaría exponiendo receptores enmascarados por residuos de ácido siálico que son necesarios para fases posteriores de adhesión (Tuomanen and Masure, 1997). El neumococo llega al pulmón por aspiración, proceso en el que podría ser importante la capacidad de la neumolisina para detener el movimiento ciliar (Feldman *et al.*, 1990; Rayner *et al.*, 1995) que es parte de una serie de mecanismos inespecíficos (reflejo de la tos, mucosidad...) que están dañados en individuos con hábitos de vida que predisponen a la enfermedad. En el pulmón, la actividad de la autolisina genera fragmentos de pared celular que son importantes factores quimiotácticos para leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos y eosinófilos). De este modo, se genera una fuerte reacción inflamatoria que contribuye determinadamente al desarrollo de la neumonía al dificultar la respiración. La inflamación se induce, principalmente, por el antígeno C (ácidos teicoicos que incluyen colina en su composición) que reacciona con la proteína C reactiva producida por el hígado. Esta respuesta se amplifica por la acción de citoquinas inflamatorias y el sistema de complemento, lo que produce fiebre en el enfermo por el carácter pirogénico de estas moléculas. El líquido derivado de la inflamación es aprovechado por el neumococo como fuente de nutrientes y vehículo para alcanzar otras zonas del pulmón a través de los poros de Kohn de los alvéolos. El siguiente estadio de la enfermedad se caracteriza por la presencia abundante de leucocitos polimorfonucleares en la zona. En esta fase, si el sistema inmunológico es lo bastante activo, los leucocitos fagocitan a los neumococos opsonizados previamente por anticuerpos. Como resultado de esta respuesta, el pulmón adquiere un aspecto similar al del hígado, por lo que este estado se denomina estado de hepatización. El proceso de eliminación de todos los residuos derivados de la fagocitosis se lleva a cabo por los monocitos. La neumonía neumocócica no deja restos de tejido fibroso por necrosis, a diferencia de neumonías causadas

por otros microorganismos (Schaechter *et al.*, 1993). La neumolisina liberada durante la lisis, puede insertarse en la membrana de las células fagocíticas para inactivar su función (Steinfort *et al.*, 1989).

Menos del 1% de los casos de neumonía desembocan en bacteriemia, un proceso que parece ser dependiente de un estado pro-inflamatorio previo por parte del paciente, en el que cambian el tipo y número de receptores celulares en respuesta a factores como IL1, TNF y trombina. En este estado pro-inflamatorio aumenta el receptor del factor activador de plaquetas en la membrana de las células del epitelio pulmonar (Cundell *et al.*, 1995a) que está constituido por neumocitos de tipo II. La unión del neumococo a dicho receptor, probablemente vía colina (Cundell *et al.*, 1995a) presente en los ácidos teicoicos de su pared celular, y a otro receptor glucídico, promueve la internalización de un pequeño porcentaje de neumococos en una vacuola mediante endocitosis. Posteriormente, las células de neumococo se liberan en la cara opuesta del neumocito tipo II y alcanzan los vasos linfáticos en un proceso en el que podría ser importante la acción de la hialuronidasa (Paton *et al.*, 1993). Una vez en el torrente sanguíneo, el neumococo se mueve a otros tejidos. La muerte por septicemia también depende de la producción de citoquinas inflamatorias como es IL6 (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1992).

El reconocimiento del receptor del factor activador de plaquetas por parte del neumococo es también importante para atravesar la barrera hemato-encefálica y alcanzar las meninges. Una vez en el espacio subaracnoideo de las meninges, los componentes de la pared celular pueden de nuevo estimular el reclutamiento de leucocitos y generar una nueva respuesta de inflamación que promueve los síntomas característicos de la meningitis.

El neumococo atraviesa dos fases fenotípicas durante su crecimiento (opaco / transparente), las cuales son diferenciables a simple vista en medio de cultivo transparente. Estos fenotipos son consecuencia de variaciones del perfil de proteínas de superficie y de la composición glucídica de la pared celular (Weiser, 1998). El fenotipo transparente está adaptado a la colonización y presenta una mayor cantidad de ácidos teicoicos en su pared (lo que podría explicar su mayor adherencia al receptor del factor activador de plaquetas dependiente de colina) y mayor cantidad de la proteína de membrana ChoP (lo que dificultaría la invasión al facilitar su eliminación del torrente sanguíneo) a diferencia del fenotipo opaco, que está adaptado a la invasión. El cambio de fenotipo opaco a transparente podría estar regulado por la actividad de permeasas y sistemas de dos componentes de un modo dependiente de la densidad celular (Weiser, 1998).

Aunque el neumococo posee factores de virulencia proteicos que, aunque contribuyen a la infección, no son toxinas potentes. La enfermedad neumocócica está causada por el crecimiento de esta bacteria en los fluidos de los nichos ecológicos que invade interfiriendo así con la función de éstos, y a la fuerte reacción inflamatoria que genera más que a la actividad de sus toxinas (Mandell *et al.*, 1995). *S. pneumoniae* causa enfermedad cuando evita la acción

fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares, gracias a las propiedades que le confiere la cápsula. La cápsula es, por tanto, su principal factor de virulencia. Las propiedades antifagocíticas de la cápsula dependen del tamaño y sobre todo de la composición de ésta. Las teorías que explican cómo la cápsula puede impedir la fagocitosis incluyen la ausencia de receptores en los fagocitos para los polisacáridos capsulares, el enmascaramiento de los receptores de anticuerpos y complemento para evitar la opsonización, y la generación de un campo electrostático que repele a las células fagocíticas (Mandell *et al.*, 1995). La cápsula está implicada en virulencia por la protección que confiere pero no es capaz de causar ningún daño por sí misma a diferencia de los componentes de la pared celular (Paton *et al.*, 1993). Los derivados acapsulados no son capaces de desarrollar la infección y sólo representan alrededor del 2% de todos los aislados clínicos (Broome and Facklam, 1981), aunque los aislados acapsulados de la conjuntiva llegan a ser un 20% (Finland and Barnes, 1977). De los aislados de conjuntiva, aproximadamente un 40% son genéticamente diferentes a las estirpes capsuladas y el resto pueden considerarse derivados de cepas capsuladas que han perdido la cápsula (Whatmore *et al.*, 2000).

Adicionalmente, se han descubierto varios genes cuya función es trascendente para la persistencia o invasión *in vivo*. Entre éstos se encuentran *nox* (Auzat *et al.*, 1999), *sodA* (Yesilkaya *et al.*, 2000), *psaA* (Tseng *et al.*, 2002) y *spxB* (Spellerberg *et al.*, 1996) relacionados con el metabolismo oxidativo y que parecen ser importantes durante las primeras fases de la infección, en las que *S. pneumoniae* tiene contacto con zonas con alta presión parcial de oxígeno y produce peróxido de hidrógeno. Esto es importante para la competencia por la supervivencia con otros microorganismos comensales de la nasofaringe como *Haemophilus influenzae* o *N. meningitidis*, más sensibles a la presencia de peróxido de hidrógeno en el medio (Pericone *et al.*, 2000)

1.2.3. Diagnóstico

En el laboratorio clínico se usan clásicamente cuatro pruebas para el diagnóstico diferencial de *S. pneumoniae* frente a los estreptococos del grupo *viridans*: la morfología de la colonia, la sensibilidad a optoquina (Opt) (Lund, 1959), la solubilidad en bilis (Neufeld, 1900) y la aglutinación con anticuerpos dirigidos a polisacáridos de la cápsula (reacción de Quellung) (Neufeld, 1902). Algunos aislados clínicos de *S. pneumoniae* muestran reacciones anómalas a una o varias de estas pruebas (Konttinen and Sivonen, 1987; Lund, 1959; Finland and Barnes, 1977) y son clasificados como neumococos atípicos (Kellogg *et al.*, 2001). Se ha utilizado una sonda comercial específica (AccuProbe) que detecta el 16S rDNA de *S. pneumoniae* con una efectividad del 100% (Davis and Fuller, 1991; Denys and Carey, 1992), pero su uso es económicamente inviable en el diagnóstico rutinario. La efectividad del uso de la PCR para la detección de genes que codifican factores de virulencia de *S. pneumoniae*, como el de la

neumolisina (Salo *et al.*, 1995), y el de la autolisina (Pozzi *et al.*, 1989; Fenoll *et al.*, 1990), está comprometida por la existencia de estos genes en algunos estreptococos viridans (Whatmore *et al.*, 2000).

1.2.4. Antibioterapia y resistencias

El tratamiento habitual de elección es la administración de penicilina G procaína por inyección intramuscular. También puede administrarse por vía oral o intravenosa en pacientes hospitalizados. Generalmente, la respuesta al antibiótico es rápida y dejan de aislarse neumococos de esputo después de algunas horas. Los primeros neumococos resistentes a penicilina fueron mutantes obtenidos *in vitro* en los años 40 (Eriksen, 1945). Desde la aparición del primer aislado clínico resistente en 1967 (Hansman and Andrews, 1967), y el primer aislado clínico multi-resistente en 1977 (Appelbaum *et al.*, 1977), el porcentaje de aislados clínicos resistentes y multi-resistentes se ha ido incrementando. La resistencia a antibióticos de *S. pneumoniae* a pasado de ser un fenómeno ocasional a ser un problema de primera índole para la salud pública desde principios de los años 90. En países como España y Francia, hasta un 50% de los aislados son parcial o totalmente resistentes a penicilina (Pradier *et al.*, 1997; Fenoll *et al.*, 1998). Además, los aislados resistentes a penicilina suelen ser resistentes a otros antibióticos (Haglund *et al.*, 1993). Se han detectado resistencias a sulfonamidas, tetraciclina, eritromicina, lincomicina, cloranfenicol, aminoglicosidos y estreptomina en un alto porcentaje de aislados clínicos. Las resistencias aparecen en los clones que invaden típicamente a los niños (serotipos 6, 14, 19 y 23), en los que la presión selectiva por uso de antibióticos es grande ya que se ha observado una relación directa entre el nivel de consumo de antibióticos y el porcentaje de aislados resistentes (Pradier *et al.*, 1997; Granizo *et al.*, 2000). Utilizando técnicas de tipado se ha podido demostrar la gran relación que existe entre estirpes resistentes a penicilina de diferentes países, lo que indica que estas cepas pueden extenderse a escala mundial (Yoshida *et al.*, 1999). La adquisición de resistencias elevadas a los antibióticos puede producirse por transferencia horizontal de DNA desde otras especies bacterianas particularmente desde especies relacionadas filogenéticamente como los estreptococos del grupo viridans, con los que comparte nicho ecológico (Reichmann *et al.*, 1997; Janoir *et al.*, 1999; Ferrandiz *et al.*, 2000). Niveles altos de resistencia a penicilina son consecuencia del efecto acumulativo de varias mutaciones presentes en las PBPs (Shockley and Hotchkiss, 1970).

En caso de fallo del tratamiento con penicilina existen varias opciones terapéuticas como son las cefalosporinas de tercera generación y la eritromicina. Pueden administrarse cefuroxima y ceftriaxona (Dowell *et al.*, 1999). En casos de meningitis se recomienda la adición de vancomicina a una cefalosporina de tercera generación (Paradisi *et al.*, 2001). Los ketólidos, nuevos derivados de los macrólidos, como la telitromicina también se han mostrado eficaces

frente a los neumococos resistentes a la penicilina e incluso a los resistentes a macrólidos (Zhanet *et al.*, 2002). Varios estudios han demostrado la eficacia de las fluoroquinolonas, estreptograminas y oxazolidinonas contra neumococos resistentes a penicilina, aunque se acentúa el cuidado de su uso racional para que no se lleguen a alcanzar niveles elevados de resistencia a estas drogas (Appelbaum, 2002; Garau, 2002). En casos de multi-resistencia suele ser efectiva la administración de clindamicina (Giebink, 2001).

Hay muchas esperanzas depositadas en las nuevas fluoroquinolonas (levofloxacin, moxifloxacin y gatifloxacin) frente a aislados resistentes a penicilina (Paradisi *et al.*, 2001). En *S. pneumoniae*, el blanco principal de las fluoroquinolonas es la topoisomerasa IV (Muñoz and de la Campa, 1996; Fernández-Moreira *et al.*, 2000), y las mutaciones que confieren resistencia aparecen en la región denominada QRDR ("quinolone resistant determinant region"; región determinante de la resistencia a quinolonas) del gen *parC*. En cepas con elevado grado de resistencia, aparecen mutaciones adicionales en el gen que codifica la subunidad A de la DNA girasa, *gyrA* (Janoir *et al.*, 1996) (Pan *et al.*, 1996) (Tankovic *et al.*, 1996), y en el que codifica la otra subunidad de la topoisomerasa IV, *parE* (Perichon *et al.*, 1997). Cepas con mutaciones en estos genes y distintos niveles de resistencia aparecen en pacientes que han sido tratados con fluoroquinolonas frente a infecciones causadas por otros microorganismos ya que hasta ahora no se han administrado para combatir infecciones neumocócicas (de la Campa *et al.*, 2003). Por lo tanto, las resistencias pueden ser adquiridas por neumococo mientras actúa como comensal o a través de otras cepas similares que conviven con él en la nasofaringe.

1.2.5. Vacunación

El fracaso creciente de la terapia antimicrobiana frente a neumococo, debido al aumento en los niveles de resistencia, ha hecho aumentar el interés sobre la vacunación, la otra forma de control de la enfermedad neumocócica. Además, a diferencia de la vacunación, aunque los agentes antimicrobianos frente a neumococo en muchos casos consiguen tratar la enfermedad, éstos no pueden impedir su aparición. La vacunación se recomienda a personas pertenecientes a grupos de riesgo, habiéndose utilizado durante muchas décadas preparaciones de organismos muertos o de polisacáridos capsulares purificados. Desde 1983, existe una vacuna comercial que incluye 25 µg de polisacáridos capsulares de los 23 serotipos más comúnmente aislados en el transcurso de patologías, sin que se presenten reacciones adversas en un número significativo de casos (Robbins *et al.*, 1983). Sin embargo, estas vacunas no son satisfactoriamente eficaces, especialmente en el caso de ancianos y niños menores de 2 años, en los que la misma debilidad del sistema inmunológico que les predispone a la enfermedad dificulta su respuesta a la vacunación (Bentley, 1981; Sell *et al.*, 1981). La respuesta inmunológica en esos casos es aún menor por ser los polisacáridos

capsulares antígenos T–independientes (Evans and Brachman, 1991), debido a la carencia de un número necesario de linfocitos B maduros para reaccionar eficazmente (Giebink, 2001). La vacunación frente al neumococo también está dificultada por el elevado número de serotipos existentes en comparación con otros patógenos bacterianos del tracto respiratorio superior. Con el objetivo de aumentar la inmunogenicidad, se están ensayando vacunas conjugadas con distintas proteínas, y de este modo convertir la respuesta inmunológica en T–dependiente. Una estrategia similar fue seguida con éxito en la construcción de la vacuna frente a *Haemophilus influenzae* tipo b (Eskola *et al.*, 1990). La primera vacuna conjugada para neumococo, CRM197, fue autorizada en el año 2000 e incluye polisacáridos capsulares de los 7 serotipos de neumococo más virulentos, involucrados en el 80% de los casos de enfermedad neumocócica invasiva (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) junto a una variable no tóxica del toxoide de la difteria. La vacuna conjugada consigue aumentar significativamente los niveles de anticuerpos séricos protectores y disminuir tanto el porcentaje de niños portadores como los casos de otitis medias (Obaro *et al.*, 1996; Dagan *et al.*, 1996; Mbelle *et al.*, 1999). La eficacia de esta vacuna sigue estando muy lejos de los niveles exigibles por lo que serán necesarios avances en el futuro (Eskola *et al.*, 2001). Adicionalmente, la vacuna conjugada frente a estos 7 serotipos tiene el problema potencial de que puede haber intercambios horizontales de tipos capsulares además de que se puede favorecer la aparición de otros serotipos que inicialmente pudieran haber quedado eclipsados por los más patógenos (Giebink, 2001).

Después de la vacunación, y tal como ocurre en la infección, aparecen anticuerpos específicos de serotipo al sexto día. Éstos son inicialmente del tipo IgM aunque poco después predominan los de tipo IgG, alcanzándose niveles muy elevados durante 12 semanas para bajar gradualmente en un proceso que puede durar varios años, aunque la defensa es menos duradera en ancianos. Sin embargo, algunos individuos no son capaces de producir anticuerpos o sólo responden levemente. Después de la vacunación o tras una segunda infección por el mismo serotipo, aparecen niveles altos de IgG anticapsular desde el primer día. Los anticuerpos protegen, en cualquier caso, se hallan producido por el propio paciente o provengan de otras fuentes como voluntarios sanos (inmunización pasiva). Se ha inmunizado con éxito frente a más de un serotipo mediante la administración de la proteína de superficie A (PspA), una proteína aparentemente implicada en virulencia de gran variabilidad antigénica pero de función desconocida (McDaniel *et al.*, 1991). También se ha logrado conferir protección mediante inmunización con una vacuna de DNA que incluía el gen de esta proteína junto al de la proteína PsaA, que forma parte de una permeasa de manganeso (Miyaji *et al.*, 2001).

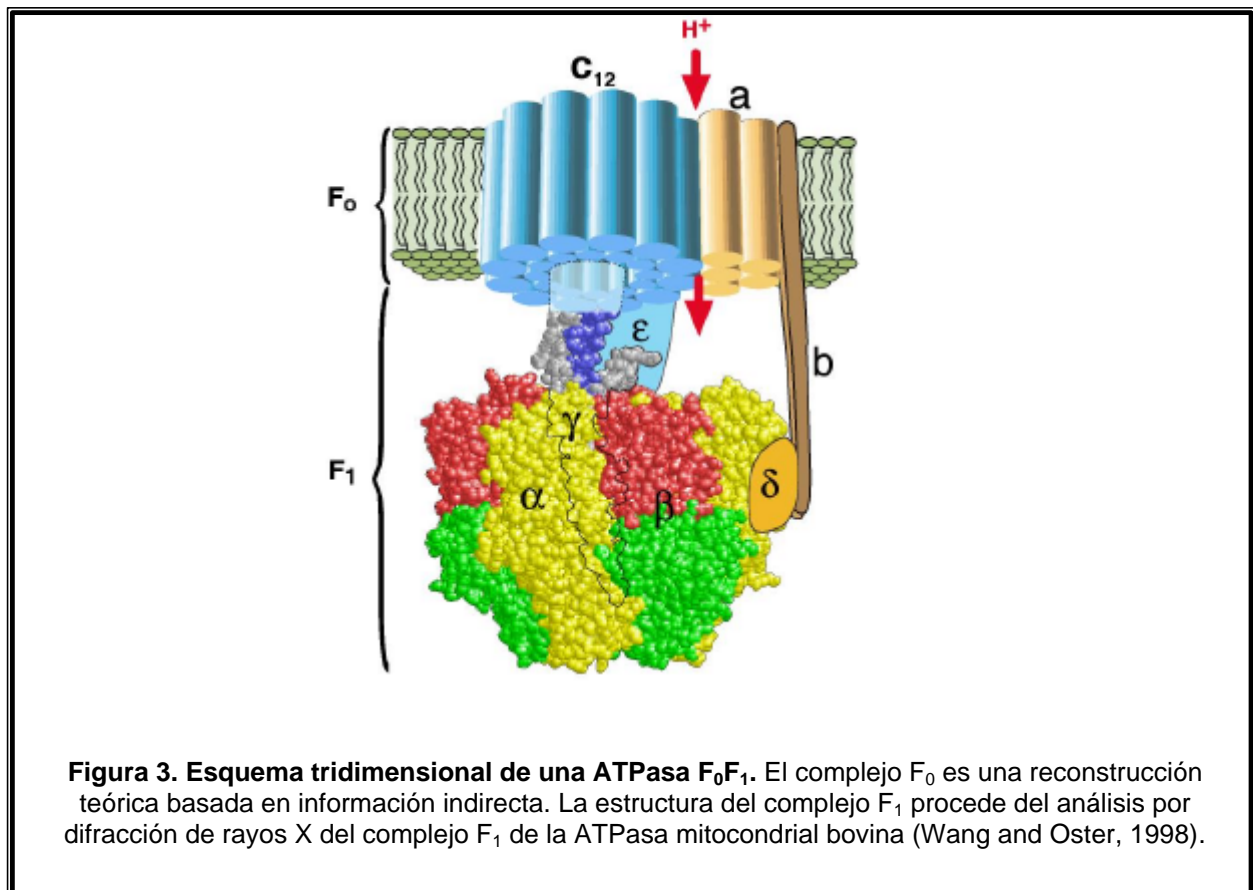
1.3. LAS ATPasas DE PROTONES BACTERIANAS

1.3.1. Las ATPasas de protones tipo F

1.3.1.1. Características y funcionamiento de las ATPasas F₀F₁

La ATPasa F_0F_1 es la enzima implicada en la generación de ATP a partir de ADP y Pi tanto en bacterias con cadena respiratoria como en mitocondrias y cloroplastos. De acuerdo con la hipótesis quimiosmótica de Peter Mitchell, en todos estos casos la oxidación de las fuentes de energía rinde productos reducidos de NAD y FAD, que ceden los electrones a una cadena de compuestos presentes en la membrana (cadena respiratoria) (Mitchell and Moyle, 1967). Los electrones se van cediendo secuencialmente entre los componentes de la cadena respiratoria con potenciales de reducción crecientes. Finalmente se obtiene una concentración de protones externa superior a la interna, lo que propicia la aparición de un gradiente electroquímico de protones. La fuerza motriz de protones es aprovechada por la ATPasa F_0F_1 para la generación de ATP, aunque en otros casos puede ser utilizada directamente en otras funciones como el transporte de solutos o el movimiento flagelar. La fuerza motriz de protones se genera a partir de la respiración en bacterias y mitocondrias, y a partir de la fotosíntesis en los cloroplastos. Los iones de sodio pueden ser utilizados en lugar de los protones bajo determinadas condiciones en algunos microorganismos como *Propionigenium modestum* (Laubinger and Dimroth, 1987) y *Acetobacterium woodii* (Heise *et al.*, 1991).

La ATPasa F_0F_1 bacteriana utilizada habitualmente como modelo es la de *Escherichia coli*. Esta enzima está compuesta por ocho subunidades con una estequiometría $a_1 c_{8-12} b_2 \delta_1 \alpha_3 \gamma_1 \beta_3 \varepsilon_1$ (Foster and Fillingame, 1982; Jiang and Fillingame, 1998; Jones *et al.*, 1998). La enzima está constituida por dos sectores con funciones y estructuras diferenciadas, F_0 (subunidades a , b y c) implicado en la translocación de protones y F_1 , (subunidades δ , α , γ , β y ε) implicado en la síntesis reversible de ATP (Fig. 3). La subunidad c , también denominada proteolípido por su elevado contenido en aminoácidos apolares, se organiza formando un oligómero dentro de F_0 . La translocación de protones produce el giro del oligómero de subunidades c que se comunica, a través de su porción citoplásmica, al complejo F_1 por medio de una serie de cambios conformacionales (Rastogi and Girvin, 1999). El cambio conformacional afecta a las subunidades ε y γ que rotan como una sola unidad haciendo girar a la cabeza del complejo F_1 compuesta por las subunidades α y β (Capaldi *et al.*, 1996). En última instancia, la energía cinética angular generada por la rotación del oligómero de subunidades c , causa la liberación de ATP (Penefsky, 1985), después de que éste se ha producido a partir de un mecanismo concertado de formación de un enlace fosfato de alta energía a partir de ADP y Pi. Este enlace está favorecido termodinámicamente, una vez que estos substratos han sido captados por la subunidad β (Grubmeyer *et al.*, 1982). Las tres subunidades β se encuentran en tres estados diferentes dependiendo del tipo de substratos unidos y su afinidad a ellos (Fig. 4). Cuando se translocan suficientes protones como para sintetizar una molécula de ATP, las tres subunidades β pasan al estado siguiente (Gresser *et al.*, 1982).



La droga DCCD (di-ciclo-hexil-carbodiimida) inhibe la actividad ATPasa al unirse covalentemente al residuo esencial que aporta el grupo carboxilo (D ó E) encargado de captar el protón, cD61 en *E. coli* (Sebald *et al.*, 1980). La unión del DCCD a una sola subunidad c es suficiente para inactivar todo el complejo (Hermolin and Fillingame, 1989). La unidad funcional de la subunidad c es el dímero, de tal modo que la cara posterior de una subunidad c interacciona con la cara frontal de otra, lo que dejaría el residuo cD61 dentro de un haz formado por cuatro α -hélices (Dmitrev *et al.*, 1999). Asimismo, las subunidades c interaccionan con la única subunidad a del complejo. La subunidad a contribuye a la formación del canal de protones aportando residuos que proporcionan cargas para la atracción y repulsión electrostáticas necesarias para el control del giro del oligómero de subunidades c. Existe un aa con carga negativa en la subunidad a, que en *E. coli* puede ser a196E ó a219E, que impide el giro de la subunidad c por repulsión frente a la también carga negativa del residuo cD61. La unión del protón al residuo cD61, supone la eliminación de esta repulsión y la libertad de giro para el oligómero (Kaim *et al.*, 1998). Se ha postulado que la función del residuo esencial y conservado de *E. coli* aR210 podría ser necesario para la liberación del protón y/o posteriores movimientos de las subunidades c frente a la subunidad a por fuerzas electrostáticas (Kaim *et al.*, 1998).

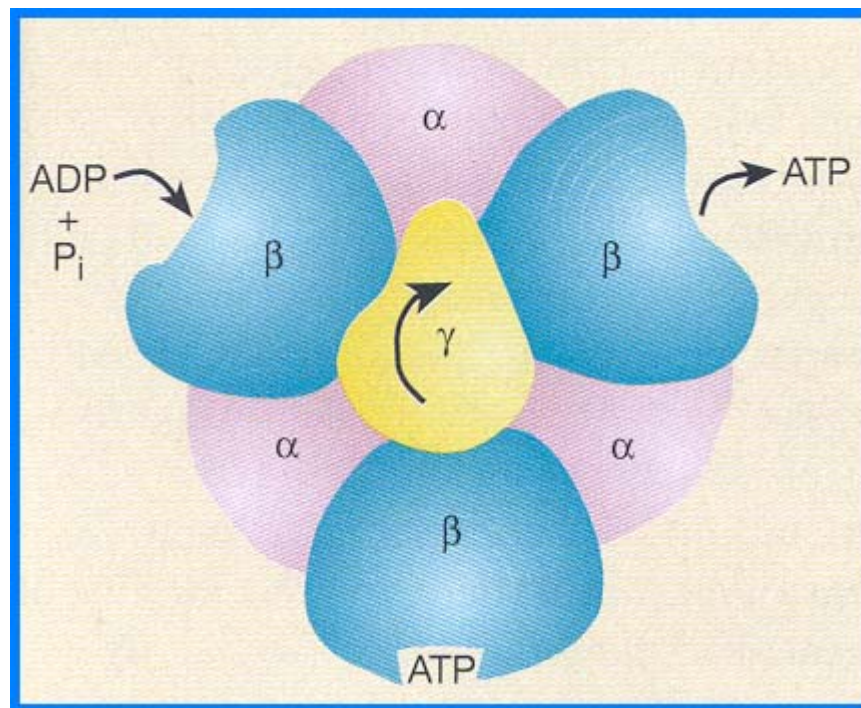


Figura 4. Funcionamiento de una ATPasa F₀F₁. Cada subunidad β se encuentra en un estado de diferente afinidad por los sustratos. Una de las subunidades se encuentra en el estado de no afinidad por el ATP, otra en el estado intermedio que une los sustratos ADP y P_i, y otra se encuentra en un estado de alta afinidad de unión a los sustratos y es en ella donde se sintetiza el ATP. La energía derivada de la fuerza motriz de protones se utiliza principalmente en la liberación de la molécula de ATP por parte de la subunidad β que pasa del estado de alta afinidad de unión al estado de no afinidad (Boyer, 1999).

Existe una fuerte dependencia entre los complejos F₀ y F₁. Se ha descrito que, aunque las subunidades de F₀ pueden ensamblarse por separado e introducirse en la membrana, necesitan de la presencia de subunidades del complejo F₁ (especialmente δ y α) para formar un poro funcional (Angov *et al.*, 1991; Brusilow, 1987; Pati and Brusilow, 1989). Una vez abierto el poro, la apertura se mantiene aunque se desligue el complejo F₁ de la membrana.

En bacterias que carecen de ciclo de Krebs y cadena respiratoria, como es el caso de *S. pneumoniae*, la principal función de la ATPasa F₀F₁ podría ser la regulación del pH intracelular en condiciones de acidificación del medio (Kobayashi *et al.*, 1984). Esta actividad precisa de gasto de ATP al expulsarse protones en contra de gradiente. En este caso, todo el proceso enzimático es inverso al que se produce durante la síntesis de ATP. La energía liberada en la hidrólisis de ATP por parte de las subunidades β es comunicada mediante cambios conformacionales a las subunidades γ y ε que a través de su giro hacen rotar el oligómero de subunidades c, lo que produce la expulsión de protones. Otra función importante de la ATPasa F₀F₁ es el mantenimiento del potencial de membrana a partir del gradiente de

protones que genera, necesario para el transporte de solutos (Kobayashi, 1985; Koebmann *et al.*, 2000) y aminoácidos como isoleucina, leucina, valina y asparragina (Trombe *et al.*, 1984).

La ATPasa F_0F_1 también está implicada en reacciones de disipación de energía que tienen como objetivo utilizar el exceso de ATP según se ha descrito en *Streptococcus bovis* (Bond and Russell, 1996), una bacteria filogenéticamente relacionada con *S. pneumoniae*. Este fenómeno está regulado por la concentración de fructosa 1, 6 difosfato bajando la K_m de la enzima por el ATP, lo que sirve para regenerar ADP en condiciones de exceso de glucosa y evitar desequilibrios en el metabolismo (Cook and Russell, 1994).

1.3.1.2. El operón *atp*

Las ATPasas F_0F_1 de bacterias están codificadas por operones. En un principio, este operón fue denominado *unc* genéricamente porque muchos de los mutantes originales de *E. coli* tenían desacoplada (en inglés, "unccoupled") la oxidación de las fuentes de energía y la fosforilación, por lo que no podían utilizar fuentes de carbono no fermentables como el succinato. Teniendo en cuenta que muchos microorganismos no tienen cadena respiratoria, es preferible denominarlo operón *atp*. Los nombres de los genes (*uncEBFHADGC*) derivan de la asignación de grupos de complementación de los mutantes *unc* originales de *E. coli* para crecer con fuentes de carbono no fermentables y no coinciden con el nombre de la subunidad que codifican. En esta tesis se han denominado los genes del mismo modo que la subunidad (*atpCAB δ α γ β ϵ*).

Se ha postulado que el orden génico juega un papel importante en el ensamblaje del complejo, pudiendo existir una relación entre la secuencia temporal de síntesis de las subunidades y los requerimientos del ensamblaje ya que las subunidades que interaccionan inicialmente se encuentran en genes contiguos (Walker, 1984). De este modo, el ensamblaje y la inserción apropiada de las subunidades del sector F_0 podría requerir interacciones entre las α -hélices de las subunidades *c*, *a* y *b* (Brusilow, 1993). Se ha postulado que ya existe conexión entre las subunidades δ y α antes de que sean liberadas del ribosoma (Dunn *et al.*, 1980), y que la síntesis secuencial de las subunidades *b* y δ puede favorecer la conexión entre F_0 y F_1 (Brusilow, 1993). En apoyo de esta hipótesis, se ha demostrado que la formación de ATPasas funcionales está favorecida si todos los genes del operón se encuentran contiguos en la misma molécula de DNA ("ensamblaje en *cis*"), sea cromosoma o plásmido, y en contraposición a cuando alguno de los genes se encuentra en un plásmido y el resto en el cromosoma ("ensamblaje en *trans*") (Fillingame and Mosher, 1986; Brusilow, 1993). Sin embargo, curiosamente, los genes de F_0 no están adyacentes a los de F_1 en cianobacterias como *Synechococcus* PCC6301 (Cozens and Walker, 1987).

En muchas bacterias existe un gen adicional denominado *atpI* cuyo producto no forma parte del complejo final. Este gen se expresa subestequiométricamente (Solomon *et al.*, 1989) y codifica una proteína de función desconocida (Walker *et al.*, 1984). Esta proteína no es esencial pero podría estar implicada en la optimización del ensamblaje del complejo, ya que los mutantes *atpI* muestran una menor cantidad de ATPasa y alteraciones en el crecimiento (Gay, 1984).

Hasta el momento, dentro del grupo de las bacterias lácticas sólo se ha conseguido obtener mutantes parciales pero no totales para la ATPasa F_0F_1 . Se han obtenido mutantes para *S. faecalis* y *S. mutans*, manteniendo en ambos casos una actividad ATPasa de membrana de aproximadamente el 50%, lo que disminuye su resistencia al ácido (Kobayashi and Unemoto, 1980; Suzuki *et al.*, 2000). Recientemente, ha podido demostrarse la esencialidad del operón *atp* tanto en *S. pneumoniae* (Ferrándiz and de la Campa, 2002) como en *Lactococcus lactis* (Koeblmann *et al.*, 2000). Sin embargo, la ATPasa F_0F_1 no es indispensable en *E. coli* ni *Bacillus subtilis* aunque su ausencia conlleva grandes cambios metabólicos, siendo los más relevantes la disminución de la tasa de crecimiento, de la relación ATP/ADP y del potencial de membrana, junto a la incapacidad para sobrevivir con fuentes de carbono no fermentables (Jensen and Michelsen, 1992; Santana *et al.*, 1994). Este fenotipo se justifica por el hecho de que el metabolismo pasa de depender de la respiración aeróbica a depender de la fermentación, lo que se traduce en un rendimiento energético mucho menor.

Un fenómeno muy estudiado en el operón *unc* de *E. coli* es el control de la traducción diferencial con el objetivo de sintetizar las distintas subunidades en cantidad proporcional a su estequiometría en el complejo. Hay que tener en cuenta que el operón se transcribe en un único mRNA. Se ha sugerido que, de no existir mecanismos que ajustaran la traducción de la estequiometría particular de cada subunidad, el gasto metabólico sería 3 veces mayor (Walker *et al.*, 1984), lo que parece improbable en bacterias de rápido crecimiento ya que están muy optimizadas metabólicamente. Este proceso se regula a nivel post-transcripcional (Brusilow, 1993) e implica cortes endonucleolíticos específicos en el mRNA (McCarthy *et al.*, 1991; Patel and Dunn, 1992) y regulación a nivel de la fase de elongación de la traducción. Este último control se basa en las diferencias en la velocidad con la que los tRNAs aportan los residuos a la cadena polipeptídica creciente. Los genes cuyo producto es necesario en grandes cantidades seleccionan aquellos codones cuyos tRNAs son más abundantes en la célula (Grosjean *et al.*, 1978; Ikemura, 1981) y evitan aquellos codones utilizados con baja frecuencia por la célula, ya que se ha demostrado en *E. coli* que retrasan la velocidad de traducción una media de 6 veces (Sorensen *et al.*, 1989). Se han desarrollado varios algoritmos para cuantificar la optimización del uso de codones en los genes. Uno de los más utilizados es la obtención del valor CAI (“codon adaptation index”; índice de adaptación de codones) en el que se compara las frecuencias de uso de codones en un gen determinado con el de un grupo de

genes expresados en gran cantidad que sirve como grupo de referencia, pudiéndose predecir de un modo aproximado la expresión de dicho gen (Sharp and Li, 1987). Adicionalmente, se ha observado que los genes que se expresan en mayor cantidad tienden a utilizar un menor número de codones diferentes (un valor conocido como número efectivo de codones) que genes de tamaño similar que se expresan en menor cantidad (Bennetzen and Hall, 1982; Wright, 1990). Se ha demostrado que este tipo de regulación también permite la adaptación a la estequiometría del complejos enzimáticos codificados por operones como es el caso del operón *unc* de *E. coli*, en el que los genes de las subunidades c , α y β , las de mayor estequiometría, muestran valores CAI más elevados, lo que se asocia a mayor velocidad de traducción (Sharp and Li, 1987).

1.3.2. Comparación entre las ATPasas de tipo F y las de tipo V y A

Existen 3 grupos de ATPasas de protones: tipos F, V y A. Las tipo F se encuentran en la membrana de las eubacterias, la membrana interna de las mitocondrias y la membrana tilacoidal de los cloroplastos, y es una de las principales pruebas de la teoría endosimbiótica para explicar la generación de células eucariotas. Las tipo V se encontraron originalmente en el sistema de endomembrana de eucariotas (vacuolas, aparato de Golgi y vesículas recubiertas), aunque también se han encontrado en eubacterias. Las ATPasas tipo A se encuentran en la membrana de las arqueobacterias. Las características de cada una de ellas y de las subunidades que las constituyen se resumen en la Tabla I. Existen algunas especies de eubacterias que poseen ATPasas con características compartidas entre el tipo V y el tipo A, como *Thermus thermophilus* (Yokoyama *et al.*, 1994) y *Streptococcus faecalis* (Takase *et al.*, 1994).

Teniendo en cuenta las secuencias de aminoácidos y el número de subunidades, las tipo V y tipo A son muy parecidas entre ellas (Iwabe *et al.*, 1989; Ihara *et al.*, 1992; Müller *et al.*, 1999), pero las de tipo F constituyen el grupo más homogéneo. Las grandes diferencias en las secuencias de las ATPasas tipo F y los otros dos tipos apoyan la idea de que se separaron en un punto temprano de la evolución, habiéndose propuesto la existencia de 2 linajes principales a partir del organismo original, el progenote. Un primer linaje estaría compuesto por las ATPasas tipo V y A, y un segundo por las ATPasas tipo F de las eubacterias actuales y de los endosimbiontes que acabaron dando lugar a las mitocondrias y cloroplastos (Gogarten *et al.*, 1989). A pesar de estas diferencias en sus secuencias, las tipo F y las tipo A son estructural y funcionalmente muy similares, según se ha comprobado tras la superposición de las estructuras cristalinas correspondientes a los complejos citoplásmicos (Hausrath *et al.*, 1999). La homología es mayor en los dominios de unión a nucleótidos, por lo que se supone que mantienen el mismo mecanismo catalítico.

Según las condiciones en las que funcionan las ATPasas tipo V *in vivo*, éstas no sintetizan ATP (Schafer *et al.*, 1999), sino que su función es la de generar un gradiente de protones a partir de hidrólisis de ATP para sacar solutos y bajar el pH de la vacuola para que puedan actuar las hidrolasas y proteasas ácidas (Mellman *et al.*, 1986). La fuerza motriz de protones generada es usada en el tráfico de ligandos, señalización, captación de nutrientes y otras actividades del sistema de endomembrana (Wieczorek *et al.*, 1999).

Tabla I. Características de las ATPasas de protones

	V-ATPasas	A-ATPasas	F-ATPasas
Localización	Endomembranas Eubacterias	Arqueobacterias	Eubacterias Mitocondrias Cloroplastos
Sector de membrana	$a_1d_1e_1c_6$	IK_x^a	$a_1c_{9-12}b_2^b$
Sector citoplásmico	$A_3B_3CDEFG_yH_z^a$	$A_3B_3CDEFGH$	$\delta\alpha_3\gamma\beta_3\varepsilon$
Tamaño proteolípido	16 KDa	Variable	8 KDa
α -hélices proteolípido	4	2,4,6	2
Hidrólisis de ATP	Irreversible	Reversible	Reversible

^a x, y, z constituyen estequiometrías desconocidas

^b El sector de membrana de mitocondrias incluye además las subunidades $\varepsilon_m\text{defgF}_6\text{IF}_1$

Las ATPasas de protones están compuestas por un sector hidrofóbico (F_0 , V_0 , A_0), constituido por tres tipos de subunidades en las del tipo F (a , c , b) y por dos subunidades en las tipo V y A (A y el proteolípido) y por un sector hidrofílico que posee los lugares catalíticos (F_1 , V_1 , A_1) constituido por un gran número de subunidades. En ocasiones, también se define un tercer sector constituido por las subunidades que unen ambos complejos y que en el caso de las ATPasas tipo F incluye a la subunidad δ y el segmento hidrofílico de la subunidad b .

El número de proteolípidos y el de residuos ácidos funcionales dentro de cada uno determina la relación entre protones translocados y moléculas de ATP sintetizadas o consumidas. Hay que tener en cuenta que en todas las ATPasas de protones existen 3 subunidades β (ó B) por complejo, en las que se sintetiza o hidroliza el ATP. La relación protones translocados por molécula de ATP (H^+/ATP) varía según el tipo de ATPasa (Cross and Taiz, 1990). En las ATPasas tipo V existen seis proteolípidos por complejo, con un tamaño de 16 KDa, constando cada proteolípido de cuatro α -hélices de membrana con un solo residuo

ácido funcional situado en la última α -hélice (Arai *et al.*, 1988). Esto supone un cociente H^+/ATP de 2 (Hilario and Gogarten, 1998). En las de tipo F, el proteolípido tiene un tamaño de 8 kDa, lo que supone la mitad de tamaño que el de las tipo V, y está presente en un número aproximado del doble (10–12 por complejo). Cada proteolípido tiene un residuo ácido y dos α -hélices, siendo el cociente H^+/ATP de aproximadamente 4. Sin embargo, existen excepciones ya que el proteolípido de la ATPasa tipo F de *Acetobacterium woodii* consta de cuatro α -hélices con un residuo ácido y un cociente H^+/ATP de 2 (Aufurth *et al.*, 2000). El oligómero en las ATPasas tipo F forma una estructura funcional similar al de las de tipo V ya que los residuos ácidos se encuentran situados dentro de la unidad funcional constituida por el dímero. Por esta razón, actualmente se acepta que el proteolípido de las ATPasas tipo V surgió como consecuencia de la duplicación y posterior fusión de un gen similar al del proteolípido de las ATPasas tipo F actuales, una hipótesis apoyada por datos estructurales (Mandel *et al.*, 1988). El proteolípido de las ATPasas tipo A es muy heterogéneo y consta de un número de dos, cuatro o seis α -hélices según la especie, existiendo un número variable de grupos ionizables por monómero (Müller *et al.*, 1999).

En los homólogos de la subunidad β existen grandes segmentos conservados entre los tres tipos de ATPasas, especialmente en los sitios catalíticos y de unión a nucleótidos, los cuales constituyen unidades funcionales definidas. Las subunidades α y β son homólogas entre ellas ya que surgieron como producto de la duplicación de un gen antes de la divergencia de las tres líneas evolutivas principales: eubacterias, arqueobacterias y eucariotas (Gogarten *et al.*, 1989). Las ATPasas de protones son eficaces marcadores evolutivos en eubacterias, y la subunidad β en concreto se ha utilizado eficazmente con este propósito (Gogarten *et al.*, 1989). Los resultados se correlacionan con los obtenidos mediante la comparación de los rRNA 16S (Amann *et al.*, 1988).

1.4. ADAPTACIÓN DE LOS ESTREPTOCOCOS A LA ACIDIFICACIÓN DEL MEDIO

Independientemente del pH del medio en el que vivan, todos los microorganismos mantienen el pH de su citoplasma cercano a la neutralidad mediante mecanismos homeostáticos que requieren energía. La energía necesaria para la homeostasis proviene de la energía de la glicolisis. Según se ha observado en *S. faecalis*, la capacidad para defenderse de un entorno ácido disminuye cuando la glicolisis se inhibe en más de un 25% (Kashket and Kashket, 1985). Las bacterias lácticas hacen disminuir el pH del medio debido a la producción y expulsión de ácido láctico consecuencia de su metabolismo y por esta razón, utilizan mecanismos activos para mantener su pH intracelular más alcalino que el extracelular. Después de la ingestión de carbohidratos, la acidificación consecuencia de la producción de

ácido láctico por parte de los estreptococos que viven en la cavidad oral supera la capacidad tamponadora de la saliva, dando lugar a fases de acidificación – neutralización.

1.4.1. Incremento de la actividad ATPasa en respuesta a acidificación

En varias bacterias lácticas, la actividad ATPasa se incrementa al disminuir el pH externo como en *S. faecalis* (Kobayashi *et al.*, 1984), *S. mutans* (Hamilton and Buckley, 1991), *Lactobacillus acidophilus* (Kullen and Klaenhammer, 1999), *L. lactis* (Koebmann *et al.*, 2000) y *S. bovis* (Miwa *et al.*, 2001). De este modo, estas bacterias pueden expulsar el exceso de protones y mantener así el pH intracelular dentro de un rango compatible con la viabilidad celular protegiendo las enzimas sensibles al pH ácido, como es el caso de las enzimas glicolíticas (Bender *et al.*, 1986). Aunque esta actividad, al precisar ATP, compromete el crecimiento (Nannen and Hutkins, 1991; Suzuki *et al.*, 1988), es tan importante evolutivamente que incluso en condiciones de ayuno las células conservan unos niveles de ATP moderadamente elevados para afrontar posibles disminuciones del pH (Greger and Eisenberg, 1985).

Se han observado aumentos en la actividad ATPasa en el rango de 3 a 4 veces en *S. faecalis* (Kobayashi *et al.*, 1984) y *S. mutans* (Hamilton and Buckley, 1991), cuando se compararon cultivos crecidos a pH moderadamente alcalino con otros crecidos por debajo de pH 6.0. El uso de protonóforos como la gramicidina D, CCCP o el fluoruro ha permitido demostrar que es el pH intracelular el inductor último de la activación de la ATPasa de protones. Los protonóforos colapsan el potencial de membrana por lo que el pH intra y extracelular se igualan (Kobayashi and Unemoto, 1980; Kashket and Kashket, 1985), lo que puede generar un incremento en la cantidad de la ATPasa que mimetiza al observado tras la acidificación del medio.

Las bacterias lácticas presentan distinto grado de resistencia a la acidez del medio, según una capacidad denominada aciduria. Existe una relación entre el pH óptimo de la ATPasa F_0F_1 y la capacidad acidúrica de una bacteria láctica (Bender *et al.*, 1986) lo que incluso condiciona el nicho ecológico que habita (Belli and Marquis, 1991). En bacterias del rumen, la capacidad acidúrica está relacionada con el rango de pH en el que puede funcionar la ATPasa F_0F_1 (Miwa *et al.*, 1997). Adicionalmente, la cantidad de esta enzima presente en la membrana también es un factor importante para determinar la capacidad acidúrica de un microorganismo (Bender and Marquis, 1987). El pH óptimo y la resistencia al ácido lo determinan las propiedades intrínsecas al sector F_0 y su interacción con otros componentes de la membrana, puesto que el pH óptimo del sector F_1 presenta sólo variaciones menores entre especies con capacidad acidúrica muy diferente (Sturr and Marquis, 1992). Las bacterias lácticas más acidúricas pueden sobrevivir a un pH más bajo manteniendo la actividad glicolítica y la integridad de su membrana porque pueden mantener su citoplasma a niveles

moderadamente neutros gracias a su ATPasa F_0F_1 más que a las propiedades de sus enzimas glicolíticas (Bunick and Kashket, 1981). Por ejemplo, las ATPasas de membrana de las bacterias lácticas más acidodúricas, como *S. mutans* o *Lactobacillus casei*, son más resistentes al ácido que las de otras bacterias lácticas menos adaptadas como *S. sanguis* (Bender *et al.*, 1986).

1.4.2. La respuesta de tolerancia al ácido

Se ha observado que varias especies bacterianas pueden sobrevivir a un pH ácido letal si previamente se han adaptado a un pH ácido sub-letal o el pH ha disminuido paulatinamente. Las células, una vez adaptadas a un bajo pH, pueden mantener esta respuesta en el tiempo, la cual ha sido denominada como respuesta de tolerancia al ácido o ATR (“acid tolerance response”), descubierta inicialmente en *Salmonella typhimurium* y *E. coli* (Foster and Hall, 1990) (Raja *et al.*, 1991). En *S. mutans*, las células adaptadas son capaces de sobrevivir a un pH externo letal porque mantienen un pH intracelular que es 0.5 unidades superior al de las no adaptadas (Svensäter *et al.*, 1997). La adaptación a pH ácido en *S. mutans* puede ocurrir en el marco de una sola generación (Belli and Marquis, 1991). Sin embargo, se necesitan unas 15 generaciones en cultivo continuo a pH alcalino para que las células de *S. mutans* adaptadas al ácido eliminen completamente dicha adaptación (Belli and Marquis, 1991). El descenso del pH interno provocado por choque ácido podría afectar la transcripción de genes específicos. Por otra parte, la ATR precisa parcialmente de síntesis proteica de novo (Svensäter *et al.*, 1997). La capacidad acidúrica de una bacteria láctica depende de la fortaleza de su respuesta de tolerancia al ácido en términos de número y cantidad de nuevas proteínas sintetizadas (Hamilton and Svensäter, 1998). Actualmente se acepta que existe una respuesta constitutiva y otra adaptativa con y sin síntesis proteica, respectivamente. La exposición de *S. mutans* al ácido supone la expresión de al menos 36 proteínas, aunque la mayoría de ellas de forma transitoria (Hamilton and Svensäter, 1998). Se ha observado en *S. faecalis* que la inhibición de la síntesis proteica *de novo* impide el incremento de la actividad ATPasa en respuesta al ácido por lo que esta enzima formaría parte de la parte inducible de la ATR (Kobayashi *et al.*, 1984).

La ATR es una respuesta compleja que incluye, además del incremento de la actividad de la ATPasa F_0F_1 descrita en el apartado anterior, mecanismos de reparación del DNA, cambios metabólicos y modificaciones en la composición de la membrana. *S. mutans* aumenta su actividad glicolítica en respuesta a la acidificación (Hamilton and Ellwood, 1978), probablemente para generar más ATP que sirve de sustrato para la ATPasa F_0F_1 (Harold, 1977). La protección del DNA también es importante ya que a pH ácido sufre un proceso de depurinación, por lo que *S. mutans* usa una endonucleasa específica para proteger su DNA de este proceso (Hahn *et al.*, 1999). Además, se induce la expresión del gen *uvrA*, implicado en la reparación por escisión (Hanna *et al.*, 2001). En *S. mutans*, el perfil de fosfolípidos de

membrana se altera a pH ácido, aumentando la proporción de ácidos grasos insaturados y los de 20 átomos de carbono frente a los de 14 y 16 átomos de carbono, lo que incrementa la impermeabilidad de la membrana a los protones (Quivey *et al.*, 2000). La bajada de pH condiciona a *S. bovis* a polarizar la fermentación a la producción de lactato, siendo esta ruta considerada menos sensible a pH ácido (Russell and Hino, 1985). *S. sanguis* usa el sistema de arginina desaminasa para la producción de amoníaco, ornitina y anhídrido carbónico a partir de arginina como parte de su respuesta de adaptación al pH ácido (Casiano-Colon and Marquis, 1988), lo que además de generar ATP, neutraliza el pH ácido por las propiedades alcalinas del amoníaco. Otra vía de protección frente al ácido, caracterizada en *Lactococcus lactis*, la constituye la enzima glutamato descarboxilasa que produce γ -aminobutirato y anhídrido carbónico a partir de glutamato y un protón (Sanders *et al.*, 1998).

Los cambios en el pH externo tienen influencia sobre muchos parámetros fisiológicos a través de variaciones en el transporte de membrana, lo que dispara numerosas señales secundarias (Olson, 1993). Aunque son desconocidos los factores transcripcionales de los que depende la ATR, se ha caracterizado un mutante de sensibilidad al ácido en *S. mutans* que tiene afectada la expresión de los genes *ylxM* y *ffh* (Gutierrez *et al.*, 1996). El gen *ylxM* está conservado en las bacterias Gram-positivas y contiene motivos de unión a DNA de tipo hélice-giro-hélice, por lo que podría estar implicado en regulación transcripcional, mientras que la función de la proteína Ffh es la traslocación de proteínas a la membrana (Phillips and Silhavy, 1992). Este doble mutante no es capaz de desarrollar la ATR, ni de incrementar la actividad ATPasa de membrana, posiblemente por deficiencias en la regulación por parte del producto del gen *ylxM* y/o deficiencias en la inserción en membrana del complejo ATPasa F₀F₁ por parte de Ffh (Gutierrez *et al.*, 1999). Además, se ha detectado un incremento en los niveles del mRNA que incluye estos 2 genes en respuesta a la acidificación (Gutierrez *et al.*, 1996).

La ATR es considerada como un factor de virulencia en el caso de bacterias como *S. typhimurium* (Foster and Hall, 1991) y *Listeria monocitogenes* (O'Driscoll *et al.*, 1996) que son sometidas a pHs muy bajos como son los del estómago o el del fagolisosoma del macrófago. También es un factor de virulencia en *S. mutans*, la principal bacteria responsable de las caries, ya que la permite sobrevivir en la placa dental cuando baja el pH por debajo de 4.0 a consecuencia de su metabolismo, lo que causa la desmineralización del esmalte (Svensater *et al.*, 1997).

1.4.3. Respuesta cruzada a otros tipos de estrés

La respuesta de adaptación a determinados tipos de estrés supone en muchos casos la adquisición de protección parcial frente a otras condiciones de estrés diferentes. Este fenómeno se basa en que estas respuestas comparten eventos comunes que se caracterizan principalmente por un aumento en la expresión de chaperonas como DnaK y GroeLS

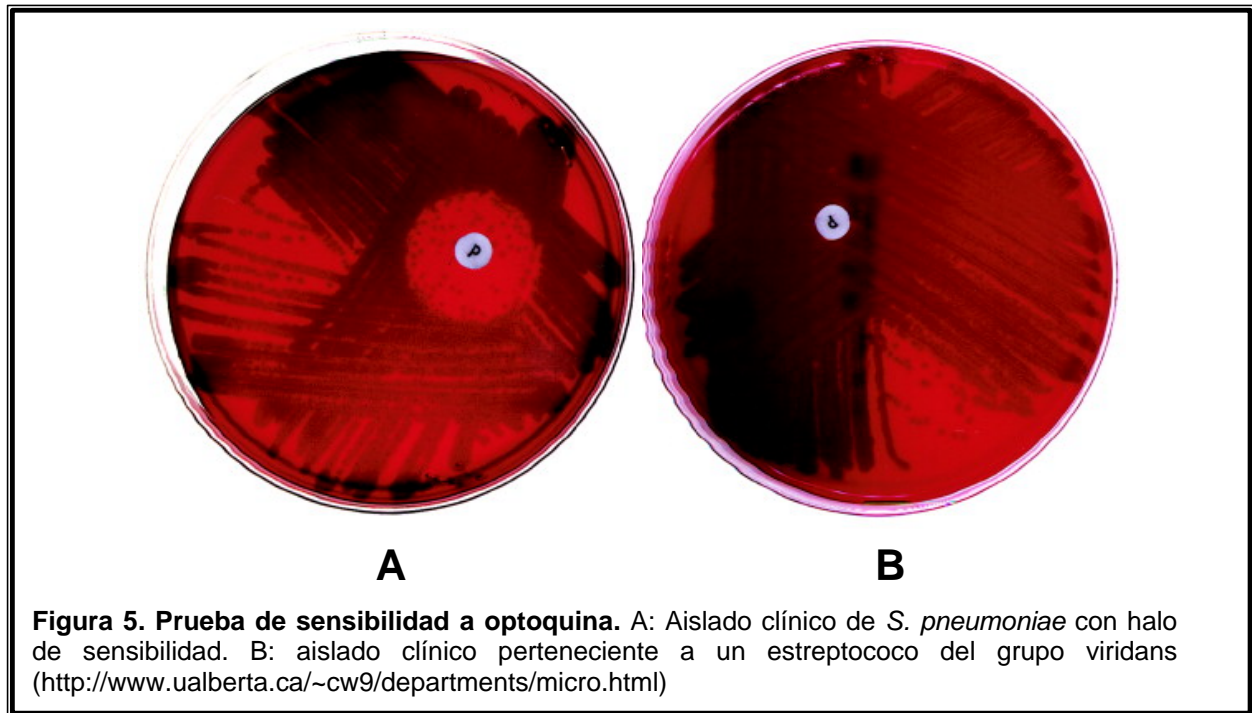
(Jayaraman *et al.*, 1997). Las chaperonas asisten a las proteínas durante su plegamiento para que éste sea correcto y protegen su estructura nativa cuando las condiciones son adversas. La expresión de los genes de las chaperonas se dirige desde promotores que presentan los denominados elementos CIRCE ("conserved inverted repeat controlling chaperone expresion"; secuencias invertidas repetidas controladoras de la expresión de chaperonas) implicados en la activación ante un grupo de condiciones comunes con diversos tipos de estrés celular (Hecker *et al.*, 1996). Por ejemplo, la exposición de *L. lactis* durante una hora a pH 5.0 protege frente a ácido, calor, oxidación, etanol, sal y radiación (de un modo independiente del gen *recA*) (O'Sullivan and Condon, 1997). Inversamente, exceptuando altas temperaturas, el sometimiento a diversos tipos de estrés no protege frente al ácido.

1.5. LOS FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS DE TIPO AMINO-ALCOHOL

1.5.1. El uso de la optoquina en el diagnóstico

La optoquina (Opt), químicamente etil-hidrocupreína, se usó a principios del siglo XX como agente terapéutico frente a *S. pneumoniae* pero debido a efectos secundarios graves en algunos pacientes como era la pérdida de visión hicieron desestimar su uso (Moore and Chesney, 1917). Su utilidad está restringida a prueba de diagnóstico, aunque no se comenzó a utilizar como tal hasta 1959, cuando Lund demostró que la prueba de sensibilidad a Opt era más fiable para la identificación de *S. pneumoniae* que la prueba de solubilidad en bilis (Lund, 1959). Las cepas que muestran un área de inhibición mayor de 14 mm alrededor de un disco de 6 mm de diámetro impregnado con 5 µg de Opt son clasificadas como *S. pneumoniae* (Fig. 5). Si la zona de inhibición es menor de 14 mm se recurre a otras pruebas como es la solubilidad en bilis. En el caso de que no exista inhibición, el aislado se identifica como estreptococo del grupo viridans, sin más pruebas complementarias (Mundy *et al.*, 1998).

El primer informe alertando sobre la existencia de aislado clínicos de neumococo resistentes a Opt (Opt^R) se remonta a 1987 (Kontinen and Sivonen, 1987). Otros estudios posteriores han detectado neumococos Opt^R (Phillips *et al.*, 1988; Muñoz *et al.*, 1990; Pikis *et al.*, 1997; Borek *et al.*, 1997). También se ha detectado la presencia de poblaciones mixtas de aislados sensibles y Opt^R en el mismo paciente (Tsai *et al.*, 2000; Pikis *et al.*, 2001). Los aislados clínicos Opt^R tienen CMI's considerablemente mayores que las cepas sensibles (Muñoz *et al.*, 1990; Fenoll *et al.*, 1994). Los aislados clínicos Opt^R no están relacionados filogenéticamente y exceptuando el fenotipo Opt^R son iguales a sus variantes sensibles (Muñoz *et al.*, 1990; Pikis *et al.*, 2001).



El fenómeno de la resistencia alta o moderada a Opt se observa en alrededor del 1% de los aislados clínicos de *S. pneumoniae* (Muñoz *et al.*, 1990), lo que podría generar un error en su identificación y, consecuentemente, errores en el pronóstico de la enfermedad e incluso en el tratamiento de los pacientes.

1.5.2. Bases moleculares de la resistencia a optoquina

Hace algunos años se obtuvieron pruebas genéticas de que el gen *atpC*, que codifica la subunidad *c* de la ATPasa F_0F_1 , era el responsable del fenotipo de sensibilidad a Opt (Fenoll *et al.*, 1994). Los mutantes Opt^R, tanto los generados en laboratorio como cepas clínicas, mostraban mutaciones puntuales en *atpC* que producían cambios en alguno de los aminoácidos que rodean al residuo funcional cE52, equivalente a cD61 de *E. coli*. Existía una relación directa entre el nivel de resistencia y el grado de inhibición de la ATPasa F_0F_1 por Opt en los diferentes mutantes. Fragmentos de PCR que llevaban mutaciones puntuales en *atpC* conferían el fenotipo Opt^R a una cepa de laboratorio sensible a esta droga (Fenoll *et al.*, 1994). Un fenómeno análogo al observado con Opt ocurre con mutantes resistentes a quinina (Qin), existiendo además un fenómeno de resistencia cruzada para ambas drogas (Muñoz *et al.*, 1996).

Recientemente fueron analizados un gran número de derivados de la mefloquina (Mef) por el Instituto Walter Reed perteneciente al ejército de los Estados Unidos de América, con el objetivo de evaluar su uso potencial en la terapia antimicrobiana. Su actividad antimicrobiana

fue testada por investigadores de la Universidad de Ohio, con la conclusión de que eran activos frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos a pesar de que la mefloquina era mucho menos activa frente a estos dos últimos grupos de microorganismos (Kunin and Ellis, 2000). Estos compuestos eran también bastante eficaces contra *Enterococcus spp* y *Staphylococcus spp*. Todos los compuestos mantenían los grupos amino y alcohol característicos de esta familia de drogas aunque solamente los derivados con un grupo piperidina unido a metanol en su posición 2 fueron activos. *S. pneumoniae* fue claramente la bacteria más sensible a estos fármacos. Su concentración mínima inhibitoria (CMI) (0,4 – 0,8 µg/ml) era compatible con los niveles alcanzables en suero (1,0 – 1,5 µg/ml). También es importante farmacológicamente el efecto sinérgico entre la mefloquina o sus derivados a concentraciones subinhibitorias y otros compuestos como gentamicina y vancomicina. Se ha observado que esta familia de compuestos producen la lisis celular con liberación de DNA al medio en *E. coli*, *Mycobacterium avium* y *Staphylococcus aureus*, especies cuyas CMIs son muy superiores a las de *S. pneumoniae* (Brown *et al.*, 1979; Bermudez *et al.*, 1999; Kunin and Ellis, 2000)

Desde la aparición de la cloroquina, hace más de 40 años, no se han presentado fármacos más eficaces contra el agente etiológico de la malaria, *Plasmodium falciparum*, exceptuando la mefloquina en los años 70. Sin embargo, las resistencias de este parásito a la cloroquina cada vez son más habituales, e incluso se están extendiendo a nivel mundial (van Es *et al.*, 1993). El tratamiento con Qin es la principal alternativa en los casos de resistencia a cloroquina (Wyler, 1983). Es difícil trabajar en laboratorio con *P. falciparum*, por el relativo desconocimiento de su biología molecular y su complejo ciclo de vida, que implica a 2 hospedadores diferentes y la migración por distintos tipos celulares (eritrocito, hepatocito, etc). Especialmente importante es el hecho de que sólo el isómero eritro de la Qin es activo frente a *S. pneumoniae*. En este isómero, la distancia entre los grupos amino y alcohol es lo bastante grande como para favorecer los enlaces intermoleculares, en contraposición con los isómeros treo donde la menor distancia entre estos radicales favorece las uniones intramoleculares (Muñoz *et al.*, 1996). El hecho de que el mismo requerimiento estructural se presente en la acción de la Qin frente a *Plasmodium falciparum* refuerza la hipótesis de que *S. pneumoniae* podría ser usado como modelo para evaluar nuevos antimaláricos pertenecientes a esta familia de compuestos gracias a las propiedades intrínsecas de su ATPasa F₀F₁ (Muñoz *et al.*, 1996).

2. OBJETIVOS

1. Caracterización genética del operón *atp* de *S. pneumoniae*.
2. Estudio de la expresión/actividad de la ATPasa F_0F_1 de *S. pneumoniae* en respuesta a cambios de pH.
3. Análisis de la respuesta de tolerancia al ácido en *S. pneumoniae*.
4. Actividad de la mefloquina y compuestos relacionados sobre la ATPasa F_0F_1 de *S. pneumoniae*.
5. Caracterización genética de aislados clínicos de estreptococos viridans sensibles a optoquina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

Todas las cepas de *E. coli*, *S. pneumoniae* y estreptococos del grupo viridans que se han utilizado en la realización de este trabajo se describen en la Tabla II. Asimismo, tanto los plásmidos usados como vectores como los plásmidos recombinantes obtenidos se describen en las Tablas III y IV.

Tabla II. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo / Fenotipo	Referencia
<i>E. coli</i> C600	<i>thr- 1, leu- 6, thi- 1, lacY1, supE44, tonA21</i>	(Kato <i>et al.</i> , 1988)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>ompT, hsdS_B (r_B⁻m_B⁻), gal, dcm</i> (DE3)	(Studier and Moffatt, 1986)
<i>E. coli</i> DH5 α	(<i>f80dlacZ_pM15</i>) <i>endA1, recA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), thi- 1,</i> (Hanahan, 1985) <i>gyrA96, relA1, Δ(lacZYA-argF) U169</i>	
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA46, thi, hsdR17(r_k⁻,m_k⁺), supE44,</i> Stratagene <i>relA1, lac⁻ F[proAB⁺, lac^f lacZ ΔM15,Tn10(Tc^R)]</i>	
<i>S. mitis</i> NCTC 12261	Cepa tipo de <i>Streptococcus mitis</i>	NCTC
<i>S. oralis</i> ATCC 10557	Cepa tipo de <i>Streptococcus oralis</i> de la ATCC	ATCC
<i>S. oralis</i> NCTC 11427	Cepa tipo de <i>Streptococcus oralis</i>	NCTC
<i>S. pneumoniae</i> 3870	Aislado clínico mosaico para los genes <i>parC</i> y <i>parE</i> que lleva el gen <i>ant</i> de estreptococos viridans	(Balsalobre <i>et al.</i> , 2003)
<i>S. pneumoniae</i> 4114	Aislado clínico resistente a ciprofloxacina (Cip ^R)	
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303		ATCC
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619		ATCC
<i>S. pneumoniae</i> CMJ1	Derivado de R6 Cip ^R	Este trabajo
<i>S. pneumoniae</i> CMJ2	“ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> CMJ3	“ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> CMJ4	“ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> CMJ5	“ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> M222	Derivado de R6 con genes <i>atpCA</i> y parte de <i>B</i> de <i>S. oralis</i>	(Fenoll <i>et al.</i> , 1994)
<i>S. pneumoniae</i> MJ11	Derivado de R6 Opt ^R	(Fenoll <i>et al.</i> , 1994)
<i>S. pneumoniae</i> MJ2	“ “ “ “	(Fenoll <i>et al.</i> , 1994)
<i>S. pneumoniae</i> MJM3	Derivado de R6 resistente a Mef (Mfl ^R)	Este trabajo
<i>S. pneumoniae</i> MJM4	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> MJM5	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> MJM6	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> MJM7	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> MJM8	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> MJM9	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> MJM11	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> MJM13	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> MJM15	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> MJM21	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> MJM22	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> MJQ3	Derivado de R6 Qin ^R	(Muñoz <i>et al.</i> , 1996)
<i>S. pneumoniae</i> MJQ4	“ “ “ “	(Muñoz <i>et al.</i> , 1996)
<i>S. pneumoniae</i> R6	Cepa tipo de laboratorio, derivada de R36A, variante rugosa de la cepa tipo II D39	
<i>S. pneumoniae</i> R6-CAT1	Inserción de la construcción <i>Patp - cat</i> , derivada de R6	Este trabajo
<i>S. pneumoniae</i> RF465KNE	<i>str-41, sul, nov-1, ery</i>	(Lacks and Greenberg, 1975)
<i>S. pneumoniae</i> RMJ1	Derivado de R6 resistente a rifampicina (Rif ^R)	Este trabajo
<i>S. pneumoniae</i> RMJ2	“ “ “ “ “ “	“ “

Cepa	Genotipo / Fenotipo	Referencia
<i>S. pneumoniae</i> RMJ3	“ “ “ “ “ “	Este trabajo
<i>S. pneumoniae</i> RMJ4	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> RMJ5	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> SMJ1	Derivado de R6 resistente a estreptomicina (Str ^R)	“ “
<i>S. pneumoniae</i> SMJ2	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> SMJ3	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> SMJ4	“ “ “ “ “ “	“ “
<i>S. pneumoniae</i> T4	<i>trt1, hex4, endA1, exo2, mal594</i> , derivada de R6	(Lacks and Greenberg, 1973)

Tabla III. Vectores plasmídicos utilizados en este trabajo

Plásmido	Tamaño (pb)	Características	Referencia
pACYC184	4244	Cm ^R – Tc ^R . Intentos de clonación en <i>E. coli</i>	(Chang and Cohen, 1978)
pUC18	2686	Ap ^R . Clonación fragmentos operón <i>atp</i> en <i>E. coli</i>	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pSU24	2397	Cm ^R . Clonación de genes del operón <i>atp</i> en <i>E. coli</i>	(Bartolomé <i>et al.</i> , 1991)
pLS1	4408	Tc ^R . Realización de fusiones génicas <i>Patp–cat</i>	(Lacks <i>et al.</i> , 1986)

Tabla IV. Plásmidos recombinantes obtenidos o utilizados en este trabajo

Plásmido	Vector	Inserto (pb) ^a	Características	Referencia
pMJSP3	pLS1	–90 a –1 operón <i>atp</i>	Fusión <i>Patp–cat</i> con promotor silvestre	Este trabajo
pMJSP4	pLS1	–90 a –1 operón <i>atp</i>	Fusión <i>Patp–cat</i> con promotor mutado	“ “
pOPTN2	pUC18	–186 a 966 operón <i>atp</i>	Incluye promotor y genes <i>atpCA</i>	(Fenoll <i>et al.</i> , 1994)
pOPTN3B	pSU24	–15 a 1501 operón <i>atp</i>	Incluye genes <i>atpCAB</i>	Este trabajo
pOPTN4	pSU24	–15 a 2334 operón <i>atp</i>	Incluye genes <i>atpCABd</i>	“ “
pOPTN5	pSU24	1501 a 6167 operón <i>atp</i>	Incluye genes <i>atpagb</i>	“ “
pOPTN7	pSU24	–15 a 6167 operón <i>atp</i>	Incluye genes <i>atpCABdagb</i>	“ “
pOPTN8	pSU24	–15 a 6409 operón <i>atp</i>	Incluye genes <i>atpCABdagbe</i>	“ “

^a Las cifras indican las posiciones del operón *atp* incluidas en el inserto, considerando el primer nucleótido del gen *atpC* como posición +1.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

Para el crecimiento de las estirpes de *E. coli* se utilizó medio LB (Sambrook *et al.*, 1989), excepto cuando se realizaron experimentos de marcaje radioactivo de polipéptidos, en los que se utilizó una variación del medio mínimo M9 (Sambrook *et al.*, 1989), que fue suplementado con 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂ y 0,5% sacarosa (medio M9-S). Para los cultivos en medio sólido se añadió agar (Pronadisa) a una concentración final del 1,5% (p/v).

Para el crecimiento de *S. pneumoniae* y el resto de estreptococos se utilizó medio C con 0,8% extracto de levadura (Difco) (C+Y) (Tomasz, 1970), medio AGCH con 0,3% sacarosa y 0,2% extracto de levadura (AGCH + Y) (Lacks, 1966) o caldo Todd–Hewit (Difco) con 0,5% extracto de levadura (medio THYE). Para los cultivos en medio sólido se añadió agar (Pronadisa) a una concentración final del 1% (p/v). Para la preparación de inóculos para las pruebas de CMI, se crecieron cultivos en agar sangre constituido por agar Mueller–Hinton a 36

g/l (Difco) y un 5% de sangre de carnero desfibrinada (Soria–Melguizo). Los componentes del medio C se adquirieron de Sigma excepto el fosfato potásico monosódico y disódico, las sales de hierro, cobre, zinc y manganeso, y el cloruro amónico que fueron suministrados por Merck. Los compuestos del medio AGCH se adquirieron de Merck excepto el hidrolizado enzimático de caseína y los casaminoácidos obtenidos de Pronadisa y la catalasa que se adquirieron a Calbiochem. Cuando se requirió, se ajustó el pH con NaOH 1N ó HCl 1N.

3.3. ENZIMAS Y REACTIVOS

3.3.1. ENZIMAS

Todas las endonucleasas de restricción fueron suministradas por Amersham Biosciences y MBI Fermentas, utilizándose según las indicaciones del fabricante en las soluciones salinas proporcionadas. Las DNA polimerasas utilizadas para amplificar por PCR fueron la DNA polimerasa termoestable de *Thermus thermophilus* (Tth) de Biotools, los sistemas “Expand™ High Fidelity PCR system” y “Long Template Expand™ High Fidelity PCR system” de Roche. Las enzimas de modificación de DNA utilizadas fueron la DNA ligasa y la DNA polimerasa del fago T4 de Amersham Biosciences y la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Mooloney (MMLV) de Gibco–BRL.

3.3.2. REACTIVOS

3.3.2.1. Compuestos antimicrobianos

Muchos de los fármacos antimicrobianos fueron proporcionados por las casas comerciales en forma de polvos de potencia definida. Se diluyeron en los disolventes recomendados a las concentraciones recomendadas y se usaron inmediatamente o se almacenaron a -20°C . Otros fármacos como ampicilina, cloranfenicol, Opt, Qin, rifampicina, Str y tetraciclina fueron adquiridos de Sigma. La ciprofloxacina (Cip) y la mefloquina (Mfl) fueron proporcionadas amablemente por los laboratorios Bayer (Barcelona) y Roche (Basilea, Suiza), respectivamente. Los compuestos derivados de la Mlf fueron suministrados por Calvin Kunin del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Ohio (USA).

3.3.2.2. Productos químicos

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos fueron suministrados mayoritariamente por Merck, además de los colorantes para electroforesis, detergentes, APS, urea, BSA, DMSO, lisozima y glicerol. El ATP, IPTG, X–GAL, DTNB, DNA de esperma de salmón, DOC, DNAasa, RNAasa y agarosa de alto grado fueron proporcionadas por Sigma. La proteinasa K fue suministrada por Roche. Los reactivos para electroforesis, marcadores de peso molecular, acrilamida, N,N'–metilen–bisacrilamida, SDS, TEMED y el β –mercaptoetanol

fueron adquiridos de Bio-Rad. La agarosa fue también proporcionada por Pronadisa. Los deoxinucleótidos utilizados en PCR provinieron del Ultrapure dNTP set de Amersham Biosciences.

3.3.2.3. Productos radioactivos

El DNA fue marcado con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ con una actividad específica de 300 Ci/mmol (Amersham Biosciences). Para la reacción de secuenciación necesaria para el experimento de "primer extension" se utilizó $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ con una actividad específica de 1.000 Ci/mmol (Amersham Biosciences).

Para el marcaje de proteínas se utilizó el compuesto PRO-MIX (70% L- $[\text{S}^{35}]\text{metionina}$ + 30% L- $[\text{S}^{35}]\text{cisteina}$) con una actividad específica 1.000 Ci/mmol (Amersham Biosciences).

3.3.2.4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos necesarios para las reacciones de secuenciación, PCR o "primer extension" fueron proporcionados por el servicio de Biopolímeros del Instituto de Salud Carlos III o por Amersham Biosciences. Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla V.

Tabla V. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia 5' – 3' ^a	Utilidad
antDOWN	TCATGAGTCTTCTCCTCTCGC	Amplificación para sonda del gen <i>ant</i>
antUP	GCTGTGCCATGTCTGGTTCACG	Amplificación para sonda del gen <i>ant</i>
atp660	ggtcggaaTTCCAATAGCGGTTAAAGTTG	Clonación del operón <i>atp</i> . Amplificación de promotor <i>atp</i> para fusión génica
atpA107R	GCGGTTGGCGAACTCCACCAG ¹⁰⁶ NWWSSPTA ¹¹³ (AtpA) (Cadena complementaria)	Secuenciación de <i>atpC</i> y <i>atpA</i>
atpB56	GACGGGCTTCTCAGCTCTGTC ⁵⁰ DRAEEAR ⁵⁶ (AtpB) (Cadena complementaria)	Secuenciación de <i>atpC</i> y <i>atpA</i> . Construcción mutantes Mfl ^R
atpB128	GGTGGCAGATTTGACCGTTAGTCTCGCTGG ¹²⁸ EVADLTVSLAG ¹³⁸ (AtpB)	Clonación del operón <i>atp</i>
atpβ394	GACCTTGGTTGCTCGCGCCCGTGC ³⁹⁴ KTLVARARR ⁴⁰² (Atpβ)	Clonación del operón <i>atp</i>
atpC1	gcgcggaattcAAAGGAGAATTTGTTATGAA ¹ MN ² (AtpC)	Clonación del operón <i>atp</i>
atpC1–Sph	gcgcgcatgcAAAGGAGAATTTGTTATGAA ¹ MN ² (AtpC)	Clonación del operón <i>atp</i>
atpC17	CCATTCATCAATAAACCTTCACCG ¹⁷ VEGELLMNG ²⁵ (AtpC) (Cadena complementaria)	Determinación del inicio de transcripción del operón <i>atp</i> por "primer extension"
atpC18R	CCGACAGATACGCCCATACAGGC ¹¹ ACMGVSVG ¹⁸ (AtpC) (Cadena complementaria)	Secuenciación de la región 5'a <i>atpC</i> de la cepa 1162/99
atpδ110	GCGCGGATCCGAGCAGACGTAATCGTCAC ¹¹⁰ VTITSAH ¹¹⁶ (Atpδ) (Cadena complementaria)	Clonación del operón <i>atp</i>
atpend1	gcgccgaattcCCGAAGCAGTCTGCATCCGTTT	Clonación del operón <i>atp</i>
atpend2	gcgcggtaccGAAGCAGTCTGCATCCG	Clonación del operón <i>atp</i>
atporf1	ggtcggaaTTCTGGATGGCTAACTTGAACCTTG	Construcción mutantes mfl ^R
atpCorf2	AACAAATTCTCCTTTAAAATAAAATTT	Amplificación promotor <i>atp</i> para fusión génica
c18R–Smi	CCAAGAGACACACCCATACAGGC ¹¹ ACMGVSLG ¹⁸ (AtpC) (Cadena complementaria)	Secuenciación de la región 5'a <i>atpC</i> de <i>S. mitis</i> y 1174/97

c18R—Sor	GCAAGAGATACACCCATACAGGC 11 ACMGVSLA ²⁰ (AtpC) (Cadena complementaria)	Secuenciación de la región 5' a <i>atpC</i> de <i>S. oralis</i>
cat1	ATGAACCTTAATAAAAATTGATTTAGAC 1 MNFNKIDLD ⁹ (Cat)	Amplificación gen <i>cat</i> para fusión génica
cat—end2	gcgcaagcctTCATATTATAAAAGCCAGCT 223 DWLL ²²⁶ (Cat) (Cadena complementaria)	Amplificación gen <i>cat</i> para fusión génica
endAlfa	GCTGGTACTTTCGTATCGACC 379 AGTLRIDL ³⁸⁶ (Atp α)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
endBeta	GCCAGAAGATGCCTTCCGTGG 445 LPEDAFRG ⁴⁵² (Atp β)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
endGamma	CTGGAGCAGTTGTTGCCTCA 220 LEQLLPQ ²²⁶ (Atp γ)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
midAlfa	CACTTCGTCAGTACGGTGCC 211 TLRQYGA ²¹⁷ (Atp α)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
midBeta	CCGTTTCACTCAGGCTGGTTC 252 FRFTQAGS ²⁵⁹ (Atp β)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
parC50	AAGGATAGCAATACTTT 50 KDSNTF ⁵⁵ (ParC)	Amplificación y secuenciación de la QRDR de <i>parC</i>
parC152	GTTGGTTCTTTCTCCGTATCG 147 DTEKEP ¹⁵² (ParC)	Amplificación y secuenciación de la QRDR de <i>parC</i>
parC503R	GCCTTGGTCACGCTGACGTAGG 502 TYVSVTKA ⁵⁰⁹ (ParC)	Generación de mutantes Cip ^R
parCup	GAACACGCCCTAGATACTGTG	Generación de mutantes Cip ^R
pepti101	GCAGTTATCGTATCTGACCCAGCC 102 AVIVSDPA ¹⁰⁹ (Spr1284)	Secuenciación de <i>spr1284</i> . Sonda
pepti202R	CGGCATGACTGAGAACATCCACC 200 GGCSQSCR ²⁰⁷ (Spr1284)	Secuenciación de <i>spr1284</i> . Sonda
pepti297	GGACGAGATGTGGAAGGTTGCC 297 VDEMWKVAQ ³⁰⁵ (Spr1284)	Secuenciación de <i>spr1284</i> y de región 3' a <i>spr1284</i> de 1162/99 y 1174/97
pepti413R	CGAACCATGTCTCCTGATTGAACGGG 405 PVQSGDMVR ¹⁰⁹ (Spr1284)	Secuenciación de <i>spr1284</i>
pepti434Sor	GGAACACGCTCACAGTTCGTGC 427 GTSVTVRA ⁴³⁴ (Spr1284)	Secuenciación de región 3' a <i>spr1284</i> de <i>S. oralis</i>
retro2485	GACTTTACCTACAGGGAC 117 VPVGESL ¹²³ (Atp α) (Cadena complementaria)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
retro3031	GGCTTACGACCTGGAGGACG 278 RRPPGREA ²⁸⁵ (Atp α) (Cadena complementaria)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
retro3576	GAGCATCAAAGAAGGCATGG 461 FHAFFDAQ ⁴⁶⁸ (Atp α) (Cadena complementaria)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
retro4138	GGTTGGTCTGACAAGCCACG 141 RGLSDQP ¹⁴⁷ (Atp γ) (Cadena complementaria)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
retro4700	CGGGACCGATAACCTGAGC 7 AQVIGPV ¹³ (Atp β)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
retro5254	CCCAGTAAAGGTCATTCCCC 191 EGNDLYWE ¹⁹⁸ (Atp β) (Cadena complementaria)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
retro5825	GCTCATCCATACCAAGGATAGC 382 AILGMDEL ³⁸⁸ (Atp β) (Cadena complementaria)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
rpoB227	GCGAATTGGTTCGCAACACTG 227 ELVRNT ²³³ (RpoB)	Generación de mutantes Rif ^R
rpoB427	CGGTTGGTGAATTGCTTGCCAACC 427 AVGELLAN ⁴³⁵ (RpoB)	Amplificación y secuenciación de la parte central de <i>rpoB</i>
rpoB554R	CAAGTGTCCGTAAGATGCAAG 548 LSSYGHL ⁵⁵⁴ (RpoB)	Amplificación y secuenciación de la parte central de <i>rpoB</i>
rpoB773R	GTCATGTAGGCAACGATTGGG 768 PIVAYMT ⁷⁷⁴ (RpoB)	Generación de mutantes Rif ^R
rpsL6	CCAATTGGTTCGCAAACCGCG 6 QLVRKPR ¹² (RpsL)	Generación de mutantes Str ^R
rpsL131R	CCGTATTTAGAACGGCCTTG 125 QGRSKYG ¹³¹ (RpsL)	Amplificación y secuenciación de <i>rpsL</i>
rpsLdown	CGGAAGTGTGCGAATGCACGG 143 RMAEANR ¹⁴⁹ (RpsG)	Amplificación y secuenciación de <i>rpsL</i>
rpsLup	GGGCTAGTAGAAGTAGTTGGC 101 PTTSTSP ¹⁰⁷ (Spr0247)	Generación de mutantes Str ^R

startAlfa	GGTGGTTGTAACCTATATCGGGG ²⁹ GVVTYIGD ³⁶ (Atp α)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
startBeta	GGTCGTCCAATCTCTGTAC ⁷⁷ GRPISVP ⁸³ (Atp β)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
startGamma	GTTTACGCTCAGAAAAGTGCG ⁴⁵ VYAQKVR ⁵¹ (Atp γ)	Secuenciación del operón <i>atp</i>
upatp3	tcggaagcttAGGAAAAGCGCTTAAGAAACA	Comprobación orden génico por PCR

^a Los aminoácidos que codifica cada oligonucleótido se representan en negrita junto con el nombre del polipéptido al que pertenecen entre paréntesis. Las dianas de restricción en el extremo 5' y las colas con GCs presentes en algunos de los oligonucleótidos se indican en minúscula. Éstas son *Bam*HI (atp δ 110) *Eco*RI (atp660, atporf1, atpC1, atpend1), *Hind*III (catend2, upatp3), *Kpn*I (atpend2) y *Pae*I (atpC1–Sph).

3.4. CULTIVOS DE BACTERIAS, TRANSFORMACIÓN GENÉTICA Y PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

3.4.1. Cultivos de bacterias

Los cultivos de *E. coli* en medio líquido crecieron en agitación a 37°C a concentración atmosférica de CO₂. Los cultivos de *S. pneumoniae* y el resto de estreptococos se crecieron en medio líquido a 37°C sin agitación o en medio sólido a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Las bacterias se guardaron a –80°C con glicerol al 25%.

Para los experimentos mostrados en las Figs. 14–17, *S. pneumoniae* se creció en medio C+Y ajustado a pH 8.0 (tampón fosfato 50 mM). El cultivo se diluyó entre 20 y 40 veces en medio fresco tamponado a pHs iniciales diferentes entre 8.0 y 6.0 a intervalos de 0.4 unidades, y se tomaron muestras cuando los cultivos llegaron a una OD₆₂₀ = 0.25. Se monitorizó la disminución del pH del medio durante el crecimiento. Los valores finales de pH se muestran en las Figs. 14–17 y son 7.5 (pH inicial 8.0), 7.3 (pH inicial 7.6), 7.0 (pH inicial 7.2), 6.6 (pH inicial 6.8), 6.2 (pH inicial 6.4) y 5.7 (pH inicial 6.0).

3.4.2. Transformación genética

Para la transformación de *E. coli* se utilizó el método de Hanahan (Hanahan, 1985). Las células competentes se mantuvieron 10 min en baño de agua–hielo, se les añadió DNA a una concentración final de 100–200 ng/ml, se mantuvieron 30 min a 4°C seguido de choque térmico de 2 min a 42°C, 3 min nuevamente a 4°C y 1 h a 37°C para la expresión de los nuevos alelos, seguido de siembra en medio sólido. Los transformantes se seleccionaron en 100 μ g/ml ampicilina ó 60 μ g/ml cloranfenicol. La identificación de transformantes en la cepa XL1–Blue se facilitó mediante el uso de X–GAL al 0,004% e IPTG al 0,008% en medio sólido, por la ausencia de color azul de la colonia (Sambrook *et al.*, 1989).

La transformación en *S. pneumoniae* se realizó por un método previamente descrito (Lacks, 1966). Primeramente se obtuvieron células competentes después de varios pasos de

dilución/crecimiento hasta una $OD_{620} = 0.25$. Estas células se diluyeron 1:20 en medio AGCH con 0,2% sacarosa y $CaCl_2$ 300 μ M, y se mantuvieron 20 min a 30°C. Posteriormente se añadió 1 μ g de DNA genómico ó 100–150 ng de DNA plasmídico (o de fragmento de PCR). Las células se mantuvieron 40 min a 30°C para que tuviera lugar la captación de DNA y 90 min a 37°C para la expresión de los nuevos alelos adquiridos. Las células fueron sembradas en medio sólido o guardadas a –80°C con un 25% de glicerol. Los transformantes fueron seleccionados con 2 μ g/ml Cip, 2,5 μ g/ml cloranfenicol, 100 μ g/ml estreptomycin, 0,31 μ g/ml Mfl, 1 μ g/ml Rif ó 1 μ g/ml tetraciclina.

3.4.3. Pruebas de susceptibilidad a compuestos antimicrobianos

Las CMI se determinaron mediante el método de microdilución tal como recomienda el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (National and Standards, 2000). El medio utilizado fue caldo Mueller–Hinton (Difco) suplementado con 2,5% de sangre de caballo defibrinada lisada (Soria–Melguizo). El inóculo se preparó mediante la suspensión en dicho caldo de varias colonias tomadas de un cultivo crecido toda la noche en medio agar sangre. La turbidez se ajustó a una $OD_{600} = 0.08$ – 0.100 (0.5 unidades McFarland; $\sim 10^8$ ufc/ml), posteriormente se diluyó 100 veces en el mismo medio ($\sim 10^6$ ufc/ml), inoculándose 10 μ l a cada pocillo ($\sim 10^4$ ufc). Se usaron placas de 96 pocillos de fondo plano que se incubaron a 37°C a concentración atmosférica de anhídrido carbónico, durante 20–24 h. La CMI estimada fue la menor concentración de antibiótico que inhibió el crecimiento visible bacteriano. Como control de sensibilidad se utilizaron las estirpes de *S. pneumoniae* ATCC 6303 y ATCC 49619. Como controles de resistencia a antimicrobianos se utilizaron la cepa de *Streptococcus mitis* NTCT 12261, y las de *Streptococcus oralis* ATCC 10557 y NTCT 11427. Como controles de resistencia a Cip y Str se utilizaron el aislado clínico *S. pneumoniae* 4114 y la cepa *S. pneumoniae* RF465KNE, respectivamente.

3.5. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DEL DNA

3.5.1. Extracción de DNA cromosómico

El DNA cromosómico, tanto de *S. pneumoniae* como el de varias estirpes de estreptococos viridans, fue extraído por el método del CTAB descrito previamente (Ausubel *et al.*, 1994).

3.5.2. Aislamiento y purificación de plásmidos

La extracción de pequeñas cantidades de DNA plasmídico de *E. coli* se llevó a cabo mediante el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) o mediante el High Pure™ Plasmid Isolation Kit (Boehringer Mannheim). La obtención a gran escala se realizó mediante el método

de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) o mediante el QIAfilter Plasmid Maxi Kit (QIAGEN). La obtención de DNA plasmídico de *S. pneumoniae* se realizó mediante un método previamente publicado (Stassi *et al.*, 1981).

3.5.3. Electroforesis

La separación de los DNA genómicos, plásmidos, fragmentos de restricción y productos amplificados por PCR se realizó en geles de agarosa tanto con fines analíticos (Pronadisa) como preparativos (Sigma). Como marcador de peso molecular, se utilizó el Weigh Marker III (Amersham Biosciences), o el DNA ladder (Fermentas).

Cuando fue necesario, los fragmentos de DNA fueron purificados desde la porción de gel de agarosa que lo contenía utilizando el Kit Gene Clean II (Bio101).

3.5.4. Hibridación de DNA

Para los ensayos de "Southern blot" (Sambrook *et al.*, 1989), el DNA se transfirió mediante capilaridad a una membrana de nylon ImmobilonTM-Ny+ (Millipore) que se secó durante 1 h a 80°C y a la cual se unió covalentemente el DNA mediante exposición a radiación ultravioleta durante 2 min. Para la obtención de las sondas, en primer lugar se obtuvieron éstas por PCR utilizando los oligonucleótidos adecuados. El exceso de oligonucleótidos y los dNTPs de las reacciones de PCR fue eliminado con columnas Microspin HR S-400 (Amersham Biosciences). Las sondas fueron entonces marcadas con biotina por "random priming" utilizando el NEBlot Phototope kit (New England Biolabs Inc). La detección de la señal resultante de la hibridación específica se llevó a cabo por el Phototope-Star detection kit (New England Biolabs Inc).

3.5.5. Construcción de plásmidos

Los plásmidos recombinantes se generaron a partir de fragmentos de PCR y 20–40 ng de DNA de vector plasmídico digeridos con las mismas enzimas a una proporción molar final de 3:1. A la mezcla de DNA en el tampón de ligación proporcionado por el fabricante, se le añadieron 3 unidades Weiss de T4 ligasa (Amersham Biosciences) y 1 mM de ATP de grado ligación (Amersham Biosciences). Se incubó la mezcla durante 4 h a 10°C, tras lo cual se inactivó la DNA ligasa por calentamiento a 65°C durante 10 min seguido de enfriamiento progresivo hasta 4°C durante 20 min para permitir la renaturalización del DNA. Los productos de ligación se utilizaron inmediatamente para transformar o se guardaron a –20°C.

Las fusiones génicas utilizadas para monitorizar la actividad del promotor *atp* se obtuvieron a partir de una reacción de ligación simultánea entre un fragmento que contenía el promotor del operón *atp*, un fragmento que contenía el gen reportero *cat* y el plásmido pLS1

como vector. Para obtener el promotor del operón *atp*, se amplificó mediante PCR un fragmento de 90 pb con los oligonucleótidos *atp660* y *atpCorf2* fosforilado, que posteriormente se digirió con *EcoRI*. El fragmento de 600 pb que contenía el gen *cat* se obtuvo mediante PCR a partir del plásmido pJS3 con el oligonucleótido *cat1* fosforilado y *cat-end2*, el cual fue posteriormente digerido con *HindIII*. Finalmente para utilizar pLS1 como vector, éste fue digerido con *EcoRI* y *HindIII*. Los plásmidos resultantes fueron denominados pMJSP3 cuando para la amplificación del promotor *atp* se utilizó como molde DNA genómico de R6, y pMJSP4 cuando el molde fue el plásmido pOPTN2. Para introducir la construcción *Patp-cat* dentro del cromosoma de la cepa R6, se transformó a esta cepa con un fragmento de PCR de 734 pb amplificado a partir de pMJSP3 utilizando los oligonucleótidos *atp660* y *cat-end2* como cebadores. Uno de los transformantes fue seleccionado por resistencia a cloranfenicol y fué denominado R6-CAT1.

3.6. AMPLIFICACIÓN POR PCR, DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

Para la amplificación de fragmentos para la clonación se utilizaron el High Fidelity System o el Long template High Fidelity System cuando el inserto superaba las 4 Kb, poseyendo ambos sistemas función correctora de pruebas. La amplificación se llevó a cabo utilizando 1 µg de DNA genómico de R6 como molde, 1 µM de cada oligonucleótido, 0,35 mM de cada dNTP, en el tampón recomendado por el fabricante con una concentración final de MgCl₂ de 2,25 mM, y 3,75 unidades de enzima. Se llevó a cabo un primer ciclo de 5 min a 95°C, 15 min 55°C (en el que a los 7 min se añadió la enzima) y 6 min 68°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95°C, 2 min a 55°C, y 2–5 min de elongación a 68°C (según el tamaño del fragmento) más 20 seg adicionales por ciclo, para finalizar con 8 min a 72°C y descenso hasta 4°C.

Para amplificar fragmentos con un objetivo distinto a la clonación se utilizó 1 unidad de DNA polimerasa termoestable de *Thermus thermophilus*, *Tth* (Biotools), 1 µg de DNA cromosómico, 0,4–0,8 µM de cada oligonucleótido, 0,2 mM de cada dNTP, en el tampón recomendado por el fabricante con 2 mM MgCl₂, en un volumen final de reacción de 50 µl. El proceso consistió en un ciclo previo de desnaturalización de 1 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 90 seg a 55°C, y 30–75 a 72°C (según la longitud del fragmento); y un ciclo final de 8 min a 72°C con posterior enfriamiento hasta 4°C.

Para evitar su interferencia en posteriores reacciones, los oligonucleótidos, dNTPs no incorporados y el exceso sales de las mezclas de reacción de PCR se eliminaron con columnas MicrospinTM HR S-400 (Amersham Biosciences).

Las reacciones de secuenciación se realizaron con el kit de terminadores de Rhodamina o el kit Bigdye de PE Biosystems y el secuenciador de DNA Biosystems Prism 377 según las instrucciones del fabricante. Todas las secuencias se llevaron a cabo en las dos hebras. Para la reacción paralela al producto de "primer extension" en el experimento de localización del inicio de transcripción del operón se utilizó el Kit Sequenase 2.0 (Amersham Biosciences).

3.7. PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA

3.7.1. Extracción de RNA total.

Para los experimentos de "primer extension y "northern blot" se extrajo el RNA de 50 ml de cultivos de *S. pneumoniae* o *E. coli* en fase exponencial que se recogieron por centrifugación y se lisaron por congelación y descongelación rápida (-80°C / 37°C) en una solución de Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA y 0,1% DOC en el caso de células de *S. pneumoniae* y 20 mM acetato sódico, 1 mM EDTA y 1 mg/ml de lisozima en el caso de células de *E. coli*. Posteriormente se añadió SDS hasta una concentración final de 0,5% y se fenolizó 3 veces con dos volúmenes de fenol ácido saturado con acetato sódico 20 mM pH 5.0 a 70°C. El RNA se precipitó 2 veces.

Para el experimento de "slot blot", se extrajo el RNA de 50 ml de cultivo en fase exponencial mediante el "RNeasy midi kit" de Qiagen lisando previamente las células durante 15 min a 37°C en 750 µl de tampón Tris 10 mM, 1 mM EDTA pH 8.0 con 0,1% DOC.

La pureza y concentración del RNA fueron determinadas por espectrofotometría y visualización tras electroforesis en geles de agarosa.

3.7.2. Ensayo de "primer extension"

Para la localización del inicio de transcripción del operón *atp* se utilizaron 20 µg de RNA total de la cepa T4. El RNA se desnaturalizó durante 1 min a 90°C en presencia de 1 pmol del oligonucleótido *atpC17*, en un volumen total de 3 µl. Después de un enfriamiento lento mediante 5 min a 42°C, se añadieron 30 unidades de transcriptasa reversa del virus de Moloney (Gibco), 32 unidades de inhibidor de RNAasas RNAsine (Promega) y 15 µCi de [α -³²P]dATP (300 Ci/mmol) en una concentración final de 175 µM de dNTPs (excepto dATP), 17,5 mM dATP, 3,5 mM DTT en el tampón proporcionado por el fabricante de la enzima y en un volumen final de 20,5 µl. La reacción de extensión se produjo por incubación a 37°C durante 30 min, tras los cuales se paró mediante la adición de 5 µl de solución de parada del kit Sequenase 2.0 (Amersham Biosciences).

La secuencia del DNA paralela se realizó mediante el kit de secuenciación Sequenase 2.0 (Amersham Biosciences) siguiendo las indicaciones del fabricante, y utilizando como molde el plásmido pOPTN2 de *E. coli* que contiene parte de la secuencia del operón *atp* de *S.*

pneumoniae, incluyendo el promotor, y el mismo oligonucleótido que en la reacción de *primer extension* (atpC17) como iniciador de la reacción de secuencia.

3.7.3. Hibridación de muestras de RNA por "northern blot"

La separación del RNA total se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y 2,2 M formaldehído (Sambrook *et al.*, 1989). A muestras de 10 ó 20 µg de RNA total ajustadas a un volumen de 4,5 µl con agua estéril, se le añadieron 2 µl de tampón 5× de electroforesis de geles de formaldehído (0,1 M MOPS pH 7.0, 40 mM acetato sódico, 5 mM EDTA), 3,5 µl de formaldehído al 37% y 10 µl de formamida desionizada. Las muestras se incubaron durante 15 min a 65°C y se enfriaron rápidamente en hielo. Antes de cargarse, a cada muestra se le añadieron 2 µl de tampón de carga para geles de formaldehído (50% glicerol, 1 mM EDTA pH 8.0, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% azul de xilen-cianol). Como marcador de peso molecular se utilizaron 3 µg del RNA ladder 9,5–0,2 Kb (Gibco). Después de la electroforesis, las bandas del carril correspondiente al marcador de peso molecular se detectaron mediante tinción durante 15 min con bromuro de etidio a 5 µg/ml en acetato amónico 0,1 M, y posterior lavado durante 14 h en agua. El RNA de los carriles con las muestras se transfirió a una membrana de nylon Immobilon™-Ny+ (Millipore) por capilaridad. La membrana se secó durante 16 h a temperatura ambiente, y el RNA se unió covalentemente a ésta por exposición durante 90 seg a luz ultravioleta. El mRNA específico de operón *atp* se detectó mediante hibridación con una sonda radioactiva a una concentración de 10⁶ cpm/ml en solución de hibridación con formamida y posterior exposición de la membrana en film (Kodak) o mediante pantallas Fujibas (Raytest Isotopenme ßgeräte GmbH).

El marcaje de la sonda utilizada se realizó mediante PCR usando DNA cromosómico de R6 y los oligonucleótidos atpb128 y atpδ110, incluyendo en la reacción 20 µCi de [α-³²P]dATP (300 Ci/mmol) (Amersham Biosciences). No se advirtieron bandas inespecíficas en un control paralelo sin isótopo radioactivo. El exceso de oligonucleótidos y dNTPs se eliminó mediante columnas Microspin HR-S400 (Amersham Biosciences).

3.7.4. Hibridación de muestras de RNA por "slot blot"

Se utilizó un método previamente descrito (Sambrook *et al.*, 1989). A 5 µg de RNA total en un volumen de 10 µl se le añadieron 20 µl de formamida desionizada, 7 µl de formaldehído al 37% y 2 µl de 20×SSC (1×SSC: cloruro sódico 0,15 M, citrato sódico 0,015 M). Las muestras se mantuvieron a 68°C durante 15 min y posteriormente a 4°C hasta su uso, momento en el que se les añadieron 2 volúmenes de 20×SSC. El RNA se transfirió a una membrana de nylon Immobilon-NY+ (Millipore) a vacío (20 mm Hg) y se lavó con 1 ml de 10×SSC. La membrana

se secó a temperatura ambiente durante 16 h y el RNA se fijó mediante exposición de 2 min a luz ultravioleta.

El marcaje de las sondas, la hibridación y el revelado se realizaron según se describe en la sección 3.5.4.

3.8. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.8.1 Expresión de proteínas bajo el control de un promotor del f10 fago T7

Para la hiperexpresión de las proteínas se utilizó la cepa de *E. coli* BL21(DE3), la cual contiene un fago lisogénico con la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor lacUV5 además de ser defectiva en proteasas (Studier *et al.*, 1990). Este fenotipo optimiza la expresión de proteínas cuyos genes se encuentran bajo el promotor $\phi 10$ del fago T7 mediante la adición de IPTG al medio, a la vez que permite la inhibición de la expresión de todos los genes endógenos de *E. coli* mediante la adición al cultivo de rifampicina, la cual inhibe la RNA polimerasa bacteriana. Para el marcaje *in vivo* de las proteínas inducidas de este modo se utilizó el producto PRO-MIX™ de Amersham Biosciences. A 140 μ l de cultivo se le añadieron 10 pmoles de PRO-MIX (1.000 Ci/mmol), y se incubó a 37°C durante 5 min. Posteriormente se paró la reacción por adición de 140 μ l de medio de cultivo a 4°C M9-S e incubación a 4°C 5 min. Se centrifugó a $12.000 \times g \times 5$ min y las células se resuspendieron en 28 μ l de tampón de desnaturalización de proteínas 2 \times (0,2 M Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 35% glicerol, 0,5 M EDTA, 800 μ g/ml de azul de bromofenol).

Las proteínas de los extractos celulares o las fracciones enriquecidas en membrana se diluyeron en tampón de desnaturalización y se separaron en geles de poliacrilamida al 12,5–15% de acuerdo a un método descrito previamente (Studier, 1972). Como marcador de peso molecular se utilizó el Low Protein Weight Marker (Bio-Rad). Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie R250 al 0,05% en metanol: ácido acético: agua (4:1:5) durante 30 min. El exceso de tinción fue eliminado mediante sucesivos lavados con una solución de metanol: ácido acético: agua (3:1:6). Los geles de poliacrilamida fueron secados y plastificados con el Gel Drying kit (Promega) para facilitar su posterior manejo y almacenado.

3.8.2. Cuantificación de la cantidad de proteína

La cantidad de proteína se cuantificó con el Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) basado en el método de Bradford (Bradford, 1976). Como patrón se utilizaron soluciones de BSA de concentración conocida.

3.9. ENSAYOS BIOQUÍMICOS

3.9.1. Preparación de extractos crudos y fracciones de membrana

Los extractos crudos celulares se prepararon a partir de 8 ml de cultivo a una $DO_{620} = 0,25$. Los cultivos se centrifugaron y se lavaron con 1,5 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7.8 y 50 μ M β -mercaptoetanol. Las células se incubaron durante 15 min en 250 μ l del mismo tampón con tritón X-100 al 0,1%. Las células se rompieron finalmente mediante el paso de 4 veces a través de la aguja de una jeringuilla de insulina. Los extractos se mantuvieron a 4°C hasta el ensayo si éste era inmediato o se guardaron a -80°C.

Las membranas se prepararon a partir de 250-500 ml de cultivo. Las células se recolectaron por centrifugación y se lavaron 2 veces con 10 ml de 20mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM $MgCl_2$. Posteriormente se resuspendieron en 5 ml del mismo tampón y fueron sometidas a sonicación durante 5 periodos de 1 min alternando con 1 min a 4°C para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. Los productos de sonicación se centrifugaron a $8000 \times g \times 10$ min para precipitar las células enteras y los restos celulares. Los sobrenadantes fueron sometidos a una ultracentrifugación de $100.000 \times g$ durante 1 h. Las membranas precipitadas se resuspendieron en 300 μ l del mismo tampón y se conservaron a 4°C hasta su uso o se almacenaron a -80°C.

3.9.2. Ensayo de actividad ATPasa

La actividad ATPasa se cuantificó en extractos crudos y en fracciones enriquecidas de membrana según se ha descrito (Muñoz *et al.*, 1996), utilizando el método de determinación de fosfato de Chen (Chen *et al.*, 1956). Se diluyeron 20 μ l de extractos crudos ó 3 μ l de fracciones enriquecidas en membranas en 0,1M Tris-ClH pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$ hasta un volumen final de 475 μ l. Esta mezcla se pre-incubó durante 20 min a temperatura ambiente con o sin inhibidor (DCCD / compuestos antimaláricos de tipo amino-alcohol). Las preparaciones se calentaron durante 8 min a 37°C y posteriormente se inició la reacción mediante la adición de 25 μ l de 0,1M ATP. La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C, tras lo cual se paró la reacción mediante la adición de 50 μ l de 40% TCA y 950 μ l de agua. Las soluciones se centrifugaron y a 1 ml de sobrenadante se añadió 1 ml de una solución constituida por 0,5% molibdato amónico, 2% ácido ascórbico y H_2SO_4 1,5 N. La concentración de fosfato se determinó después de 90 min a temperatura ambiente mediante la absorción a OD_{725} . Como patrón se utilizaron soluciones de fosfato monopotásico de concentración conocida.

Una unidad ATPasa se definió como la actividad necesaria para la producción de 1 μ mol de fosfato inorgánico por ml en 30 minutos. El valor IC_{50} para cada fármaco antimalárico se define como la concentración de droga necesaria para inhibir la actividad ATPasa en un 50%.

3.9.3. Ensayo de medición de actividad CAT

Se utilizó un método publicado previamente que acopla la reacción de producción de acetil-CoA a una reacción colorimétrica (Ballester *et al.*, 1990). Se añadieron 50 μ l de cada extracto crudo a 0,9 ml de una solución constituida por 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 0,4 mg/ml DTNB y 0,1 mM acetil-CoA. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 min, midiéndose a partir de ese punto el incremento de OD_{412nm} cada 10 seg durante un periodo de 2 min (Δ OD₀). Se añadieron entonces 50 μ l de cloranfenicol 2 mM, registrándose nuevamente el incremento de OD_{412nm} durante otros 2 min (Δ OD_c).

La actividad específica CAT se calculó según la siguiente fórmula:

$\frac{\Delta OD_c - \Delta OD_0}{0,0136 \times \text{mg/ml proteína}} \times \text{nmoles/ml} = \text{Unidades de actividad CAT}$	$= \text{(nmoles de Cm acetilado / mg proteína)}$
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------

Donde:

Δ OD_c: incremento de OD_{412nm} entre 60 y 120 segundos después de añadir cloranfenicol.

Δ OD₀: incremento de OD_{412nm} entre 60 y 120 segundos antes de añadir cloranfenicol.

0,0136: coeficiente de extinción molar del DTNB.

3.10. METODOS INMUNOQUÍMICOS

3.10.1. Preparación de antisuero

El antisuero frente a la subunidad β de la ATPasa F₀F₁ de *S. pneumoniae* se obtuvo mediante inyección a un conejo de un homogenizado de poliacrilamida y PBS que contenía esta subunidad después de ser hiperexpresada en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) –pOPTN8. Se aplicaron tres inyecciones subcutáneas, la primera contenía coadyuvante completo de Freund y las dos últimas coadyuvante incompleto. Transcurridas tres semanas desde la última inyección, se extrajo sangre del conejo, se centrifugó y el suero se almacenó a –80°C hasta su uso. El suero frente a la autolisina fue proporcionado amablemente por Ernesto García (García *et al.*, 1982).

3.10.2. Ensayo “western blot”

Las proteínas presentes en geles de SDS-PAGE se electrotransfirieron a papel Inmobilon–P en tampón de transferencia (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM glicina, 0,1% SDS, 20% metanol) durante 1 h a 295 mA. Los sitios de unión inespecífica de la membrana se bloquearon durante 2 h a temperatura ambiente en solución de incubación (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5mM NP40 y 0,05% EDTA). Posteriormente, la membrana se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos diluidos en solución de incubación (para los

anticuerpos anti- β se hizo una dilución 1:200 y para los anticuerpos anti-LytA se hizo una dilución 1:15.000). Los complejos Ag-Ac se detectaron mediante la incubación durante 1h con proteína A acoplada a peroxidasa (Sigma) a una dilución 1:5.000. El revelado se realizó mediante ELISA empleando un reactivo dependiente de la actividad peroxidasa (Roche Molecular Biochemicals).

3.11. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Las pantallas del equipo FujiBas se visualizaron mediante el programa BasReader 2.9 (Raytest Isotopenme β geräte GmbH). Los análisis de densitometría se realizaron con el programa Gel Works ID Intermediate 3.01 (Nonlinear Dynamics Ltd.). Para el análisis de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas se empleó el programa PC/Gene 6.85 (IntelliGenetics Inc.). Los análisis estadísticos fueron realizados con GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software Inc.). El programa WU-BLAST 2.0 se utilizó para cuantificar la identidad y similaridad de las subunidades de la ATPasa de protones de distintos microorganismos.

Para la obtención tanto del CAI como el número efectivo de codones de los genes del operón se realizó un programa informático escrito en lenguaje Visual Basic. El CAI se cuantificó según el algoritmo de Sharp y Li (Sharp and Li, 1987). Como grupo de genes de referencia de elevada expresión universal se utilizaron 52 genes de proteínas ribosómicas descargados desde la página Web con las secuencias génicas de la cepa TIGR4 (<http://www.tigr.org>).

4. RESULTADOS

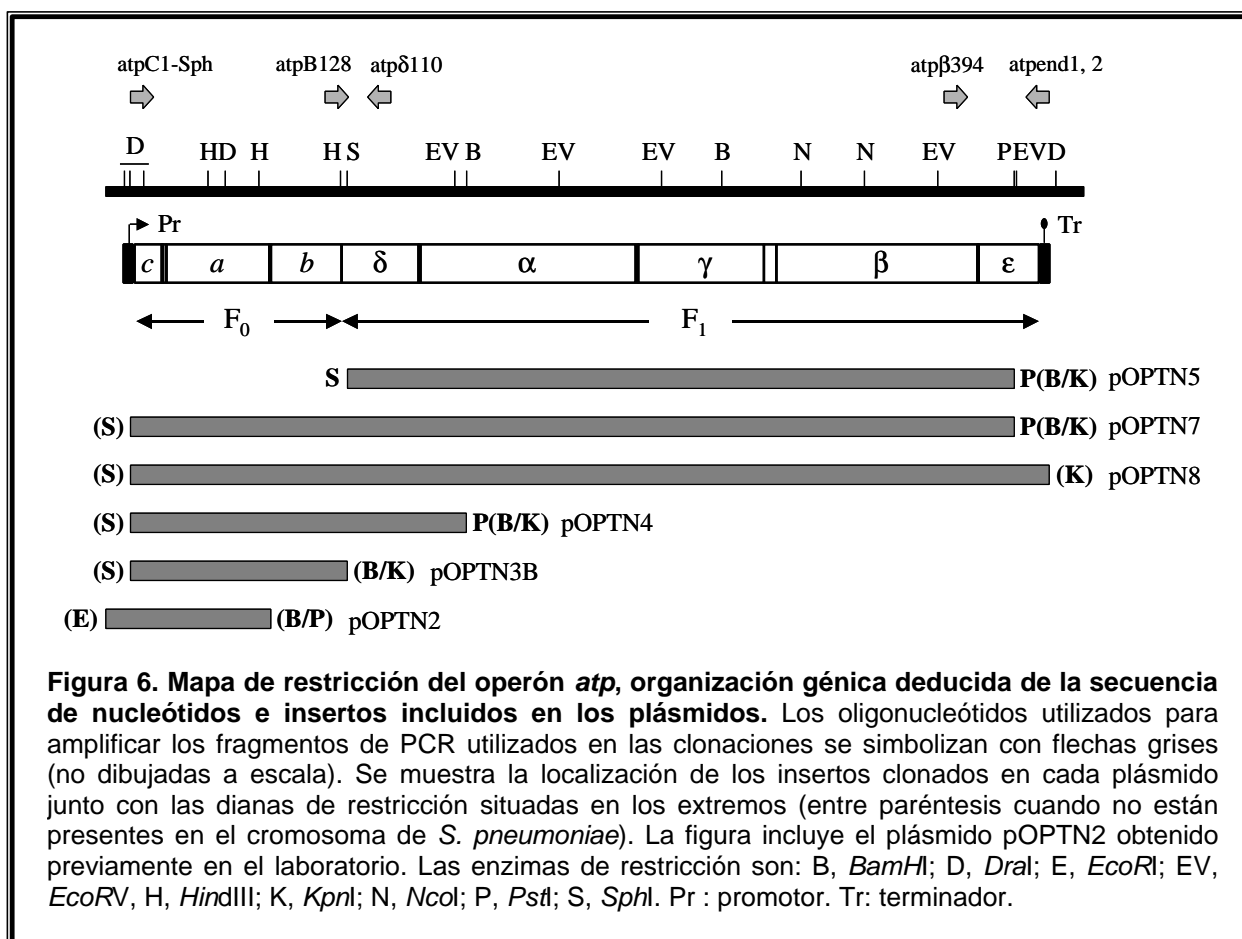
4.1. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL OPERÓN *atp* DE *S. pneumoniae*

4.1.1. Clonación del operón *atp* de *S. pneumoniae* en *E. coli*

En nuestro laboratorio se había clonado y secuenciado previamente una región del cromosoma de *S. pneumoniae* que incluía los genes que codifican las tres subunidades del complejo F_0 de la ATPasa F_0F_1 (Fenoll *et al.*, 1994). Con esta secuencia (GeneBank Z26851) se realizó una búsqueda por homología frente a la que en ese momento era la secuencia preliminar del genoma de la cepa R6 (disponible en <http://www.tigr.org>). Se encontró una identidad del 99,7% con una región de 1.008 nucleótidos dentro del contig 4182, con la que se construyó una secuencia combinada Z26851/contig 4182 que teóricamente incluía todo el operón *atp* ya que mostraba una identidad del 70% con el operón *atp* de *S. mutans*. Esta secuencia fue utilizada para diseñar oligonucleótidos que se utilizaron en reacciones de PCR destinadas a la clonación del operón *atp* de *S. pneumoniae* R6 en *E. coli*. La amplificación se llevó a cabo mediante una polimerasa con función correctora de pruebas, lo que aumenta la fidelidad de la replicación, utilizando DNA cromosómico de la cepa R6 como molde.

Inicialmente se intentó clonar todo el operón en un solo paso, incluyendo el promotor, en el plásmido pACYC1284 de *E. coli*, de número medio de copias, para evitar problemas de toxicidad por superproducción de la subunidad *a*. El inserto se generó por PCR con los oligonucleótidos *atporf1* y *atpend1* (Fig. 7). Tanto el vector como el inserto fueron digeridos con *EcoRI*, utilizando las dianas para esta enzima incluidas en los extremos de ambos oligonucleótidos. Sin embargo no se obtuvieron plásmidos recombinantes. Por ello, en lugar de amplificar con el oligonucleótido *atporf1* se utilizó *atpC1* (Fig. 7), para que el fragmento amplificado no incluyera el promotor. En este caso, tampoco se obtuvieron recombinantes por lo que se decidió clonar el operón en varios pasos para facilitar la inserción de fragmentos más pequeños dentro del vector. El primer fragmento fue amplificado con los oligonucleótidos *atpB128* y *atpend1*. El fragmento, que poseía un tamaño de la longitud esperada (4,7 Kb) fue digerido con *PaeI* (un isoesquizómero de *SphI*) y *PstI* y clonado en pUC18, plásmido de alto número de copias ya que el inserto no incluía el gen de la subunidad *a*. Sin embargo, a pesar de que se obtuvieron plásmidos recombinantes, éstos mostraron una gran inestabilidad, observándose la delección del fragmento después de sucesivas generaciones de crecimiento. Por esta razón se eligió como vector de clonación al plásmido pSU24, de número medio de copias, que además dispone de un poli-ligador asociado al promotor $\Phi 10$ de T7, cuya baja actividad en ausencia de inductor facilita el control de la expresión de los genes clonados. El inserto de 4,7 Kb fue subclonado en el plásmido pSU24 y el plásmido recombinante fue denominado pOPTN5 (Fig. 6) que incluía los genes completos *atpagb*, y secuencias parciales de los genes *atpd* y *atpe*. El siguiente paso fue la adición a este plásmido de los genes situados al inicio del operón, los cuales codifican subunidades del sector F_0 . Se amplificó un fragmento

de 1,8 Kb mediante los oligonucleótidos atpC1-Sph y atp δ 110 (Figs. 6 y 7), se digirió con *PaeI* utilizando las dianas presentes en el extremo del oligonucleótido atpC1-Sph y dentro de la secuencia amplificada, y se ligó a pOPTN5 digerido con la misma enzima. El plásmido obtenido se denominó pOPTN7 (Fig. 6), e incluía las secuencias completas de los 7 genes iniciales del operón y parte del gen atp ϵ . La orientación correcta del inserto de pOPTN7 fue comprobada por PCR y secuenciación. Finalmente, para completar la clonación de todo el operón, se amplificó un fragmento de 0,7 Kb con los oligonucleótidos atp β 394 y atp ϵ d2 (Figs. 6 y 7), que incluía tanto la parte restante del gen atp ϵ como el terminador de transcripción del operón. Este fragmento fue digerido con *PstI* y *KpnI*, dianas presentes dentro de la secuencia del fragmento y en atp ϵ d2, respectivamente, y ligado al plásmido pOPTN7 digerido previamente con las mismas enzimas. El plásmido obtenido se denominó pOPTN8 (Fig. 6) e incluía los 8 genes del operón bajo el control del promotor Φ 10 de T7.



Con el objetivo de que fueran de utilidad para experimentos posteriores, también se obtuvieron plásmidos que incluían otras combinaciones de genes. El plásmido pOPTN4 (Fig. 6) se construyó mediante la digestión del plásmido pOPTN8 con *BamHI* y posterior religación, y contenía las secuencias completas de los genes *atpCABd*. El plásmido pOPTN3B (Fig. 6)


incluía únicamente los genes del complejo F_0 , *atpCAB*, y se construyó después de delecionar *atpD* mediante la digestión de pOPTN4 con *Bam*HI, seguido de digestión parcial con *Pae*I, sellado de extremos cohesivos con DNA polimerasa del fago T4 y posterior religación.

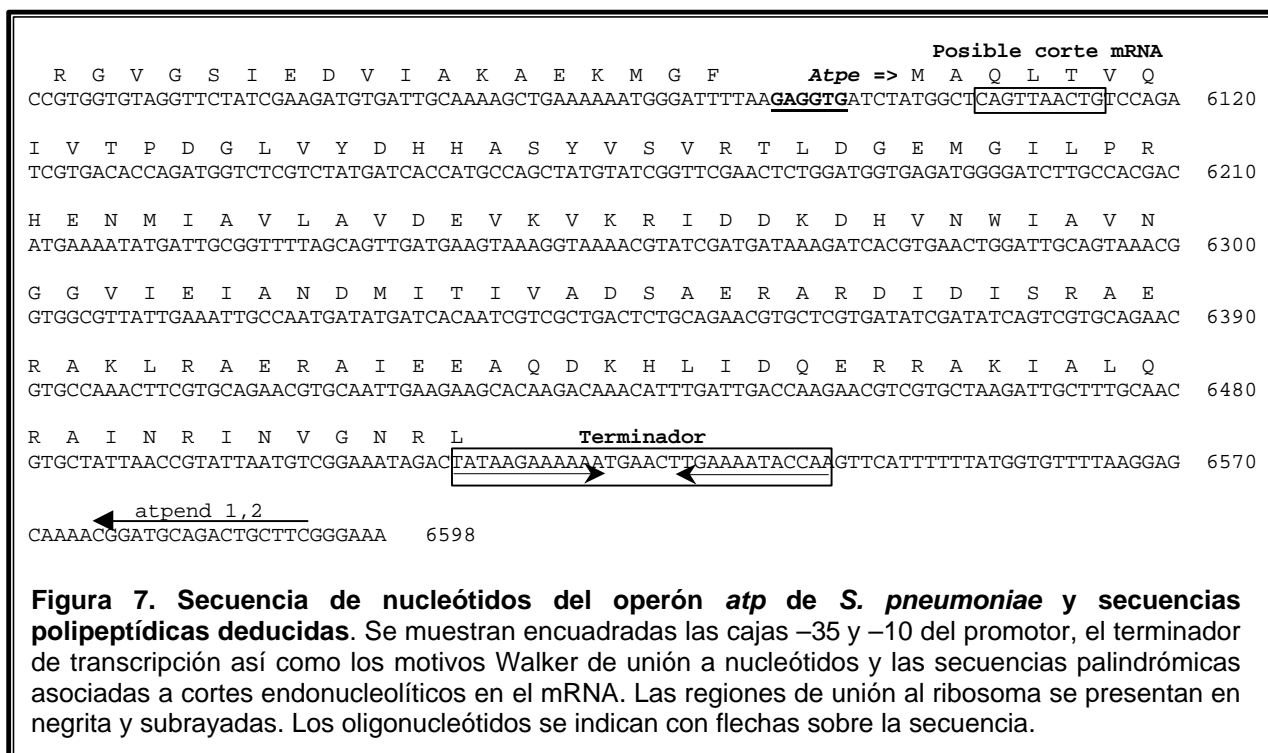
4.1.2. Secuenciación del operón *atp* de *S. pneumoniae*

Después de clonar el operón *atp* se determinó su secuencia de nucleótidos mediante cebadores internos localizados a intervalos regulares cuyo diseño fue basado en la secuencia híbrida Z26851/contig 4182, utilizando el plásmido pOPTN8 como molde (Fig. 7). La secuencia obtenida solamente mostraba cuatro cambios respecto a la secuencia del contig 4182, tres de ellos en *atpA* ($A_{311} \rightarrow G$, $G_{450} \rightarrow T$, $C_{516} \rightarrow T$) y uno en *atpβ* ($G_{967} \rightarrow A$), aunque sólo dos de ellos daban lugar a cambio de aminoácido ($\alpha E104G$ y $\beta D323N$).

<i>orf1</i> =>		<i>atporf1</i>	
Y P K K Y L D Y K S P R E D F W M A N L N L K F S K M E I I			
CTATCCTAAAAATACTTGGACTACAAGTCACCCAGAGAAGACTTCTGGATGGCTAACTTGAACCTGAAATTTAGCAAATGGAAATAAT			90
F I K R F Q			
TTTTATTAAACGCTTCCAATAGCGGTTAAAAAGTTGACA	-35		
atpC1-Sph			
M N L T F L G L C I A C M G V S V G E G L L M N G L F K			
TTTGTATGAATTAACATTTTTAGGCTTATGTATTGCCTGTATGGCGTATCTGTCGGTGAAGGTTTATGATGAATGGACTGTTAAA			270
S V A R Q P D M L S E F R S L M F L G V A F I E G T F F V T			
TCAGTAGCACGCCAACAGATATGCTTTCTGAGTTTCGTAGTTTGATGTTTTAGGTGTTCCTTTATTGAAGGAACTTTCTTTGTAAC			360
L V F S F I I K			
CTTGTCTTCTCATTATTATCAATAAATACATGGAACGAGAAGAAAAGGAGGATTTTAGATGGAAGAAAGTATTAATCCAATCATCTC			450
I G P V I F N L T M L A M T L L I V G V I F V F I Y W A S R			
TATTGGTCTGTATTCTCAATCTGACTATGTTAGCCATGACTTTGTTGATTGTGGGAGTTATTTTGTCTTTATTTATGGGCAAGCCG			540
N M T L K P K G K Q N V L E Y V Y D F V I G F T E P N I G S			
CAATATGACCTTGAAACCCAAAGGAAAGCAAAATGTACTTGAGTATGTCTATGACTTTTGTATTGGATTACAGAACCTAACATTGGTTC			630
R Y M K D Y S L F F L C L F L F M V I A N N L G L M T K L Q			
CGCTACATGAAAGATTACTCACTCTTTTCTCTTGTATTATTCCTTTTCATGGTGATTGCCAATAACCTTGGCTTAATGACAAAGCTTCA			720
T I D E T N W W S S P T A N L Q Y D L T L S F L V I L L T H			
AACGATCGATGAGACTAACTGGTGGAGTTCCCAACCGCTAATTTACAGTATGACTTAACCTTATCTTTCTTGTCTTTTGTGACACA			810
I E S V R R R G F K K S I K S F M S P V F V I P M N I L E E			
TATAGAAAGCGTTCGTCGCTGGATTAAAAAAGTATAAAATCTTTTATGAGTCTCTGTGTTTGTACACCGATGAATATCTTGGAAAGA			900
F T N F L S L A L R I F G N I F A G E V M T S L L L L L S H			
ATTTACAACTTCTTATCTTTGGCTTTGCGGATTTTCGGGAATATCTTTGCAGGAGAGGTCATGAC			990
Q A I Y W Y P V A F G A N L A W T A F S V F I S C I Q A Y V			
CCAAGCTATTTATTGGTATCCAGTAGCCTTTGGAGCTAATTTGGCTTGGACTGCATTTTCTGTCTTTATTTCCTGCATCCAAGCTTATGT			1080
F T L L T S V Y L G N K I N I E E E			
TTTTACTCTTTGACATCTGTGTATTTAGGGAATAAGATTAATATTGAAGAGGAATAGAAAGGAGTAACCTGATGCACGTAACAGTAGGTG			1170
E L I G N F I L I T G S F I L L L V L I K K F A W S N I T G			
AATTAATGGTAATTTTATTTAATCACTGGCTCTTTTATTCTTTTGCTAGTCTTGATTAATAAATTTGCATGGTCTAATATTACAGGCA			1260
I F E E R A E K I A S D I D R A E E A R Q K A E V L A Q K R			
TTTTCGAAGAAAGAGCTGAAAAAATGCTTCAGATATTGACAGAGCTGAAGAAGCCCGTCAAAAAGCAGAAGTATTGGCTCAAAAACGCG			1350
E D E L A G S R K E A K T I I E N A K E T A E Q S K A N I L			
AAGATGAATTGGCTGGTAGCCGTAAAGAAGCTAAGACAATCATGAAAATGCAAAGGAAACAGCTGAGCAAAGTAAGGCTAATATCTTAG			1440
A D A K V E A G R L K E K A N Q E I A Q N K A E A L Q S V K			
CAGATGCTAAAGTAGAAGCAGGTCGCTTAAAAGAGAAGCGAATCAAGAAATTTGCTCAGAATAAAGCTGAGGCTTTGCAAAGTGTAAAG			1530

atpB128	
G E V A D L T V S L A G K I I S K N L D S H A H K E L I D Q	
GCGAGGTGGCAGATTTGACCGTTAGTCTCGCTGGTAAAATCATCTCAAAAAACCTTGACAGTCATGCTCATAAGAACTCATTGATCAGT	1620
atpd =>	
Y I D Q L G E A M D K K T A K V I E K Y S M P F V Q L V I E	
ATATCGATCAGCT AGGAG AAGCCTAATGGACAAGAAAACAGCAAAGGTAATTGAAAAATACAGCATGCCTTTTGTCCAATTAGTGATTGA	1710
K G E E D R I F S D L D Q I K Q V A E E T G L P S F L A Q V	
AAAAGGAGAAGAGACCGGATTTTTTCAGACTTGGATCAAATCAAGCAAGTCGCAGAAGAAACGGGCTTACCTTCTTTTTTAGCTCAGGT	1800
A V D E S D K E K T V G F F Q D S V S P L M Q N F I Q V L I	
GGCAGTTGATGAGTCTGATAAGGAAAAACAGTTGGTTTCTTTCAAGACTCTGTCTCACCTTTAATGCAAACTTTATTAGGTTCTGAT	1890
Y N H R A N L F Y D V L V D C L N R L E K E T N R F E V T I	
TTACAATCACAGAGCAAATCTTTTTTATGATGTGCTTGTAGATTGCTTGAACCGACTTGAAAAAGAAACAAATCGATTGAAAGTGACGAT	1980
atpδ110	
T S A H P L T D E Q K T R L L P L I E K K M S L K V R S V K	
TACGTCTGCTCATCTCTAACTGATGAACAGAAGACTCGTTTGTCCCTTTGATTGAGAAAAAATGTCTCTGAAAGTAAGGAGTGATAA	2070
E Q I D E S L I G G F V I F A N H K T I D V S I K Q Q L K V	
AGAACAATCGATGAAAGTCTCATTGGTGGTTTTGTCAATTTTTGCCAATCACAAAGACAATTGATGTGAGTATTAACAACAACCTTAAAGT	2160
V K E N L K atpa => M A I N A Q E I S A L I K Q Q I E N	
TGTTAAAGAAAATTTGAAATG AAAGTGGT TTCTTATGGCAATTAACGCACAAGAAATCAGCGCTTTAATTAAGCAACAATGAAAAT	2250
F K P N F D V T E T G V V T Y I G D G I A R A H G L E N V M	
TTCAAACCAATTTGATGTGACTGAAACAGGTGTTGTAACTATATCGGGGACGGTATCGCGCTGCTCACGGCCTTGAAAATGTCATG	2340
S G E L L N F E N G S Y G M A Q N L E S T D V G I I I L G D	
AGTGGAGAGTTGTTGAATTTTGAACCGCTCTTATGGTATGGCTCAAACCTTGGAGTCAACAGACGTTGGTATTATCATCTAGGTGAC	2430
F T D I R E G D T I R R T G K I M E V P V G E S L I G R V V	
TTACAGATATCCGTGAAGGCGATACAATCCGCGTACAGGAAAATCATGGAAGTCCCTGTAGGTGAAAGTCTGATTGGTCGTGTTGTG	2520
D P L G R P V D G L G E I H T D K T R P V E A P A P G V M Q	
GATCCGCTTGGTCTCCAGTTGACGGTCTTGGAGAAATCCACACTGATAAACTCGTCCAGTAGAAGCACCAGCTCCTGGTGTATGCAA	2610
R K S V S E P L Q T G L K A I D A L V P I G R G Q R E L I I	
CGTAAGTCTGTTTCAGAACCAATTGCAAACCTGGTTTGAAGCTATGACGCCCTTGTACCGATTGGTCTGGTCAACGTGAGTTGATTATC	2700
Walker A	
G D R Q T G K T T I A I D T I L N Q K D Q D M I C I Y V A I	
GGTGACCGTCAGACAGGAAAACAACCAATTCGCGATTGATAACAATCTTGAACCAAAAAGATCAAGATATGATCTGTATCTACGTCGCGATT	2790
G Q K E S T V R T Q V E T L R Q Y G A L D Y T I V V T A S A	
GGACAAAAGAATCAACAGTTTCGTACGCAAGTAGAAACACTTCCTCAGTACGGTGCCTTGGACTACACAATCGTTGTGACAGCCTCTGCT	2880
S Q P S P L L F L A P Y A G V A M A E E F M Y Q G K H V L I	
TCACAACCATCTCCATTGCTCTTCTAGCTCCTTATGTGTTGGGTTGCTATGGCGGAAGAATTTATGTATCAAGGTAAGCATGTTTGGATT	2970
Walker B	
V Y D D L S K Q A V A Y R E L S L L L R R P P G R E A F P G	
GTATACGATGATCTATCAAAACAAGCGGTAGCTTATCGTGAACGTGCTCTTGTCTCGTCTCCAGGTCTGAAAGCCTTCCAGGG	3060
D V F Y L H S R L L E R S A K V S D E L G G G S I T A L P F	
GATGTTTTCTATCTCCACAGCCGTTTGTCTGAGCGCTCAGCTAAAGTTTCTGATGAACCTGGTGGTGGATCAATTACAGCCCTACCATT	3150
I E T Q A G D I S A Y I A T N V I S I T D G Q I F L G D G L	
ATCGAGACACAAGCAGGAGATATCTCAGCCTATATCGCAACCAACGTGATTTCTATCACTGATGGACAAATCTTCTTGGCGATGGCCTC	3240
F N A G I R P A I D A G S S V S R V G G S A Q I K A M K K V	
TTCAATGCAGGTATTCGTCCAGCCATCGATGCGGGTTCATCTGTATCTCGTGTAGGTGGTTCTGCACAAATCAAAGCCATGAAGAAGGT	3330
A G T L R I D L A S Y R E L E A F T K F G S D L D A A T Q A	
GCTGGTACACTTCGTATCGACCTTGCTTCATACCGTGAGTTGGAAGCCTTACTAAGTTTGGTTCTGACTTGGACGCAGCAACACAGGCT	3420
K L N R G R R T V E V L K Q P V H K P L P V E K Q V T I L Y	
AAGTTGAACCGTGGACGTCGTACCGTTGAGGTCTTGAACAACCTGTTCAAAACCATTACCTGTTGAGAAAACAAGTAACCATTCTTTAT	3510
A L T H G F L D T V P V D D I V R F E E E F H A F F D A Q H	
GCTTTGACACATGGTTTTCTGGATACTGTTCCAGTAGATGATATTGTTTCTGTTTCGAGGAAGAGTTCCATGCCTTCTTTGATGCTCAACAT	3600
P E I L E T I R D T K D L P E E A V L D A A I T E F L N Q S	
CCAGAGATTTTGGAAACCAATTCGTGATCAAAAAGACTTGCCAGAAGAAGCAGTCTGGATGCTGCAGTTACAGAGTTTCTCAATCAATCT	3690
S F Q atpg => M A V S L N D I K T K I A S T K N T S Q I	
AGCTTCCAATAAGAATG GAGGTG TCAGATGGCAGTATCTCAATGATATTAACAACAAAATCGCCTCAACAAAAATACGAGTCAAATC	3780

T N A M Q M V S A A K L G R S E E A A R N F Q V Y A Q K V R ACTAATGCCATGCAAATGGTATCGGCTGCTAAGCTAGTTCGTTCTGAAGAAGCTGCTCGCAACTTCCAAGTTTACGCTCAGAAAGTGCCT	3870
K L L T D I L H G N G A G A S T N P M L I S R S V K K T G Y AAACTTTTGACAGATATCCTTCATGGTAATGGAGCTGGTGCTCAACTAATCCGATGTTGATTAGCCGTTCTGTGAAGAAGACAGGCTAT	3960
I V I T S D R G L V G G Y N S S I L K A V M E L K E E Y H P ATCGTTACACTTCAGACCGCGTTTGGTTGGAGGTTATAATTCTCTATTTTGAAGCTGTTATGGAGTTGAAAGAAGATAACCACCCA	4050
D G K G F E M I C I G G M G A D F F K A R G I Q P L Y E L R GACGGTAAAGTTTGAATGATCTGTATCGGTGGGATGGGAGCTGATTTCTTTAAGGCTCGCGGTATTCAACCCTTTATGAATTACGT	4140
G L S D Q P S F D Q V R K I I S K T V E M Y Q N E L F D E L GGTTGTGACACCACTAGCTTTGATCAAGTTCGTAAGATTATTTCAAAAAGCTGTTGAAATGTACCAAAATGAACTCTTTGATGAGCTT	4230
Y V C Y N H H V N T L T S Q M R V E Q M L P I V D L D P N E TATGTTTGTCTACAACCACCATGTCAATACGCTAACCAGTCAAATGCGTGTGGAACAAATGCTCCGATTGTTGACTTGGATCCAAATGAA	4320
A D E E Y S L T F E L E T S R E E I L E Q L L P Q F A E S M GCGGATGAAGAGTACAGCTTGCATTTTGAATTGAAACAGCCGAGAAGAAATCTGGAGCAGTTGTTGCCTCAGTTTGCAGAAAGTATG	4410
I Y G A I I D A K T A E N A A G M T A M Q T A T D N A K K V ATTTACGGTGCCATTATCGATGCCAAGACAGCTGAGAATGCTGCGGGCATGACAGCCATGCAAACAGCGACAGATAATGCTAAGAAAGTC	4500
I N D L T I Q Y N R A R Q A A I T Q E I T E I V A G A S A L ATCAATGATTTGACAATTCAGTATAACCGTGCCAGACAGCGCGGATTACACAAGAAATTACAGAAATCGTAGCAGGTGCTAGTGCCTTA	4590
E GAATAGGCTCTAGTCCAGCTCGTATGAAAATGAACTTAGGACCTAGTTGAGCTAGGAACCGACAGTATCTTATATAGAAT <u>AGGAG</u> AAGGA	4680
M S S G K I A Q V I G P V V D V L F A A G E K L P E I N N A GATGAGTTCAGGTAAATTTGCTCAGGTTATCGGTCCCCTGTAGACGTTTGTGTTGCAGCAGGGGAAAACTTCTGAGATTAACAATGC	4770
L V V Y K N D E R K T K I V L E V A L E L G D G M V R T I A ACTTGTCTCTACAAAAATGACGAAAGAAAAACAAAAATCGTCCTTGAAGTAGCCTTGGAGATTAGGAGATGGTATGGTTCGTACTATCGC	4860
M E S T D G L T R G M E V L D T G R P I S V P V G K E T L G CATGGAATCAACAGATGGGTTGACTCGTGAATGGAAGTATTGGACACAGGTCGTCCAATCTCTGTACCAGTAGTAAAGAACTTTGGG	4950
R V F N V L G D T I D L E A P F T E D A E R Q P I H K K A P ACGTGTCTTCAACGTTTTGGGAGATACCATTGACTTGAAGCTCCTTTTACAGAAGACGCAGAGCGTCAGCCAATTCATAAAAAAGCTCC	5040
T F D E L S T S S E I L E T G I K V I D L L A P Y L K G G K AACTTTTGATGAGTTGTCTACCTCTTCTGAAATCCTTGAACAGGGATCAAGGTTATTGACCTTCTTGCCCTTACCTTAAAGGTGGTAA	5130
Walker A V G L F <u>G G A G V G K T</u> V L I Q E L I H N I A Q E H G G I S AGTTGACTTTTTCGGTGGTCCCGGAGTTGGTAAAACTGTCTTAATCCAAGAATTGATTACAACATTGCCAAGAGCACGGTGGTATTTTC	5220
V F A G V G E R T R E G N D L Y W E M K E S G V I E K T A M AGTATTTGCTGGTGTGGGGAACGTACTCGTGAGGGGAATGACCTTTACTGGGAATGAAAGAATCAGGCGTTATCGAGAAAACAGCCAT	5310
V F G Q M N E P P G A R M R V A L T G L T I A E Y F R D V E GGTCTTTGGTCAGATGAATGAGCCACCAGGAGCACGTATGCGTGTGCGCTTACTGGTTTGACAATCGCTGAATACTTCCGTGATGTGGA	5400
Walker B G Q D V <u>L L F I D</u> N I F R F T Q A G S E V S A L L G R M P S AGGCCAAGACGTGCTTCTTTATCGATAATATCTTCCGTTTCACTCAGGCTGGTTCAGAAGTATCTGCCCTTTTGGGTCGTATGCCATC	5490
A V G Y Q P T L A T E M G Q L Q E R I T S T K K G S V T S I AGCCGTTGGTTACCAACCAACTTGTACGGAATGGGTCAATTGCAAGAAGCTATCACATCAACCAAGAAGGGTCTGTAACTCTAT	5580
Q A I Y V P A D D Y T D P A P A T A F A H L D S T T N L E R CCAGGCTATCTATGTGCCAGCGATGACTATACTGACCAGCGCCAGCAACAGCCTTCGCTCACTTGGATTCAACAACAACTTGAACG	5670
K L V Q L G I Y P A V D P L A S S S R A L A P E I V G E E H TAAGTTGGTACAATTGGGTATCTACCCAGCCGTTGACCCACTTGCTTCAAGCTCACGTGCCTTGGCACCTGAAATCGTTGGAGAAGAGCA	5760
Y A V A A E V K R V L Q R Y H E L Q D I I A I L G M D E L S CTATGCAGTTGCTGCTGAAGTAAACGTGCTTCAACGTTACCATGAATTGCAAGATATCATTGCTATCCTTGGTATGGATGAGCTTTC	5850
atpβ394 D E E K T L V A R A R  I Q F F L S Q N F N V A E Q F T G Q TGATGAAGAAAAGACCTTGGTTGCTCGCGCCGTCGTATCCAGTTCCTTCTGTACAAAACCTTCAACGTTGCGGAACAATTTACTGGTCA	5940
P G S Y V P V A E T V R G F K E I L D G K Y D H L P E D A F GCCAGTTCTTATGTTCCAGTTGCTGAAACTGTACGTGGCTTTAAGGAAATCCTTGATGGTAAATACGACCCTTCCAGAAGATGCCTT	6030



4.1.3. Análisis de la secuencia de nucleótidos

4.1.3.1. Características generales

Dentro de la secuencia se encontraron ocho ORFs con un codon de inicio (ATG en todos los casos) y otro de terminación (TAA en cinco casos y TAG en tres) precedidos de una secuencia de unión al ribosoma (RBS) a una distancia apropiada del codon de inicio. Los ORFs compartían una elevada homología con los genes que codifican las distintas subunidades de la ATPasa F_0F_1 de procariontes, especialmente con los de otros estreptococos (datos no mostrados). Esta elevada homología permitió la asignación de todos los genes y la determinación del orden génico dentro del operón que en el caso de *S. pneumoniae* fue *atpCABdagbe*. Delante del primer gen se encontraron secuencias similares a las consenso para las cajas -10 y -35 de un promotor típico. Después del codon de paro del último ORF se encontró un terminador independiente del factor rho, estructuralmente estable, con una energía libre de -17.2 Kcal según estimó el programa RNAFOLD del PCGene. No se encontraron secuencias dentro de las regiones intergénicas que pudieran hacer sospechar la presencia de promotores internos. De hecho, las secuencias intergénicas fueron muy cortas (< 35 pb) con excepción a la presente entre *atpg* y *atpb*, que fue de 85 pb. El codon de paro de *atpb* solapa con el de inicio de *atpd*, por lo que podría existir un fenómeno de traducción acoplada entre estos dos genes, como se ha postulado para *L. lactis* y *S. faecalis* (Koeblmann *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 1992).

Teniendo en cuenta la conservación de muchas de las propiedades del operón dentro de los procariontes y el modo de acción conservado de la enzima, es razonable pensar que una

estequiometría del complejo similar se ha mantenido en el resto de los procariotas. De hecho se ha publicado que la estructura terciaria de la ATPasa en estreptococos es similar a la de *E. coli* (Sutton and Marquis, 1987). Teniendo en cuenta que *S. pneumoniae* es una bacteria de rápido crecimiento, se analizó el operón *atp* con el objetivo de encontrar pruebas de la existencia de un proceso de traducción diferencial cuantitativa de las diferentes subunidades, que debía propiciar unos niveles de traducción con subidas y bajadas de tres veces a lo largo del operón. Como se mencionó en la introducción, este fenómeno ajusta la cantidad de subunidades traducidas a la estequiometría del complejo con el objetivo de producir un ahorro metabólico.

Aunque no existen ni secuencias palindrómicas ni secuencias invertidas repetidas en ninguna de las regiones intergénicas, con excepción del terminador de transcripción, se encontraron secuencias invertidas repetidas y palindrómicas de al menos 8 bases dentro de los genes. Destacan dos secuencias palindrómicas muy similares, una de 8 pb dentro de la segunda mitad de *atpA* (GTCATGAC) y otra de 10 pb al inicio de *atpe* (CAGTTAACTG) (Fig. 7). Estas secuencias podrían ser lugares de procesamiento del mRNA por parte de la RNasa E, puesto que dichas secuencias se encuentran en el operón *atp* de *E. coli* en posiciones equivalentes a éstas (Patel and Dunn, 1995; Patel and Dunn, 1992), o bien ser sitios de procesamiento de la RNasa III, que reconoce estructuras secundarias en el RNA. En *E. coli*, el procesamiento endonucleolítico a nivel de *atpA* contribuye a mantener la estequiometría del complejo puesto que sólo es necesaria una copia de la subunidad *a* y, por otra parte, evita la toxicidad celular asociada a un exceso de dicha subunidad (Kanazawa *et al.*, 1984; Fenoll *et al.*, 1994) (Tabla VII). Un exceso de subunidad *a* puede afectar al ensamblaje del sector F₀ (Kanazawa *et al.*, 1984) y alterar las propiedades de la membrana debido a su fuerte carácter hidrofóbico (von Meyenburg *et al.*, 1985). La función del corte endonucleolítico en *atpe* sería desestabilizar el mRNA, eliminando la estabilidad proporcionada por el terminador, y hacerlo de este modo accesible a la exonucleasas que lo degradarían. La subunidad ϵ es necesaria en una unidad por lo que el corte endonucleolítico podría contribuir a optimizar la cantidad de producto sintetizado según la estequiometría del complejo.

Se analizaron las secuencias RBS ya que su grado de complementariedad con la del extremo 3' del rRNA 16S ha sido clásicamente relacionada con la eficiencia de la iniciación de la traducción en bacterias (Steitz, 1979). No se encontraron diferencias significativas en las secuencias RBS de los distintos genes del operón ni en su distancia al codon de inicio. Todos los genes del operón comienzan con el codon ATG por lo que este factor tampoco influiría en una posible expresión diferencial. Se ha postulado que la cuarta base del gen (la primera después del codon de inicio) puede ser importante para el inicio de la traducción, ya que en el caso de ser A la unión del formil-metionil-tRNA estaría favorecida puesto que el nucleótido

adyacente al anticodon es U, tanto en *E.coli* (Taniguchi and Weissmann, 1979) como en *S. pneumoniae*. De acuerdo con esta hipótesis, *atpC* y *atpb* (ambos con alta estequiometría) tienen A como cuarta base.

4.1.3.2. Preferencia en la utilización de codones

Se calcularon dos parámetros por el método de Sharp and Li (Sharp and Li, 1987): *w* (adaptación relativa de un codon) y CAI ("codon adaptation index", índice de adaptación de codones de un gen). Para la obtención de los valores *w* se utilizó un grupo de referencia constituido por genes que codifican proteínas ribosómicas (Tabla VI), genes considerados como altamente expresados en bacterias. El valor *w* es el cociente entre el número de veces que se utiliza un determinado codon y el número de veces que se utiliza el codon más común de entre todos los isocodones que codifican el mismo aminoácido, estando su valor comprendido entre 0 y 1 (0,001 en el caso de no encontrarse representado el codon). Se utilizaron los datos de secuencia de *S. pneumoniae* TIGR4 y se eligieron 52 de los 56 genes que codifican proteínas ribosómicas, después de excluir cuatro genes (*prmA*, *rpsN*, *sp0555* y *sp0973*) que mostraron un perfil de codones diferente (valores CAI values <0.5).

Tabla VI. Tabla de referencia de valores *w* para codones del genoma completo y de los 52 genes de proteínas ribosómicas.

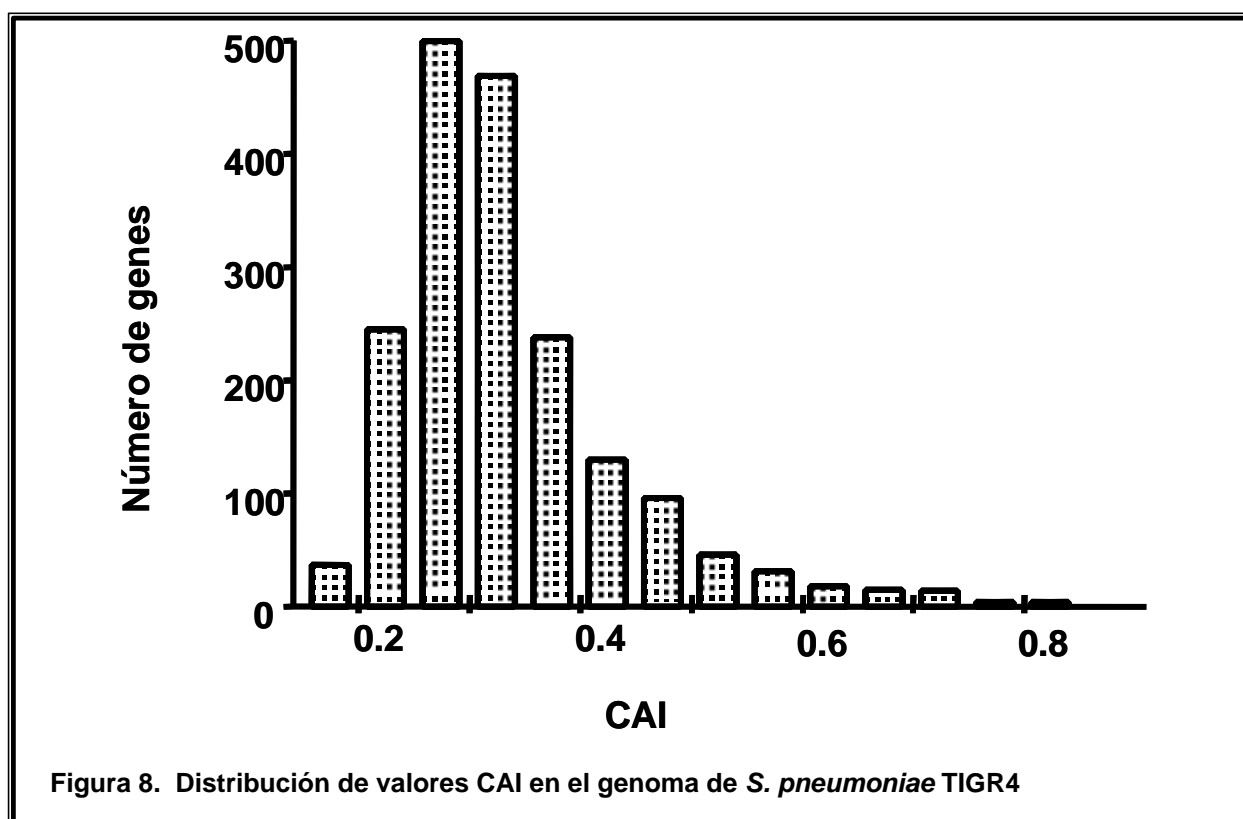
GEN ^a		RP		GEN		RP		GEN		RP		GEN		RP		
Phe	UUU	1.000	0.612	Ser	UCU	1.000	0.594	Tyr	UAU	1.000	0.263	Cys	UGU	1.000	1.000	
	UUC	0.471	1.000		UCC	0.260	0.001		UAC	0.450	1.000		UGC	0.562	1.000	
Leu	UUA	0.459	0.044		UCA	0.851	1.000	Stop	UAA	-	-	Stop	UGA	-	-	
	UUG	1.000	0.625		UCG	0.260	0.012		UAG	-	-		UGG	1.000	1.000	
Leu	CUU	0.487	1.000	Pro	CCU	0.889	0.300	His	CAU	1.000	0.228	Arg	CGU	1.000	1.000	
	CUC	0.271	0.040		CCC	0.160	0.001		CAC	0.496	1.000		CGC	0.312	0.233	
	CUA	0.244	0.044		CCA	1.000	1.000		Gln	CAA	1.000		1.000	CGA	0.212	0.005
	CUG	0.244	0.001		CCG	0.228	0.035		CAG	0.612	0.016		CGG	0.185	0.002	
Ile	AUU	1.000	0.386	Thr	ACU	1.000	1.000	Asn	AAU	1.000	0.236	Ser	AGU	0.851	0.085	
	AUC	0.526	1.000		ACC	0.719	0.018		AAC	0.493	1.000		AGC	0.481	0.224	
	AUA	0.115	0.011		ACA	1.000	0.649		Lys	AAA	1.000		1.000	Arg	AGA	0.312
Met	AUG	1.000	1.000		ACG	0.408	0.031		AAG	0.753	0.082		AGG	0.063	0.001	
Val	GUU	1.000	1.000	Ala	GCU	1.000	1.000	Asp	GAU	1.000	1.000	Gly	GGU	1.000	1.000	
	GUC	0.579	0.097		GCC	0.498	0.069		GAC	0.515	0.773		GGC	0.341	0.119	
	GUA	0.521	0.559		GCA	0.571	0.714		Glu	GAA	1.000		1.000	GGA	0.732	0.514
	GUG	0.552	0.126		GCG	0.308	0.106		GAG	0.612	0.111		GGG	0.368	0.030	

^a GEN, genoma completo. RP, proteínas ribosómicas.

La comparación de los valores *w* del genoma completo y de los genes de las 52 proteínas ribosómicas mostraron en éstos últimos 21 codones con valores *w* inferiores a 0.1 (10 veces menor que el isocodon preferido). Este dato sugiere una fuerte selección de codones

en los genes de las 52 proteínas ribosómicas y validan la tabla como tabla de referencia. Los valores w están comprendidos entre 0 y 1.

Posteriormente se calcularon los valores CAI. El valor CAI de un gen se define como la media geométrica de los valores w de todos sus codones y también está comprendido entre 0 y 1. De un total de 2.240 ORFs de *S. pneumoniae* TIGR4, solamente se seleccionaron los 1.864 ORFs con un tamaño entre 80 y 1.500 codones, una vez excluidos los genes utilizados para construir la tabla de referencia. La distribución de valores CAI fue unimodal (Fig. 8), y variaron en un rango de 0,154 y 0,866, con un valor medio de 0,336.



Cuando se analizaron los genes del operon *atp* se observó que los que codifican las subunidades α y β presentaron valores CAI más elevados que el resto de los genes, además de poseer un menor porcentaje de codones raros en su secuencia y un menor número de codones diferentes respecto a su longitud que el resto de los genes del operón (Tabla VII). Por otro lado, *atpA* se mostró como el gen menos optimizado respecto al uso de codones en comparación con el grupo de referencia, además de utilizar más codones diferentes, justificado por el hecho de codificar una subunidad de baja estequiometría y potencialmente tóxica.

Tabla VII. Características de los genes del operón *atp* y relación con la estequiometría del complejo.

Subunidad	Estequiometría	nt ^a	Cortes ^b	4 ^a Base	CAI (cr) ^c	Nc
<i>c</i>	8–12	201	–	A	0,416 (8,8%)	32
<i>a</i>	1	718	SÍ	G	0,339 (11,7%)	56
<i>b</i>	2	495	–	C	0,434 (9,6%)	43
δ	1	537	–	G	0,372 (9,6%)	48
α	3	1506	–	G	0,497 (5,3%)	53
γ	1	879	–	G	0,422 (7,2%)	56
β	3	1407	–	A	0,547 (4,6%)	50
ϵ	1	420	SÍ	G	0,427 (8,4%)	45

^a nt: tamaño del gen en nucleótidos incluyendo el codon de paro

^b Cortes: posibles cortes endonucleolíticos en el mRNA

^c cr: % de codones raros. Se consideran como codones raros aquéllos con valores $w < 0.05$ en el grupo de genes de proteínas ribosómicas utilizadas en la Tabla de referencia (17 del total de 61) .

4.1.4 Análisis de las secuencias de aminoácidos

4.1.4.1. Cálculos de homologías

Se realizó una comparación entre las secuencias polipeptídicas deducidas para las subunidades de la ATPasa F_0F_1 de *S. pneumoniae* y las presentes en las bases de datos (Tabla VIII).

Tabla VIII. Homología entre las secuencias polipeptídicas deducidas de las subunidades de la ATPasa F_0F_1 de *S. pneumoniae* y de otras bacterias a distancia filogenética creciente.

Subunidad	% Identidad (% similaridad) ^a Especie bacteriana					
	<i>S. sanguis</i>	<i>S. bovis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
<i>c</i>	63(84)	56(76)	53(73)	31(59)	33(59)	27(58)
<i>a</i>	65(79)	50(71)	50(74)	44(66)	36(58)	27(50)
<i>b</i>	70(84)	62(77)	57(76)	44(68)	36(64)	27(54)
δ	54(76)	39(58)	38(62)	26(52)	24(45)	25(47)
α	93(95)	87(93)	85(93)	80(89)	75(87)	53(70)
γ	85(94)	73(85)	67(83)	67(77)	49(73)	34(60)
β	96(99)	88(93)	90(95)	87(94)	78(87)	66(80)
ϵ	80(92)	64(86)	65(88)	62(79)	42(61)	25(53)

^a La identidad y similaridad se calculó mediante el programa WU-BLASTP 2.0 del EBI (European Bioinformatics Institute) con los valores por defecto, utilizando en las bases de datos Swissprot, Trembl y Tremblnew, y desactivando la opción de aplicación de filtros (<http://blast.suwtl.edu>; W. Gish, 1996–1999).

Las subunidades de la ATPasa F_0F_1 de *S. sanguis*, un organismo que comparte nicho ecológico con *S. pneumoniae*, fueron las que mostraron mayor homología. Ambas bacterias viven en ambientes menos ácidos que los otros 2 estreptococos con los que presenta elevada homología, *S. mutans* y *S. bovis*. Las subunidades de F_0 están menos conservadas que las de F_1 , exceptuando la subunidad δ , que es la menos conservada de todas las subunidades, lo que se ha atribuido a su función de unión de los sectores F_0 y F_1 (Müller *et al.*, 1999). Las subunidades de F_0 de *S. mutans* y *S. bovis*, estreptococos muy acidófilos, compartían residuos diferentes a los que existen en *S. pneumoniae* y *S. sanguis*, y más especialmente en el caso de la subunidad *c* para la que mostrarán una identidad del 92%, muy por encima de las otras dos subunidades del complejo F_0 , que no superaron una identidad del 75% (datos no mostrados).

4.1.4.2. Comparación de las subunidades de *S. pneumoniae* y las de *E. coli*. Localización de estructuras secundarias y residuos implicados en estructura y función.

A través de numerosos estudios basados en el análisis de mutantes, marcaje con moléculas hidrofóbicas y detección con anticuerpos se han asignado características estructurales y funcionales a muchos residuos de las distintas subunidades de la ATPasa F_0F_1 de *E. coli*. En la Tabla IX se detallan cuales de estos residuos están conservados en *S. pneumoniae*.

4.1.4.2.1. Subunidad *c*

Su perfil de hidrofobicidad muestra claramente la presencia de dos α -hélices de membrana. Según datos experimentales previos, tras el plegamiento de la proteína, ambas α -hélices se enfrentarían situando el residuo esencial cE52 en proximidad de los residuos cG20 y cM23 asociados a Qin^R (Fig. 9A) (Muñoz *et al.*, 1996). Este perfil es compatible con la hipótesis de que residuos enfrentados en la proximidad de cE52 forman un bolsillo estructural, que en el caso de *S. pneumoniae* incluye al residuo cD19 en el lugar equivalente al aminoácido cI28 de *E. coli*. Esta sustitución es poco frecuente según la matriz BLOSUM62. La posible implicación funcional de este segundo residuo con grupo carboxilo se discute más adelante.

4.1.4.2.2. Subunidad *a*

Esta subunidad es 33 aa menor en *S. pneumoniae* que en *E. coli*, aunque los aa adicionales se encuentran principalmente en el extremo N-terminal de la proteína, la menos conservada. La subunidad *a* de *S. pneumoniae* tiene una elevada hidrofobicidad, con un

número de α -hélices de membrana entre cuatro y siete según los parámetros de análisis (Fig. 9B) al igual que como se ha observado en *E. coli*. El fuerte carácter hidrofóbico de la subunidad *a* ha impedido la determinación de su estructura por cristalografía de rayos X, aunque el modelo de su estructura aceptado actualmente consta de cinco α -hélices de membrana. (Hatch *et al.*, 1995; Jiang and Fillingame, 1998) A pesar de ser una subunidad poco conservada en general, existe una gran homología en las dos últimas α -hélices de membrana respecto a la misma subunidad de *E. coli*, que son las que se asocian principalmente a la funcionalidad de la enzima al ser las que interaccionan con la subunidad *c*, estando conservados la mayoría de los residuos funcionales como es el caso de aR170 (Tabla IX).

4.1.4.2.3. Subunidad *b*

Su perfil de hidrofobicidad muestra la presencia de un dominio hidrofóbico en el extremo N-terminal y de una parte hidrofílica que comprende la mayor parte de la proteína (Fig. 9C), al igual que en la misma subunidad en *E. coli*. Se conservan cuatro residuos, uno dentro del dominio hidrofóbico implicado en la conexión con la subunidad *a* (G10), lo que indica que esta subunidad también podría ser importante para el mantenimiento de la correcta estructura del complejo F_0 . Los otros residuos conservados, aV119, aS124 y aG127, se han relacionado con la conexión a F_1 , la otra función importante de esta subunidad.

4.1.4.2.4. Subunidades del sector F_1

Lo más destacable es la presencia, tanto en la subunidad α como en la β , de los motivos Walker A (GXXXXGKT; donde X es un aminoácido cualquiera) y B (L-hidrofóbico-hidrofóbico-hidrofóbico-D), implicados en la unión a nucleótidos y presentes en distintos grupos de proteínas que comparten esta función (Walker *et al.*, 1982). Esto confirma que la subunidad α también colabora uniendo nucleótidos en la ATPasa F_0F_1 de *S. pneumoniae*. El motivo Walker A se encuentra entre las posiciones 169 y 176 en la subunidad α (GDRQTGKT) y entre las posiciones 155 y 162 en la subunidad β (GGAGVGKT). El motivo Walker B se encuentre entre las posiciones 257 y 261 en la subunidad α (LIVYD) y entre las posiciones 245 y 249 en la subunidad β (LLFID) (Fig. 7).

Tabla IX. Residuos del sector F₀ de *S. pneumoniae* conservados en *E. coli* con función asignada ^a

Subunidad	Residuo en		Función	Referencia
	<i>E.coli</i>	<i>S. pneumoniae</i>		
AtpC	G23	G14	Bolsillo de unión al protón	(Fimmel <i>et al.</i> , 1990)
	A24	V15	Bolsillo de unión al protón	(Fillingame <i>et al.</i> , 1991)
	A25	S16	Bolsillo de unión al protón	(Fimmel and Fordham, 1989)
	G29	G20	Bolsillo de unión al protón	(Fimmel and Norris, 1989)
	L31	L22	Bolsillo de unión al protón	(Fimmel <i>et al.</i> , 1990)
	G38	S29	Bolsillo de unión al protón	(Fimmel <i>et al.</i> , 1990)
	A40	A31	Conexión con subunidad ϵ	(Zhang and Fillingame, 1995)
	R41	R32	Conexión con subunidad ϵ	(Fraga <i>et al.</i> , 1994)
	Q42	Q33	Conexión con subunidad ϵ	(Zhang and Fillingame, 1995)
	P43	P34	Conexión con subunidad ϵ	(Zhang and Fillingame, 1995)
	D44	D35	Conexión con subunidad γ	(Watts <i>et al.</i> , 1995)
	F54	F45	Bolsillo de unión al protón	(Girvin and Fillingame, 1994)
	M57	V48	Bolsillo de unión al protón	(Girvin and Fillingame, 1994)
	G58	A49	Bolsillo de unión al protón	(Girvin and Fillingame, 1994)
D61	E52	Captación del protón	(Sebald <i>et al.</i> , 1980)	
AtpA	E196	E160	Translocación del protón	(Fillingame, 1990)
	S206	S166	Translocación del protón	(Cain and Simoni, 1986)
	L207	L167	Conexión con subunidad <i>c</i>	(Jiang and Fillingame, 1998)
	R210	R170	Translocación del protón	(Hatch <i>et al.</i> , 1995)
	N214	N174	Conexión con subunidad <i>c</i>	(Jiang and Fillingame, 1998)
	A217	A177	Translocación del protón	(Cain and Simoni, 1989)
	G218	G178	Translocación del protón	(Cain and Simoni, 1988)
	E219	E179	Translocación del protón	(Cain and Simoni, 1988)
	I221	M181	Conexión con subunidad <i>c</i>	(Jiang and Fillingame, 1998)
	L224	L184	Conexión con subunidad <i>c</i>	(Jiang and Fillingame, 1998)
	L225	L185	Conexión con subunidad <i>c</i>	(Jiang and Fillingame, 1998)
	P240	P197	Conexión con subunidad <i>b</i>	(Kumamoto and Simoni, 1986)
	Q252	Q217	Translocación del protón	(Hatch <i>et al.</i> , 1995)
AtpB	G9	G10	Conexión con subunidad <i>a</i>	(Kumamoto and Simoni, 1986)
	V124	V119	Interacción subunidad <i>b</i> y F ₁	(Howitt <i>et al.</i> , 1996)
	A128	S124	Interacción subunidad <i>b</i> y F ₁	(Howitt <i>et al.</i> , 1996)
	G131	G127	Interacción subunidad <i>b</i> y F ₁	(Porter <i>et al.</i> , 1985)

^a Una vez localizadas las α -hélices de membrana en las subunidades de *E. coli* y *S. pneumoniae* mediante el programa RAO-ARGOS (PCGENE) (Rao and Argos, 1986) sus secuencias polipeptídicas fueron alineadas con el programa PALING (PCGENE). Todos los residuos con función asignada en *E. coli* se compararon con las posiciones correspondientes en *S. pneumoniae*.

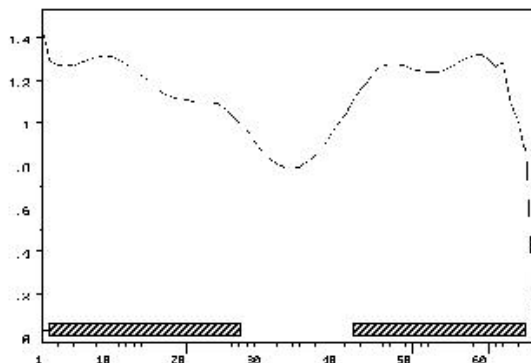
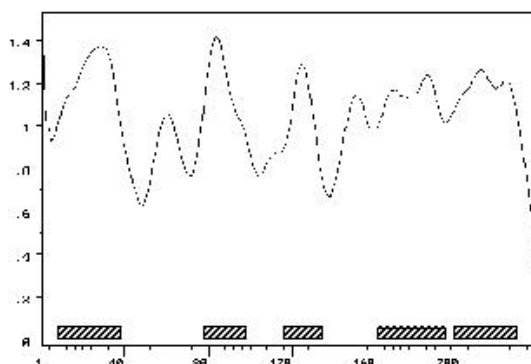
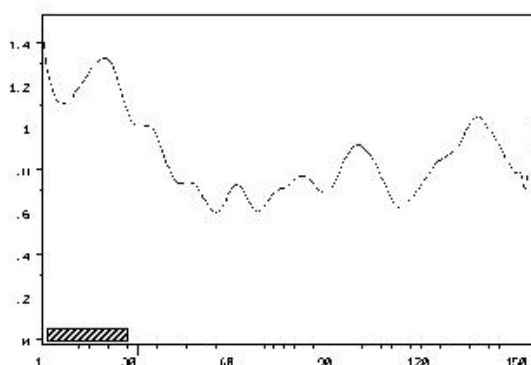
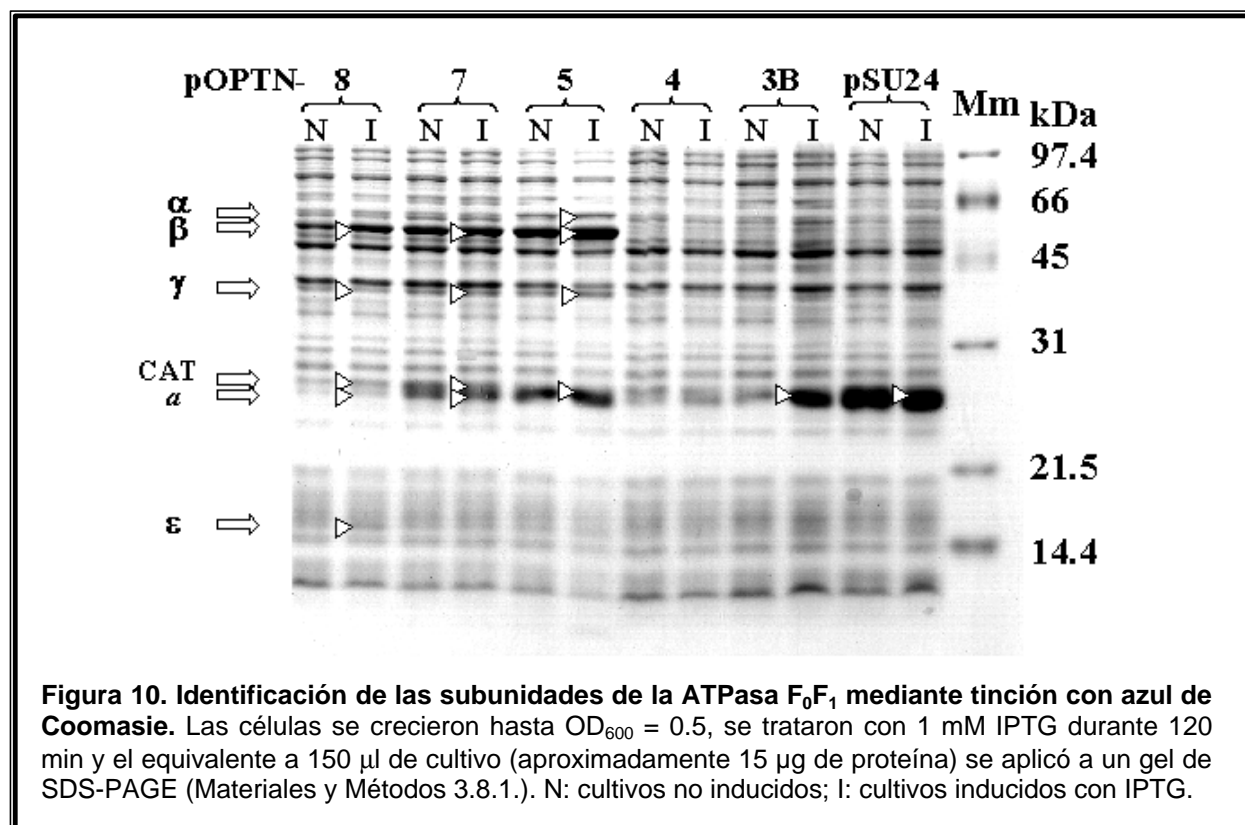
Subunidad c**Subunidad a****Subunidad b**

Figura 9. Perfiles de hidrofobicidad de las subunidades del sector F_0 de *S. pneumoniae*. Los perfiles se calcularon con el programa RAOARGOS de PCGENE. El eje X muestra la posición del residuo y el eje Y la probabilidad de que forme parte de una α -hélice de membrana según el algoritmo de Rao y Argos (Rao and Argos, 1986)]. Para la subunidad a, se muestra el modelo de 5 α -hélices aceptado en la actualidad (Hatch *et al.*, 1995; Jiang and Fillingame, 1998).

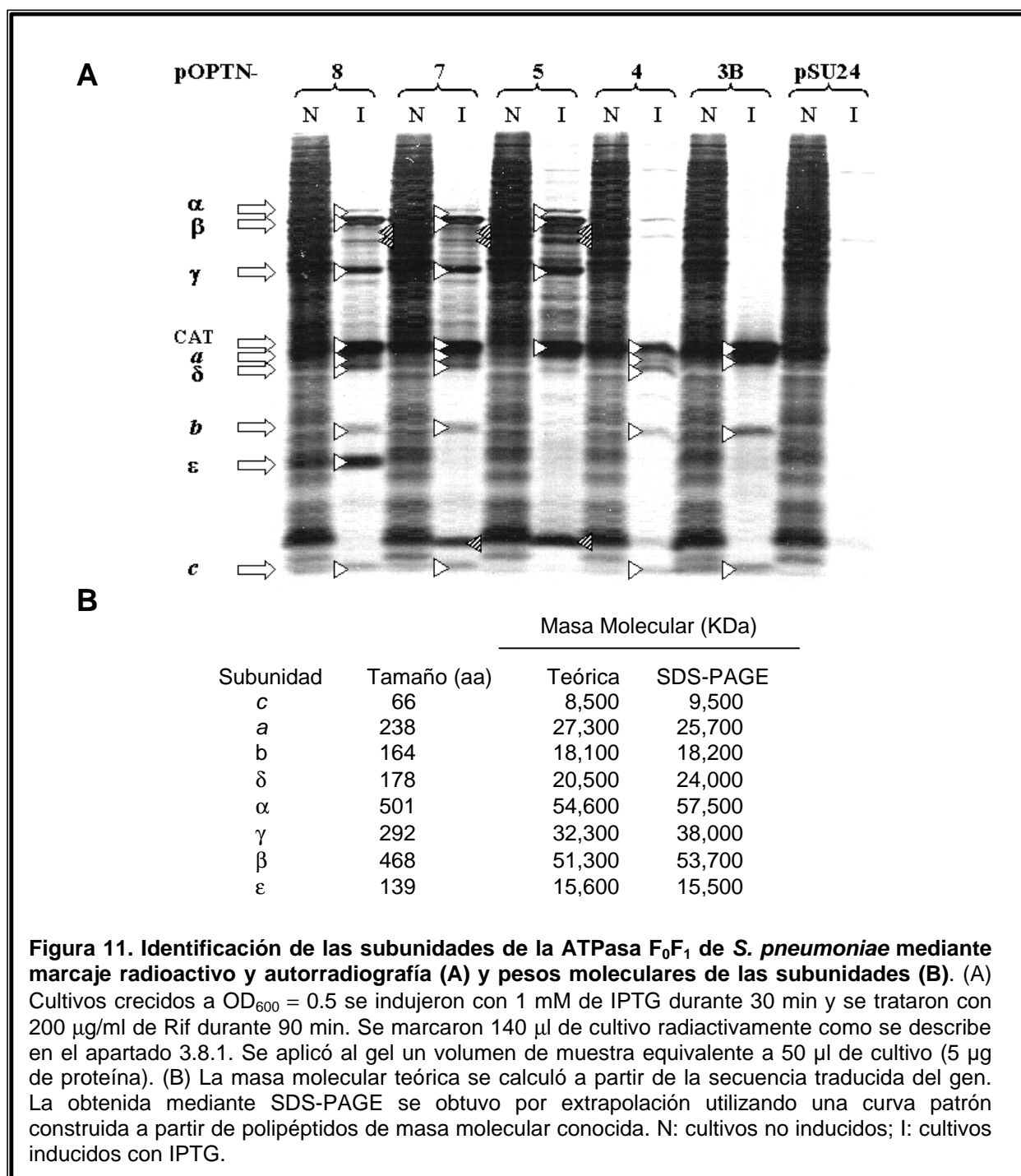
4.2. EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL OPERÓN *atp* EN *E. coli*

4.2.1. Hiperexpresión e identificación de las subunidades

Los plásmidos obtenidos en el apartado 4.1.1 se introdujeron en la cepa BL21 (DE3). Los clones se cultivaron en medio LB hasta entrar en fase exponencial tras lo cual se añadió IPTG al medio para inducir la expresión de los genes clonados. La posterior electroforesis de los extractos crudos reveló la hiperexpresión de las subunidades de mayor peso molecular del complejo (α , β y γ), la subunidad a , la subunidad ϵ y la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT) presente en el vector y que confiere resistencia a cloranfenicol (Fig. 10).



La identificación de las subunidades restantes se realizó mediante un marcaje radioactivo en medio mínimo, tras la inducción con IPTG e inhibición de la RNA polimerasa de *E. coli* con rifampicina. La autorradiografía permitió la identificación de las subunidades que no se habían revelado en el primer experimento: c , b y δ (Fig. 11A). La mayor precisión del marcaje radioactivo específico junto con el gran número de plásmidos utilizados permitió la detección de polipéptidos que coincidían con una gran precisión con los pesos moleculares teóricos de todos los productos de los genes clonados en cada plásmido (Fig. 11B).



Se observaron 2 polipéptidos adicionales (Fig. 11A; puntas de flecha ralladas), de menor tamaño que las subunidades α y β, en extractos de cultivos que las superproducían (pOPTN5, -7, -8). Estos polipéptidos podrían ser productos de degradación de dichas subunidades por acción de proteasas de *E. coli*, de forma similar a lo que se ha observado cuando se hiperproducen las propias subunidades de *E. coli*. Otro polipéptido adicional (Fig. 11A; puntas de flecha ralladas) de bajo peso molecular (11,7 kDa) está presente en los extractos de las cepas que llevan pOPTN5 y pOPTN7. Estos plásmidos codifican los residuos

1–85 de la subunidad ϵ pero no su codon de paro. El polipéptido resultante, de 11,7 kDa, podría ser el producto de un ORF híbrido formado por *atp ϵ* y parte de la secuencia del vector pSU24 que tendría teóricamente un tamaño de 12,6 kDa. Este fragmento no está presente en el carril correspondiente al plásmido pOPTN8 que contiene *atp ϵ* completo.

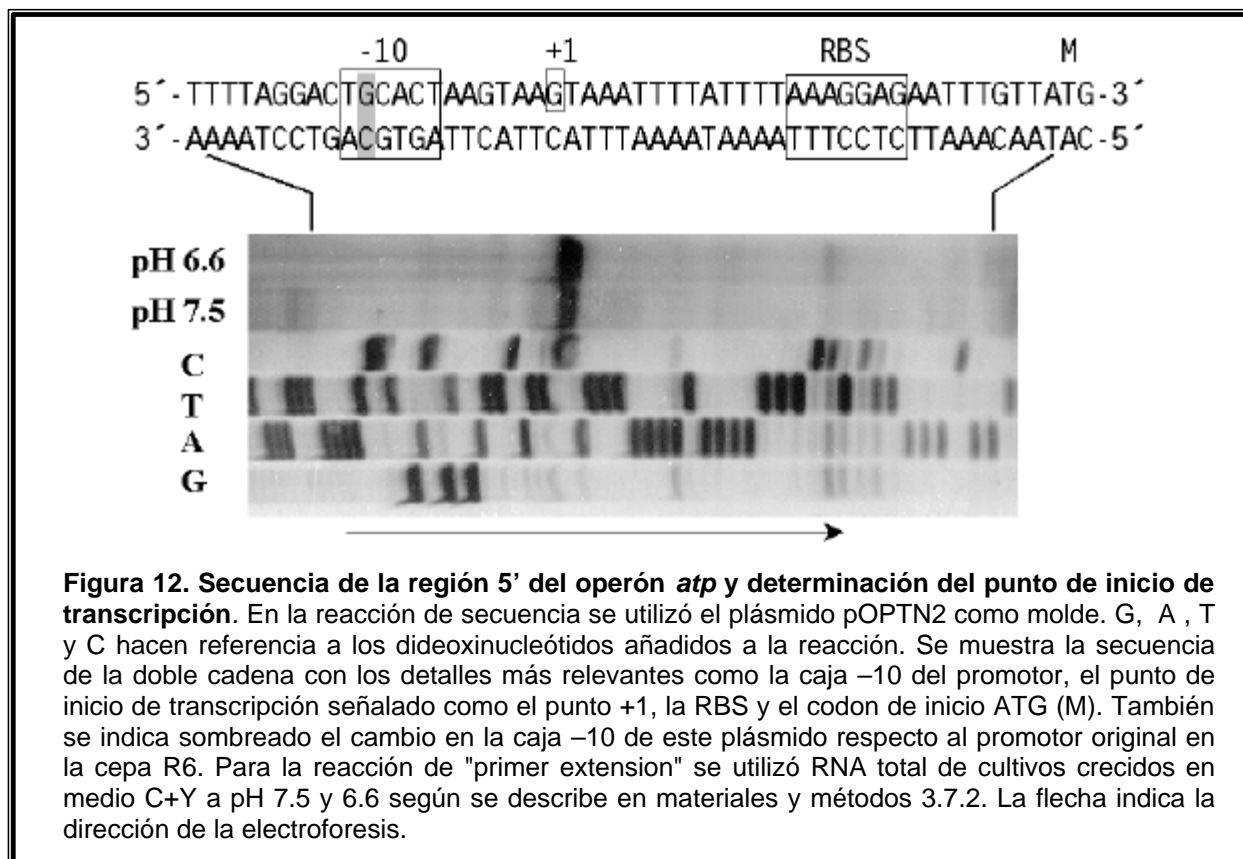
4.2.2. Actividad ATPasa en cepas superproductoras

Para comprobar si los polipéptidos expresados a partir de los genes clonados en pOPTN8 eran capaces de formar complejos funcionales en el sistema heterólogo de *E. coli*, se cuantificó la actividad ATPasa tanto en membrana como en extractos crudos y se estudió la inhibición por DCCD, Opt y Mfl. Se observó un incremento en la actividad ATPasa de membrana de 1,95 veces en el clon que contenía pOPTN8 ($15,11 \pm 1,50$ unidades; media \pm SEM; $n = 2$) respecto al clon con el vector pSU24 ($7,73 \pm 1,27$ unidades). En extractos crudos el incremento fue de 2,43 veces en el clon con pOPTN8 ($4,72 \pm 0,42$ unidades; media \pm SEM; $n = 2$) respecto al clon con pSU24 ($1,94 \pm 0,08$ unidades; $n = 2$). La actividad se inhibió en más de un 65% con DCCD 10 μ M, inhibidor universal de ATPasas F_0F_1 . Opt y Mfl a concentración elevada (100 μ M) sólo inhibieron la actividad del clon BL21(DE3) –pOPTN8 y muy levemente (menos del 20%).

4.3. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN *atp*

4.3.1. Determinación del lugar de inicio de transcripción del operón *atp*

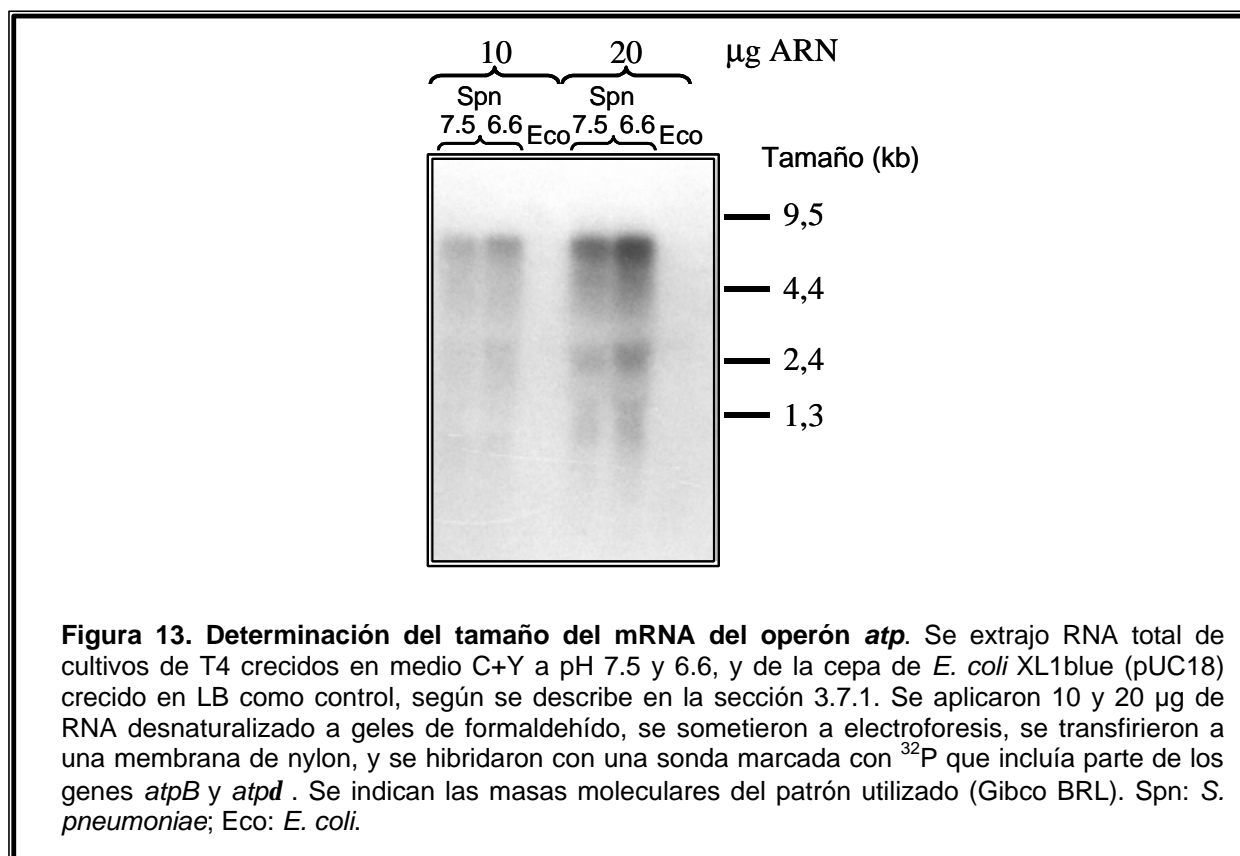
El inicio del mRNA del operón se determinó por “primer extension” sobre RNA total extraído de la cepa T4 crecido a dos pHs diferentes (6.6 y 7.5) y utilizando como cebador un oligonucleótido de 24 nt (*atpC17*, Fig. 7). Este experimento rindió un fragmento de 78 nt que señalaba como inicio de transcripción al nucleótido G situado a 7 pb del extremo 3' de la caja – 10 del promotor y a 29 pb del codon de inicio del primer gen del operón, *atpC* (Fig. 12). La intensidad de la banda fue superior en $1,46 \pm 0,03$ veces (media \pm SEM; $n = 2$) a pH 6.6 que a pH 7.5, lo que indicaba algún tipo de regulación de la expresión del operón dependiente del nivel de acidificación extracelular.



4.3.2. Determinación del tamaño del mRNA del operón *atp*

Para analizar si todos los genes del operón *atp* se transcribían en una sola unidad transcripcional en *S. pneumoniae* se determinó el tamaño del mRNA específico mediante "northern blot" a partir de muestras de RNA total extraídas a pH 7.5 y 6.6 (Fig. 13). En ambos casos se observó una banda mayoritaria correspondiente a un mRNA de aproximadamente 6,5 Kb. Esta longitud se correspondía con el tamaño del operón completo, lo que confirmaba que todos los genes del operón se transcribían en una sola unidad a partir de un único promotor, como se ha descrito en otras bacterias como *S. faecalis* (Shibata *et al.*, 1992). Se intuyen algunas bandas que podrían ser consecuencia de procesamientos aunque no puede descartarse que sean productos de degradación debidos a la manipulación experimental.

Al igual que en el experimento de "primer extension", se observó un incremento en la intensidad del mRNA específico del operón de $1,56 \pm 0,07$ veces (media \pm SEM; $n = 2$) cuando el RNA total se extrajo de células que crecieron en medio a 6.6 en comparación con un cultivo paralelo a pH 7.5.



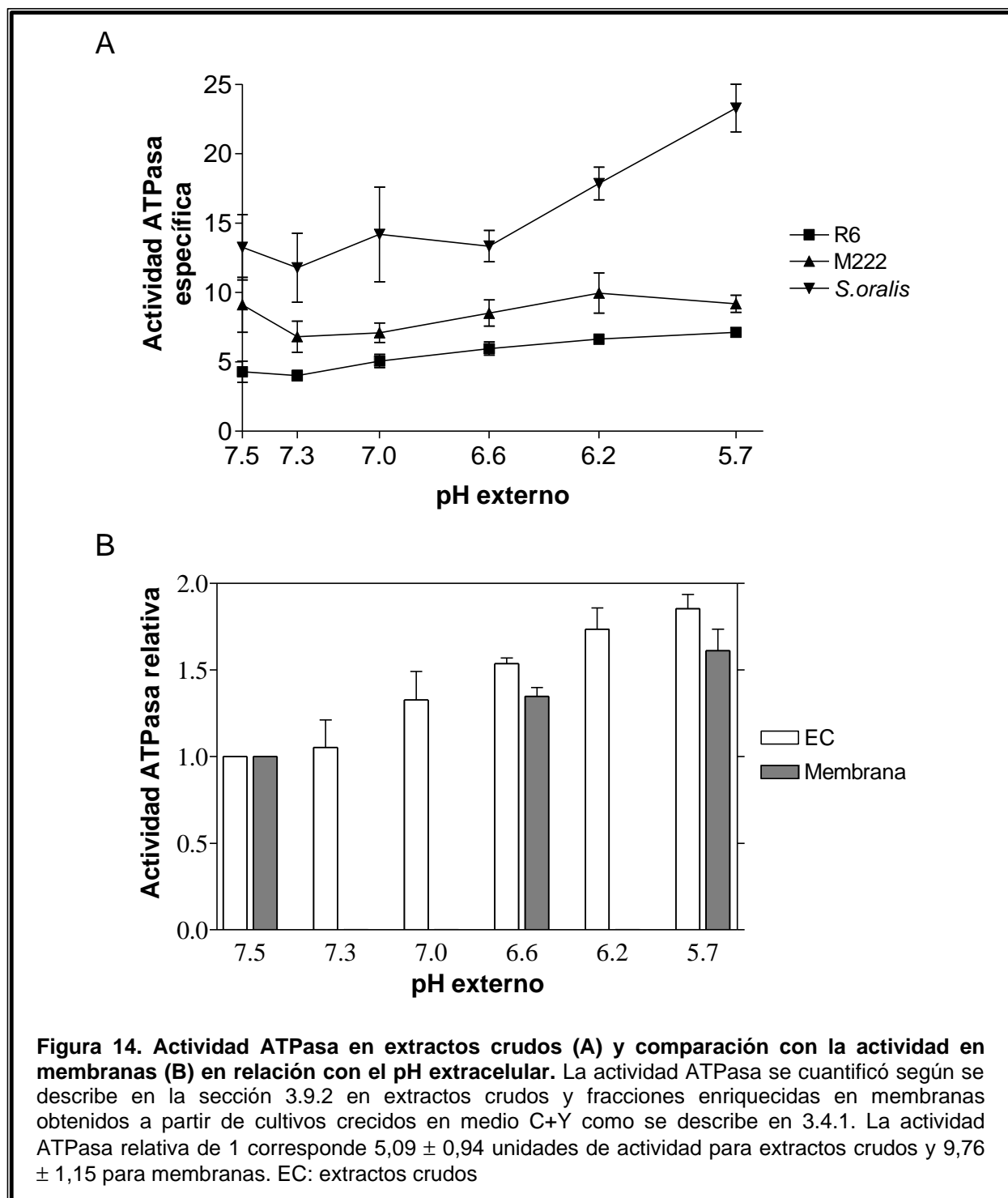
4.4. ACTIVACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL OPERÓN *atp* EN RESPUESTA A ACIDIFICACIÓN

4.4.1. Actividad ATPasa F₀F₁

Cuando se cuantificó la actividad ATPasa específica de extractos crudos que provenían de cultivos crecidos a diferentes pHs se observó un incremento creciente paralelo a la acidificación del medio, existiendo diferencias de $1,57 \pm 0,03$ veces (media \pm SEM; n=5) a pH 6.6 y de $1,90 \pm 0,07$ veces a pH 5.7 respecto a los cultivos crecidos a pH 7.5 (Fig. 14A).

Por su parte, *S. oralis* mostró tener unos niveles de actividad ATPasa entre 2,5 y 3 veces superiores a los de *S. pneumoniae* (Fig. 14A), lo que está en consonancia con su mayor capacidad acidúrica. La cepa de *S. pneumoniae* M222 también mostró capacidad de aumentar la actividad ATPasa a pH ácido además de poseer una actividad enzimática algo mayor que la cepa R6, lo que se podría atribuir al hecho de que posee los genes *atpC*, *atpA* y parte de *atpB* de *S. oralis* (Fenoll *et al.*, 1994).

También se cuantificó la actividad ATPasa en fracciones enriquecidas en membranas, las cuales tenían 2 veces más actividad específica que los extractos crudos, observándose también una mayor actividad cuando los cultivos crecieron a un pH más ácido (Fig. 14B). Los incrementos de actividad ATPasa en membrana fueron de $1,35 \pm 0,05$ veces (media \pm SEM; n = 5) a pH 6.6 y de $1,61 \pm 0,12$ veces a pH 5.7 respecto a los cultivos crecidos a pH 7.5.



La actividad ATPasa, tanto en extractos crudos como en membranas, se inhibió en un 75% utilizando DCCD $10 \mu\text{M}$ y en un 80–85% utilizando Opt $0,5 \mu\text{M}$. El hecho de que ambas drogas sean inhibidores específicos de las ATPasas tipo F_0F_1 pone de manifiesto que ésta es la ATPasa más abundante en *S. pneumoniae*, lo que coincide con datos publicados previamente para *S. faecalis* (Kobayashi *et al.*, 1984).

4.4.2. Cantidad de proteína

El incremento de actividad observado en extractos crudos y membranas podía ser consecuencia de un incremento paralelo en la cantidad de enzima sintetizada *de novo*, de un aumento de la funcionalidad o de un aumento en el ensamblaje de subunidades ya sintetizadas para formar complejos funcionales. Para diferenciar entre estas posibilidades, se realizó un inmunomarcaje por "western blot" con anticuerpos generados frente a las subunidad β del complejo F_1 , aunque el antisuero resultante era capaz de reconocer las subunidades α y β de la enzima (Fig. 15). Esta reacción cruzada del antisuero podría deberse a una contaminación en la fracción inyectada al conejo con la subunidad α , puesto que migra de forma similar a β en el gel preparativo (Fig. 10; carril pOPTN8 inducido). Otra posible explicación se basa en que ambas subunidades comparten motivos de unión a nucleótidos ya que incluso provienen de la duplicación de un gen ancestral (Gogarten *et al.*, 1989). Estos dominios podrían ser reconocidos por los mismos anticuerpos, lo que se ha observado en *E. coli* (Walker *et al.*, 1984). Como muestras se utilizaron los extractos crudos procedentes de cultivos crecidos a diferentes pHs, los cuales habían mostrado incrementos en la actividad con la acidificación tal y como se demostró en el apartado anterior.

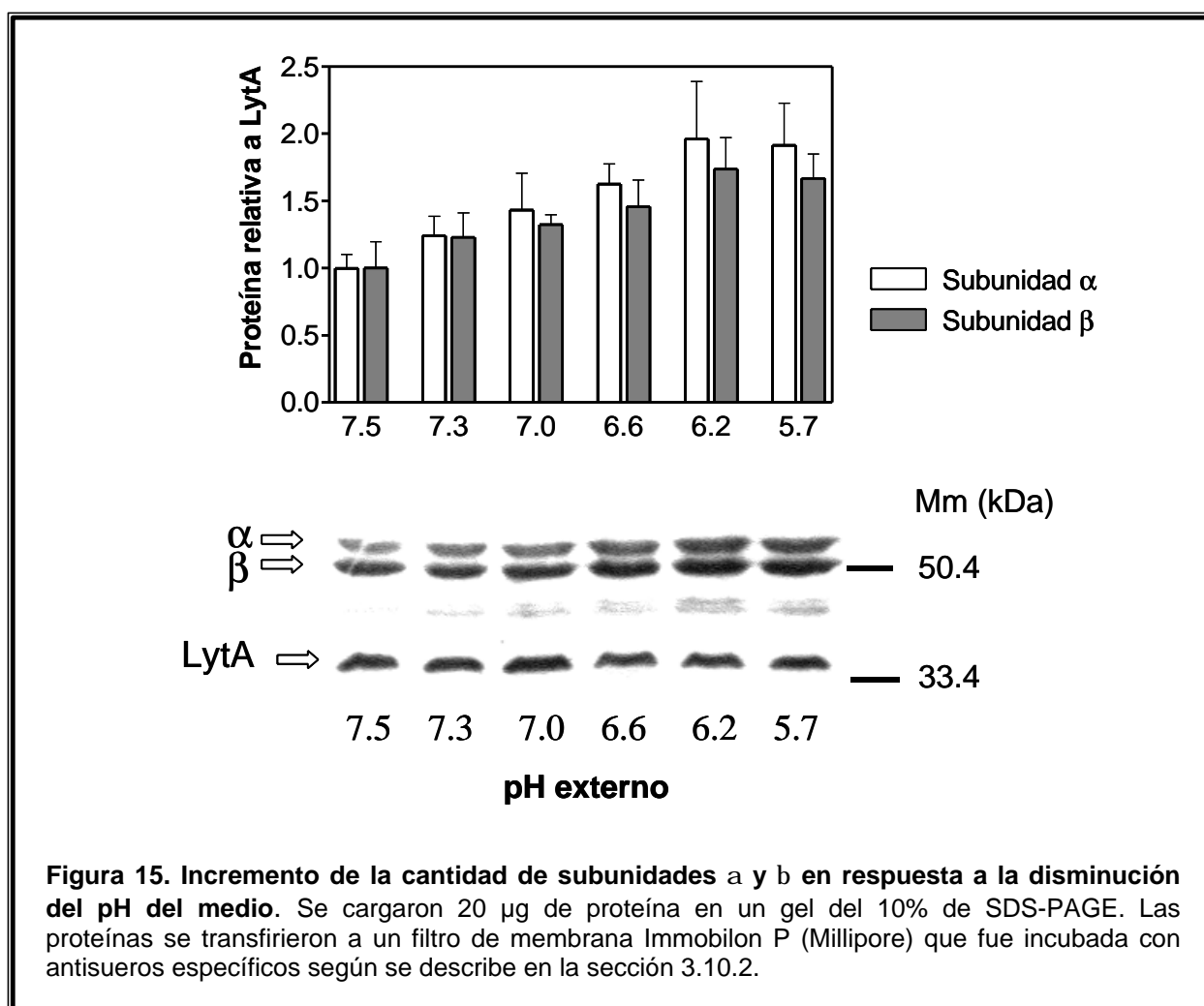
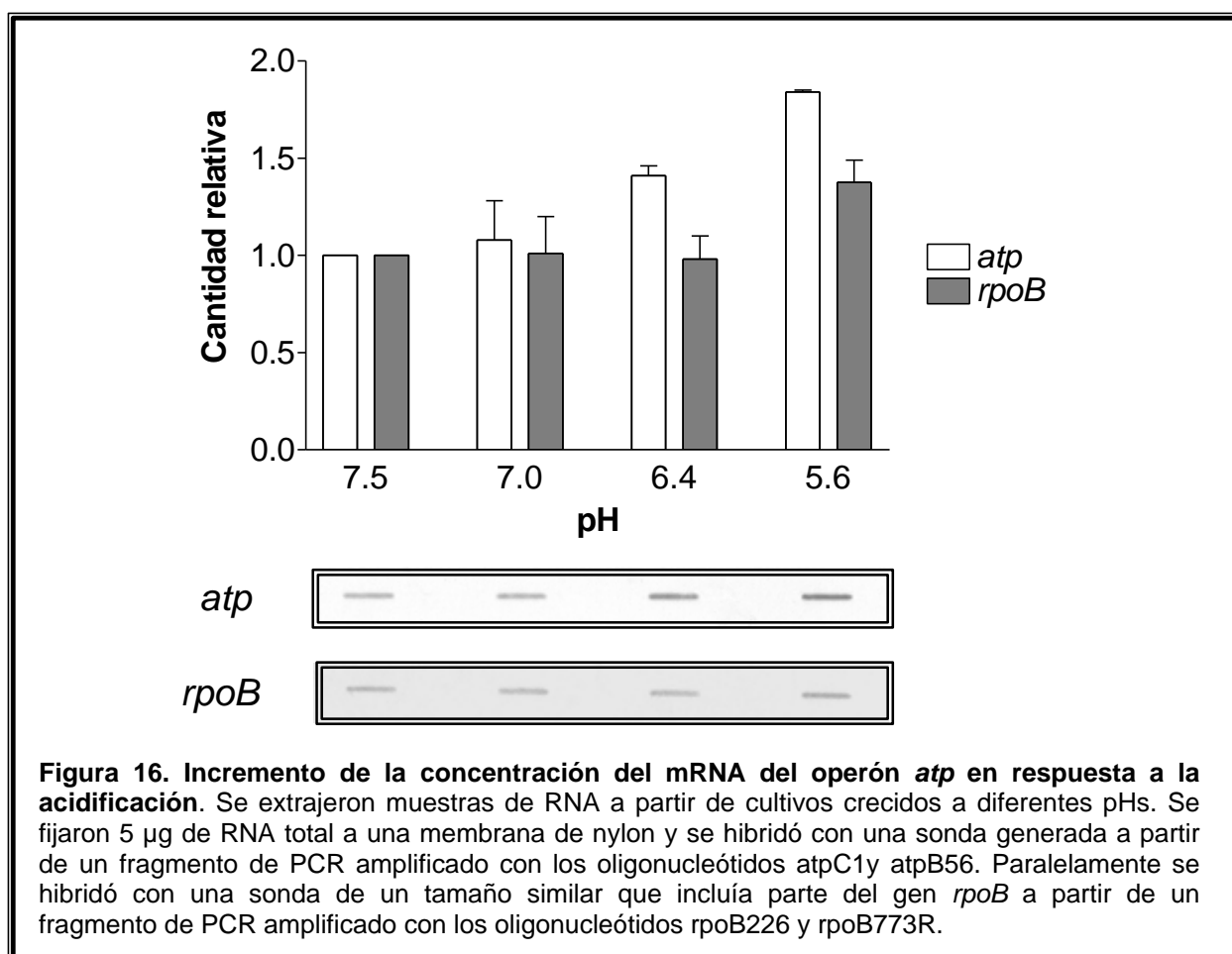


Figura 15. Incremento de la cantidad de subunidades α y β en respuesta a la disminución del pH del medio. Se cargaron 20 μ g de proteína en un gel del 10% de SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a un filtro de membrana Immobilon P (Millipore) que fue incubada con antisueros específicos según se describe en la sección 3.10.2.

Para ambas subunidades se observó un incremento en la cantidad de proteína paralelo a la bajada del pH extracelular con una diferencia cercana a las dos veces entre los extractos de cultivos crecidos a pH 7.5 respecto a pH 5.7 ($1,91 \pm 0,31$ veces para la subunidad α y $1,67 \pm 0,18$ veces para la subunidad β (media \pm SEM; $n = 3$)). Este incremento era muy similar al observado en la actividad y apoya la relación existente entre actividad y cantidad de proteína. Por otro lado, la expresión de un control interno constituido por la proteína autolisina (LytA) no mostró variaciones significativas frente a cambios externos de pH.

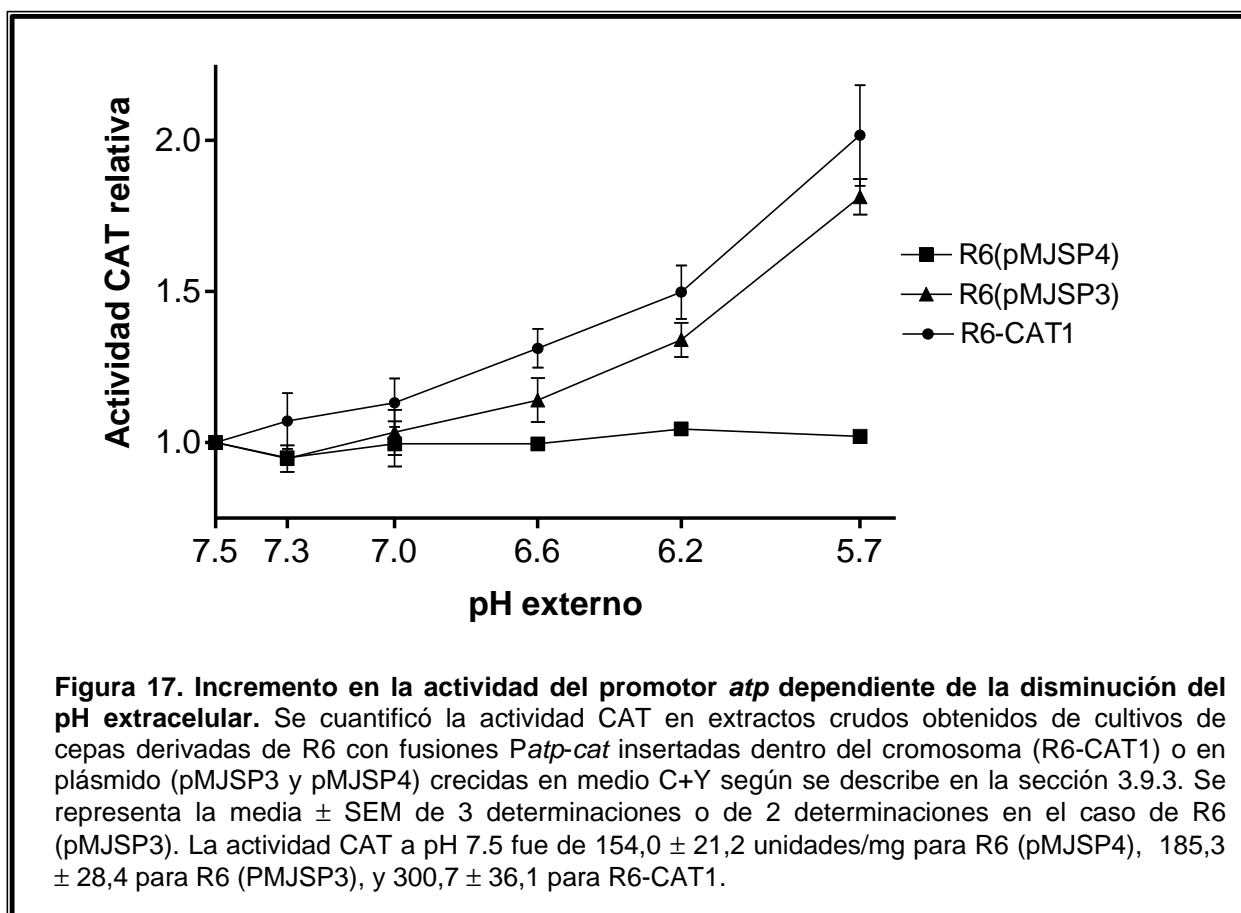
4.4.3. Niveles de mRNA

Para comprobar si el incremento en la cantidad de proteína venía determinado por una mayor cantidad de mRNA, como parecían indicar los experimentos de "primer extension" y "northern blot", se determinó la concentración de dicho mRNA mediante "slot blot" en RNAs totales procedentes de cultivos crecidos a diferentes pHs. Los resultados mostraron que existía un incremento en la concentración del mRNA específico del operón *atp* en respuesta a la acidificación del cultivo de $1,41 \pm 0,05$ veces a pH 6.4 y $1,84 \pm 0,01$ veces a pH 5.6 (media \pm SEM; $n=2$) que es paralelo al observado a nivel de proteína y actividad enzimática (Fig. 16). Un control interno constituido por el mRNA del gen *rpoB* sólo mostró ligeras variaciones con la disminución del pH (Fig. 16).



4.4.4. Actividad del promotor *atp*

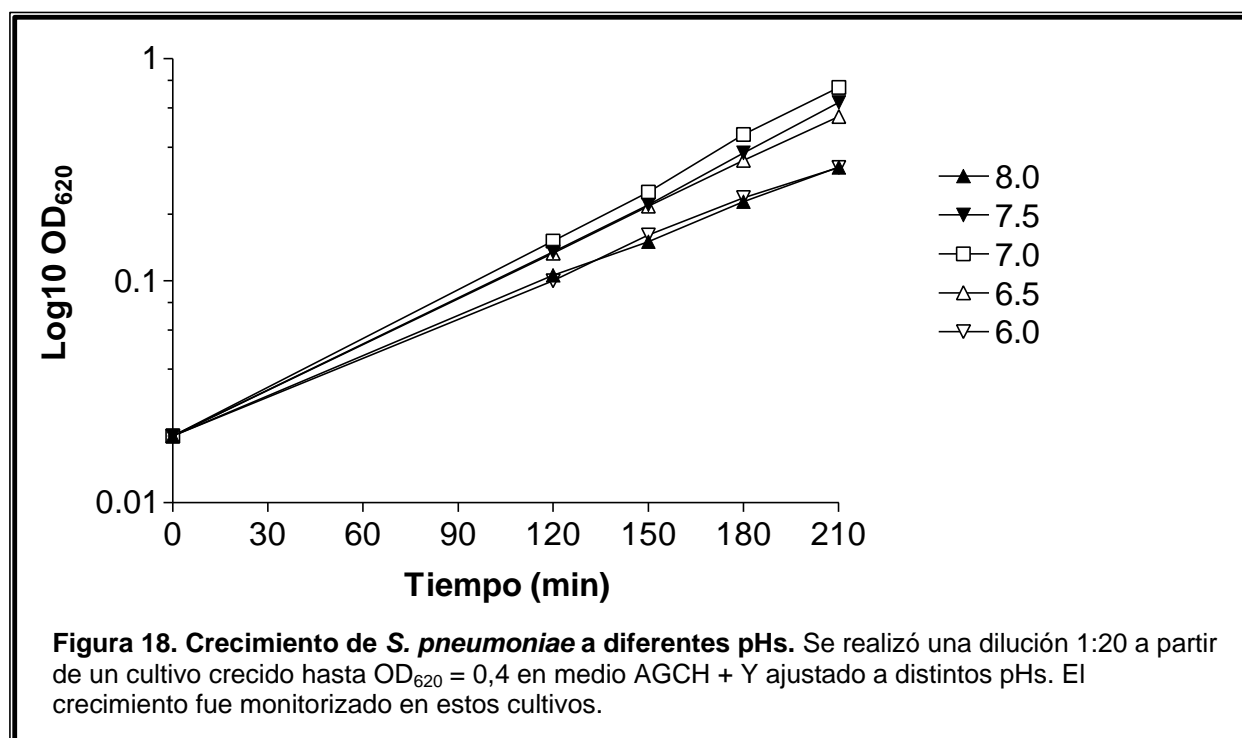
El incremento en el mRNA del operón *atp* podría venir determinado por un aumento de la actividad del promotor o bien por una mayor estabilidad del mRNA en condiciones de bajo pH. Para diferenciar ambas posibilidades se realizaron fusiones génicas de tipo transcripcional-traduccionales entre el promotor del operón *atp* y el gen *cat*, que codifica la enzima cloranfenicol acetil transferasa, que cumplía la función de gen reportero. Esta construcción permitía cuantificar la actividad del promotor mediante un ensayo colorimétrico. La construcción se introdujo dentro del plásmido pLS1 dando lugar a pMJSP3, y dentro del cromosoma de la cepa R6 para generar la cepa R6-CAT1. Mediante secuenciación utilizando oligonucleótidos internos del gen *cat*, se localizó el lugar del cromosoma en el que se insertó la fusión *Patp-cat*. Esta inserción interrumpió dos genes, *aacA* (Heath and Rock, 2000) y *gatA* (Hoskins *et al.*, 2001). Los resultados mostraron un incremento de la actividad del promotor en la cepa con el plásmido pMJSP3 de $1,81 \pm 0,14$ veces (media \pm SEM; $n = 3$) entre cultivos crecidos a pH 7.5 y 5.7, un valor acorde con los resultados obtenidos en los apartados anteriores (Fig. 17). Una diferencia similar, $1,99 \pm 0,05$ veces (media \pm SEM; $n = 3$), se observó en la cepa R6-CAT1 aunque, sorprendentemente, los valores de actividad CAT obtenidos fueron de casi el doble respecto a la cepa con el plásmido pMJSP4 (Fig. 17)



Adicionalmente, una cepa con el plásmido pMJSP4, que era idéntico a pMJSP3 salvo una mutación en la caja -10 del promotor *atp* (TGCACT en vez de T \bar{A} CACT), no experimentó incrementos significativos en la actividad CAT en respuesta a la acidificación del medio a pesar de que los valores basales a pH 7.5 eran similares a los obtenidos con la construcción con el plásmido pMJSP3 (Fig. 17). Este promotor surgió espontáneamente cuando se intentaron clonar los genes de las subunidades *c* y *a* de la ATPasa de *S. pneumoniae* en un plásmido de número de elevado de copias en *E. coli*, que dio lugar al plásmido pOPTN2 (Fenoll *et al.*, 1994).

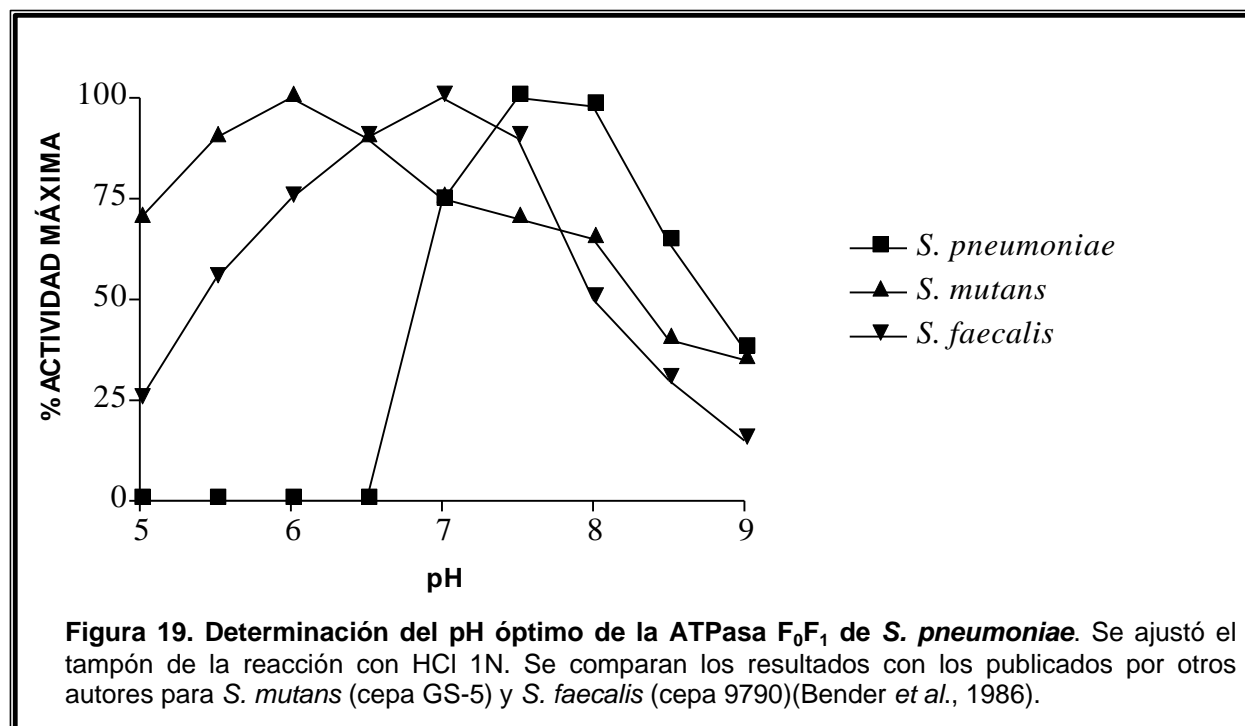
4.5. RESPUESTA DE TOLERANCIA AL ÁCIDO EN *S. pneumoniae*

Teniendo en cuenta que el incremento en la actividad ATPasa forma parte de una respuesta global frente al pH ácido en otras bacterias, denominada ATR, se analizó la posibilidad de que dicha respuesta también existiera en *S. pneumoniae*. Inicialmente se determinó el pH óptimo de crecimiento de *S. pneumoniae* y su capacidad para crecer a otros pHs. Se observó que el pH óptimo inicial para el crecimiento de *S. pneumoniae* era 7.0 (Fig. 18). A pH 7.5 y 6.5 la velocidad de crecimiento disminuyó ligeramente, aunque a pH 8.0 y 6.0 disminuyó notoriamente (Fig. 18). El crecimiento de *S. pneumoniae* se detuvo a pHs superiores a 8.2 e inferiores a 5.0.



4.5.1. Determinación del pH óptimo de la ATPasa de protones de *S. pneumoniae*

Se determinó el pH óptimo de la ATPasa de protones por ser un indicador de la capacidad acidúrica del microorganismo, dentro del grupo de las bacterias lácticas, y de este modo estimar dicha capacidad en *S. pneumoniae*. El pH óptimo está en el intervalo entre pH 7.5 y 8.0 (Fig. 19). La actividad disminuyó abruptamente por debajo de pH 7.0 lo que produjo un pico de actividad manifiestamente estrecho, especialmente cuando se comparó este perfil con los obtenidos para *S. mutans* y *S. faecalis* (Bender *et al.*, 1986).



4.5.2. Análisis de supervivencia tras reto a pH letal

4.5.2.1. Determinación del pH letal

Para comprobar si *S. pneumoniae* era capaz de desarrollar una ATR, primeramente se determinó el pH letal, que se define como aquél en el que sobrevive alrededor de un 0,01% de la población celular después de una exposición entre 2 y 3 horas (Svensater *et al.*, 1997). *S. pneumoniae* creció hasta pH 5.0, por lo que se analizó la supervivencia de las células a pHs inferiores a éste. Se observó que aproximadamente el 50% de la población bacteriana sobrevivía a pH 5.0, el 10% lo hacía a pH 4.5 y el 0,01% a pH 4.4, mientras que no se detectó supervivencia a pH 4.3 o inferior (< 0,0001%) (Fig. 20), por lo que se tomó el pH 4.4 como pH letal.

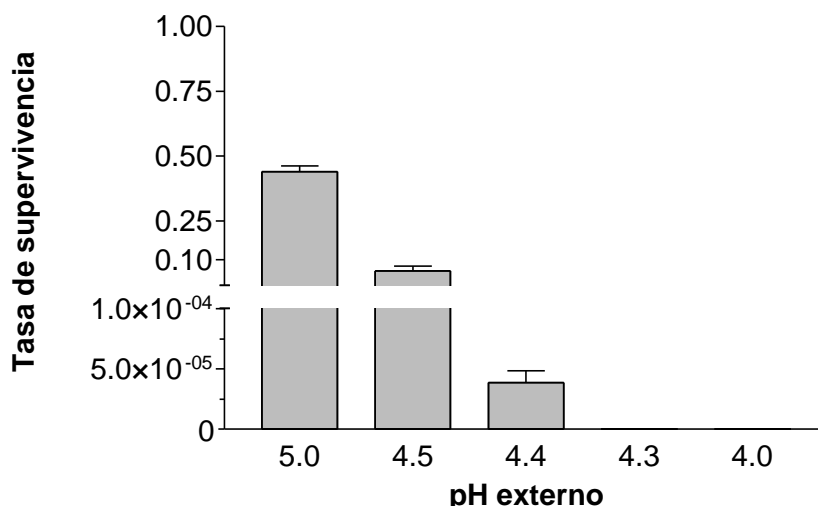


Figura 20. Determinación del pH letal de *S. pneumoniae*. Se realizó una dilución 1/10 en THYE de células congeladas en THYE a $OD_{620} = 0,1$. Después de una incubación de 2 h en THYE a pH 7.5, se diluyó el volumen equivalente a 6×10^6 células en 5 ml de medio THYE ajustado a distintos pHs. Después de 2 horas de incubación se sembraron en medio THYE-agar entre 1 ml y 1 μ l de cultivo ($1,2 \times 10^6$ - $1,2 \times 10^3$ células). El número de supervivientes se estimó tras incubar 16 h a 37°C con 5% CO_2 . Los valores son la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

4.5.2.2. Cuantificación de supervivientes a pH letal

Se comparó la supervivencia de cultivos expuestos durante 2 h a distintos pHs previamente a una exposición de 2 h a pH 4.4 (Fig. 21). El número de supervivientes se incrementó 3 veces si el cultivo había sido previamente sometido durante 2 h a pH 6.6, 7 veces a pH 6.2 y 10 veces a pH 5.8. Estos resultados demuestran la existencia de una respuesta de tolerancia al ácido en *S. pneumoniae*.

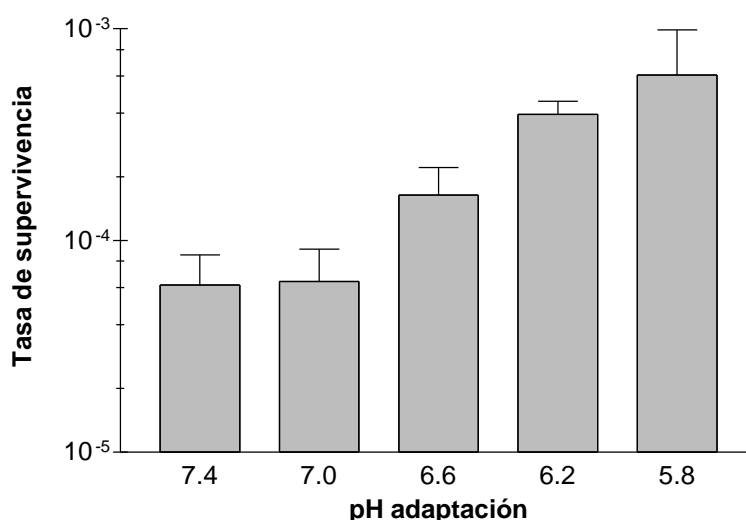
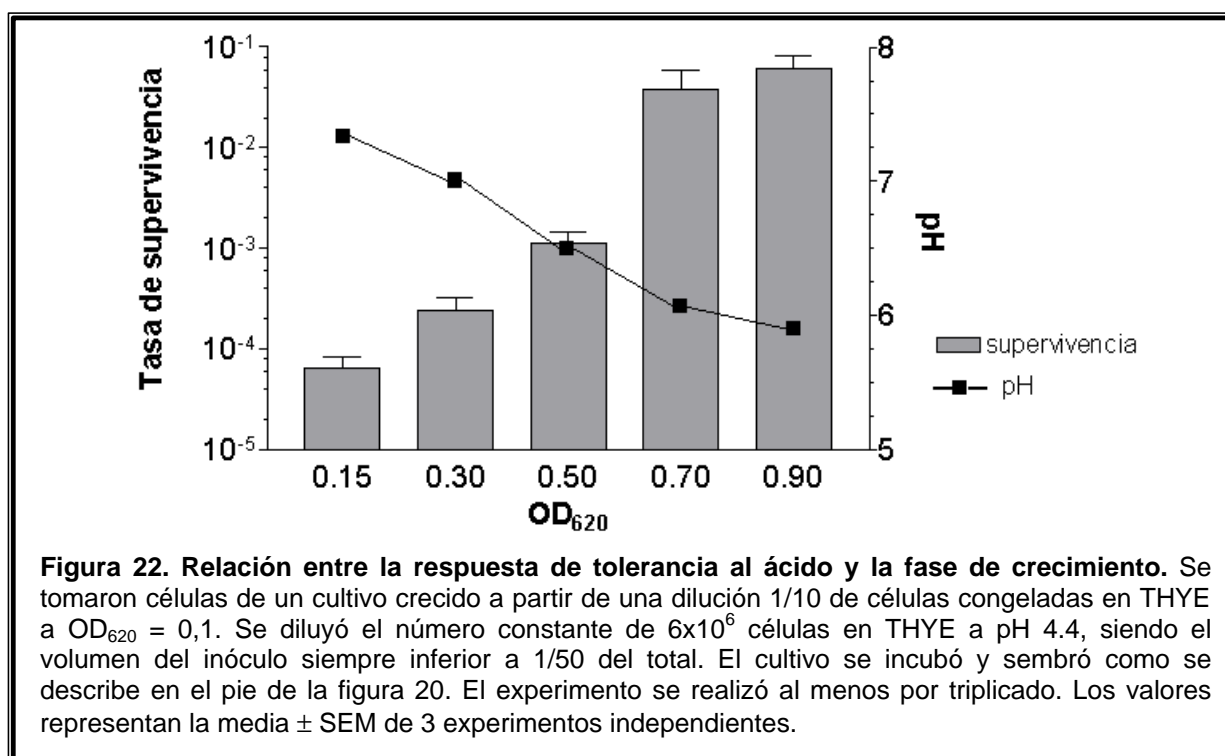


Figura 21. Respuesta de tolerancia al ácido de *S. pneumoniae*. Se realizó una dilución 1/10 a partir de células congeladas en THYE a $OD_{620} = 0,1$ en 5 ml de medio THYE ajustado a distintos pHs dentro del rango de pH de crecimiento de *S. pneumoniae*. Después de una incubación de 2 h se diluyó un volumen equivalente a 6×10^6 células en THYE ajustado a pH 4.4, siendo el volumen del inóculo siempre inferior a 1/50 del total. Tras incubar durante 2 h se sembraron como se describe en el pie de la figura 20. Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

4.5.3. Relación entre la respuesta de tolerancia al ácido y fase de crecimiento

Cuando se comparó la capacidad de sobrevivir a pH letal de células en distintas fases de crecimiento, se observó que las células en fase exponencial tardía y fase estacionaria presentaban mayor supervivencia que las células en fase exponencial temprana (Fig. 22). El incremento en grado de supervivencia era de casi tres órdenes de magnitud, 970 veces, entre células en fase estacionaria ($OD_{620} = 0.900$) y en fase exponencial temprana ($OD_{620} = 0,150$). Por tanto, la acidificación del medio debido al crecimiento como consecuencia del metabolismo láctico de *S. pneumoniae* inducía la ATR en mayor grado que el sometimiento al pH subletal que fue como máximo de 10 veces (Fig. 21). Sin embargo, la inducción de la ATR aparecía a valores de pH muy similares tanto en el sometimiento a pH subletal como cuando fue consecuencia de la acidificación derivada del crecimiento. (Figs. 21 y 22).



4.6. ACTIVIDAD DE LA MEFLOQUINA Y COMPUESTOS RELACIONADOS SOBRE LA ATPasa F_0F_1

4.6.1. Inhibición del crecimiento bacteriano

Teniendo en cuenta que mutaciones en la subunidad c de la ATPasa de protones de *S. pneumoniae* confieren resistencia a Opt y Qin, se analizó si esas mismas mutaciones conferían resistencia a Mfl que tiene una estructura química similar y que, al igual que Qin, se utiliza en la terapia contra la malaria. Se utilizaron una serie de derivados de la Mfl sintetizados por el instituto Walter Reed (Fig. 23).

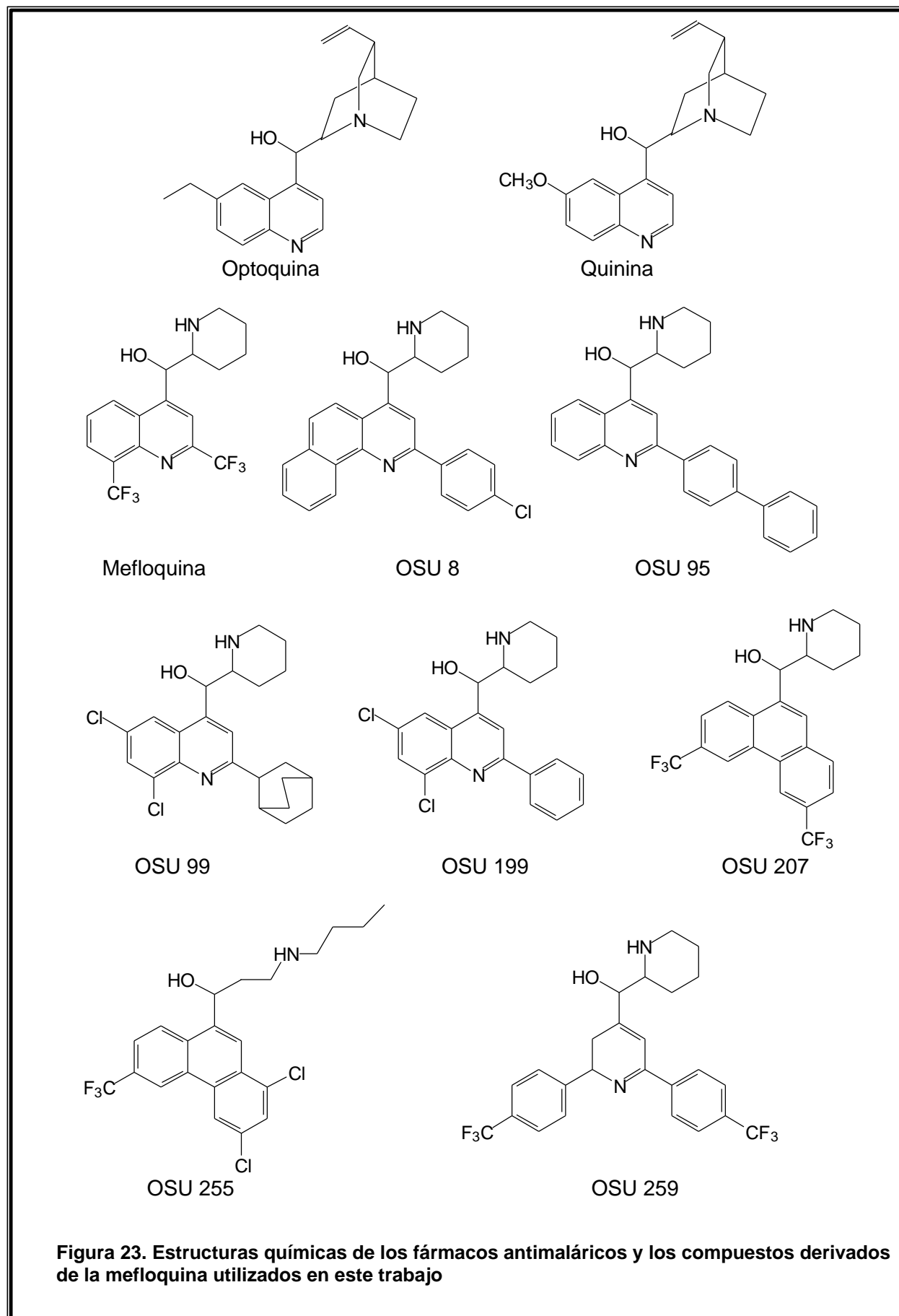


Figura 23. Estructuras químicas de los fármacos antimaláricos y los compuestos derivados de la mefloquina utilizados en este trabajo

Las cepas utilizadas fueron los mutantes MJ11, MJ2 (seleccionados originalmente como Opt^R) (Fenoll *et al.*, 1994), MJQ3 y MJQ4 (seleccionados originalmente como Qin^R) (Muñoz *et al.*, 1996). Con el fin de realizar un ensayo más completo, también se incluyeron mutantes Mfl^R cuyo aislamiento y genotipo se describe más adelante. Las mismas mutaciones que confieren Opt^R y Qin^R, también confieren resistencia tanto a Mfl como a los compuestos OSU8, OSU199 y OSU207 (Tabla X), por lo que existe un fenómeno de resistencia cruzada para todos ellos. Sin embargo, la actividad de las drogas no fue equivalente. Mfl mostró una potencia de 2,4 – 10 veces superior a Opt, y de 40 – 300 veces superior a Qin. Ninguno de los mutantes mostró niveles de resistencia significativos frente a los compuestos OSU95, OSU99, OSU255 y OSU259. Los mutantes MJQ4, MJM6 y MJM7 presentaron sólo niveles de resistencia moderados frente al fármaco OSU199, que mostró una actividad superior a Mfl contra la mayor parte de los mutantes.

Tabla X. Sensibilidad de *S. pneumoniae* a antimetabólicos de tipo amino- alcohol.

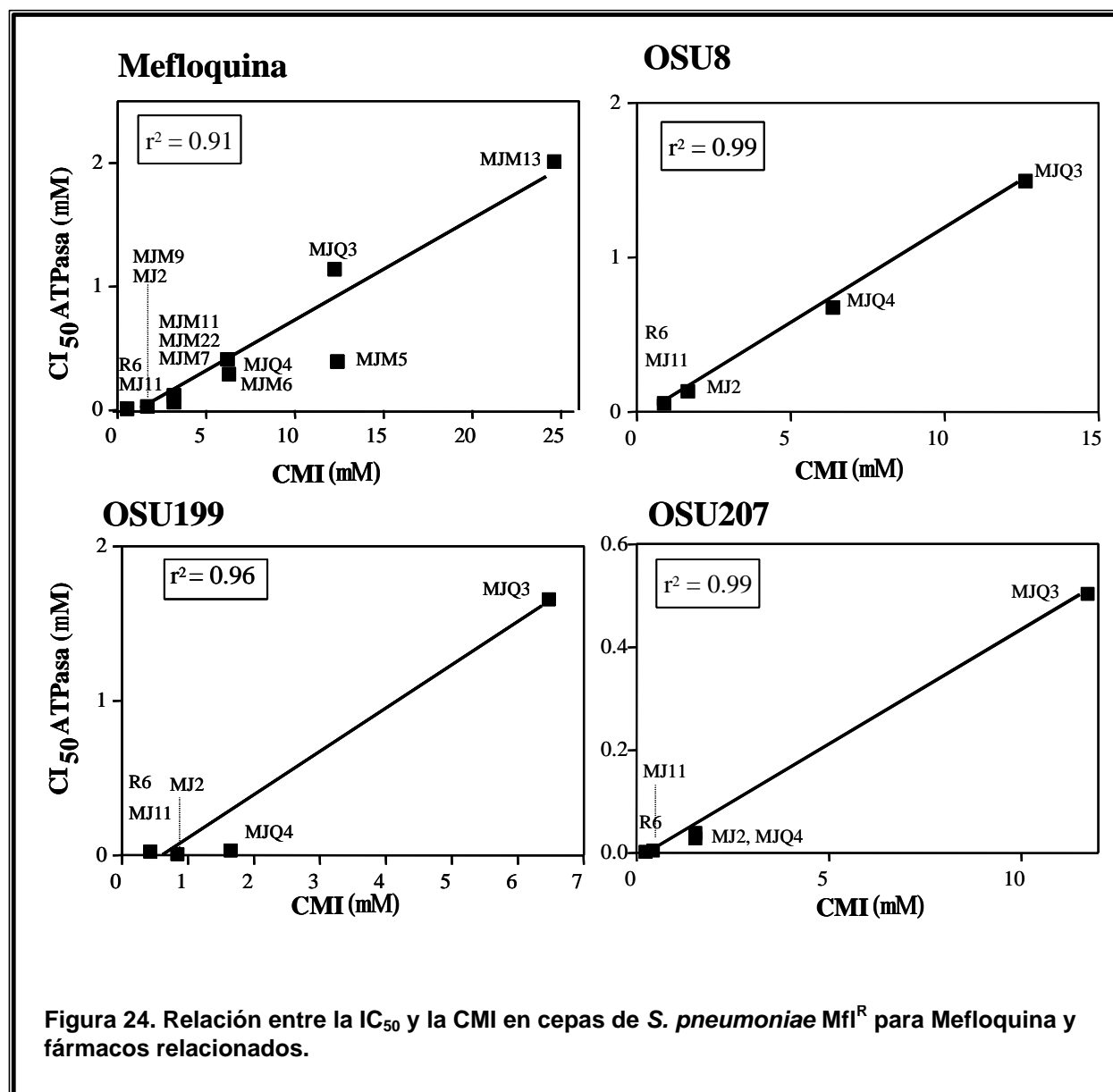
Cepas	CMI (µg/ml) ^a									
	Opt	Qin	Mfl	OSU8	OSU95	OSU99	OSU199	OSU207	OSU255	OSU259
ATCC 6303	0,75	25	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,07	0,15
ATCC 49619	1,5	50	0,15	0,31	0,62	0,62	0,31	0,15	0,15	0,15
R6	1,5	50	0,15	0,31	0,15	0,62	0,15	0,15	0,62	1,25
MJ11	24	72	0,15	0,31	0,15	0,62	0,15	0,07	0,62	1,25
MJ2	24	230	0,62	0,62	0,31	0,31	0,31	0,62	1,25	1,25
MJQ3	3	144	5	5	0,31	0,31	2,5	5	1,25	1,25
MJQ4	18	180	2,5	2,5	0,31	0,31	0,62	0,62	1,25	1,25
MJM3	6	200	2,5	—	—	—	5	—	—	—
MJM5	48	200	5	—	—	—	5	—	—	—
MJM6	12	100	2,5	—	—	—	0,62	—	—	—
MJM7	3	200	1,25	—	—	—	0,62	—	—	—
MJM8	6	100	5	—	—	—	2,5	—	—	—
MJM9	12	200	0,62	—	—	—	1,25	—	—	—
MJM11	12	100	2,5	—	—	—	1,25	—	—	—
MJM13	24	400	10	—	—	—	10	—	—	—
MJM15	12	200	5	—	—	—	2,5	—	—	—
MJM21	6	200	2,5	—	—	—	2,5	—	—	—
MJM22	24	200	2,5	—	—	—	2,5	—	—	—

^a —, no determinado

4.6.2. Inhibición de la actividad ATPasa

Para obtener una prueba bioquímica que confirmara que la ATPasa F₀F₁ era el blanco primario de Mfl y los derivados OSU8, 199 y 207, se comparó la capacidad antimicrobiana y la de inhibición de la actividad ATPasa de estos compuestos utilizando mutantes que cubrían un amplio espectro de nivel de resistencia. La capacidad antimicrobiana (CMI) y la inhibición de la actividad ATPasa (IC₅₀) por parte de cada fármaco, mostraron un buen nivel de correlación a

juzgar por los valores de los coeficientes de determinación, r^2 , del análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, que fueron muy cercanos a 1 en todos los casos (Fig. 24). También se comprobó la relación entre CMI e IC_{50} en un sólo mutante, MJQ4. Se seleccionó este mutante por presentar niveles de resistencia intermedios situados dentro del rango de linealidad de la relación entre ambos factores. La capacidad antimicrobiana y la inhibición de la actividad ATPasa mostraron nuevamente una buena correlación, presentando los fármacos OSU199 y OSU207 una mayor potencia que la mefloquina (Fig. 25).



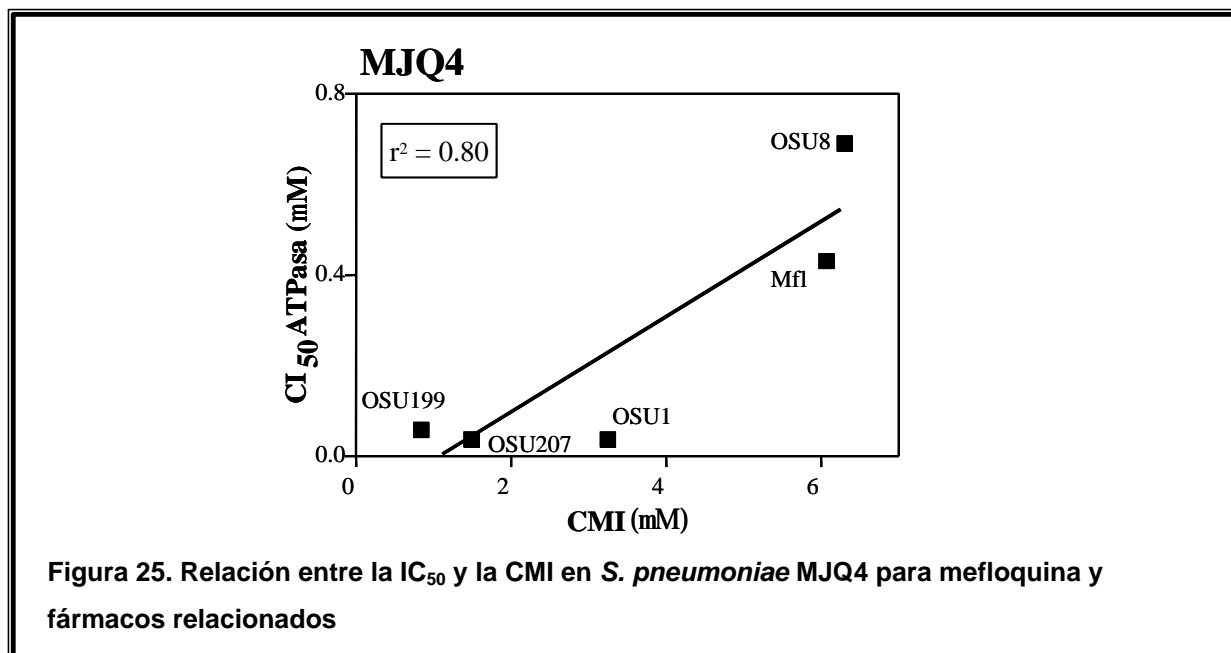


Figura 25. Relación entre la IC_{50} y la CMI en *S. pneumoniae* MJQ4 para mefloquina y fármacos relacionados

4.6.3. Caracterización de mutaciones implicadas en resistencia a mefloquina

Inicialmente se trataron de aislar mutantes espontáneos Mfl^R mediante siembra de 2×10^{10} células de R6 en 0,3 $\mu\text{g/ml}$ de Mfl (2 veces la CMI). Con este método se obtuvo un mutante que fue denominado MJM1. Los genes *atpC* y *atpA* de esta cepa se amplificaron por PCR con los oligonucleótidos atporf1 y atpB56 y se secuenciaron. Se observó una única mutación puntual en *atpA*: un codon TTT cambió a TCT, lo que produciría el cambio F209S en la secuencia de aa de la subunidad *a* de la ATPasa F_0F_1 de MJM1. Para obtener evidencia genética de que este cambio estaba implicado en resistencia a Mfl, el producto de PCR obtenido a partir de MJM1 que llevaba *atpCA* se usó para transformar células competentes de R6 y el mismo producto de PCR, pero de R6, se utilizó como control. Como se esperaba, el producto de PCR de MJM1 transformó a R6 a resistencia a Mfl con alta eficiencia ($>10^5$ transformantes/ml). Sin embargo, el producto de PCR de R6 también fue capaz de transformar a R6 a Mfl^R , aunque con menor eficiencia (10^3 transformantes/ml). Se seleccionaron dos colonias de la transformación de R6 con el producto de PCR de MJM1 y se comprobó que llevaban el cambio F209S en la subunidad *a*. Estos resultados indicaban que esta mutación estaba implicada realmente en resistencia a Mfl. Uno de estos transformantes se denominó MJM11 (Tabla XI) y fue utilizado en estudios posteriores.

Se seleccionaron varias colonias Mfl^R obtenidas en el experimento de transformación con el producto de PCR de R6. Estos mutantes fueron nombrados con las iniciales MJM seguidas de una cifra. La aparición de este pequeño porcentaje de resistentes podría atribuirse a cambios al azar producidos por la propia tasa de error de la DNA polimerasa ya que en el control de transformación sin DNA no aparecieron mutantes resistentes. Fragmentos de PCR que llevaban *atpCA* amplificados a partir de las cepas resistentes podían conferir resistencia a

R6 mediante transformación con elevada eficiencia ($>10^5$ transformantes/ml). Estas cepas presentaron mutaciones puntuales únicas asociadas a cambios de aminoácido (Tabla XI). Ocho mutaciones se encontraron en *atpC*, y 5 en en *atpA*. En ambas subunidades, los cambios se restringían a regiones relativamente cortas localizadas dentro de α -hélices de membrana según la predicción de los perfiles de hidrofobicidad (Fig. 9). Dentro de la subunidad a, los residuos mutados se encontraron en las dos últimas α -hélices de membrana.

Tabla XI. Mutaciones en *atpC* y *atpA* que confieren resistencia cruzada a antimetabólicos de tipo amino- alcohol.

Cepa	Cambio de aminoácido (cambio de codon) ^a			
	Subunidad c		Subunidad a	
	α -hélice 1	α -hélice 2	α -hélice 4	α -hélice 5
R6	¹³ MGVSVGE <u>G</u> LLMN ²⁴	⁴⁴ MFLGVAFIE <u>G</u> TFFV ⁵⁷	¹⁷⁸ GEVMTS <u>L</u> LLL ¹⁸⁷	²⁰⁵ AWTA <u>F</u> SVFIS ²¹⁴
MJ11	—	A49T (GCC→ACC)	—	—
MJ2	—	V48L (GTT→CTT)	—	—
MJQ3	M23I (ATG→ATA)	—	—	—
MJQ4	G20A (GGT→GCT)	—	—	—
MJM3	—	—	—	W206G (TGG→GGG)
MJM5	G14S (GGC→AGC)	—	—	—
MJM6	—	—	—	S214P (TCC→CCC)
MJM7	—	V57L (GTA→CTA)	—	—
MJM8	M13T (ATG→ACG)	—	—	—
MJM9	—	M44V (ATG→GTG)	—	—
MJM10	M23I (ATG→ATT)	—	—	—
MJM11	—	—	—	F209S (TTT→TCT)
MJM13	N24Y (AAT→TAT)	—	—	—
MJM14	G20A (GGT→GCT)	—	—	—
MJM15	—	G47A (GGT→GCT)	—	—
MJM21	—	—	L186P (CTT→CCT)	—
MJM22	—	—	—	W206C (TGG→TGT)

^a Los residuos que cambian en las cepas resistentes se muestran en negrita. Se muestran subrayados los residuos cE19 y cE52, ya que el primero también podría estar implicado en la translocación de protones, como se discute en el texto.

Las CMI's para Mfl de los mutantes Mfl^R fueron considerablemente mayores que los de R6 (4 – 64 veces), al igual que para OSU199 (4 – 64 veces). Todos estos mutantes excepto MJM7 mostraron niveles de resistencia incrementados a Opt (4 – 32 veces), y excepto MJM6, MJM8 y MJM11 también mostraron niveles de resistencia incrementados a Qin (4 – 8 veces).

4.7. ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE MUTANTES

Teniendo en cuenta el gran número de mutantes Mfl^R obtenidos, se analizó la posibilidad de que el mismo método fuera válido para aislar mutantes resistentes a otros fármacos antimicrobianos. Los fármacos elegidos fueron Cip, Rif y Str debido a que se conocen los genes implicados en la resistencia y que ésta es causada principalmente por mutaciones puntuales.

4.7.1 Obtención de mutantes de resistencia mediante PCR, a partir de DNA de una cepa sensible

Se amplificaron mediante PCR las secuencias génicas implicadas en Cip^R, Rif^R y Str^R a partir de DNA genómico de R6, una cepa sensible a todos ellos. Para obtener fragmentos de unas 1.600 pb se utilizaron oligonucleótidos específicos: parCUP y parC503R para *parC*; rpoB227 y rpoB773R para *rpoB*, rpsLUP y rpsLDOWN para *rpsL* (Tabla V, Fig. 26). El fragmento de 1.629 pb amplificado a partir de *parC* codificaba los primeros 508 aa de la subunidad ParC de la topoisomerasa IV (824 residuos) que incluye la QRDR (Muñoz and de la Campa, 1996). El fragmento de 1.641 pb amplificado a partir de *rpoB*, codificaba 548 residuos de la región central de la subunidad β de la RNA polimerasa (residuos 227 a 774). El fragmento de 1.615 pb amplificado a partir de *rpsL* codificaba los primeros 320 residuos de Spr0247 (una posible amilopululanasa alcalina), el gen *rpsL* completo que codifica la subunidad ribosómica S12 (de 137 residuos de longitud), y la mayor parte (149 residuos de 156) de la proteína ribosómica S7 codificaba por el gen *rpsG* (Fig. 26).

Con estos fragmentos se transformaron células competentes de R6 y se seleccionaron los transformantes resistentes en medio sólido con Cip a 2 $\mu\text{g/ml}$ (4 veces la CMI), Rif a 1 $\mu\text{g/ml}$ (>33 veces la CMI) ó Str a 100 $\mu\text{g/ml}$ (32 veces la CMI). Estas concentraciones de antibióticos se eligieron teniendo en cuenta los niveles de resistencia que alcanzan cepas con mutaciones puntuales en *parC* (Muñoz and de la Campa, 1996), *rpoB* (Enright *et al.*, 1998; Padayachee and Klugman, 1999) y *rpsL* (Salles *et al.*, 1992). Sólo se obtuvieron colonias cuando el DNA de la transformación incluía la región génica implicada en resistencia, quedando por debajo del límite de detección la aparición de mutantes resistentes transformados con otros fragmentos de PCR y en el control en el que no se añadió DNA (Tabla XII). La tasa de transformación se encontraba en el rango de 10^1 a 10^3 transformantes/ml, variando con el tipo de DNA transformante. Además, se obtuvieron entre 2 y 4,5 veces menos mutantes cuando el DNA transformante se amplificó con una DNA polimerasa con función correctora de pruebas en un experimento realizado paralelamente (Tabla XII). Estos valores son compatibles con la mayor fidelidad de esta enzima, que es de tres veces según los fabricantes (catálogo de Biotools).

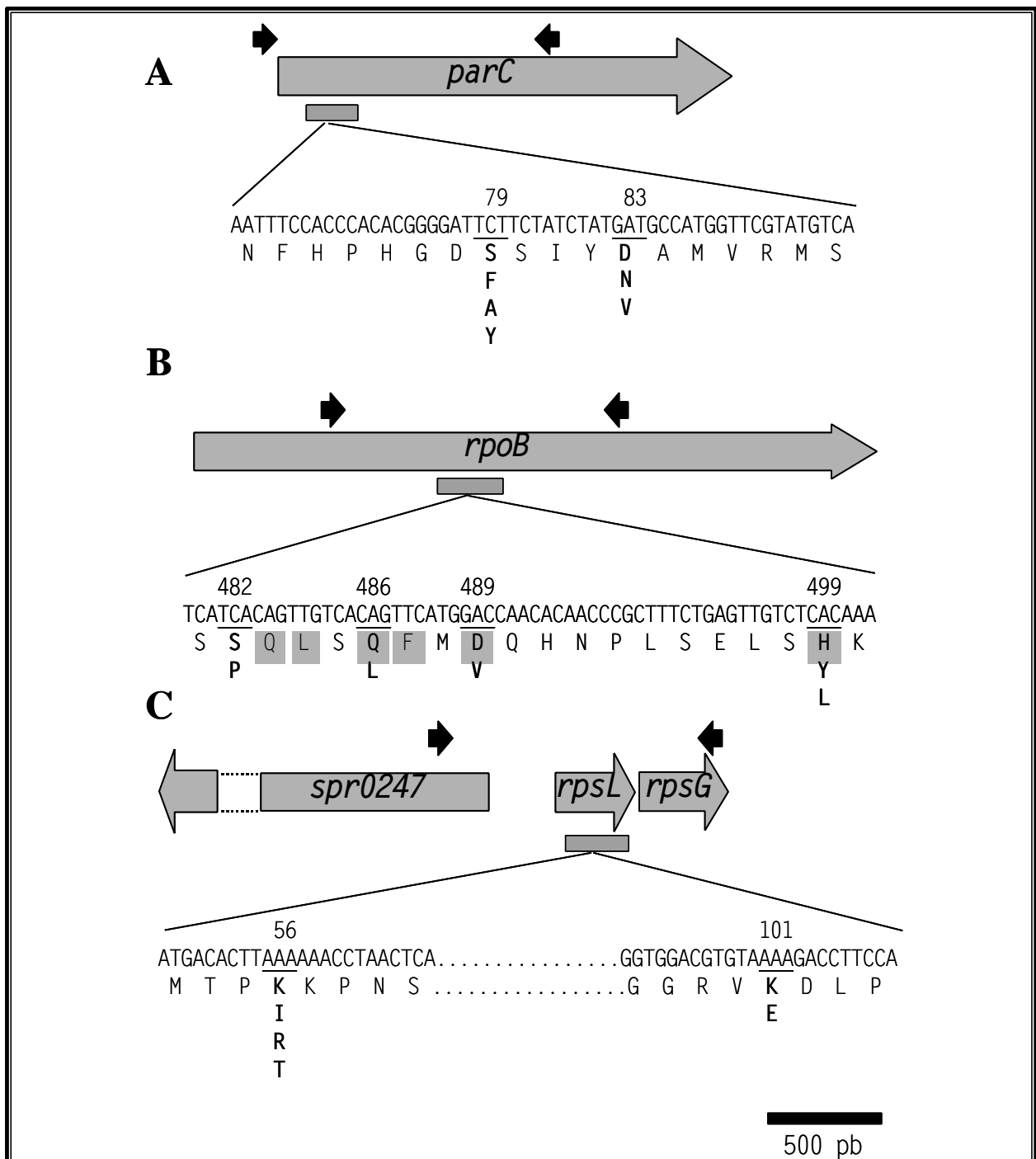


Figura 26. Localización de los productos de PCR utilizados para la obtención de mutantes, de las regiones secuenciadas y de las mutaciones presentes en las cepas Cip^R (A), Rif^R (B) y Str^R (C). Las flechas negras (no a escala) indican los oligonucleótidos usados para amplificar los fragmentos utilizados en experimentos de PCR. Los rectángulos rayados corresponden a las regiones secuenciadas. Las sustituciones de aa presentes en las cepas resistentes se muestran debajo del aa presente en la cepa silvestre (en negrita y subrayado).

Todos estos resultados en conjunto demuestran que los mutantes obtenidos son producto de la tasa de error de la DNA polimerasa durante la reacción de PCR y descarta cualquier otro evento de modificación del DNA derivado de la transformación.

Tabla XII. Obtención de cepas resistentes por transformación con productos de PCR obtenidos a partir de DNA de una cepa sensible

DNA fuente	DNA polimerasa ^b	Transformantes/ml seleccionados en ^a (Frecuencia de transformación $\times 10^{-5}$)		
		Ciprofloxacina	Rifampicina	Estreptomina
<i>parC</i>	Tth	94 \pm 21 (1,0)	—	—
	HF	33 \pm 22 (0,4)	—	—
<i>rpoB</i>	Tth	—	1.119 \pm 319 (12,4)	—
	HF	—	580 \pm 193 (6,4)	—
<i>rpsL</i>	Tth	—	—	299 \pm 88 (3,2)
	HF	—	—	72 \pm 28 (0,8)

^a se transformó 1 ml de células competentes de R6 (6×10^6 células) con 0,15 μ g de producto de PCR. Los valores representan la media \pm SEM de 3 determinaciones independientes.

^b Tth: DNA polimerasa termoestable de *Thermus thermophilus* (Biotools); HF: Expand High Fidelity PCR system (Boehringer Mannheim).

4.7.2 Características de los mutantes

Se seleccionaron diez mutantes resistentes a cada compuesto para analizar su secuencia, cuantificar su nivel de resistencia y comprobar su estabilidad. Todos los mutantes mostraron cambios únicos de nucleótido con cambio de aminoácido en regiones o puntos clave asociados con resistencia según la información publicada previamente: la región QRDR de *parC*, la región central de *rpoB* y aminoácidos de lisina en *rpsL*.

Se obtuvieron en total 5 tipos de mutantes diferentes Cip^R, 5 de Rif^R y 4 Str^R (Tabla XIII), que fueron sometidos a un posterior análisis. Los mutantes mostraron niveles de resistencia superiores a la cepa original en el rango de 4–8 veces para la Cip, mayores de 133 veces para Rif y de 128 a más de 256 veces para Str (Tabla XIII). Los fragmentos de PCR que contenían las mutaciones, amplificados a partir de DNA de las cepas obtenidas, eran capaces de transformar a la cepa sensible R6 con una eficiencia de 10^4 a 10^6 transformantes por ml, al igual que lo hacían los fragmentos equivalentes del aislado clínico 4114 y la cepa RF465KNE utilizadas como control de Cip^R y Str^R, respectivamente. Estas cifras representan un aumento de entre dos y tres órdenes de magnitud respecto a los productos de amplificación de la cepa

sensible original y confirma la implicación de las mutaciones en la adquisición del fenotipo de resistencia. Los fragmentos secuenciados, de unas 400 pb de longitud, también eran capaces de transformar a una cepa sensible aunque el número de resistentes era dos órdenes de magnitud menor que cuando se utilizaron los fragmentos de 1,6 Kpb.

Cuando en vez de utilizar fragmentos de PCR de R6 se utilizaron fragmentos de 400 pb se aislaron únicamente mutantes Rif^R con una eficiencia de 10⁻⁵ mientras que no se aislaron mutantes Cip^R ni Str^R (dos órdenes de magnitud menos transformantes que los de 1,6 Kb). Estos resultados confirman la importancia del tamaño de la región homóloga para la transformación genética en *S. pneumoniae*.

Tabla XIII. Características de los mutantes obtenidos por PCR

Antimicrobiano de selección	Cepa	Gen	Cambio de aa (cambio de codon) ^a	CMI (µg/ml) (incremento) ^b	Transformantes / ml (×10 ⁴) ^c
Ciprofloxacina	CMJ1	<i>parC</i>	S79F (TCT→TIT)	4 (8×)	4
	CMJ2		D83N (GAT→AAT)	2 (4×)	6
	CMJ3		S79A (TCT→GCT)	2 (4×)	10
	CMJ4		S79Y (TCT→TAT)	4 (8×)	27
	CMJ5		D83V (GAT→GIT)	2 (4×)	2
Rifampicina	RMJ1	<i>rpoB</i>	Q486L (CAG→CTG)	16 (> 533×)	140
	RMJ2		H499Y (CAC→TAC)	8 (> 266×)	13
	RMJ3		S482P (TCA→CCA)	4 (>133×)	43
	RMJ4		H499L (CAC→CTC)	16 (> 533×)	14
	RMJ5		D489V (GAC→GTC)	16 (> 533×)	48
Estreptomycin	SMJ1	<i>rpsL</i>	K56I (AAA→ATA)	>800 (>256×)	16
	SMJ2		K56R (AAA→AGA)	>800 (>256×)	7
	SMJ3		K56T (AAA→ACA)	>800 (>256×)	27
	SMJ4		K101E (AAA→GAA)	200–400 (64–128×)	43

^a Las posiciones asignadas a los residuos de los 3 genes son las de la secuencia genómica de la cepa R6 (Hoskins *et al.*, 2001).

^b Los valores de CMI son la media de 4 determinaciones independientes. Entre paréntesis se indica el incremento en resistencia en número de veces respecto a R6 que fue de 0,5 µg/ml para Cip, inferior a 0,03 µg/ml para Rif y 3,12 µg/ml para Str.

^c Se utilizaron productos de PCR incluyendo la secuencia total o parcial de los genes indicados para transformar células competentes de la cepa sensible R6, tal y como se expone en la Tabla XI. La capacidad de transformación de los productos de PCR amplificados a partir de DNA de los mutantes representan la media de 2 determinaciones. Como controles positivos de transformación se utilizaron productos de PCR del aislado clínico Cip^R 4114 (que presenta el cambio S79F en ParC y cuyo producto rindió 2 × 10⁴ transformantes/ml) y la cepa Str^R RF465KNE (que presenta el cambio K56T en la proteína S12 y cuyo producto de PCR rindió 60 × 10⁴ transformantes/ml).

Para comprobar que las mutaciones podían transferirse y permanecer de un modo estable, se seleccionaron y analizaron 2 colonias resultantes de la transformación con el DNA amplificado a partir del DNA de cada cepa mutante. Todas las cepas derivadas de los mutantes conservaron el cambio de nucleótido y mostraron los mismos niveles de resistencia que los clones originales, lo que reforzaba la relación entre mutación y resistencia

4.8. CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS CLÍNICOS ATÍPICOS DEL GRUPO *viridans*

4.8.1. Sensibilidad a antimicrobianos

Se recibieron 2 cepas clínicas de estreptococos del Laboratorio de Referencia de Neumococo del Instituto de Salud Carlos III, que mostraban características atípicas según las pruebas de identificación. Estos 2 aislados, 1174/97 y 1162/99, fueron clasificados inicialmente como neumococos por ser α -hemolíticos y presentar sensibilidad a Opt, con unos halos de inhibición de 14 y 20 mm respectivamente. Sin embargo, no presentaban solubilidad en bilis y el análisis de su DNA reveló la ausencia de los genes de virulencia específicos de neumococo *lytA* (autolisina) y *pnl* (pneumolisina) (Asunción Fenoll, comunicación personal). El sistema API 32 Strep los identificó como *S. oralis* (Asunción Fenoll, comunicación personal).

Se calcularon las CMI a Opt, Qin y Mfl de estos aislados (Tabla XIV). El aislado 1162/99 presentó una sensibilidad idéntica a las 2 cepas tipo de *S. pneumoniae*, mientras que el aislado 1174/99 mostró unos niveles de Opt^R y Mfl^R que eran intermedios entre las cepas tipo de *S. pneumoniae* usadas como controles de sensibilidad y las cepas tipo de *S. oralis* y *S. mitis* usadas como controles de resistencia.

Tabla XIV. Resistencia de aislados clínicos y cepas control a compuestos antimicrobianos

Cepa	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
	Optoquina	Quinina	Mefloquina
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303	0,75	50	0,31
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,75	50	0,31
<i>S. mitis</i> NTCT 12261	96	800	40
<i>S. oralis</i> NTCT 11427	48	400	40
<i>S. oralis</i> ATCC 10557	48	400	20
Aislado 1174/97	6	800	10
Aislado 1162/99	0,75	50	0,31

4.8.2. Análisis de la secuencia.

Se secuenciaron los genes *atpC* y *atpA* en ambos aislados clínicos por ser los genes responsables del fenotipo de sensibilidad a antimicrobianos de tipo amino-alcohol en *S.*

pneumoniae. El aislado 1162/99 mostró una similaridad casi completa (99,70%; 3 cambios en 990 nucleótidos; sin cambio de aminoácido) con la cepa R6 de *S. pneumoniae*, lo que explicaba la sensibilidad a antimicrobianos de este aislado clínico. Por otro lado, los genes *atpC* y *atpA* del aislado 1174/97 mostraron mayor identidad con *S. mitis* (83,07%) y *S. oralis* (80,99%) que con *S. pneumoniae* (79,51%).

Teniendo en cuenta que las pruebas de identificación mostraron que el aislado 1162/99 no pertenecía a la especie *S. pneumoniae*, se secuenció la región situada 5' respecto al operón *atp* para comprobar si existían puntos de recombinación. La identidad entre *S. pneumoniae* y el aislado 1162/99 se mantenía en un fragmento de 50 pb (sólo 2 cambios) que alcanzaba hasta la caja -10 del promotor. A partir de ese punto y hasta la posición -115, se observó un incremento abrupto en el número de cambios que además coincidían en gran medida con los presentes en el resto de cepas secuenciadas, de tal modo que la homología en esta región era mayor con *S. mitis* (93,8%) que con *S. pneumoniae* (78,5%). Esta situación se mantenía hasta el codón de paro de un nuevo ORF situado 5' respecto a *atpC* en R6, que se trata de una secuencia de inserción del tipo IS1239 identificada como el gen *spr1367* en la secuencia genómica de R6 (Hoskins *et al.*, 2001). Sin embargo, este gen no aparecía en esta posición los dos aislados ni en las cepas tipo de *S. oralis* y *S. mitis* por lo que ya no existía homología entre su secuencia y la de *S. pneumoniae*. En estas cepas aparecía un nuevo ORF después de una secuencia intergénica de 302–313 pb, excepto en *S. oralis* en la que era 246–257 pb superior debido a la presencia de numerosas inserciones. En el aislado 1162/99, este ORF tenía una identidad del 87% con el gen *spr1284* de R6, que codifica una proteína de 47,9 KDa compuesta por 428 residuos y que, hipotéticamente, codifica una peptidasa de la familia U32. Esta enzima estaba muy conservada entre *S. pneumoniae*, *S. mitis* y los 2 aislados clínicos ya que existía una identidad superior al 97% para los polipéptidos deducidos de la secuencia nucleotídica. Este gen fue localizado a una distancia de 68.630 pb del gen *atpC* en la cepa R6 y a 73.606 pb en la cepa TIGR4 utilizando la información de las secuencias genómicas respectivas, lo que significaba que la organización génica era distinta en esta región cromosómica entre *S. pneumoniae* y las otras 4 cepas.

Situada 3' al cambio observado en la caja -10 del promotor se encontraba una región de 19 pb que era idéntica entre *S. pneumoniae*, *S. mitis* y los 2 aislados clínicos, lo que la hacía ser candidata a ser el punto 5' de recombinación (Fig. 27).

Por otro lado, la secuenciación del tercer gen del operón en el aislado 1162/99, *atpB*, permitió encontrar una región de 24 pb conservada entre las 4 cepas, a partir de la que se perdía nuevamente la identidad entre R6 y el aislado 1162/99, por lo que se trataba teóricamente del punto 3' de recombinación (Fig. 27). Teniendo en cuenta la situación de los dos puntos de recombinación candidatos, el tamaño hipotético del fragmento recombinado era de aproximadamente 1,3 Kpb.

La sensibilidad parcial a Opt de la cepa 1174/97 podría deberse a dos cambios de aa con respecto a la cepa tipo de *S. mitis* NCTC 12261 y que están cercanos a los residuos en los que se acumulan las mutaciones que confieren Opt^R a *S. pneumoniae*. En la subunidad *c* existe el cambio cL21M, al lado de cG20, y en la subunidad *a*, el cambio aA205I, al lado de aW206.

=>	IS1239	-35	-10	
-115	TAG CAA?AATGGAAATAATTTTTATTAAACGCTTCCAATAGCGGTTAAAAAG TTGACA AATTTAAATTTAGGACT TACACT			SPN
	. . . T . A . T . T CC T GTT . . A CC . T A			1162
	. . . T . . . T . AT T GTTA . A CC . T A			1174
	. . . T . A . T . T C T CGTAA . A CC . T A			SMI
 A TA . A . C . G T CGTAA . A CA A			SOR
	atpC =>			
-35	AAGTAAGTAAATTTTATTTTAAAGGAGAATTTGTT ATGA AATTTAACATTTTATAGGCTTATGTATGCCTGTATGGGCGTA			SPN
 C C			1162
 A . A G . C . C C . C . TC T			1174
 A . A C . C TC C T			SMI
 AA . A CA . C C . TC . T . C T			SOR
45	TCTGTCGGTGAAGGTTTATTGATGAATGGACTGTTTAAATCAGTAGCACGCCAACAGATATGCTTTCTGAGTTTCGTAG			SPN
 G TT . . G T TA . CG			1162
	. . . C . T G A . G TT . . G T TA . CG			1174
	. . . C . T G C . TT . . G T . T CA . C . A . AC . A			SMI
	. . . C . T . CA A . G C . TT . . C C . T C . CA . CC . AC . A . A			SOR
125	TTTGATGTTTTAGGTGTGCCTTTATTTGAAGGAACCTTCTTTGTAACCTTTGTCTTCTCATTATTATTATCAAAT AA AATAC			SPN
 C G C T CG . A			1162
 A . CC G T C . T T C			1174
 C . A . . A . CA . G . GA G G . T . C . C T CG . C G . C . A .			SMI
 C . A . . A . CA . G . GA G G . T . C . C T CG . C G . C . A .			SOR
	atpA =>			
205	ATGGAACGAGAAGAAAAGGGAGGATTTTAG ATG GGAAGAAAGTATTAATCCAATCATCTCTATTGGTCTCTTATCTTCAA			SPN
 A . G C C AA C . TG			1162
	. . . AT . AT ?? A . G C C AA C . TG			1174
	. . . C . . . T . . T . A . C . AG AG . G . AT . ATTG . A . ?			SMI
 C C C C AA C . TG			SOR
285	TCTGACTATGTTAGCCATGACTTTGTTGATTGTGGGAGTTATTTTGTCTTTATTTATTGGGCAAGCCGCAATATGACCT			SPN
 C			1162
	. . . T . A . . T . AC . . . T C . TC . . TTTC . G CA . . . C T . T A .			1174
	. . . T . A TTT C A . C . C G CT . A T .			SMI
	. . . T . A . C C C G C T T .			SOR
365	TGAAACCCAAAGGAAAGCAAAATGTAAGTATGTCTATGACTTTGTTATTGGATTACAGAACCTAACATTGGTTTCG			SPN
 T . A A C T A . A C C .			1162
 G C A T . A T G A . T . A . . C ???			1174
 T . A A C T A . A C C .			SMI
 G C A T . A T G A . T . A . . C ???			SOR
 T . A A C T A . A C C .			SMI
 G C A T . A T G A . T . A . . C ???			SOR
 T . A A C T A . A C C .			SMI
 G C A T . A T G A . T . A . . C ???			SOR
445	CGCTACATGAAAGATTACTCACTCTTTTCTTTGTTTATTCCCTTTTCATGGTGATTGCCAATAACCTTGGCTTAATGAC			SPN
 T			1162
	. . . A A A . T . A T T C . C . T T T . G . . G .			1174
	. . . CAATG . A . G T . T ATT . C A CC A TA G .			SMI
	. . . A C . G G C T . A . T AC . G . A C . T . G . G .			SOR
525	AAAGCTTCAAACGATCGATGAGACTAACTGGTGGAGTTCGCCAACCGCTAATTTACAGTATGACTTAACCTTATCTTTTC			SPN
 T . A A . CA G A CTT CA T . A . . C . TTCA . T C . TGT . . G CT			1162
	. . . T . GAA G . T . CA GTGTA . TCTT CC . A A . A GTCA . T GGT G A			1174
	. . . C . A T . CA A CTT CA T . A T . A C . C T GG . G . A G			SMI
	. . . C . A T . CA A CTT CA T . A T . A C . C T GG . G . A G			SOR
585	TTGTCATTTTGTGACACATATAGAAAGCGTTTCGTCGTCGGATTAAAAAAGTATAAAAATCTTTTATGAGTCTCTGTG			SPN
 G . A . T A . G . G . C . T . GG . GA C GA C . TACC GG G . A . C CA			1162
	. . . CAA . T . C . AA C . CG G . AA A . C GTA . T G . A . . G . A . CA GT			1174
	. . . GAA . T . CC . A C T G . GA C GA TA . C G . C . A C . CA GC			SMI
	. . . GAA . T . CC . A C T G . GA C GA TA . C G . C . A C . CA GC			SOR
665	TTTGTACATACCGATGAATATCTTGAAGAATTTACAACTTCTTATCTTTGGCTTTGCGGATTTTCGGGAATATCTTTGC			SPN
 T			1162
	. . . A . G . C C . AC . T G . C . G . T C . T C . T T			1174
	. . . A . G . C A C A G C . TC . C . T . AC . T . A G . A . T . T			SMI
	. . . A . G . CT . C A G C T AC . T . C G . G A			SOR

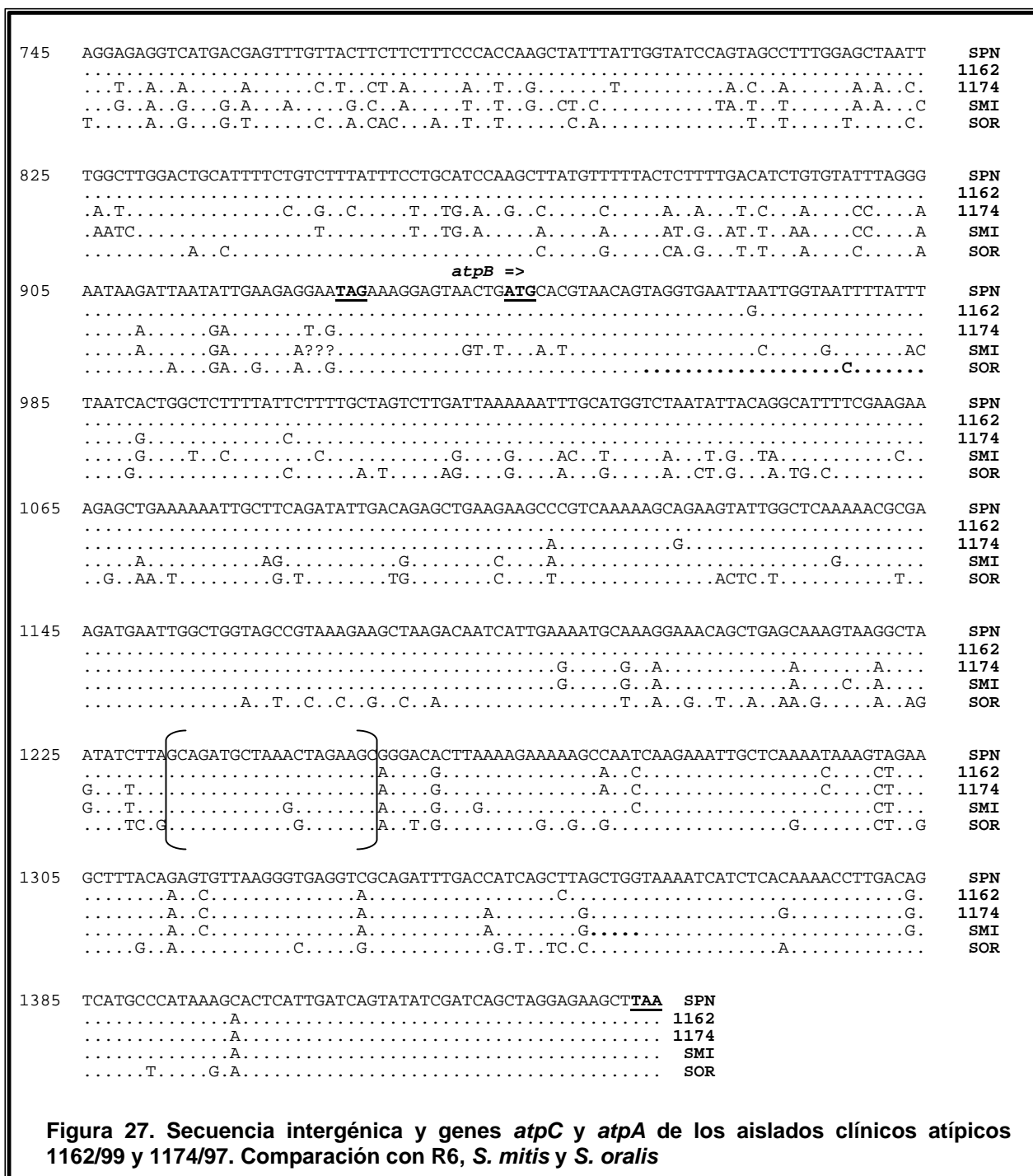
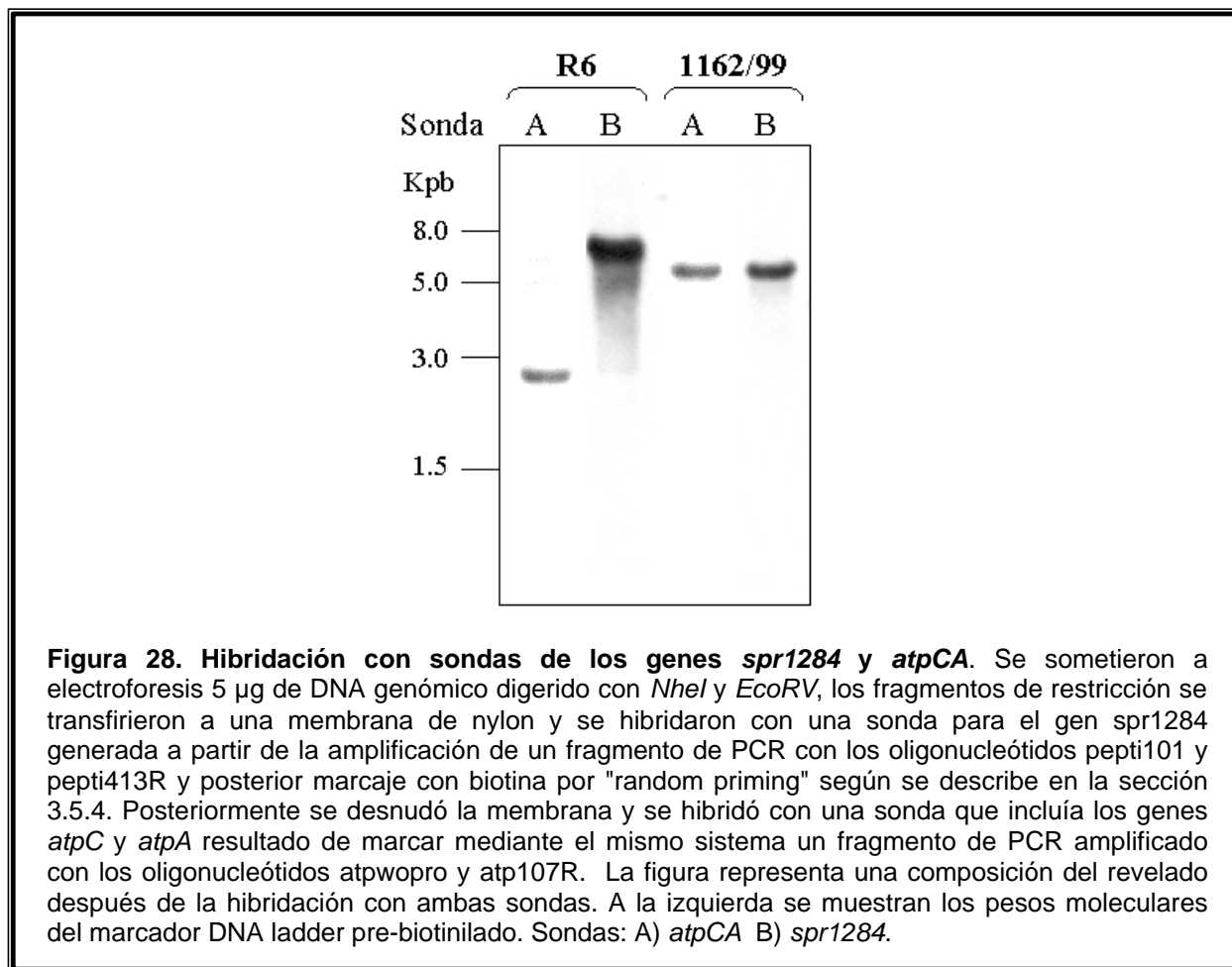


Figura 27. Secuencia intergénica y genes *atpC* y *atpA* de los aislados clínicos atípicos 1162/99 y 1174/97. Comparación con R6, *S. mitis* y *S. oralis*

4.8.3. Confirmación del orden génico por hibridación de DNA

Para confirmar la diferente organización génica entre *S. pneumoniae* y el resto de las cepas en esta región se utilizó la técnica "Southern blot", utilizando DNA cromosómico de las 5 cepas utilizadas en el estudio digerido con las enzimas *NheI* y *EcoRV* (Fig. 28). Mientras que una sonda que contenía el gen de la peptidasa hibridó con un fragmento de restricción de 6,3 kpb de R6 y un fragmento de 4,9 kbp del aislado clínico 1162/99, otra sonda con los genes *atpCA* hibridó con un fragmento distinto en R6, de 2,9 kpb de longitud, pero con un fragmento del mismo tamaño, 4,7 Kpb, en el aislado clínico 1162/99. Estos resultados confirmaban que el

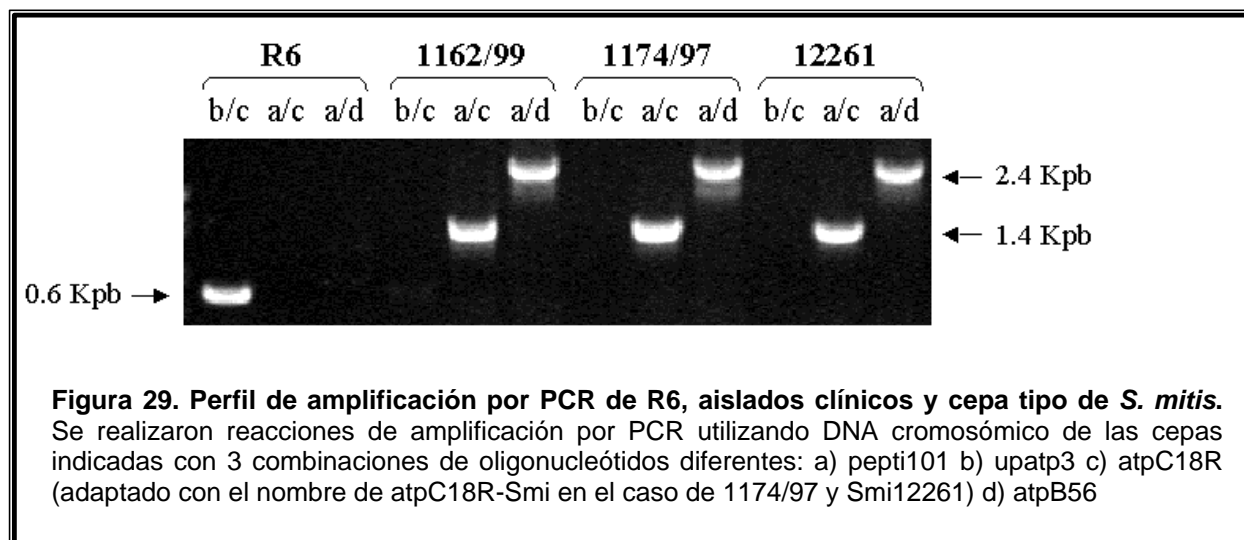
gen de la peptidasa se encontraba en proximidad al operón *atp* en el aislado clínico 1162/99 pero no en R6. El tamaño de los fragmentos en R6 coincidía con los tamaños predichos por el mapa de restricción de su secuencia genómica. No se detectó hibridación entre la sonda con los genes *atpCA* y el DNA genómico del aislado 1174/97 y las cepas tipo de *S. mitis* y *S. oralis* debido a que presentan una identidad inferior al 80% respecto a la sonda. Contrariamente, en todas las cepas se detectó hibridación cuando se utilizó la sonda con el gen de la peptidasa, debido a que está más conservado.



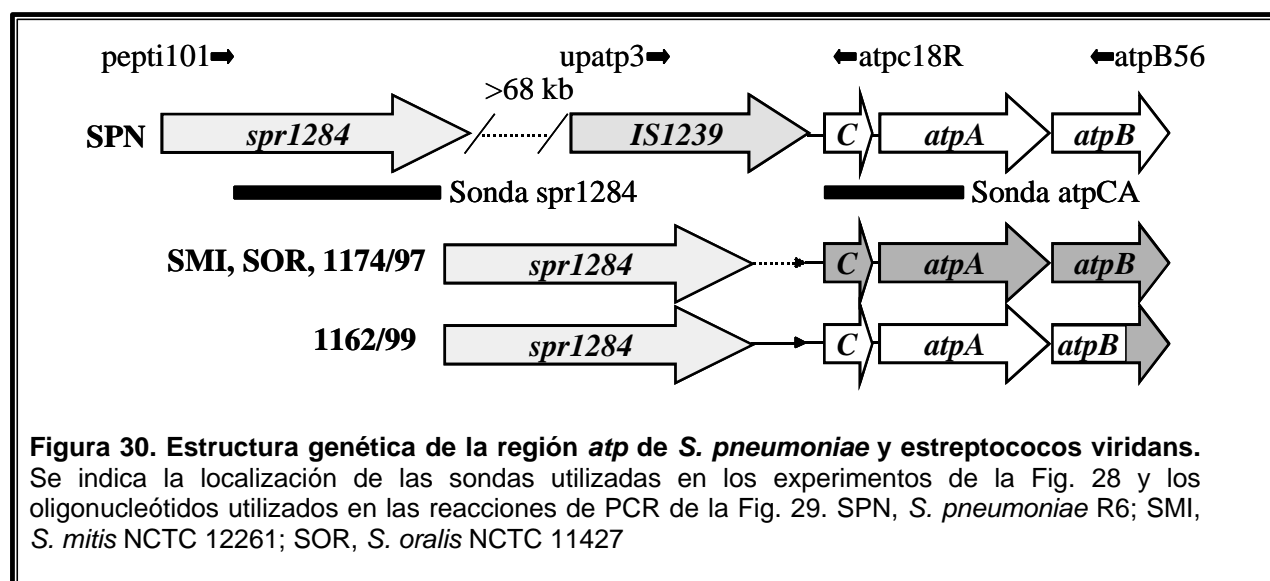
4.8.4. Confirmación del orden génico por PCR

Se analizó la organización génica mediante PCR, utilizando oligonucleótidos localizados en posición 5' que primaban en el gen de la secuencia de inserción o en de la peptidasa y oligonucleótidos 3' que primaban dentro del operón *atp*. En el caso de R6 sólo se obtuvo amplificación en el caso en el que se utilizó un oligonucleótido 5' situado dentro del gen de la secuencia de inserción IS1239, generándose un fragmento de 0,6 Kpb (Fig. 29), mientras que la ausencia de amplificación cuando se utilizó un oligonucleótido que primaba con el gen de la peptidasa era atribuible a la lejanía existente entre este gen y el operón *atp*. Por el contrario, en el caso de los aislados clínicos 1162/99 y 1174/97 sólo existió amplificación cuando el

oligonucleótido 5' primaba en el gen de la peptidasa, rindiendo fragmentos de 1,4 y 2,4 Kpb según la posición del oligonucleótido 3' utilizado, un patrón de amplificación idéntico al obtenido para la cepa tipo de *S. mitis* (Fig. 29). Estos datos apoyaban a los resultados obtenidos por secuenciación y "Southern blot". Mediante un análisis análogo por PCR se observó que todas las cepas tenían el mismo ORF situado 3' al operón *atp* (datos no mostrados). Este locus, denominado como *spr1358*, codifica una proteína conservada sin función asignada.



De estos resultados se deduce que la organización génica de la región cromosómica situada 5' al gen *atpC* es diferente en *S. pneumoniae*, *S. oralis* y *S. mitis*. La organización génica de los aislados 1174/97 y 1162/99 coincide con la de los estreptococos viridans (Fig. 30)



4.8.5. Confirmación de presencia en los aislados clínicos de un gen específico de estreptococos viridans

Para confirmar adicionalmente que los aislados clínicos 1174/97 y 1162/99 no eran cepas de *S. pneumoniae* sino del grupo *viridans*, se analizó la presencia del gen *ant*. Este gen es homólogo al que codifica una proteína implicada en la transferencia de grupos adenilo a los aminoglicósidos, confiriendo así resistencia a eritromicina (Ohmiya *et al.*, 1989). El gen *ant* no está presente en el genoma de *S. pneumoniae* salvo en aislados clínicos mosaico para genes de la topoisomerasa IV que han sufrido un evento de recombinación con DNA procedente de estreptococos orales (Balsalobre *et al.*, 2003).

El análisis de "Southern blot" utilizando una sonda para el gen *ant* mostró hibridación tanto en el caso del DNA de los dos aislados clínicos, 1162/99 y 1174/97, como en el de las cepas tipo de *S. mitis* y *S. oralis*, mientras que no existió hibridación con DNA de R6 (Fig. 31). Los resultados de este experimento apoyaban los datos obtenidos previamente que indicaban que ninguno de los dos aislados clínicos era miembro de la especie *S. pneumoniae* a pesar de su sensibilidad total o parcial a Opt.

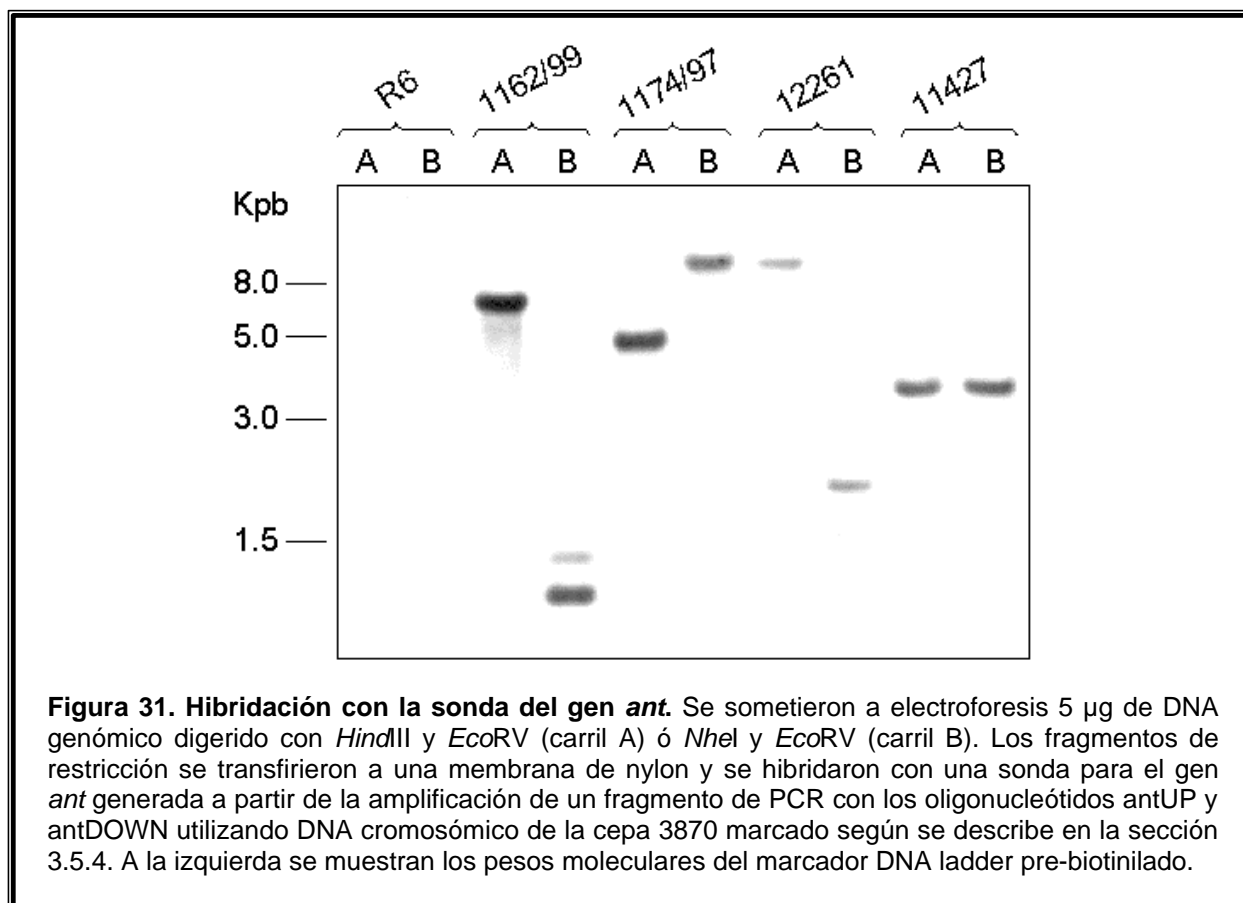


Figura 31. Hibridación con la sonda del gen *ant*. Se sometieron a electroforesis 5 µg de DNA genómico digerido con *Hind*III y *Eco*RV (carril A) ó *Nhe*I y *Eco*RV (carril B). Los fragmentos de restricción se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con una sonda para el gen *ant* generada a partir de la amplificación de un fragmento de PCR con los oligonucleótidos antUP y antDOWN utilizando DNA cromosómico de la cepa 3870 marcado según se describe en la sección 3.5.4. A la izquierda se muestran los pesos moleculares del marcador DNA ladder pre-biotinilado.

5. DISCUSIÓN

5.1 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL OPERÓN *atp*

El operón *atp* de *S. pneumoniae* fue clonado en *E. coli* en varias fases hasta obtener un plásmido que contenía el operón completo, aunque sin incluir el promotor (Fig. 6). Las dificultades encontradas en la clonación de este operón y su estabilidad utilizando plásmidos de alto número de copias ya había sido descrita en los casos de *S. faecalis* y *S. mutans* (Shibata *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1996). Estos problemas son atribuibles tanto a la dificultad de clonar genes de bacterias Gram-positivas ricas en AT en *E. coli* debido a la potencia de sus regiones promotoras (Dillard and Yother, 1991) como a la toxicidad derivada del incremento de la cantidad de subunidad *a* (Fenoll *et al.*, 1994).

El operón *atp* de *S. pneumoniae* está codificado por ocho genes ordenados del siguiente modo: *atpCABδ α γ β ϵ* (Fig. 7). Los ocho genes se transcriben a partir de un único promotor. La transcripción se inicia a 29 pb del codon de inicio del gen *atpC* (Fig. 12). El inicio del mRNA de los operones *atp* de *S. mutans* (Smith *et al.*, 1996) #658] y *L. lactis* (Koebmann *et al.*, 2000) ocurre en posiciones análogas. El tamaño del mRNA del operón *atp* es de 6,5 kb (Fig. 13), indicando que todos los genes se transcriben en una única molécula de mRNA y que el terminador de transcripción localizado en posición 3' a *atp ϵ* (Fig. 7) es funcional. El operón de *S. pneumoniae* carece del gen *atpI*, mientras que *atpC* y *atpA* tienen intercambiadas sus posiciones respecto a la mayoría de las bacterias estudiadas (Fenoll *et al.*, 1994), al igual que en *S. mutans* (Smith *et al.*, 1996), *L. lactis* (Koebmann *et al.*, 2000), *S. sanguis* y *S. bovis* (GeneBank). Estas dos características probablemente obedecen a una distinta estrategia de ensamblaje del complejo. Aunque se han propuesto varios mecanismos en *E. coli*, no excluyentes, para explicar cómo las diferentes subunidades del operón se sintetizan en la relación apropiada respecto a la estequiometría a partir de una única molécula de mRNA, éste es un fenómeno aún no totalmente comprendido. El control de la traducción diferencial de los genes del operón sería también un fenómeno multi-factorial en *S. pneumoniae* en el que podrían estar implicados: cortes endonucleolíticos específicos dentro del mRNA (Fig. 7); incremento en la estabilidad del complejo de iniciación de la traducción mediada por la complementariedad de la cuarta base del gen y el perfil de uso de codones (Tabla VII). Sin embargo, no se hallaron pruebas de que las secuencias de unión al ribosoma de los genes estuvieran implicadas en su traducción diferencial. Los genes de las subunidades α y β mostraron un perfil de uso de codones más adaptado a una elevada tasa de traducción que el resto de los genes del operón, evitando la acumulación de codones extraños que podrían ralentizar la traducción (Tabla VII). Esto indicaría que *atp α* y *atp β* habrían optimizado su secuencia para mejorar la fase de elongación de la traducción, lo que encaja con su mayor estequiometría. También se han encontrado pruebas de que la traducción de la subunidad *a* está especialmente controlada. Además de existir un posible corte endonucleolítico en el

mRNA de *atpA* (Fig. 7), su perfil de uso de codones, acumulación de codones extraños y uso efectivo de codones es claramente más desfavorable para su expresión que los observados en el resto de los genes (Tabla VII). Todos estos mecanismos podrían ir destinados a limitar la expresión de una proteína necesaria en bajas cantidades y potencialmente tóxica. En cuanto al gen de la subunidad *c*, la que presenta mayor estequiometría, aunque no mostró ninguna ventaja adicional respecto al uso de codones, tiene características suficientes como para poder justificar una elevada tasa de traducción. La primera es el hecho de ser el primer gen del operón (Figs. 6 y 7) ya que en procariontes el proceso de transcripción y el de traducción son simultáneos. De este modo, este gen puede empezar a traducirse antes de que acabe la transcripción de los genes más distales. El pequeño tamaño de su producto, sólo 66 aa, facilitaría su expresión en grandes cantidades. Además, este gen dispone en el mRNA de una secuencia muy rica en AT delante de su región RBS, algo que se ha asociado a una potenciación de la traducción. Además, presenta A como cuarta base del gen.

La comparación de las secuencias de las subunidades del complejo F_0F_1 con el resto de las secuencias presentes en las bases de datos mostró que las subunidades del complejo F_0 están menos conservadas (Tabla VIII), quizá por el hecho de que son las que determinan la resistencia específica del microorganismo al pH (Sturr and Marquis, 1992). Las subunidades *c* de los dos estreptococos más acidúricos (*S. mutans* y *S. bovis*) muestran un 92% de identidad. Puesto que las subunidades del complejo F_0 raramente superan una homología del 70%, incluso entre bacterias muy cercanas, esta elevada identidad hace suponer que la subunidad *c* determina la resistencia al ácido de la ATPasa F_0F_1 .

5.2. HIPEREXPRESIÓN DEL OPERON *atp* EN *E. coli*

Los ocho genes del operón *atp* codifican polipéptidos de tamaños aparentes similares a los esperados según los experimentos de hiperexpresión en *E. coli* BL21(DE3). Por otra parte, la presencia de dos polipéptidos de tamaño similar a los de las subunidades α y β apuntan a que podrían estar funcionando procesos de proteólisis (Fig. 11A). En casos de hiperproducción de las subunidades del complejo F_0 , la construcción final de la enzima podría verse alterada por agotamiento de factores adicionales necesarios para el correcto ensamblaje (Brusilow, 1993). En cultivos inducidos no se observó correlación entre el incremento de actividad ATPasa de membrana (1,95 veces en el clon que contenía pOPTN8) y el gran aumento en la cantidad de enzima expresada (Fig. 10). Este hecho podría atribuirse a defectos en la síntesis equilibrada de las subunidades y/o al ensamblaje de éstas. De hecho, cuando se realizó un fraccionamiento celular, la mayor parte de las subunidades α y β formaban aparentemente cuerpos de inclusión insolubles y precipitaban junto con los restos celulares (datos no mostrados). Por otra parte, la deficiente obtención de complejos F_0F_1 funcionales podría atribuirse tanto a ausencia de la región promotora del operón *atp* en pOPTN8 como a la

complejidad de los mecanismos de regulación de la traducción adaptada a la estequiometría del complejo. Estos mecanismos podrían estar muy adaptados a la maquinaria de traducción y las condiciones citoplásmicas de cada microorganismo, pudiendo ser muy diferentes en organismos tan separados evolutivamente como *S. pneumoniae* y *E. coli*. La expresión basal (en ausencia de inducción) de los genes presentes en los plásmidos recombinantes influyó en la tasa de crecimiento de las cepas que los llevaban. Los plásmidos que más afectaron al crecimiento, según el tiempo de duplicación cuantificado en el intervalo $OD_{600} = 0,1-0,5$ en medio M9-S, fueron pOPNT8, pOPTN3, pOPTN4 y pOPTN7 (con tiempos de generación entre 115 y 119 min). La presencia de pOPTN5 (100 min) afectó sólo levemente respecto a la cepa con el vector pSU24 (92 min). De estos resultados se deduce que los plásmidos que más afectaron al crecimiento contenían genes de subunidades del complejo F_0 , lo que se ha asociado en *E. coli* con la toxicidad de la subunidad α y a fugas de protones al medio extracelular que son deletéreas para la célula pero no lo suficiente como para inhibir completamente el crecimiento (Brusilow, 1987). El bajo efecto sobre la viabilidad celular de pOPTN5 está justificado ya que sólo porta genes de subunidades citoplásmicas, cuya presencia no es tóxica. Análogamente, se ha observado que cuando la superproducción de las subunidades de la ATPasa de *E. coli* es superior a seis veces se produce una disminución del crecimiento acompañada de la aparición de estructuras aberrantes en la membrana debido al exceso de complejos F_0 (von Meyenburg *et al.*, 1984).

5.3. RESPUESTA A LA ACIDIFICACIÓN

5.3.1. Incremento de la expresión de la ATPasa F_0F_1

A pesar de su relativa sensibilidad al ácido, la actividad de la ATPasa F_0F_1 también aumenta en respuesta a la acidificación del medio en *S. pneumoniae*, tal y como se había observado en bacterias similares pero más acidúricas. Este aumento se produce dentro del rango de pH de 7.5 y 5.7 (Fig. 14), decreciendo nuevamente por debajo de pH 5.7 (datos no mostrados) posiblemente por daños en las enzimas glicolíticas (Bender *et al.*, 1986) o en la propia ATPasa F_0F_1 teniendo en cuenta su perfil de actividad (Fig. 19). Un perfil similar se observó en el caso de *S. oralis* (Fig. 14A). De igual modo, en *S. bovis*, la actividad ATPasa aumenta con la acidificación del medio entre los valores de pH 7.0 a 4.5 (Miwa *et al.*, 2001). El incremento de actividad ATPasa se correspondió con un incremento paralelo en la cantidad de proteína medida como cantidad de las dos subunidades más abundantes en el complejo, α y β , por lo que la relación actividad/proteína permanecía constante (Fig. 15). El incremento en la cantidad de la subunidad β también se ha observado por "western blot" en *S. bovis* (Miwa *et al.*, 2001). Otro estudio ha detectado por electroforesis bidimensional en *S. oralis* incrementos de al menos 2 veces en las 5 subunidades del sector F_1 (Wilkins *et al.*, 2001). El incremento en

cantidad de proteína se correspondió asimismo con un incremento en la cantidad de mRNA específico del operón (Fig. 16). Recientemente, también se ha observado un incremento paralelo al de la actividad enzimática en el mRNA de *S. bovis* (Miwa *et al.*, 2001) y *Lactobacillus acidophilus* (Kullen and Klaenhammer, 1999).

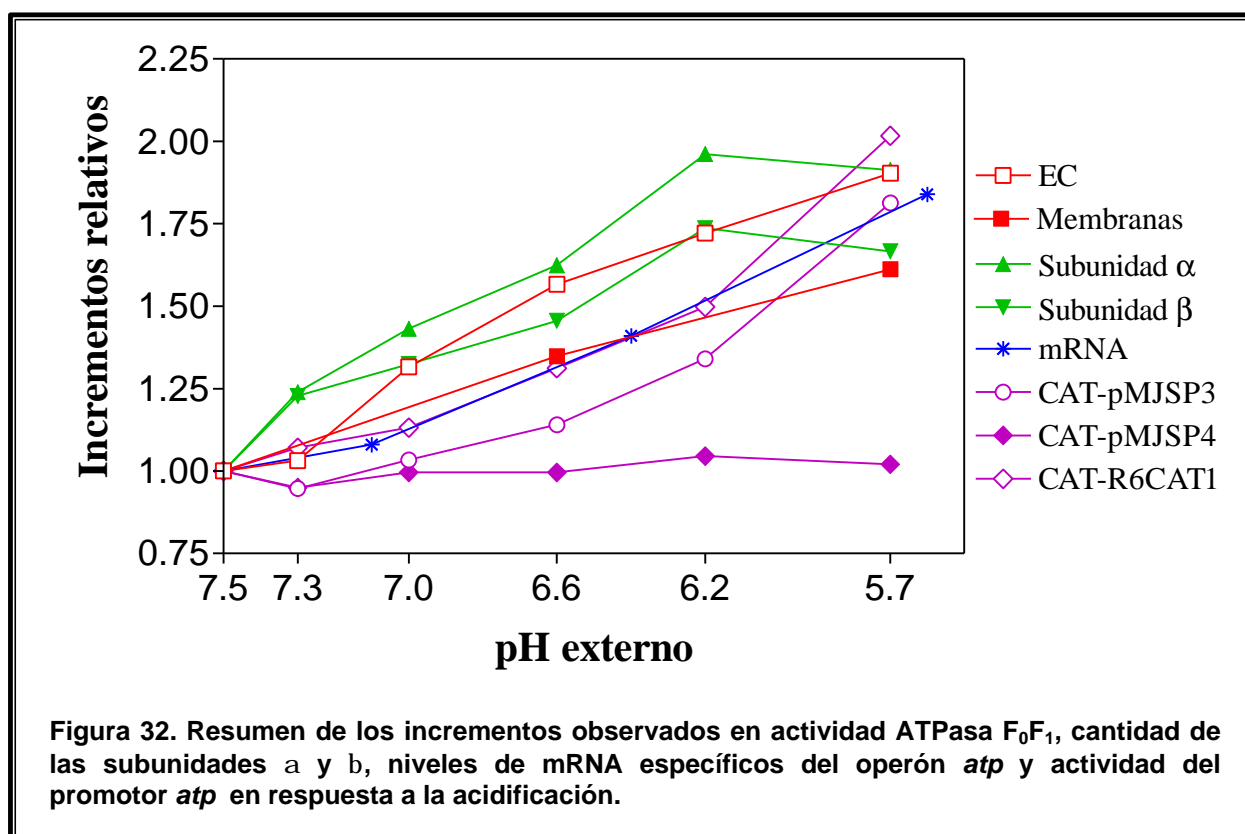
Las variaciones menores de dos veces en las actividades enzimáticas han sido consideradas por algunos autores como no significativas para la fisiología bacteriana, debido a la dificultad de obtener resultados reproducibles. En ciertos casos cambios pequeños pueden ser trascendentes, como es el caso de la actividad fosfofructoquinasa para la que una reducción de 2 veces tiene una fuerte repercusión en la tasa de crecimiento de *L. lactis* (Andersen *et al.*, 2001). Este podría ser el caso de la ATPasa F_0F_1 , puesto que se ha sugerido que cambios de actividad de dos veces o incluso inferiores podrían originar cambios metabólicos significativos en *E. coli* (Brusilow, 1993). Además, las variaciones en la ATPasa F_0F_1 de *S. pneumoniae* no pueden ser muy grandes ya que se trata de la ATPasa mayoritaria de la célula (como se deduce de la comparación de los niveles de actividad detectados en extractos crudos y membranas) y fuertes incrementos podrían no ser viables por el fuerte impacto que tiene su función en los niveles celulares de ATP. En *S. mutans* la actividad ATPasa se incrementa también 2 veces entre pH 8.0 y 6.0, como la diferencia que se ha observa en *S. pneumoniae*, y sólo cuatro veces entre pH 8.0 y 5.0 (Hamilton and Buckley, 1991), a pesar de que el incremento de esta función enzimática juega un papel muy importante en la fuerte adaptación que esta bacteria desarrolla frente al pH ácido.

5.3.2. Actividad del promotor del operón *atp*

La respuesta del promotor a la acidificación se testó mediante fusiones génicas de tipo transcripcional-traduccionales entre el promotor del operón y el gen *cat* (Fig. 17). El operón fue capaz de incrementar su actividad en respuesta a la acidificación y era por lo tanto responsable principal de los incrementos observados en todos los niveles anteriores: mRNA, proteína y actividad enzimática (Fig. 32). Esto supone un tipo de control a nivel de iniciación de transcripción como indicaba el experimento de "primer extension". Curiosamente, se obtuvieron valores de aproximadamente el doble de actividad cuando la construcción se encontraba en el cromosoma que cuando la construcción estaba presente en un plásmido. Este hecho puede ser interpretado como que la región 5' al punto de inserción de la construcción estaría afectando a la actividad del promotor.

El hecho de que una mutación en la caja -10 del promotor no impidiera su funcionamiento basal pero sí su capacidad para ser regulado apoya la hipótesis de que esa base puede formar parte de una secuencia de reconocimiento por parte de un factor σ alternativo o de otro tipo de regulador. En *E. coli*, el factor sigma de fase estacionaria, codificado por el gen *rpoS*, dirige una respuesta que aumenta la capacidad de resistencia al

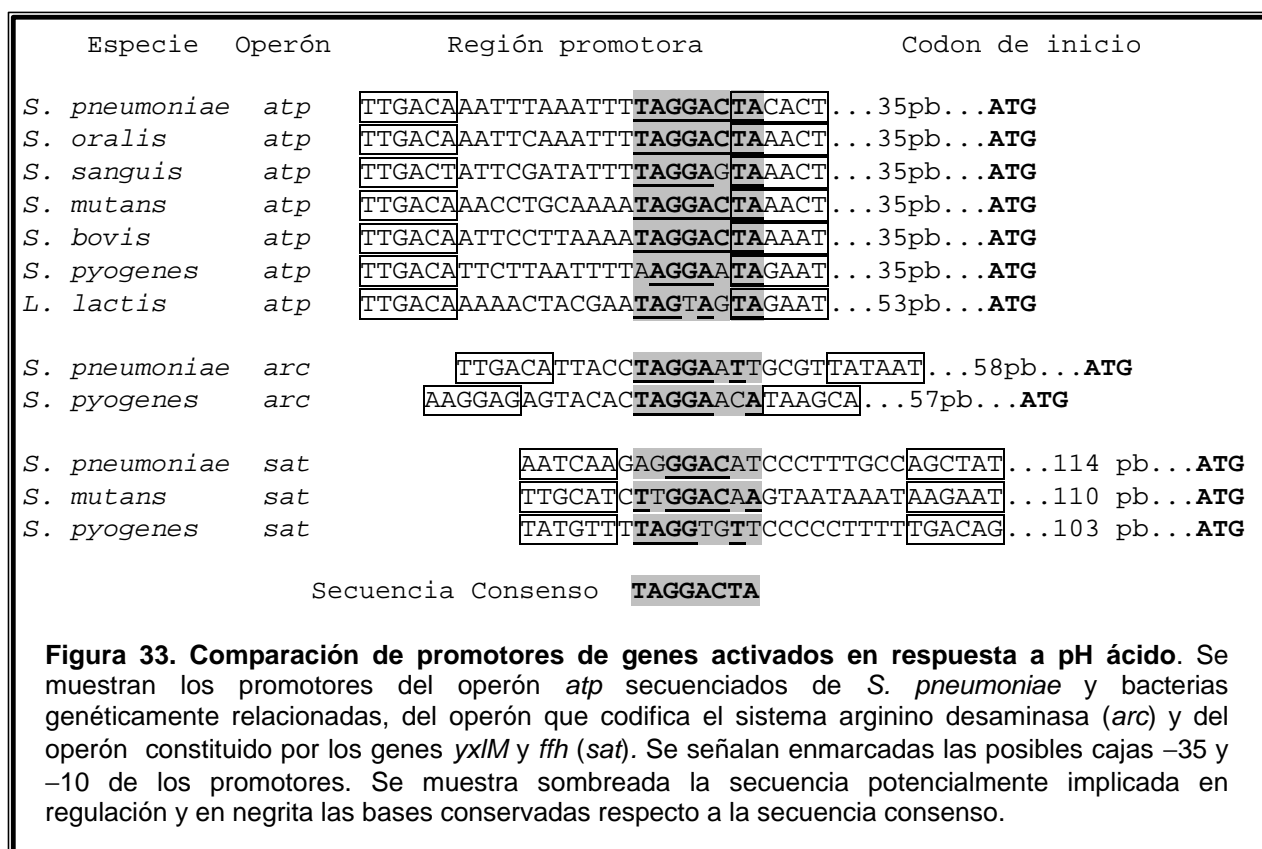
ácido, a temperaturas extremas y al estrés osmótico. Curiosamente, la caja -10 del promotor de los genes que regula este factor sigma alternativo, CTATACT, es casi idéntica a la caja -10 del operón del operón *atp* de *S. pneumoniae*. Solamente un cambio de base diferencia ambas secuencias (CTAÇACT en *S. pneumoniae*) en la posición menos conservada de la secuencia consenso del factor sigma de fase estacionaria de *E. coli* (45%), mientras que la base en la que el cambio impedía la regulación del promotor en el experimento de las fusiones génicas en *S. pneumoniae* era la segunda más conservada (91%) (CTACACT) (Espinosa-Urgel *et al.*, 1996). Sin embargo, la secuencia promotora mantiene una gran homología con los promotores típicos de *S. pneumoniae* por lo que aparentemente también puede ser reconocido por el factor sigma típico, algo también postulado para el caso de *L. lactis* (Koebmann *et al.*, 2000), lo que explicaría la expresión basal detectada a pH alcalino.



Tras comparar las secuencias 5' del operón *atp* de varias bacterias lácticas relacionadas filogenéticamente con *S. pneumoniae*, se encontró una secuencia conservada de 8 pb entre las cajas -35 y -10 (Fig. 31). Secuencias similares a la de 8 pb se encuentran en los promotores del operón *sat* de *S. mutans* (Gutierrez *et al.*, 1999) y *S. pyogenes* (GeneBank), y *sat* de *S. pyogenes* (GeneBank) cuya expresión aumenta en condiciones ácidas (Casiano-Colon and Marquis, 1988). La expresión de estos genes podría estar regulada por un factor específico de pH ácido, de un modo posiblemente independiente de la respuesta común a otros tipos de estrés que utilizan motivos CIRCE en las secuencias promotoras de los genes que codifican chaperonas. Uno de los genes del operón *sat*, *yIxM*, posee motivos de unión a DNA de tipo

hélice–giro–hélice (Kremer *et al.*, 2001) y podría actuar como regulador de transcripción. De los dos promotores que dirigen la expresión de *ylxM*, la secuencia de 8 pb sólo se encuentra en el que es inducible por pH. El gen *ylxM* se transcribe conjuntamente con el gen *ffh* que codifica una proteína esencial implicada en translocación de proteínas a la membrana y al medio extracelular, similar a la proteína SRP de mamíferos (Valent *et al.*, 1998). Esta proteína ha sido caracterizada recientemente en *S. pneumoniae* (Zheng *et al.*, 2002). En dobles mutantes *ylxM* – *ffh* se ha observado que no se produce un incremento en la actividad ATPasa a bajo pH (Kremer *et al.*, 2001). Por lo tanto, para aumentar la actividad ATPasa en membrana podría ser necesario el aumento de expresión del operón *atp* sino también el del gen *ffh* para exportar el complejo a la membrana (Gutierrez *et al.*, 1999).

La capacidad de adaptación al ácido engloba una respuesta común y otra independiente a otros tipos de estrés. Por lo tanto, la parte específica del estrés ácido podría estar dirigida por un factor sigma alternativo o regulador, siendo uno de los candidatos el producto del gen *ylxM*, teniendo en cuenta su incremento de expresión, sus motivos de unión al DNA y la hipotética región compartida con otros promotores que se activan con pH ácido lo que apuntaría además a un proceso de autorregulación positiva.



La regulación del operón *atp* parece ser diferente en otros microorganismos evolutivamente más distantes. Recientemente se ha publicado que el incremento de actividad

ATPasa en *S. faecalis* se debe principalmente a un incremento en el ensamblaje de las subunidades (Arikado *et al.*, 1999) a pesar de que previamente los mismos investigadores había notificado que existía síntesis proteica *de novo* (Kobayashi *et al.*, 1984) (Kobayashi *et al.*, 1986). En *Saccharomyces cerevisiae* hay un incremento de actividad ATPasa en respuesta al ácido, pero no va acompañada de incremento de transcripción, sino de aumento en la capacidad catalítica de la enzima (Eraso *et al.*, 1987). En *E. coli*, la expresión del operón no está regulada por pH sino por la tasa de crecimiento condicionada por el tipo de fuente de carbono (Kasimoglu *et al.*, 1996).

En *S. pneumoniae* no se puede descartar completamente que la formación del complejo funcional no dependa también en grado menor de otros factores como el ensamblaje o su capacidad para insertarse en membrana. Sin embargo, no parece que el control a nivel de ensamblaje sea importante en *S. pneumoniae* si se tiene en cuenta que en *S. bovis*, una bacteria cuya ATPasa F_0F_1 sigue aparentemente una regulación similar, la cantidad de subunidad β en el citoplasma es mucho menor que la que se encuentra en membrana (Miwa *et al.*, 2001).

5.3.3. Capacidad acidúrica y respuesta de tolerancia al ácido

S. pneumoniae es una bacteria sensible al ácido como lo demuestra el que sólo pueda crecer hasta pH 5.0, mientras que *S. mutans* es comparativamente tolerante al ácido puesto que puede crecer hasta pH 4.0 (Harper and Loesche, 1983). De acuerdo con esta afirmación, el pH óptimo de la ATPasa de protones de *S. pneumoniae* se encuentra entre 7.5 y 8.0 (Fig. 18), no existiendo actividad por debajo de 6.5, mientras que el óptimo de la enzima de *S. mutans* es de 6.0 y es superior al 50% en un rango de pH comprendido entre 5.0 y 8.0 (Fig. 19) (Bender *et al.*, 1986). Incluso más significativo que el elevado pH óptimo de la enzima de *S. pneumoniae* fue el hecho de que presentara un rango de pH extraordinariamente estrecho, ya que la ATPasa F_0F_1 de microorganismos notoriamente más acidúricos que *S. pneumoniae*, como *S. sanguis* o *S. faecalis*, presentan un pH óptimo similar (7.0–7.5) pero su actividad se resiente menos con la acidificación (Bender *et al.*, 1986) (Sturr and Marquis, 1992). Por otra parte, los niveles de actividad ATPasa en *S. pneumoniae* fueron de aproximadamente la mitad de los encontrados en *S. oralis* (Fig. 14A), una bacteria más acidúrica. Del mismo modo, la actividad ATPasa es casi 3 veces mayor en los organismos más acidúricos de la flora ruminal, como es *S. bovis*, en comparación con los menos acidúricos (Miwa *et al.*, 1997). Por ello, no solamente el elevado pH óptimo y el limitado rango de pH para la actividad de la enzima, sino además la menor actividad confirmaban que *S. pneumoniae* se trataba de una bacteria poco acidúrica.

En cuanto a la respuesta ATR, el pH en el que un periodo de 2 h era suficiente para matar a más del 99,99% de las células de un cultivo de *S. pneumoniae* en las condiciones de

experimentación fue de 4.4 (Fig. 20). Este pH es sensiblemente superior al pH letal para otras bacterias relacionadas, que es de 4.0 para *L. lactis* (Hartke *et al.*, 1996) y de 3.5 para *S. mutans* (Svensater *et al.*, 1997) (Li *et al.*, 2001). El rango de adaptación que induce protección parcial frente a este pH letal en *S. pneumoniae* es de 6.6 a 5.8 (Fig. 21), siendo máximo a éste último pH. Por otro lado, se observó una inducción de la ATR más acusada como respuesta al incremento en la OD del cultivo que como respuesta al reto con pH subletal (Figs. 21 y 22), aunque la inducción se producía a los mismos valores de pH. Este efecto se debe a la acidificación del medio como consecuencia de la fermentación láctica (López *et al.*, 1976), como parece ocurrir en *S. mutans* (Li *et al.*, 2001). Un sistema que podría contribuir a la ATR en *S. sanguis* es el sistema arginina desaminasa, el cual se activa por pH ácido y que se incrementa paralelamente a la densidad del cultivo (Curran *et al.*, 1995). La mayor activación de la ATR como respuesta a la acidificación del medio de cultivo, algo que ocurre *in vivo*, podría suponer una adaptación paulatina a la disminución del pH, en contraposición a la disminución brusca del pH (reto con pH subletal) que sólo ocurre normalmente en condiciones de laboratorio. Otra posible explicación sería una resistencia parcial al ácido desarrollada como consecuencia de adaptación al ayuno de nutrientes según éstos se van agotando al avanzar la fase de crecimiento del cultivo. *L. lactis* experimenta este fenómeno, ya que aumenta su resistencia al ácido después de ser sometida a un periodo de ayuno (Nannen and Hutkins, 1991).

La capacidad acidúrica de las bacterias lácticas condiciona su nicho ecológico (Belli and Marquis, 1991). *S. pneumoniae* invade lugares dentro del cuerpo humano con pH alrededor de 7.4 como son la sangre, el líquido cefalorraquídeo y exudados derivados de inflamación como son los pulmonares, óticos o nasales. Este pH sería compatible con el pH óptimo de su ATPasa y su capacidad acidúrica en general. De igual forma, las bacterias lácticas acidúricas *S. mutans* y *S. bovis* invaden la placa dental y las vías urinarias, respectivamente, que llegan a tener pHs inferiores a 5.0.

La respuesta ATR empieza a activarse en *S. pneumoniae* en el rango de pH 7.0–6.6 (Fig. 21), un punto en el que la actividad ATPasa es superior en 1,5 veces respecto a su nivel basal a pH 7.5 (Fig. 14AB). Valores similares de pH se alcanzan en los fluidos del cuerpo humano que invade el neumococo durante la infección. La acidificación es consecuencia del metabolismo láctico del neumococo junto con la acción inflamatoria mediada por leucocitos activados, lo que supera la capacidad tamponadora del fluido extracelular (Sahn *et al.*, 1983). Por esta razón, el pH disminuye hasta un valor entre 7.0 y 6.8 tanto en sangre (Elwell *et al.*, 1975) como en líquido cefalorraquídeo (Andersen *et al.*, 1989) y fluido pleural (Light *et al.*, 1980). Aunque neumococo puede vivir a pHs mucho más ácidos *in vitro*, un pH inferior a 6.8 no se asocia a infección neumocócica (Light *et al.*, 1980). El pH podría tener influencia sobre la capacidad virulenta de *S. pneumoniae* como indica el hecho de que la acidificación derivada

del crecimiento bacteriano inhibe la neumolisina en su acción de detener el movimiento ciliar del epitelio del tracto respiratorio (Feldman *et al.*, 1990).

S. pneumoniae es una bacteria que presenta competencia natural de un modo dependiente de la alcalinidad del medio (Tomasz and Mosser, 1966) (Chen and Morrison, 1987). La competencia se induce ajustando el pH del medio de cultivo a pH 7.8–8.0. El pH extracelular determina el pH intracelular, para el que ha sido determinado un pH óptimo de inducción de competencia de 8.3 ± 0.2 (Clave and Trombe, 1989). Sin embargo, un pH intracelular bajo es el activador principal de la actividad de la ATPasa F_0F_1 (Kobayashi *et al.*, 1984). Hasta ahora, la única explicación para este hecho es que el factor estimulador de competencia (CSP) es más activo a pH alcalino que a pH ácido (Chen and Morrison, 1987). La función de una parte de los genes específicos de competencia es aumentar el metabolismo, lo que hace que los niveles de ATP se incrementen en un 50% (Clave and Trombe, 1989). El ATP es necesario en varios pasos del proceso de transformación como son la captación, protección y transporte del DNA exógeno, y su recombinación con el DNA endógeno (Clave and Trombe, 1989). El ATP también es necesario para la actividad de la ATPasa. Esta enzima podría consumirlo en grandes cantidades como demuestra el hecho de que un mutante en *atpb* de *S. mutans* con un 55% de actividad de la enzima presentara un aumento del 40% de las reservas celulares de ATP (Suzuki *et al.*, 2000). De hecho, la acidificación es también un factor inductor de la glicolisis, lo que aumenta los niveles de ATP probablemente destinados a ser consumidos por la ATPasa F_0F_1 para regular el pH intracelular.

Con todos estos datos es razonable pensar que la inducción del estado de competencia y de la expresión del operón *atp* son fenómenos antagónicos ya que compiten por el mismo sustrato, el ATP, mientras que el pH intracelular sería el factor determinante que permitiría la inducción de un proceso (entrada en estado de competencia) u otro (activación de la expresión del operón *atp*).

5.4. MUTANTES DE RESISTENCIA A MEFLOQUINA Y NUEVOS DERIVADOS

5.4.1. Actividad antimicrobiana de la mefloquina y sus derivados

El blanco primario para la mefloquina y los compuestos OSU8, 199 y 207 en *S. pneumoniae* es la ATPasa F_0F_1 , ya que se observó una elevada correlación entre el nivel de inhibición del crecimiento de las cepas resistentes y la inhibición de la actividad ATPasa (Figs 24 y 25). Los compuestos OSU95, 99, 255 y 259 podrían utilizarse potencialmente incluso frente a los mutantes resistentes al resto de drogas de este grupo ya que ni siquiera las modificaciones de la enzima en los mutantes analizados alteró significativamente su acción antimicrobiana. Desde hace una década, la aparición de estirpes resistentes a las terapias habituales está aumentando en *S. pneumoniae*, lo que no se contrarresta de un modo equilibrado con la aparición de nuevos fármacos antimicrobianos. Los nuevos compuestos son,

en su mayoría, derivados de otros más antiguos, con un espectro más amplio o con alguna mejora en las propiedades farmacodinámicas, por lo que en la mayor parte de los casos su utilidad es sólo temporal. Por ello, son muy atractivas aquellas familias de fármacos que no hallan sido utilizadas previamente frente a neumococo como son los derivados de la Mfl analizados en este trabajo. Teniendo en cuenta todas las funciones que cumple la ATPasa F_0F_1 en *S. pneumoniae*, que la hacen ser enzima esencial (Ferrándiz and de la Campa, 2002), hacen de ella un blanco muy atractivo para el desarrollo de nuevos antimicrobianos como son los que se exponen en este trabajo. Además, *S. pneumoniae* es el único de los organismos analizados que tiene una CMI para estos compuestos dentro del rango de concentración alcanzable en suero, lo que les da potencialidad comercial añadida como quimioterapéuticos contra este patógeno

Por otra parte, la Mfl se usa actualmente tanto en la profilaxis como en el tratamiento contra la malaria. El hecho de que la Mfl y sus derivados sean activos frente a *S. pneumoniae* refuerza la hipótesis de que *S. pneumoniae* podría ser un buen modelo para testar de un modo rápido nuevos compuestos antimaláricos de tipo amino-alcohol.

5.4.2. Modelo de interacción entre las subunidades *c* y *a* en *S. pneumoniae*

Gracias al elevado número de mutantes obtenidos en este trabajo se obtuvo información valiosa sobre la disposición espacial de las subunidades *c* y *a* en *S. pneumoniae*. Las posiciones de los residuos mutados (en las dos α -hélices de la subunidad *c* y en las dos últimas α -hélices de la subunidad *a*) eran compatibles con datos estructurales y funcionales previos obtenidos en las subunidades homólogas de *E. coli* (Tabla IX). Además, gran parte de las mutaciones se encontraron en residuos conservados localizados a intervalos regulares con una periodicidad acorde con los 3,6 residuos por vuelta de las α -hélices proteicas, lo que indica que probablemente estos residuos están orientados hacia la misma posición en el espacio (Fig. 32).

Aunque los mutantes de *S. pneumoniae* Opt^R y Qin^R previamente descritos presentaban mutaciones en la subunidad *c* (Fenoll *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 1996), en este trabajo se han encontrado también mutantes en la subunidad *a*. Experimentos realizados en *E. coli* han demostrado que las dos últimas α -hélices de membrana de la subunidad *a*, no solamente son las más conservadas (Cox *et al.*, 1986), sino que son las que interaccionan más íntimamente con la subunidad *c* durante la translocación del protón (Deckers-Hebestreit and Altendorf, 1996) (Jiang and Fillingame, 1998). Otro ejemplo en esta dirección lo constituye la ATPasa F_0F_1 de la bacteria halófila *Propionigenium modestum*, que sufre alteraciones en su capacidad para conmutar en el uso entre protones e iones sodio cuando existen mutaciones en la subunidad *c* o en las dos últimas α -hélices de membrana de la subunidad *a* (Kaim *et al.*, 1998). En esta

bacteria, las mutaciones en la subunidad *a* afectan a los residuos α K220, α V264 y α L278, equivalentes a α N163, α L216 y α L229 de *S. pneumoniae*. Estos residuos están próximos a aquellos en los que mapean las mutaciones de resistencia a compuestos antimaláricos (Tabla XI). Todos estos datos confirman el elevado grado de interacción entre las dos últimas α -hélices de la subunidad *a* y la subunidad *c*, y explica que existan mutaciones que confieran resistencia a Opt, Qin y Mfl en esa zona de la subunidad *a* de la ATPasa F_0F_1 de *S. pneumoniae*.

Los residuos de la subunidad *c* que están mutados en cepas Mef^R forman parte de un bolsillo estructural de unión al protón que se encontrarían en posición cercana al residuo esencial E52, cuando la subunidad *c* está plegada. Este bolsillo está favorecido por la presencia de varios residuos G que carecen de cadena lateral (Girvin *et al.*, 1998). Algunos de los mutantes resistentes (MJQ4, MJM5 y MJM15) presentan sustituciones en alguno de estos residuos G, por A ó S, que añaden un grupo metilo o hidroxilo, respectivamente. Algo similar ocurre en el caso del mutante MJ11, que presenta una sustitución de un residuo A por T, que añade también un residuo hidroxilo. Estas mutaciones aparecen enfrentadas en el espacio según el modelo de la Fig. 34, a pesar de estar situadas en distintas α -hélices. El pequeño aumento de longitud de la cadena lateral del aminoácido (por adición de grupos metilo ó hidroxilo) sería suficiente como para generar un fenotipo de resistencia por la modificación que se produce en el bolsillo de unión al protón, del mismo modo que las sustituciones cA24S y cI28T en *E. coli* protegen la funcionalidad de la enzima de *E. coli* frente al inhibidor DCCD al dificultar su reacción con el residuo esencial cD61 (Fillingame *et al.*, 1991). Los residuos equivalentes en *S. pneumoniae*, cV15 y cE19 son contiguos a residuos mutados en mutantes resistentes a compuestos antimaláricos.

El cambio α L186P destaca por ser el único localizado dentro de la α -hélice 4 de la subunidad A. A pesar de que teóricamente esta posición se encuentra ligeramente alejada de los residuos funcionales, las características desestabilizadoras del residuo P podrían justificar alteraciones locales de la estructura proteica y, por ello, el fenotipo de resistencia.

Algunas mutaciones de resistencia se encontraron en residuos cercanos al segundo residuo de ácido glutámico, cE19, que podría ser también funcional y formar parte de un segundo bolsillo de unión al protón. Al igual que ocurre con el residuo cE52, las mutaciones de resistencia impedirían la reactividad de la droga con el residuo alternativo cE19 por modificaciones estructurales del sitio de unión.

La presencia de un segundo residuo E en la subunidad *c* de *S. pneumoniae* podría significar que funciona de un modo ligeramente diferente a como lo hace la enzima de *E. coli*. Si este residuo fuera funcional, alteraría significativamente el cociente entre protones expulsados por molécula de ATP hidrolizada. En organismos con cadena respiratoria, este cociente determina la relación entre fosfato y oxígeno en la fosforilación oxidativa, un

parámetro fisiológico fundamental (Jiang *et al.*, 2001). Un segundo residuo de ácido glutámico funcional podría ser especialmente beneficioso en el caso del grupo de bacterias lácticas a las que pertenece *S. pneumoniae*, y en las que está conservada la presencia de este residuo (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. mutans*, *S. bovis*, *S. pyogenes* y *L. lactis*), ya que la ATPasa podría expulsar el doble de protones con el mismo gasto energético lo que supondría una optimización del proceso y una adaptación a la supervivencia en un entorno ácido. Curiosamente, este segundo residuo ácido también se encuentra conservado en las bacterias patógenas *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*. La implicación fisiológica de un segundo residuo que aporte un grupo carboxilo para la captación del protón se demostró en *E. coli* mediante la construcción de mutantes con el cambio cA28D o cA28E, que determinaban que la función de la enzima fuera susceptible de ser regulada por pH alcanzándose un pH óptimo para la enzima de 7.5, a diferencia de la enzima silvestre cuya actividad se mostró independiente del pH dentro del rango 6.0 – 8.0 (Jones, 2001).

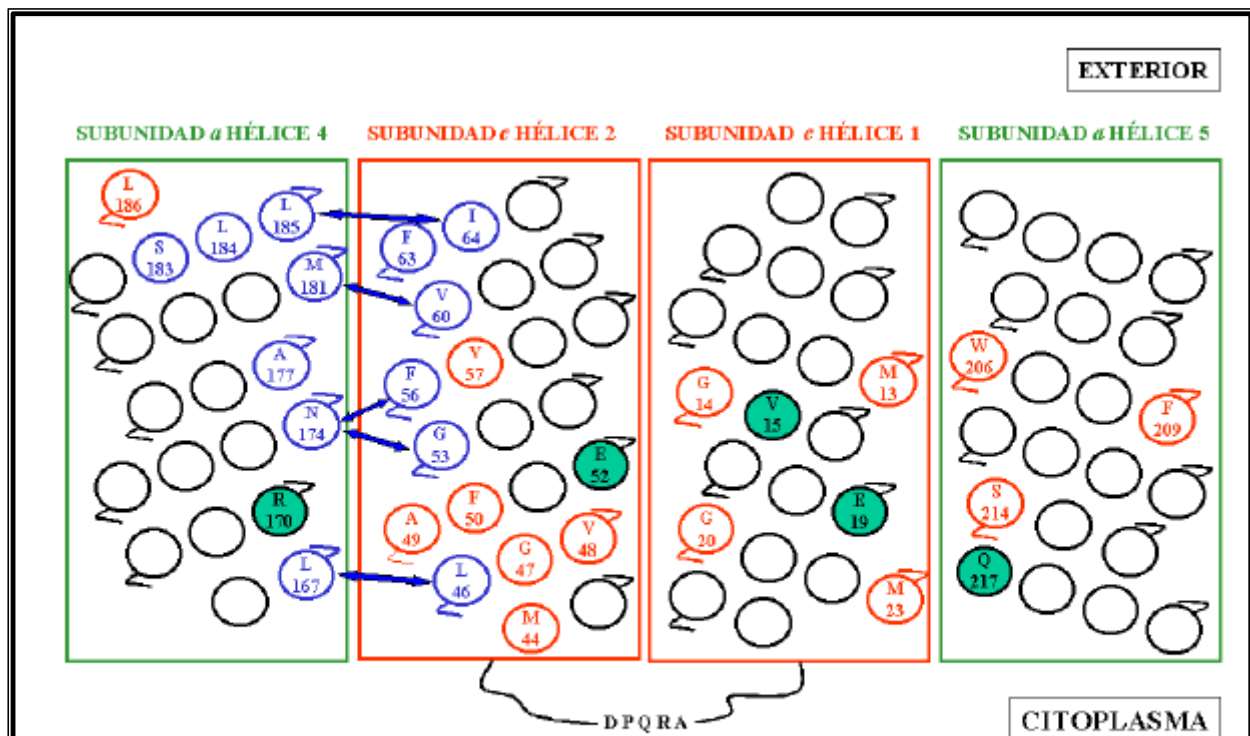


Figura 34. Modelo espacial de la interacción entre las subunidades c y a de la ATPasa F_0F_1 de *S. pneumoniae*. Se muestra la posible disposición espacial de las dos α -hélices de la subunidad c conectadas por una región citoplásmica junto a las 2 últimas α -hélices (4ª y 5ª) de la subunidad a. Los residuos en azul que están conectados con flechas del mismo color interactúan entre ellos según se ha demostrado en *E. coli* mediante experimentos de entrecruzamiento de puentes disulfuro introduciendo residuos de C en la secuencia por mutagénesis dirigida (Jiang and Fillingame, 1998). Los residuos marcados en verde son esenciales para la función de la enzima (se incluye el residuo E19 no presente en *E. coli*). Los residuos marcados en rojo son aquellos en los que mapean las mutaciones de resistencia cruzada a antimolécicos de tipo amino-alcohol en *S. pneumoniae* según este trabajo.

5.5. AISLAMIENTO DE MUTANTES POR PCR Y TRANSFORMACIÓN

En esta tesis se describe un sistema sencillo para obtener mutantes de resistencia con alta eficiencia, con el único requisito de conocer el gen responsable y que la resistencia sea consecuencia de mutaciones puntuales. El método consiste en la amplificación mediante PCR de la secuencia implicada en resistencia de una cepa sensible silvestre, seguida de transformación con dicho producto de PCR y selección de las cepas resistentes. El sistema aprovecha la tasa de error de las DNA polimerasas en las reacciones de PCR y la capacidad de *S. pneumoniae* para recombinar DNA exógeno con su DNA cromosómico cuando éstos comparten una elevada homología. De este modo se obtuvieron eficiencias de obtención de mutantes en el rango de 10^{-4} a 10^{-5} (Tabla XIII), lo que representa un incremento mínimo de 10^4 veces respecto a la tasa de aparición de mutantes espontáneos seleccionados a concentraciones letales de antibiótico, entre 10^{-8} y 10^{-9} para Cip^R, Rif^R y Str^R (Belanger *et al.*, 2002) (Pan *et al.*, 1996) (nuestros resultados).

La elevada tasa de mutantes obtenidos puede ser explicada calculando las cifras a través de las diferentes etapas del protocolo. Teniendo en cuenta que la polimerasa de DNA de *Thermus thermophilus* de Biotools, utilizada para la generación de mutantes, comete un error cada 10^4 nucleótidos (datos del fabricante) y que la longitud de los fragmentos amplificados era de unos 1600 nucleótidos, uno de cada 7 fragmentos amplificados llevaría una mutación al azar. El número de posiciones de los fragmentos amplificados en los que se encontraron mutaciones que conferían resistencia se encontraba alrededor entre 2 y 5, y teniendo en cuenta que se podría estar cerca de la saturación de la obtención de todos los mutantes posibles, el número medio de fragmentos amplificados con una mutación de resistencia sería de 5×10^{-4} . La eficiencia de transformación media con estos fragmentos fue a su vez de aproximadamente el 5% (10^{-2}), por lo que el número teórico mínimo de mutantes por errores de la DNA polimerasa debería ser de aproximadamente 10^{-4} – 10^{-5} , una cifra compatible con la observada.

Además de la elevada eficiencia de obtención de mutantes, este sistema tiene ventajas adicionales como es el mantenimiento del fondo genético, lo que permite una ulterior comparación de los niveles de resistencia que proporcionan distintas mutaciones. Para el diseño de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación pueden elegirse diferentes zonas de un gen determinado en la que se desea obtener mutantes de resistencia en el caso de que los cambios pudieran aparecer en más de una región de éste, lo que facilita la localización rápida de la mutación. Por lo tanto, este sistema no es tan restrictivo como la mutagénesis dirigida a la hora de modificar los residuos. También facilita la construcción de mutantes

complejos mediante pasos secuenciales de transformación con el DNA amplificado de la etapa anterior, siempre que las nuevas mutaciones incrementen los niveles de resistencia.

La publicación reciente de la secuencia genómica completa de dos cepas de neumococo (Tettelin *et al.*, 2001) (Hoskins *et al.*, 2001) permite diseñar fácilmente oligonucleótidos para amplificar cualquier gen implicado en resistencia, aunque también podrían aislarse mutantes para cualquier gen cuando las mutaciones conlleven la adquisición de un fenotipo seleccionable. Estos mutantes pueden ser utilizados con fines biomédicos o bioquímicos ya que en el caso de que sean mutaciones desconocidas, proporcionarían información sobre la estructura espacial de motivos importantes dentro de la proteína diana del compuesto antimicrobiano como puede ser el centro activo.

Se ha demostrado la utilidad del método ya que se consiguieron aislar un elevado número de mutantes puntuales de resistencia manteniendo el fondo genético de la cepa de laboratorio R6, algunos de ellos con cambios no descritos previamente. Se confirmó la relación entre las mutaciones en los genes *parC*, *rpoB* y *rpsL* con Cip^R, Rif^R y Str^R respectivamente, a juzgar por la localización de las mutaciones, los niveles de resistencia, la elevada eficiencia de transformación del fragmento de PCR con la mutación y el mantenimiento de estas características en las cepas transformadas con dichos fragmentos. El hecho de que sólo se obtuvieran mutantes de resistencia cuando se transformó con fragmentos de PCR que contenían la secuencia implicada en resistencia y que fuera proporcional a la tasa de error de la DNA polimerasa, confirmaba que el pequeño porcentaje de mutantes que aparece en los controles de transformación es debido a la tasa de mutación de la enzima.

Todas las mutaciones observadas en *parC* ya habían sido detectadas en aislados clínicos ó cepas de laboratorio Cip^R (Bast *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 1999; Janoir *et al.*, 1996; Muñoz and de la Campa, 1996; Pan *et al.*, 1996; Tankovic *et al.*, 1996). A pesar de que los cambios S79F y S79Y se había confirmado por transformación que estaban implicados en resistencia (Janoir *et al.*, 1996; Muñoz and de la Campa, 1996; Tankovic *et al.*, 1996), en este trabajo se presenta la primera evidencia de que los cambios S79A, D83N y D83V, están implicados en bajo nivel de Cip^R.

Todas las cepas de neumococo Rif^R obtenidas en este trabajo tenían mutaciones en la región I del gen *rpoB* (posiciones 478–510 de R6), una región conservada donde mapean la mayor parte de las mutaciones que confieren resistencia a Rif en bacterias (Campbell *et al.*, 2001) y donde se han localizado también las mutaciones que confieren Rif^R en neumococo (Enright *et al.*, 1998) (Padayachee and Klugman, 1999). Los mutantes Rif^R aislados en este trabajo presentaron cambios de aminoácido en los residuos S482, Q486, D489 y H499 (Tabla 14, Fig. 26). Estudios bioquímicos y estructurales de la RNA polimerasa de *Thermus aquaticus* han mostrado que la Rif se une en un bolsillo de la subunidad β dentro del canal de unión de DNA y RNA y bloquea la elongación de la transcripción cuando en mRNA tiene un tamaño de

2–3 nt. Diez residuos de la región I están directamente implicados en la interacción con la Rif (Campbell *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1999). Estos residuos son idénticos entre *E. coli*, *M. tuberculosis* y *S. pneumoniae* (6 de ellos se muestran sombreados en la Fig. 30). Tres de ellos, Q486, D489 y H499 se encuentran mutados en *S. pneumoniae* Rif^R. Estos resultados sugieren que la unión de la Rif a la RNA polimerasa es similar en todas las enzimas bacterianas, y esto explica el amplio espectro de esta droga. De acuerdo con esta hipótesis, se han encontrado mutaciones de resistencia a Rif en los residuos D489 y H499 en aislados clínicos de neumococo (Enright *et al.*, 1998) (Padayachee and Klugman, 1999) y mutaciones implicadas en Rif^R en *E. coli* (Jin and Gross, 1988; Severinov *et al.*, 1993) y *M. tuberculosis* (Heep *et al.*, 2001) en el residuo equivalente a Q486 de *S. pneumoniae*. Sin embargo, no se ha descrito en otras bacterias mutaciones en el residuo equivalente a S482 (Campbell *et al.*, 2001). Este residuo se encuentra fuera del dominio de unión a Rif, que alcanza hasta el residuo colindante Q483 (Campbell *et al.*, 2001). El cambio S482P confiere un nivel de resistencia más bajo que el resto de los cambios detectados (CMI = 4 µg/ml) a la cepa RMJ4. La sustitución de A por P podría causar ligeras alteraciones del bolsillo suficientes como para justificar la resistencia que confiere esta mutación, algo observado en otros residuos cercanos al motivo de unión a Rif (Campbell *et al.*, 2001). Por ejemplo, podría verse afectada la acción de otro residuo cercano, L484, que es uno de los residuos hidrofóbicos que contacta por fuerzas de Van der Waals con radicales específicos de Rif (Campbell *et al.*, 2001). La ventaja de este método para elegir el gen en el que producen las mutaciones permitiría probar si sustituciones alternativas en otras subunidades de la RNA polimerasa pudieran conferir resistencia a Rif en *S. pneumoniae* como se ha sugerido para otros microorganismos (Hetherington *et al.*, 1995)

Con respecto a las mutaciones que confieren resistencia a Str, se encontraron mutaciones en dos residuos K, K56 y K101 (equivalentes a K42 y K87 de *E. coli*). Estos residuos se ha demostrado que están implicados en Str^R en *E. coli* y *M. tuberculosis* (Funatsu and Wittmann, 1972) (Finken *et al.*, 1993), habiéndose descrito el cambio K56T como el responsable del fenotipo Str^R de la cepa 533 de *S. pneumoniae* (Salles *et al.*, 1992).

En resumen, con este método ha sido posible construir mutantes Cip^R, Rif^R y Str^R con mutaciones en regiones específicas. El mismo método podría ser utilizado para construir todos los posibles mutantes resistentes a otras drogas. Sería también posible construir dobles mutantes por PCR secuencial y ciclos de transformación. También pueden construirse de este modo cepas resistentes a 2 ó más antibióticos de la misma familia, y la actividad de nuevos compuestos probados en los mutantes obtenidos. Esta información sería de gran utilidad para seleccionar la terapia más adecuada, que idealmente serían drogas antimicrobianas que no mostraran resistencia cruzada.

5.6. CARACTERIZACIÓN DE DOS AISLADOS CLÍNICOS DEL GRUPO VIRIDANS SENSIBLES A OPTOQUINA

Se caracterizaron dos aislados clínicos que habían sido inicialmente identificados como neumococos por su sensibilidad a optoquina. El resto de las pruebas de diagnóstico confirmó que no se trataba de *S. pneumoniae* sino de especies del grupo viridans, concretamente *S. oralis* según el test API 32 Step. La secuenciación de los genes responsables del fenotipo de sensibilidad a optoquina, *atpC* y *atpA*, en estos aislados clínicos reveló que mientras que uno de ellos, 1174/97 compartía la mayor parte de los cambios de *S. mitis* respecto a neumococo, el otro, 1162/99, tenía una identidad casi absoluta respecto a *S. pneumoniae* R6. Esta era la razón de que el aislado 1162/99 presentara sensibilidad total a Opt, Qin y Mefl con niveles idénticos a las cepas tipo de neumococo, mientras que 1174/97 presentaba sólo sensibilidad parcial a Opt, y Mefl. El estudio de las secuencias flanqueantes a estos genes detectó dos puntos posibles de recombinación, el 5' en la zona del promotor *atp* y el 3' en la parte central del gen *atpB*, a partir de los que la secuencia del aislado 1162/99 dejaba de compartir la identidad casi completa con *S. pneumoniae* para pasar a compartirla con *S. mitis* y el aislado 1174/97.

Este es el primer caso descrito de un estreptococo del grupo *viridans* que presenta sensibilidad total a Opt y compuestos relacionados debido a la adquisición por transformación de los genes *atpCA* y parte de *atpB* de *S. pneumoniae*. Por lo tanto, en este caso no se produjo un intercambio que proporcionara resistencia sino sensibilidad, que se mantuvo al no existir presión selectiva por parte de los antimaláricos de tipo amino-alcohol.

Ya había sido demostrada *in vitro* la posibilidad de cambios en los patrones de resistencia a optoquina mediante recombinación de estos genes entre *S. pneumoniae* y *S. oralis* (Fenoll *et al.*, 1994), algo que está favorecido por la conservación del orden génico dentro del operón. En este experimento, el DNA cromosómico de *S. oralis* era capaz de transformar a *S. pneumoniae* para adquirir el fenotipo Opt^R. Una de las cepas resultantes analizada, M222, mostró un intercambio de los genes *atpC*, *atpA* y parte de *atpB*, lo que justificaba la resistencia (Fenoll *et al.*, 1994). Curiosamente, el punto de recombinación 3' dentro de la cepa M222 se encontraba muy cercano al observado en el aislado 1162/99. En ambos casos, se insertó dentro del cromosoma un fragmento que no sólo incluía los dos primeros genes del operón, responsables del fenotipo, sino también la primera parte del gen de la subunidad *b*, que codifica el dominio de membrana de esta subunidad (Fig. 9C). Este dominio podría estar implicado en el ensamblaje de todo el complejo F₀ y su inclusión dentro de DNA transformante evitaría incompatibilidades estructurales entre subunidades del sector F₀ de distintas especies para formar un complejo de membrana funcional. Sin embargo, otra posible explicación para la recombinación en ese punto es que sólo sea necesario un elevado grado de comprometimiento entre las subunidades *c* y *a* para el ensamblaje del complejo F₀, y que la recombinación ocurra

dentro del gen de la subunidad *b* por tratarse de una región muy conservada entre bacterias genéticamente próximas a *S. pneumoniae*, cuando el otro punto se encuentra en la zona del promotor, también muy conservada. Los resultados de este trabajo demuestran que el hecho de que la organización génica esté conservada dentro del operón entre especies relacionadas no sólo optimiza el ensamblaje secuencial de las subunidades tras su traducción sino que además facilita la transferencia interespecífica de fracciones del operón para formar complejos completos y funcionales, algo que ya había sido postulado previamente (Brusilow, 1993).

Excepto en el fragmento recombinado, el aislado 1162/99 mostró una gran similitud con *S. mitis* y el aislado 1174/97 tanto en la secuencia como en la estructura génica de esta región según se pudo comprobar mediante secuenciación, PCR y "Southern blot". En todos ellos, en el extremo 5' al operón *atp* se encontraba un gen homólogo al gen *spr1284* de *S. pneumoniae* R6 que codifica una peptidasa, mientras que en *S. pneumoniae* este gen se encontraba a más de 68 kpb, codificando el gen 5' más cercano una transposasa.

Por otro lado, el otro aislado clínico, 1174/97, podría encuadrarse dentro de la pequeña fracción de estreptococos del grupo *viridans* que muestran sensibilidad parcial a optoquina (Whatmore *et al.*, 2000). La secuencia de las subunidades *c* y *a* de este aislado presentan muchos cambios de aa cuando se compararon con *S. pneumoniae* y las cepas tipo de *S. mitis* y *S. oralis*. Entre los cambios en las subunidades *a* y *c* que están implicados en el fenotipo Opt^R/Opt^S, sólo hay un residuo que cambia en *S. oralis* y *S. mitis* y que está conservado en *S. pneumoniae* y el aislado 1174/97: el residuo aL186 de la cuarta α -hélice. Para esta α -hélice existe identidad entre *S. pneumoniae* y el aislado 1174/97, mientras que hay 3 cambios en residuos cercanos tanto en la cepa tipo de *S. mitis* (aT182A, aL184M y aL186V) como en la cepa tipo de *S. oralis* (aT182A, aL186I, aL187T) con respecto a *S. pneumoniae*. Por lo tanto la secuencia polipeptídica de la 4ª α -hélice, compartida por el aislado 1174/97 y *S. pneumoniae*, podría ser la responsable del fenotipo Opt^S intermedio del aislado 1174/97.

Por lo tanto, este trabajo demuestra que también es posible identificar estreptococos *viridans* como neumococos por su sensibilidad a esta droga. Estos datos apoyan la evidente falta de fiabilidad de las pruebas de diagnóstico basadas en las características del producto de un solo gen, como son las pruebas de sensibilidad a optoquina (genes *atpC* y *atpA*) y solubilidad en bilis (gen *lytA*). Poder diferenciar correctamente *S. pneumoniae* y los estreptococos del grupo *viridans* es importante para el diagnóstico, el pronóstico de la enfermedad, y el diseño del tratamiento (Whatmore *et al.*, 2000).

Los procesos de recombinación de genes de la ATPasas no son nuevos en la evolución. Su transferencia horizontal y duplicación es el origen de los otros tipos de ATPasa de protones, V_0V_1 y A_0A_1 (Zimniak *et al.*, 1988; Gogarten *et al.*, 1989). El hecho de que las ATPasas de protones F_0F_1 sean enzimas universales, ha permitido incluso el uso, con éxito, de las subunidades α y β como marcadores evolutivos (Hilaro and Gogarten, 1993).

6. CONCLUSIONES

1. Las ocho subunidades de la ATPasa F_0F_1 de *S. pneumoniae* están codificadas por un operón que se transcribe a partir de un único promotor para dar lugar a una única molécula de mRNA de 6,5 Kb.
2. Cada gen del operón presenta características particulares en cuanto a la regulación de su traducción adaptadas a la estequiometría de la subunidad que codifican: regiones potenciales de procesamiento del mRNA, la naturaleza de la cuarta base del gen y el perfil de uso de codones. Respecto al gen de la subunidad *c*, es más importante su localización al inicio del operón y su pequeño tamaño.
3. *S. pneumoniae* es capaz de aumentar sus niveles de ATPasa F_0F_1 en respuesta a la acidificación. Este aumento es consecuencia de incrementos en la cantidad de enzima, en la del mRNA específico del operón y en la de la actividad del promotor, por lo que existe un control a nivel de iniciación de transcripción.
4. Un cambio de G por A en la caja -10 del promotor impide su regulación por pH. La mutación se encuentra en una secuencia similar a la de reconocimiento del factor sigma de fase estacionaria de *E. coli* y en una secuencia conservada en los promotores del operón *atp* de bacterias cercanas filogenéticamente y otros genes que se activan en respuesta a la acidificación. Por estas razones, la posición mutada podría pertenecer a una secuencia de reconocimiento por parte de un factor regulador.
5. *S. pneumoniae* es capaz de desarrollar una respuesta de tolerancia al ácido, que es más evidente cuando el pH disminuye paulatinamente como consecuencia de su propio metabolismo láctico.
6. *S. pneumoniae* es una bacteria débilmente acidúrica según se deduce del estrecho rango de pH en el que puede crecer, el elevado pH óptimo de su ATPasa F_0F_1 , el estrecho rango de pH en el que es funcional esta enzima y las características de su respuesta de tolerancia al ácido.
7. La ATPasa F_0F_1 es la diana primaria en *S. pneumoniae* de la mefloquina y de compuestos relacionados estructuralmente, ya que se observa una relación directa entre su capacidad antimicrobiana y la capacidad para inhibir esta enzima.
8. El aislamiento de un gran número de mutantes de resistencia a mefloquina ha permitido la adaptación del modelo de interacción entre las subunidades *c* y *a* de *E. coli* en *S. pneumoniae*. Este modelo incluye un segundo residuo de ácido glutámico que podría estar implicado en translocación de protones.

9. Se ha desarrollado un sistema que permite la obtención de mutantes resistentes a antibióticos con alta eficiencia mediante PCR y transformación. Este sistema permite la obtención de mutantes con frecuencias 4 órdenes de magnitud superiores a las obtenidas por mutación espontánea.
10. Se ha caracterizado genéticamente un aislado perteneciente al grupo de los estreptococos viridans que es sensible a optoquina. Este aislado ha adquirido los genes *atpC*, *atpA* y parte de *atpB* desde una cepa de *S. pneumoniae*. La existencia de este tipo de cepas puede causar errores en el diagnóstico.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1988) Beta-subunit of ATP-synthase: a useful marker for studying the phylogenetic relationship of eubacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 2815-2821.
- Andersen, H.W., Solem, C., Hammer, K. and Jensen, P.R. (2001) Twofold reduction of phosphofructokinase activity in *Lactococcus lactis* results in strong decreases in growth rate and in glycolytic flux. *J. Bacteriol.*, **183**, 3458-3467.
- Andersen, N.E., Gyiring, J., Hansen, A.J., Laursen, H. and Siesjo, B.K. (1989) Brain acidosis in experimental pneumococcal meningitis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **9**, 381-387.
- Angov, E., Ng, T.C. and Brusilow, W.S. (1991) Effect of the delta subunit on assembly and proton permeability of the F₀ proton channel of *Escherichia coli* F₁F₀ ATPase. *J. Bacteriol.*, **73**, 407-411.
- Appelbaum, P.C. (2002) Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: implications for drug selection. *Clin. Infect. Dis.*, **34**, 1613-1620.
- Appelbaum, P.C., Bhamjee, A., Scragg, J.N., Hallett, A.F., Bowen, A.J. and Cooper, R.C. (1977) *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet*, **2**, 995-997.
- Arai, H., Terres, G., Pink, S. and Forgac, M. (1988) Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.*, **263**, 8796-8802.
- Arikado, E., Ishihara, H., Ehara, T., Shibata, C., Saito, H., Kakegawa, T., Igarashi, K. and Kobayashi, H. (1999) Enzyme level of enterococcal F₁F₀-ATPase is regulated by pH at the step of assembly. *Eur J Biochem*, **259**, 262-8.
- Aufurth, S., Schagger, H. and Muller, V. (2000) Identification of subunits a, b, and c1 from *Acetobacterium woodii* Na⁺-F₁F₀-ATPase. Subunits c1, c2, and c3 constitute a mixed c-oligomer. *J. Biol. Chem.*, **275**, 33297-33301.
- Austrian, R. (1986) Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J. Antimicrob. Chemother.*, **18**, 35-45.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G. and Struhl, K.E. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Auzat, I., Chapuy-Regaud, S., Le Bras, G., Dos Santos, D., Ogunniyi, A.D., Le Thomas, I., Garel, J.R., Paton, J.C. and Trombe, M.C. (1999) The NADH oxidase of *Streptococcus pneumoniae*: its involvement in competence and virulence. *Mol. Microbiol.*, **34**, 1018-1028.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M. and McCarthy, M. (1944) Studies on the chemical structure of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.*, **79**, 137-158.

- Balsalobre, L., Ferrándiz, M.-J., Liñares, J., Tubau, F. and de la Campa, A.G. (2003) The viridans streptococci are the donors in the horizontal transfer of topoisomerase IV genes to *Streptococcus pneumoniae*. *Enviada a publicación*.
- Baltz, R.H., Norris, F.H., Matsushima, P., DeHoff, B.S., Rockey, P., Porter, G., Burgett, S., Peery, R., Hoskins, J., Braverman, L., Jenkins, I., Solenberg, P., Young, M., McHenney, M.A., Skatrud, P.L. and Rosteck, P.R.J. (1998) DNA sequence sampling of the *Streptococcus pneumoniae* genome to identify novel targets for antibiotic development. *Microb. Drug Resist.*, **4**, 1-9.
- Ballester, S., Alonso, J.C., López, P. and Espinosa, M. (1990) Comparative expression of the pC194 *cat* gene in *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene*, **86**, 71-79.
- Bartolomé, B., Jubete, Y., Martínez, E. and de la Cruz, F. (1991) Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene*, **102**, 75-78.
- Bast, D.J., E., L.D., Duncan, C., Kilburn, L., Mandell, L.A., Davidson, R.J. and de Azevedo, J.C.S. (2000) Fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: contribution of type II topoisomerase mutations and efflux to levels of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 3049-3054.
- Belanger, A.E., Lai, A., Brackman, M.A. and LeBlanc, D.J. (2002) PCR-based ordered genomic libraries: a new approach to drug target identification for *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 2507-2512.
- Belli, W.A. and Marquis, R.E. (1991) Adaptation of *Streptococcus mutants* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1134-1138.
- Bender, G.R. and Marquis, R.E. (1987) Membrane ATPases and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2124-2128.
- Bender, G.R., Sutton, S.V. and Marquis, R.E. (1986) Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect. Immun.*, **53**, 331-338.
- Bennetzen, J.L. and Hall, B.D. (1982) Codon selection in yeast. *J. Biol. Chem.*, **8**, 1893-1912.
- Bentley, D.W. (1981) Pneumococcal vaccine in the institutionalized elderly: review of past and recent studies. *Rev. Infect. Dis.*, **3 Suppl**, S61-70.
- Bermudez, L.E., Kolonoski, P., Wu, M., Aralar, P.A., Inderlied, C.B. and Young, L.S. (1999) Mefloquine is active in vitro and in vivo against *Mycobacterium avium* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 1870-1874.

- Bond, D.R. and Russell, J.B. (1996) A role for fructose 1,6-diphosphate in the ATP-mediated energy-spilling reaction of *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2095-2099.
- Borek, A.P., Dressel, D.C., Hussong, J. and Peterson, L.R. (1997) Evolving clinical problems with *Streptococcus pneumoniae*: increasing resistance to antimicrobial agents, and failure of traditional optochin identification in Chicago, Illinois, between 1993 and 1996. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **29**, 209-214.
- Boyer, P.D. (1999) What makes ATP synthase spin?. *Nature*, **402**, 247-249
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Broome, C.V. and Facklam, R.R. (1981) Epidemiology of clinically significant isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Rev. Infect. Dis.*, **3**, 277-281.
- Brown, R.E., Stancato, F.A. and Wolfe, A.D. (1979) The effects of mefloquine on *Escherichia coli*. *Life Sci.*, **25**, 1857-1864.
- Brusilow, W.S. (1987) Proton leakiness caused by cloned genes for the F₀ sector of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*: requirement for F₁ genes. *J. Bacteriol.*, **169**, 4984-4990.
- Brusilow, W.S.A. (1993) Assembly of the *Escherichia coli* F₁ F₀ ATPase, a large multimeric membrane-bound enzyme. *Mol. Microbiol.*, **9**, 419-424.
- Bunick, F.J. and Kashket, S. (1981) Enolases from fluoride-sensitive and fluoride-resistant streptococci. *Infect. Immun.*, **34**, 856-863.
- Cain, B.D. and Simoni, R.D. (1986) Impaired proton conductivity resulting from mutations in the a subunit of F₁F₀ ATPase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **261**, 10043-10050.
- Cain, B.D. and Simoni, R.D. (1988) Interaction between Glu-219 and His-245 within the a subunit of F₁F₀-ATPase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6606-6612.
- Cain, B. D. and Simoni, R. D. (1989) Proton translocation by the F₁F₀ATPase of *Escherichia coli*. Mutagenic analysis of the a subunit. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3292-3300.
- Campbell, E.A., Choi, S.Y. and Masure, H.R. (1998) A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genome analysis. *Mol. Microbiol.*, **27**, 929-939.
- Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A. and Darst, S.A. (2001) Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerases. *Cell*, **23**, 901-912.
- Capaldi, R.A., Aggeler, R., Wilkens, S. and Gruber, G. (1996) Structural changes in the gamma and epsilon subunits of the *Escherichia coli* F₁F₀-type ATPase during energy coupling. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **28**, 397-401.

- Casiano-Colon, A. and Marquis, R.E. (1988) Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1318-1324.
- Clave, C. and Trombe, M.C. (1989) DNA uptake in competent *Streptococcus pneumoniae* requires ATP and is regulated by cytoplasmic pH. *FEMS Microbiol. Lett.*, **53**, 113-118.
- Cook, G.M. and Russell, J.B. (1994) Energy-spilling reactions of *Streptococcus bovis* and resistance of its membrane to proton conductance. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1942-1948.
- Cox, G.B., Fimmel, A.L., Gibson, F. and Hatch, L. (1986) The mechanism of ATP synthase: a reassessment of the functions of the b and a subunits. *Biochim. Biophys. Acta*, **849**, 62-69.
- Cozens, A.L. and Walker, J.E. (1987) The organization and sequence of the genes for ATP synthase subunits in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. Support for an endosymbiotic origin of chloroplasts. *J. Mol. Biol.*, **194**, 359-383.
- Cross, R.L. and Taiz, L. (1990) Gene duplication as a means for altering H⁺/ATP ratios during the evolution of F₁F₀ ATPases and synthases. *FEBS Lett.*, **259**, 227-229.
- Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I. and Tuomanen, E.I. (1995a) *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*, **377**, 435-438.
- Cundell, D.R., Weiser, J.N., Shen, J., Young, A. and Tuomanen, E.I. (1995b) Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, **63**, 757-761.
- Curran, T.M., Lieou, J. and Marquis, R.E. (1995) Arginine deiminase system and acid adaptation of oral streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4494-4496.
- Chang, A.C. and Cohen, S.N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.*, **134**, 1141-1156.
- Chen, J.D. and Morrison, D.A. (1987) Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 1959-1967.
- Chen, P.S.J., Toribara, T.Y. and Warner, H. (1956) Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, **28**, 1756-1758.
- Dagan, R., Melamed, R., Muallem, M., Piglansky, L., Greenberg, D., Abramson, O., Mendelman, P.M., Bohidar, N. and Yagupsky, P. (1996) Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. *J. Infect. Dis.*, **1996**, 1271-1278.

- Davies, T.A., Pankuch, G.A., Dewasse, B.E., Jacobs, M.R. and Appelbaum, P.C. (1999) In vitro development of resistance to five quinolones and amoxicillin-clavulanate in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 1177-1182.
- Davis, T.E. and Fuller, D.D. (1991) Direct identification of bacterial isolates in blood cultures by using a DNA probe. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2193-2196.
- de la Campa, A.G., Ferrándiz, M.-J., Tubau, F., Pallarés, R., Manresa, F. and J., L. (2003) Genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated during ciprofloxacin therapy from a patient with bronchiectasis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47** (En prensa).
- Deckers-Hebestreit, G. and Altendorf, K. (1996) The F₀F₁-type ATP synthases of bacteria: Structure and function of the F₀ complex. *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**, 791-824.
- Denys, G.A. and Carey, R.B. (1992) Identification of *Streptococcus pneumoniae* with a DNA probe. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2725-2727.
- Dillard, J.P. and Yother, J. (1991) Analysis of *Streptococcus pneumoniae* sequences cloned into *Escherichia coli*: effect of promoter strength and transcription terminators. *J. Bacteriol.*, **173**, 5105-5109.
- Dmitrev, O.Y., Jones, P.C. and H., F.R. (1999) Structure of the subunit c oligomer in the F₁F₀ ATP synthase: model derived from solution structure of the monomer and cross-linking in the native enzyme. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7785-7790.
- Dopazo, J., Mendoza, A., Herrero, J., Caldara, F. and Humbert Y, F.L., Guerrier M, Grand-Schenk E, Gandin C, de Francesco M, Polissi A, Buell G, Feger G, Garcia E, Peitsch M, Garcia-Bustos JF. (2001) Annotated draft genomic sequence from a *Streptococcus pneumoniae* type 19F clinical isolate. *Microb. Drug Resist.*, **7**, 99-125.
- Dowell, S.F., Butler, J.C. and Giebink, G.S. (1999) Acute otitis media: management and surveillance in an era of pneumococcal resistance. Drug-Resistant *Streptococcus Pneumoniae* Therapeutic Working Group. *Nurse Pract.*, **24**, 1-9 (10 Suppl).
- Dunn, S.D., Heppel, L.A. and Fullmer, C.S. (1980) The NH₂-terminal portion of the alpha subunit of *Escherichia coli* F₁ ATPase is required for binding the delta subunit. *J. Biol. Chem.*, **255**, 6891-6896.
- Elwell, M.R., Sammons, M.L., Liu, C.T. and Beisel, W.R. (1975) Changes in blood pH in rats after infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, **11**, 724-726.
- Enright, M., Zawadski, P., Pickerill, P. and Dowson, C.G. (1998) Molecular evolution of rifampicin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.*, **4**, 65-70.
- Eraso, P., Cid, A. and Serrano, R. (1987) Tight control of the amount of yeast plasma membrane ATPase during changes in growth conditions and gene dosage. *FEBS Lett.*, **224**, 193-197.

- Eriksen, K.R. (1945) Studies of induced resistance to penicillin in pneumococcus type 1. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **22**, 398-405.
- Eskola, J., Kayhty, H., Takala, A.K., Peltola, H., Ronnberg, P.R., Kela, E., Pekkanen, E., McVerry, P.H. and Makela, P.H. (1990) A randomized, prospective field trial of a conjugate vaccine in the protection of infants and young children against invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *N. Engl. J. Med.*, **323**, 1381-1387.
- Eskola, J., Kilpi, T., Palmu, A., Jokinen, J., Haapakoski, J., Herva, E., Takala, A., Kayhty, H., Karma, P., Kohberger, R., Siber, G. and Makela, P.H. (2001) Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N. Engl. J. Med.*, **344**, 403-409.
- Espinosa-Urgel, M., Chamizo, C. and Tormo, A. (1996) A consensus structure for sigma S-dependent promoters. *Mol. Microbiol.*, **21**, 657-659.
- Evans, A.S. and Brachman, P.S. (1991) *Bacterial infections of humans*, 2nd ed. Plenum Medical Book Co, N. Y.
- Feldman, C., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., Boulnois, G.J., Read, R.C., Todd, H.C., Cole, P.J. and Wilson, R. (1990) The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microb. Pathog.*, **9**, 275-284.
- Fenoll, A., Jado, I., Vicioso, D., Pérez, A. and Casal, J. (1998) Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990-1996). *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3447-3454.
- Fenoll, A., Martínez-Suarez, J., Muñoz, R., Casal, J. and García, J.L. (1990) Identification of atypical strains of *Streptococcus pneumoniae* by a specific DNA probe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **9**, 396-401.
- Fenoll, A., Muñoz, R., García, E. and de la Campa, A.G. (1994) Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F₀ complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H⁺-ATPases. *Mol. Microbiol.*, **12**, 587-598.
- Fernández-Moreira, E., Balas, D., González, I. and de la Campa, A.G. (2000) Fluoroquinolones inhibit preferentially *Streptococcus pneumoniae* DNA topoisomerase than DNA gyrase native proteins. *Microb. Drug Res.*, **6**, 259-267.
- Ferrándiz, M.J. and de la Campa, A.G. (2002) The membrane-associated F₀F₁ ATPase is essential for the viability of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **10514**, 1-6.
- Ferrandiz, M.J., Fenoll, A., Liñares, J. and de la Campa, A.G. (2000) Horizontal transfer of *parC* and *gyrA* in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 840-847.

- Fillingame, R.H. and Mosher, M.E. (1986) Use of lambda-*unc* transducing phages in genetic analysis of H⁺-ATPase mutants of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, **126**, 558-68.
- Fillingame, R. H. (1990) Molecular mechanics of ATP synthesis by F₁F₀-type H⁺-transporting ATP synthases. *The Bacteria. A Treatise on Structure and Function*, vol. 12. New York: academic.
- Fillingame, R.H., Oldenburg, M. and Fraga, D. (1991) Mutation of alanine 24 to serine in subunit c of the *Escherichia coli* F₁F₀-ATP synthase reduces reactivity of aspartyl 61 with dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.*, **266**, 20934-20939.
- Fimmel, A.L. and Fordham, S.A. (1989) The F₁F₀-ATPase of *Escherichia coli*. The substitution of alanine by tyrosine at position 25 in the c-subunit affects function but not assembly. *Biochim. Biophys. Acta.*, **978**, 299-304.
- Fimmel, A.L., Karp, P.E. and Norris, U. (1990) Mutations within the *uncE* gene affecting assembly of the F₁F₀-ATPase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **269**, 303-308.
- Fimmel, A.L. and Norris, U. (1989) The F₁F₀-ATPase of *Escherichia coli*. The substitution of glycine by valine at position 29 in the c-subunit affects function but not assembly. *Biochim. Biophys. Acta.*, **986**, 257-262.
- Finken, M., Kirschner, P., Meier, A., Wrede, A. and Böttger, E.C. (1993) Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of ribosomal protein S12 and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol. Microbiol.*, **9**, 1239-1246.
- Finland, M. and Barnes, M.W. (1977) Changes in occurrence of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* at Boston City Hospital during selected years between 1935 and 1974. *J. Clin. Microbiol.*, **5**, 154-166.
- Foster, D.L. and Fillingame, R.H. (1982) Stoichiometry of subunits in the H⁺-ATPase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2009-2015.
- Foster, J.W. and Hall, H.K. (1990) Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **172**, 771-778.
- Foster, J.W. and Hall, H.K. (1991) Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **173**, 5129-5135.
- Fraga, D., Hermolin, J., Oldenburg, M., Miller, M.J. and Fillingame, R.H. (1994) Arginine 41 of subunit c of *Escherichia coli* H⁺-ATP synthase is essential in binding and coupling of F₁ to F₀. *J. Biol. Chem.*, **269**, 7532-7537.
- Funatsu, G. and Wittmann, H.G. (1972) Location of amino acid replacements in protein S12 isolated from *Escherichia coli* mutants resistant to streptomycin. *J. Mol. Biol.*, **68**, 547-550.

- Garau, J. (2002) Treatment of drug-resistant pneumococcal pneumonia. *Lancet Infect. Dis.*, **2**, 404-415.
- García, E., M., R.J., García, P., Ronda, C., López, R. and Tomasz, A. (1982) Preparation of antiserum against the pneumococcal autolysin. Inhibition of autolysin activity and some autolytic processes by the antibody. *FEMS Microbiol. Lett.*, **14**, 133-136.
- Gay, N.J. (1984) Construction and characterization of an *Escherichia coli* strain with a *uncl* mutation. *J. Bacteriol.*, **158**, 820-825.
- Giebink, G.S. (2001) The prevention of pneumococcal disease in children. *N. Engl. J. Med.*, **345**, 1177-1183.
- Girvin, M.E. and Fillingame, R.H. (1994) Hairpin folding of subunit c of F₁F₀ ATP synthase: 1H distance measurements to nitroxide-derivatized aspartyl-61. *Biochemistry*, **33**, 665-674.
- Girvin, M.E., Rastogi, V.K., Abrildgaard, F., Markley, J.L. and Fillingame, R.H. (1998) Solution structure of the transmembrane H⁺-translocating subunit c of the F₁F₀ ATP synthase. *Biochemistry*, **37**, 8817-8824.
- Gogarten, J.P., Kibak, H., Dittrich, P., Taiz, L., Bowman, E.J., Bowman, B.J., Manolson, M.F., Poole, R.J., Date, T., Oshima, T., Konishi, J., Denda, K. and Yoshida, M. (1989) Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implications for the origin of eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **86**, 6661-6665.
- Granizo, J.J., Aguilar, L., Casal, J., Garcia-Rey, C., Dal-Re, R. and Baquero, F. (2000) *Streptococcus pneumoniae* resistance to erythromycin and penicillin in relation to macrolide and beta-lactam consumption in Spain (1979-1997). *J. Antimicrob. Chemother.*, **46**, 767-773.
- Gray, B.M., Converse, G.M. and Dillon, H.C.J. (1980) Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J. Infect. Dis.*, **142**, 923-933.
- Greenwood, B. (1999) The epidemiology of pneumococcal infection in children in the developing world. *Philos. Trans. R. Soc. Lon B Biol Sci.*, **354**, 777-785.
- Greger, J.E. and Eisenberg, A.D. (1985) Adenosine 5'-triphosphate content of *Streptococcus mutans* GS-5 during starvation in a buffered salt medium. *Caries Res.*, **19**, 314-319.
- Gresser, M.J., Myers, J.A. and Boyer, P.D. (1982) Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F₁ adenosine triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate, and oxygen exchange measurements with an alternating three-site model. *J. Biol. Chem.*, **257**, 12030-12038.

- Grosjean, H., Sankoff, D., Jou, W.M., Fiers, W. and Cedergren, R.J. (1978) Bacteriophage MS2 RNA: a correlation between the stability of the codon: anticodon interaction and the choice of code words. *J. Mol. Evol.*, **12**, 113-119.
- Grubmeyer, C., Cross, R.L. and Penefsky, H.S. (1982) Mechanism of ATP hydrolysis by beef heart mitochondrial ATPase. Rate constants for elementary steps in catalysis at a single site. *J. Biol. Chem.*, **257**, 12092-12100.
- Gundel, M. and Schwarz, F.K.T. (1932) Studien über die Bakterienflora der oberen Atemwege Neugeborner (im Vergleich mit der Mundhöhlenflora der Mutter und des Pflegepersonals) unter besonderer Berücksichtigung ihrer Bedeutung für das Pneumonieproblem. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheit*, **113**, 411-436.
- Gutierrez, J.A., Crowley, P.J., Brown, D.P., Hillman, J.D., Youngman, P. and Bleiweis, A.S. (1996) Insertional mutagenesis and recovery of interrupted genes of *Streptococcus mutans* by using transposon Tn917: preliminary characterization of mutants displaying acid sensitivity and nutritional requirements. *J. Bacteriol.*, **178**, 4166-4175.
- Gutierrez, J.A., Crowley, P.J., Cvitkovitch, D.G., Brady, L.J., Hamilton, I.R., Hillman, J.D. and Bleiweis, A.S. (1999) *Streptococcus mutans* ffh, a gene encoding a homologue of the 54 kDa subunit of the signal recognition particle, is involved in resistance to acid stress. *Microbiology*, **145**, 57-66.
- Haglund, L.A., Istre, G.R., Pickett, D.A., Welch, D.F. and Fine, D.P. (1993) Invasive pneumococcal disease in central Oklahoma: emergence of high-level penicillin resistance and multiple antibiotic resistance. Pneumococcus Study Group. *J. Infect. Dis.*, **168**, 1532-1536.
- Hahn, K., Faustoferri, R.C. and Quivey, R.G. (1999) Induction of an AP endonuclease activity in *Streptococcus mutans* during growth at low pH. *Mol Microbiol*, **31**, 1489-98.
- Hamilton, I.R. and Buckley, N.D. (1991) Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance. *Oral Microbiol. Immunol.*, **6**, 65-71.
- Hamilton, I.R. and Ellwood, D.C. (1978) Effects of fluoride on carbohydrate metabolism by washed cells of *Streptococcus mutans* grown at various pH values in a chemostat. *Infect. Immun.*, **19**, 434-442.
- Hamilton, I.R. and Svensäter, G. (1998) Acid-regulated proteins induced by *Streptococcus mutans* and other oral bacteria during acid shock. *Oral Microbiol. Immunol.*, **13**, 292-300.
- Hanahan, D. (1985) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Hand, W.L. and Sanford, J.P. (1970) Posttraumatic bacterial meningitis. *Ann. Intern. Med.*, **72**, 869-874.

- Hanna, M.N., Ferguson, R.J., Li, Y.H. and Cvitkovitch, D.G. (2001) *uvrA* is an acid-inducible gene involved in the adaptive response to low pH in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.*, **183**, 5964-5973.
- Hansman, D. and Andrews, G. (1967) Hospital infection with pneumococci resistant to tetracycline. *Med. J. Aust.*, **1**, 498-501.
- Harold, F.M. (1977) Membranes and energy transduction in bacteria. *Curr. Topics Bioenerg.*, **6**, 83-149.
- Harper, D.S. and Loesche, W.J. (1983) Effect of pH upon sucrose and glucose catabolism by the various genogroups of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.*, **62**, 526-531.
- Hartke, A., Bouche, S., Giard, J.C., Benachour, A., Boutibonnes, P. and Auffray, Y. (1996) The Lactic Acid Stress Response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.*, **33**, 194-919.
- Hatch, L.P., Cox, G.B. and Howitt, S.M. (1995) The essential arginine residue at position 210 in the alpha subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase can be transferred to position 252 with partial retention of activity. *J. Biol. Chem.*, **270**, 29407-29412.
- Hausrath, A.C., Gruber, G., Matthews, B.W. and Capaldi, R.A. (1999) Structural features of the gamma subunit of the *Escherichia coli* F₁ ATPase revealed by a 4.4-Å resolution map obtained by x-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **96**, 13697-13702.
- Havarstein, L.S., Coomaraswamy, G. and Morrison, D.A. (1995) An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11140-11144.
- Havarstein, L.S., Gaustad, P., Nes, I.F. and Morrison, D.A. (1996) Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Mol. Microbiol.*, **21**, 863-9.
- Heath, R.J. and Rock, C.O. (2000) A triclosan-resistant bacterial enzyme. *Nature*, **406**, 145-6.
- Hecker, M., Schumann, W. and Volker, U. (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, **19**, 417-428.
- Heep, M., Brandstätter, B., Rieger, U., Lehn, N., Richter, E., Rüscher-Gerdes, S. and Nieman, S. (2001) Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 107-110.
- Heise, R., Reidlinger, J., Müller, V. and Gottschalk, G. (1991) A sodium-stimulated ATP synthase in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *FEBS Lett*, **295**, 119-122.
- Henrichsen, J. (1995) Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2759-2762.

- Hermolin, J. and Fillingame, R.H. (1989) H⁺-ATPase activity of *Escherichia coli* F₁F₀ is blocked after reaction of dicyclohexylcarbodiimide with a single proteolipid (subunit c) of the F₀ complex. *J. Biol. Chem.*, **5**, 3896-3903.
- Hetherington, S.V., Watson, A.S. and Patrick, C.C. (1995) Sequence and analysis of the *rpoB* gene of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 2164-2166.
- Hilario, E. and Gogarten, J.P. (1993) Horizontal transfer of ATPase genes - the tree of life becomes a net of life. *Biosystems*, **31**, 111-119.
- Hilario, E. and Gogarten, J.P. (1998) The prokaryote-to-eukaryote transition reflected in the evolution of the V/F/A-ATPase catalytic and proteolipid subunits. *J. Mol. Evol.*, **46**, 703-715.
- Hosea, S.W., Brown, E.J., Hamburger, M.I. and Frank, M.M. (1981) Opsonic requirements for intravascular clearance after splenectomy. *N. Engl. J. Med.*, **304**, 245-250.
- Hoskins, J., Alborn, W.E., Arnold, J., Blaszczyk, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S., Estrem, S.T., Fritz, L., Fu, D.J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J.S., Khoja, H., Kraft, A.R., Lagace, R.E., LeBlanc, D.J., Lee, L.N., Lefkowitz, E.J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S.M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C.W., Nicas, T.I., Norris, F.H., O_Gara, M., Peery, R.B., Robertson, G.T., Rockey, P., Sun, P.M., Winkler, M.E., Yang, Y., Young_Bellido, M., Zhao, G., Zook, C.A., Baltz, R.H., Jaskunas, S.R., Rosteck, P.R., Skatrud, P.L. and Glass, J.I. (2001) Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bact.*, **183**, 5709-17.
- Howitt, S.M., Rodgers, A.J., Jeffrey, P.D. and Cox, G.B. (1996) A mutation in which alanine 128 is replaced by aspartic acid abolishes dimerization of the b-subunit of the F₀F₁-ATPase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 7038-7042.
- Hui, F.M. and Morrison, D.A. (1991) Genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: nucleotide sequence analysis shows *comA*, a gene required for competence induction, to be a member of the bacterial ATP-dependent transport protein family. *J. Bacteriol.*, **173**, 372-81.
- Ihara, K., Abe, T., Sugimura, K.L. and Mukohata, Y. (1992) Halobacterial A-ATP synthase in regulation to V-ATPase. *J. Exp. Biol.*, **172**, 475-485.
- Ikemura, T. (1981) Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. *J. Mol. Biol.*, **146**, 1-21.
- Iwabe, N., Kuma, K., Hasegawa, M., Osawa, S. and Miyata, T. (1989) Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **86**, 9355-9359.
- Janoir, C., Podglajen, I., Kitzis, M.D., Poyart, C. and Gutmann, L. (1999) In vitro exchange of fluoroquinolone resistance determinants between *Streptococcus pneumoniae* and

- viridans streptococci and genomic organization of the *parE-parC* region in *S. mitis*. *J. Infect. Dis.*, **180**, 555-558.
- Janoir, C., Zeller, V., Kitzis, M.-D., Moreau, N.J. and Gutmann, L. (1996) High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 2760-2764.
- Jayaraman, G.C., Penders, J.E. and Burne, R.A. (1997) Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans hrcA*, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Mol Microbiol*, **25**, 329-341.
- Jensen, P.R. and Michelsen, O. (1992) Carbon and energy metabolism of *atp* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **174**, 7635-7641.
- Jiang, W. and Fillingame, R.H. (1998) Interacting helical faces of subunits *a* and *c* in the F_1F_0 ATP synthase of *Escherichia coli* defined by disulfide cross-linking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6607-6612.
- Jiang, W., Hermolin, J. and Fillingame, R.H. (2001) The preferred stoichiometry of *c* subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4966-4971.
- Jin, D.J. and Gross, C.A. (1988) Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J. Mol. Biol.*, **202**, 45-58.
- Jones, P.C. (2001) Introduction of a carboxyl group in the first transmembrane helix of *Escherichia coli* F_0F_1 ATPase subunit *c* and cytoplasmic pH regulation. *J. Bacteriol.*, **183**, 1524-1530.
- Jones, P.C., Jiang, W. and Fillingame, R.H. (1998) Arrangement of the multicopy H^+ - translocating subunit *c* in the membrane sector of the *Escherichia coli* F_1F_0 ATP synthase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 17178-17185.
- Kaim, G., Matthey, U. and Dimroth, P. (1998) Mode of interaction of the single *a* subunit with the multimeric *c* subunits during the translocation of the coupling ions by F_1F_0 ATPases. *Embo J.*, **17**, 688-695.
- Kanazawa, H., Kiyasu, T., Noumi, T. and Futai, M. (1984) Overproduction of subunit *a* of the F_0 component of proton-translocating ATPase inhibits growth of *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.*, **158**, 300-306.
- Kashket, S. and Kashket, E.R. (1985) Dissipation of the proton motive force in oral streptococci by fluoride. *Infect. Immun.*, **48**, 19-22.
- Kasimoglu, E., Park, S.J., Malek, J., Tseng, C.P. and Gunsalus, R.P. (1996) Transcriptional regulation of the proton-translocating ATPase (*atpIBEFHAGDC*) operon of *Escherichia coli*: control by cell growth rate. *J. Bacteriol.*, **178**, 5563-5567.

- Kato, J., Nishimura, Y., Yamada, M., Suzuki, H. and Hirota, Y. (1988) Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**, 3967-3977.
- Kellogg, J.A., Bankert, D.A., Elder, C.J., Gibbs, J.L. and Smith, M.C. (2001) Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 3373-3375.
- Kilian, M., Reinholdt, J., Lomholt, H., Poulsen, K. and Frandsen, E.V. (1996) Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS*, **104**, 321-338.
- Klugman, K.P. and Feldman, C. (2001) *Streptococcus pneumoniae* respiratory tract infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **14**, 173-179.
- Kobayashi, H. (1985) A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. *J. Biol. Chem.*, **260**, 72-76.
- Kobayashi, H., Suzuki, T., Kinoshita, N. and Unemoto, T. (1984) Amplification of the *Streptococcus faecalis* proton-translocating ATPase by a decrease in cytoplasmic pH. *J. Bacteriol.*, **158**, 1157-1160.
- Kobayashi, H., Suzuki, T. and Unemoto, T. (1986) Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.*, **261**, 627-630.
- Kobayashi, H. and Unemoto, T. (1980) *Streptococcus faecalis* mutants defective in regulation of cytoplasmic pH. *J. Bacteriol.*, **143**, 1187-1193.
- Koebmann, B.J., Nilsson, D., Kuipers, O.P. and Jensen, P.R. (2000) The membrane-bound H(+)-ATPase complex is essential for growth of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, **182**, 4738-43.
- Konttinen, S. and Sivonen, A. (1987) Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from blood and middle ear fluid. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **6**, 422-4.
- Kremer, B.H., van der Kraan, M., Crowley, P.J., Hamilton, I.R., Brady, L.J. and Bleiweis, A.S. (2001) Characterization of the sat operon in *Streptococcus mutans*: evidence for a role of Ffh in acid tolerance. *J. Bacteriol.*, **183**, 2543-2552.
- Kullen, M.J. and Klaenhammer, T.R. (1999) Identification of the pH-inducible, proton-translocating F₁F₀-ATPase (*atpBEFHAGDC*) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. *Mol. Microbiol.*, **33**, 1152-61.
- Kumamoto, C.A. and Simoni, R.D. (1986) Genetic evidence for interaction between the a and b subunits of the F₀ portion of the *Escherichia coli* proton translocating ATPase. *J. Biol. Chem.*, **261**, 10037-10042.
- Kunin, C.M. and Ellis, W.Y. (2000) Antimicrobial activities of mefloquine and a series of related compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 848-852.

- Lacks, S. and Greenberg, B. (1973) Competence for deoxyribonucleic acid uptake and deoxyribonuclease action external to cells in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **114**, 152-163.
- Lacks, S.A. (1966) Integration efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics*, **53**, 207-35.
- Lacks, S.A. and Greenberg, B. (1975) A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4060-4066.
- Lacks, S.A., Lopez, P., Greenberg, B. and Espinosa, M. (1986) Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J. Mol. Biol.*, **192**, 753-765.
- Laubinger, W. and Dimroth, P. (1987) Characterization of the Na⁺-stimulated ATPase of *Propionigenium modestum* as an enzyme of the F₁F₀ type. *Eur. J. Biochem.*, **168**, 475-480.
- Lee, M.S. and Morrison, D.A. (1999) Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J. Bacteriol.*, **181**, 5004-5016.
- Li, Y.H., Hanna, M.N., Svensater, G., Ellen, R.P. and Cvitkovitch, D.G. (2001) Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *J. Bacteriol.*, **183**, 6875-6884.
- Light, R.W., Girard, W., M., , Jenkinson, S.G. and George, R.B. (1980) Parapneumonic effusions. *Am. J. Med.*, **69**, 507-512.
- López, R., Ronda-Laín, C., Tapia, A., Waks, S.B. and Tomasz, A. (1976) Suppression of the lytic bactericidal effects of cell wall-inhibitory antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **10**, 697-706.
- Luby, J.P. (1992) Infections of the central nervous system. *Am. J. Med. Sci.*, **304**, 379-391.
- Lund, E. (1959) Diagnosis of pneumococci by the optochin and bile test. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **47**, 308-315.
- Mandel, M., Moriyama, Y., Hulmes, J.D., Pan, Y.C., Nelson, H. and Nelson, N. (1988) cDNA sequence encoding the 16-kDa proteolipid of chromaffin granules implies gene duplication in the evolution of H⁺-ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **85**.
- Mandell, G. L., Douglas, R. G. and Bennett, J. E. (1995) Principles and practice of infectious diseases 4th edition. Churchill Livingstone, New York
- Mbelle, N., Huebner, R.E., Wasas, A.D., Kimura, A., Chang, I. and Klugman, K.P. (1999) Immunogenicity and impact on nasopharyngeal carriage of a nonavalent pneumococcal conjugate vaccine. *J. Infect. Dis.*, **180**, 1171-1176.

- McCarthy, J.E., Gerstel, B., Surin, B., Wiedemann, U. and Ziemke, P. (1991) Differential gene expression from the *Escherichia coli atp* operon mediated by segmental differences in mRNA stability. *Mol. Microbiol.*, **5**, 2447-2458.
- McDaniel, L.S., Sheffield, J.S., Delucchi, P. and Briles, D.E. (1991) PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect. Immun.*, **59**, 222-228.
- Mellman, I., Fuchs, R. and Helenius, A. (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 663-700.
- Mitchell, P. and Moyle, J. (1967) Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*, **213**, 137-139.
- Miwa, T., Abe, T., Fukuda, S., Ohkawara, S. and Hino, T. (2001) Regulation of H⁺-ATPase synthesis in response to reduced pH in ruminal bacteria. *Curr. Microbiol.*, **42**, 106-110.
- Miwa, T., Esaki, H., Umemori, J. and Hino, T. (1997) Activity of H⁺-ATPase in ruminal bacteria with special reference to acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2155-2158.
- Miyaji, E.N., Dias, W.O., Gamberini, M., Gebara, V.C., Schenkman, R.P., Wild, J., Riedl, P., Reimann, J., Schirmbeck, R. and Leite, L.C. (2001) PsaA (pneumococcal surface adhesin A) and PspA (pneumococcal surface protein A) DNA vaccines induce humoral and cellular immune responses against *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine*, **20**, 805-812.
- Moore, H.F. and Chesney, A.M. (1917) A study of ethylhydrocuprein (optochin) in the treatment of acute lobar pneumonia. *Arch. Intern. Med.*, **19**, 611-682.
- Morrison, D.A. and Baker, M.F. (1979) Competence for genetic transformation in pneumococcus depends on synthesis of a small set of proteins. *Nature*, **282**, 215-217.
- Müller, V., Ruppert, C. and Lemker, T. (1999) Structure and function of the A₁A₀-ATPases from methanogenic Archaea. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 15-27.
- Mundy, L.S., Janoff, E.N., Schwebke, K.E., Shanholtzer, C.J. and Willard, K.E. (1998) Ambiguity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. Optochin, bile solubility, quellung, and the AccuProbe DNA probe tests. *Am. J. Clin. Pathol.*, **109**, 55-61.
- Muñoz, R. and de la Campa, A.G. (1996) ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 2252-2257.
- Muñoz, R., Fenoll, A., Vicioso, D. and Casal, J. (1990) Optochin-resistant variants of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **13**, 63-66.

- Muñoz, R., García, E. and de la Campa, A.G. (1996) Quinine specifically inhibits the proteolipid subunit of the F_0F_1 H^+ -ATPase of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **178**, 2455-2458.
- Nannen, N.L. and Hutkins, R.W. (1991) Proton-translocating adenosine triphosphatase activity in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, **74**, 747-751.
- National and Standards, C.f.C.L. (2000) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; 5th ed. Publication*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Neufeld, F. (1900) Über eine spezifische bacterolytische Wirkung der Galle. *Z. Hyg. Infekt. (Leipzig)*, **34**, 454-464.
- Neufeld, F. (1902) Über die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorien der Agglutination. *Z. Hyg. Infekt.*, **40**, 54-72.
- Obaro, S.K., Adegbola, R.A., Banya, W.A. and Greenwood, B.M. (1996) Carriage of pneumococci after pneumococcal vaccination. *Lancet*, **348**, 271-272.
- O'Driscoll, B., Gahan, C.G. and Hill, C. (1996) Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1693-1698.
- Ohmiya, K., Tanaka, T., Noguchi, N., O'Hara, K. and Kono, M. (1989) Nucleotide sequence of the chromosomal gene coding for the aminoglycoside 6-adenylyltransferase from *Bacillus subtilis* Marburg 168. *Gene*, **78**, 377-378.
- Olson, E.R. (1993) Influence of pH on bacterial gene expression. *Mol. Microbiol.*, **8**, 5-14.
- O'Sullivan, E. and Condon, S. (1997) Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4210-4215.
- Padayachee, T. and Klugman, K. (1999) Molecular basis of rifampin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 2361-2365.
- Pan, X.-S., Ambler, J., Mehtar, S. and Fisher, L.M. (1996) Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 2321-2326.
- Paradisi, F., Corti, G. and Cinelli, R. (2001) *Streptococcus pneumoniae* as an agent of nosocomial infection: treatment in the era of penicillin-resistant strains. *Clin. Microbiol. Infect.*, **7 Suppl 4**, 34-42.
- Patel, A.M. and Dunn, S.D. (1992) RNase E-dependent cleavages in the 5' and 3' regions of the *Escherichia coli unc* mRNA. *J. Bacteriol.*, **174**, 3541-3548.
- Patel, A.M. and Dunn, S.D. (1995) Degradation of *Escherichia coli uncB* mRNA by multiple endonucleolytic cleavages. *J. Bacteriol.*, **177**, 3917-3922.

- Pati, S. and Brusilow, W.S. (1989) The roles of the alpha and gamma subunits in proton conduction through the F₀ sector of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 2640-2644.
- Paton, J.C., Andrew, P.W., Boulnois, G.J. and Mitchell, T.J. (1993) Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 89-115.
- Penefsky, H.S. (1985) Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin: relationship to ATP synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 1589-1593.
- Pericone, C.D., Overweg, K., Hermans, P.W.M. and Weiser, J.N. (2000) Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect. Immun.*, **68**, 3990-3997.
- Perichon, B., Tankovic, J. and Courvalin, P. (1997) Characterization of a mutation in the *parE* gene that confers fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **41**, 166-167.
- Pestova, E.V., Havarstein, L.S. and Morrison, D.A. (1996) Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol. Microbiol.*, **21**, 853-62.
- Phillips, G., Barker, R. and Brogan, O. (1988) Optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Lancet*, **2**, 281.
- Phillips, G.J. and Silhavy, T.J. (1992) The *E. coli ffh* gene is necessary for viability and efficient protein export. *Nature*, **359**, 744-746.
- Pikis, A., Campos, J.M., Rodriguez, W.J. and Keith, J.M. (2001) Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance, and clinical implications. *J. Infect. Dis.*, **184**, 582-590.
- Pikis, A., Rodríguez, W.J., Campos, J.M. and Keith, J.M. (1997) Optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr. Res.*, **41**, 128.
- Porter, A.C., Kumamoto, C., Aldape, K. and Simoni, R.D. (1985) Role of the *b* subunit of the *Escherichia coli* proton-translocating ATPase. A mutagenic analysis. *J. Biol. Chem.*, **260**, 8182-8187.
- Pozzi, G., Oggioni, M.R. and Tomasz, A. (1989) DNA probe for the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 370-372.
- Pradier, C., Dunais, B., Carsenti-Etesse, H. and Dellamonica, P. (1997) Pneumococcal resistance patterns in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **16**, 644-647.
- Quivey, R.G.J., Faustoferri, R., Monahan, K. and Marquis, R. (2000) Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **189**, 89-92.

- Raja, N., Goodson, M., Chui, W.C., Smith, D.G. and Rowbury, R.J. (1991) Habituation to acid in *Escherichia coli*: conditions for habituation and its effects on plasmid transfer. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 59-65.
- Rao, M.J.K. and Argos, P. (1986) A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **869**, 197-214.
- Rastogi, V.K. and Girvin, M.E. (1999) Structural changes linked to proton translocation by subunit *c* of the ATP synthase. *Nature*, **402**, 263-268.
- Rayner, C.F., Jackson, A.D., Rutman, A., Dewar, A., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., Cole, P.J. and Wilson, R. (1995) Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect. Immun.*, **63**, 442-447.
- Reichmann, P., König, A., Linares, J., Alcaide, F., Tenover, F.C., McDougal, L., Swidsinski, S. and Hakenbeck, R. (1997) A global gene pool for high-level cephalosporin resistance in commensal *Streptococcus* species and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.*, **176**, 1001-1012.
- Rimini, R., Jansson, B., Feger, G., Roberts, T.C., de Francesco, M., Gozzi, A., Faggioni, F., Domenici, E., Wallace, D.M., Frandsen, N. and Polissi, A. (2000) Global analysis of transcription kinetics during competence development in *Streptococcus pneumoniae* using high density DNA arrays. *Mol. Microbiol.*, **36**, 1279-1292.
- Robbins, J.B., Austrian, R., Lee, C.J., Rastogi, S.C., Schiffman, G., Henrichsen, J., Makela, P.H., Broome, C.V., Facklam, R.R., Tiesjema, R.H. and al., e. (1983) Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J. Infect. Dis.*, **148**, 1136-1159.
- Russell, J.B. and Hino, T. (1985) Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiraling effect that contributes to rumen acidosis. *J. Dairy Sci.*, **68**, 1712-1721.
- Sahn, S.A., Reller, L.B., Taryle, D.A., Antony, V.B. and Good, J.T.J. (1983) The contribution of leukocytes and bacteria to the low pH of empyema fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **128**, 811-815.
- Salo, P., Ortvist, A. and Leinonen, M. (1995) Diagnosis of bacteremic pneumococcal pneumonia by amplification of pneumolysin gene fragment in serum. *J. Infect. Dis.*, **171**, 479-482.
- Salles, C., Créancier, L., Claverys, J.P. and Méjean, V. (1992) The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 6103.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring harbor, N. Y.

- Sanders, J.W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J.R., Venema, G. and Kok, J. (1998) A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Mol Microbiol.*, **27**, 299-310.
- Santana, M., Ionescu, M.S., Vertes, A., Longin, R., Kunst, F., Danchin, A. and Glaser, P. (1994) *Bacillus subtilis* F₀F₁ ATPase: DNA sequence of the *atp* operon and characterization of *atp* mutants. *J. Bacteriol.*, **176**, 6802-6811.
- Schaechter, M., Medoff G. and Eisenstein, B. I. (1993) *Mechanism of microbial disease* 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore
- Schafer, G., Engelhard, M. and Muller, V. (1999) Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 570-620.
- Sebald, W., Machleidt, W. and Wachter, E. (1980) N,N'-dicyclohexylcarbodiimide binds specifically to a single glutamyl residue of the proteolipid subunit of the mitochondrial adenosinetriphosphatases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 785-789.
- Sell, S.H., Wright, P.F., Vaughn, W.K., Thompson, J. and Schiffman, G. (1981) Clinical studies of pneumococcal vaccines in infants. I. Reactogenicity and immunogenicity of two polyvalent polysaccharide vaccines. *Rev. Infect. Dis.*, **3 Suppl**, S97-107.
- Severinov, K., Soushko, M., Goldfarb, A. and Nikiforov, V. (1993) New rifampicin-resistant and streptolydigin-resistant mutants in the β subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 14820-14826.
- Sharief, M.K., Ciardi, M. and Thompson, E.J. (1992) Blood-brain barrier damage in patients with bacterial meningitis: association with tumor necrosis factor-alpha but not interleukin-1 beta. *J. Infect. Dis.*, **166**, 350-358.
- Sharp, P.M. and Li, W. (1987) The codon adaptation index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 1281-95.
- Shibata, C., Ehara, T., Tomura, K., Igarashi, K. and Kobayashi, H. (1992) Gene structure of *Enterococcus hirae* (*Streptococcus faecalis*) F₁F₀-ATPase, which functions as a regulator of cytoplasmic pH. *J. Bacteriol.*, **174**, 6117-6124.
- Shockley, T.E. and Hotchkiss, R.D. (1970) Stepwise introduction of transformable penicillin resistance in pneumococci. *Genetics*, **64**, 397-408.
- Smith, A.J., Quivey, J. R. G. and Faustoferri, R.C. (1996) Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus mutans* membrane-bound, proton-translocating ATPase operon. *Gene*, **183**, 87-96.
- Solomon, K.A., Hsu, D.K. and Brusilow, W.S. (1989) Use of lacZ fusions to measure in vivo expression of the first three genes of the *Escherichia coli unc* operon. *J Bacteriol.*, **171**, 3039-3045.

- Sorensen, M.A., Kurland, C.G. and Pedersen, S. (1989) Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **207**, 365-377.
- Spellerberg, B., Cundell, D.R., Sandros, J., Pearce, B.J., Idanpaan-Heikkila, I., Rosenow, C. and Masure, H.R. (1996) Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, **19**, 803-813.
- Stassi, D.L., López, P., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1981) Cloning of chromosomal genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7028-7032.
- Steinfurt, C., Wilson, R., Mitchell, T., Feldman, C., Rutman, A., Todd, H., Sykes, D., Walker, J., Saunders, K., Andrew, P.W. and al. (1989) Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium in vitro. *Infect. Immun.*, **57**, 2006-2013.
- Steitz, J.A. (1979) Prokaryotic ribosome binding sites. *Methods Enzymol.*, **60**, 311-321.
- Studier, F.W. (1972) Bacteriophage T7. *Science*, **176**, 367-76.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, **185**, 60-89.
- Sturr, M.G. and Marquis, R.E. (1992) Comparative acid tolerances and inhibitor sensitivities of isolated F-ATPases of oral lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2287-2291.
- Sutton, S.V. and Marquis, R.E. (1987) Membrane-associated and solubilized ATPases of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *J. Dent. Res.*, **66**, 1095-1098.
- Suzuki, T., Tagami, J. and Hanada, N. (2000) Role of F₁F₀-ATPase in the growth of *Streptococcus mutans* GS5. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 555-562.
- Suzuki, T., Unemoto, T. and Kobayashi, H. (1988) Novel streptococcal mutants defective in the regulation of H⁺-ATPase biosynthesis and in F₀ complex. *J. Biol. Chem.*, **263**, 11840-11843.
- Svensater, G., Larsson, U.B., C., G.E., Cvitkovitch, D.G. and Hamilton, I.R. (1997) Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.*, **12**, 266-273.
- Takase, K., Kakinuma, S., Yamato, I., Konishi, K., Igarashi, K. and Kakinuma, Y. (1994) Sequencing and characterization of the ntp gene cluster for vacuolar-type Na⁺-translocating ATPase of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 11037-11044.
- Taniguchi, T. and Weissmann, C. (1979) *Escherichia coli* ribosomes bind to non-initiator sites of Q beta RNA in the absence of formylmethionyl-tRNA. *J. Mol. Biol.*, **128**, 481-500.
- Tankovic, J., Perichon, B., Duval, J. and Courvalin, P. (1996) Contribution of mutations in *gyrA* and *parC* genes to fluoroquinolone resistance of mutants of *Streptococcus pneumoniae* obtained in vivo and in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 2505-2510.

- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S. and Heidelberg J, D.R., Haft DH, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Kolonay JF, Nelson WC, Peterson JD, Umayam LA, White O, Salzberg SL, Lewis MR, Radune D, Holtzapple E, Khouri H, Wolf AM, Utterback TR, Hansen CL, McDonald LA, Feldblyum TV, Angiuoli S, Dickinson T, Hickey EK, Holt . (2001) Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*, **293**, 498-506.
- Tomasz, A. (1964) Studies on the competence (for genetic transformation) of *Diplococcus pneumoniae* in a synthetic medium. *Bacteriological Proceedings*, 29.
- Tomasz, A. (1970) Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirement for protein synthesis during induction of competence. *J. Bacteriol.*, **101**, 860-871.
- Tomasz, A. and Hotchkiss, R.D. (1964) Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **51**, 480-486.
- Tomasz, A. and Mosser, J.L. (1966) On the nature of the pneumococcal activator substance. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **55**, 58-66.
- Trombe, M.C., Clave, C. and Manias, J.M. (1992) Calcium regulation of growth and differentiation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 77-84.
- Trombe, M.C., Laneelle, G. and Sicard, A.M. (1984) Characterization of a *Streptococcus pneumoniae* mutant with altered electric transmembrane potential. *J. Bacteriol.*, **158**, 1109-1114.
- Tsai, H.Y., Hsueh, P.R., Teng, L.J., Lee, P.I., Huang, L.M., Lee, C.Y. and Luh, K.T. (2000) Bacteremic pneumonia caused by a single clone of *Streptococcus pneumoniae* with different optochin susceptibilities. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 458-459.
- Tseng, H.J., McEwan, A.G., Paton, J.C. and Jennings, M.P. (2002) Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidative stress. *Infect. Immun.*, **70**, 1635-9.
- Tuomanen, E.I. and Masure, H.R. (1997) Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Microb. Drug Resist.*, **3**, 297-308.
- Valent, Q.A., Scotti, P.A., High, S., de Gier, J.W., von Heijne, G., Lentzen, G., Wintermeyer, W., Oudega, B. and Luirink, J. (1998) The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *EMBO J.*, **17**, 2504-2512.
- van Es, H.H., Skamene, E. and Schurr, E. (1993) Chemotherapy of malaria: a battle against all odds? *Clin. Invest. Med.*, **16**, 285-293.
- von Meyenburg, K., Jorgensen, B.B., Michelsen, O., Sorensen, L. and McCarthy, J.E. (1985) Proton conduction by subunit a of the membrane-bound ATP synthase of *Escherichia coli* revealed after induced overproduction. *EMBO J.*, **4**, 2357-2363.

- von Meyenburg, K., Jorgensen, B.B. and van Deurs, B. (1984) Physiological and morphological effects of overproduction of membrane-bound ATP synthase in *Escherichia coli* K-12. *EMBO J.*, **3**, 1791-1797.
- Walker, J. E. (1984) DNA sequence around the *E.coli unc* operon. *Biochem. J.*, **224**, 799-815.
- Walker, J.E., Saraste, M. and Gay, N.J. (1984) The *unc* operon. Nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 164-200.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, J. and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the α - and β - subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **1**, 945-951.
- Watts, S.D., Zhang, Y., Fillingame, R.H. and Capaldi, R.A. (1995) The gamma subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase complex (ECF₁F₀) extends through the stalk and contacts the c subunits of the F₀ part. *FEBS Lett.*, **368**, 235-238.
- Weiser, J.N. (1998) Phase variation in colony opacity by *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.*, **4**, 129-135.
- Whatmore, A.M., Efstratiou, A., Pickerill, A.P., Broughton, K., Woodard, G., Sturgeon, D., George, R. and Dowson, C.G. (2000) Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: characterization of "Atypical" pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes. *Infect. Immun.*, **68**, 1374-82.
- Wieczorek, H., Brown, D., Grinstein, S., Ehrenfeld, J. and Harvey, W.R. (1999) Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *Bioessays*, **21**, 637-648.
- Wilkins, J.C., Homer, K.A. and Beighton, D. (2001) Altered protein expression of *Streptococcus oralis* cultured at low pH revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3396-3405.
- Wizemann, T.M., Moskovitz, J., Pearce, B.J., Cundell, D., Arvidson, C.G., So, M., Weissbach, H., Brot, N. and Masure, H.R. (1996) Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesins in three major pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**, 7985-7990.
- Wright, F. (1990) The 'effective number of codons' used in a gene. *Gene*, **87**, 23-29.
- Wyler, D.J. (1983) Malaria: resurgence, resistance, and research. *N. Engl. J. Med.*, **308**, 875-878, 934-940.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC9 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.

- Yesilkaya, H., Kadioglu, A., Gingles, N., Alexander, J.E., Mitchell, T.J. and Andrew, P.W. (2000) Role of manganese-containing superoxide dismutase in oxidative stress and virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, **68**, 2819-26.
- Yokoyama, K., Akabane, Y., Ishii, N. and Yoshida, M. (1994) Isolation of prokaryotic V_0V_1 -ATPase from a thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12248-12253.
- Yoshida, R., Hirakata, Y., Kaku, M., Tomono, K., Maesaki, S., Yamada, Y., Kamihira, S., Jacobs, M.R., Appelbaum, P.C. and Kohno, S. (1999) Genetic analysis of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae* isolates from several countries by penicillin-binding protein gene fingerprinting and pulsed-field gel electrophoresis. *Chemotherapy*, **45**, 158-165.
- Zhanel, G.G., Walters, M., Noreddin, A., Vercaigne, L.M., Wierzbowski, A., Embil, J.M., Gin, A.S., Douthwaite, S. and Hoban, D.J. (2002) The ketolides: a critical review. *Drugs*, **62**, 1771-1804.
- Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Ritcher, C., Severinov, K. and Darst, S.A. (1999) Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, **98**, 811-824.
- Zhang, Y. and Fillingame, R.H. (1995) Subunits coupling H^+ transport and ATP synthesis in the *Escherichia coli* ATP synthase. Cys-Cys cross-linking of F_1 subunit epsilon to the polar loop of F_0 subunit c. *J. Biol. Chem.*, **270**, 24609-24614.
- Zheng, F., Zook, C., Campo, L., Henault, M., Watson, H., Wang, Q.M. and Peng, S.B. (2002) Identification and characterization of *Streptococcus pneumoniae* Ffh, a homologue of SRP54 subunit of mammalian signal recognition particle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 601-608.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., Passlick, B., Kafferlein, E., Coulie, P.G. and Izbicki, J.R. (1992) Protection against lethal pneumococcal septicemia in pigs is associated with decreased levels of interleukin-6 in blood. *Infect. Immun.*, **60**, 1692-1694.
- Zimniak, L., Dittrich, P., Gogarten, J.P., Kibak, H. and Taiz, L. (1988) The cDNA sequence of the 69-kDa subunit of the carrot vacuolar H^+ -ATPase. Homology to the beta-chain of F_0F_1 -ATPases. *J. Biol. Chem.*, **263**, 9102-9112.

The promoter of the operon encoding the F₀F₁ ATPase of *Streptococcus pneumoniae* is inducible by pH

Antonio Javier Martín-Galiano, María José Ferrándiz and Adela G. de la Campa*

Unidad de Genética Bacteriana (CSIC), Centro Nacional de Biología Fundamental, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain.

Summary

The genes encoding the subunits of the F₀F₁ membrane ATPase of *Streptococcus pneumoniae* were cloned and sequenced. The eight genes, transcribed to one mRNA, are organized in an operon encoding the c, a, b, delta, alpha, gamma, beta and epsilon subunits of 66, 238, 165, 178, 501, 292, 471 and 139 amino acid residues, respectively, that were expressed in an *Escherichia coli* system. To investigate the role of the ATPase in the regulation of the intracellular pH, the expression of the operon between pH 5.7 and 7.5 was studied. An increase in both the ATPase activity and the amount of the alpha and beta F₁ subunits as shown by Western blot analysis was observed as the pH decreased. These increases were accompanied by an increase in the *atp*-specific mRNA, as shown by Northern blot and slot-blot analysis. Primer extension experiments and transcriptional fusions between the *atp* promoter and the reporter *cat* gene demonstrated that this pH-dependent increase in the mRNA was regulated at the level of initiation of transcription. Transcription of the operon occurs from a promoter with a consensus -35 box (TTGACA) and a -10 box (TACACT) that differs from the consensus (TATAAT). A point mutation at the -10 box of the promoter (change to TGCACT) avoided this increase, suggesting a role for this sequence in the pH-inducible regulation.

Introduction

Streptococcus pneumoniae (the pneumococcus) continues to be the leading bacterial cause of community-acquired pneumonia, meningitis, otitis media and sinusitis. This broad pathogenic potential reflects the diversity of habitats in which this microorganism can become established. The pneumococcus persists in an asymptomatic

carrier state in the nasopharynx of healthy individuals, from where it is able to spread and gain access to the ear, lung or bloodstream. On the other hand, the emergence of resistance to antimicrobial agents commonly used for the treatment of pneumococcal diseases (Hoffman *et al.*, 1995; Pallarés *et al.*, 1995), has highlighted the need for novel antimicrobial agents directed at new targets. These new targets are ideally essential genes or genes required for the survival of the bacteria within the host. The ability of pneumococci to adapt to their different habitats implies a tight regulation of the intracellular concentration of solutes, including protons. The bacterial F-type proton ATPases have a fundamental role in the maintenance of pH homeostasis. The structure of these bacterial enzymes is very similar and consists of two complexes: a cytoplasmic sector F₁ (α , β , δ , γ , and ξ subunits), which contains the catalytic sites for ATP hydrolysis; and a cytoplasmic membrane sector F₀ (a, c and b subunits), which forms the proton channel. Proton transport through F₀ drives the release of ATP on F₁ by long-range conformational changes. The protonated/deprotonated state of an acidic residue of the c subunit produces conformational changes that drive the rotation of an oligomeric ring of these subunits. This rotation, in turn, causes the rotation of two attached subunits (γ and ξ), causing conformational changes in the β subunits (Rastogi and Girvin, 1999; Sambongi *et al.*, 1999; Stock *et al.*, 1999). The catalytic sites on each β subunit cycle sequentially through structural states of low (release of ATP), medium (binding of ADP and inorganic phosphate) and high (ATP formation) nucleotide-binding affinities (Abrahams *et al.*, 1994). The procedure is reversible, and hydrolysis of ATP in F₁ generates rotation of γ and ξ , resulting in the pumping of protons back across the membrane through F₀. In bacteria with a respiratory chain, such as *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, the primary role of the enzyme is to synthesize ATP from the proton gradient of the respiratory chain. Conversely, in bacteria that do not have a respiratory chain, its role is to create a proton gradient (used for a variety of transport processes) with the energy provided by ATP hydrolysis and to maintain the intracellular pH via proton extrusion (Futai *et al.*, 1989; Kakinuma, 1998). This is the case for the oral streptococci *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* (Bender *et al.*, 1986), *Enterococcus hirae* (Kobayashi *et al.*, 1984; 1986), *Lactobacillus acidophilus* (Kullen and Klaenhammer, 1999) and *Lactococcus lactis* (Koeblmann

Accepted 25 June, 2001. *For correspondence. E-mail agcampa@isciil.es; Tel. (+34) 91 509 7057; Fax (+34) 91 509 7919.

et al., 2000). In all these species, it has been reported that the activity of the F_0F_1 ATPase increases as the pH of the growth medium decreases. However, the regulation of this pH-inducible phenotype has not been established clearly at the molecular level. Increase in the mRNA levels of the *atp* operon has been observed in *L. acidophilus* (Kullen and Klaenhammer, 1999), but not in *S. mutans* or *E. hirae*. Moreover, in *E. hirae*, the control seems to be at the enzyme assembly step (Arikado *et al.*, 1999). *S. pneumoniae* is also a facultative anaerobe and, as such, lacks many genes associated with aerobic growth (Baltz *et al.*, 2000). The pneumococcal F_0F_1 ATPase might also be involved in the regulation of the intracellular pH. In addition, this enzyme shows a unique sensitivity to the amino alcohol antimalarial drugs, such as optochin and quinine (Fenoll *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 1996). Optochin- and quinine-resistant pneumococcal strains have point mutations that change amino acid residues located in one of the two transmembrane alpha-helices of the c subunit of the F_0 complex (Fenoll *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 1996). Although optochin was used at the beginning of the twentieth century for the treatment of pneumococcal infections (Moore and Chesney, 1917), its use is nowadays restricted to diagnostic purposes because of its high toxicity. However, new related, less toxic compounds have been synthesized (Kunin and Ellis, 2000). The special optochin sensitivity of the pneumococcus constitutes a routinely used clinical test that differentiates this bacterium from other α -haemolytic streptococci. Given the special characteristics of the pneumococcal F_0F_1 ATPase and its probable role in the maintenance of intracellular pH, this enzyme could be considered to be a target for the design of new antibacterial agents. Besides this, the pneumococcus could also be considered as a model system for the study of the putative antimalarial activity of new compounds (Muñoz *et al.*, 1996).

In the present study, we have genetically characterized the operon encoding the F_0F_1 ATPase of *S. pneumoniae* and identified the eight subunits encoded by the operon. The effects of acidification of the medium on ATPase activity, the synthesis of F_1 subunits, *atp* mRNA levels and the strength of the *atp* promoter have also been studied.

Results

Cloning and sequencing of the atp operon of S. pneumoniae

We have previously sequenced and characterized a region of the *S. pneumoniae* R6 genome encoding the c, a and b subunits of the F_0 complex of the F_0F_1 H^+ -ATPase (accession number Z26851) (Fenoll *et al.*, 1994). Comparisons between this sequence and the preliminary sequence of the *S. pneumoniae* genome

(available at <http://www.tigr.org>) revealed a high level of identity (only three changes in 1008 nucleotides) between positions 272 and 1279 of sequence Z26851 and between positions 6 and 1013 of contig 4182. This alignment allowed us to combine sequence Z26851 and contig 4182. The combined sequence showed high similarity (>70% identity) with that of the F_0F_1 operon of *S. mutans* (accession number U31170) (Smith *et al.*, 1996) and predicted an operon composed of eight genes organized in the following order: c, a, b (F_0 complex), δ , α , γ , β and ϵ (F_1 complex). To clone the *S. pneumoniae atp* operon, oligonucleotide primers synthesized based on the combined sequence described above were used in polymerase chain reaction (PCR) amplifications of R6 chromosomal DNA (Fig. 1A) as described in *Experimental procedures*. Attempts to clone the *atp* operon with its own promoter using oligonucleotides located 5' of the putative promoter were unsuccessful (not shown). Recombinant plasmids containing various genes of the *atp* operon under the control of a T7 RNA polymerase promoter were cloned into the intermediate-copy-number pSU24 *E. coli* vector (Bartolomé *et al.*, 1991). Restriction analysis and nucleotide sequence determinations showed that plasmid pOPTN8 carried the eight genes of the operon (*atpC*, *atpA*, *atpB*, *atpD*, *atpX*, *atpY*, *atpZ* and *atpE*), pOPTN7 the first seven genes, pOPTN4 the first four genes and pOPTN3B the first three genes that constitute the F_0 complex (Fig. 1A). Analysis of the sequence (Fig. 2) revealed the presence of a putative promoter upstream of the ATG initiation codon for *atpC* and a putative rho-independent transcription terminator ($\Delta G = -17.2$ kcal) downstream of the stop codon of *atpE* (Fig. 2). These observations suggested that the eight genes of the operon constitute a single transcriptional unit.

Protein sequence comparisons (Table 1) showed that the most similar proteins to the *S. pneumoniae* ATPase subunits were those from other streptococci. Identities >50% were observed for the eight subunits with those of *S. sanguis*, and for seven of the subunits (the exception being subunit δ) with those of *Streptococcus bovis* and *S. mutans*. Overall, higher identities were observed for the F_1 subunits (especially for the α and β subunits) than for the subunits of the F_0 complex, and subunit δ was the least conserved.

Identification of the subunits encoded by the atp operon

Recombinant plasmids carrying different portions of the *atp* operon under the control of the T7 inducible promoter (Fig. 1A) were established in *E. coli* BL21(DE3). When the T7 RNA polymerase of those strains was induced with IPTG and the *E. coli* RNA polymerase was inhibited with rifampicin, polypeptides that were not expressed by the pSU24 vector were produced (Fig. 1B) and specifically

labelled with [³⁵S]-methionine (Fig. 1C). Three bands with apparent molecular masses of 26.9, 19.9 and 9.1 kDa, which would correspond to the F₀ subunits a, b and c, respectively, were labelled in *E. coli* carrying pOPTN3B (*atpCAB*) (Fig. 1C). Therefore, these same three bands and an additional band of 25.7 kDa, which would correspond to the δ subunit, were observed in the extract of the strain carrying pOPTN4 (*atpCABδ*). Bands of 54.9, 50 and 39.8 kDa, most probably corresponding to the α, β and γ subunits, respectively, were labelled in *E. coli* containing pOPTN5 (*atpαβγ*). Accordingly, all those

seven proteins (α, β, γ, a, δ, b and c subunits) were overexpressed in the strain carrying pOPTN7, and an additional protein of 16.6 kDa, corresponding to the ε subunit, in the strain carrying pOPTN8. These results identified the eight subunits of the pneumococcal F₀F₁ ATPase. The apparent molecular weight values were in agreement with those predicted from sequence analysis.

Two extra bands (hatched arrowheads in Fig. 1C) appeared in the extracts of cultures overproducing α and β subunits (pOPTN5, 7 and 8), which might correspond to degradation products yielded by *E. coli* proteases,

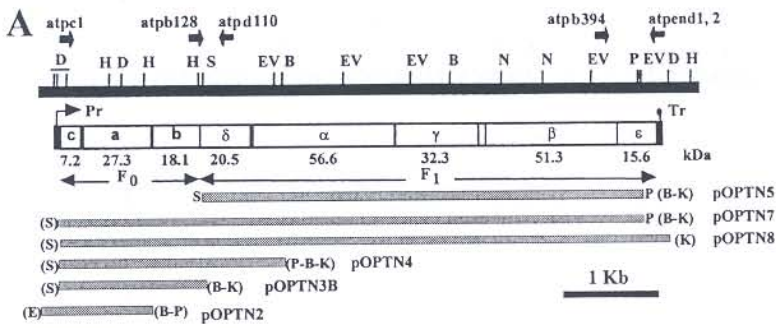
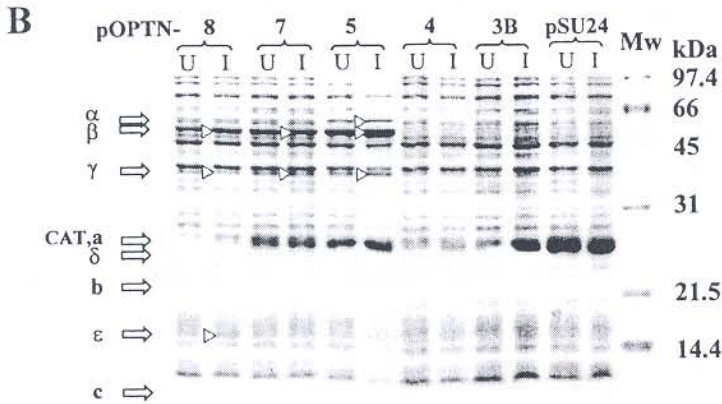


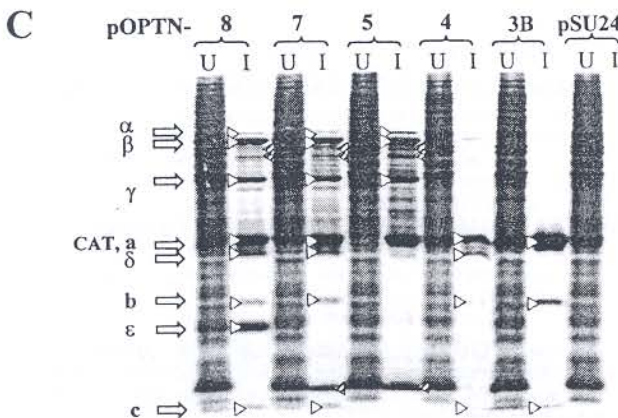
Fig. 1. Restriction map of the *atp* operon region of *S. pneumoniae* and its genetic organization as deduced from the nucleotide sequence (A) and proteins encoded by the *atp* operon (B and C).

A. Pr indicates promoter, Tr, transcription terminator. The molecular masses of the predicted proteins of the F₀ and F₁ complexes are indicated. The physical maps of the inserts of pertinent plasmids are indicated (shaded bars) together with the restriction enzyme sites derived from the cloning experiments (in parentheses), but not present in the *S. pneumoniae* chromosomal DNA. B, *Bam*HI; D, *Dra*I, E, *Eco*RI; EV, *Eco*RV; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; N, *Nco*I; P, *Pst*I; S, *Sph*I. Oligonucleotides used in PCR experiments are indicated by grey arrows (not drawn to scale).



B. Polypeptides revealed by Coomassie blue staining.

C. Autoradiogram of plasmid-encoded products. Cultures of BL21(DE3) containing the indicated plasmids were grown in LB (B) or in M9 (C) media and induced with IPTG as described in *Experimental procedures*. Samples containing 15 μg (1B) or 5 μg (1C) of protein were electrophoresed in an SDS-polyacrylamide gel. I, cultures induced with IPTG and treated with rifampicin; U, uninduced cultures.



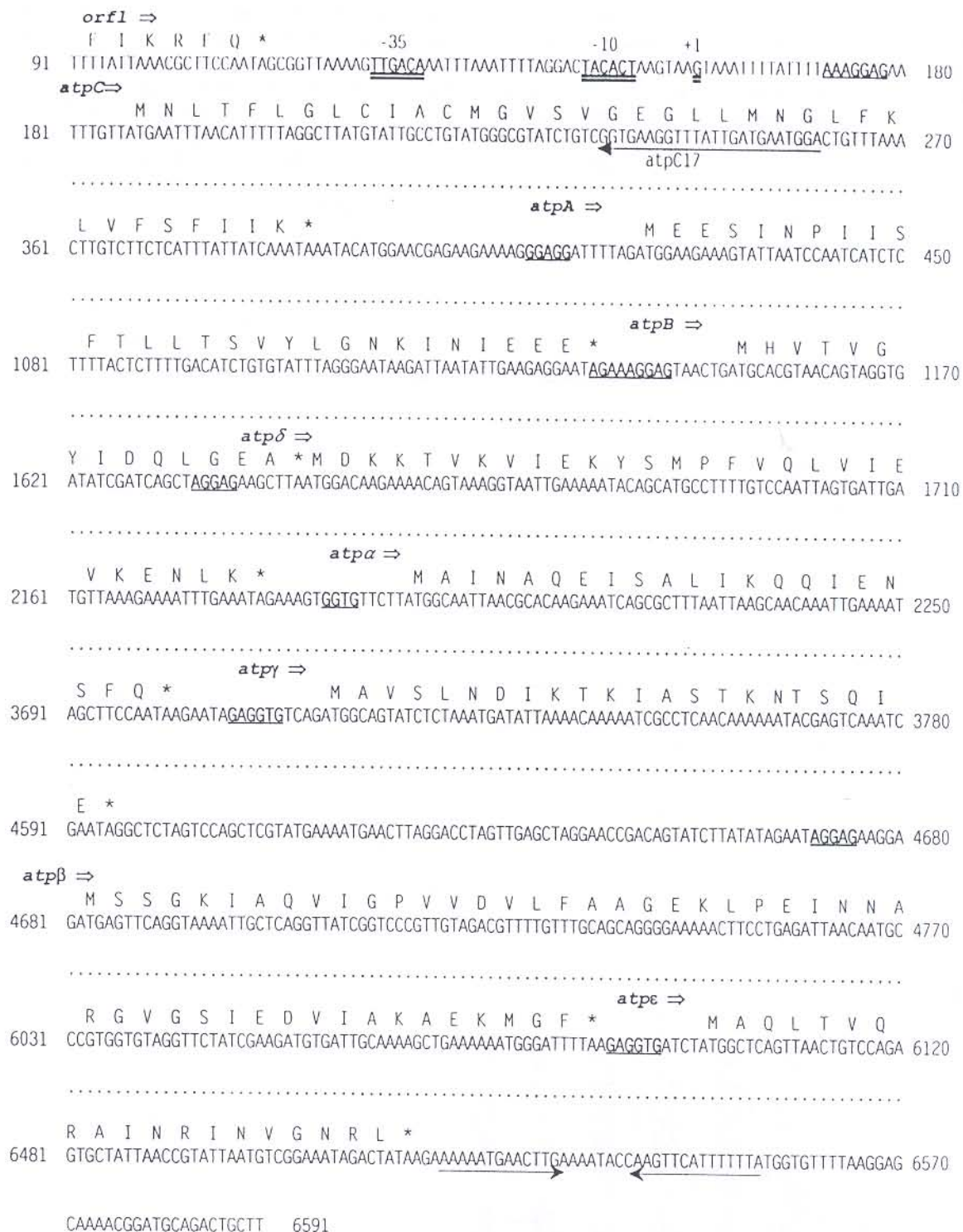


Fig. 2. Part of the nucleotide sequence of a 6591 bp fragment of *S. pneumoniae* R6 DNA that contains the *atp* operon and deduced amino acid sequences. The sequence expanding nucleotides 1–1253 corresponds to Z26851 (Fenoll *et al.*, 1994). The –35 and –10 promoter regions and the first nucleotide of the mRNA (+1) are marked with a double underline and set in bold type. Putative ribosome binding sites are underlined and in bold type. Facing arrows indicate the inverted repeats that constitute the putative transcription terminator.

Table 1. Similarities between the deduced amino acid sequences of the eight *S. pneumoniae* *atp* operon gene products and those homologous proteins from six other bacteria of increasing evolutionary distance.

Subunit	Identity (similarity) (%) ^a					
	Bacterial species					
	<i>S. sanguis</i>	<i>S. bovis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. hirae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Atpc	63 (84)	56 (76)	53 (73)	31 (59)	33 (59)	27 (58)
Atpa	65 (79)	50 (71)	50 (74)	44 (66)	36 (58)	27 (50)
Atpb	70 (84)	62 (77)	57 (76)	44 (68)	36 (64)	27 (54)
Atp δ	54 (76)	39 (58)	38 (62)	26 (52)	24 (45)	25 (47)
Atp α	93 (95)	87 (93)	85 (93)	80 (89)	75 (87)	53 (70)
Atp γ	85 (94)	73 (85)	67 (83)	67 (77)	49 (73)	34 (60)
Atp β	96 (99)	88 (93)	90 (95)	87 (94)	78 (87)	66 (80)
Atp ϵ	80 (92)	64 (86)	65 (88)	62 (79)	42 (61)	25 (53)

a. Program used was WU-BLASTP 2.0. (W. Gish, <http://blast.wustl.edu>) with default settings.

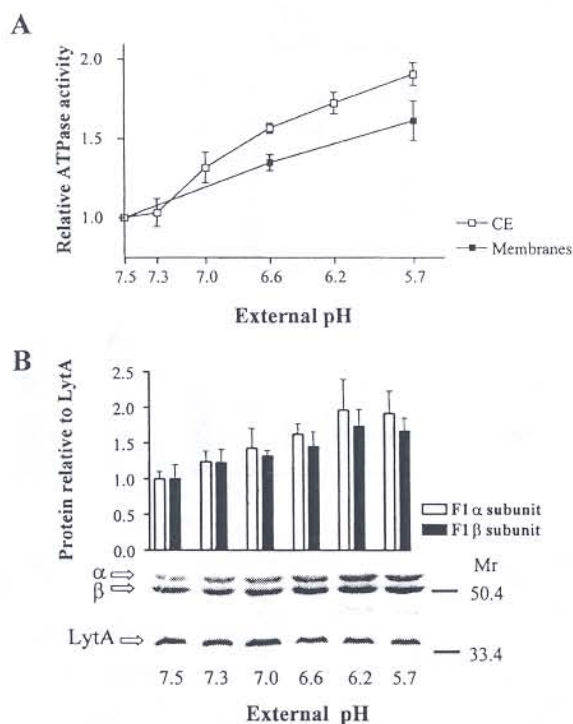


Fig. 3. The activity (A) and the amount of α and β F_1 subunits (B) of *S. pneumoniae* F_0F_1 ATPase increase as the external pH decreases. A. *S. pneumoniae* R6 strain was grown in C + Y medium as described in *Experimental procedures*. ATPase activity was determined in crude cell extracts (CE) and membranes. The graph represents the results (mean \pm SEM, standard error of the mean) of five independent experiments and shows the ratio between the ATPase activity at the indicated pH and that at pH 7.5. Specific activities at pH 7.5 were 5.09 ± 0.94 units mg^{-1} protein for the crude extracts and 9.76 ± 1.15 units mg^{-1} protein for the membranes.

B. Western blot analysis of subunits α and β . Crude cell extracts were prepared from cells grown as in (A). Samples containing 20 μg of protein were separated by 10% SDS-PAGE and blotted to Immobilon P membrane filters (Millipore). The membrane was incubated with polyclonal anti- $\alpha\beta$ F_1 subunit antibody (1:250) and polyclonal anti-autolysin antibody (1:15 000). The results (mean \pm SEM) of three independent experiments are represented.

similar to the degradation of overproduced *E. coli* α and β subunits (von Meyenburg *et al.*, 1984). Another extra band was observed in extracts of the strains carrying a partial ϵ sequence (hatched arrowhead in Fig. 1C, lanes pOPTN7 and pOPTN5). This polypeptide could originate from the fusion of the partial *atp ϵ* sequence and a stop codon into the pSU24 plasmid vector. In the Coomassie-stained gel (Fig. 1B), overproduction of β and γ subunits was observed in cells carrying plasmids pOPTN8, 7 and 5, α subunit in cells carrying pOPTN5 and ϵ subunit in cells carrying pOPTN8. It was striking that overproduction of the CAT protein was evident in most cases, with the exception of plasmids pOPTN4 and pOPTN8. These results are in agreement with the ability of the δ subunit to drive the F_0 complex to the membrane (Rodgers *et al.*, 1997), leading to some lethality to the bacteria that overproduce both the F_0 complex and the δ subunit (plasmid pOPTN4) or both F_0 and F_1 complexes (pOPTN8).

A twofold increase in membrane-associated ATPase activity was found in *E. coli* strains carrying pOPTN8 compared with those harbouring the vector plasmid pSU24. As expected, this activity was inhibited by 75% when $10 \mu\text{M}$ N,N' -dicyclohexylcarbodiimide was added to the reaction mixtures. However, the inhibition by optochin and mefloquine, specific inhibitors of the pneumococcal F_0F_1 H^+ -ATPase, was only 15% and 23% respectively (data not shown). As it has been shown that the amino alcohol antimalarials are both able to inhibit growth (Kunin and Ellis, 2000) and cross the *E. coli* membranes (Nissani and Ginsburgh, 1989), these results suggested that the overproduced subunits of the *S. pneumoniae* ATPase were not correctly assembled inside the *E. coli* membrane, possibly because the capacity of the membrane was exceeded.

Increase in the ATPase amount and activity at pH values below 7.5

If the F_0F_1 membrane ATPase was involved in the control

of internal pH in *S. pneumoniae*, its activity would increase as the pH of the growth medium decreased. To test this hypothesis, the ATPase activity of pneumococcal cultures grown at different pHs was measured in both total-cell extracts and membrane fractions (Fig. 3A). As expected, higher specific activity (about twofold) was observed in membrane fractions than in cellular extracts (see footnote to Fig. 3A). However, inhibition of the ATPase activities in membranes or cell extracts was equivalent: a 75% inhibition by 10 μ M DCCD and 80–85% inhibition by 0.5 μ M optochin (data not shown), suggesting that the membrane-associated F_0F_1 ATPase was the major ATPase activity in the cell. This activity was apparently dependent on external pH (Fig. 3A). Increases were observed at pH 5.7 with respect to the activities at pH 7.5: 1.90 \pm 0.07-fold for cell extracts and 1.61 \pm 0.12-fold for membranes.

To test whether the increase in ATPase activity corresponded to an increase in the amount of this enzyme, Western blot experiments using antibodies directed against α and β subunits and against autolysin as an internal control were used. Increases of 1.91 \pm 0.31-fold (for the α subunit) and of 1.67 \pm 0.18-fold (for the β subunit) were observed when the external pH varied from 7.5 to 5.7 (Fig. 3B).

Increase in the *atp* mRNA at pH values lower than 7.5

The transcription initiation site of the *atp* operon was determined in a primer extension assay using RNA extracted from *S. pneumoniae* T4 grown at two different pHs (6.6 and 7.5) and a 24-mer oligonucleotide (*atp*C17; Fig. 2), as a primer. This yielded 78 nucleotide (nt) run-off products (Fig. 4A) mapping to the G (position 158 of the sequence in Fig. 2) located 7 bp downstream of the 3' end of a -10 promoter-like box (Fig. 4A). The transcription start site, using RNA extracted from an *E. coli* culture carrying pOPTN2, was identical to that in *S. pneumoniae* (data not shown). Furthermore, in *S. pneumoniae*, the location of the transcription start point was independent of the pH of the growth medium, although the intensity of the band was higher (1.6 \pm 0.2, average of three independent experiments) at pH 6.6 than at pH 7.5.

To test whether the eight genes of the operon were transcribed in a single messenger, total RNA was extracted from *S. pneumoniae* T4 strain grown at different pHs, blotted and hybridized with an internal DNA probe corresponding to the δ subunit. A major band of 6.6 kb was observed, corresponding to an mRNA including the complete operon (Fig. 4B). The intensity of the band at pH 6.6 was 1.4-fold higher than that observed at pH 7.5, indicating an increase in the mRNA at acid pH. Dot blot analyses of total RNAs from *S. pneumoniae* grown at three different pHs (Fig. 4C) were made using probes specific for

atp δ or for the pneumococcal *gyrA* gene. Hybridizations with the *gyrA* probe did not change significantly with respect to the values at pH 7.5 (1.1 \pm 0.03 at pH 6.6 and 1.0 \pm 0.06 at pH 5.7). However, hybridizations with the

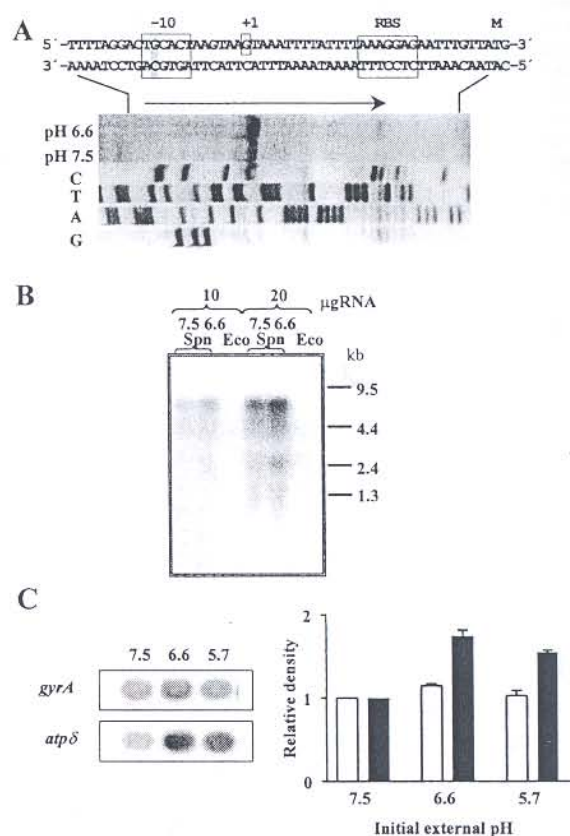


Fig. 4. Localization of the transcription initiation site of *atpC* (A), size of the mRNA of the *atp* operon (B) and expression at different external pHs (C).

A. Sequenase reactions using pOPTN2 plasmid as template and *atp*C17 as primer provided a reference sequence ladder: G, A, T and C indicate the dideoxynucleotides used. For primer extension experiments, 20 μ g of RNAs obtained from *S. pneumoniae* R6 grown in C + Y medium as described in *Experimental procedures* at a final medium of pH 6.6 or 7.5 were used. The double-strand DNA sequence of the 5' *atpC* region is shown with their principal features: the -10 region, the first nucleotide of the mRNA (+1), the putative ribosome binding site (RBS) and the start codon of *atpC*. The nucleotide change in plasmid pOPTN2 (G instead of A) with respect to the R6 DNA sequence is shadowed in the -10 box.

B. Northern blot analysis. Total RNA from cells of T4 (Spn) grown as in (A) at final medium pH 7.5 and 6.6 were denatured, electrophoresed, transferred to nylon membranes and probed with a 32 P-labelled probe comprising *atp* δ , obtained by PCR with oligonucleotides *atp*B128 and *atp* δ 110. *E. coli* XL1-Blue (Eco) RNA was used as a negative control. Positions and sizes of RNA standards (Gibco BRL) are shown on the right.

C. Dot-blot analysis. Total RNA from cultures of R6 (20 μ g) grown as in (A) with the indicated final medium pHs were transferred to Immobilon membranes, hybridized with either a *atp* δ probe used in (B) or a probe of the *gyrA* gene. The graph represents the results (mean \pm SEM) of three independent experiments.

atpδ probe showed a 1.7 ± 0.07 -fold increase at pH 6.6 and a 1.5 ± 0.03 -fold increase at pH 5.7, with respect to the values observed at pH 7.5 (Fig. 4B).

Regulation of transcription mediated by pH

The increase in *atp* mRNA at acid pH could result from enhanced transcription initiation, as suggested by the primer extension experiments (Fig. 4A), or increased stability of the mRNA. To differentiate between these two possibilities, transcriptional fusions of the *atp* promoter region (nucleotide positions 104–186 of the sequence shown in Fig. 2) and the *cat* gene (chloramphenicol acetyltransferase) from plasmid pJS3 were cloned into the streptococcal plasmid pLS1 and introduced into *S. pneumoniae*. Two transcriptional fusions were constructed. One fusion (carried into plasmid pMJSP3) contained the TACACT –10 region present in the chromosome of *S. pneumoniae* R6, and the other fusion (carried into plasmid pMJSP4) contained the TGCCT –10 box from plasmid pOPTN2. The mutation present in pOPTN2 appeared spontaneously when this plasmid was

established into *E. coli* (Fenoll *et al.*, 1994). The activity of the promoters, measured as the CAT activity encoded by the reporter gene, increased as the pH of the growth medium decreased (Fig. 5A). When *S. pneumoniae* R6 carried pMJSP3, a 1.81 ± 0.14 -fold increase at pH 5.7 was found with respect to the activity at pH 7.5. Surprisingly, when *S. pneumoniae* R6 carried pMJSP4, this increase was not observed. The fusion of the *atp* wild promoter and the *cat* gene was also introduced into the *S. pneumoniae* R6 chromosome. This was achieved by transformation of *S. pneumoniae* R6 with a PCR product obtained by amplification of pMJSP3 with oligonucleotides *atp660* and *cat-end2*, rendering strain R6-CAT1 (see *Experimental procedures*). Sequencing of the chromosome of strain R6-CAT1 with oligonucleotides internal to the *cat* gene revealed that the *Patp*–*cat* fusion interrupted two genes: *aacA* (Heath and Rock, 2000) and an open reading frame (ORF) homologous to *gatA* (data not shown). This strain showed CAT activities higher than those reported when the transcriptional fusion was present in plasmid pMJSP3. However, the increases in CAT activity at acid pH were parallel (Fig. 5): a 1.99 ± 0.05 -fold increase at pH 5.7 with respect to the activity at pH 7.5.

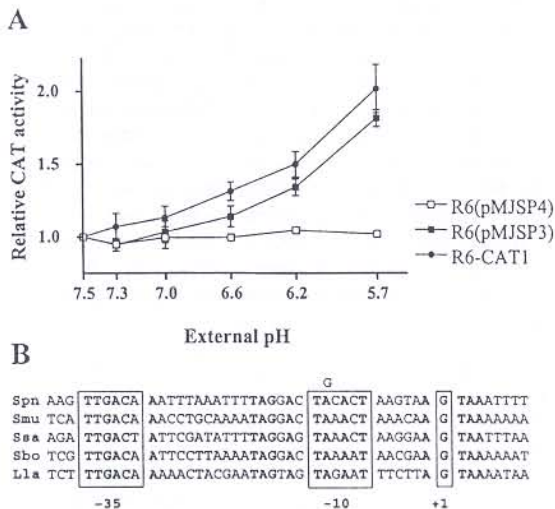


Fig. 5. Increase in the activity of the wild-type *atp* promoter when the external pH decreases (A) and comparison of the promoter sequences of other related *atp* promoters (B).

A. Cultures of the R6-derived strains carrying *Patp*–*cat* transcriptional fusions inserted into the chromosome (R6-CAT1) or into plasmids pMJSP3 or pMJSP4 were grown in C + Y medium as described in *Experimental procedures*. The graph represents the results (mean \pm SEM) of three [R6-CAT1 and R6 (pMJSP3)] or two independent experiments [R6 (pMJSP4)]. CAT specific activities at pH 7.5 were 154.0 ± 21.2 units mg^{-1} for R6 (pMJSP4), 185.3 ± 28.4 units mg^{-1} for R6 (pMJSP3) and 300.7 ± 36.1 units mg^{-1} for R6-CAT1.

B. Nucleotide positions identical to all sequences are indicated in bold. The nucleotide change present in plasmid pMJSP4 (G instead of A) with respect to the R6 sequence is indicated above the –10 box. Sequences present in the GenBank database are *S. pneumoniae* (Spn, Z26851), *S. mutans* (Smu, U31170), *S. sanguis* (Ssa, AF001955), *S. bovis* (Sbo, AB009314), *L. lactis* (Lla, AF059739).

Discussion

In this work, we have genetically characterized the operon encoding the eight subunits of the F_0F_1 ATPase of *S. pneumoniae*. In contrast to other bacterial operons, there is no *atpI* gene in *S. pneumoniae*, and the order of the genes coding for the c and a subunits is reversed, as in *S. mutans* (Smith *et al.*, 1996) and *L. lactis* (Kobmann *et al.*, 2000). The operon is transcribed in a single mRNA (Fig. 4B), similar to that reported for the equivalent operon of other bacterial species (Jones *et al.*, 1983; Shibata *et al.*, 1992; Ivey *et al.*, 1994). We have observed an increase in the F_0F_1 ATPase activity of *S. pneumoniae* cells growing at pH values lower than pH 7.5 in the range of pH 7.5–5.7 (Fig. 3A). Comparisons of the acid-inducible increments in ATPase activity (Fig. 3A), CAT activity of transcriptional fusions (Fig. 5), mRNA levels (Fig. 4) and amount of $F_1 \alpha$ and β subunits (Fig. 3B) showed near-parallel kinetics. Likewise, the *atp* mRNA showed increases of 1.7 from pH 7.5 to pH 6.6 and 1.5 at pH 5.7, compared with the variation in the *gyrA* mRNA (Fig. 4C). These results indicate that the activation of the *atp* promoter accounts for the increase in mRNA and, consequently, for the increase in the amount and enzymatic activity of the ATPase. Almost parallel pH-dependent increases were observed in the transcription of the *Patp*–*cat* fusions in both the chromosome and plasmid pMJSP3 (Fig. 5A). It is interesting to note that the CAT activity encoded by the fusion was about twofold higher when it was located in the chromosome (R6-CAT1) than when carried by plasmid

pJSMP3. These results suggest that the nucleotide sequence upstream of the chromosomal *Patp*-*cat* fusion (i.e. the sequence of the *aacA* locus) is enhancing promoter strength. However, the most important observation came from the comparison of the CAT activities of the *Patp*-*cat* fusions in plasmids pMJSP3 and pMJSP4 (Fig. 5A). Although these activities were equivalent in both plasmids at external pH 7.5, indicating that both promoters were functional, plasmid pMJSP4 did not show acid inducibility. As the only difference between the transcriptional fusions carried by those plasmids is a point mutation at region -10 of the promoter (Fig. 5B), these results support the idea that the pH control of the *atp* promoter is exerted at the level of transcription initiation. It is tempting to speculate that the putative regulator could be an alternative sigma factor of the RNA polymerase, whose synthesis would be activated when the bacteria is growing at acidic pH. A change in external pH might trigger a transient change in internal pH, which can subsequently serve as an intracellular signal for the synthesis of this putative sigma factor. This acidification of external pH occurs when *S. pneumoniae* reaches the stationary phase of growth, as a consequence of the accumulation of catabolic products (López *et al.*, 1976). In *E. coli*, when cells reach the end of the exponential phase or are exposed to various stresses such as hyperosmolarity, low or high temperature or acid pH, a class of promoters is specifically induced by a specific sigma factor called σ^S (for a review, see Hengge-Aronis, 1996). A compilation of σ^S -dependent promoters deduced a -10 box consensus sequence CTATACT, slightly different from the typical TATAAT hexamer recognized by σ^{70} (Espinosa-Urgel *et al.*, 1996). Interestingly, the former sequence is almost identical to that of the -10 region of the *S. pneumoniae atp* promoter, as well as other related promoters (Fig. 5B). Only one change in the *S. pneumoniae atp* -10 sequence with respect to the σ^S -10 consensus is observed: CTACACT in *S. pneumoniae* and CTATACT in the *E. coli* σ^S consensus. However, this position is the least conserved (45%) in the σ^S -dependent promoter consensus (Espinosa-Urgel *et al.*, 1996), whereas the position mutated in the non-responder promoter (plasmid pMJSP4; Fig. 5A) is well conserved (88%).

The ability of streptococci to tolerate acid growth conditions has been related to the optimum pH of F_0F_1 ATPase (Bender *et al.*, 1986), and this property determines, at least in part, the ecological niche of the bacteria (Belli and Marquis, 1991). Likewise, the optimum pH of *S. pneumoniae* F_0F_1 ATPase is pH 7.5, and the enzyme shows 75% maximum activity in the pH range 7-8.5 (data not shown). This pH range predicts *S. pneumoniae* as a streptococcal species poorly aciduric, in accordance with the pH of the habitats in which this microorganism is usually found (blood, pleural,

cerebrospinal and ear fluids). In contrast, *S. mutans* can colonize dental plaque during the acid stage (pH < 4.0) because the optimum pH of its ATPase is 5.0 (Sturr and Marquis, 1992). However, other adaptive mechanisms contribute to the acid tolerance of *S. mutans*, such as the induction of a DNA repair system that acts at low pH (Hahn *et al.*, 1999) and of stress proteins that are transcribed from promoters recognized by an alternative RNA polymerase sigma factor (Jayaraman *et al.*, 1997).

The adaptation of *S. pneumoniae* to different external pHs could be a global response mediated by an alternative sigma factor. The elucidation of the molecular genetic mechanisms involved in this adaptation will allow a better understanding of the pathogenicity of this bacterium and will also contribute to the identification of new antimicrobial targets.

Experimental procedures

Bacterial strains, plasmids, growth and genetic transformation

The *E. coli* strain used for plasmid transformation was XL1-Blue (Stratagene). Strains of *S. pneumoniae* were wild-type R6 or the R6 derivative T4 (*end-1 exo-2 trt-1 hex-4 malM594*). *E. coli* plasmids used for cloning were pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) and pSU24 (Bartolomé *et al.*, 1991). Plasmids pLS1 (Lacks *et al.*, 1986) and pJS3 (Ballester *et al.*, 1986) were used for cloning into *S. pneumoniae* and as a source of the *cat* gene respectively. *E. coli* was grown in Luria-Bertani (LB) medium or M9-S (Sambrook *et al.*, 1989). For transformation, *S. pneumoniae* was grown in a casein hydrolysate-based medium with 2% sucrose (Lacks, 1966). Transformants of *E. coli* were selected in LB medium containing either chloramphenicol at $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ (pSU24) or ampicillin at $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ (pUC18). Transformants of *S. pneumoniae* were selected in medium containing tetracycline at $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (pLS1) or chloramphenicol at $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (pMJSSP3 and 4).

For the experiments showed in Figs 3-5, *S. pneumoniae* was grown in liquid C-medium (Tomasz, 1970) containing 0.08% yeast extract (C + Y). In all experiments, cells were grown in C + Y medium (with pH adjusted to 8.0) until $A_{620} = 0.25$. The culture was diluted 20- to 40-fold in fresh medium buffered at different initial pH ranging from 8.0 to 6.0 at 0.4-range intervals, and samples were taken when cultures reached $A_{620} = 0.25$. This C-medium contained 50 mM phosphate buffer. Changes in the medium pH during growth, resulting from the production of lactic acid, were monitored in the experiments, the final pH being more acidic than the initial pH. These final pH values, which are the values represented in the graphs in Figs 3-5, at $A_{620} = 0.25$ were 7.5 (initial pH 8.0), 7.3 (initial pH 7.6), 7.0 (initial pH 7.2), 6.6 (initial pH 6.8), 6.2 (initial pH 6.4) and 5.7 (initial pH 6.0).

DNA and RNA isolation and manipulation

Streptococcus pneumoniae chromosomal DNA was obtained

as described previously (Fenoll *et al.*, 1994). Plasmids were prepared from *E. coli* by the alkaline lysis method (Sambrook *et al.*, 1989) or with the Qiafilter plasmid maxi kit (Qiagen), and from *S. pneumoniae* by alkaline lysis. Restriction endonucleases and DNA ligase were obtained from commercial sources and used as specified by the suppliers. Gel electrophoresis of plasmids, restriction fragments or PCR products was carried out in agarose gels as described previously (Sambrook *et al.*, 1989). DNA was recovered from gel slices using the Gene Clean II kit (Bio 101). RNA was prepared as described previously (Balas *et al.*, 1998), using 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA and 0.1% sodium deoxycholate as lysis solution for *S. pneumoniae*. Primer extension analysis was performed as described previously (Balas *et al.*, 1998), using cellular RNA (10–20 µg) and 1 pmol of the atpc17 oligonucleotide (5'-CCATTCATCAATAAACCTTCACCG-3'). For Northern analysis, samples of 20 µg of total RNA were separated in a 1.2% agarose, 6.75% formaldehyde gel. RNA was transferred to nylon membranes (Duralon UV; Stratagene) by capillary blotting (Sambrook *et al.*, 1989) and UV cross-linked. Comparison of the relative quantities of specific mRNA was performed using dot blot analysis. RNA samples (20 µg) were denatured for 15 min at 68°C in the presence of 50% formamide, 7% formaldehyde, 1× SSC, diluted twofold in 10× SSC and transferred to nylon membranes using a manifold. DNA fragments from *S. pneumoniae* *atpδ* or *gyrA* genes, used as probes for hybridization, were labelled with [α -³²P]-dATP by PCR using the atpb128 and atpδ110 oligonucleotides (see below) and plasmid pOPTN8 as a template for the *atp* fragment or oligonucleotides *gyrA*44 and *gyrA*170 (Muñoz and de la Campa, 1996) for *gyrA*. Dot blotting and hybridization were performed according to the manufacturer's instructions. Relative amounts of transcript were quantified by densitometric analysis using a FUJIX BAS 1000 apparatus.

PCR amplification and cloning procedures

Cloning of the *atp* operon was performed by means of PCR amplifications from *S. pneumoniae* R6. Reactions contained 2.6 units of Expand high fidelity PCR system (Boehringer Mannheim), 1 µg of R6 chromosomal DNA, 300 nM each synthetic oligonucleotide primer, 350 µM each dNTP and 1.75 mM MgCl₂ in a final volume of 50 µl in the buffer recommended by the manufacturers. Amplification was achieved with an initial cycle of 5 min denaturation at 95°C, 15 min annealing at 55°C (7 min before and 8 min after adding the enzyme) and 6 min polymerase extension at 68°C, followed by 30 cycles of 1 min at 95°C, 2 min at 55°C and 4 or 5 min polymerase extension at 72°C, with a final 20 min at 72°C extension step and slow cooling at 4°C. The following primers were used: atp660 (5'-ggtcggaaTTCCAATAGCGGTTAAAAGTTG-3') (positions 104–125 of the sequence in Fig. 2); atpCorf2 (5'-AACAAATTCTCCTTTAAAATAAAATTT-3') (positions 168–186 of the complementary sequence in Fig. 2); atpC1 (5'-gctgcatgcaAAAGGA GAATTTGTTATGAA-3') (coding for the two first residues of subunit c); atpB128 (5'-GGTGGCAGATTTGACCGT TAGTCTCGCTGG-3') (coding for VADLTVSLAG of subunit b); atpδ110 (5'-gctgcatgcaGAGCAGACGTAATCGTAC-3') (the complementary strand of the primer coding for VTITSA of

subunit δ); atpβ394 (5'-GACCTTGGTTGCTCGCGC CCGTGC-3') (coding for TLVARARR of subunit β); atpδ1 (5'-gctgcatgcaTTCCCGAAGCAGTCTGCATCCGTTT-3'); and atpδ2 (5'-gctgcatgcaGAAGCAGTCTGCATCCG-3'). The 5' end of some of the primers contained sequences including a *Bam*HI (atpδ110), *Eco*RI (atp660, atpδ1), *Kpn*I (atpδ2) or *Sph*I (atpC1) restriction site (lower case letters). Amplification with atpb128 and atpδ1 rendered a fragment of 5 kb that was cut with *Pst*I and *Sph*I and cloned into pUC18. The resulting plasmid showed low stability, and deletions in the insert were observed. To avoid this, the *Pst*I–*Sph*I insert was subcloned into the pSU24 *E. coli* vector (Bartolomé *et al.*, 1991) cut with the same enzymes. The recombinant plasmid, named pOPTN5 (Fig. 1), was stable and carried three genes of the operon (*atpα*, *atpγ* and *atpβ*). Plasmid pOPTN7 (Fig. 1), containing seven genes of the operon (*atpCABδαγβ*), was constructed as follows. A PCR product of 1.8 kb obtained by amplification with atpC1 and atpδ110 was cut with *Sph*I (a target included in atpC1 and in the chromosomal DNA) and ligated to pOPTN5 cut with the same enzyme. To construct pOPTN8 (Fig. 1), containing the eight genes of the operon, a 0.7 kb PCR fragment obtained with atpβ394 and atpδ2 was digested with *Pst*I and *Kpn*I (a target included in atpδ2) and cloned into pOPTN7 cut with the same enzymes. To clone separately the genes of the three subunits of the F₀ complex (*atpCAB*), plasmid pOPTN7 was cut with *Bam*HI and self-ligated, rendering plasmid pOPTN4 (Fig. 1) that contained the *atpCABδ* genes. To eliminate *atpδ*, pOPTN4 was digested with *Bam*HI and partially with *Sph*I, made blunt ended with T4 DNA polymerase and self-ligated. The resulting plasmid, pOPTN3B (Fig. 1), carried the three F₀ subunit genes.

Fusions between the promoter region of the *atp* operon and the reporter *cat* gene (*Patp*–*cat*) were made as follows. A 90 bp fragment obtained by PCR amplification with primers atp660 and phosphorylated atpCorf2 was cut with *Eco*RI and ligated simultaneously to two other fragments, a 600 bp *Hind*III-cut fragment containing the *cat* gene from pJS3 and *Eco*RI–*Hind*III-digested pLS1. The 600 bp fragment containing *cat* was obtained by amplification of pJS3 with phosphorylated oligonucleotide cat1 (5'-ATGAACTTTAA TAAAATTGATTTAGAC-3', coding for the first nine amino acid residues) and cat-end2 (5'-gctgcaagctTCATATTAT AAAAGCCAGCT-3', the complementary strand of the one coding for the last four residues). For the construction of pMJSP3, R6 chromosomal DNA was used as template in the amplification of the *atp* promoter region, whereas plasmid pOPTN2 was used as template for the construction of pMJSP4. To introduce the *Patp*–*cat* fusion into the chromosome of strain R6, a competent culture of this strain was transformed with a 734 bp PCR product obtained by amplification of pMJSP3 with oligonucleotides atp660 and cat-end2 and selection for chloramphenicol resistance. One of the transformants, named R6-CAT1, was selected for further study.

DNA sequence determination and analysis

DNA sequencing was carried out with an Applied Biosystems Prism 377 DNA sequencer. Sequencing reactions were performed according to protocols provided by Applied

Biosystems with the primers used for the PCR amplifications and with internal primers. Sequencing of the chromosomal region flanking the *Patp-cat* fusion of strain R6-CAT1 was made with oligonucleotides cat191 (5'-GTGATGGTTA TCATGCAGG-3') and catmed (5'-CCTAACTCTCCGT CGCTATTG-3') and 3 µg of R6-CAT1 DNA. All sequences shown in this study were determined in both strands of the DNA. The sequence of the *atp* operon was determined using plasmid pOPTN8 primed with internal primers. The DNA sequence corresponding to the *atp* operon has been assigned GenBank accession number AF368465.

Analysis of plasmid-encoded proteins

The pSU24 vector/BL21(DE3) host cloning system permits the specific synthesis and labelling of protein products encoded by genes placed under the control of the phage T7 $\phi 10$ promoter (Studier *et al.*, 1990). The host cell harbours a defective λ -prophage that contains the T7 RNA polymerase gene under the control of the *lac* UV5 that can be induced by IPTG. Cultures (1 ml) of BL21(DE3) carrying the desired plasmids were grown at 37°C in M9 or LB media containing 50 µg of chloramphenicol. When the culture reached $A_{600} = 0.5$, cells grown in M9 were induced with IPTG (1 µmol), incubation proceeded for 30 min, and 200 µg of rifampicin was added. After 90 min, 10 pmol of [³⁵S]-methionine (1000 Ci mmol⁻¹) was added, and incorporation was terminated 5 min later by chilling the cultures on ice. Cells grown in LB were induced with IPTG for 120 min. Cells were centrifuged, suspended and lysed in sample loading solution for gel electrophoresis. Proteins were analysed by electrophoresis in 15% (w/v) polyacrylamide gels and revealed by staining gels with Coomassie blue, photography and autoradiography.

ATPase and CAT activity measurements

Crude extract or membrane-associated ATPase activity was measured as described previously (Fenoll *et al.*, 1994). One unit of activity was defined as the amount of enzyme that resulted in the release of 1 µmol of inorganic phosphate (Pi) ml⁻¹ 30 min⁻¹. For the preparation of crude extracts, 8 ml of cells grown to $A_{620} = 0.25$ were collected by centrifugation, washed with 1.5 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 50 µM β -mercaptoethanol and lysed by incubation at 30°C for 15 min in 250 µl of the same buffer containing 0.1% Triton X-100. Extracts were passed several times through a 27-gauge needle and kept at -70°C. Preparation of crude extracts and CAT activity determinations were carried out as previously described (Ballester *et al.*, 1990).

Western blot analysis

Rabbit antibodies against α and β subunits were obtained by three successive subcutaneous injections of polyacrylamide portions containing the two subunits separated by SDS-PAGE at 3 week intervals. The first one was performed with complete Freund's adjuvant and successive injections with incomplete adjuvant. Three weeks after the last injection, blood was recovered, centrifuged and the serum stored at

-80°C. An anti-LytA serum (García *et al.*, 1982) was kindly supplied by E. García. Transblotted membranes were developed using a 1:5000 dilution of Protein A coupled to peroxidase (Sigma) as the secondary antibody and chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reagent for peroxidase-based the secondary detection system (Roche Molecular Biochemicals).

Acknowledgements

We thank E. García for critical reading of the manuscript. A.J. M-G and M.J.F. have fellowships from the Comunidad Autónoma de Madrid. This work was supported by grant 98/008-01 from Fondo de Investigación Sanitaria. The technical assistance of A. Rodríguez-Bernabé is acknowledged.

References

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., and Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**: 621–628.
- Arikado, E., Ishihara, H., Ehara, T., Shibata, C., Saito, H., Kakegawa, T., *et al.* (1999) Enzyme level of enterococcal F₁F₀-ATPase is regulated by pH at the step of assembly. *Eur J Biochem* **259**: 262–268.
- Balas, D., Fernández-Moreira, E., and de la Campa, A.G. (1998) Molecular characterization of the gene encoding the DNA gyrase A subunit of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **180**: 2854–2861.
- Ballester, S., López, P., Alonso, J.C., Espinosa, M., and Lacks, S.A. (1986) Selective advantage of deletions enhancing chloramphenicol acetyltransferase gene expression in *S. pneumoniae* plasmids. *Gene* **41**: 153–163.
- Ballester, S., Alonso, J.C., Lopez, P., and Espinosa, M. (1990) Comparative expression of the pC194 *cat* gene in *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* **86**: 71–79.
- Baltz, R.H., Norris, F.H., Matsushima, P., Dehoff, B.S., Rockey, P., Porter, G. *et al.* (2000) DNA sequence sampling and genes disruption for identification of new antibacterial targets in *Streptococcus pneumoniae*. In *Streptococcus pneumoniae. Molecular Biology and Mechanism of Disease*. Tomasz, A. (ed.). New York: Mary Ann Liebert, pp. 33–44.
- Barrolomé, B., Jubete, Y., Martínez, E., and de la Cruz, F. (1991) Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene* **102**: 75–78.
- Belli, W.A., and Marquis, R.E. (1991) Adaptation of *Streptococcus mutants* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1134–1138.
- Bender, G., Sutton, S., and Marquis, R. (1986) Acid Tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral Streptococci. *Infect Immun* **53**: 331–338.
- Espinosa-Urgel, M., Chamizo, C., and Tormo, A. (1996) A consensus structure for σ^{54} -dependent promoters. *Mol Microbiol* **21**: 657–659.
- Fenoll, A., Muñoz, R., García, E., and de la Campa, A.G. (1994) Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype

- of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F_0 complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H^+ -ATPases. *Mol Microbiol* **12**: 587–598.
- Futai, M., Noumi, T., and Maeda, M. (1989) ATP synthase (H^+ -ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu Rev Biochem* **58**: 111–136.
- García, E., Rojo, J.M., García, P., Ronda, C., López, R., and Tomasz, A. (1982) Preparation of antiserum against the pneumococcal autolysin. Inhibition of autolysin activity and some autolytic processes by the antibody. *FEMS Microbiol Lett* **14**: 133–136.
- Hahn, K., Faustoferri, R.C., and Quivey, R.G. (1999) Induction of an AP endonuclease activity in *Streptococcus mutans* during growth at low pH. *Mol Microbiol* **31**: 1489–1498.
- Heath, R.J., and Rock, C.O. (2000) A triclosan-resistant bacterial enzyme. *Nature* **406**: 145–146.
- Hengge-Aronis, R. (1996) Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C. (ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 1497–1512.
- Hoffman, J., Cetron, M.S., Farley, M.M., Baughman, W.S., Facklam, R.R., Elliot, J.A., et al. (1995) The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. *N Engl J Med* **333**: 481–486.
- Ivey, D.M., Sturr, M.G., Krulwich, T.A., and Hicks, D.B. (1994) The abundance of *atp* gene transcript and of the membrane F_1F_0 -ATPase as a function of the growth pH of alkalophilic *Bacillus firmus* OF4. *J Bacteriol* **176**: 5167–5170.
- Jayaraman, G.C., Penders, J.E., and Burne, R.A. (1997) Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* *hrcA*, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Mol Microbiol* **25**: 329–341.
- Jones, H.M., Brajkovich, C.M., Gubsalus, R., and P. (1983) *In vivo* 5' terminus and length of the mRNA for the proton-translocating ATPase (*unc*) operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **155**: 1279–1287.
- Kakinuma, Y. (1998) Inorganic cation transport and energy transduction in *Enterococcus hirae* and other streptococci. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1021–1045.
- Kobayashi, H., Suzuki, T., Kinoshita, N., and Unemoto, T. (1984) Amplification of the *Streptococcus faecalis* proton-translocating ATPase by a decrease in cytoplasmic pH. *J Bacteriol* **158**: 1157–1160.
- Kobayashi, H., Suzuki, T., and Unemoto, T. (1986) Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *J Biol Chem* **261**: 627–630.
- Koebmann, B.J., Nilsson, D., Kuipers, O.P., and Jensen, P.R. (2000) The membrane-bound H^+ -ATPase complex is essential for growth of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **182**: 4738–4743.
- Kullen, M.J., and Klaenhammer, T.R. (1999) Identification of the pH-inducible, proton-translocating F_1F_0 -ATPase (*atpBEFHAGDC*) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. *Mol Microbiol* **33**: 1152–1161.
- Kunin, C.M., and Ellis, W.Y. (2000) Antimicrobial activities of mefloquine and a series of related compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 848–852.
- Lacks, S.A. (1966) Integration efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics* **53**: 207–235.
- Lacks, S.A., López, P., Greenberg, B., and Espinosa, M. (1986) Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J Mol Biol* **192**: 753–765.
- López, R., Ronda-Lain, C., Tapia, A., Waks, S.B., and Tomasz, A. (1976) Suppression of the lytic bactericidal effects of cell wall-inhibitory antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **10**: 697–706.
- von Meyenburg, K., Jorgensen, B.B., and van Deurs, B. (1984) Physiological and morphological effects of overproduction of membrane-bound ATP synthase in *Escherichia coli* K-12. *EMBO J* **3**: 1791–1797.
- Moore, H.F., and Chesney, A.M. (1917) A study of ethylhydrocuprein (optochin) in the treatment of acute lobar pneumonia. *Arch Intern Med* **19**: 611–682.
- Muñoz, R., and de la Campa, A.G. (1996) ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2252–2257.
- Muñoz, R., García, E., and de la Campa, A.G. (1996) Quinine specifically inhibits the proteolipid subunit of the F_0F_1 H^+ -ATPase of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **178**: 2455–2458.
- Nissani, E., and Ginsburgh, H. (1989) Protonophoric effects of antimalarial drugs and alkylamines in *Escherichia coli* membranes. *Biochim Biophys Acta* **978**: 293–298.
- Pallarés, R., Liñares, J., Vadillo, M., Cabellos, C., Manresa, F., Viladrich, P.F., et al. (1995) Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona, Spain. *N Engl J Med* **333**: 474–480.
- Rastogi, V.K., and Girvin, M.E. (1999) Structural changes linked to proton translocation by subunit *c* of the ATP synthase. *Nature* **402**: 263–268.
- Rodgers, A.J., Wilkens, S., Aggeler, R., Morris, M.B., Howitt, S.M., and Capaldi, R.A. (1997) The subunit δ -subunit *b* domain of the *Escherichia coli* F_1F_0 ATPase. The *b* subunits interact with F_1 as a dimer and through the δ subunit. *J Biol Chem* **272**: 31058–31064.
- Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., et al. (1999) Mechanical rotation of the *c* subunit oligomer in ATP synthase (F_0F_1): direct observation. *Science* **286**: 1722–1724.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shibata, C., Ehara, T., Tomura, K., Igarashi, K., and Kobayashi, H. (1992) Gene structure of *Enterococcus hirae* (*Streptococcus faecalis*) F_1F_0 -ATPase, which functions as a regulator of cytoplasmic pH. *J Bacteriol* **174**: 6117–6124.
- Smith, A.J., Quivey, R.G., Jr, and Faustoferri, R.C. (1996) Cloning and nucleotide sequence analysis of the

- Streptococcus mutans* membrane-bound, proton-translocating ATPase operon. *Gene* **183**: 87–96.
- Stock, D., Leslie, A.G.W., and Walker, J.E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**: 1700–1705.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60–89.
- Sturr, M., and Marquis, R. (1992) Comparative acid tolerances and inhibitor sensitivities of isolated F-ATPases of oral lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2287–2291.
- Tomasz, A. (1970) Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirement for protein synthesis during induction of competence. *J Bacteriol* **101**: 860–871.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC9 vectors. *Gene* **33**: 103–119.

Mefloquine and New Related Compounds Target the F_0 Complex of the F_0F_1 H^+ -ATPase of *Streptococcus pneumoniae*

Antonio Javier Martín-Galiano,¹ Begoña Gorgojo,¹ Calvin M. Kunin,² and Adela G. de la Campa^{1*}

Unidad de Genética Bacteriana (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain,¹ and Department of Internal Medicine, The Ohio State University, Columbus, Ohio²

Received 26 November 2001/Returned for modification 7 February 2002/Accepted 26 February 2002

The activities of mefloquine (MFL) and related compounds against previously characterized *Streptococcus pneumoniae* strains carrying defined amino acid substitutions in the *c* subunit of the F_0F_1 H^+ -ATPase were studied. In addition, a series of MFL-resistant (Mfl^r) strains were isolated and characterized. A good correlation was observed between inhibition of growth and inhibition of the membrane-associated F_0F_1 H^+ -ATPase activity. MFL was about 10-fold more active than optochin and about 200-fold more active than quinine in inhibiting both the growth and the ATPase activities of laboratory pneumococcal strain R6. Mutant strains were inhibited by the different compounds to different degrees, depending on their specific mutations in the *c* subunit. The resistant strains studied had point mutations that changed amino acid residues in either the *c* subunit or the *a* subunit of the F_0 complex. Changes in the *c* subunit were located in one of the two transmembrane α helices: residues M13, G14, G20, M23, and N24 of helix 1 and residues M44, G47, V48, A49, and V57 of helix 2. Changes in the *a* subunit were also found in either of the transmembrane α helices, helix 5 or 6: residue L186 of helix 5 and residues W206, F209, and S214 of helix 6. These results suggest that the transmembrane helices of the *c* and *a* subunits interact and that the mutated residues are important for the structure of the F_0 complex and proton translocation.

The prevalence of *Streptococcus pneumoniae* strains resistant to common antimicrobial agents (10, 26) and the emergence of resistance to new drugs like the fluoroquinolones (4, 20) have highlighted the need for novel antimicrobial agents directed at new targets. The membrane-associated F_0F_1 H^+ -ATPase could be such a target, given that the unique sensitivity of *S. pneumoniae* to the amino alcohol antimalarial agents optochin (OPT) and quinine (QIN) resides in the characteristics of its F_0 complex (6, 24). The H^+ -ATPase could be essential for the viability of the pneumococcus, as demonstrated in *Lactococcus lactis*, a genetically related species (17). The primary role of this enzyme in *S. pneumoniae* is to create a proton gradient with the energy provided by ATP hydrolysis and to maintain the intracellular pH via proton extrusion (21), as in other related bacteria (7, 14). However, in bacteria with a respiratory chain such as *Escherichia coli*, the primary role of this enzyme is to synthesize ATP from the proton gradient of the respiratory chain. The bacterial F_0F_1 ATPases consist of cytoplasmic sector F_1 (with α , β , δ , γ , and ξ subunits), which contains the catalytic sites for ATP hydrolysis, and cytoplasmic membrane sector F_0 (with *a*, *c*, and *b* subunits), which forms the proton channel. Proton transport through F_0 drives the release of ATP on F_1 by long-range conformational changes. The protonation state of an acidic residue of the *c* subunit produces conformational changes that drive the rotation of an oligomeric ring of these subunits. This rotation, in turn, causes the rotation of the attached γ and ξ subunits, producing conformational changes

in the β subunits (28, 33) that result in ATP synthesis (1). Conversely, hydrolysis of ATP in F_1 generates rotation of γ and ξ , resulting in the pumping of protons back across the membrane through F_0 . In *S. pneumoniae* (21), as well as in other related bacteria (2, 15–18), the activity of the F_0F_1 ATPase has been seen to increase as the pH of the growth medium decreases. The regulation of this pH-inducible phenotype occurs in *S. pneumoniae* at the level of transcription initiation (21).

Although OPT was used at the beginning of the 20th century for the treatment of pneumococcal infections (23), nowadays its use is restricted to diagnostic purposes due to its high toxicity. However, new related, less toxic compounds have been synthesized (19). Given the special characteristics of the pneumococcal F_0F_1 ATPase and its role in the maintenance of intracellular pH, this enzyme could be considered a target for the design of new antibacterial agents. Moreover, the pneumococcus could also be considered a model system for the study of the putative antimalarial activities of new compounds (24).

In the present study, we describe the molecular basis of the antipneumococcal behavior of mefloquine (MFL) and related compounds. MFL has been found to have bactericidal activities against gram-positive bacteria, including staphylococci, pneumococci, and enterococci, but showed poor activities against gram-negative enteric bacteria and yeasts (19). However, the MFL-related compounds used in this work showed enhanced activities against staphylococci, enterococci, and yeasts, having activities similar to those of amphotericin B against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* (19). The activities of these compounds on the growth and membrane-associated ATPase activities of *S. pneumoniae* strains with de-

* Corresponding author. Mailing address: Unidad de Genética Bacteriana (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain. Phone: (341) 509-7904. Fax: (341) 509-7919. E-mail: agcampa@isciii.es.

TABLE 1. Susceptibilities of *S. pneumoniae* strains to amino alcohol antimalarials

Strain	MIC (µg/ml) ^a									
	OPT	QIN	MFL	OSU8	OSU95	OSU99	OSU199	OSU207	OSU255	OSU259
ATCC 6303	0.75	25	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.07	0.15
ATCC 49619	1.5	50	0.15	0.31	0.62	0.62	0.31	0.15	0.15	0.15
R6	1.5	50	0.15	0.31	0.15	0.62	0.15	0.15	0.62	1.25
MJ11	24	72	0.15	0.31	0.15	0.62	0.15	0.15	0.62	1.25
MJ2	24	230	0.62	0.62	0.31	0.31	0.31	0.62	1.25	1.25
MJQ3	3	144	5	5	0.31	0.31	2.5	5	1.25	1.25
MJQ4	18	180	2.5	2.5	0.31	0.31	0.62	0.62	1.25	1.25
MJM3	6	200	2.5	—	—	—	5	—	—	—
MJM5	48	200	5	—	—	—	5	—	—	—
MJM6	12	100	2.5	—	—	—	5	—	—	—
MJM7	3	200	1.25	—	—	—	0.62	—	—	—
MJM8	6	100	5	—	—	—	0.62	—	—	—
MJM9	12	200	0.62	—	—	—	2.5	—	—	—
MJM11	12	100	2.5	—	—	—	1.25	—	—	—
MJM13	24	400	10	—	—	—	1.25	—	—	—
MJM15	12	200	5	—	—	—	10	—	—	—
MJM21	6	200	2.5	—	—	—	2.5	—	—	—
MJM22	24	200	2.5	—	—	—	2.5	—	—	—

^a —, not determined.

defined mutations in the *c* and *a* subunits of the F₀F₁ ATPase have been studied. In addition, MFL-resistant (Mfl^r) strains have been isolated and characterized.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, growth, and transformation of bacteria. The following strains of *S. pneumoniae* were used in this study: common laboratory strain R6; OPT- and QIN-resistant R6 derivatives MJ11 and MJ2 (6) and MJQ3 and MJQ4 (24); and strains ATCC 6303 and ATCC 49619, which were used as quality controls for antimalarials (18). Unless stated otherwise, strain R6 was grown in liquid C medium with added 0.08% yeast extract, and transformation was carried out as described by Tomasz (34). Cultures containing 9 × 10⁸ CFU per ml were treated with DNA at 0.1 µg/ml for 40 min at 30°C and then at 37°C for 90 min before they were plated onto plates with medium containing 0.3 µg of MFL per ml.

Susceptibility tests. MICs were determined by the microdilution method with cation-adjusted Mueller-Hinton broth supplemented with 2.5% lysed horse blood recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (25). The inoculum was prepared by suspension of several colonies from an overnight blood agar culture in Mueller-Hinton broth and adjusting the turbidity to that of a 0.5 McFarland standard (ca. 10⁸ CFU/ml). The suspension was further diluted to provide a final bacterial concentration of 10⁵ CFU/ml in each well of the microdilution trays. The plates were covered with plastic wrap and incubated in the ambient atmosphere at 37°C for 20 to 24 h. The MIC was defined as the lowest concentration of drug that inhibited visible growth. *S. pneumoniae* strains ATCC 49619 and ATCC 6303 were used for quality control.

PCR amplification and DNA sequence determination. *S. pneumoniae* chromosomal DNA was obtained as described previously (6). PCR amplifications were performed with 1 U of *Thermus thermophilus* thermostable DNA polymerase (Biotools), 1 µg of chromosomal DNA, each of the synthetic oligonucleotide primers at a concentration of 0.4 µM, each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 0.2 mM, and 2 mM MgCl₂ in a final volume of 50 µl. To amplify the *atpC* and *atpA* genes, oligonucleotides atpofI (5'-ggtcggaaTTC TGGATG GCTAACTTGAACCTTG-3'; corresponding to nucleotides -143 to -120 upstream of *atpC*) and atpB56 (5'-GACGGGCTTCTTCAGCTCTGTC-3'; the complementary strand of the primer coding for the DRAEEAR amino acid sequence of subunit *b*), respectively, were used. The 5' end of atpofI contained an additional sequence (lowercase) that included an *Eco*R1 restriction site, which is underlined in the atpofI oligonucleotide sequence above. Amplification was achieved with an initial cycle of 1 min of denaturation at 94°C and 30 cycles of 30 s at 94°C, 90 s at 55°C, and 75 s of a polymerase extension step at 72°C, with a final 8-min extension step at 72°C and slow cooling at 4°C. The PCR products used in control transformation experiments were obtained with 2.6 U of a proofreading enzyme (Expand High Fidelity PCR system; Boehringer Mann-

heim). The *parE* fragment used in these experiments was amplified with oligonucleotides parE105 (5'-GGAGGGAAATTCGGTCAAGGTGGCTA-3'; this sequence codes for the GGKFGNGGY amino acid sequence) and parE483 (9). Gel electrophoresis of the PCR products was carried out in agarose gels as described previously (32). The DNA fragments were purified with MicroSpin S400 HR columns (Amersham Pharmacia Biotech), and both strands were sequenced with an Applied Biosystems Prism 377 DNA sequencer, according to the protocols provided by the manufacturer, with both the primers used for the PCR amplifications and internal primers.

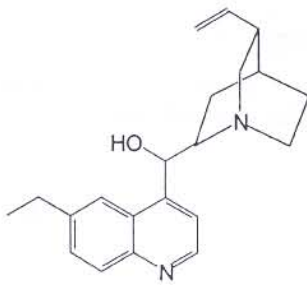
ATPase activity determinations. Membrane-associated ATPase activity was measured as described previously (24). One unit of activity was defined as the amount of enzyme that resulted in the release of 1 µmol of inorganic phosphate per ml per 30 min. The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀s; the means of two independent determinations) were defined as the concentration of the antimalarial agent required for a 50% reduction of enzymatic activity.

Chemicals. OPT and QIN were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. MFL (Ro 21-5998-000) was provided by Roche Laboratories, Basel, Switzerland. Other antimalarial drugs are identified by The Ohio State University (OSU) code numbers (18). New OSU compounds used were OSU207 and OSU255, which have molecular weights of 427.4 and 444.35, respectively.

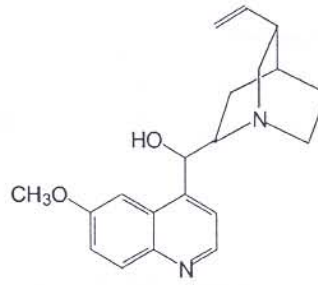
Nucleotide sequence accession numbers. The sequences reported here have been deposited in GenBank under accession numbers AY061860 to AY061873.

RESULTS

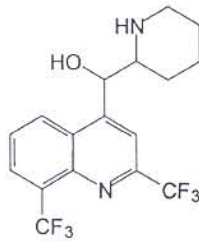
Antimicrobial activities of MFL and OSU compounds. To test if MFL and the OSU compounds specifically target the F₀F₁ ATPase of *S. pneumoniae*, their MICs for OPT-resistant (Opt^r) and QIN-resistant (Qin^r) strains were determined (Table 1). The chemical structures of these compounds are shown in Fig. 1. The strains used were R6 mutants with defined point mutations in *atpC* and were selected according to either their OPT resistance (strains MJ11 and MJ2) (6) or QIN resistance (strains MJQ3 and MJQ4) (24). Susceptible strains used as controls were R6, ATCC 6303, and ATCC 49619. MFL and the OSU compounds were 1.2- to 10-fold more active than OPT and 40- to >300-fold more active than QIN in inhibiting the growth of the last three *S. pneumoniae* strains. When the MICs for R6 were compared to those for the MJ2, MJ11, MJQ3, and MJQ4 mutants, significant increases (variations of two or more times the MIC) in the levels of resistance to MFL, OSU8, and



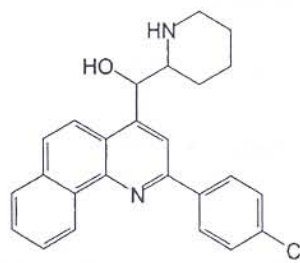
Optochin



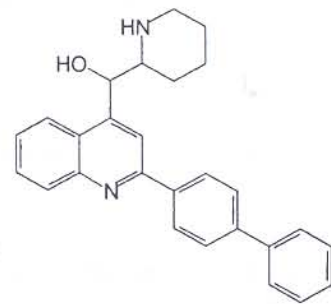
Quinine



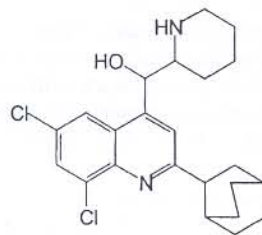
Mefloquine



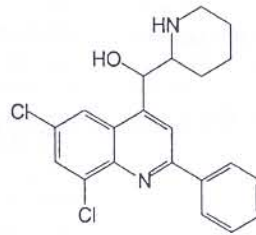
OSU 8



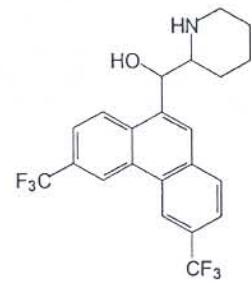
OSU 95



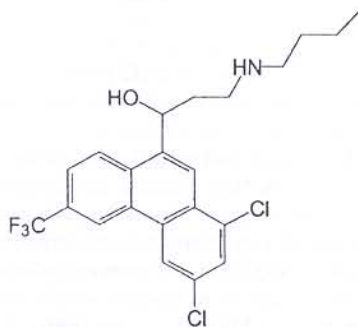
OSU 99



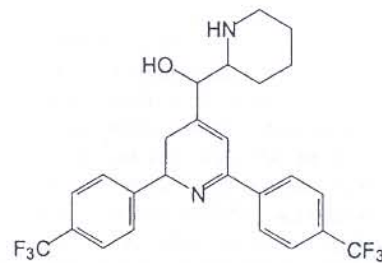
OSU 199



OSU 207



OSU 255



OSU 259

FIG. 1. Chemical structures of the amino alcohol antimalarial agents used in this study.

TABLE 2. Mutational substitutions of the *c* and *a* subunits of *S. pneumoniae* strains resistant to amino alcohol antimalarial agents

Strain	Amino acid change (codon change) from the R6 amino acid sequence ^a			
	<i>c</i> subunit		<i>a</i> subunit	
	α helix 1	α helix 2	α helix 5	α helix 6
R6	¹³ MGVSVGE <u>GLLMN</u> ²⁴	⁴⁴ MFLGVAFIEGTFV ⁵⁷	¹⁷⁸ GEVMTSLLLL ¹⁸⁷	²⁰⁵ AWTAFSVFIS ²¹⁴
MJ11		A49T (GCC→ACC)		
MJ2		V48L (GTT→CTT)		
MJQ3	M23I (ATG→ATA)			
MJQ4	G20A (GGT→GCT)			
MJM3				W206G (TGG→GGG)
MJM5	G14S (GGC→AGC)			
MJM6				S214P (TCC→CCC)
MJM7		V57L (GTA→CTA)		
MJM8	M13T (ATG→ACG)			
MJM9		M44V (ATG→GTG)		
MJM10	M23I (ATG→ATT)			
MJM11				F209S (TTT→TCT)
MJM13	N24Y (AAT→TAT)			
MJM14	G20A (GGT→GCT)			
MJM15		G47A (GGT→GCT)		
MJM21			L186P (CTT→CCT)	
MJM22				W206C (TGG→TGT)

^a The amino acid positions indicated refer to the coordinates for *S. pneumoniae* R6 (GenBank accession no. Z26851) (see reference 6). Residues that changed in the mutant strains indicated are shown in boldface. The E residues possibly involved in proton translocation are showed underlined in the α helices of the *c* subunit.

OSU199 were observed for strains MJQ3 and MJQ4; and strain MJQ3 also showed a 15-fold increase in its level of resistance to OSU199 and OSU207. However, strain MJ2 showed an increased level of resistance only to MFL and OSU207, whereas there was no difference in the resistance of strain MJ11 to any of the compounds assayed. None of the mutant strains had increased levels of resistance to OSU compounds 95, 99, 255, and 259 (Table 1). These results together suggest that the *c* subunit of the F_0 complex of the F_0F_1 ATPase is the target for MFL and OSU compounds 8, 199, and 207 and that for each mutant there is a characteristic pattern of inhibition by the various compounds.

Characterization of Mfl^r *S. pneumoniae* strains. Mfl^r strains were obtained by plating 2×10^{10} R6 cells in 0.3 μ g of MFL per ml (twofold the MIC). One isolate, designated isolate MJM1, was obtained. The *atpC* and *atpA* genes of this strain were amplified by PCR with oligonucleotides atporf1 and atpB56 and sequenced. A single mutation was observed in *atpA*; i.e., a TTT codon in strain R6 was changed to a TCT codon, which would produce an F209S change in the predicted amino acid sequence of the *a* subunit of the MJM1 F_0F_1 ATPase (data not shown). To provide genetic evidence that this change was indeed involved in MFL resistance, the PCR product obtained from strain MJM1 DNA carrying *atpCA* was used to transform competent R6 cells, and the same PCR product, but from R6 DNA, was used as a control. As expected, the PCR product from strain MJM1 transformed R6 to MFL resistance with a high degree of efficiency (greater than 10^5 transformants/ml). However, the R6 PCR product was also able to transform R6 to MFL resistance, although at a much lower efficiency (10^3 transformants/ml). Two colonies selected from the R6 transformation with the MJM1 PCR product were found to carry the F209S amino acid change in the *a* subunit, indicating that this mutation is indeed involved in MFL resistance. One of these transformants was named MJM11 (Table

2) and was used for further studies. Several colonies were selected from cultures of isolates used in the transformation experiment with the R6 PCR product, and the sequences of their *atpCA* genes were determined. These strains carried point mutations either in the *atpC* gene (strains MJM5, MJM7, MJM8, MJM9, MJM10, MJM13, MJM14, and MJM15) or in the *atpA* gene (strains MJM3, MJM6, MJM11, MJM21, and MJM22) (Table 2). Genetic evidence showing that the mutations carried by these strains were indeed involved in resistance was obtained by genetic transformation. The PCR products carrying those mutations were able to transform MFL-susceptible (Mfl^s) strain R6 to MFL resistance with a high degree of efficiency (greater than 10^5 transformants/ml). With the exception of strains MJM10 and MJM14, which had amino acid substitutions identical to those in MJQ3 and MJQ4, respectively, the susceptibilities of these strains to MFL and the OSU compounds were analyzed. The MICs of MFL for mutant strains selected for resistance to MFL were significantly increased (from 4- to 64-fold), as were the MICs of OSU199 (4- to 64-fold). All strains except MJM7 had increased levels of resistance to OPT (4- to 32-fold); and all strains except MJM6, MJM8, and MJM11 had increased levels of resistance to QIN (4- to 8-fold) (Table 1).

The appearance of Mfl^r colonies in the transformation with the 1,277-bp PCR product carrying the R6 *atpCA* genes might be attributed to the error rate of the polymerase. This rate is of 1 error/10 kbp; therefore, one error in 10 molecules of 1 kb would be expected. From our results, about 1% (10^{-2}) of the putative nucleotide changes would result in a residue change that confers MFL resistance. Since 9×10^6 cells were used in the transformation experiments, the expected number of clones with mutations for MFL resistance would be 9×10^3 , a figure consistent with the results obtained. Furthermore, when a 1,158-bp fragment of an unrelated gene (*parE*, coding for the ParE subunit of DNA topoisomerase IV) was amplified and

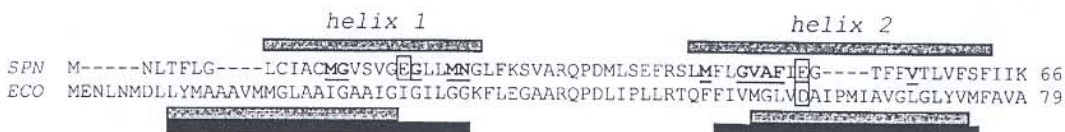
c subunit**a subunit**

FIG. 2. Comparisons of the amino acid sequences and secondary structures of the *c* and *a* subunits of *S. pneumoniae* (SPN) and *E. coli* (ECO). The predicted α helices are shown above the sequence for *S. pneumoniae* and below the sequence for *E. coli*; gray bars indicate predictions made by the PHD method and solid bars indicate predictions made according to Miller et al. (22) (for the *c* subunit) or Valiyaveetil and Fillingame (35) (for the *a* subunit). Residues mutated in the resistant pneumococcal strains are shown in boldface and are underlined. Residues of the *E. coli* *a* subunit involved in interactions with the *c* subunit (11) are shown in boldface and are double underlined. Residues involved in proton translocation in *E. coli* and the equivalent residues in *S. pneumoniae* are boxed.

used in transformation experiments, the frequency of Mfl^r colonies was equivalent to that obtained in the control experiment with no DNA (no colonies appeared in 0.1 ml of the transformation mixture, which gives a frequency of less than 10 transformants/ml). In addition, similar numbers (5×10^2 transformants/ml) of Mfl^r colonies were observed when a proofreading enzyme was used in the amplification of the *atpCA* genes, and no Mfl^r colonies appeared when *parE* was amplified with this enzyme.

Characteristics of the mutations affecting the *c* and *a* subunits of *S. pneumoniae* F₀F₁ ATPase. Predictions of the secondary structures of the *c* and *a* subunits were made by the PHD method (29–31) by using a server available over the Internet (<http://www.embl-heidelberg.de>). Those calculations predicted two transmembrane α helices for the *c* subunits and

six transmembrane α helices for the *a* subunits of *S. pneumoniae* and *E. coli* (Fig. 2). Among the 13 Mfl^r strains obtained by selection with MFL (named MJMX, where the second M represents MFL; Table 2), 8 carried mutations in *atpC* and 5 carried mutations in *atpA*. All amino acid residues that changed in the Mfl^r stains were located in a predicted transmembrane α helix (Table 2; Fig. 2). Five strains showed changes in helix 1 in the *c* subunit, and three showed changes in helix 2 in the *c* subunit, while the changes in the *a* subunit were at residues located in helix 5 (one strain) and helix 6 (four strains).

Inhibition of F₀F₁ATPase by MFL and OSU compounds. Biochemical evidence for the targeting of the F₀F₁ ATPase by MFL and related compounds was obtained by testing the inhibition of the ATPase activities of membranes obtained from

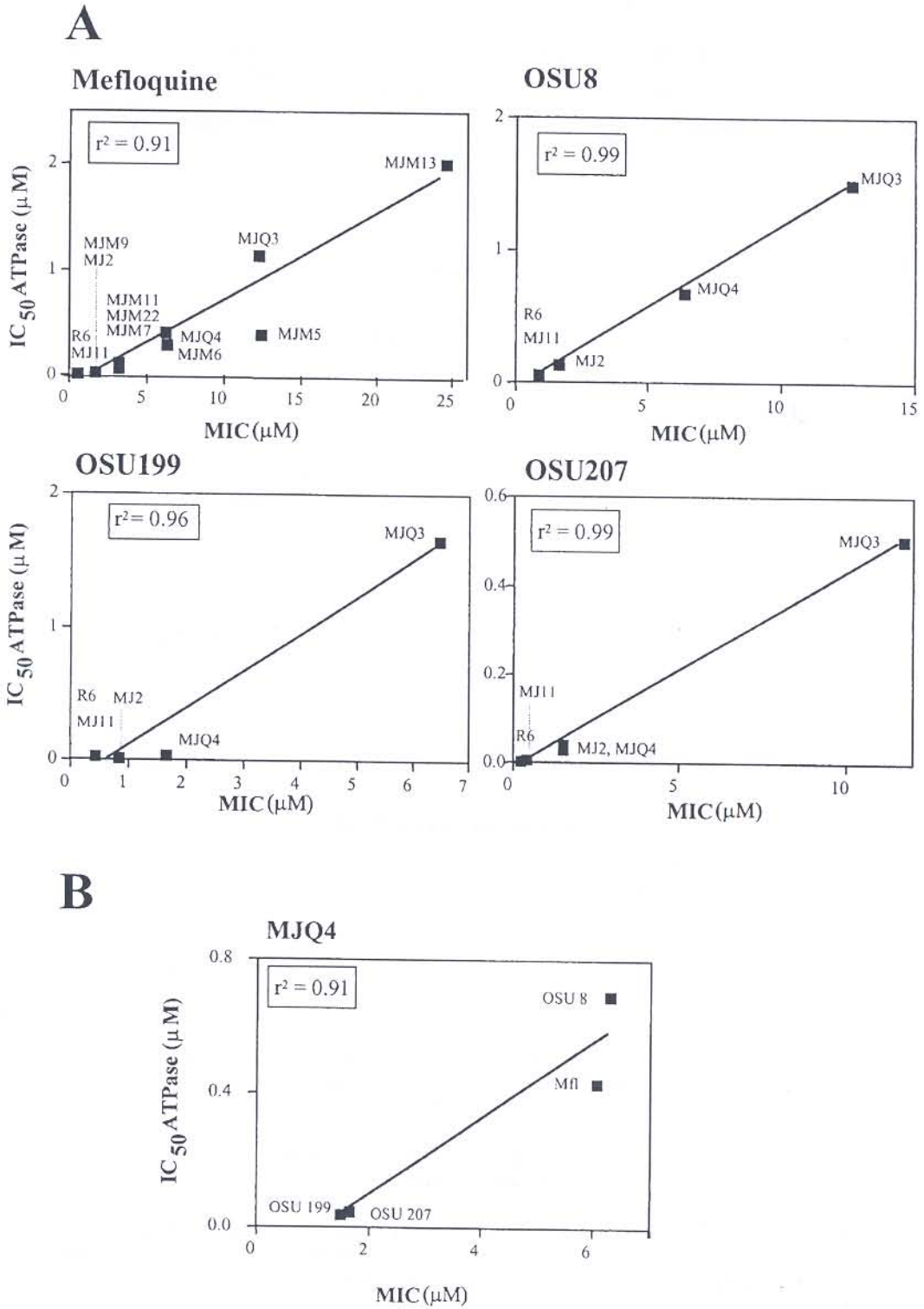


FIG. 3. Correlations between inhibition of ATPase activity and inhibition of growth of the membranes of the indicated strains by MFL and the OSU compounds (A) and inhibition of growth of the membrane of MJQ4 by the different compounds (B).

strain R6 and the mutant strains. All compounds inhibited the R6 ATPase activity, including those compounds (OSU95, OSU99, OSU255, and OSU259) that inhibited the growth of both sensitive and resistant strains (Table 1). The levels of inhibition of the ATPase activities of the strains by MFL, OSU8, OSU199, and OSU207 (IC_{50} values) showed good correlations with their MICs (Fig. 3A), indicating that the primary target for these compounds in the cell is the membrane ATPase. A good correlation was also obtained when the IC_{50} s of the different compounds were plotted against the MICs for strain MJQ4, a strain that showed intermediate sensitivities to most of the compounds tested (Fig. 3B), indicating that all compounds share the same target in the cell.

DISCUSSION

Combined genetic and biochemical studies support a hairpinlike structure for the *c* subunit, with two α helices that transverse the membrane in an antiparallel fashion and that are separated by a conserved polar loop region that forms the F_1 binding region (14). The Mfl^r pneumococcal strains had point mutations that change the amino acid residues located in one of the two transmembrane α helices of the *c* subunit at positions close to the two acidic residues E19 and E52 (Table 2; Fig. 2). Although previously characterized Opt^r strains, selected according to their OPT resistance (strains MJ2 and MJ11), had mutations in helix 1 (6) and strains selected according to their QIN resistance (strains MJQ3 and MJQ4) had mutations in helix 2 (24), the strains selected according to their MFL resistance had mutations in either helix 1 or helix 2 (Table 2; Fig. 2). However, independently of the compound used for mutant selection, cross-resistance to those three antimalarial agents was observed (Table 1; Fig. 2 and 3), suggesting that these chemically similar drugs interact with the *c* subunit in the same region of the protein, the ion-binding pocket. In the *E. coli* pocket, the D61 side chain is positioned within a four-helix bundle formed by the front and back faces of two adjacent monomers, with D61 of helix 2 of one monomer packing in close proximity to residues A24 and I28 of helix 1 and with A62 of helix 2 of the neighboring monomer (5, 13) being in a cavity created by the absence of side chains at residues G23, G27, and G58 (8). Interestingly, two of the *S. pneumoniae*-resistant strains (strains MJ11 and MJM5) had amino acid changes at positions equivalent to G23 and G58 of *E. coli* (Table 2; Fig. 2), and G-to-A changes are found in strains MJQ4 and MJM15. All these results suggest a structure for the oligomeric subunit *c* ring of *S. pneumoniae* compatible with that of *E. coli*. However, whereas the *E. coli* *c* subunit has only one carboxyl group (D61 of α helix 2), the *S. pneumoniae* *c* subunit has two carboxyl groups, one each in a centered position in each α helix (residues E19 and E52, equivalent to residues I28 and D61, respectively, of *E. coli*), suggesting that both carboxylic groups would be involved in proton translocation. In agreement with this hypothesis, functional ATPases from *E. coli* mutants in which the essential carboxyl group of the *c* subunit has been switched to position 24 of helix 1 (equivalent to V15 of *S. pneumoniae*) (22) or in which a second carboxyl group has been introduced at position 28 (equivalent to E19 of *S. pneumoniae*) (12) have been described.

In addition to mutations in the *c* subunit, five of the Mfl^r

strains carried mutations in two α helices of the *a* subunit: position L186 of the penultimate helix and positions W206, F209, and S214 of the ultimate helix (Fig. 2). These two helices are also present in the *E. coli* *a* subunit (Fig. 2). Studies of cysteine cross-linking (11) and nuclear magnetic resonance analysis (28) have established that helix 2 of subunit *c* makes contact with the penultimate helix of subunit *a* (Fig. 2), with residues S207, N214, A217, I221, I223, L224, and I225 lying in one face of the transmembrane helix. These residues then interact with helix 2 of subunit *c*. This proximity of the helices supports the possibility of an interaction between residue R210 of the *a* subunit and residue D61 of the *c* subunit during proton translocation. The location of the L186P change in *S. pneumoniae* MJM21 is in accordance with this model of the F_0 complex of *E. coli*.

Four residue changes present in the resistant *S. pneumoniae* strains are located in the last helix of subunit *a* (Fig. 2), suggesting an interaction between this helix of the *a* subunit and any of the helices of the *c* subunit. Although no cross-link formation has been observed between helix 1 of the *E. coli* subunit *c* and the last helix of subunit *a* (11), a mutant strain with an H245D substitution showed a 45% reduction of normal proton translocation activity (3), and structural studies have defined one hydrophilic pathway between R210 of the *E. coli* *a* subunit and the periplasmic surface, including residues N238, H245, and Q252 of the last helix of this protein (11).

The location and nature of the amino acid changes found in the *c* subunit of the R6 descendants reported here are in accordance with those observed in pneumococcal Opt^r clinical isolates, which showed G20S, M23I, A49T, V48F, and F50L changes (6, 27). In addition, a change in the *a* subunit (W206S) that corresponds to that found in strain MJM3 has also been recently reported in a clinical isolate of *S. pneumoniae* (27).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank E. García for critical reading of the manuscript. The technical assistance of A. Rodríguez-Bernabé is acknowledged.

A.J.M.-G. received a fellowship from Comunidad Autónoma de Madrid. This study was supported by grant 1274/01 from Instituto de Salud Carlos III.

REFERENCES

1. Abrahams, J. P., A. G. W. Leslie, and J. E. Walker. 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F_1 -ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370:621-628.
2. Bender, G., S. Sutton, and R. Marquis. 1986. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect. Immun.* 53:331-338.
3. Cain, B. D., and R. D. Simoni. 1988. Interaction between Glu-219 and His-245 within the *a* subunit of F_1F_0 -ATPase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263:6606-6612.
4. Chen, D. K., A. McGeer, J. C. de Azavedo, and D. E. Low. 1999. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *N. Engl. J. Med.* 341:233-239.
5. Dmitrev, O. Y., P. C. Jones, and R. H. Fillingame. 1999. Structure of the subunit *c* oligomer in the F_1F_0 ATP synthase: model derived from solution structure of the monomer and cross-linking in the native enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7785-7790.
6. Fenoll, A., R. Muñoz, E. García, and A. G. de la Campa. 1994. Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F_0 complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H^+ -ATPases. *Mol. Microbiol.* 12:587-598.
7. Futai, M., T. Noumi, and M. Maeda. 1989. ATP synthase (H^+ -ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu. Rev. Biochem.* 58:111-136.
8. Girvin, M. E., V. K. Rastogi, F. Abrildgaard, J. L. Markley, and R. H. Fillingame. 1998. Solution structure of the transmembrane H^+ -translocating subunit *c* of the F_1F_0 ATP synthase. *Biochemistry* 37:8817-8824.

9. González, L., M. Georgiou, F. Alcaide, D. Balas, J. Liñares, and A. G. de la Campa. 1998. Fluoroquinolone resistance mutations in the *parC*, *parE*, and *gyrA* genes of clinical isolates of viridans group streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2792-2798.
10. Hoffman, J., M. S. Cetron, M. M. Farley, W. S. Baughman, R. R. Facklam, J. A. Elliot, K. A. Deaver, and R. F. Breiman. 1995. The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. *N. Engl. J. Med.* **333**:481-486.
11. Jiang, W., and R. H. Fillingame. 1998. Interacting helical faces of subunits *a* and *c* in the F_1F_0 ATP synthase of *Escherichia coli* defined by disulfide cross-linking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6607-6612.
12. Jones, P. C. 2001. Introduction of a carboxyl group in the first transmembrane helix of *Escherichia coli* F_1F_0 ATPase subunit *c* and cytoplasmic pH regulation. *J. Bacteriol.* **183**:1524-1530.
13. Jones, P. C., W. Jiang, and R. H. Fillingame. 1998. Arrangement of the multicopy H^+ -translocating subunit *c* in the membrane sector of the *Escherichia coli* F_1F_0 ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **273**:1718-1785.
14. Kakinuma, Y. 1998. Inorganic cation transport and energy transduction in *Enterococcus hirae* and other streptococci. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1021-1045.
15. Kobayashi, H., T. Suzuki, N. Kinoshita, and T. Unemoto. 1984. Amplification of the *Streptococcus faecalis* proton-translocating ATPase by a decrease in cytoplasmic pH. *J. Bacteriol.* **158**:1157-1160.
16. Kobayashi, H., T. Suzuki, and T. Unemoto. 1986. Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **261**:627-630.
17. Koebmann, B. J., D. Nilsson, O. P. Kuipers, and P. R. Jensen. 2000. The membrane-bound H^+ -ATPase complex is essential for growth of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **182**:4738-4743.
18. Kullen, M. J., and T. R. Klaenhammer. 1999. Identification of the pH-inducible, proton-translocating F_1F_0 -ATPase (*atpBEFHAGDC*) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. *Mol. Microbiol.* **33**:1152-1161.
19. Kunin, C. M., and W. Y. Ellis. 2000. Antimicrobial activities of mefloquine and a series of related compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:848-852.
20. Liñares, J., A. G. de la Campa, and R. Pallarés. 1999. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *N. Engl. J. Med.* **341**:1546-1548.
21. Martín-Galiano, A. J., M. J. Ferrándiz, and A. G. de la Campa. 2001. The promoter of the operon encoding the $F_0F_1 H^+$ -ATPase of *Streptococcus pneumoniae* is inducible by pH. *Mol. Microbiol.* **6**:1327-1338.
22. Miller, M. J., M. Oldenburg, and R. H. Fillingame. 1990. The essential carboxyl group in subunit *c* of the F_1F_0 ATP synthase can be moved and H^+ -translocation retained. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:4900-4904.
23. Moore, H. F., and A. M. Chesney. 1917. A study of ethylhydrocupreïn (optochin) in the treatment of acute lobar pneumonia. *Arch. Intern. Med.* **19**:611-682.
24. Muñoz, R., E. García, and A. G. de la Campa. 1996. Quinine specifically inhibits the proteolipid subunit of the $F_0F_1 H^+$ -ATPase of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **178**:2455-2458.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
26. Pallarés, R., J. Liñares, M. Vadillo, C. Cabellos, F. Manresa, P. F. Viladrich, R. Martín, and F. Gudiol. 1995. Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona, Spain. *N. Engl. J. Med.* **333**:474-480.
27. Pikis, A., J. M. Campos, W. J. Rodriguez, and J. M. Keith. 2001. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance, and clinical implications. *J. Infect. Dis.* **184**:582-590.
28. Rastogi, V. K., and M. E. Girvin. 1999. Structural changes linked to proton translocation by subunit *c* of the ATP synthase. *Nature* **402**:263-268.
29. Rost, B. 1996. PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol.* **266**:525-539.
30. Rost, B., P. Fariselli, and R. Casadio. 1996. Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci.* **5**:1704-1718.
31. Rost, B., and C. Sander. 1993. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* **232**:584-599.
32. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
33. Stock, D., A. G. W. Leslie, and J. E. Walker. 1999. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**:1700-1705.
34. Tomasz, A. 1970. Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirement for protein synthesis during induction of competence. *J. Bacteriol.* **101**:860-871.
35. Valiyaveetil, F. I., and R. H. Fillingame. 1998. Transmembrane topography of subunit *ain* the *Escherichia coli* F_1F_0 ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **273**:16241-16247.

High-Efficiency Generation of Antibiotic-Resistant Strains of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and Transformation

Antonio J. Martín-Galiano and Adela G. de la Campa*

Unidad de Genética Bacteriana (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

Received 8 November 2002/Returned for modification 2 January 2003/Accepted 21 January 2003

We designed a method by which to generate antibiotic-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* at frequencies 4 orders of magnitude greater than the spontaneous mutation rate. The method is based on the natural ability of this organism to be genetically transformed with PCR products carrying sequences homologous to its chromosome. The genes encoding the targets of ciprofloxacin (*parC*, encoding the ParC subunit of DNA topoisomerase IV), rifampin (*rpoB*, encoding the β subunit of RNA polymerase), and streptomycin (*rpsL*, encoding the S12 ribosomal protein) from susceptible laboratory strain R6 were amplified by PCR and used to transform the same strain. Resistant mutants were obtained with a frequency of 10^{-4} to 10^{-5} , depending on the fidelity of the DNA polymerase sequence used for PCR amplifications. Ciprofloxacin-resistant mutants, for which the MICs were four- to eightfold higher than that for R6, carried a single mutation of a residue in the quinolone resistance-determining region: S79 (change to A, F, or Y) or D83 (change to N or V). Rifampin-resistant strains, for which the MICs were at least 133-fold higher than that for R6, contained a single mutation within cluster I of *rpoB*: S482 (change to P), Q486 (change to L), D489 (change to V), or H499 (change to L or Y). Streptomycin-resistant mutants, for which the MICs were at least 64-fold higher than that for R6, carried a mutation at either K56 (change to I, R, or T) or K101 (change to E). PCR products obtained from the mutants were able to transform R6 to resistance with high efficiency ($>10^4$). This method could be used to efficiently obtain resistant mutants for any drug whose target is known.

Fn* The pneumococcus *Streptococcus pneumoniae* is the human pathogen responsible for most community-acquired pneumonia, meningitis, and otitis media, causing about three million deaths annually in children in developing parts of the world (15). Since the 1990s, the number of pneumococcal clinical isolates resistant to the major therapeutic drugs, including new ones such as the fluoroquinolones (5, 27), has been increasing worldwide (9, 18, 33) and is becoming a major problem for public health. In this scenario, studies on the mechanisms involved in antibiotic resistance are of primary importance. These studies rely mainly on the identification of antibiotic targets by locating the mutations involved in resistance and on biochemical studies of inhibition mechanisms. A significant advance in this direction has been the determination of the complete genome sequences of laboratory pneumococcal strain R6 (19) and a serotype 4 isolate (40) and most of that of a serotype 19F isolate (7). Deciphering the role of these genomic sequences entails the generation of a large amount of theoretical information that must be corroborated experimentally by molecular biology. However, molecular methods for *S. pneumoniae* are still limited (22) despite its clinical significance. On the other hand, it is well known that *S. pneumoniae* is a naturally competent bacterium and methods for its transformation under laboratory conditions have been developed. The state of competence is a process dependent on cell density

AQ: A

AQ: B

triggered by the accumulation in the medium of the competence-stimulating peptide that signals the two-component ComD-ComE system (16, 35), which results in the transcriptional activation of a competence-specific sigma factor (26). This factor enables transcription of the late competence genes that encode enzymes for the binding, uptake, and recombination of the donor DNA with the chromosome (3, 24, 36).

We have recently obtained several mefloquine-resistant pneumococcal mutants by using PCR amplification of fragments of the genes *atpC* and *atpA*, which encode the *c* and *a* subunits of the F_0F_1 ATPase, respectively (10, 29). Transformation with these PCR products obtained from strain R6 and selection of transformants in inhibitory mefloquine concentrations rendered mutants at a frequency several orders of magnitude greater than the spontaneous mutation rate. The information provided by the new mutants has significantly contributed to our understanding of the arrangement of the F_0F_1 ATPase (28). It was proposed that those mutants originated as a result of the error rate of the DNA polymerase used in the PCR amplifications (28). In this work, we present evidence supporting this hypothesis and that the method is useful for obtaining *S. pneumoniae* mutants at high frequency with mutations in at least three genes, *parC*, *rpoB*, and *rpsL*, known to be targets of ciprofloxacin (CIP) (20, 30, 34, 39), rifampin (RIF) (8, 32), and streptomycin (STR) (37), respectively.

While this report was in preparation, a PCR-based approach to drug target identification in *S. pneumoniae* was published (2). Although PCR methodology and the natural transformability of the pneumococcus are the bases of both studies, our work has been focused on the generation and characterization of antibiotic-resistant pneumococcal transformants.

* Corresponding author. Mailing address: Unidad de Genética Bacteriana (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain. Phone: 34 915097057. Fax: 34 915097919. E-mail: agcampa@isciii.es.

TABLE 1. Oligonucleotides used in this work

Name	Sequence (5'-3')	Nucleotide (amino acid) positions*
parCUP	GAACACGCCCTAGATACTGTG	-103 to -83 of <i>parC</i>
parC50	AAGGATAGCAATACTTT	147-163 of <i>parC</i> (⁵⁰ KDSNTF ⁵⁵)
parC152	GTTGGTTCTTTCTCCGTATCG	Complementary to 456-438 of <i>parC</i> (¹⁴⁷ DTEKEP ¹⁵²)
parC503R	GCCTTGGTCACGCTGACGTAGG	Complementary to 1526-1505 of <i>parC</i> (⁵⁰² TYVSVTKA ⁵⁰⁹)
rpoB227	GCGAATTGGTTCGCAACACTG	680-700 of <i>rpoB</i> (²²⁷ ELVRNT ²³³)
rpoB427	CGGTTGGTGAATTGCTTGCCAACCC	1282-1306 of <i>rpoB</i> (⁴²⁷ AVGELLAN ⁴³⁵)
rpoB554R	CAAGTGCCGTAAGATGCAAG	Complementary to 1641-1662 of <i>rpoB</i> (⁵⁴⁸ LSSYGHL ⁵⁵⁴)
rpoB773R	GTCATGTAGGCAACGATTGGG	Complementary to 2322-2301 of <i>rpoB</i> (⁷⁶⁸ PIVAYMT ⁷⁷⁴)
rpsLUP	GGGCTAGTAGAAGTAGTTGGC	320-300 of spr0247 (¹⁰¹ PTTSTSP ¹⁰⁷)
rpsL6	CCAATTGGTTCGCAAACCCGC	15-35 of <i>rpsL</i> (⁶ QLVRKPR ¹²)
rpsL131R	CCGTATTTAGAACGGCCTTG	Complementary to 392-373 of <i>rpsL</i> (¹²⁵ OGRSKYG ¹³¹)
rpsLDOWN	CGGAAGTGTGCGAATGCACGG	Complementary to 443-426 of <i>rpsG</i> (¹⁴³ RMAEANR ¹⁴⁹)

* Nucleotide and amino acid numbering refers to the genes and proteins obtained from the *S. pneumoniae* R6 sequence, with the first nucleotide or amino acid at position 1.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth and transformation of bacteria. The *S. pneumoniae* strains used in this study were laboratory strain R6, ATCC 49619, STR-resistant (*Str*^r) strain 533 (*str-41 sul nov-1 ery*), and CIP-resistant (*Cip*^r) clinical isolate 4114. *S. pneumoniae* was grown in a casein hydrolysate-based medium with 0.2% sucrose (AGCH) as the energy source and transformed as previously described (23). Strain R6 was used as the recipient in transformation experiments. Cultures containing 9×10^6 CFU per ml were treated with DNA at 0.15 µg/ml for 40 min at 30°C and then at 37°C for 90 min before plating on medium plates containing 2 µg of CIP per ml, 1 µg of RIF per ml, or 100 µg of STR per ml. Colonies were counted after 24 h of growth at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in AGCH medium with 1% agar. Rates of spontaneous mutation to drug resistance were estimated by plating 2×10^{10} cells in 1 µg of RIF per ml or 100 µg of STR per ml.

DNA techniques. *S. pneumoniae* chromosomal DNA was prepared as previously described (14). Synthetic oligonucleotide primers used in PCR amplifications and in sequencing reactions are listed in Table 1 and were designed on the basis of the previously published sequences of the corresponding genes of strain R6 (11, 19, 30). Amplifications were performed with 1 U of *Thermus thermophilus* (*Tth*) thermostable DNA polymerase (Biotools) or 2.5 U of a proofreading enzyme, the Expand High Fidelity PCR system (Hf; Boehringer Mannheim), 1 µg of genomic DNA, the corresponding synthetic oligonucleotide primers at 0.4 µM each, 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate, and 2 mM MgCl₂ in a final volume of 50 µl. Amplification was carried out with an initial cycle of 1 min of denaturation at 94°C; 30 cycles of 30 s at 94°C, 90 s at 55°C, and a 75-s polymerase extension step at 72°C; and a final 8-min step, followed by slow cooling to 4°C. The remaining deoxynucleoside triphosphates and primers were removed from PCR products with HR S-400 columns (Amersham) prior to sequencing or transformation. Sequencing was done on both DNA strands with an Applied Biosystems Prism 377 DNA sequencer in accordance with the manufacturer's protocols.

MIC determination. MICs were determined by the microdilution method with cation-adjusted Mueller-Hinton broth (Difco) supplemented with 2.5% lysed horse blood as recommended by the NCCLS (31). Mueller-Hinton agar plates (Difco) supplemented with 5% defibrinated sheep blood were used to grow the strains overnight. The inoculum was prepared by suspension of several colonies in Mueller-Hinton broth and adjusting the turbidity to a 0.5 McFarland standard (ca. 10⁸ CFU/ml). The suspension was further diluted to provide a final bacterial concentration of 10⁴ CFU/ml in each well of the microdilution trays. Plates were covered with plastic tape and incubated in ambient atmosphere at 37°C for 20 to 24 h. The MIC was defined as the lowest concentration of a drug that inhibited visible growth. *S. pneumoniae* strains ATCC 49619 and R6 were used for quality control. CIP was kindly provided by Bayer (Barcelona, Spain), whereas RIF and STR were purchased from Sigma.

RESULTS

Construction of resistant strains by PCR and transformation. Fragments of about 1,600 bp were amplified by PCR from *S. pneumoniae* R6 by using the specific oligonucleotides parCUP and parC503R for *parC*, rpoB227 and rpoB773R for

rpoB, and rpsLUP and rpsLDOWN for *rpsL* (Table 1 and Fig. 1). The 1,629-bp *parC* PCR fragment has the sequence encoding the first 508 amino acid residues of the 824-residue ParC subunit of DNA topoisomerase IV and includes the quinolone

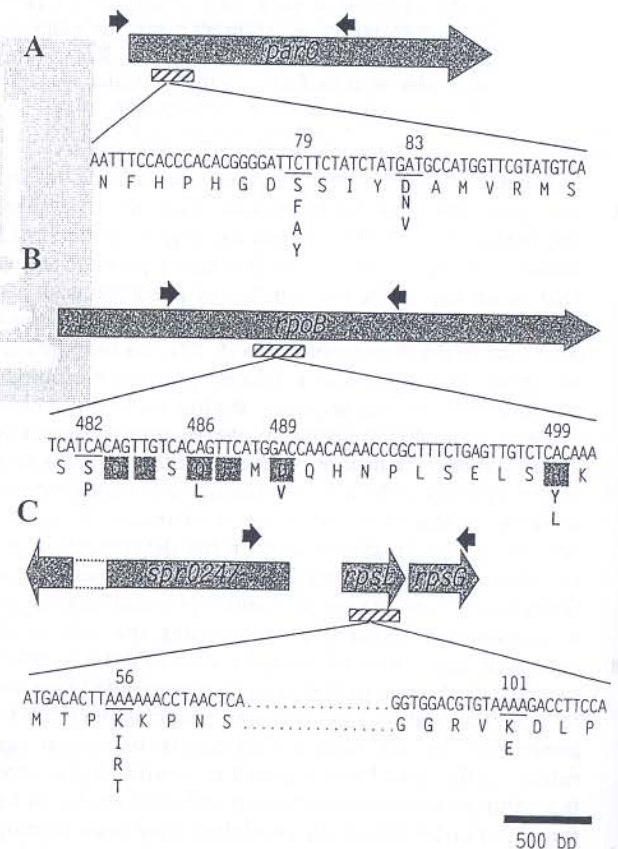


FIG. 1. Locations of the PCR products employed in this work, of the regions sequenced, and of the mutations present in the *Cip*^r (A), *Rif*^r (B), and *Str*^r (C) strains. Black arrows (not drawn to scale) indicate the oligonucleotides used to amplify the fragments of about 1,600 bp used in PCR experiments. Hatched rectangles correspond to the regions that were sequenced to identify the mutations. Amino acid substitutions present in the resistant strains are shown (in boldface) below the wild-type residue positions (underlined).

TABLE 2. Antibiotic-resistant R6 transformants obtained with R6 PCR products

Donor DNA	Enzyme	No. of transformants/ml (transformation frequency, 10 ⁻⁵) selected on ^a :		
		CIP	RIF	STR
<i>parC</i>	<i>Tth</i>	94 ± 21 (1.0)	None	None
	<i>Hf</i>	33 ± 22 (0.4)	None	None
<i>rpoB</i>	<i>Tth</i>	None	1,119 ± 319 (12.4)	None
	<i>Hf</i>	None	580 ± 193 (6.4)	None
<i>rpsL</i>	<i>Tth</i>	None	None	299 ± 88 (3.2)
	<i>Hf</i>	None	None	72 ± 28 (0.8)

^a Samples (0.15 µg) of PCR products carrying the genes indicated were used to transform 1 ml (9 × 10⁶ CFU) of a competent R6 culture. Values (mean ± standard deviation) of three independent experiments are presented. The transformation frequency is the number of transformants divided by the total number of cells. None indicates that no transformants were observed when 300 µl of the transformation mixture was plated on selective plates, which gave a frequency <4 × 10⁻⁷. PCR products used as controls were a *parC* PCR product from *S. pneumoniae* 4114 carrying an S79F change that yielded 2.0 × 10⁴ ± 1.5 × 10⁴ transformants/ml and an *rpsL* PCR product from *S. pneumoniae* 533 (25) carrying a K56R (37) change that yielded 5.8 × 10⁵ ± 2.8 × 10⁵ transformants/ml.

resistance-determining region (QRDR; 30). The 1,641-bp *rpoB* PCR fragment codes for 547 residues (residues 227 to 554) of the central region of the β subunit of the RNA polymerase. The 1,615-bp *rpsL* PCR fragment includes the coding region for the first 320 residues of Spr0247, a putative alkaline amylopullulanase; the *rpsL* gene that encodes the 137-residue-long 30S ribosomal protein S12; and most (149 residues out of 156) of the 30S ribosomal protein S7 encoded by the *rpsG* gene. These R6 PCR-derived fragments were used to transform competent R6 cells, and transformants were selected on CIP at 2 µg/ml (4 times the MIC for R6), RIF at 1 µg/ml (more than 33 times the MIC for R6), or STR at 100 µg/ml (32 times the MIC for R6). These antibiotic concentrations were chosen by taking into account the levels of resistance to these drugs achieved by single mutations in *parC* (30), *rpoB* (8, 32), and *rpsL* (37). The frequencies of resistant mutants obtained by transformation were 1 × 10⁻⁵ to 12.4 × 10⁻⁵ and 0.4 × 10⁻⁵ to 6.4 × 10⁻⁵ when PCR products amplified with the *Tth* and *Hf* enzymes, respectively, were used (Table 2). As a consequence, two- to fourfold more transformants appeared when the *Tth* enzyme was used, which is consistent with the error rate differences (threefold) of these polymerases reported by the manufacturers. Transformants resistant to a particular antimicrobial agent appeared only when the corresponding target gene was present in the PCR product used as the donor DNA, whereas no colonies were detected when other antimicrobial agents were used for selection (Table 2). In this way, transformants resistant to either CIP, RIF, or STR appeared when the PCR products contained *parC*, *rpoB*, or *rpsL*, respectively. The MICs for the mutant strains showed increases in resistance of 4- to 8-fold for CIP, at least 133-fold for RIF, and at least 64-fold for STR (Table 3).

Characterization of antibiotic-resistant strains. Ten resistant mutants for each antibiotic were chosen, and pertinent regions (Fig. 1) of the *parC*, *rpoB*, and *rpsL* genes were sequenced. A region of 310 bp encoding ParC residues 50 to 172 was amplified and sequenced with oligonucleotides parC50 and parC152 (Table 1). The 10 Cip^r strains carried single

mutations affecting residue S79 or D83 of the ParC QRDR (Table 3). A 380-bp region of *rpoB* coding for residues 427 to 554 was amplified and sequenced with oligonucleotides rpoB427 and rpoB554R. The RIF-resistant (Rif^r) strains carried mutations affecting residue S482, Q486, D489, or H499. A 378-bp fragment of *rpsL* encoding residues 6 to 131 of the S12 ribosomal protein from the Str^r strains was also amplified and sequenced with oligonucleotides rpsL6 and rpsL131R, showing mutations that would produce changes at K56 or K101.

Genetic evidence demonstrating that the mutations carried by the resistant strains were indeed involved in resistance was obtained by genetic transformation. PCR products of about 1,600 bp amplified from the Cip^r, Rif^r, and Str^r strains described above were able to transform strain R6 to resistance highly efficiently (0.2 × 10⁵ to 14 × 10⁵ transformants/ml) (Table 3). Two independent colonies from each of these transformation experiments were selected and analyzed. Their MICs and mutations were identical to those of the parental Cip^r, Rif^r, or Str^r strain (not shown). These results confirmed the relationship between amino acid changes and resistance phenotypes.

DISCUSSION

In this report, we describe a simple method by which to obtain antibiotic-resistant strains of *S. pneumoniae* by taking advantage of the PCR method, the error rate of the DNA polymerases used in the amplifications, and the natural transformation ability of *S. pneumoniae*. The appearance of resistant colonies upon transformation with the 1,600-bp PCR products carrying the appropriate R6 genes could be attributed to the error rate of the polymerase. This rate is 1 error/10 kb;

TABLE 3. Characteristics of resistant strains

Drug and strain (no. of clones)	Gene	Amino acid (codon) change ^a	MIC (µg/ml) (fold increase) ^b	No. of transformants/ml (10 ⁴) ^c
CIP				
CMJ1 (4)	<i>parC</i>	S79F (TCT→TIT)	4 (8)	4
CMJ2 (1)	<i>parC</i>	D83N (GAT→AAT)	2 (4)	6
CMJ3 (1)	<i>parC</i>	S79A (TCT→GCT)	2 (4)	10
CMJ4 (2)	<i>parC</i>	S79Y (TCT→TAT)	4 (8)	27
CMJ10 (1)	<i>parC</i>	D83V (GAT→GTT)	2 (4)	2
RIF				
RMJ1 (5)	<i>rpoB</i>	Q486L (CAG→CTG)	16 (>533)	140
RMJ3 (1)	<i>rpoB</i>	H499Y (CAC→TAC)	8 (>266)	13
RMJ4 (1)	<i>rpoB</i>	H499L (CAC→CTC)	16 (>533)	43
RMJ5 (2)	<i>rpoB</i>	S482P (TCA→CCA)	4 (>133)	14
RMJ7 (1)	<i>rpoB</i>	D489V (GAC→GTC)	16 (>533)	48
STR				
SMJ1 (2)	<i>rpsL</i>	K56I (AAA→ATA)	>800 (>256)	16
SMJ2 (6)	<i>rpsL</i>	K56R (AAA→AGA)	>800 (>256)	7
SMJ4 (1)	<i>rpsL</i>	K56T (AAA→ACA)	>800 (>256)	27
SMJ6 (1)	<i>rpsL</i>	K101E (AAA→GAA)	200 (64)	43

^a The amino acid positions of the genes indicated are according to the *S. pneumoniae* R6 genomic sequence. Mutated amino acids are underlined.

^b The MICs shown are averages of four independent determinations. Each value in parentheses is the MIC for the resistant strain divided by the MIC for R6 (0.5 µg of CIP per ml, <0.03 µg of RIF per ml; and 3.12 µg of STR per ml).

^c PCR products carrying parts of the indicated genes from resistant strains were used to transform R6 competent cells. PCR products used as controls were those indicated in Table 2.

therefore, 1.6 errors would be expected for 10 molecules of 1,600 bp. Since 4.5×10^5 competent cells (5% of 9×10^6 CFU) could be transformed with chromosomal DNA in our experiments, the total number of putative mutants would be about 7.2×10^4 . On the basis of our results, of the putative nucleotide changes that would occur in the *parC* PCR fragment (encoding 508 residues of ParC) and in the *rpsL* PCR fragment (encoding 320 residues of Spr0247, 137 residues of RpsL, and 149 residues of RpsG), only changes at two positions conferred CIP resistance (0.4%) or STR resistance (0.3%). However, of the putative nucleotide changes that would occur in the *rpoB* PCR fragment (encoding 547 residues of the β subunit of RNA polymerase), changes at four positions conferred RIF resistance (0.7%) (Table 3). If we introduced these corrections, among 7.2×10^4 putative mutants, the expected numbers of resistant clones would be approximately 3×10^2 Cip^r, 2×10^2 Str^r, and 5×10^2 Rif^r clones. These values are consistent with the numbers of drug-resistant clones (0.9×10^2 Cip^r, 3×10^2 Str^r, and 1×10^2 Rif^r clones) obtained and are also in line with those previously reported for RIF and STR (2) and with the frequencies reported for mefloquine-resistant mutants (28).

The method allowed us to obtain mutants at frequencies several orders of magnitude higher than that of spontaneous mutation. The frequency of mutation to Cip^r, Rif^r, and Str^r in *S. pneumoniae* has been shown to be in the range of 10^{-8} to 10^{-9} (2, 34; our own results), whereas the Cip^r, Rif^r, and Str^r transformation frequencies obtained with the corresponding PCR products were about 10^{-5} , 10^{-4} , and 10^{-5} , respectively (Table 3).

Among the 10 mutants sequenced that were resistant to each antibiotic, 5 different Cip^r, 5 different Rif^r, and 4 different Str^r mutations were obtained. All of the ParC QRDR mutations found in the Cip^r strains obtained in this work had been previously described in laboratory or clinical isolates (1, 6, 20, 30, 34, 39). Although S79F and S79Y have been shown to be involved in resistance by transformation (20, 30, 39), the results presented in this work represent the first evidence that the S79A, D83N, and D83V changes are involved in low-level CIP resistance.

All of the pneumococcal Rif^r strains obtained in this work had mutations in cluster I of *rpoB* (R6 residue positions 478 to 510), a conserved region where most of the bacterial Rif^r mutations map (reference 4 and references cited therein) and also where Rif^r mutations have been characterized in *S. pneumoniae* clinical isolates (8, 32). The Rif^r mutations found in this work were at residues S482, Q486, D489, and H499 (Table 3 and Fig. 1). Structural and biochemical studies of the *Thermus aquaticus* core RNA polymerase have revealed that RIF binds to a pocket of the RNA polymerase β subunit deep within the DNA-RNA channel and blocks the path of the elongating RNA when the transcript becomes two or three nucleotides long. Ten residues of cluster I are directly implicated in the interaction with RIF (4, 41). These residues are identical among *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, and *S. pneumoniae* (six of them are shadowed in Fig. 1). Three of these residues are equivalent to those found to be mutated in Rif^r *S. pneumoniae* that established hydrogen bonds with the antibiotic (Q486, D489, and H499). These results suggest that the binding of RIF to *S. pneumoniae* RNA polymerase is similar in all bacterial enzymes. Accordingly, mutations altering

D489 and H499 have been found in Rif^r *S. pneumoniae* clinical isolates (8, 32) and those altering the Q residue equivalent to *S. pneumoniae* R6 Q486 have been shown to be involved in Rif^r in *E. coli* (21, 38) and *M. tuberculosis* (17). However, no mutations at the residue equivalent to S482 of *S. pneumoniae* have been previously reported in other Rif^r bacteria (reference 4 and references cited therein). This residue does not interact directly with RIF, although it is conserved among bacterial β subunits and is in close proximity to the RIF binding pocket (4). The change of S482 to proline conferred low-level RIF resistance (MIC = 4 μ g/ml) to strain RMJ4 (Table 3) and might affect the folding or packing of the protein in the vicinity of this residue, causing distortions of the RIF binding pocket, as has been proposed for other Rif^r mutations that also map to residues surrounding this pocket (4).

With respect to the Str^r strains, mutations were found at two lysine residues, K56 and K101 (equivalent to K42 and K87 of *E. coli*). These two residues have been shown to be involved in Str^r in *E. coli* (13) and *M. tuberculosis* (reference 12 and references therein), and the K56T change has been shown to be responsible for the Str^r phenotype of *S. pneumoniae* 533 (37).

In summary, with the method described in this work, it was possible to construct Cip^r, Rif^r, and Str^r strains carrying mutations in specific gene regions. The same method might be used to construct all possible mutants resistant to other drugs. It would also be possible to make double mutants by sequential PCR and transformation cycles. Strains resistant to two (or more) antibiotics of the same family can be obtained in this way. The activity of the various antibiotics could be tested in the mutants obtained. This information would be useful in selecting more adequate therapy, ideally with antibiotics not showing cross-resistance.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank E. García for critical reading of the manuscript. The technical assistance of Amaya Aguirre is acknowledged.

A.J.M.-G. is the recipient of a fellowship from the Comunidad Autónoma de Madrid. This study was supported by grant 1274/01 from the Instituto de Salud Carlos III, grant 00/0258 from the Fondo de Investigación Sanitaria, and grant BIO2002-01398 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología.

REFERENCES

- Bast, D. J., D. E. Low, C. Duncan, L. Kilburn, L. A. Mandell, R. J. Davidson, and J. C. S. de Azevedo. 2000. Fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: contributions of type II topoisomerase mutations and efflux to levels of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3049-3054.
- Belanger, A. E., A. Lai, M. A. Brackman, and D. J. LeBlanc. 2002. PCR-based ordered genomic libraries: a new approach to drug target identification for *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2507-2512.
- Campbell, E. A., S. Y. Choi, and H. R. Masure. 1998. A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genome analysis. *Mol. Microbiol.* 27:929-939.
- Campbell, E. A., N. Korzheva, A. Mustaev, K. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb, and S. A. Darst. 2001. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerases. *Cell* 23:901-912.
- Chen, D. K., A. McGeer, J. C. de Azavedo, and D. E. Low. 1999. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *N. Engl. J. Med.* 341:233-239.
- Davies, T. A., G. A. Pankuch, B. E. Dewasse, M. R. Jacobs, and P. C. Appelbaum. 1999. In vitro development of resistance to five quinolones and amoxicillin-clavulanate in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1177-1182.
- Dopazo, J., A. Mendoza, J. Herrero, F. Caldara, Y. Humbert, L. Friedli, M. Guerrier, E. Grand-Schenk, C. Gandin, M. de Francesco, A. Polissi, G.

- Buell, G. Feger, E. García, M. Peitsch, and J. F. García-Bustos. 2001. Annotated draft genomic sequence from a *Streptococcus pneumoniae* type 19F clinical isolate. *Microb. Drug Resist.* 7:99-125.
8. Enright, M., P. Zawadzki, P. Pickerill, and C. G. Dowson. 1998. Molecular evolution of rifampicin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* 4:65-70.
 9. Fenoll, A., I. Jado, D. Vicioso, A. Pérez, and J. Casal. 1998. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990-1996). *J. Clin. Microbiol.* 36:3447-3454.
 10. Fenoll, A., R. Muñoz, E. García, and A. G. de la Campa. 1994. Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F_0 complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H^+ -ATPases. *Mol. Microbiol.* 12:587-598.
 11. Ferrándiz, M. J., A. Fenoll, J. Liñares, and A. G. de la Campa. 2000. Horizontal transfer of *parC* and *gyrA* in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:840-847.
 12. Finken, M., P. Kirschner, A. Meier, A. Wrede, and E. C. Böttger. 1993. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of ribosomal protein S12 and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol. Microbiol.* 9:1239-1246.
 13. Funatsu, G., and H. G. Wittmann. 1972. Location of amino acid replacements in protein S12 isolated from *Escherichia coli* mutants resistant to streptomycin. *J. Mol. Biol.* 68:547-550.
 14. González, I., M. Georgiou, F. Alcaide, D. Balas, J. Liñares, and A. G. de la Campa. 1998. Fluoroquinolone resistance mutations in the *parC*, *parE*, and *gyrA* genes of clinical isolates of viridans group streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2792-2798.
 15. Greenwood, B. 1999. The epidemiology of pneumococcal infection in children in the developing world. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354:777-785.
 16. Hävarstein, L. S., G. Coomaraswamy, and D. A. Morrison. 1995. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11140-11144.
 17. Heep, M., B. Brandstätter, U. Rieger, N. Lehn, E. Richter, S. Rüscher-Gerdes, and S. Nieman. 2001. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampicin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 39:107-110.
 18. Hoffman, J., M. S. Cetron, M. M. Farley, W. S. Baughman, R. R. Facklam, J. A. Elliot, K. A. Deaver, and R. F. Breiman. 1995. The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. *N. Engl. J. Med.* 333:481-486.
 19. Hoskins, J., W. E. Alborn, J. Arnold, L. C. Blaszczak, S. Burgett, B. S. DeHoff, S. T. Estrem, L. Fritz, D. J. Fu, W. Fuller, C. Geringer, R. Gilmour, J. S. Glass, H. Khoja, A. R. Kraft, R. E. Lagace, D. J. LeBlanc, L. N. Lee, E. J. Lefkowitz, J. Lu, P. Matsushima, S. M. McAhren, M. McHenry, K. McLeaster, C. W. Mundy, T. I. Nicas, F. H. Norris, M. O'Gara, R. B. Peery, G. T. Robertson, P. Rockey, P. M. Sun, M. E. Winkler, Y. Yang, M. Young-Bellido, G. Zhao, C. A. Zook, R. H. Baltz, S. R. Jaskunas, P. R. Rosteck, P. L. Skatrud, and J. I. Glass. 2001. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* 183:5709-5717.
 20. Janoir, C., V. Zeller, M.-D. Kitzis, N. J. Moreau, and L. Gutmann. 1996. High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2760-2764.
 21. Jin, D. J., and C. A. Gross. 1988. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* *rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J. Mol. Biol.* 202:45-58.
 22. Lacks, S. 2000. Cloning and expression of pneumococcal genes in *Streptococcus pneumoniae*, p. ●●●-●●●. In A. Tomasz (ed.), *Streptococcus pneumoniae: molecular biology and mechanism of disease*. Mary Ann Liebert, Inc., Larchmont, N.Y.
 23. Lacks, S. A. 1966. Integration efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics* 53:207-235.
 24. Lacks, S. A., S. Ayalew, A. G. de la Campa, and B. Greenberg. 2000. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: expression of *dprA*, a late competence gene encoding a DNA methyltransferase of the *DpnII* restriction system. *Mol. Microbiol.* 35:1089-1098.
 25. Lacks, S. A., and B. Greenberg. 1975. A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA. *J. Biol. Chem.* 250:4060-4066.
 26. Lee, M. S., and D. A. Morrison. 1999. Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J. Bacteriol.* 181:5004-5016.
 27. Liñares, J., A. G. de la Campa, and R. Pallarés. 1999. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *N. Engl. J. Med.* 341:1546-1548.
 28. Martín-Galiano, A. J., B. Gorgojo, C. M. Kunin, and A. G. de la Campa. 2002. Mefloquine and new related compounds target the F_0 complex of the F_0F_1 H^+ -ATPase of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1680-1687.
 29. Martín-Galiano, A. J., M. J. Ferrándiz, and A. G. de la Campa. 2001. The promoter of the operon encoding the F_0F_1 H^+ -ATPase of *Streptococcus pneumoniae* is inducible by pH. *Mol. Microbiol.* 6:1327-1338.
 30. Muñoz, R., and A. G. de la Campa. 1996. ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2252-2257.
 31. NCCLS. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. NCCLS, Villanova, Pa.
 32. Padayachee, T., and K. Klugman. 1999. Molecular basis of rifampin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2361-2365.
 33. Pallarés, R., J. Liñares, M. Vadillo, C. Cabellos, F. Manresa, P. F. Viladrich, R. Martín, and F. Gudiol. 1995. Resistance to penicillin and cephalosporins and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona, Spain. *N. Engl. J. Med.* 333:474-480.
 34. Pan, X.-S., J. Ambler, S. Mehtar, and L. M. Fisher. 1996. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2321-2326.
 35. Pestova, E. V., L. S. Hävarstein, and D. A. Morrison. 1996. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol. Microbiol.* 21:853-862.
 36. Pestova, E. V., and A. D. Morrison. 1998. Isolation and characterization of three *Streptococcus pneumoniae* transformation-specific loci by use of a *lacZ* reporter insertion vector. *J. Bacteriol.* 180:2701-2710.
 37. Salles, C., L. Créancier, J.-P. Claverys, and V. Méjean. 1992. The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 20:6103.
 38. Severinov, K., M. Soushko, A. Goldfarb, and V. Nikiforov. 1993. Rifampicin region revisited: new rifampicin-resistant and streptolydigin-resistant mutants in the β subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 268:14820-14826.
 39. Tankovic, J., B. Perichon, J. Duval, and P. Courvalin. 1996. Contribution of mutations in *gyrA* and *parC* genes to fluoroquinolone resistance of mutants of *Streptococcus pneumoniae* obtained in vivo and in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2505-2510.
 40. Tettelin, H., K. E. Nelson, I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, S. Peterson, J. Heidelberg, R. T. DeBoy, D. H. Haft, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. Gwinn, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, J. D. Peterson, L. A. Umayam, O. White, S. L. Salzberg, M. R. Lewis, D. Radune, E. Holtzapple, H. Khouri, A. M. Wolf, T. R. Utterback, C. L. Hansen, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, S. Angiuoli, T. Dickinson, E. K. Hickey, I. E. Holt, B. J. Loftus, F. Yang, H. O. Smith, J. C. Venter, B. A. Dougherty, D. A. Morrison, S. K. Hollingshead, and C. M. Fraser. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293:498-506.
 41. Zhang, G., E. A. Campbell, L. Minakhin, C. Ritcher, K. Severinov, and S. A. Darst. 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 98:811-824.

AQ: E

