

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



CARACTERIZACIÓN DEL GEN *gyrA* DE *Streptococcus pneumoniae* Y REGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Delia Balas Fuertes

Bajo la dirección de la doctora

Adela González de la Campa

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2006-4

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA II

CARACTERIZACION DEL GEN *gyrA* DE *Streptococcus pneumoniae*
Y REGULACION DE SU EXPRESION

DELIA BALAS FUERTES
MADRID, 2001

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA II

CARACTERIZACION DEL GEN *gyrA* DE *Streptococcus pneumoniae*
Y REGULACION DE SU EXPRESION

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA POR:

DELIA BALAS FUERTES

DIRECTOR:

Dra. ADELA GONZALEZ DE LA CAMPA

CENTRO NACIONAL DE BIOLOGIA FUNDAMENTAL

INSTITUTO DE SALUD CARLOS III

MADRID 2001

A mis padres
A Ramón y a mis hijos, Delia y Ramón

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Adela González de la Campa**, por transmitirme no sólo su entusiasmo por el estudio de la Biología Molecular, sino también por su capacidad de trabajo, su confianza y continuo apoyo en la realización de la presente Tesis Doctoral.

Al **Dr. Jesús Pla Alonso**, Profesor Titular de la Facultad de Farmacia y Tutor de esta Tesis.

Al **Dr. Manuel Espinosa**, por su ayuda y sus valiosos consejos a lo largo de la realización de este trabajo.

A la **Dra. Rosario Muñoz**, cuyo trabajo en este laboratorio nos ha permitido avanzar en el conocimiento de las resistencias a antimicrobianos en neumococo.

A los **Dres. M^a José Ferrándiz, Paulino Gómez y Rosario Bullido, y a Carmen Albo**, por su gran ayuda para resolver los problemas cotidianos, su paciencia, y su gran apoyo moral.

A todos mis compañeros de laboratorio, **Esteban Fernández-Moreira, Javier Martín Galiano, Irene González, Alicia Bernabé, M^a José Saiz, Begoña Gorgojo y Luz Balsalobre**, quienes me han ayudado, no sólo a realizar la presente Tesis Doctoral, sino por haber hecho más agradable el trabajo diario.

A todos los compañeros del Carlos III que he conocido en estos años, por los buenos momentos que hemos compartido.

Al **Instituto de Salud Carlos III**, por la concesión de la Beca de Perfeccionamiento que me ha permitido llevar a cabo la presente Tesis Doctoral.

Finalmente, a mi familia por la comprensión, paciencia y apoyo dispensados en estos años de trabajo.

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
-10Ext	Secuencia promotora –10 extendida
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ADP	Adenosina difosfato
ADPNP	5'-adenilil- β , γ -imidodifosfato
Ap	Ampicilina
Ap ^R	Resistencia a ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Cloramfenicol acetil transferasa
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention”. Centros para Control y Prevención de Enfermedades
Ci	Curio. Unidad de radiactividad correspondiente a $2,2 \times 10^5$ cpm
CI ₅₀	Concentración de antibiótico requerida para reducir la actividad enzimática un 50%
Cm	Cloramfenicol
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Cm ^R	Resistencia a cloramfenicol
Cp	Ciprofloxacina
cpm	Cuentas por minuto
Cp ^R	Resistencia a ciprofloxacina
C-terminal	Extremo carboxi-terminal
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNA CCC	DNA circular cerrado covalente
DNA OC	DNA circular abierto
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
DOC	Deoxicolato sódico
DTNB	Acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
Fqs	Fluoroquinolonas

Girasa	DNA girasa
h	horas
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodalton
Kpb	Kilobase
min	minutos
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
nm	nanometros
nmoles	nanomoles
Nov	Novobiocina
Nov ^R	Resistencia a novobiocina
nt	nucleótido
N-terminal	Extremo amino-terminal
OD	densidad óptica
oligo	oligonucleótido
P	Promotor
pb	pares de bases
PBP _s	“Penicillin Binding Proteins”. Proteínas de Unión a Penicilina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	Fósforo inorgánico
pmoles	picomoles
QRDR	Región Determinante de Resistencia a Quinolonas
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RNA	Acido ribonucleico
RNAP	RNA polimerasa
RST	Estimulación de la transcripción mediada por relajación
SDS	Duodecil sulfato sódico
seg	segundos
Tc	Tetraciclina
Tc ^R	Resistencia a tetraciclina

TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamida
Topo IV	DNA topoisomerasa IV
Tris	Trihidroximetil-aminometano
UFC	Unidades formadoras de colonias
V/cm	Voltios/cm
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. IMPORTANCIA CLINICA DE <i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
1.2. EL PROBLEMA DE LA MULTIRRESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN <i>S. pneumoniae</i>	4
1.3. DNA TOPOISOMERASAS BACTERIANAS	5
1.3.1. DNA Topoisomerasas de tipo I.....	6
1.3.2. DNA Topoisomerasas de tipo II	7
1.3.2.1. DNA girasa.....	7
1.3.2.2. Topoisomerasa IV.	9
1.3.3. Mecanismo de acción de las DNA topoisomerasas de tipo II.....	10
1.3.3.1. Superenrollamiento y relajación.....	12
1.3.3.2. Decatenación	13
1.3.4. Funciones biológicas de las DNA topoisomerasas de tipo II	13
1.3.5. Papel de las DNA topoisomerasas en el control del superenrollamiento del DNA	14
1.4. LAS DNA TOPOISOMERASAS COMO BLANCO DE ACCION DE ANTIMICROBIANOS.....	16
1.4.1. Cumarinas	16
1.4.2. Ciclotialidinas	17
1.4.3. Otros inhibidores de la DNA girasa.....	17
1.4.4. Fluoroquinolonas	18
1.4.4.1. Mecanismo de acción de las fluoroquinolonas	20
1.4.5. La resistencia a fluoroquinolonas en <i>S. pneumoniae</i>	23
1.4.5.1. Alteraciones en el blanco molecular	24
1.4.5.2. Disminución de la concentración intracelular de fluoroquinolonas	27
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAL Y METODOS.....	31
3.1. CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS.....	32
3.2. MEDIOS DE CULTIVO	34

3.3. ENZIMAS Y REACTIVOS.....	35
3.3.1. ENZIMAS.....	35
3.3.2. REACTIVOS.....	35
3.3.2.1. Antibióticos.....	35
3.3.2.2. Productos químicos.....	35
3.3.2.3. Productos radiactivos.....	36
3.3.2.4. Oligonucleótidos.....	36
3.4. CULTIVO DE BACTERIAS Y PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.....	38
3.5. AISLAMIENTO Y MANIPULACION DEL DNA.....	39
3.5.1. Extracción de DNA cromosómico.....	39
3.5.2. Aislamiento y purificación de plásmidos.....	39
3.5.3. Electroforesis.....	39
3.5.4. Hibridación de DNA.....	40
3.5.5. Construcción de plásmidos con deleciones en 5´ de la fusión transcripcional <i>PgyrA-cat</i>	41
3.6. AMPLIFICACION POR PCR, DETERMINACION Y ANALISIS DE LA SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS.....	41
3.7. PURIFICACION Y ANALISIS DE RNA.....	42
3.8. ENSAYO ESPECTROFOTOMETRICO DE ACTIVIDAD CLORAMFENICOL ACETIL TRANSFERASA (CAT).....	43
3.8.1. Preparación de extractos celulares.....	43
3.8.2. Medida de ACTIVIDAD CAT.....	44
3.9. ENSAYO DE ACTIVIDAD CAT EN CAPA FINA.....	44
4. RESULTADOS.....	46
4.1. CARACTERIZACION GENETICA DEL GEN <i>gyrA</i> DE <i>S. pneumoniae</i>	47
4.1.1. Clonación del gen <i>gyrA</i> de <i>S. pneumoniae</i>	47
4.1.2. Secuenciación del gen <i>gyrA</i> de <i>S. pneumoniae</i>	49
4.2. CARACTERIZACION DEL SITIO DE INICIO DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN <i>gyrA</i>	51

4.3. CARACTERIZACION DE UNA CURVATURA INTRINSECA DEL DNA EN LA REGION PROMOTORA DE <i>gyrA</i>	52
4.4. SECUENCIAS IMPLICADAS EN LA TRANSCRIPCION DEL GEN <i>gyrA</i>	55
4.5. CORRELACION ENTRE CURVATURA DEL PROMOTOR DE <i>gyrA</i> Y FUERZA DEL PROMOTOR	59
4.5.1. Ensayo de permutación circular del plásmido pLGYAC126	62
4.6. ESTIMULACION DE LA TRANSCRIPCION DE <i>gyrA</i> POR RELAJACION DEL DNA (RESPUESTA RST)	64
4.6.1. Respuesta RST en <i>S. pneumoniae</i> T4.....	64
4.6.2. Respuesta RST en <i>E. coli</i> C600	68
4.6.3. Respuesta RST en <i>S. pneumoniae</i> T4GyrB ^R	70
4.6.4. Respuesta RST en <i>S. pneumoniae</i> T4ParC ^R	71
4.7. ANALISIS DEL SUPERENROLLAMIENTO DEL DNA PLASMIDICO	72
4.8. CARACTERISTICAS DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN <i>gyrB</i> DE <i>S. pneumoniae</i>	75
4.8.1. Caracterización del inicio de la transcripción.....	75
4.8.2. Secuencias implicadas en la transcripción	76
4.8.3. ¿Existe curvatura en la región promotora de <i>gyrB</i> ?.....	78
4.8.4. Respuesta RST en la fusión P <i>gyrB</i> -cat	78
5. DISCUSION	83
5.1. CARACTERISTICAS DE LA SUBUNIDAD GyrA DE <i>S. pneumoniae</i>	84
5.2. CARACTERISTICAS DEL PROMOTOR DE <i>gyrA</i>	91
5.2.1. Región -10 extendida	91
5.2.2. Curvatura y fuerza del promotor de <i>gyrA</i>	94
5.3. ESTIMULACION DE LA TRANSCRIPCION DE <i>gyrA</i> Y <i>gyrB</i> POR RELAJACION DEL DNA (RESPUESTA RST)	97
5.4. POSIBLES FACTORES REGULADORES DE LA RESPUESTA RST	101
6. CONCLUSIONES	106
7. BIBLIOGRAFIA	109

<u>Figura</u>	<u>Pag.</u>
1 Estructura de las subunidades GyrA y GyrB de la DNA girasa de <i>E. coli</i> .	8
2 Mecanismo de acción de las DNA topoisomerasas de tipo II	11
3 Estructura molecular de las Fluoroquinolonas	19
4 Mecanismo de acción intracelular de quinolonas	22
5 Mapa de restricción de la región <i>gyrA</i> de <i>S. pneumoniae</i> y estructura genética deducida de la secuencia de nucleótidos	49
6 Secuencia de nucleótidos de un fragmento de 2685 pb de <i>S. pneumoniae</i> R6 que contiene el gen <i>gyrA</i>	50
7 Secuencia de DNA de la región 5' de <i>gyrA</i> y localización del sitio de inicio de la transcripción	51
8 Localización del centro de la curvatura en el plásmido pBEND-11 por el ensayo de permutación circular	54
9 Construcción de una fusión transcripcional de la región promotora de <i>gyrA</i> y el gen <i>cat</i> (<i>PgyrA-cat</i>)	56
10 Secuencia de la región promotora de <i>gyrA</i> fusionada a <i>cat</i> y localización de los extremos 5' de las delecciones	58
11 Movilidad electroforética de fragmentos de DNA que llevan diferentes zonas de las regiones promotoras de <i>gyrA</i> y <i>gyrB</i>	60
12 Efecto de las delecciones de la fusión <i>PgyrA-cat</i> en la actividad <i>in vivo</i> del promotor de <i>gyrA</i>	61
13 Localización del centro de la curvatura en el plásmido pBEND126 por el método de permutación circular	63
14 Inducción en <i>S. pneumoniae</i> T4 de la actividad CAT de fusiones transcripcionales <i>PgyrA-cat</i> con diferentes concentraciones de novobiocina y ciprofloxacina	65
15 Inducción en <i>S. pneumoniae</i> T4 de la actividad CAT de fusiones transcripcionales <i>PgyrA-cat</i> con novobiocina	66

Figura	Pag.
16 Inducción en <i>S. pneumoniae</i> T4 de la actividad CAT de fusiones transcripcionales <i>PgyrA-cat</i> con ciprofloxacina	67
17 Inducción en <i>E. coli</i> C-600 de la actividad CAT de fusiones transcripcionales <i>PgyrA-cat</i> con novobiocina	68
18 Inducción en <i>E. coli</i> C-600 de la actividad CAT de fusiones transcripcionales <i>PgyrA-cat</i> con ciprofloxacina	69
19 Inducción en <i>S. pneumoniae</i> T4GyrB ^R de la actividad CAT de fusiones transcripcionales <i>PgyrA-cat</i> con novobiocina	70
20 Inducción en <i>S. pneumoniae</i> T4ParC ^R de la actividad CAT de fusiones transcripcionales <i>PgyrA-cat</i> con ciprofloxacina	71
21 Cambios en el superenrollamiento de pLGYAC126 por inhibición de la girasa y Topo IV y girasa, y Representación gráfica del superenrollamiento en pLGYAC126 por inhibición con novobiocina o ciprofloxacina	73
22 Secuencia de DNA de la región 5' de <i>gyrB</i> y localización del inicio de la transcripción	75
23 Secuencia de la región promotora de <i>gyrB</i>	76
24 Construcción de la fusión transcripcional de la región promotora de <i>gyrB</i> y el gen <i>cat</i> (<i>PgyrB-cat</i>)	77
25 Inducción de la actividad CAT en <i>S. pneumoniae</i> T4 de la fusión transcripcional <i>PgyrB-cat</i> con novobiocina	79-80
26 Inducción de la actividad CAT en <i>S. pneumoniae</i> T4 de la fusión transcripcional <i>PgyrB-cat</i> con ciprofloxacina	81-82
27 Comparación de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la DNA girasa de <i>S. pneumoniae</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	85
28 Estructura de las subunidades GyrA de la girasa y ParC de la topo IV de <i>S. pneumoniae</i>	87
29 Arbol proteico de las subunidades GyrA y ParC de distintas bacterias	88

Figura		Pag.
30	Organización genética de los genes que codifican las subunidades de la DNA girasa	90
31	Modelo de regulación de la transcripción de <i>gyrA</i> de <i>S. pneumoniae</i>	95
32	Posible secuencia de unión de una proteína reguladora	105

<u>Tabla</u>	<u>Pag.</u>
I Características de las DNA topoisomerasas de <i>E. coli</i>	6
II Cambio de los aminoácidos de las DNA topoisomerasas II de <i>S. pneumoniae</i> y su contribución al fenotipo de resistencia a fluoroquinolonas	28
III Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	32
IV Vectores plasmídicos utilizados en este trabajo	32
V Plásmidos recombinantes de <i>E. coli</i> utilizados en este trabajo	33
VI Plásmidos recombinantes de <i>S. pneumoniae</i> utilizados en este trabajo	34
VII Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	37-38
VIII CMI a cloramfenicol de las cepas de <i>E. coli</i> que llevan plásmidos con deleciones en la región promotora de <i>gyrA</i>	57
IX Características de los plásmidos que llevan diferentes fusiones transcripcionales <i>PgyrA-cat</i>	59

1. INTRODUCCION

1.1. IMPORTANCIA CLINICA DE *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae (neumococo) es uno de los principales patógenos humanos. Aunque puede producir infecciones en adultos sanos, suele ser un patógeno oportunista, causando infecciones graves y muerte en niños, adultos mayores de 65 años, o cuando existen factores que disminuyen las defensas del huésped (Jernigan et al., 1996). Esta bacteria coloniza el tracto respiratorio superior pudiendo causar, a) infecciones invasivas, incluyendo bacteriemia y meningitis; b) neumonía y otras infecciones del tracto respiratorio inferior; y c) infecciones del tracto respiratorio superior que incluyen otitis media y sinusitis. En cuanto al número de casos, el CDC ha estimado que cada año se producen en Estados Unidos 3.000 casos de meningitis, 50.000 de bacteriemia, 500.000 de neumonía, y 7 millones de otitis media (Jernigan et al., 1996).

S. pneumoniae es el principal agente etiológico de neumonía adquirida en la comunidad (Granton and Grossman, 1993; Bartlett et al., 1998), y un 25-35% de los pacientes con neumonía neumocócica requieren hospitalización (Bartlett et al., 1998). Otras infecciones respiratorias como la otitis media aguda y la sinusitis, que normalmente no llegan a ser invasivas, producen una considerable morbilidad y coste médico (Bluestone, 1990; Musher, 1992).

Cuando neumococo invade el torrente sanguíneo (bacteriemia), es capaz de infectar distintos órganos y sistemas (huesos, articulaciones, válvulas cardíacas). La bacteriemia es más frecuente en personas de más de 65 años y en niños de menos de 2 años. En adultos, de 60-87% de las bacteriemias están asociadas con neumonía (Kuikka et al., 1992). En cuanto a la meningitis neumocócica, la incidencia es mayor entre los niños de 6 a 24 meses y en personas de más de 65 años (Wenger et al., 1990; Kragstbjerg et al., 1994). La incidencia de meningitis por *Haemophilus influenzae* tipo b en niños, ha disminuido rápidamente con la introducción de la vacuna conjugada, por lo que *S. pneumoniae* se ha convertido en la causa más frecuente de meningitis bacteriana en los niños de este grupo de edad (Peltola, 2000).

S. pneumoniae se encuentra como comensal en la nasofaringe de personas sanas, fundamentalmente niños y personas que viven en condiciones de hacinamiento (Gray et al., 1980). Puede colonizar este hábitat desde el primer día de vida, y más de un 95% de los niños son colonizados alguna vez durante los dos primeros años de vida (Gray et al., 1980). En

general, cuanto menor es la edad de la primera colonización, mayor es la duración del estado de portador (Gray et al., 1982). Los grupos capsulares 6, 14, 19, y 23, además de ser los que presentan una mayor frecuencia de resistencia antimicrobiana (Liñares et al., 1992; Fenoll et al., 1998), representan dos tercios de todos los neumococos aislados durante los dos primeros años de vida. En los adultos, las infecciones con neumococos resistentes son causadas frecuentemente por estas cepas de niños portadores. Existen diferencias en la frecuencia de aislamiento de determinados serotipos en portadores y enfermos, lo que indica que algunos tipos capsulares tienen mayor capacidad para pasar de comensal a patógeno, aunque se conoce poco sobre los factores bacterianos y del huésped que están implicados (Tuomanen et al., 1995; Cundell et al., 1995).

La gravedad de las infecciones producidas por *S. pneumoniae* y la aparición de cepas resistentes a penicilina y otros antibióticos son factores que hacen que la prevención sea esencial. La vacuna disponible hasta el momento (aprobada en 1983), incluye los polisacáridos capsulares específicos de los 23 serotipos neumocócicos invasivos más prevalentes (Butler et al., 1993; Butler et al., 1995). En 1997, el Comité Asesor para la Inmunización (Advisory Committee on Immunization Practices, ACIP) de Estados Unidos, recomendó la vacunación sistemática de personas mayores de 65 años y de otros grupos de riesgo (inmunodeprimidos, esplenectomizados, enfermos crónicos) (CDC., 1997). En febrero de 2.000 fue aprobada la vacuna conjugada antineumocócica indicada para niños menores de dos años, en los que la respuesta de anticuerpos a la vacuna polisacáridica era baja. Los serogrupos de la formulación de la vacuna conjugada (4, 6, 9, 14, 18, 19, y 23) son los responsables del 70 al 80% de las infecciones neumocócicas invasivas en los niños en Estados Unidos y Canadá, Oceanía, Africa, y Europa (Hausdorff et al., 2000). Se ha demostrado que, con la vacuna conjugada, una inmunización primaria seguida de una dosis de recuerdo, es segura y produce unos incrementos significativos de anticuerpos frente a los siete serotipos, lo que demuestra una estimulación efectiva de la memoria por linfocitos T (Rennels et al., 1998; Dagan et al., 1996).

1.2. EL PROBLEMA DE LA MULTIRRESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN *S. pneumoniae*

La aparición y dispersión de resistencia a antimicrobianos en bacterias patógenas es actualmente un problema clínico de primera magnitud. En 1967, se aisló en Australia la primera cepa de *S. pneumoniae* con resistencia intermedia a penicilina (Concentración Mínima Inhibitoria, CMI de 0.6 µg/ml) (Hansman and Bullen, 1967). En 1977 se describen en Sudáfrica cepas altamente resistentes a penicilina (CMI de 4-8 µg/ml), y también resistentes a cloramfenicol (Appelbaum et al., 1977). La resistencia a penicilina fue encontrada posteriormente en todo el mundo (Klugman, 1990; Appelbaum, 1992). En Europa, España tiene una elevada frecuencia de cepas de neumococo resistentes a penicilina, tanto en niños portadores como en enfermos, y con un patrón de resistencia similar al de Sudáfrica (Pérez et al., 1987; Pallarés et al., 1988; Otín et al., 1988). En nuestro país, la incidencia de cepas resistentes aumentó de un 6% en 1979 a un 44% en 1989 y a un 49% en 1998 (Fenoll et al., 1991; Fenoll et al., 1998). De forma similar, en Hungría más de un 50% de las cepas de neumococo son resistentes a penicilina (Marton et al., 1991) y en Rumania un 25% (Millar et al., 1991). Sin embargo, en otros países como Canadá, los niveles de resistencia permanecen bajos, 13,9% en 1998 (Chen et al., 1999). Esta frecuencia elevada de cepas con alto nivel de resistencia a penicilina hace que la mayoría de los β-lactámicos sean ineficaces para el tratamiento de las infecciones neumocócicas. Sin embargo, se ha demostrado que la neumonía por *S. pneumoniae* resistente a penicilinas y cefalosporinas, puede ser tratada con dosis elevadas de estos antibióticos por vía intravenosa (Pallarés et al., 1995).

La resistencia a penicilina suele ir asociada con resistencia a otros antibióticos como la eritromicina, que es la alternativa clásica a la penicilina en pacientes alérgicos y en casos de resistencia. En España, la frecuencia de cepas resistentes a eritromicina aumentó de un 10% en 1989 (Fenoll et al., 1991; Liñares et al., 1992; Pallarés et al., 1995) a un 33,7% en 1997 (Baquero et al., 1999). Esta resistencia también afecta a otros macrólidos, como claritromicina y azitromicina, siendo la frecuencia de resistencia similar a la de la eritromicina (Baquero et al., 1999).

La resistencia a penicilina en neumococo es debida a alteraciones en las proteínas de unión a penicilina (PBPs) (Tomasz, 1987). La resistencia en *S. pneumoniae* se ha producido

por transformación con genes que codifican las PBPs modificadas y que provienen de otras especies de estreptococos genéticamente relacionados (estreptococos del grupo viridans) (Spratt, 1994). Este intercambio de material genético se ha propuesto como el origen de la estructura en mosaico de los genes que codifican las PBPs (Coffey et al., 1995). En España, donde la prevalencia de *S. pneumoniae* resistente a penicilina es muy alta, también es elevada la prevalencia de estreptococos viridans resistentes (Alcaide et al., 1995; Baquero et al., 1991). Por tanto, la detección de un aumento en la prevalencia de estreptococos viridans resistentes a penicilina puede servir como señal de alarma de una próxima aparición de neumococos resistentes. La extensión local de cepas de neumococo resistentes a penicilina puede explicarse por una parte, por su capacidad para la colonización, fundamentalmente en zonas con una alta frecuencia de “individuos colonizables”, especialmente niños (Boken et al., 1995), así como por el consumo local de antibióticos (Baquero, 1996). El siguiente paso sería una extensión geográfica, con dispersión clonal de un país a otro de cepas resistentes (Gasc et al., 1995; Lefevre et al., 1995).

La incidencia de *S. pneumoniae* multirresistentes hace difícil la elección de una terapia antibiótica adecuada para el tratamiento de las infecciones neumocócicas. Esto ha llevado a la utilización de antimicrobianos alternativos como las fluoroquinolonas (Fqs) y al desarrollo de compuestos de este grupo más activos, ya que neumococo, y en general las bacterias Gram-positivas, presentan una elevada resistencia intrínseca a la mayoría de estos compuestos. De hecho, las nuevas Fqs están actualmente indicadas en el tratamiento de la neumonía neumocócica (Bartlett et al., 1998). Las principales dianas de las Fqs son la DNA girasa (Gellert et al., 1976) y la DNA topoisomerasa IV (Kato et al., 1990), pertenecientes a la familia de las DNA topoisomerasas de tipo II bacterianas.

1.3. DNA TOPOISOMERASAS BACTERIANAS

Todas las células tienen dos tipos de DNA topoisomerasas muy conservadas que, aunque se diferencian en sus propiedades, comparten un mismo mecanismo de acción. Todas las DNA topoisomerasas producen una rotura en el DNA (de cadena sencilla las de tipo I y de doble las de tipo II), y pasan una cadena de DNA (sencilla o doble) a través de la rotura producida, con posterior sellado de la rotura inicial. Las enzimas de tipo I incluyen las

topoisomerasas I y III bacterianas y la topoisomerasa I de eucariotas. Las enzimas de tipo II comprenden la DNA girasa (girasa) y la topoisomerasa IV (topo IV) bacterianas y las topoisomerasas II (topo II) eucariotas. Las principales características de las topoisomerasas bacterianas se muestran en la Tabla I. Estas enzimas son esenciales para la replicación, transcripción y recombinación y juegan un papel fundamental en la estructura del cromosoma, condensación / decondensación, y segregación (Luttinger, 1995; Wang, 1996).

Tabla I. Características de las DNA topoisomerasas de *E. coli*.

	Tipo I		Tipo II	
	Topo I	Topo III	Girasa	Topo IV
Estructura	Monómero	Monómero	GyrA ₂ GyrB ₂	ParC ₂ ParE ₂
Peso molecular (kDa)	105	74	GyrA (97) GyrB (90)	ParC (75) ParE (70)
Gen	<i>topA</i>	<i>topB</i>	<i>gyrA, gyrB</i>	<i>parC, parE</i>
Rotura en el DNA	DNA-1	DNA-1	DNA-2	DNA-2
Relajación	Si	No	Si	Si
Decatenación	No	Si	Si	Si
Superenrollamiento	No	No	Si	No
Función:				
Replicación	Si	Si	Si	Si
Transcripción	Si	Si	Si	Si
Segregación cromosoma	No	Si	Si	Si

1.3.1. DNA Topoisomerasas de tipo I

En *Escherichia coli* el gen *topA* codifica la **DNA topoisomerasa I** (topo I) (Sternglanz et al., 1981; Trucksis and Depew, 1981). La estructura cristalina del fragmento N-terminal de 67 kDa de la topo I (Lima and Mondragon, 1994) muestra una cavidad lo suficientemente

grande como para que el DNA de doble cadena pase a través de ella. La topo I es un factor específico en la iniciación de la replicación en el *oriC*, impidiendo la iniciación en otros sitios diferentes (Kaguni and Kornberg, 1984).

La **DNA Topoisomerasa III** (topoIII), codificada por el gen *topB* de *E. coli* (DiGate and Marians, 1988; DiGate and Marians, 1989), está implicada en la estabilización del genoma bacteriano, ya que deleciones en *topB* producen un aumento de las deleciones espontáneas del DNA cromosómico (Wang, 1991; Schofield et al., 1992).

La evidencia *in vitro*, basada en preferencias de sustrato y en actividades enzimáticas, sugiere que el papel celular de la topo I es relajar superenrollamientos, mientras que el de la topo III es decatenar (DiGate and Marians, 1988).

1.3.2. DNA Topoisomerasas de tipo II

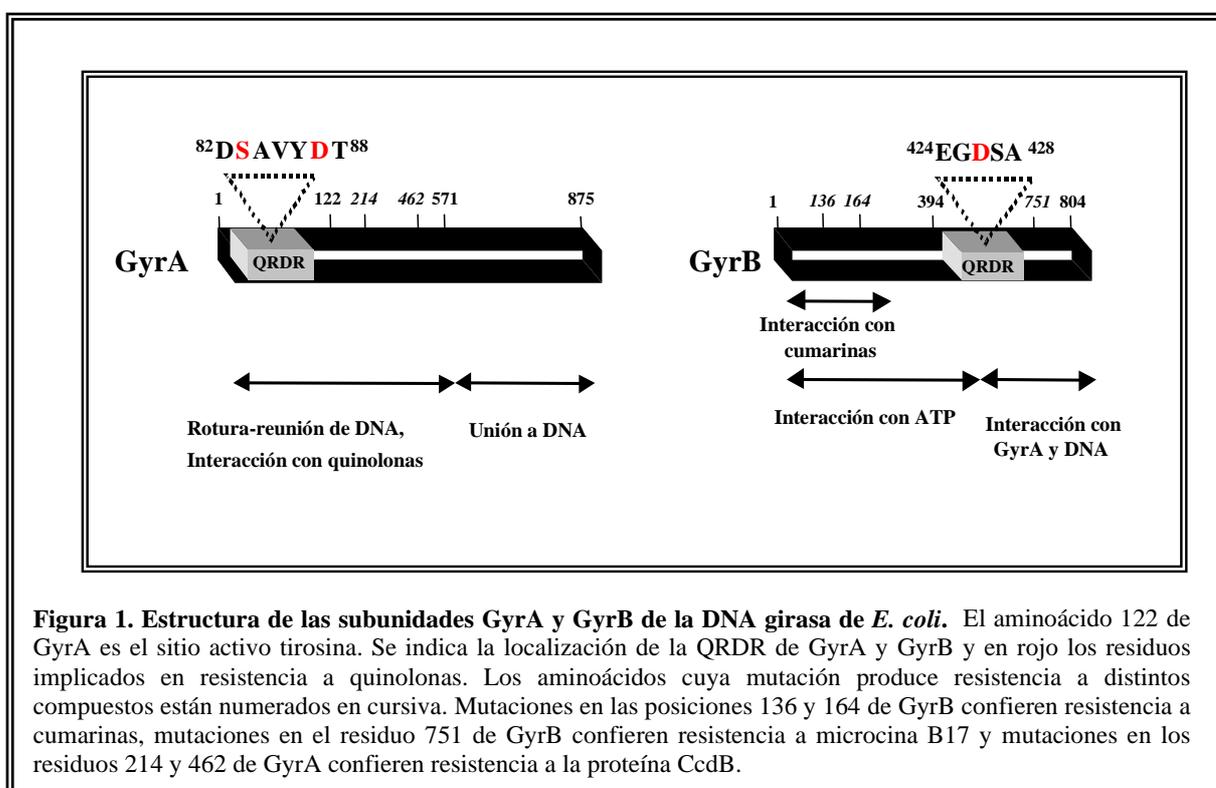
1.3.2.1. DNA girasa.

Los genes *gyrA* y *gyrB* codifican la girasa de *E. coli* (Mizuuchi et al., 1984; Swanberg and Wang, 1987; Adachi et al., 1984). El gen que codifica la subunidad GyrB de *S. pneumoniae* ha sido clonado y caracterizado en nuestro laboratorio (Muñoz et al., 1995). GyrB de *S. pneumoniae* muestra un 54% de identidad con GyrB de *E. coli*, y entre un 44 y un 66% con la de otras bacterias. Sin embargo, del gen *gyrA*, sólo había sido caracterizada la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) (Muñoz et al., 1995).

Generalmente, los genes *gyrA* y *gyrB* se encuentran en localización contigua en el cromosoma bacteriano (Lampe and Bott, 1985; Takiff et al., 1994), sin embargo, *gyrA* de *S. pneumoniae* está localizado, a al menos, 90 Kb de *gyrB* (Muñoz et al., 1995) al igual que en *E. coli* (Hane and Wood, 1969).

La girasa más estudiada ha sido la de *E. coli* (Fig. 1). El dominio N-terminal de GyrA (64 kDa) es responsable de la reacción de rotura-reunión del DNA, mientras que el dominio C-terminal (33 kDa) es la proteína de unión al DNA cuando éste envuelve a la enzima (Reece and Maxwell, 1989; Reece and Maxwell, 1991b; Reece and Maxwell, 1991a). El dominio N-terminal de GyrB (43 kDa) permite la transducción de energía vía hidrólisis de ATP (Jackson et al., 1991; Ali et al., 1993) y se une a las cumarinas (novobiocina, cumermicina A1) (Gilbert and Maxwell, 1994), mientras que el dominio C-terminal (47 kDa) interacciona con GyrA y

con el DNA (Adachi et al., 1987). El fragmento N-terminal de 393 aminoácidos, que contiene el dominio de la ATPasa de GyrB de *E. coli*, ha sido cristalizado en presencia de ADPNP (5'-adenilil- β , γ -imidodifosfato) (Jackson et al., 1991) y su estructura resuelta a 2,5 Å por cristalografía de rayos X (Wigley et al., 1991). La identificación en nuestro laboratorio del cambio S127-L en GyrB de *S. pneumoniae*, que confiere resistencia a novobiocina, representa la primera caracterización de una mutación de resistencia a cumarinas en el gen *gyrB* de una bacteria Gram-positiva (Muñoz et al., 1995). En general, las cumarinas son compuestos más



activos en bacterias Gram-positivas que en Gram-negativas, probablemente por diferencias en la estructura de sus subunidades GyrB. En la estructura cristalográfica del fragmento N-terminal de GyrB de *E. coli* con novobiocina, el residuo V120 (equivalente a S127 de *S. pneumoniae*) se encuentra en el dominio de unión a ATP y no está implicado en la unión a novobiocina (Lewis et al., 1996). Este dato es apoyado con la localización, fuera del dominio de unión de ATP, de las mutaciones que confieren resistencia a novobiocina y cumermicina en *E. coli* (Contreras and Maxwell, 1992; del Castillo et al., 1991) y *Borrelia burgdorferi* (Samuels et al., 1994), pero no con las mutaciones encontradas en *S. pneumoniae* (Muñoz et

al., 1995). Esto parece indicar que la estructura de GyrB de *E. coli* y *S. pneumoniae* son diferentes. Además, la localización de las mutaciones que confieren resistencia a diferentes inhibidores de GyrB en el sitio de unión a ATP de GyrB de *S. pneumoniae* (novobiocina) (Muñoz et al., 1995) y de *Staphylococcus aureus* (novobiocina, cumermicina A1) (Stieger et al., 1996) parece indicar que este hecho es común a otras bacterias Gram-positivas y explica las diferencias en la susceptibilidad a estos compuestos entre bacterias Gram-positivas y negativas.

1.3.2.2. Topoisomerasa IV.

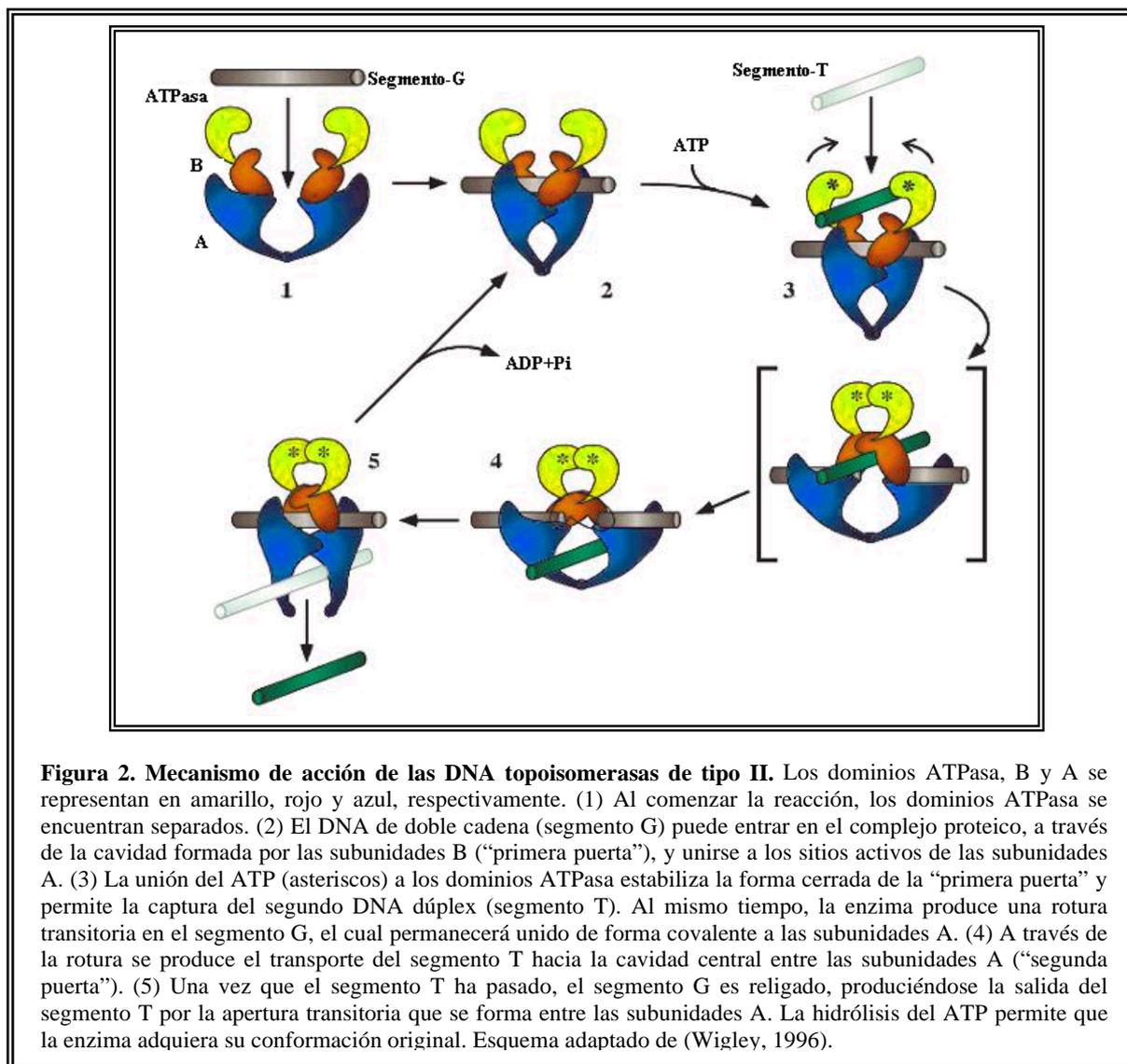
La topo IV es una enzima que ha sido descrita recientemente en *E. coli* (Tabla I) (Kato et al., 1990). Al igual que GyrA, ParC está implicada en el proceso de rotura-reunión de la doble cadena de DNA y ParE, como GyrB, se requiere para la transducción de energía vía hidrólisis de ATP (Peng and Marians, 1993). En el genoma de *S. pneumoniae*, *parC* y *parE* están localizados de forma contigua (Muñoz and de la Campa, 1996) como en otras bacterias (Ferrero et al., 1994; Kato et al., 1988; Luttinger et al., 1991). En neumococo, ParC y ParE son proteínas de 823 y 647 aminoácidos, respectivamente (Fernández-Moreira et al., 2000), mientras que en *E. coli*, ParC y ParE están constituidas por 730 y 601 aminoácidos (Kato et al., 1990). ParC y ParE de *S. pneumoniae* muestran una mayor identidad con sus equivalentes en *S. aureus* (51% y 68%, respectivamente), que con GyrA y GyrB de *S. pneumoniae* (39% y 49%, respectivamente).

Al igual que la topo I y a diferencia de la DNA girasa, la topo IV tiene actividad de relajación *in vivo*. Un defecto en la topo I es compensado por un incremento en la expresión de los genes *parC* y *parE* (Kato et al., 1990). Mutaciones en *parC* o *parE* no son compensadas por transformación con plásmidos que llevan *gyrA* o *gyrB*, sin embargo, la introducción simultánea de un plásmido con ambos genes corrige el fenotipo defectivo de los mutantes en *parC* o *parE*. Esto sugiere que las subunidades de la topo IV y la girasa no son intercambiables y que la girasa puede sustituir, al menos en parte, algunas de las funciones de la topo IV como la partición de los cromosomas (Kato et al., 1992). La girasa y la topo IV tienen funciones diferentes *in vivo*. La primera se encarga del mantenimiento del superenrollamiento del DNA celular, mientras que la topo IV de separar los cromosomas

hijos. Sin embargo, la girasa parece ser indispensable para la segregación de los cromosomas, ya que una mutación en *gyrA* o *gyrB* produce el mismo fenotipo que mutaciones en *parC* y *parE*, aunque este fenotipo podría ser debido a un efecto secundario de la disminución en el superenrollamiento (Kato et al., 1992).

1.3.3. Mecanismo de acción de las DNA topoisomerasas de tipo II

Se ha propuesto un modelo del mecanismo de acción de las topoisomerasas de tipo II, derivado de las estructuras cristalinas disponibles, es decir, de los fragmentos N-terminal de GyrA (Morais Cabral et al., 1997) y GyrB (Wigley et al., 1991) de *E. coli* y de un fragmento de 92 kDa de la topo II de *Saccharomyces cerevisiae* (Berger et al., 1996). Según este modelo (Fig. 2), las topoisomerasas de tipo II pasan una cadena dúplex de DNA, llamada cadena transportadora o segmento T, a través de un corte transitorio en otro dúplex de DNA, llamado DNA abierto o segmento G. El segmento G puede estar en la misma cadena que el segmento T, como en el caso de la reacción de superenrollamiento llevada a cabo por la girasa, o en una cadena distinta, como en el caso de la separación de los cromosomas hijos llevado a cabo por la topo IV (Kampranis et al., 1999). El segmento G es cortado transitoriamente pero sus extremos 5' permanecen unidos covalentemente a residuos de Y de las subunidades A, unión que permite retener la energía del enlace fosfato. La característica más importante de la estructura N-terminal de 43 kDa de GyrB de *E. coli*, es la presencia de una cavidad con un diámetro de 20 Å que se extiende a lo largo del dímero (Wigley et al., 1991). Puesto que el diámetro de la doble hélice de DNA es también de unos 20 Å, esta cavidad puede formar parte de la “primera puerta” a través de la cual pasa el segmento T, que es capturado con elevada eficiencia, independientemente de la topología del DNA. Este mecanismo es posible por la conformación del complejo girasa-DNA, donde el dominio C-terminal (33kDa) de GyrA lleva el segmento T hacia la abrazadera dependiente de ATP. La unión del ATP se acompaña de cambios conformacionales tanto de la enzima como del DNA (Kampranis et al., 1999) y un paso clave en la unión del ATP parece ser la dimerización del fragmento N-terminal de GyrB (Wigley et al., 1991). El segmento T es transportado hacia la cavidad central entre las subunidades A (“segunda puerta”), cuyo diámetro de 30 Å permite albergar la doble cadena



de DNA (Morais Cabral et al., 1997). La girasa puede catalizar varios ciclos de superenrollamiento sin la disociación de la proteína del DNA (superenrollamiento procesivo). Cada ciclo requiere la unión y la hidrólisis de dos moléculas de ATP (Wigley et al., 1991). La rotura en la doble cadena puede entonces ser sellada dejando dos superenrollamientos en el DNA. El paso final de la reacción es la liberación del DNA desde el interior del complejo. Este requiere la hidrólisis del ATP para debilitar la interacción entre los dominios N-terminal de GyrB, permitiendo dejar un espacio a través del cual el DNA puede ser liberado. La energía liberada con la hidrólisis del ATP permite que la proteína adquiera su conformación original (Wigley et al., 1991).

1.3.3.1. Superenrollamiento y relajación

La DNA girasa es la única enzima capaz de introducir superenrollamientos negativos en el DNA (Gellert et al., 1976). La principal diferencia entre la girasa y otras topoisomerasas de tipo II está en el modo de interacción con el DNA. Experimentos de protección a rotura con radical hidroxilo han permitido determinar que la longitud del DNA que envuelve a la girasa es de 128 pb, con 54 pb protegidas a un lado del sitio de escisión de la enzima y 74 pb al otro. Una región de 13 pb presenta una mayor protección, siendo adyacente al sitio de escisión. La presencia de ADPNP o de una quinolona produce una alteración en el patrón de protección, debido probablemente a un cambio conformacional del complejo enzima-DNA (Orphanides and Maxwell, 1994). La girasa tiene mayor afinidad por el DNA relajado que por el DNA superenrollado negativamente (Higgins and Cozzarelli, 1982). A diferencia de la girasa, la topo IV no enrolla el DNA alrededor de sí misma. Los experimentos de protección a digestión con DNAasa I demuestran que la topo IV protege una región de 34 pb alrededor del sitio de rotura (Peng and Marians, 1995). La topo IV se une preferentemente al DNA superenrollado, lo que apoya su papel en la relajación del DNA.

Estas diferencias en el modo de unión al DNA entre la topo IV y la girasa también explican sus diferencias en el mecanismo de acción. La topo IV no dirige la orientación del segmento de DNA que va a atravesar la rotura de la doble cadena, sino que va a realizar el paso de cualquier segmento. Por el contrario, la actividad de superenrollamiento de la girasa requiere que la enzima distinga entre diferentes segmentos de DNA, de manera que el paso de las cadenas permita la introducción de dos superenrollamientos negativos. En el caso de la girasa, el dominio C-terminal de GyrA es responsable de inducir un superenrollamiento positivo del DNA que envuelve a la enzima (Reece and Maxwell, 1991a). Cuando se elimina el dominio C-terminal (GyrA de 59 kDa, que lleva los 523 residuos del extremo N-terminal), la girasa “se convierte” en una topoisomerasa de tipo II (Kampranis and Maxwell, 1996). En consecuencia, el complejo entre esta proteína, GyrA59, y GyrB (GyrA59₂GyrB₂), es incapaz de catalizar el superenrollamiento del DNA, puesto que no envuelve el DNA alrededor de sí mismo, pero sí de relajarlo de manera dependiente de ATP. Este complejo es también una potente enzima decatenante, con una eficiencia superior al de la girasa nativa. En conjunto, estos resultados sugieren que las propiedades de la girasa son atribuibles al modo de unión del

DNA alrededor del dominio C-terminal de GyrA (Kampranis and Maxwell, 1996).

Además del superenrollamiento y la relajación dependiente de ATP, la girasa también cataliza la relajación de superenrollamientos negativos en ausencia de ATP (Gellert et al., 1977; Sugino et al., 1977). La topo IV puede relajar los superenrollamientos negativos (Kato et al., 1990) y positivos en una reacción dependiente de ATP (Hiasa and Marians, 1996; Zechiedrich et al., 2000), sin embargo, esta actividad es menos eficaz que la actividad decatenante.

1.3.3.2. Decatenación

La principal enzima decatenante en la célula es la topo IV. Estudios *in vitro* demuestran que esta actividad es, para la girasa, entre 27 y 130 veces más baja que su actividad de superenrollamiento (Marians, 1987). Además, la topo IV muestra entre 70 (Hiasa and Marians, 1996) y 100 (Zechiedrich et al., 1997) veces mayor actividad decatenante que la girasa.

1.3.4. Funciones biológicas de las DNA topoisomerasas de tipo II

La **replicación** es uno de los procesos mejor conocido que genera superenrollamientos en el DNA. Durante la replicación semiconservativa, se forman superenrollamientos positivos delante de la horquilla de replicación. La separación de la doble cadena de DNA, detrás de la horquilla, podría considerarse como un caso especial de superenrollamiento negativo. *In vitro*, la topo IV es capaz de eliminar de forma eficiente superenrollamientos positivos y negativos (Kato et al., 1992), y la girasa es la única enzima capaz de convertir superenrollamientos positivos en negativos (Gellert et al., 1976). La girasa actúa asimismo durante el proceso de elongación de la replicación *in vivo* (Kreuzer and Cozzarelli, 1979). La topo IV es capaz de llevar a cabo los pasos finales de la replicación (decatenación de las moléculas hijas unidas) (Peng and Marians, 1993). La incapacidad de la girasa para separar las moléculas hijas unidas, podría deberse a sus características de unión al DNA y a su preferencia por el DNA relajado (Higgins and Cozzarelli, 1982). Las uniones intermoleculares entre las moléculas hijas son similares a superenrollamientos y la unión de la topo IV a estos productos de replicación es más estable que en el caso de la girasa (Peng and Marians, 1995). Los

concatémeros formados en el proceso de recombinación son resueltos por la girasa y no por la topo IV y los formados en la replicación son resueltos por la topo IV pero no por la girasa (Adams et al., 1992).

Un segundo ejemplo de proceso celular que genera superenrollamiento es la **transcripción**. El paso de la maquinaria de transcripción separa transitoriamente el DNA en dominios con superenrollamiento positivo delante de la RNA polimerasa (RNAP) y superenrollamiento negativo detrás de ésta (Liu and Wang, 1987). La girasa y la topo I actúan conjuntamente para relajar estos dominios que se originan durante la transcripción o, en general, en aquellos procesos en los que una proteína se desplaza a lo largo del DNA.

1.3.5. Papel de las DNA topoisomerasas en el control del superenrollamiento del DNA

El principal papel fisiológico del superenrollamiento del DNA es probablemente facilitar la separación de la doble hélice de DNA durante la replicación y la transcripción. El superenrollamiento del DNA es esencial para la viabilidad y está estrictamente regulado en la célula.

La girasa, la topo I y la topo IV actúan en conjunto en el mantenimiento del nivel de superenrollamiento del DNA (Zechiedrich et al., 2000). La girasa actúa introduciendo superenrollamiento negativo y la topo I relajándolo (Pruss et al., 1982). La topo IV puede sustituir a la topo I en la regulación de los niveles celulares de superenrollamiento, debido a su capacidad para relajar el superenrollamiento negativo (Kato et al., 1990).

A su vez, las topoisomerasas están reguladas por el superenrollamiento del DNA (Menzel and Gellert, 1983). La transcripción de los genes *gyrA*, *gyrB* y *topA* responde a superenrollamiento, de manera que un incremento en el superenrollamiento negativo activa la transcripción de *topA* y una disminución favorece la expresión de *gyrA* y *gyrB* (Menzel and Gellert, 1987a). La primera evidencia de esta regulación fue la observación de que mutantes *topA* de *E. coli* adquieren mutaciones espontáneas en *gyrA* o *gyrB* (DiNardo et al., 1982). Menzel y Gellert (Menzel and Gellert, 1983) estudiaron el efecto de la inhibición de la actividad de las topoisomerasas en la expresión de *gyrA* y *gyrB* de *E. coli*. El tratamiento con inhibidores de GyrB (novobiocina y cumermicina) produce un aumento de 10 veces en la cantidad de proteínas GyrA y GyrB, que también aumenta de 2-3 veces por tratamiento con

un inhibidor de GyrA (ácido nalidíxico). Por tanto, los inhibidores de GyrB producen una mayor inducción que el inhibidor de GyrA. Esto se debe a que la inhibición de GyrA no produce una relajación completa del DNA celular pero sí la inhibición de GyrB (Snyder, 1979): los inhibidores de GyrA afectan tanto a la actividad de superenrollamiento como de relajación de la girasa, mientras que los inhibidores de GyrB sólo afectan a la actividad de superenrollamiento (Gellert et al., 1977; Sugino et al., 1977). La síntesis de la girasa es controlada por el nivel de superenrollamiento del DNA y ésta síntesis es mayor cuando el DNA está relajado (Menzel and Gellert, 1983). La regulación de los genes *gyrA* y *gyrB* *in vivo* se produce a nivel de transcripción, ya que la fusión de la región promotora de estos genes con el gen *galK* hace que la actividad galactokinasa sea inducible por cumermicina (Menzel and Gellert, 1987a).

Los mecanismos que relacionan superenrollamiento del DNA con transcripción son poco conocidos. Se ha demostrado la activación de la transcripción del promotor *lac* por incremento del nivel de superenrollamiento (Borowiec, 1985). En este caso, debido a que el superenrollamiento negativo favorece la apertura de la doble hélice necesaria para la formación del complejo abierto RNAP-DNA, se podría esperar que éste incrementase el nivel de transcripción, al menos para aquellos promotores en los que la formación del complejo abierto es el paso limitante (Borowiec, 1985). Sin embargo, no se conoce ningún mecanismo que explique la estimulación de un promotor cuya actividad está aumentada por una disminución en el superenrollamiento negativo del DNA. No se sabe si otros factores, además de la RNAP, son necesarios, y si la secuencia de DNA requerida incluye otras zonas además del promotor (Menzel and Gellert, 1987b). La estimulación, inducida por relajación del DNA, de los genes *gyrA* y *gyrB* parece implicar sólo la parte del promotor que está desenrollada durante la iniciación de la transcripción. El análisis de deleciones de la fusión del promotor de *gyrA* y *gyrB* con el gen *galK* indica que sólo la secuencia que incluye la región consenso -10, el inicio de la transcripción y las primeras bases del transcrito son necesarias para la inducción por cumermicina (Menzel and Gellert, 1987b). Estos resultados están en contra de un modelo que fue propuesto para explicar los efectos del superenrollamiento en la actividad del promotor, y en el cual la variable importante es el desplazamiento angular alrededor de la hélice entre las regiones -35 y -10 que permite la unión de la RNAP y que depende de la longitud de la

región espaciadora (Stefano and Gralla, 1982). Los resultados de Menzel y Gellert indican que ni la secuencia -35 , ni su posición relativa con la región -10 , influyen en la respuesta del promotor a la relajación del DNA (Menzel and Gellert, 1987b). El reconocimiento del promotor tampoco parece ser el responsable de la estimulación, ya que éste depende de la región -35 , cuya secuencia y espacio con relación a la región -10 , ha sido alterada sin afectar a la activación (Menzel and Gellert, 1987b).

La iniciación de la transcripción por RNAP purificada conduce en algunos promotores a la formación, además de los transcritos completos, de “transcritos abortivos”, en un proceso cíclico con la RNAP unida al promotor. Hay algunos promotores en los que el nivel de formación de estos transcritos es elevado (Stefano and Gralla, 1979). Estas cadenas cortas de RNA pueden unirse con la región de la hebra complementaria de DNA formando un pequeño lazo (R-loop), y como tal ser estabilizado por el superenrollamiento negativo del DNA. La relajación del DNA debería desestabilizar este lazo. Si la liberación de este RNA fuera el paso limitante, la reiniciación y en consecuencia la síntesis de mensajero, podría ser más rápida en DNA relajado. Este modelo apoyaría los resultados de Menzel y Gellert para las fusiones transcripcionales de los promotores de *gyrA* y *gyrB*, que incluyen la región -10 y las primeras bases del transcrito, y que presentan un nivel basal de transcripción reducido pero son las que muestran mayor inducción por cumermicina. Es decir, el bloqueo del proceso de transcripción en las primeras bases sería compensado por la relajación del DNA (Menzel and Gellert, 1987b). El efecto de estas secuencias localizadas por detrás del promotor ha sido descrito también en otros genes (Russell et al., 1984).

1.4. LAS DNA TOPOISOMERASAS COMO BLANCO DE ACCION DE ANTIMICROBIANOS

Hasta el momento no se han desarrollado inhibidores de la topo I y la topo III como agentes antibacterianos, sin embargo, la girasa es el blanco de acción de antimicrobianos con estructuras químicas muy diferentes y que interaccionan con la enzima por distintos mecanismos. Actualmente se sabe que la topo IV es también una diana de antimicrobianos.

1.4.1. Cumarinas

Son una familia de compuestos naturales aislados de ciertas especies de *Streptomyces*. Entre ellas se incluyen la novobiocina, la cumermicina A1 y la clorobiocina. Las cumarinas inhiben la actividad ATPasa de GyrB necesaria para el “reciclaje” de la girasa, y el tratamiento con novobiocina reduce el nivel de superenrollamiento celular (Gellert et al., 1976; Sugino et al., 1978; Ali et al., 1993; Maxwell, 1993; Lewis et al., 1996). Las cumarinas también inhiben *in vitro* la actividad de la topo IV, aunque a una concentración mayor que la necesaria para inhibir la girasa (Peng and Marians, 1993; Hoshino et al., 1994). Sin embargo, el papel de la topo IV en la acción de las cumarinas *in vivo* no ha sido demostrado por la identificación de mutaciones de resistencia en *parE*.

1.4.2. Ciclotialidinas

Otros productos naturales que inhiben la actividad ATPasa de la girasa son la ciclotialidina y sus derivados estructurales, GR122222X, Ro 47-5990 y Ro 48-2865, que son péptidos cíclicos producidos por distintas especies de *Streptomyces* (Stieger et al., 1996; Oram et al., 1996). Aunque la región de solapamiento con el sitio de unión del ATP es similar para las ciclotialidinas y las cumarinas, el sitio de unión de cada ligando y la susceptibilidad a estos compuestos es diferente (Muñoz et al., 1995; Oram et al., 1996; Stieger et al., 1996). Tanto las cumarinas como las ciclotialidinas actúan como inhibidores competitivos de la unión del ATP. Uno de los principales problemas asociados con las aplicaciones clínicas de las cumarinas es su toxicidad, debida a la inhibición de enzimas eucariotas como la topoisomerasa II (Liu et al., 1980). Las ciclotialidinas presentan mayor afinidad por la girasa que por la topo II eucariota, que la novobiocina, lo que las convierte en potenciales agentes terapéuticos (Nakada et al., 1994).

1.4.3. Otros inhibidores de la DNA girasa

La **cinodina** es un antibiótico producido por miembros del género *Nocardia*. Inhibe la actividad de la girasa *in vitro* y, aunque se ha propuesto que ésta enzima es el blanco de acción *in vivo*, no se han encontrado mutantes en *gyrA* o *gyrB* resistentes a cinodina (Osburne et al., 1990).

Los derivados terpenoides **clerocidina**, **terpentecina** y **UCT4B** son productos

naturales de diferentes hongos, que inhiben la síntesis del DNA en bacterias. Se ha demostrado que la clerocidina inhibe el superenrollamiento del DNA por la girasa purificada y estabiliza el complejo de escisión *in vitro* (Tamamura et al., 1988; McCullough et al., 1993).

Algunos péptidos, codificados por plásmidos de *E. coli*, también actúan sobre la DNA girasa. La **Microcina B17** es activa frente a enterobacterias, y se ha demostrado que es un inhibidor de la replicación del DNA, induce la respuesta SOS y lleva a la muerte de la bacteria (Herrero and Moreno, 1986), probablemente porque es capaz de inducir rotura en el DNA de una forma similar a las quinolonas (Vizán et al., 1991). Se han identificado mutaciones de resistencia a microcina B17 en *gyrB* (Vizán et al., 1991) y ésta es diferente de las mutaciones que causan resistencia a cumarinas o a quinolonas (Fig. 1), lo que sugiere que la interacción del péptido con GyrB es diferente a la de los otros antimicrobianos. Otro polipéptido producido por un plásmido de *E. coli* es **CcdB (LetD)** que interacciona con GyrA. Este péptido, al igual que la microcina B17, estabiliza el complejo de rotura entre la girasa y el DNA (Maki et al., 1992). Esta proteína es producida por el factor F que produce asimismo de forma coordinada CcdA, una proteína “antídoto” que se acompleja con CcdB y revierte su unión con GyrA (Maki et al., 1996). Las mutaciones que confieren resistencia a CcdB han sido localizadas en *gyrA* (Fig. 1) y estos cambios no producen resistencia a las quinolonas (Miki et al., 1992).

1.4.4. Fluoroquinolonas

Las quinolonas, al ser un grupo de antimicrobianos sintéticos presentan, frente a los compuestos de origen natural, la ventaja de no existir en la naturaleza mecanismos de resistencia naturales. Otra ventaja es que actúan sobre un blanco, la girasa, que no está presente en las células eucariotas lo que evitaría su toxicidad. Sin embargo, el descubrimiento de la topo IV puso de manifiesto la existencia de dos blancos celulares para las quinolonas y que la topo IV es homóloga a la DNA topoisomerasa II eucariota.

Las quinolonas pueden ser clasificadas en cuatro grupos en función de su actividad frente a *S. pneumoniae*. El progenitor de las 4-quinolonas fue el ácido nalidíxico que se utilizó para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario en 1963 (Leshner, 1962). Las

modificaciones de su estructura química dieron lugar al primer grupo de compuestos (ácido oxolínico, piromídico, pipemídico, cinoxacina y flumequina), que se caracterizan por su baja potencia *in vitro* y por un perfil farmacocinético desfavorable. Las quinolonas de los grupos 2, 3, y 4 presentan mejores propiedades farmacocinéticas, alcanzan concentraciones elevadas en suero y las CMI₉₀ son menores, lo que permite su utilización para el tratamiento de infecciones sistémicas. Estos compuestos se diferencian de los del primer grupo en dos características comunes, la presencia de un átomo de flúor en el C-6 (de ahí el nombre de fluoroquinolonas) y un sustituyente pirrolidín o piperazolidín en el C-7 del núcleo de la quinolona. Esta combinación aumenta la actividad antibacteriana y amplía el espectro de acción (Fig. 3). Las Fqs representativas del segundo grupo son la norfloxacin, ciprofloxacina, enoxacina, fleroxacina, lomefloxacina, ofloxacina, y levofloxacina. La concentración de estos compuestos que inhibe al 90% de las cepas de *S. pneumoniae* (CMI₉₀) está en el rango de 1-4 µg/ml. A diferencia de la ciprofloxacina, la levofloxacina es utilizada

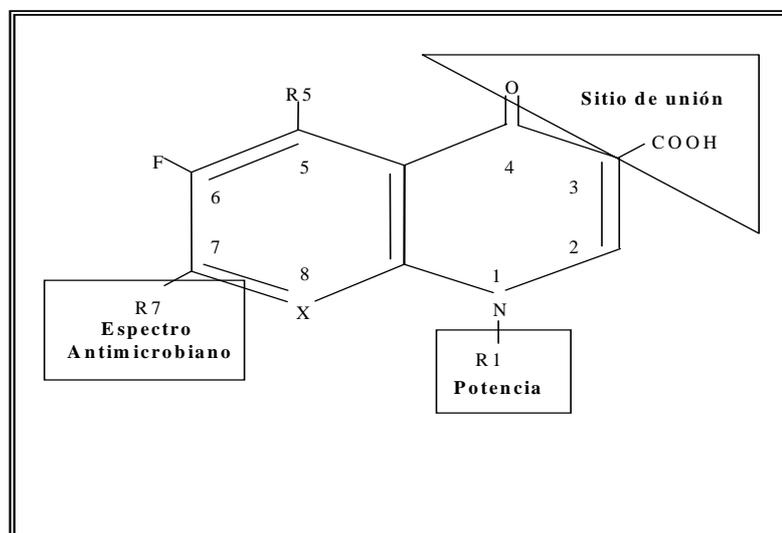


Figura 3. Estructura molecular de las Fluoroquinolonas. Los grupos 3-carboxilo y 4-carbonilo son esenciales para la unión al complejo topoisomerasas-DNA. La introducción de un sustituyente en el C-7 tiende a aumentar la actividad antibacteriana y la presencia de un grupo voluminoso en el N-1 aumenta la potencia del compuesto. La inhibición de la girasa y la penetración en la célula es aumentada por la presencia de un átomo de F en el C-6 (Bryskier and Chantot, 1995). Los sustituyentes en el C-7 no sólo determinan el espectro de actividad de estos compuestos sino también la preferencia por una determinada diana. La introducción de un grupo bencenosulfonilamido en el anillo piperazinil del C-7 de la ciprofloxacina cambia el blanco primario de la topo IV por la girasa en *S. pneumoniae* (Alovero et al., 2000).

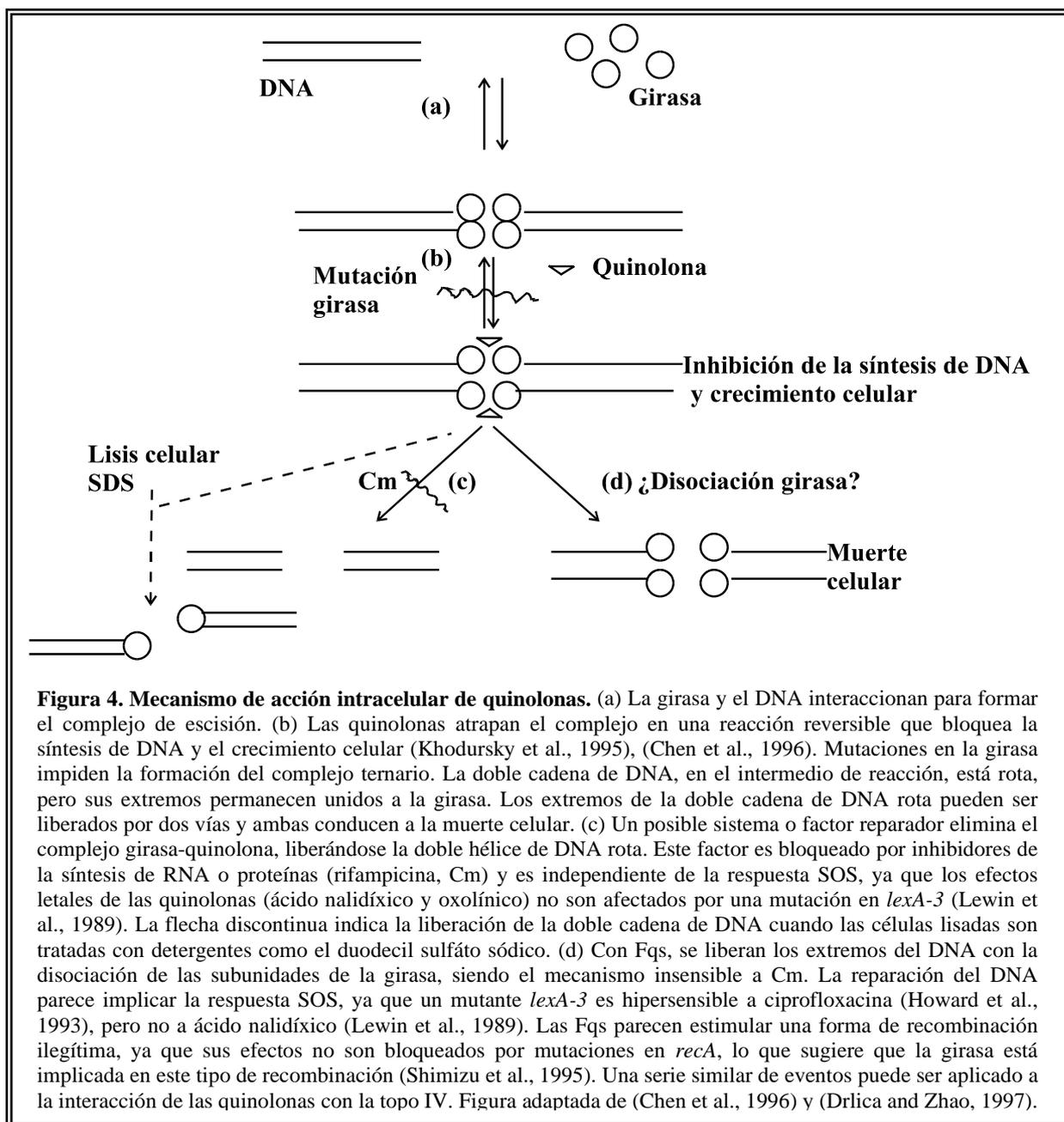
tercer grupo (esparfloxacina, tosufloxacina, gatifloxacina y grepafloxacina) tienen mayor potencia frente a bacterias Gram-positivas y anaerobios, con unos valores de CMI₉₀ de 0,25-1 µg/ml. El cuarto grupo de compuestos (trovafloxacina, clinafloxacina, sitafloxacina y moxifloxacina) tiene valores de CMI₉₀ de 0,12-0,25 µg/ml. La moxifloxacina ha demostrado ser eficaz en clínica, sin embargo, hacen falta más ensayos clínicos para obtener resultados fiables en infecciones causadas por neumococos resistentes (Nightingale, 2000). Algunas Fqs como la trovafloxacina, grepafloxacina y clinafloxacina han tenido que ser retiradas del mercado debido a sus efectos secundarios (R.C. Read, 2000).

1.4.4.1. Mecanismo de acción de las fluoroquinolonas

El desarrollo del ácido nalidíxico como un agente antibacteriano precedió en más de una década al descubrimiento de la girasa (Gellert et al., 1976) y a su identificación como blanco de acción de quinolonas en *E. coli* (Gellert et al., 1977; Sugino et al., 1977). La primera evidencia de que la topo IV podía ser un blanco de quinolonas fue la demostración de que esta enzima era inhibida *in vitro* por estos compuestos (Kato et al., 1992). Como ya se ha comentado, todas las DNA topoisomerasas producen una rotura transitoria en el DNA uniéndose covalentemente mediante enlace fosfotirosina al extremo 5'-fosfato generado en la rotura. Estos complejos de escisión enzima-DNA son intermedios catalíticos y están presentes en concentraciones bajas, por lo que son bien tolerados por la célula. Sin embargo, las quinolonas convierten a las topoisomerasas en toxinas fisiológicas atrapando el complejo topoisomerasa-DNA y convirtiéndolo en un complejo ternario topoisomerasa-quinolona-DNA (Kreuzer and Cozzarelli, 1979; Froelich-Ammon and Osheroff, 1995). La formación de este complejo ternario lleva a la muerte celular según el mecanismo mostrado en la figura 4. Aunque la formación del complejo ternario es crítica para la citotoxicidad de las quinolonas, normalmente estos complejos son reversibles. Se ha propuesto que se requiere el paso de la DNA polimerasa o la RNAP para convertir el complejo ternario en una forma irreversible. En un sistema de transcripción *in vitro*, se ha observado que el complejo ternario bloquea el paso de la RNAP de *E. coli* 10-20 pb por delante del sitio de escisión de la girasa (Willmott et al., 1994). Una mutación en GyrA hace que la concentración de quinolona necesaria para este

bloqueo de la transcripción sea mayor, lo que confirma el modelo (Willmott and Maxwell, 1993). Por otra parte, se ha demostrado *in vitro*, que el complejo ternario con la girasa forma una barrera para el paso de T7 DNA polimerasa, pero que la colisión del complejo de replicación con el complejo ternario no es suficiente para convertirlo en un complejo irreversible, lo que sugiere la implicación de otros factores (Wentzell and Maxwell, 2000). Un estudio similar demostró la capacidad del complejo topo IV-norfloxacina-DNA para bloquear la replicación del DNA (Hiasa et al., 1996). La frecuencia de colisiones entre la horquilla de replicación y el complejo topoisomerasa-DNA puede ser el paso limitante que conduce a la muerte celular y esta frecuencia depende del número y localización de los complejos enzima-DNA. Las quinolonas produce un daño en el DNA que se pone de manifiesto por la inducción del sistema SOS, siendo la recombinación el principal sistema para la reparación de las lesiones. La pérdida de la función de UvrD afecta a la reparación del complejo formado con la topo IV pero no al formado con la girasa, lo que sugiere que el sistema de reparación postreplicativo es efectivo para la reparación del complejo topo IV-quinolona-DNA pero no para el formado con la girasa, debido probablemente a la posición de los complejos durante la replicación. La girasa actúa delante de la horquilla de replicación y la topo IV detrás, por lo que el complejo formado con la girasa colisiona con la horquilla de replicación con más frecuencia que el formado con la topo IV y quizás éste último tiene más probabilidades de ser reparado por el sistema postreplicativo que el formado por la girasa (Khodursky and Cozzarelli, 1998).

Compuestos con estructuras diferentes, como las quinolonas, la campotericina y las



epidofilotoxinas, actúan en las topoisomerasas eucariotas y procariotas incrementando la constante de equilibrio de la reacción de rotura-reunión del DNA, pero la diferencia entre estos compuestos reside en que unos inhiben la religación y otros incrementan las roturas en el DNA (Froelich-Ammon and Osheroff, 1995). Estudios realizados con la campotericina

(inhibidor de la topo I eucariota) sugieren que actúa inhibiendo la religación del DNA (Tanizawa et al., 1995). Los compuestos cuyo blanco es la topo II pueden, 1) inhibir la religación: etopósido y amsacrina (topo II eucariota) (Sorensen et al., 1992) y quinolonas antibacterianas (girasa y topo IV) (Anderson et al., 1999) ó 2) estabilizar el complejo ternario, como la Fq antineoplásica, CP-115,953 (topo II eucariota y procariota) (Elsea et al., 1997; Hooper, 1998a; Hooper, 1998b). Esta Fq favorece la rotura del DNA mediada por la girasa de *E. coli* (Robinson et al., 1991), la topo IV de Gram-positivos y Gram-negativos (Anderson et al., 1998), la topoisomerasa II de levaduras (Elsea et al., 1995), *Drosophila* (Robinson et al., 1991) y humanos (Elsea et al., 1993).

1.4.5. La resistencia a fluoroquinolonas en *S. pneumoniae*

Recientemente se han publicado distintos estudios sobre la prevalencia de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a Fqs. En España, la frecuencia de cepas resistentes a ciprofloxacina aumentó de un 0,9% en 1991/92 a un 3% en 1997/98 (Liñares et al., 1999); en Canadá, de un 0% en 1993 a 1,7% en 1997/98 (Chen et al., 1999) y en Estados Unidos, la prevalencia de cepas resistentes a ciprofloxacina fue de 0,3% en los mismos años (Sahm et al., 2000). Se puede considerar que esta resistencia es actualmente baja en todo el mundo (File and Slama, 2001). Hay varios factores que pueden contribuir al incremento de la resistencia a quinolonas, entre ellos, el consumo elevado, su utilización en la práctica veterinaria y su uso profiláctico. Entre las estrategias para disminuir el desarrollo y extensión de la resistencia a las Fqs se encuentran: la utilización en aquellas situaciones en las que claramente van a producir un beneficio; la adecuada dosificación, esencial para limitar la selección de mutantes; la combinación con otros antibióticos y el desarrollo de nuevas Fqs con una actividad similar frente a sus dos dianas (File and Slama, 2001).

La resistencia a las quinolonas se produce por mutaciones en sus blancos celulares, DNA girasa y topoisomerasa IV, y/o por la disminución de su concentración intracelular mediada por bombas de flujo.

Al igual que se ha observado con la resistencia a penicilina (Spratt, 1994), los estreptococos del grupo viridans podrían ser un reservorio de genes de resistencia a Fqs, si se asume que la resistencia en éstos y en neumococo se produce por transferencia horizontal.

Los estreptococos del grupo viridans y *S. pneumoniae* comparten el mismo mecanismo de resistencia (González et al., 1998), la secuencia de los genes de la girasa y la topo IV muestra una elevada identidad (González et al., 1998; Ferrándiz et al., 1999), y es posible transformar *S. pneumoniae* sensible a resistente a ciprofloxacina, con DNA de estreptococos viridans resistentes a este compuesto (González et al., 1998; Janoir et al., 1999). En nuestro laboratorio, se han caracterizado distintos aislados clínicos de *S. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacina con una estructura en mosaico en sus genes *parC* y *gyrA*, lo que sugiere una recombinación entre las dos especies (Ferrándiz et al., 2000).

1.4.5.1. Alteraciones en el blanco molecular

Estudios iniciales en *E. coli* identificaron mutaciones de resistencia a quinolonas en una región concreta de GyrA y GyrB, conocida como QRDR. En GyrA, los residuos mutados encontrados con más frecuencia son S83 y D87 del dominio N-terminal (Fig. 1) (Yoshida et al., 1990). La estructura cristalina de este dominio, muestra que las mutaciones están localizadas en la zona de contacto entre las dos subunidades GyrA (Morais Cabral et al., 1997). En GyrB, la mutación que determina resistencia incluye el residuo D426 del dominio C-terminal (Nakamura et al., 1989; Yoshida et al., 1991), es decir, la región de GyrB implicada en la interacción con GyrA (Fig. 1).

Los trabajos de varios grupos han demostrado que en el desarrollo de alto nivel de resistencia a quinolonas en *E. coli*, las mutaciones en *parC* y *parE* se producen sólo en presencia de mutaciones en *gyrA*. Estas mutaciones se han encontrado en la región QRDR de *parC* (Khodursky et al., 1995; Kumagai et al., 1996; Vila et al., 1996; Heisig, 1996) y *parE* (Breines et al., 1997), que son homólogas a *gyrA* y *gyrB*, respectivamente. La topo IV purificada de *E. coli* se inhibe por Fqs a concentraciones de 2-10 veces superiores a las que inhiben a la girasa (Peng and Mariani, 1993; Hoshino et al., 1994; Khodursky et al., 1995). Estos datos indican claramente que la DNA girasa es el blanco primario para las quinolonas en *E. coli* y la topo IV el blanco secundario. Estudios genéticos realizados con otras bacterias Gram-negativas como *Neisseria gonorrhoeae* (Belland et al., 1994) y *H. influenzae* (Georgiou et al., 1996) indican que comparten con *E. coli* este mecanismo de resistencia. Por el contrario, en bacterias Gram-positivas como *S. pneumoniae* (Gootz et al., 1996; Janoir et al.,

1996; Pan et al., 1996; Tankovic et al., 1996; Muñoz and de la Campa, 1996), estreptococos del grupo viridans (González et al., 1998), *S. aureus* (Magerrison et al., 1992; Ferrero et al., 1994; Ito et al., 1994) y *Enterococcus faecalis* (Korten et al., 1994), las mutaciones en *gyrA* se encuentran en las cepas con alto nivel de resistencia que también tienen mutaciones en *parC*. Estudios genéticos de distintos laboratorios, incluido el nuestro, han demostrado que en *S. pneumoniae* la topo IV es el blanco primario para la ciprofloxacina (Cp) y la girasa el blanco secundario (Gootz et al., 1996; Janoir et al., 1996; Pan et al., 1996; Tankovic et al., 1996; Muñoz and de la Campa, 1996). En la Tabla II se muestra el análisis de varios aislados clínicos y de laboratorio resistentes a Cp y se indica como tanto el tipo, como el número de mutaciones, influyen en el nivel de resistencia. Las cepas con bajo nivel de resistencia a Cp (CMI ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$) presentan cambios que afectan a una de las dos subunidades de la topo IV: residuos S79 y D83 de ParC y en D435 de ParE. Las cepas con alto nivel de resistencia (CMI a Cp ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$) tienen cambios en ParC y GyrA (S81, E85) o en ParE y GyrA. Algunos aislados presentan más de dos mutaciones. Aunque no se dispone de la estructura tridimensional de las proteínas ParC y GyrA, estas observaciones son una evidencia de que los aminoácidos S81 de GyrA y S79 de ParC son esenciales para las interacciones con el DNA y las Fqs.

Mediante experimentos de transformación genética, en los que se empleó como DNA donador productos de PCR que llevaban diferentes mutaciones, se establecieron las mutaciones responsables de resistencia a Cp (Tabla II). Mutaciones sencillas en *parC* confieren un incremento en la resistencia a Cp de 4-8 veces. Una vez que las células han adquirido un fenotipo de bajo nivel de resistencia a Cp por mutaciones en *parC*, es posible transformarlas a alto nivel de resistencia utilizando productos de PCR que llevan mutaciones en *gyrA* de las cepas con alto nivel de resistencia a Cp. Estos transformantes muestran un incremento en la resistencia a Cp de 32-128 veces (Tabla II).

Por otra parte, estudios de selección paso a paso de mutantes resistentes a distintas Fqs parecen clasificarlas en tres tipos. El primer grupo, que incluye ciprofloxacina, levofloxacina y trovafloxacina, selecciona mutaciones en las regiones QRDR de la topo IV antes que en la girasa (Fukuda and Hiramatsu, 1999; Gootz et al., 1996; Janoir et al., 1996; Pan et al., 1996; Tankovic et al., 1996; Muñoz and de la Campa, 1996), sugiriendo que estas drogas actúan

preferentemente a través de la topo IV *in vivo*. Por el contrario, el segundo grupo, que incluye esparfloxacina, gatifloxacina y NSFQ-105, selecciona mutaciones en la girasa antes que en la topo IV, indicando que este tipo de Fqs actúan a través de la girasa (Alovero et al., 2000; Fukuda and Hiramatsu, 1999; Pan and Fisher, 1997). El tercer grupo, representado por clinafloxacina, gemifloxacina y moxifloxacina, actúa tanto frente a la topo IV como frente a la girasa (Pan and Fisher, 1998; Heaton et al., 2000; Varon et al., 1999). Es necesario resaltar que en los estudios de selección de mutantes en los que se seleccionan cepas con mutaciones en la QRDR de *gyrA*, no se han realizado experimentos de transformación genética que seleccionen transformantes resistentes a las Fqs empleadas, utilizando como DNA donador la QRDR de *gyrA*. Por tanto, es posible que los mutantes seleccionados para estas Fqs tengan una segunda mutación en la topo IV fuera de la región QRDR.

Por otro lado, estudios bioquímicos de inhibición de las actividades enzimáticas de las topoisomerasas de *S. pneumoniae*, muestran que la topo IV es más sensible a la inhibición por Fqs que la girasa y que las CMI para las Fqs son más próximas a los valores de inhibición de la decatenación que a los valores de inhibición del superenrollamiento. Estos ensayos se han realizado con Fqs (ciprofloxacina, esparfloxacina, trovafloxacina, clinafloxacina, gemifloxacina) pertenecientes a los diferentes grupos citados anteriormente (Fernández-Moreira et al., 2000; Pan and Fisher, 1999; Morrissey and George, 1999; Morrissey and George, 2000). Estos resultados demuestran que, a nivel bioquímico, en *S. pneumoniae* el blanco primario para las Fqs es la topo IV y la girasa el blanco secundario. Como se demostró en nuestro laboratorio, las mutaciones que alteran los residuos D83 o S79 de ParC confieren un incremento de la resistencia a Cp de 8 veces en las cepas transformantes (Muñoz and de la Campa, 1996). Este incremento en la CMI es muy parecido a la diferencia de 10 veces entre los valores de CI_{50} (concentración de Fq necesaria para la reducción de la actividad enzimática en un 50%) para el superenrollamiento por la girasa y la decatenación por la topo IV. Por lo tanto, la topo IV es ocho veces más sensible *in vivo* y diez veces más sensible *in vitro* a las Fqs que la girasa. Sin embargo, para las otras Fqs, el incremento en la CMI no se correlaciona de la misma forma con el cociente CI_{50} superenrollamiento/ CI_{50} decatenación (Fernández-Moreira et al., 2000). Esto sugiere que otros factores, además de la inhibición bioquímica de las topoisomerasas, deberían ser considerados cuando se analiza la actividad

antibacteriana de estas Fqs. Entre estos factores podrían encontrarse la distinta localización celular de la topo IV y la girasa (Kato et al., 1992; Huang et al., 1998), el diferente papel de las topoisomerasa en el metabolismo del DNA y los diferentes mecanismos de muerte celular por las distintas Fqs (Drlica and Zhao, 1997).

Estudios en *S. aureus* muestran asimismo que las CMI de las Fqs son más próximas a la CI₅₀ para la decatenación por la topo IV, que a la CI₅₀ para el superenrollamiento por la girasa (Blanche et al., 1996; Tanaka et al., 1997), lo que provee una evidencia bioquímica de que la topo IV es el blanco primario para las Fqs en las bacterias Gram-positivas. Sin embargo, en las bacterias Gram-negativas como *E. coli* o *Pseudomonas aeruginosa*, la situación es la opuesta; la girasa se inhibe preferentemente (Hoshino et al., 1994; Ullsperger and Cozzarelli, 1996).

1.4.5.2. Disminución de la concentración intracelular de fluoroquinolonas

Otro factor importante en la determinación de resistencia a las Fqs es la expresión de bombas de flujo dependientes de energía, que expulsan el antibiótico de la célula de forma activa. Este mecanismo, como causa de bajo nivel de resistencia a Fqs, ha sido descrito en *S. pneumoniae* (Baranova and Neyfakh, 1997; Zeller et al., 1997; Brenwald et al., 1998), y en otras bacterias Gram-positivas como *S. aureus* (Kaatz et al., 1993; Neyfakh et al., 1993; Ng et al., 1994; Muñoz-Bellido et al., 1999), *B. subtilis* (Neyfakh et al., 1991; Neyfakh, 1992) y en nuestro laboratorio para los estreptococos del grupo viridans (Ferrándiz et al., 1999). En *S. pneumoniae*, este fenotipo está relacionado con una bomba de flujo codificada por el gen *pmrA* (Gill et al., 1999), que comparte homología con el gen *norA* de *S. aureus*. La resistencia mediada por *pmrA* depende del incremento en la expresión del gen (Gill et al., 1999). El aumento de la actividad de las Fqs observado cuando se inhibe la bomba de flujo con reserpina está limitado a las Fqs más hidrofílicas, lo que sugiere que la resistencia mediada por PmrA en *S. pneumoniae* depende de la clase de Fq utilizada (Baranova and Neyfakh, 1997).

TABLA II. Cambio de los aminoácidos de las DNA topoisomerasas II de *S. pneumoniae* y su contribución al fenotipo de resistencia a fluoroquinolonas.

Cambio de aminoácido				Resistencia relativa ^a			Referencia ^b
ParC	ParE	GyrA	GyrB	CIP	SPA	CLX	
⁷⁸ D <u>SS</u> IY <u>DA</u> ⁸⁴	⁴³³ E <u>G</u> D <u>SA</u> ⁴³⁷	⁸⁰ D <u>SS</u> IY <u>EA</u> ⁸⁶	⁴³³ E <u>G</u> D <u>SA</u> ⁴³⁷				
A Aislados clínicos o de laboratorio							
— ^c	—	—	—	1	1	1	
⁸⁴ A → T	—	—	—	8	Nd	Nd	(5)
⁸³ D → Y	Nd	—	—	8	2	1	(4)
⁸³ D → H	Nd	—	Nd	4-8	2-4	Nd	(8)
⁷⁹ S → Y	Nd	—	—	4-8	2-4	Nd	(2, 3, 4, 8)
⁷⁹ S → F	—	—	—	4-8	1-2	1	(2, 4, 5, 8)
	⁴³⁵ D → N	—	Nd	4-8	1-2	Nd	(7)
	⁴³⁵ D → N	⁸¹ S → F	Nd	32	8	Nd	(7)
⁷⁹ S → F	Nd	⁸¹ S → Y	—	32-128	64	4	(2,4)
⁷⁹ S → F	Nd	⁸¹ S → F	—	64-128	64-128	2-4	(2, 3, 4)
⁷⁹ S → Y	—	⁸¹ S → Y	—	64	16	4	(2, 5, 6)
⁷⁹ S → Y	—	⁸⁵ E → K	—	64-128	128	Nd	(2, 3, 5)
⁷⁹ S → Y	Nd	⁸¹ S → F	Nd	64	64	4-8	(2, 3, 4, 6)
⁷⁹ S → Y	Nd	⁸⁵ E → K	Nd	64-128	Nd	Nd	(2)
⁷⁹ S → F	Nd	⁸⁵ E → K	Nd	64-128	Nd	Nd	(2)
⁷⁹ S → Y	—	⁸¹ S → Y	⁴³⁵ D → N	64	Nd	Nd	(5)
⁸³ D → E							
⁷⁹ S → Y	Nd	⁸¹ S → Y	Nd	128	256	Nd	(3)
		⁸⁵ E → K					
T Transformantes							
⁸³ D → Y	—	—	—	8	2	1	(4)
⁷⁹ S → Y	—	—	—	8	2	1	(3, 4, 8)
—	⁴³⁵ D → N	⁸¹ S → F	—	32	8	Nd	(1)
⁸³ D → Y	—	⁸¹ S → Y	—	32	16	2	(4)
⁷⁹ S → Y	—	⁸¹ S → Y	—	64	16	2	(4)
⁷⁹ S → F	—	⁸¹ S → F	—	64	16	8	(4)
⁷⁹ S → Y	—	⁸⁵ E → K	—	128	128	Nd	(3)

^aCIP, ciprofloxacina; SPA, sparfloxacina; CLX, clinafloxacina. Los valores de resistencia relativa son las CMI de las cepas resistentes dividido por las CMI de las cepas susceptibles.

^b Referencias: 1, (Baranova and Neyfakh, 1997); 2, (Gootz et al., 1996); 3, (Janoir et al., 1996); 4, (Muñoz and de la Campa, 1996); 5, (Pan et al., 1996); 6, (Pan and Fisher, 1998); 7, (Perichon et al., 1997); 8, (Tankovic et al., 1996).

^c — no cambio; Nd, no determinado

2. OBJETIVOS

La caracterización genética de las topoisomerasas de tipo II de *S. pneumoniae*, el conocimiento de la regulación de su expresión y de su interacción con antimicrobianos permitirá avanzar en el desarrollo tanto de nuevos fármacos más activos como de nuevas dianas moleculares en este patógeno. Los objetivos de este trabajo fueron completar la caracterización genética de las topoisomerasas de tipo II de neumococo e iniciar el estudio de la regulación de la expresión de los genes que codifican la DNA girasa.

1. Clonación y secuenciación del gen *gyrA* de *S. pneumoniae*.
2. Caracterización de la transcripción del gen *gyrA* de *S. pneumoniae*: secuencias implicadas.
3. Caracterización de una curvatura intrínseca del DNA en la región promotora de *gyrA*. Correlación entre curvatura y fuerza del promotor.
4. Estudio de la respuesta RST (estimulación de la transcripción mediada por relajación del DNA) de *gyrA* en *S. pneumoniae* y *E. coli* y efectos en el superenrollamiento del DNA.
5. Características de la transcripción del gen *gyrB* de *S. pneumoniae*: secuencias implicadas y respuesta RST.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS

Las cepas de *E. coli* y *S. pneumoniae* utilizadas en la realización de este trabajo se describen en la Tabla III. Los vectores plasmídicos, plásmidos recombinantes de *E. coli* y *S. pneumoniae*, construidos y utilizados en este trabajo se describen en las Tablas IV, V y VI, respectivamente.

Tabla III. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo/Fenotipo	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	(ϕ 80 d lacZ Δ M15) <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169	(Hanahan, 1985)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac^-</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> Z Δ M15, <i>Tn10</i> (Tc ^R)]	Stratagene
<i>E. coli</i> C-600	<i>thr-1</i> , <i>leu-6</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY1</i> , <i>supE44</i> , <i>tonA21</i>	(Kato et al., 1988)
<i>S. pneumoniae</i> R6	Silvestre, derivada de R36A, variante rugosa de la cepa tipo II D39	Rockefeller Univ.
<i>S. pneumoniae</i> T4	<i>trt1</i> , <i>hex4</i> , <i>endA1</i> , <i>exo2</i> , <i>mal594</i> , derivada de R6	(Lacks and Hotchkiss, 1960)
<i>S. pneumoniae</i> T4GyrB ^R	como T4, <i>nov-1</i> (Nov ^R)	Este trabajo
<i>S. pneumoniae</i> T4ParC ^R	como T4, <i>cip-1</i> (Cip ^R)	Este trabajo

Tabla IV. Vectores plasmídicos utilizados en este trabajo

Plásmido	Tamaño (pb)	Características	Referencia
pUC18	2686	Ap ^R . Clonaciones de <i>gyrA</i> y de fusiones <i>PgyrA-cat</i> y <i>PgyrB-cat</i>	(Yanisch-Perron et al., 1985)
pUC19	2686	Ap ^R . Clonación de fusiones <i>PgyrA-cat</i>	(Yanisch-Perron et al., 1985)
pEMBL18 ⁺	3960	Ap ^R . Clonación de <i>gyrA</i>	(Dente et al., 1983)
pCY7	4736	Ap ^R . Análisis de curvatura	(Prentki et al., 1987)
pLS1	4408	Tc ^R . Clonación de deleciones 5' de <i>PgyrA-cat</i> y fusión <i>PgyrB-cat</i>	(Lacks et al., 1986)
pJS3	4100	<i>cat</i> bajo el control de dos promotores: P _{tet} (constitutivo) y P _{cat} (inducible por Cm)	(Ballester et al., 1986)
pBR322	4361	Tc ^R , Ap ^R . Marcador de peso molecular en ensayos de curvatura	(Bolivar et al., 1977)

Tabla V. Plásmidos recombinantes de *E. coli* utilizados en este trabajo

Nombre	Vector	Inserto (pb) *	Características	Referencia
pBEND-11	pCY7	-128 a 94 de <i>gyrA</i>	222pb / <i>DraI-SacI</i> de pGYAN6 en pCY7/ <i>SacI</i>	Fig. 5
pBEND126	pCY7	-126 a 3 de <i>gyrA</i>	PCR pGYAC126/Directo+ <i>gyrA1XbaI</i> , digestión <i>SacI-XbaI</i> y clonación en pCY7	Figs 9 y 10
pGYAC1	pUC19	-311 a 3 de <i>gyrA</i>	Fusión <i>PgyrA-cat</i>	Figs 9 y 10
pGYAC3,-9	pUC18	-311 a 3 de <i>gyrA</i>	Fusión <i>PgyrA-cat</i>	Figs 9 y 10
pGYAC31	pUC19	-31 a 3 de <i>gyrA</i>	Deleción 5'-pGYAC1	Figs 9 y 10
pGYAC59	pUC19	-59 a 3 de <i>gyrA</i>	PCR pGYAC1/-10 <i>gyrASalI</i> +cat-end2 <i>HindIII</i> , digestión y clonación en pUC19	Figs 9 y 10
pGYAC67	pUC19	-67 a 3 de <i>gyrA</i>	Deleción 5'-pGYAC1	Figs 9 y 10
pGYAC69	pUC19	-69 a 3 de <i>gyrA</i>	Deleción 5'-pGYAC1	Figs 9 y 10
pGYAC126	pUC19	-126 a 3 de <i>gyrA</i>	Deleción 5'-pGYAC1	Figs 9 y 10
pGYAC149	pUC19	-149 a 3 de <i>gyrA</i>	Deleción 5'-pGYAC1	Figs 9 y 10
pGYAC182	pUC19	-182 a 3 de <i>gyrA</i>	Deleción 5'-pGYAC1	Figs 9 y 10
pGYAC233	pUC19	-233 a 3 de <i>gyrA</i>	Deleción 5'-pGYAC1	Figs 9 y 10
pGYAC249	pUC19	-249 a 3 de <i>gyrA</i>	Deleción 5'-pGYAC1	Figs 9 y 10
pGYAC269	pUC19	-269 a 3 de <i>gyrA</i>	Deleción 5'-pGYAC1	Figs 9 y 10
pGYAC281	pUC19	-281 a 3 de <i>gyrA</i>	Deleción 5'-pGYAC1	Figs 9 y 10
pGYAC283	pUC19	-283 a 3 de <i>gyrA</i>	Deleción 5'-pGYAC1	Figs 9 y 10
pGYAN1,-3	pEMBL18 ⁺	1301 a 2187 de <i>gyrA</i>	Ver detalles en el texto	Fig. 5
pGYAN6	pEMBL18 ⁺	-311 a 536 de <i>gyrA</i>	"Primer extension" <i>gyrA</i>	Fig. 5
pGYAN11	pEMBL18 ⁺	1982 a 3605 de <i>gyrA</i>	Ver detalles en el texto	Fig. 5
pGYAN31	pUC18	404 a 1456 de <i>gyrA</i>	Ver detalles en el texto	Fig. 5
pPGYAN1	pUC18	-311 a 47 de <i>gyrA</i>	PCR pGYAN6/Reverso+ <i>gyrA16EcoRI</i> , digestión <i>KpnI-EcoRI</i> y clonación en pUC18	Figs 9
pQRDR26	pUC18	107 a 536 de <i>gyrA</i>	PCR R6/ <i>gyrA46XbaI</i> + <i>gyrA172HindIII</i> , digestión y clonación en pUC18	(Muñoz and de la Campa,1996), Fig. 5
pGYBC1,-5	pUC18	-452 a 3 de <i>gyrB</i>	Fusión <i>PgyrB-cat</i>	Fig. 24
pGYRN5	pEMBL18 ⁺	-452 a 1704 de <i>gyrB</i>	-	(Muñoz et al., 1995)
pGYRN8.1	pUC18	-452 a 1704 de <i>gyrB</i>	pGYRN5 digerido con <i>HindIII+EcoRI</i> y clonado en pUC18	Fig. 24

* Se indican las posiciones incluidas en el inserto, considerando el primer nucleótido de *gyrA* o *gyrB* como posición +1.

Tabla VI. Plásmidos recombinantes de *S. pneumoniae* utilizados en este trabajo

Nombre	Estirpe	Marcador	Inserto (pb)	Construcción	Referencia
pLGYAC31	C-600, T4, T4GyrB ^R , T4ParC ^R	Tc ^R	688	PCR pGYAC31/directo <i>EcoRI</i> +cat-end2 <i>HindIII</i> , digestión y clonación en pLS1	Figs 9 y 10
pLGYAC59	C-600, T4, T4GyrB ^R , T4ParC ^R	Tc ^R , Cm ^R	719	PCR pGYAC59/directo <i>EcoRI</i> +cat-end2 <i>HindIII</i> , digestión y clonación en pLS1	Figs 9 y 10
pLGYAC69	C-600, T4, T4GyrB ^R , T4ParC ^R	Tc ^R , Cm ^R	726	PCR pGYAC69/directo <i>EcoRI</i> +cat-end2 <i>HindIII</i> , digestión y clonación en pLS1	Figs 9 y 10
pLGYAC126	C-600, T4, T4GyrB ^R , T4ParC ^R	Tc ^R , Cm ^R	783	PCR pGYAC126/directo <i>EcoRI</i> +cat-end2 <i>HindIII</i> , digestión y clonación en pLS1	Figs 9 y 10
pLGYBC452	T4	Tc ^R , Cm ^R	1109	pGYBC1/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> y clonación en pLS1	Fig. 24
pMJSPN1	T4,	Tc ^R , Cm ^R	1360	Fusión del promotor <i>atp</i> (ATPasa de membrana F ₀ F ₁) con <i>cat</i> .	Laboratorio

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

E. coli se creció en el medio de Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989), con 1,5% de agar (p/v) para los cultivos en medio sólido.

S. pneumoniae se creció en Todd-Hewitt (Difco, Detroit, Michigan, Estados Unidos) con 0,5% de extracto de levadura (Difco) ó AGCH (Lacks, 1966) con 0,3% de sacarosa y 0,2% de extracto de levadura. Los compuestos del medio AGCH fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania) a excepción del hidrolizado enzimático de caseína y los casaminoácidos que fueron proporcionados por Pronadisa (Madrid, España) y la catalasa por Calbiochem (Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, California, Estados Unidos). Para los cultivos en medio sólido se emplearon placas de agar (Difco) con 5% de sangre de carnero desfibrinada ó placas de AGCH con agar al 3%.

3.3. ENZIMAS Y REACTIVOS

3.3.1. ENZIMAS

Las enzimas de restricción fueron suministradas por Amershan Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Reino Unido) y MBI Fermentas (Vilnius, Lituania). Las enzimas utilizadas para PCR fueron Taq polimerasa (Pharmacia), ExpandTM High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim, Alemania) y DNA polimerasa (Biotools, Elmhurst, Illinois, Estados Unidos). La T4 DNA ligasa, polinucleótido quinasa y fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* fueron suministrados por Pharmacia y Fermentas y la transcriptasa reversa MMLV (“Moloney murine leukemia virus”) por Gibco-BRL. Todas las enzimas fueron utilizadas según las especificaciones de los distintos laboratorios.

3.3.2. REACTIVOS

3.3.2.1. Antibióticos

Los antibióticos fueron proporcionados por los laboratorios fabricantes en forma de polvos de potencia definida. Se disolvieron en los diluyentes recomendados y se congelaron. Los antibióticos ampicilina, tetraciclina y novobiocina fueron suministrados por Sigma (St. Louis, Mo.). La ciprofloxacina fue proporcionada por Bayer (West Haven, CT, Estados Unidos) y el cloramfenicol por Boehringer Mannheim.

3.3.2.2. Productos químicos

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos fueron suministrados en su mayoría por Merck (Darmstadt, Alemania), así como los colorantes para electroforesis, detergentes, persulfato amónico, urea, seroalbúmina bovina, dimetil sulfóxido, lisozima y glicerol. El ATP, IPTG, X-GAL, DTNB, DNA de esperma de salmón, deoxicolato, RNAasa, DNAasa y cloroquina fueron proporcionados por Sigma y el acetil-Coenzima A y la proteinasa K por Boehringer Mannheim. El β -mercaptoetanol fue suministrado por Bio-Rad (Hercules, California, Estados Unidos).

Los reactivos para electroforesis, marcadores de peso molecular, acrilamida, N,N'-metilen-bisacrilamida, duodecil sulfato sódico (SDS), N-N'-N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED), y el reactivo empleado para la cuantificación de las proteínas por el método de

Bradford fueron suministrados por Bio-Rad.

El DNA fue recuperado de los geles utilizando el sistema Gene Clean II Kit (Bio 101, La Jolla, CA, Estados Unidos) y columnas Microcon® PCR de Millipore. Para eliminar los oligonucleótidos de los productos de PCR se emplearon columnas MicroSpin S400 HR de Pharmacia.

Millipore suministró también las membranas para transferencia Immobilon™-Y e Immobilon™ NY⁺ y los filtros de nitrocelulosa de 0,45, 0,22 y 0,025 μm.

Para la cromatografía en capa fina se utilizaron las capas Silica-gel 60 proporcionadas por Merck.

Para revelar los “Southern blot” se utilizaron pantallas Fujibas que se visualizaron en un equipo FujiBas mediante el programa BasReader 2-9 (Raytest Isotopenme ßgeräte GmbH) y se analizaron con el programa Tina 2.09 de la misma casa. Los “Southern blot” también fueron expuestos con películas Kodak X-Omat UVfilm, que se revelaron con productos de Eastman Kodak. Cuando fue necesario se emplearon pantallas amplificadoras de señal radiográfica (Dupont).

3.3.2.3. Productos radiactivos

El DNA fue marcado con [α -³²P]dATP y [α -³²P]dCTP de actividad específica 300 Ci/mmol. En las reacciones de secuenciación se utilizó [α -³⁵S]dATP con actividad específica de 1.000 Ci/mmol. Estos isótopos fueron suministrados por Amershan-Pharmacia-Biotech. En el ensayo de actividad CAT (Cloramfenicol-acetil-transferasa) en capa fina se utilizó Cm-¹⁴C de actividad específica de 55 mCi/mmol y fue suministrado por Itisa Biomedica.

3.3.2.4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados como cebadores en reacciones de secuenciación ó de PCR fueron proporcionados por el Servicio de Biopolímeros del Instituto de Salud Carlos III o por Pharmacia. En la Tabla VII se relacionan dichos oligonucleótidos.

Tabla VII. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Oligonucleótidos	Secuencia 5'→3' ^a	Utilidad
-10gyrA	5'-gcgctcGACGGGAATTTATGGTATAAT-3'	Construcción de pGYAC59
512	5'-AGTAAATTTTAAATAAAAAGGAGAATTC ATC-3'	Construcción de pGYAN6
cat2	5'-AACTTTAATAAAAATTGATTTAGAC-3' NFNKIDLD	Amplificación de <i>cat</i>
cat-end	5'-gcgagcTCTCATATTATAAAAGCCAGTC-3'	Amplificación de <i>cat</i>
cat-end2	5'-gcgcaagctTCTCATATTATAAAAGCCAGTC-3'	Construcción pGYAC59 y amplificación de fusiones transcripcionales (<i>gyrA/gyrB/cat</i>)
directo	5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'	Amplificación, construcción y secuenciación de diferentes plásmidos
reverso	5'-CAGGAAACAGCTATG-3'	Como para el oligo directo
gyrA1	5'-CATTAATAAATGCCTCATTTTCAC-3'	Construcción de pGYAC3/pGYAC9
gyrA1- <i>Xba</i> I	5'-gcgctctagaCATTAATAAATGCCTCATTTTCAC- 3'	Construcción de pBEND126
gyrA9	5'-gcgagcTCAATCTGACAAAGGAGATG-3' VNLTKEM	Construcción de pGYAC3/pGYAC9
gyrA16	5'-gcggaattcTTCATCTCCTTTGTCAGATTG-3' NLTKEMK	Amplificación de la región promotora de <i>gyrA</i>
gyrA20	5'-CACTCATGGCGTAGTCG-3' DYAMS	"Primer extensión" de <i>gyrA</i>
gyrA46	5'-gcgctctaGA(C/T)GGT(C/T)TNAAACNGT NCA-3' DGLKPVH	Construcción de pGYAN31
gyrA172	5'-gcgcaagcTTTGTAGCCATACCNACNGCAA TNCC-3' GIAVGMATN	Construcción de pGYAN6
gyrA435	5'-gcgctcgACNGATCA(A/G)GATGA(A/G)G TT-3' DKIQSEYDD	Construcción de pGYAN1/pGYAN3
gyrA607	5'-gcgctgacGA(T/C)GCNTA(T/C)CTNNT (C/T)TT(T/C)ACNAC-3' DDAYLFFTT	Construcción de pGYAN11
gyrA717	5'-GGATATGGTAAGCGTACAGTCGC-3'	Secuenciación de <i>gyrA</i>
gyrA730	5'-AAGGTCGTGGTGGTAAGGG-3'	Secuenciación de <i>gyrA</i>
gyrB1	5'-CATCTTATTCCTTTTCTTATATG-3'	Amplificación de la región promotora de <i>gyrB</i> . Construcción de pGYBC1/ pGYBC5
gyrB22	5'-CGCATACGAACAGCCTCTAAGCCC-3' GLEAVRMR	"Primer extension" de <i>gyrB</i>
gyrB555	5'-CCAGCCGGGTGCAGATCAAG-3' QPGADQ	Como para <i>gyrB1</i>
parC50	5'-cggaagcttGTTGGTTCTTTCTCCGTATCG-3' KDSNTF	Amplificación de la QRDR de <i>parC</i>
parC152	5'-gcgctctagAAGGATAGCAATAC TTTT-3' DTEKEPY	Amplificación de la QRDR de <i>parC</i>
Spnga-1	5'-GTTTGTCTGGGGTCACACCC-3'	Secuenciación de <i>gyrA</i>
Spnga-4	5'-GTCAAGCGCGACGCTCAGCC-3'	Secuenciación de <i>gyrA</i>
Spnga-5	5'-CGCTCATATCTTAGAAG-3'	Secuenciación de <i>gyrA</i>
Spnga-6	5'-GGCTGAGGCGTCGCGCTTGA-3'	Secuenciación de <i>gyrA</i>
Spnga-7	5'-CCTGTTTCATAAGCCTTATG-3'	Secuenciación de <i>gyrA</i>

Oligonucleótidos	Secuencia 5'→3' ^a	Utilidad
Spnga-8	5'-GGTGCTCTTGTCATGGGAAAT-3'	Secuenciación de <i>gyrA</i>
Spnga-9	5'-GAAGAGCAGATGATCATGGG-3'	Secuenciación de <i>gyrA</i>
Spnga-10	5'-GAACCAGTGTTAAGGAGTT-3'	Secuenciación de <i>gyrA</i>
Spnga-11	5'-GGCAAACCTCTTAACACTGG-3'	Secuenciación de <i>gyrA</i>
Spnga-67	5'-CGTAAATTTTCTGATAAACGCC-3'	Secuenciación de <i>gyrA</i>

^a. Los aminoácidos codificados se representan en negrita. Las dianas de restricción en el extremo 5' presentes en algunos de los oligonucleótidos se indican en minúscula, estas son *EcoRI* (*gyrA*16), *HindIII* (*gyrA*172, *cat-end2* y *parC50*), *PstI* (*gyrA*435), *SacI* (*gyrA*9 y *cat-end*), *SalI* (*gyrA*607 y -10*gyrA*) o *XbaI* (*gyrA*46, *parC*152 y *gyrA*1-*XbaI*).

3.4. CULTIVO DE BACTERIAS Y PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS

E. coli se creció a 37°C y con agitación en medio líquido. Los cultivos se almacenaron congelados a -80°C en medio LB líquido, con su antibiótico correspondiente y un 25% de glicerol (Sambrook et al., 1989). La transformación de *E. coli* se realizó según el método de Hanahan (Hanahan, 1985). Los transformantes fueron seleccionados en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina, 10 µg/ml de tetraciclina o distintas concentraciones de cloramfenicol, según el plásmido considerado. El muestreo de colonias de *E. coli* XL1-Blue transformadas con plásmidos recombinantes se hizo en medio LB con X-GAL, IPTG y ampicilina, que permitió la identificación de los recombinantes por mostrar color blanco en dichas placas (Sambrook et al., 1989).

Para el aislamiento de *S. pneumoniae*, los cultivos fueron crecidos en medios líquidos a 37°C sin agitación o en medios sólidos a 37°C en un 5% de CO₂. Los cultivos se conservaron a -80°C en el medio líquido con el antibiótico correspondiente y glicerol al 25%. La transformación de *S. pneumoniae* fue realizada según un procedimiento descrito previamente (Lacks, 1966). Los transformantes se seleccionaron en AGCH sólido con 1 µg/ml de tetraciclina y distintas concentraciones de cloramfenicol.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada por el método de dilución en agar. El inóculo se preparó resuspendiendo algunas colonias de un cultivo fresco en placa, en suero salino estéril al 0,9% y ajustando la turbidez al 0,5 del estándar de McFarland (10⁸ UFC/ml). Esta suspensión fue diluida para conseguir una concentración final de 10⁴ UFC/ml y dispensada con un replicador. Para las cepas de *E. coli* se utilizaron placas de agar Mueller-

Hinton (Difco) y para *S. pneumoniae* placas de agar Mueller-Hinton suplementadas con un 5% de sangre de carnero desfibrinada y con concentraciones crecientes de antibiótico. Las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 h. Las cepas de neumococo se incubaron a 37°C en presencia de 5% de CO₂. La realización de la técnica, definición de CMI, uso de cepas control e interpretación de los resultados de sensibilidad se llevó a cabo siguiendo las instrucciones y criterios del “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS., 1993).

3.5. AISLAMIENTO Y MANIPULACION DEL DNA

3.5.1. Extracción de DNA cromosómico

El DNA cromosómico de *S. pneumoniae* fue obtenido como se ha descrito previamente (Fenoll et al., 1994).

3.5.2. Aislamiento y purificación de plásmidos

Los plásmidos de *E. coli* fueron obtenidos por el método de lisis alcalina (Birnboim and Doly, 1979). Para la extracción a gran escala se utilizó el sistema comercial QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y para el aislamiento a pequeña escala el High Pure™ Plasmid Isolation Kit (Boehringer Mannheim).

La extracción de los plásmidos de *S. pneumoniae* se hizo según un método previamente publicado (Stassi et al., 1981) y para el análisis del nivel de superenrollamiento por métodos publicados (Clewell and Helinski, 1970; 1972).

La purificación de los plásmidos se llevó a cabo por centrifugación en gradiente de densidad cloruro de cesio/bromuro de etidio (Sambrook et al., 1989).

3.5.3. Electroforesis

La separación preparativa y analítica de los plásmidos, fragmentos de restricción, y productos de PCR se realizó en geles de agarosa o poliacrilamida (Sambrook et al., 1989).

Los ensayos de curvatura de fragmentos de DNA se realizaron en geles no desnaturizantes de 3,5% de poliacrilamida, a tres temperaturas diferentes, 6, 20 y 60°C y se corrieron a 8 V/cm en tampón TBE (45 mM Tris-borato, 1mM EDTA). Los fragmentos de DNA fueron visualizados por tinción con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. El DNA del

pBR322, digerido con *Hph*I, fue utilizado como un marcador de peso molecular sin curvatura. El trazado semilogarítmico de la movilidad relativa de los fragmentos del marcador fue calibrado utilizando el ajuste de mínimos cuadrados. La movilidad aparente de cada fragmento de DNA fue extrapolada a partir del trazado calibrado de los mínimos cuadrados y se calculó el cociente entre el tamaño aparente a 6 y 60°C, factor $R^{6/60}$ (Poljak and Gralla, 1987).

Para los ensayos de permutación circular, los fragmentos de DNA se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 5%, se corrieron a 2 V/cm en TBE durante 18 h a 4°C, y se visualizaron por tinción con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio.

Para el análisis de la curvatura se utilizó el programa DNASTAR (DNASTAR, Inc., London, United Kingdom).

Para analizar el nivel de superenrollamiento de plásmidos, se realizaron electroforesis en geles al 1% de agarosa con 5 µg/ml de cloroquina que se corrieron a 2,5 V/cm en tampón TBE, con la misma concentración de cloroquina, durante 16 h. Para la visualización de los plásmidos, se lavaron los geles con agua durante 2 h y se tiñeron 1 h con 5 µg/ml de bromuro de etidio. El DNA plasmídico fue transferido a membranas ImmobilonTM NY⁺ y se hibridaron con una sonda del inserto *cat* del plásmido pLGYAC126. La sonda se marcó con 20 µCi de [α -³²P]dCTP (300 Ci/mmol) que se incluyeron en la mezcla de una reacción de PCR con los oligonucleótidos *cat*2 y *cat*-end2. Las membranas fueron expuestas en pantallas Fujibas o en películas Kodak X-Omat a -80°C de 1 a 7 días.

3.5.4. Hibridación de DNA

Los “Southern blots” y la hibridación de colonia *in situ* (método de Grünstein and Hognes) fueron realizados según métodos publicados (Sambrook et al., 1989). El DNA fue marcado con 50 µCi de [α -³²P]dCTP (300 Ci/mmol) utilizando el sistema Multiprime DNA Labelling (Amersham). El isótopo no incorporado se eliminó utilizando las columnas MicrospinTM S-300 HR (Resina Sephacril S-300 HR) o columnas MicroSpin S400 HR de Amersham-Pharmacia.

Las sondas de DNA específicas derivadas de regiones previamente clonadas se obtuvieron por amplificación por PCR con los oligonucleótidos adecuados. Los productos de

PCR se aislaron de geles de agarosa y se marcaron radiactivamente utilizando el sistema indicado.

3.5.5. Construcción de plásmidos con deleciones en 5' de la fusión transcripcional *PgyrA-cat*

Las deleciones se realizaron siguiendo el protocolo y utilizando los reactivos del sistema comercial double-stranded Nested Deletion (Pharmacia). El método para construir deleciones unidireccionales en DNA de doble cadena se basa en la digestión controlada del DNA con la exonucleasa III de *E. coli* (Exo III). Esta enzima es una 3'-exonucleasa que es activa sólo sobre DNA de doble cadena: los extremos romos y 5'-protuberantes son susceptibles a la digestión, mientras que los extremos 3'-protuberantes son resistentes. El resultado del tratamiento con Exo III es DNA de doble cadena con una región de cadena sencilla que posteriormente se digiere con la nucleasa S1. El plásmido pGYAC1 fue digerido con *HindIII* y *PstI* generando un extremo sensible, adyacente a la secuencia promotora del gen *gyrA*, y un extremo resistente a la Exo III, respectivamente. El plásmido linearizado fue incubado a 30°C con la enzima, tomándose muestras cada 1 min que fueron tratadas con la nucleasa S1 y analizadas en geles de agarosa para determinar el tamaño de la deleción. Las muestras con deleciones se recircularizaron con T4 DNA ligasa y se transformaron en *E. coli* XL1-Blue. Los plásmidos que llevan deleciones de la fusión transcripcional fueron numerados asignando el valor 1 a la base A del codon de iniciación ATG de *gyrA* y en todos ellos se comprobó la extensión de la deleción por secuenciación.

3.6. AMPLIFICACION POR PCR, DETERMINACION Y ANALISIS DE LA SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS

La amplificación específica del DNA por PCR se realizó utilizando 2 unidades de Taq polimerasa, 1 µg de DNA cromosómico, 1 µM de cada oligonucleótido sintético, 200 µM de cada dNTP y 3,5 mM de MgCl₂ en el tampón recomendado por el fabricante. La amplificación se llevó a cabo con un ciclo inicial de 5 min de desnaturalización a 95°C, 15 min de hibridación a 55°C (7 min antes y 8 min después de añadir la enzima), y 6 min de extensión a 72°C. Después, 20 ciclos de 1 min a 95°C, 2 min a 55°C y 2,5 min de extensión a

72°C, con un ciclo final de extensión de 20 min a 72°C y enfriamiento lento a 4°C.

Para las reacciones de PCR con los oligonucleótidos *gyrA*46 y *gyrA*435, las condiciones, menos específicas, fueron las siguientes: un ciclo inicial de 5 min de desnaturalización a 95°C y 60 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 40°C y 2,5 min a 72°C.

La secuenciación del DNA se llevó a cabo utilizando los protocolos y el material del sistema comercial “Sequenase System” (U.S. Biochemical). Todas las secuencias fueron determinadas en ambas hebras del DNA. Las reacciones de secuencia se analizaron mediante electroforesis en geles de acrilamida al 6% con 42% de urea. Las comparaciones de secuencias de DNA y proteínas se realizaron utilizando el programa informático de Intelligenetics PCGENE 6.0.

A la secuencia correspondiente al gen *gyrA* se le ha asignado en GenBank el número de acceso AF053121.

3.7. PURIFICACION Y ANALISIS DE RNA

Células de cultivos de *E. coli* XL1-Blue llevando los plásmidos pGYAN6 (*gyrA*) y pGYRN5 (*gyrB*), se recogieron en fase exponencial ($OD_{600nm} = 0,50$), se resuspendieron en 2,5 ml de solución de lisis (20 mM de acetato sódico pH 5.5, 1 mM de EDTA y 1 mg/ml de lisozima) y se lisaron por congelación (-70°C) y calentamiento rápido (37°C) durante varias veces. La solución se llevó a 0,5% de duodecil sulfato sódico (SDS), y los RNAs se extrajeron tres veces con fenol saturado con 20 mM de acetato sódico pH 5,5 a 70°C y se precipitaron dos veces. La pureza y concentración del RNA fueron determinadas por electroforesis y espectrofotometría.

En el ensayo de “primer extension”, el RNA celular (3-15 µg) fue hibridado con 1 pmol del oligonucleótido *gyrA*20 para *gyrA* y *gyrB*22 para *gyrB*, mediante enfriamiento lento de 65 a 20°C, en 14 µl de 50 mM de Tris pH 8.3, 75 mM de KCl y 3 mM de MgCl₂. La muestra se llevó a un volumen final de 20,5 µl, y se incubó durante 30 min a 37°C con 8 unidades de transcriptasa reversa M-MLV en presencia de 100 µM de dNTPs (excepto dATP), 10 mM de DTT, 9.75 µM de dATP frío y 15 µCi de [α -³²P]dATP (300 Ci/mmol). El producto fue extraído con fenol, precipitado y resuspendido en 4 µl de solución de tinción de formamida para su conservación a -20°C.

3.8. ENSAYO ESPECTROFOTOMETRICO DE ACTIVIDAD CLORAMFENICOL ACETIL TRANSFERASA (CAT)

La determinación de la actividad CAT se realizó por el método espectrofotométrico de Shaw (Shaw, 1979), que mide el grado de acetilación del cloramfenicol en una reacción acoplada. La transferencia de un grupo acetilo desde acetil-coenzima A al cloramfenicol produce la reducción de la coenzima A (CoA-SH). La reacción de CoA-SH con el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), genera disulfuro de CoA, ácido tionitrobenzoico y un equivalente molar de 5-tio-2-nitrobenzoato. Este último es el compuesto que produce la reacción coloreada y absorbe a 412nm. Una unidad de actividad CAT es equivalente a 1 μ mol de cloramfenicol acetilado por minuto.

3.8.1. Preparación de extractos celulares

Para la preparación de extractos de *S. pneumoniae*, se inocularon 100 μ l de cultivos glicerolados de la cepa T4 con los plásmidos pLGYAC126, -69, -59, -31 y pMJSPN1, en 100 ml de medio fresco AGCH (suplementado con 0,3% de sacarosa y 0,2% de extracto de levadura) y 1 μ g/ml de tetraciclina o 2,5 μ g/ml de cloramfenicol para el plásmido pMJSPN1. Los cultivos se crecieron a 37°C hasta una OD_{650nm} de 0,2 a 0,4. En este momento se tomaron 2 ml del cultivo (t = 0) y el resto se fraccionó en dos cultivos de 40 ml. A uno de ellos, se le añadió novobiocina o ciprofloxacina a una concentración previamente determinada, y al otro, agua destilada en el mismo volumen que el antimicrobiano correspondiente. Se continuó el crecimiento, que se monitorizó por medida de la OD_{650nm}, tomándose muestras de 2 ml a diferentes tiempos tras la adición del antimicrobiano. Las células se centrifugaron a 5.000 r.p.m. durante 5 min a 4°C, se lavaron con 1,33 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 50 μ M β -mercaptoetanol, y se lisaron por incubación a 30°C durante 10 min en el mismo tampón con 0,1% de deoxicolato sódico. Los lisados se pasaron dos veces por una jeringa de insulina y se almacenaron congelados a -80°C hasta su utilización.

Para la obtención de extractos de *E. coli*, se inocularon 100 μ l de cultivos de C-600 con los plásmidos pLGYAC126, -69, -59 y -31, crecidos toda la noche en medio LB con el antibiótico adecuado, en el mismo medio sin antibiótico, reanudando el crecimiento hasta una OD_{650nm} de 0,2 a 0,4. Como solución de lisis se utilizó el mismo tampón que para neumococo,

pero con 25 µg/ml de lisozima.

3.8.2. Medida de ACTIVIDAD CAT

La mezcla de reacción se preparó a partir de los componentes disolviendo 4 mg de DTNB en 1 ml de 1 M Tris-HCl pH 7.8, a la que se añadieron 200 µl de 5mM acetil-CoA ajustando el volumen a 10 ml con agua destilada. En una cubeta de espectrofotómetro, se mezclaron 0,9 ml de esta mezcla de reacción (0.4 mg/ml DTNB, 100 mM Tris-HCl pH 7,8 y 0.1 mM Acetil-CoA) y 50 µl de cada extracto. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 min y se midió el incremento de A_{412nm} cada 10 seg durante 2 min (ΔA_o). Se añadieron entonces, 50 µl de 2 mM cloramfenicol y se midió el incremento de A_{412nm} durante el mismo intervalo de tiempo (ΔA_c).

La actividad específica CAT se determinó según la fórmula:

$$\frac{\Delta A_c - \Delta A_o}{0,0136 \times \text{mg/ml proteína}} \times \text{nmoles/ml} = \text{Unidades de actividad CAT en nmoles de Cm acetilado/mg de proteína}$$

Donde:

ΔA_c : incremento de A_{412nm} entre 60 y 120 seg después de añadir cloramfenicol.

ΔA_o : incremento de A_{412nm} entre 60 y 120 seg antes de añadir cloramfenicol.

0,0136: coeficiente de extinción molar del DTNB.

La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el sistema comercial de Bio-Rad. Como patrón de concentración se utilizó una solución definida de albúmina sérica bovina.

3.9. ENSAYO DE ACTIVIDAD CAT EN CAPA FINA

Este ensayo se basa en la detección de las formas acetiladas y no acetiladas de cloramfenicol marcado con ^{14}C en cromatografía en capa fina.

Los extractos celulares se prepararon como se describe en el apartado 3.8.1.

Para la medida de la actividad CAT, se añadieron 100 μl de la mezcla de reacción (0,25 M Tris-HCl pH 7.5, 0,5 mM Acetil-CoA y 0,1 μCi ^{14}C -Cloramfenicol) a los extractos celulares (30 μl de cada extracto + 20 μl de 0,25 M Tris-HCl pH7,5) y se incubaron durante 2 h a 37°C. Se añadió a las muestras 1 ml de acetato de etilo, se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 1 min a temperatura ambiente, recuperando la fase superior orgánica que fue secada a vacío. Las muestras fueron resuspendidas en 20 μl de acetato de etilo y cargadas en capas de sílica-gel. La cromatografía fue desarrollada en cloroformo:metanol (19:1). Las capas fueron reveladas por exposición en pantallas Fujibas. Para determinar la correlación entre unidades PSL, μCi y nmoles, se depositan en la capa fina volúmenes variables (5, 2.5, 2 y 1 μl) de la mezcla de reacción. En cada experimento, el volumen final de las muestras es de 150 μl , por lo que de $\text{Cm-}^{14}\text{C}$ tendremos 0,1 $\mu\text{Ci}/150 \mu\text{l}$ (= 0,00066 μCi). Como la actividad específica del $\text{Cm-}^{14}\text{C}$ es de 55 mCi/mmol, en cada muestra de reacción 1 μCi equivale a 18 nmoles. El resultado en unidades PSL de cada volumen de la mezcla de reacción depositada en la capa fina se correlaciona matemáticamente con esta equivalencia, teniendo en cuenta que 100 μl de la mezcla de reacción tienen 0,1 μCi de $\text{Cm-}^{14}\text{C}$. En los experimentos de inducción con novobiocina la correlación aplicada fue de 1 μCi = 18 nmoles = 37033 PSL, y en los experimentos de inducción con ciprofloxacina de 1 μCi = 18 nmoles = 36375 PSL.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACION GENETICA DEL GEN *gyrA* DE *S. pneumoniae*

4.1.1. Clonación del gen *gyrA* de *S. pneumoniae*

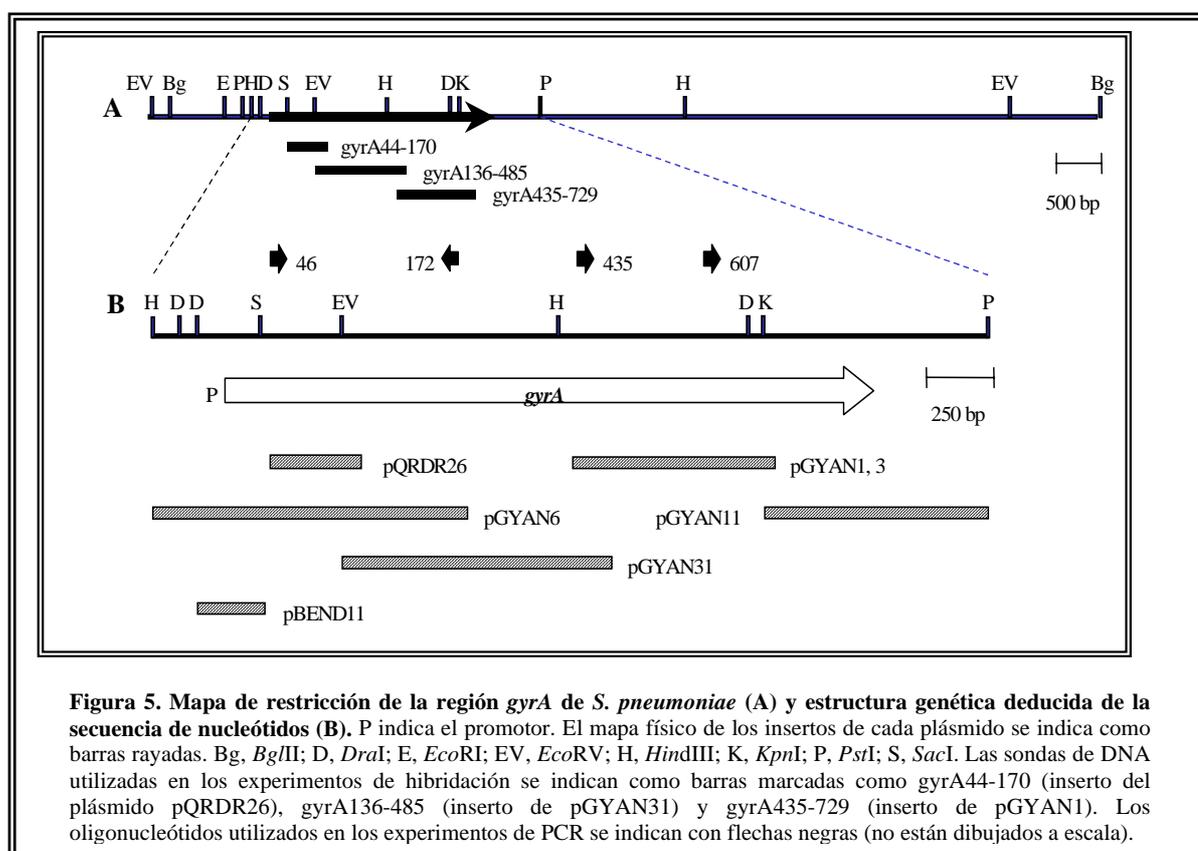
En nuestro laboratorio se había clonado previamente, en el plásmido pQRDR26 (Muñoz and de la Campa, 1996), una región del genoma de *S. pneumoniae* R6 que codifica los aminoácidos 44-170 de GyrA (Fig. 5) que incluye la QRDR.

En esta tesis se ha diseñado una estrategia de clonación mediante reacciones solapantes de PCR (“PCR-walking”) para clonar el gen *gyrA* completo. Esta estrategia requirió la construcción de una serie de oligonucleótidos degenerados, basados en la secuencia de aminoácidos de proteínas GyrA conocidas, que se diseñaron según el uso de codones en *S. pneumoniae*. Estos oligonucleótidos se utilizaron en amplificaciones de PCR, bien solos, o en combinación con un oligonucleótido rico en A-T, 512 (Fenoll et al., 1994), que teóricamente podría anillar en cualquier región del cromosoma de neumococo, que es rico en A-T. Entre los productos de PCR resultantes, se identificaron los correspondientes a *gyrA*, tanto por hibridación con sondas de DNA específicas derivadas de las regiones previamente clonadas, como por la presencia de dianas de restricción que estuvieran asimismo presentes en el DNA cromosómico del gen *gyrA*, y que habían sido localizadas mediante experimentos de hibridación del DNA cromosómico (“Southern-blot”) (Fig. 5). Posteriormente, los fragmentos que cumplían estas características (hibridación positiva, tamaño apropiado y dianas de restricción adecuadas) se aislaron de geles de agarosa, se digirieron con endonucleasas de restricción cuyas dianas estaban presentes en los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y/o en el gen *gyrA*, y se clonaron en vectores de *E. coli*. Los clones recombinantes se verificaron una vez más mediante hibridación *in situ* con la misma sonda de DNA que había sido utilizada para la identificación inicial de los productos de PCR.

La región N-terminal de *gyrA* fue amplificada utilizando los oligonucleótidos *gyrA*172 (degenerado) y 512 (rico en A-T) (Figs 5 y 6). Los productos de PCR que hibridaron con la sonda *gyrA*44-170, obtenida a partir del plásmido pQRDR26 por medio de una amplificación por PCR con los oligonucleótidos *gyrA*46 y *gyrA*172, se aislaron de geles de agarosa, se cortaron con *Hind*III (diana incluida en *gyrA*172 y en la región N-terminal de *gyrA*) y se clonaron en pEMBL18⁺ cortado con la misma enzima de restricción. Se seleccionó uno de los plásmidos (pGYAN6) por hibridación de colonia *in situ* utilizando la sonda *gyrA*44-170. La

secuencia de nucleótidos de su inserto se correspondió con la secuencia N-terminal de GyrA, y se detectó en uno de sus extremos el oligonucleótido gyrA172 (Fig. 5).

Para clonar la región C-terminal de *gyrA* se realizaron experimentos de PCR utilizando uno de los tres oligonucleótidos degenerados siguientes: gyrA46, gyrA435, y gyrA607 (Figs 5 y 6). Para la obtención del plásmido pGYAN31 (Fig. 5), se amplificó el DNA cromosómico de R6 utilizando gyrA46. Los productos de PCR que hibridaron con la sonda gyrA44-170, se aislaron de geles de agarosa, se cortaron con *EcoRV* (diana localizada en *gyrA*) (Fig. 5) y *XbaI* (diana incluida en el oligonucleótido), y se ligaron a pUC18 cortado con *XbaI+SmaI*. Finalmente, pGYAN31 fue seleccionado por hibridación de colonia *in situ*, con la misma sonda de DNA, gyrA44-170. Para la construcción de los plásmidos pGYAN1 y pGYAN3, se utilizó el oligonucleótido gyrA435 en la amplificación por PCR, y la sonda gyrA136-485 correspondiente al inserto del plásmido pGYAN31, que se obtuvo por amplificación con los oligonucleótidos directo y reverso, para la hibridación. Los fragmentos de PCR con hibridación positiva fueron aislados de geles de agarosa, cortados con *PstI* (una diana incluida en el oligonucleótido gyrA435) y clonados en pEMBL18⁺ digerido con la misma enzima. El aislamiento del plásmido pGYAN11 se realizó mediante la amplificación por PCR del DNA de R6 con el oligonucleótido gyrA607. Los productos de PCR se cortaron con *KpnI+PstI* (dianas incluidas en *gyrA*, Fig. 5), y los fragmentos de tamaño adecuado que hibridaron con la sonda gyrA435-729, correspondiente al inserto del plásmido pGYAN1, se aislaron y clonaron en el vector pEMBL18⁺ cortado con las mismas enzimas.



4.1.2. Secuenciación del gen *gyrA* de *S. pneumoniae*

La estrategia de clonación por PCR permitió la caracterización genética de *gyrA* de *S. pneumoniae* (Fig. 6). El análisis de la secuencia de nucleótidos reveló la presencia de un posible promotor de transcripción, con una región -35 y una región -10 extendida separadas por 17 pb. Se observó asimismo un posible sitio de unión al ribosoma (Shine and Dalgarno, 1975).

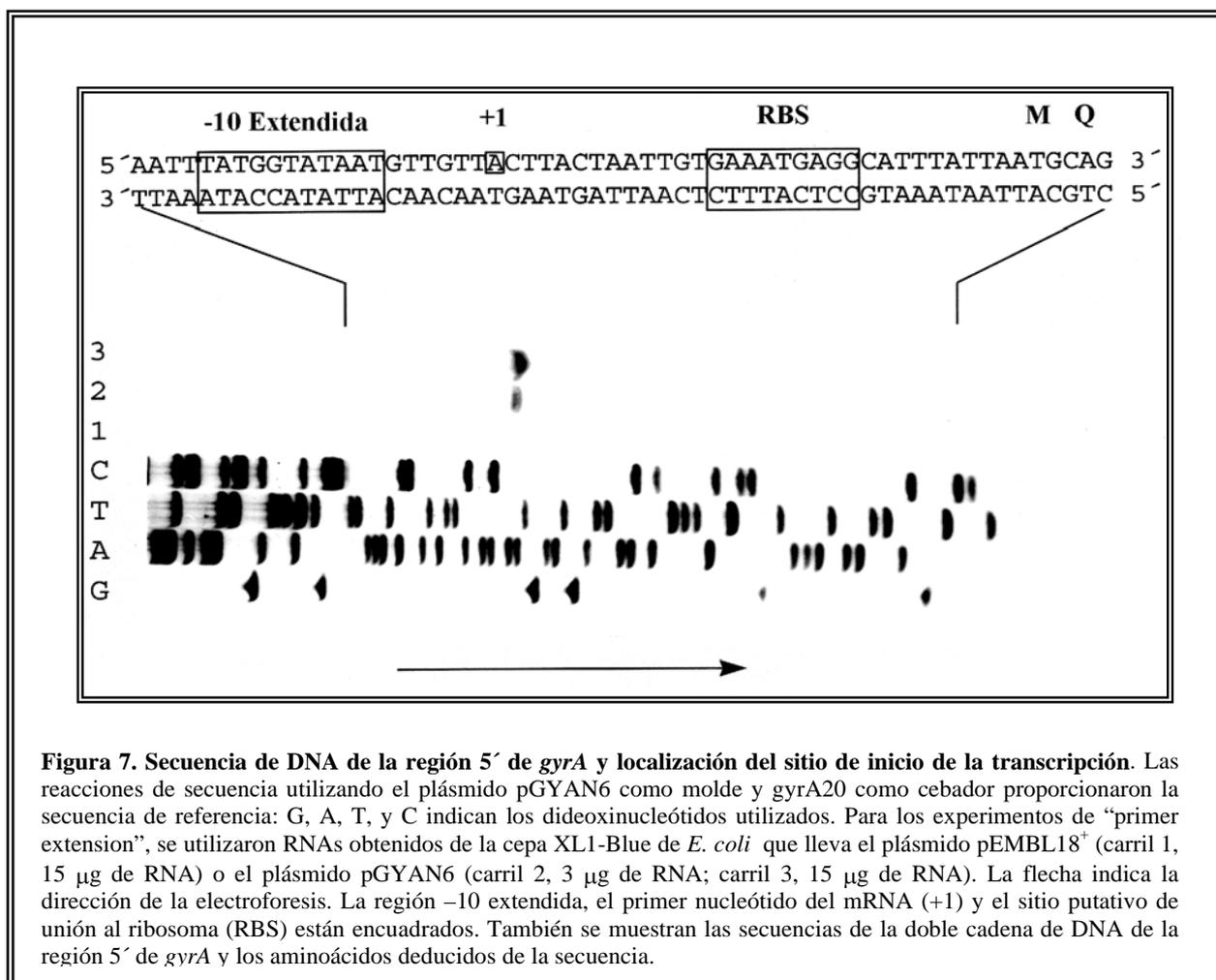
La proteína deducida de la secuencia de nucleótidos de *gyrA* tiene un tamaño de 822 aminoácidos.

<u>TTTAAAAA</u> ACTTTGTCCAGAAATATGCCTTATAGTTCCTGATGTAACGTTTTAGTGGTTTAGAGGCTGAAAATAGACGGGAATTATGGTATAATGTTGTT	-33
<i>DraI</i>	
<i>gyrA</i> → M Q D K N L V N V N L T K E M K A S F I D Y A	23
ACTTACTAATTGTCAAAATGAGGCATTTATTAATGCAGGATAAAAAATTTAGTGAATGTCAATCTGACAAAGGAGATGAAGGCAAGTTTTATCGACTACGCC	68
+1 RBS <i>gyrA46</i> → ← <i>gyrA20</i>	
M S V I V A R A L P D V R <u>D G L K P V H</u> R R I L Y G M N E L G V T	56
ATGAGTGTATCGTAGCGCGAGCTTCTCCTGATGTTGAGATGGCTTAAAACTGTTCCACGTCGCATTCTCTACGGAATGAATGAATTGGGTGTGACCC	168
<i>SacI</i>	
P D K P H K K S A R I T G D V M G K Y H P H G D S S I Y E A M V R M	90
CAGACAAACCCATAAAAAATCTGCTCGTATTACAGGGGATGTCATGGGTAATACCACCCACACGGGGATTCTCTATTTATGAAGCCATGGTCCGTAT	268
A Q W W S Y R Y M L V D G H G N F G S M D G D S A A A Q R Y T E A	123
GGCTCAATGGTGGAGCTACCGTTACATGCTTGTAGATGGTCATGGGAATTTGGTCCATGGATGGAGATAGTGTGCCGCTCAACGTTATACCGAGGCA	368
R M S K I A L E M L R D I N K N T V D F V D N Y D A N E R E P L V	156
CGTATGAGCAAGATTGCTCTGGAATGCTTCGTGATATCAACAAAAATACAGTTGATTTCTGTTGATAACTATGATGCCAATGAACGGGAAACCTTGGTCT	468
<i>EcoRV</i>	
L P A R F P N L L V N G A T <u>G I A L V G M A T N</u> I P P H N L G E T I D	190
TGCCACGCGCTTTTCCAAACCTTTTGGTTAATGGAGCAACTGGTATCGCGGTTGGGATGGCAACCAATATCCACCTCATAATCTGGGTGAAACCATTTGA	568
A V K L V M D N P E V T T K D L M E V L P G P D F P T G A L V M G	223
TGCAGTGAAGTTGGTCATGGATAATCCTGAAGTGACTACCAAGGATTTGATGGAACTTGGCTGGACCAGATTTTCCAACCTGGTGTCTTGTTCATGGGG	668
K S G I H K A Y E T G K G S I V L R S R T E I E T T K T G R E R I	256
AAATCAGGTATCCATAAGGCTTATGAAACAGGTAAGGTTTCGATTGCTCCTACGTTCTCGTACAGAGATGAAACGACTAAGACTGGTCTGAGCGTATCG	768
V V T E F P Y M V N K T K V H E H I V R L V Q E K R I E G I T A V R	290
TTGTAACAGAATTTCCCTTACATGGTCAATAAAAAACCAAGGTGCATGAGCATATTTGCTGTTGGTTTCAGGAAAAACGATTGAGGGTATCACAGCAGTACG	868
D E S N R E G V R F V I E V K R D A S A N V I L N N L F K M T Q M	323
TGATGAGTCAAACCGTGAAGGTGTTGATTTGTTATTGAAGTCAAGCGCGACGCTCAGCCAAATGTTATTCTCAATAACCTCTTCAAAATGACCCAAATG	968
Q T N F G F N M L A I Q N G I P K I L S L R Q I L D A Y I E H Q K	356
CAAACCAATTTTGGTTTCAATATGCTCGCTATCCAAAAATGGTATACCGAAAAATTTGTCTCTTCGTCAGATTTGGATGCTTATATGACCAACAAAAAG	1068
E V V V R R T R F D K E K A E A R A H I L E G L L I A L D H I D E V	390
AAGTGGTTGTTTCGTCGACAGTTTGTATAAGGAAAAAGCGGAAGCGCGCTCATATCTTAGAAGGTCTCTTGGATGCGCTAGACCATATCGACGAAGT	1168
I R I I R A S E T D A E A Q A E L M S K F K L S E R Q S Q A I L D	423
GATTCGTATCATCCGTCTAGTGAACCGGATGCGGAAGCTCAAGCTGAGTTGATGAGCAAGTTTAAAGCTTCTGAACGTCAAAGTCAAGCTATCCTTGTAT	1268
<i>gyrA 435</i> → <i>HindIII</i>	
M R L R R L T G L E R <u>D K I Q S E Y D D</u> L L A L I A D L A D I L A	456
ATGCGTCTTCGCGGTTTGACAGGTTTGGAACGCGATAAGATTCAATCTGAGTATGATGACCTCTGGCTCTGATTGCGGATTTAGCAGATATTCTTGCCTA	1368
K P E R V S Q I I K D E L D E V K R K F S D K R R T E L M V G Q V L	490
AGCCTGAACGTTTCTCAAATATCAAAGACGAATGGATGAAGTTAAACGTAATTTTCTGATAAACCGCTACAGAGTTGATGGTTGGACAGGTTCTT	1468
S L E D E D L I E E S D V L I T L S N R G Y I K R L D Q D E F T A	523
GAGTCTCGAGGATGAGGACTTGATTGAAGAATCGGATGCTTGTATTACCTTTTCTAACAGAGGCTACATTAAGCGTTTGGATCAGGACGAGTTCACTGCT	1568
Q K R G G R G V Q G T G V E D D D F V R E L V S T S T H D H L L F	556
CAAAAACGTTGGGGTCTGGTGTCCAAGGAACGGGAGTAGAAGATGATGACTTTTGTTCGTCGAGTTAGTGTCAACTAGTACCCATGATCATCTGCTCTTCT	1668
F T N K G R V Y R L K G Y E I P E Y G R T A K G L P V N L K L D	590
TCACAAACAGGGACGTCTATCGTCTTAAAGGTTATGAAATCTCTGAGTATGGTTCGACTGCCAAAGGGCTACCAGTAGTCAATCTCTTGAATTTGGA	1768
<i>gyrA607</i> →	
E D E S I Q T V I N V E S D R S <u>D D A Y L F F T T</u> R H V L L K R T	623
TGAAGACGAAAGTATTTCAGACGGTTATCAATGTTGAGTCTGATCGCAGTGTATGCTTATCTCTTCTTACAAACCGCTACGATTTGTTGAAGAGAACC	1868
S V K E F A N I R Q N G L K A L N L Q D E D E L I N V L L A E G D	656
AGTGTAAAGGAGTTTGCCAAATATTCGTCAAATGGTCTCAAAGCGCTGAAATTTAAAGGATGAAGATGAGTTAATCAATGTCTTGTGGCAGAAGGAGATA	1968
<i>DraI</i>	
M D I I I G T K F G Y A V R F N Q S A V R G M S R I A T G V K G V N	690
TGGATATTATCATTTGCTACCAAGTTTGGTTATGCAGTTCGCTTAAATCAATCAGCCGTTCTGGTATGAGCCGATCGCCACTGGTGTGAAAGGTGTTAA	2068
<i>KpnI</i>	
L R E G D T V V G A S L I T D Q D E V L I I T E K G Y G K R T V A	723
CCTTCGTGAAGGAGACACAGTTGTTGGTCCAGCTTGTACTGATCAAGATGAGGTTCTTATATCAAGAAAAAGGATATGGTAAGCGTACAGTCCGCT	2168
T E Y P T K G R G G K G M Q T A K I T T E K N G L A G L M T V Q G	756
ACTGAATACCCAAACAAAGGTCGTGGTGGTAAGGGAATGCAGACAGCTAAAATTTCCGAAAAAATGGCTTGTGTCGGCTTATGACTGTTCAAGGGG	2268
D E D L M I I T D T G V M I R T N L A N I S Q T G R A T M G V K V M	790
ATGAGGATTTGATGATTACTGATACAGGTGTCATGATTCGAACCAATCTTGCCAATTTTCAACAAACAGGACGTGCAACTATGGGAGTTAAAGTAAT	2368
R L D Q D A Q I V T F T T V A V A E K E E E V G T E N E T E G E A *	822
GCCCTGGATCAAGATGCTCAGATAGTACTTTCACAACGGTTGCGGTGGCAGAAAAAGAAAGTTGGGACAGAAAAACGAAACAGAAGGTGAAGCATAA	2468
TGTCTCAAAAAATAATAAAAAAGAAAAACAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATCTTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTAC	2529

Figura 6. Secuencia de nucleótidos de un fragmento de 2685 pb de *S. pneumoniae* R6 que contiene el gen *gyrA*. Se muestra la hebra correspondiente al mRNA. Los nucleótidos y aminoácidos están numerados tomando el primer nucleótido de *gyrA* como nt 1 y el primer residuo de GyrA como residuo 1. Se indican subrayados y en negrita las regiones promotoras -35 y -10 extendida y el sitio de unión al ribosoma (RBS). El primer nucleótido del mRNA se indica como +1. Se representan oligonucleótidos y endonucleasas de restricción importantes. Los residuos aminoacídicos codificados por los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR están subrayados y en negrita.

4.2. CARACTERIZACION DEL SITIO DE INICIO DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN *gyrA*

Para localizar el sitio de iniciación de la transcripción de *gyrA*, se realizó un ensayo de “primer extension” con un oligonucleótido de 17 pb (*gyrA*20) y con RNA extraído de la cepa XL1-Blue de *E. coli* portadora del plásmido pGYAN6. Se utilizó RNA de la misma cepa pero con el vector pEMBL18⁺ como control negativo. El resultado de “primer extension” fue un producto de 89 nucleótidos (Fig. 7), que localizó el inicio de la transcripción en la A, situada en la posición -31 de la secuencia de la figura 6. Este nucleótido se encuentra a 6 pb del extremo 3´ de la secuencia -10 extendida y a 30 pb del codon de iniciación ATG (Fig. 7).



4.3. CARACTERIZACION DE UNA CURVATURA INTRINSECA DEL DNA EN LA REGION PROMOTORA DE *gyrA*

Previamente se había observado en nuestro laboratorio una movilidad anómala de algunos fragmentos de restricción que incluían la región promotora de *gyrA*. Debido a que este fenómeno está normalmente asociado con la existencia de curvaturas intrínsecas en el DNA, se realizó un modelo por ordenador de la región que incluye los nucleótidos -128 a -8 de la secuencia representada en la figura 6. El modelo (Fig. 8A) predecía una región curvada localizada en la posición -67, es decir, en la región -35 del promotor. Se realizaron electroforesis bidimensionales en geles de poliacrilamida, corriendo la primera dimensión a 60°C y la segunda a 4°C. Se observó que el fragmento de 403 pb *HindIII-SacI* que contenía la región promotora (Fig. 5) se separaba de la diagonal de los fragmentos de DNA no curvados (no se muestra), indicando la presencia de una curvatura en el DNA.

Para localizar de forma precisa el centro de la curvatura, se utilizó el método de permutación circular (Wu and Crothers, 1984). Este método consiste en clonar un inserto de DNA, sospechoso de presentar curvatura, en un plásmido cuyo sitio de multiclonado deja a ambos lados una serie de dianas de restricción únicas en tándem. Al digerir con estas enzimas, se genera una serie de fragmentos permutados circularmente, es decir, de idéntico tamaño, pero con los extremos localizados en distintas posiciones del fragmento original. A igual longitud, las moléculas curvadas migran más lentamente que las moléculas no curvadas y, si el centro de la curvatura está localizado en el centro de un fragmento de restricción, afectará más a la forma del DNA que si está en uno de los extremos del fragmento. Por tanto, la movilidad electroforética, en geles no desnaturizantes de poliacrilamida, de los fragmentos de DNA curvados disminuirá tanto más cuanto más centrada esté la curvatura. Para realizar este análisis se construyó el plásmido pBEND-11 (Fig. 5), llevando a cabo las siguientes manipulaciones. En primer lugar, el inserto *DraI-EcoRV* de 533 pb del plásmido pGYAN6 (Fig. 5) fue clonado en el sitio *SmaI* del plásmido pCY7 (Prentki et al., 1987), un derivado del pBR322 en el cual un fragmento de 375 pb *EcoRI-BamHI* está presente como un tándem repetido y separado por el sitio de multiclonado *SacI-SmaI-XbaI-BglIII*. Puesto que este método está diseñado para clonar insertos de DNA de 150 a 300 pb, el plásmido resultante fue digerido con *SacI* para acortar el tamaño del inserto. El inserto, que comprende los

nucleótidos –128 a 94 de la secuencia de la figura 6, se clonó de nuevo en el sitio *SacI* del plásmido pCY7 y su orientación fue determinada por secuencia. El plásmido resultante, pBEND-11, fue digerido con enzimas de restricción para producir una serie de fragmentos de igual tamaño, 609 pb (inserto de 234 pb y fragmento *EcoRI-BamHI* de 375 pb) (Fig. 8B), que se diferencian en la posición del centro de la curvatura y que se analizaron en geles de poliacrilamida a 4°C. Las movilidades relativas se representaron frente a la distancia entre el extremo 5' (del sitio *EcoRI* del fragmento duplicado en el vector) y el punto medio del fragmento generado por cada enzima de restricción (Fig. 8C). En la gráfica, el punto más bajo de la curva que mejor aproxima se corresponde con el centro de la curvatura (Wu and Crothers, 1984). En este caso, la posición del centro de la curvatura se localizó a 74 pb del extremo 5' del fragmento (nt –128), es decir, alrededor del nucleótido –55 de la secuencia de la figura 6, entre las regiones –35 y –10 extendida del posible promotor de transcripción de *gyrA*.

Para conocer el ángulo de curvatura, se ha deducido empíricamente una relación entre el grado de curvatura y la movilidad electroforética en geles de acrilamida (Thompson and Landy, 1988):

$$\mu_m = [\cos(\alpha/2)]\mu_e,$$

donde α es el ángulo de la curvatura estimado, μ_m la movilidad del fragmento en cuyo punto medio se encuentra el centro de la curvatura y μ_e la movilidad del fragmento en cuyo extremo se encuentra el centro de la curvatura. Para el fragmento de 609 pb, el ángulo de la curvatura estimado por esta ecuación fue de 82°.

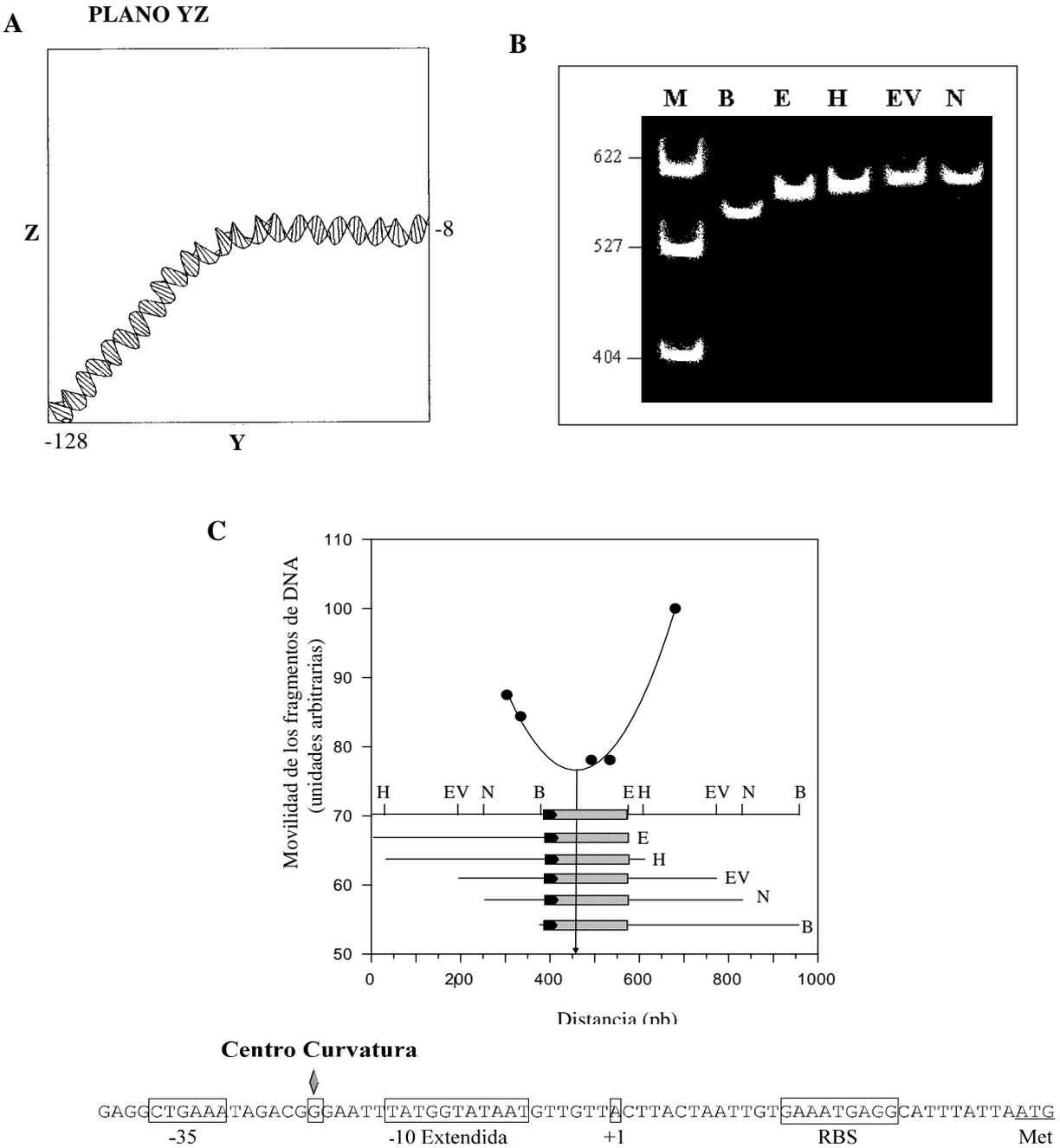


Figura 8. Localización del centro de la curvatura en el plásmido pBEND-11 por el ensayo de permutación circular. **A.** Estructura diseñada por ordenador de la región de DNA desde el nucleótido -128 a -8 de la secuencia de la figura 6. El gráfico se representa en el plano YZ para mostrar la región curvada que predice el programa. **B.** El plásmido pBEND-11 fue digerido con cada una de las enzimas indicadas (E, *EcoRI*; H, *HindIII*; EV, *EcoRV*; N, *NheI*; B, *BamHI*) para generar fragmentos de 609 pb que llevan el inserto en diferentes posiciones relativas a su extremo 5'. Estos fragmentos fueron aislados de un gel de agarosa y su movilidad analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% y a 4°C. El plásmido pBR322 digerido con *HpaII*, fue utilizado como marcador de peso molecular (carril M). **C.** Estructura física del plásmido pBEND-11. Se indican los sitios de restricción que se generan una sola vez en cada fragmento duplicado que flanquea el inserto (cuadros grises). Las puntas de flecha (en negro) indican la orientación del inserto. La movilidad de cada fragmento se representó frente a la distancia entre el extremo 5' (sitio *EcoRI*) del fragmento duplicado en el vector y el punto medio del fragmento generado por cada enzima de restricción. La línea representa la mejor aproximación de los datos experimentales, y la flecha indica su mínimo, que se corresponde con el centro de la curvatura.

4.4. SECUENCIAS IMPLICADAS EN LA TRANSCRIPCION DEL GEN *gyrA*

Se construyó una fusión transcripcional de la región promotora de *gyrA* y el gen *cat* (cloramfenicol acetil transferasa) de actividad enzimática cuantificable. Para ello, en primer lugar se amplificó por PCR la región promotora de *gyrA*, que comprende los nucleótidos -311 hasta el 47 (considerando el primer nucleótido de *gyrA* como posición 1) (Figs 9 y 10), y se clonó en el vector pUC18 de *E. coli*. El plásmido recombinante (pPGYAN1) fue linearizado por digestión con *EcoRI*, amplificándose, posteriormente, por PCR todo el plásmido (región promotora de *gyrA* y vector pUC18) (Fig. 9). Por otra parte, se amplificó por PCR el gen *cat* del plásmido pJS3. Los productos resultantes de ambas amplificaciones se digirieron con *SacI*, se ligaron y se transformaron en la cepa XL1-Blue de *E. coli*, seleccionando los clones que llevaban la fusión transcripcional *PgyrA-cat* en 5 µg/ml de cloramfenicol. Se seleccionó uno de los plásmidos, pGYAC3 (Fig. 9). La fusión *PgyrA-cat* fue clonada posteriormente en el vector pUC19 con el objeto de eliminar la duplicación del sitio de multiclonado que se había producido en la clonación (Fig. 9). De los plásmidos que presentaban la fusión deseada, se utilizó uno, denominado pGYAC1, para construir una serie de deleciones desde el extremo 5' de la fusión transcripcional. La selección de los clones con deleciones 5' se hizo tanto por sus CMI_s a cloramfenicol (Tabla VIII) como por el tamaño del inserto. Con estos métodos de selección no se obtuvo ningún plásmido que llevara sólo la región promotora -10 extendida de *gyrA*. Este plásmido (pGYAC59), se construyó a partir de pGYAC1 por amplificación por PCR con los oligonucleótidos -10gyrA y cat-end2. El producto de PCR fue digerido con *SalI*+*HindIII* (dianas incluidas en los oligos) y clonado en pUC19 cortado con las mismas enzimas. En la figura 10 se presenta un resumen de las deleciones de la región promotora de *gyrA* presentes en diferentes plásmidos.

Las fusiones *PgyrA-cat* presentes en los plásmidos pGYAC126, -69, -59 y -31, fueron clonadas en el plásmido interespecífico pLS1, capaz de replicar en *S. pneumoniae* (Lacks et al., 1986) y transformadas en *E. coli* C-600 y *S. pneumoniae* T4. Para ello, se realizaron reacciones de PCR con los oligonucleótidos directo y cat-end2, utilizando como molde los diferentes plásmidos. Los productos de PCR se cortaron con *EcoRI* (diana incluida en el sitio de multiclonado del vector) y *HindIII* (diana de cat-end2), se ligaron a pLS1 cortado con las

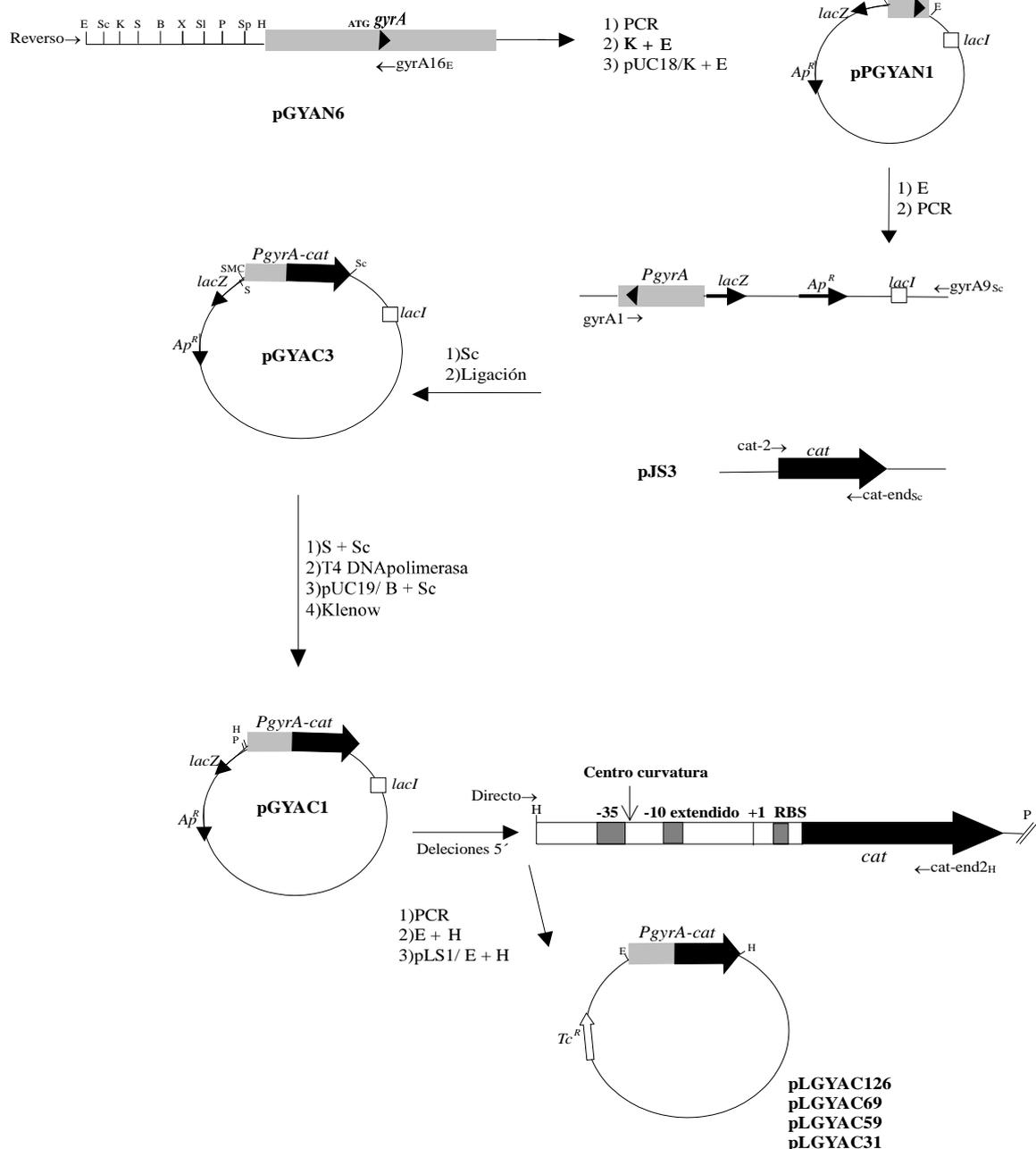
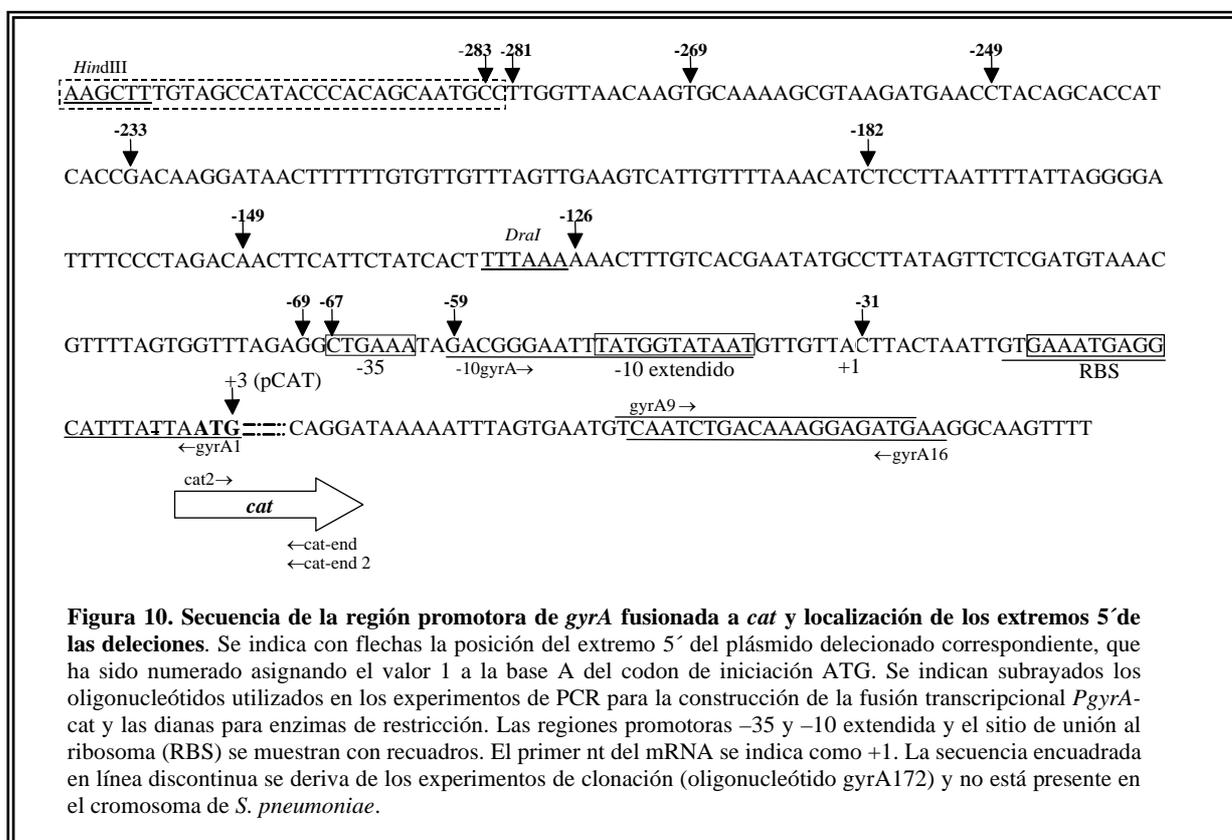


Figura 9. Construcción de una fusión transcripcional de la región promotora de *gyrA* y el gen *cat* (*PgyrA-cat*). El plásmido pGYAN6 que lleva la región N-terminal de *gyrA* se utilizó para amplificar la región promotora de *gyrA* con los oligonucleótidos *gyrA16* y reverso. El producto de PCR se cortó con E y K y se clonó en pUC18 dando lugar a pPGYAN1. Este plásmido se linearizó con E y todo el plásmido se amplificó por PCR con los oligonucleótidos *gyrA1* fosforilado y *gyrA9*. Por otra parte, el gen *cat* se amplificó por PCR a partir de pJS3 con *cat2* fosforilado y *cat-end*. Los productos de PCR resultantes de ambas amplificaciones fueron digeridos con Sc y se ligaron, dando lugar a pGYAC3. Posteriormente, la fusión *PgyrA-cat* se clonó en pUC19 para eliminar la duplicación del sitio de multiclonado: pGYAC3 fue digerido con Sc + S, para liberar el fragmento que lleva la fusión transcripcional, tratado con T4 DNA polimerasa y clonado en pUC19, digerido con B + H y tratado con Klenow. El plásmido pGYAC1, que lleva la fusión *PgyrA-cat*, fue utilizado para la construcción de una serie de deleciones desde el extremo 5' de la fusión transcripcional. Las fusiones *PgyrA-cat* que llevan los plásmidos delecionados pGYAC126, -69, -59, y -31 fueron clonadas en pLS1. Dianas de restricción: E, *EcoRI*; Sc, *SacI*; K, *KpnI*; S, *SmaI*; B, *BamHI*; X, *XbaI*; Sl, *SalI*; P, *PstI*; Sp, *SphI*; H, *HindIII*. SMC, sitio de multiclonado (dianas de restricción, H, Sp, P, Sl, X, B, S, K, S, B, X, Sl, P, Sp, H).

mismas enzimas y se establecieron en *E. coli* C-600, haciendo la selección en 10 µg/ml de tetraciclina y cloramfenicol para pLGYA126 y pLGYAC69 ó en 10 µg/ml de tetraciclina para pLGYAC31 (Fig. 9). Posteriormente, estos plásmidos fueron establecidos en *S. pneumoniae* T4, seleccionando los clones recombinantes en 1 µg/ml de tetraciclina. El plásmido pLGYAC59 no pudo purificarse a partir de *E. coli* por los métodos habituales, incluso con volúmenes elevados, por lo que se transformó directamente a *S. pneumoniae* con la mezcla de ligación, seleccionando los recombinantes en 1 µg/ml de tetraciclina.

Tabla VIII. CMI a cloramfenicol de las cepas de *E. coli* que llevan plásmidos con deleciones en la región promotora de *gyrA*

Estirpe (XL1-Blue <i>E. coli</i>)	CMI a Cm (µg/ml)
pGYAC283	80
pGYAC281	80
pGYAC269	80
pGYAC249	40
pGYAC233	80
pGYAC182	80
pGYAC149	80
pGYAC126	40-80
pGYAC69	40-80
pGYAC67	20-40
pGYAC59	80
pGYAC31	≤2.5



En la Tabla IX se describen las características de los plásmidos que llevan las diferentes fusiones transcripcionales con el gen *cat*. De los datos de esta Tabla se deduce que las deleciones deben extenderse más allá de la región -10 extendida del promotor para eliminar la expresión del gen *cat*. Sólo la secuencia que incluye la región promotora -10 extendida, el sitio de inicio de la transcripción y las primeras bases del transcrito (inserto del plásmido pLGYAC59) (Fig. 10), son necesarias para la función del promotor de *gyrA*.

Tabla IX. Características de los plásmidos que llevan diferentes fusiones transcripcionales *PgyrA-cat***A**

Estirpe	CMI a Cloramfenicol ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad específica CAT (nmoles/mg)	$R^{6/60}$
T4 (pLGYAC126)	5	$64,5 \pm 2,5$	1,2
T4 (pLGYAC69)	10	$229,5 \pm 3,5$	1,0
T4 (pLGYAC59)	10	$191 \pm 5,4$	1
T4 (pLGYAC31)	1	≤ 1	1
T4 (pJS3)	20	$315,5 \pm 5$	-
T4 (pMJSPN1)	-	1391 ± 125	-

-, no determinado.

B

Estirpe	CMI a Cloramfenicol ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad específica CAT (nmoles/mg)
C-600 (pLGYAC126)	40-80	82 ± 6
C-600 (pLGYAC69)	40-80	104 ± 6
C-600 (pLGYAC59)	80	280 ± 36
C-600 (pLGYAC31)	$\leq 2,5$	≤ 1

4.5. CORRELACION ENTRE CURVATURA DEL PROMOTOR DE *gyrA* Y FUERZA DEL PROMOTOR

Se ha propuesto que las curvaturas del DNA presentes en la región 5' del promotor aumentan la capacidad transcripcional de dichos promotores (Bossi and Smith, 1984; Plaskon and Wartell, 1987; McAllister and Achberger, 1989). Por ello se estudió la movilidad electroforética de los fragmentos de DNA de diferentes zonas de la región promotora de *gyrA* y se correlacionó con la actividad CAT de sus fusiones transcripcionales. Para determinar si un fragmento de DNA presenta movilidad anómala, indicativa de la existencia de curvatura, se determinó el factor $R^{6/60}$ (Poljak and Gralla, 1987), que es el cociente entre el tamaño aparente de los fragmentos a 6°C y el tamaño aparente a 60°C. Los fragmentos de DNA curvado experimentan un aumento de la movilidad al aumentar la temperatura, mientras que los fragmentos rectos migran siempre igual independientemente de la temperatura. Por tanto, en los fragmentos rectos el valor $R^{6/60}$ es próximo a 1, mientras que en los curvados este valor es superior a 1.

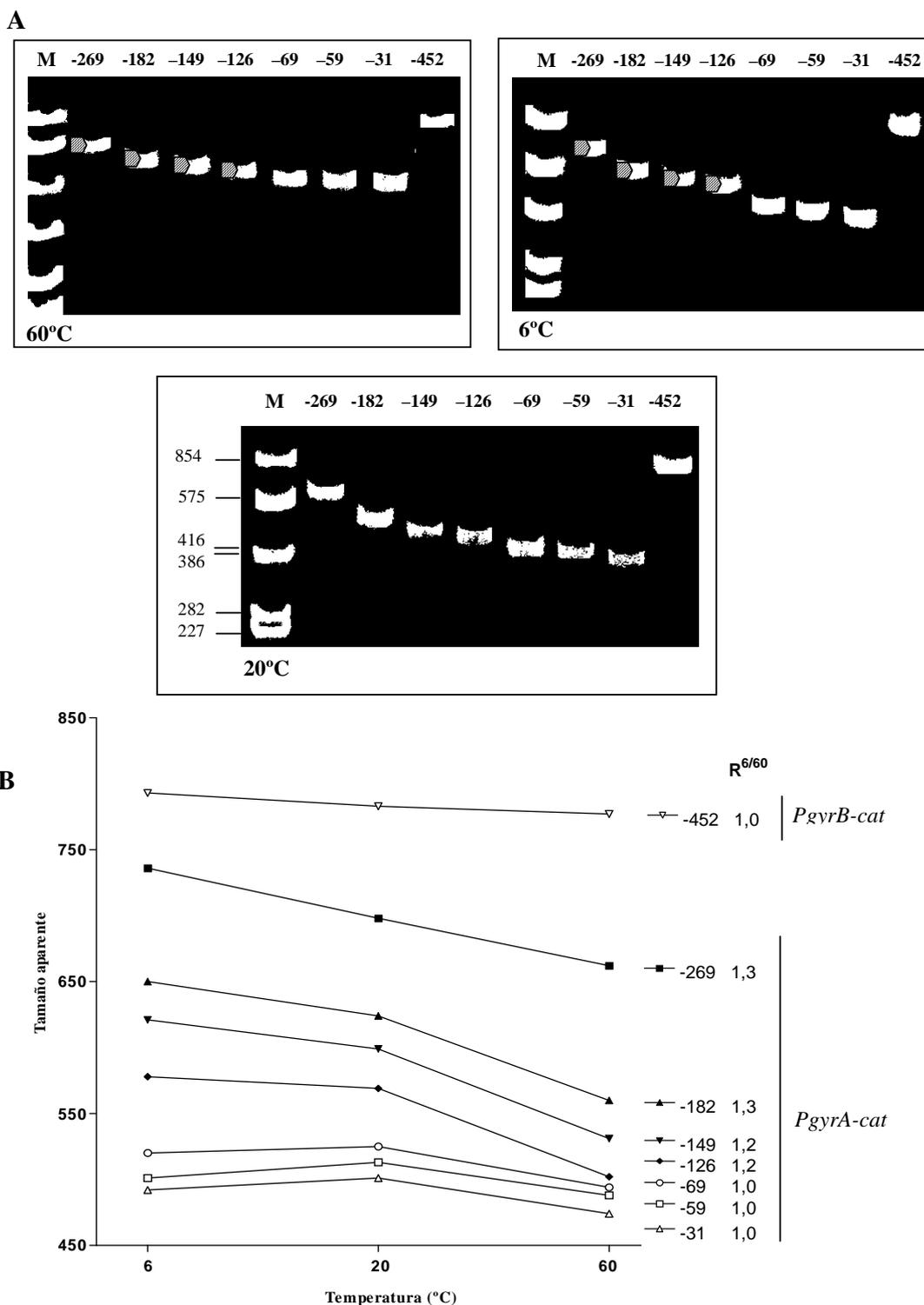


Figura 11. A. Movilidad electroforética de fragmentos de DNA que llevan diferentes zonas de las regiones promotoras de *gyrA* y *gyrB*. Se utilizaron geles de 3,5% poliacrilamida a tres temperaturas, 6, 20 y 60°C. Los fragmentos fueron visualizados por tinción con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. Como un marcador de peso molecular sin curvatura, se utilizó pBR322 digerido con *HphI* (M). Se indican con puntas de flecha los fragmentos de DNA cuya movilidad aparente es anómala. **B.** Se representa la movilidad aparente de cada inserto de DNA a tres temperaturas y los cocientes entre el tamaño aparente a 6 y 60°C, factor $R^{6/60}$ (Poljak and Gralla, 1987).

Los insertos de los diferentes plásmidos (pGYAC269, -182, -149, pLGYAC126, -69, -59 y -31) (Fig. 10) se aislaron de geles de agarosa tras su digestión con *EcoRI* (enzima de restricción del sitio de multiclonado de los plásmidos) y *NcoI* (enzima localizada en la secuencia del gen *cat*), dando lugar a fragmentos de tamaño 729, 624, 591, 569, 529, 512 y 490 pb, respectivamente. Las deleciones a partir del extremo 5' de la fusión transcripcional *PgyrA-cat* eliminaron de forma progresiva la curvatura (Fig. 11A). Todos los fragmentos de DNA que incluyen la secuencia que lleva el plásmido pLGYAC126 (Fig. 10) presentaron valores de $R^{6/60}$ superiores a 1, por lo que se consideraron como fragmentos curvados, mientras que los que no llevan la secuencia comprendida entre los nucleótidos -126 a -69 no presentaron curvatura (Fig. 11B).

La influencia “*in vivo*” de las secuencias localizadas en posición 5' del promotor fue determinada mediante la medida de la actividad CAT de las fusiones *PgyrA-cat* que llevan los plásmidos pLGYAC126, -69, -59, -31. Se observó una correlación inversa entre la actividad transcripcional (CAT) y la curvatura (Tabla IX, Fig. 12). Los plásmidos pLGYAC69 y pLGYAC59 no presentaron curvatura (factores $R^{6/60} = 1$), pero tuvieron una actividad CAT superior (3,5 veces para pLGYAC69 y 2,9 veces para pLGYAC59) a la del plásmido pLGYAC126, que se caracterizó por presentar curvatura (factor $R^{6/60} = 1,2$). Por lo tanto, en el caso del promotor de *gyrA* de *S. pneumoniae*, la presencia de una curvatura intrínseca en el DNA implica una menor fuerza del promotor y eficiencia de transcripción.

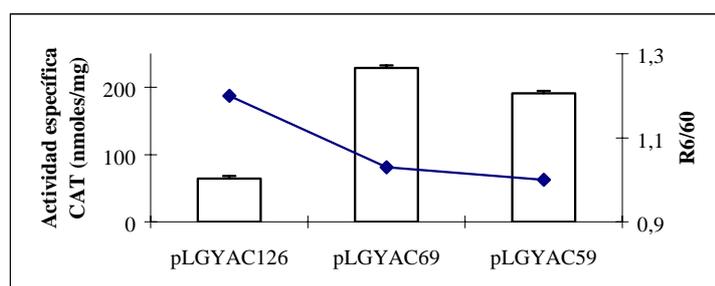


Figura 12. Efecto de las deleciones de la fusión *PgyrA-cat* en la actividad *in vivo* del promotor de *gyrA*. La actividad CAT de cultivos de T4 con los plásmidos indicados se muestra como barras, que representan los valores de al menos tres experimentos. La movilidad electroforética de los insertos plasmídicos se indica por el valor del factor $R^{6/60}$ (◆).

4.5.1. Ensayo de permutación circular del plásmido pLGYAC126

Para comprobar si el centro de la curvatura en la fusión *PgyrA-cat* del plásmido pLGYAC126 se localizaba en la misma posición que en el plásmido pBEND-11 (Fig. 8) se realizó un ensayo de permutación circular. Se construyó el plásmido pBEND126 a partir de pLGYAC126, amplificando por PCR un fragmento de 156 pb con los oligonucleótidos directo y *gyrA1-XbaI* (como *gyrA1* con una diana *XbaI* en su extremo 5', Fig. 10). El producto de PCR fue digerido con *SacI* (diana localizada en el sitio de multiclonado de pLGYAC126) y *XbaI* y clonado en pCY7 cortado con las mismas enzimas. La orientación del inserto en el plásmido pBEND126 fue determinada por análisis de restricción. El plásmido pBEND126, que lleva un inserto de 159 pb (nt -126 a 3 de pLGYAC126, Fig. 10) fue digerido con una serie de enzimas de restricción, cuyos sitios de corte están presentes sólo una vez en el fragmento duplicado *EcoRI-BamHI*, generando una familia de fragmentos de igual tamaño (534 pb) (Fig. 13A) que se analizaron en geles de poliacrilamida a 4°C. Las movilidades relativas fueron representadas frente a la distancia entre el extremo 5' (sitio *EcoRI*) del fragmento duplicado en el vector y el punto medio del fragmento generado por cada enzima de restricción (Fig. 13B). El centro de la curvatura se localizó a 94 pb del extremo 5' terminal del fragmento y en el nt -55 de la secuencia de la figura 10. Este resultado indica que el centro de la curvatura en el plásmido pLGYAC126 está localizado en la misma posición que en el plásmido pBEND-11.

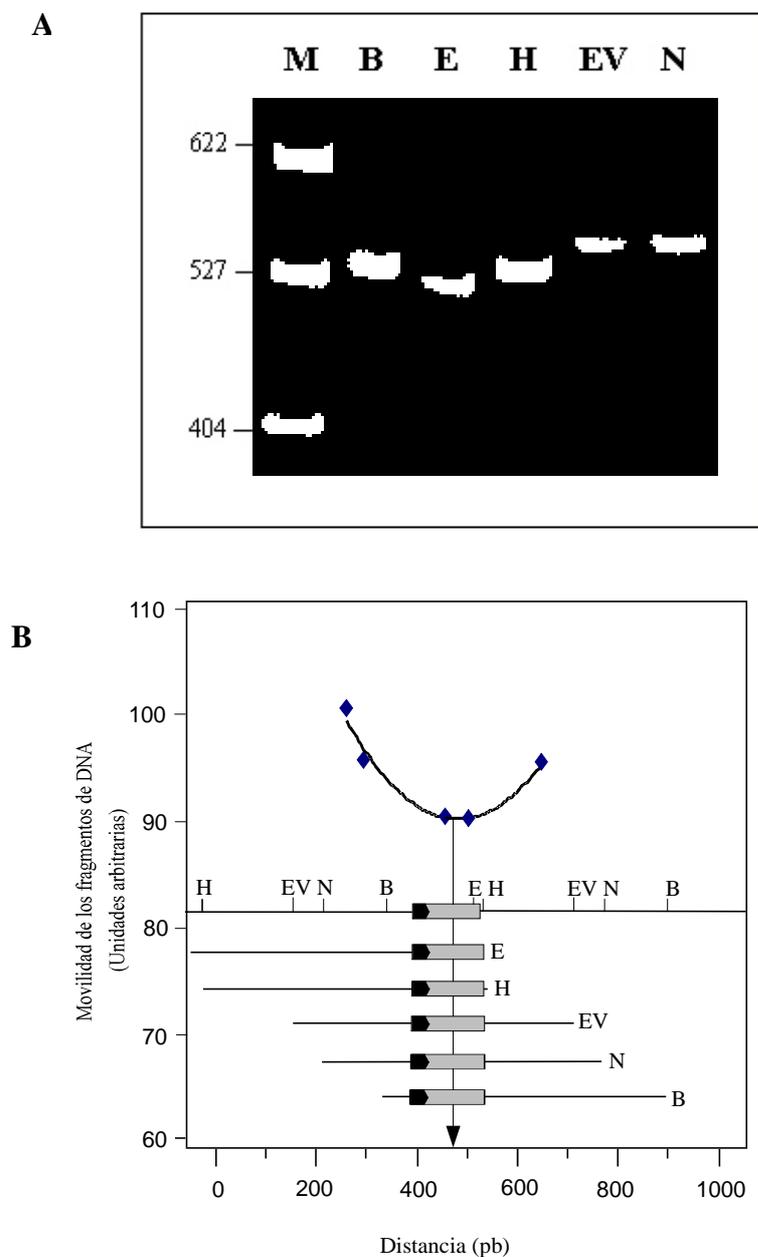


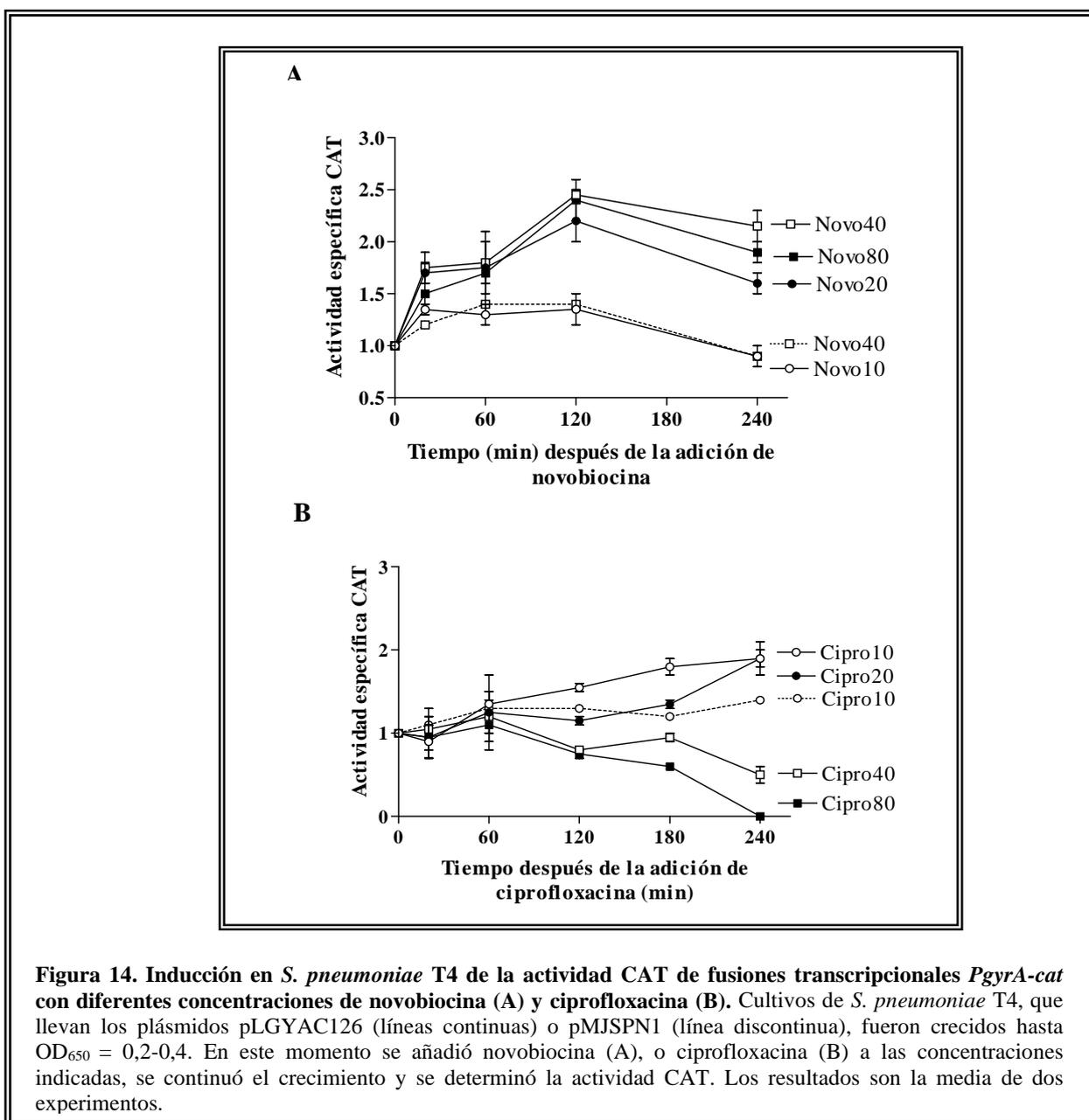
Figura 13. Localización del centro de la curvatura en el plásmido pBEND126 por el método de permutación circular. **A.** El plásmido pBEND126 fue digerido con cada una de las enzimas indicadas (E, *EcoRI*; H, *HindIII*; EV, *EcoRV*; N, *NheI*; B, *BamHI*) para generar fragmentos de 534 pb que llevan el inserto en diferentes posiciones relativas a su extremo 5'. Estos fragmentos fueron analizados por electroforesis en gel de 5% poliacrilamida a 4°C. El plásmido pBR322 digerido con *HpaII*, fue utilizado como marcador de peso molecular (M). **B.** Estructura física del plásmido pBEND126. Se indican los sitios de restricción que se generan una sola vez en cada fragmento duplicado que flanquea el inserto (cuadros grises). Las puntas de flecha (en negro) indican la orientación del inserto. Se determinó la movilidad de cada fragmento y se representó frente a la distancia entre el extremo 5' (del sitio *EcoRI*) del fragmento duplicado en el vector y el punto medio del fragmento generado por cada enzima de restricción. La línea representa la mejor aproximación de los datos experimentales, y la flecha indica su mínimo, que se corresponde con el centro de la curvatura.

4.6. ESTIMULACION DE LA TRANSCRIPCION DE *gyrA* POR RELAJACION DEL DNA (RESPUESTA RST)

Como se ha comentado en la introducción (apartado 1.3.5.), la síntesis de la girasa, codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*, parece estar controlada por el nivel de superenrollamiento del DNA. En *E. coli* la transcripción de *gyrA* y *gyrB* aumenta en respuesta a la relajación del DNA mediada por inhibidores de la girasa (Menzel and Gellert, 1983; Menzel and Gellert, 1987a). Para determinar si la respuesta RST se producía en *S. pneumoniae* y cual era la región promotora de *gyrA* implicada en la misma, se utilizaron los plásmidos descritos en la Tabla IX y se midió el grado de inducción de actividad CAT por novobiocina y ciprofloxacina, tanto en *S. pneumoniae* (estirpe T4) como en *E. coli* (estirpe C-600). Como control de no-inducción, se utilizó el plásmido pMJSPN1 que lleva una fusión del promotor *atp* (nt -186 a 1 de *atpC*, asignando el valor 1 a la base A del codon de iniciación ATG) con el gen *cat*.

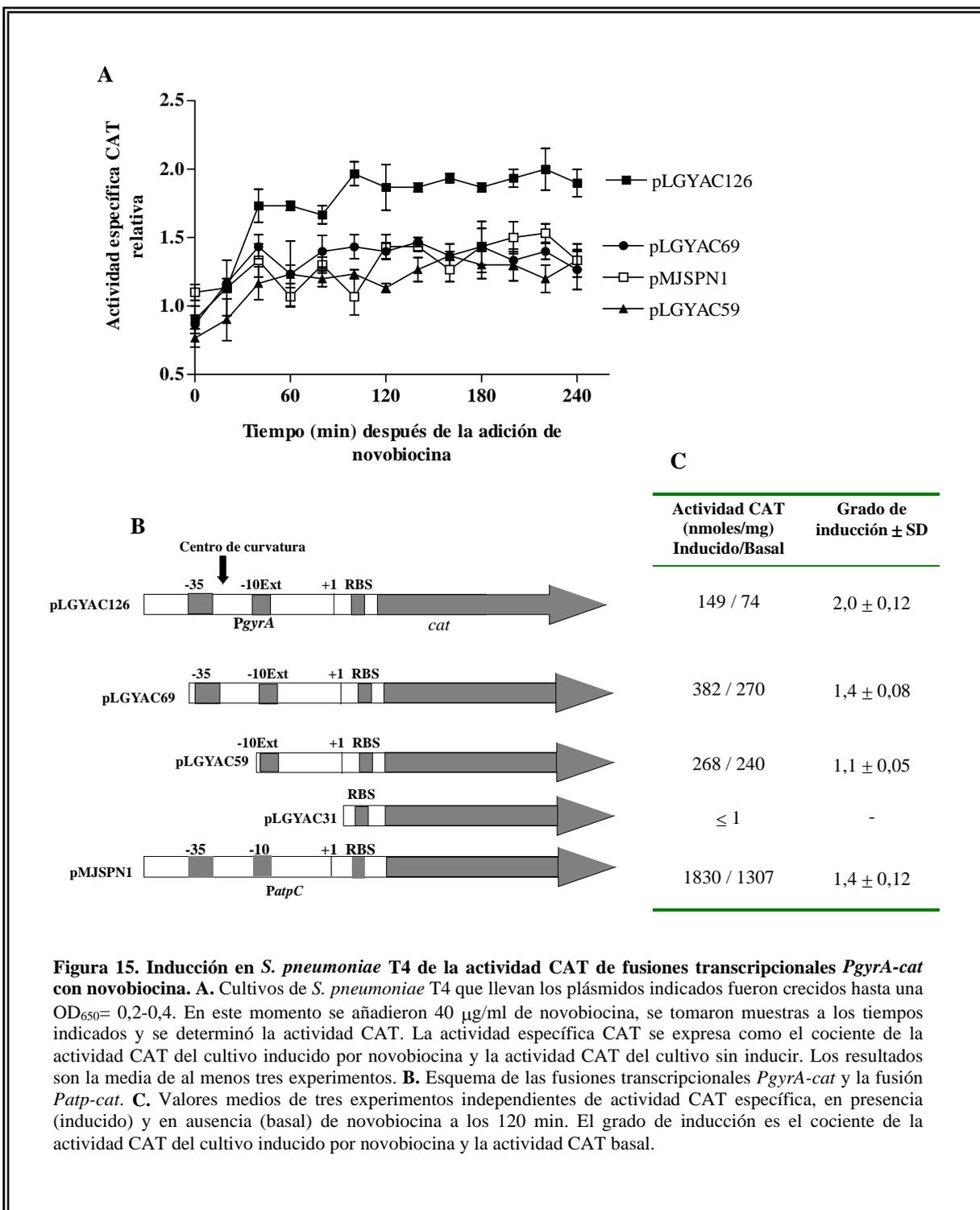
4.6.1. Respuesta RST en *S. pneumoniae* T4

En primer lugar se determinaron las concentraciones óptimas de novobiocina (inhibidor de GyrB) y ciprofloxacina (inhibidor de GyrA), en ensayos con los plásmidos pLGYAC126 y pMJSPN1 (como control de no-inducción) a distintas concentraciones de antibiótico y a varios tiempos después del tratamiento (Fig. 14). Mientras que a 10 µg/ml de novobiocina no se produjo inducción de la expresión, a concentraciones ≥ 20 µg/ml se observó un aumento mayor o igual a 2 veces en la expresión de *cat* a los 120 min después del tratamiento (Fig. 14A). Se seleccionó como concentración óptima de novobiocina 40 µg/ml, concentración 40 veces superior a la CMI que es de 1 µg/ml (Fig. 14A). Para la ciprofloxacina, las concentraciones de 40 y 80 µg/ml (80 y 160 veces superiores, respectivamente, a la CMI que es 0,5 µg/ml) detuvieron el crecimiento de la bacteria. Se eligió como concentración óptima de inducción 10 µg/ml (20 veces la CMI), puesto que produce un mayor grado de inducción en todos los tiempos estudiados y permite un mejor crecimiento de la bacteria que a 20 µg/ml (Fig. 14B).

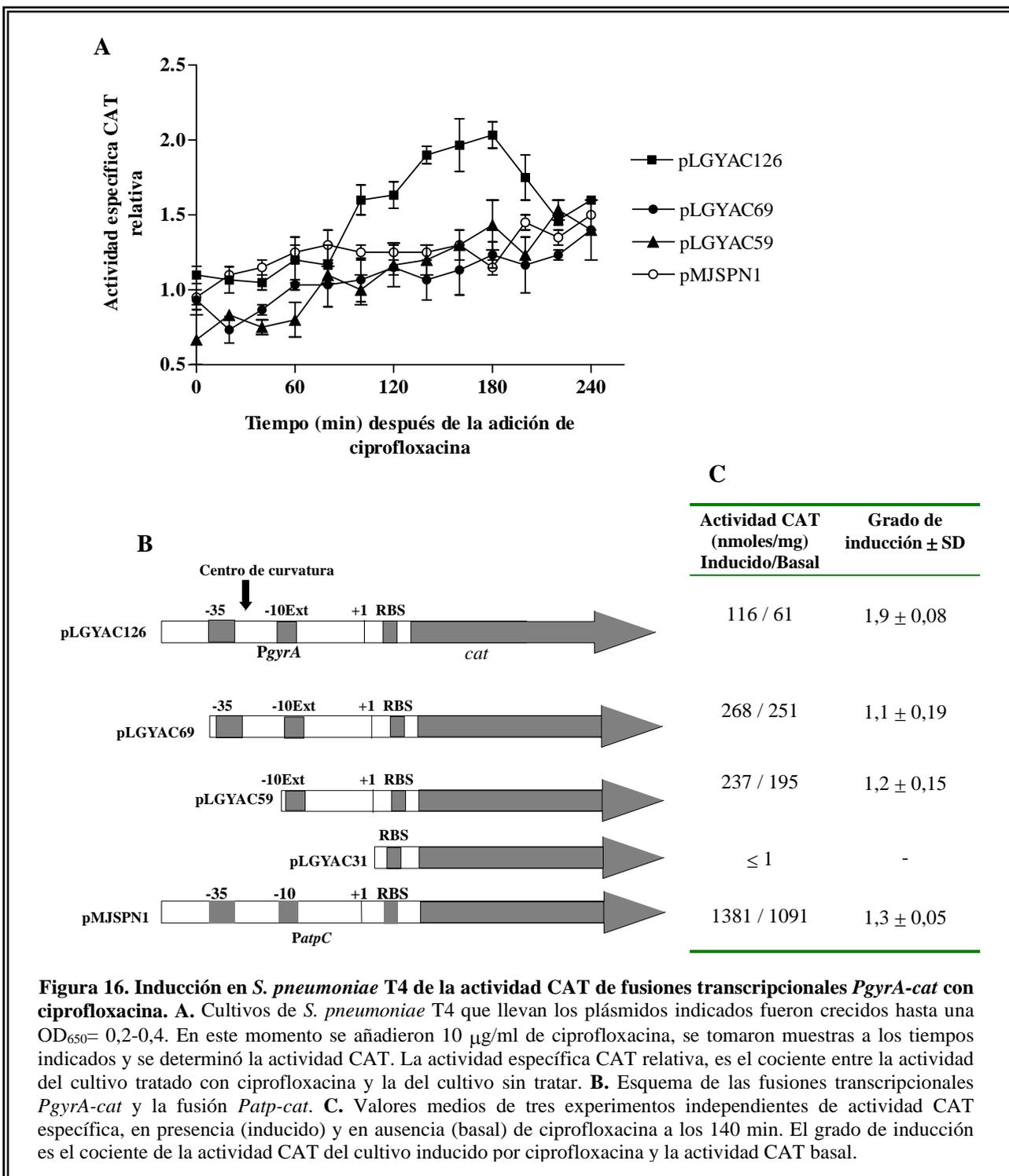


En la figura 15 se muestra la inducción por novobiocina a varios tiempos después del tratamiento de cepas de *S. pneumoniae* T4 con los plásmidos pLGYAC126, -69, -59, -31 o pMJSPN1. La adición de novobiocina incrementó la expresión de la actividad CAT aproximadamente 2 veces en la fusión *PgyrA-cat* del plásmido pLGYAC126. Esta se produjo a los 40 minutos y se mantuvo prácticamente constante hasta 4 horas después. No se observó respuesta RST en los plásmidos pLGYAC69 y pLGYAC59, indicando que dicha respuesta

depende de la secuencia situada en el extremo 5' de la región -35 del promotor de *gyrA* (nucleótidos -126 a -69 presentes en pLGYAC126 y no en los otros plásmidos).



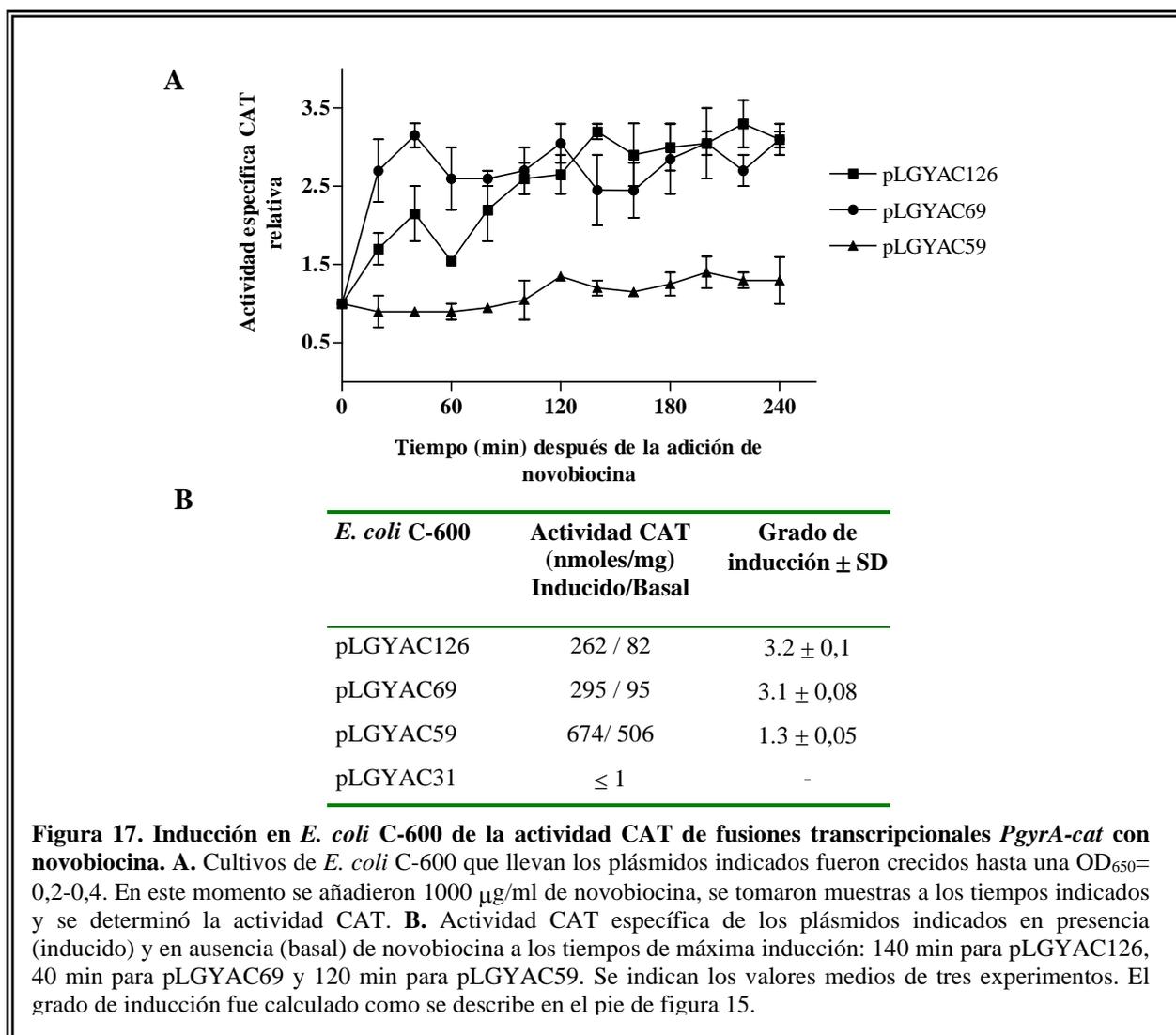
En la figura 16 se muestran los resultados de experimentos de inducción con ciprofloxacina. Al igual que en el caso de la novobiocina, sólo la actividad CAT del plásmido pLGYAC126 fue inducida por ciprofloxacina en aproximadamente 1,9 veces. A diferencia de



la novobiocina, la ciprofloxacina indujo la expresión de *cat* a partir de los 90 min, con un pico de inducción a los 140 min y una disminución progresiva hasta las 4 h.

4.6.2. Respuesta RST en *E. coli* C600

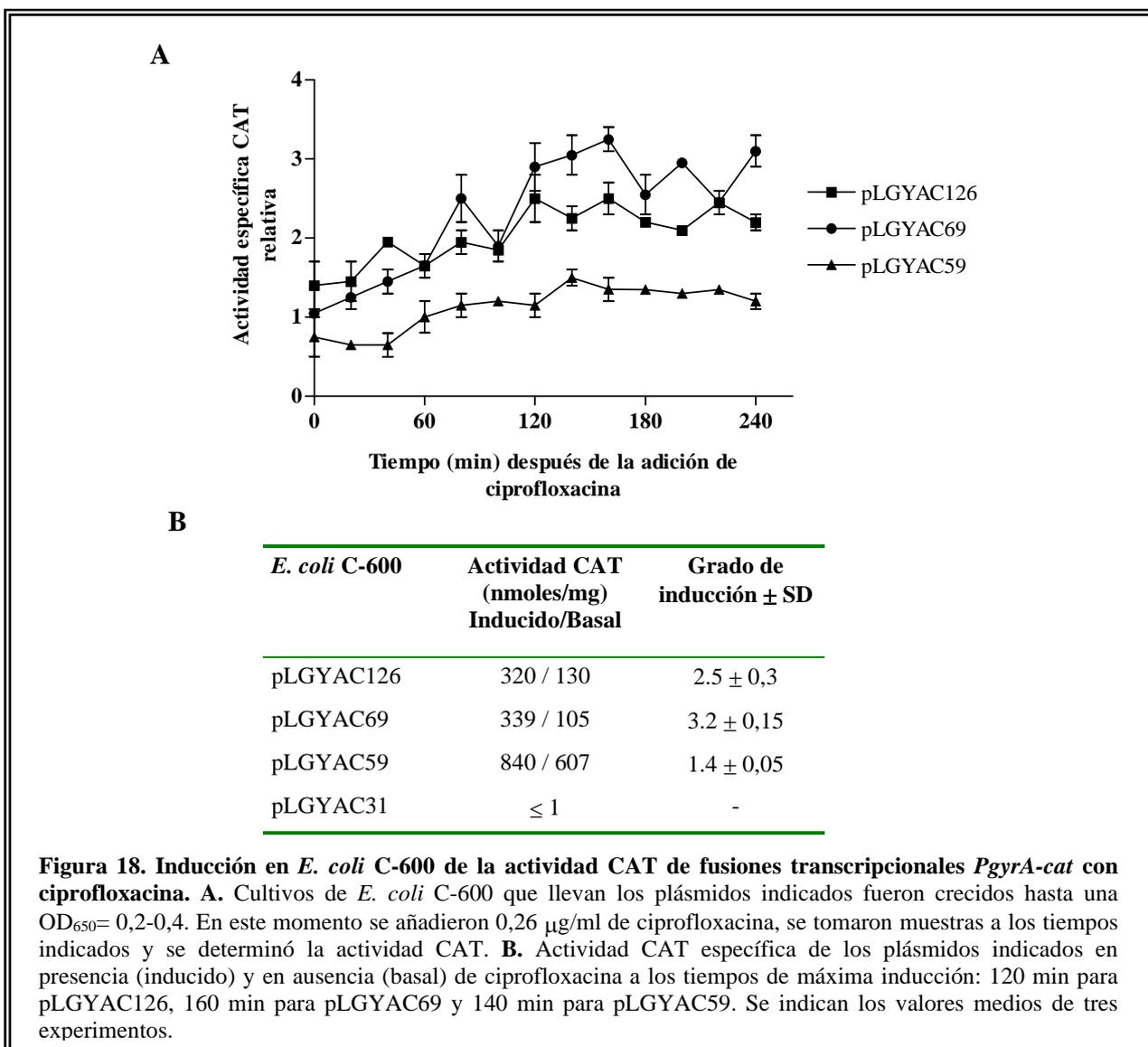
La concentración de novobiocina utilizada fue de 1.000 $\mu\text{g/ml}$ (10 veces la CMI de *E. coli*, que es 100 $\mu\text{g/ml}$), como se describe en estudios previos de otros autores (Menzel and Gellert, 1983). Para la ciprofloxacina, se utilizó una concentración de 0,26 $\mu\text{g/ml}$ (20 veces superior a la CMI, que es 0,013 $\mu\text{g/ml}$), siguiendo la misma relación con respecto a la CMI que en el caso de neumococo. En la figura 17 se observa que tanto en el plásmido pLGYAC126 como en pLGYAC69, la actividad específica CAT aumentó más de 3 veces con



respecto a la mostrada por las cepas que llevan los mismos plásmidos y que no fueron tratadas con novobiocina, mientras que la actividad CAT de pLGYAC59 no varió.

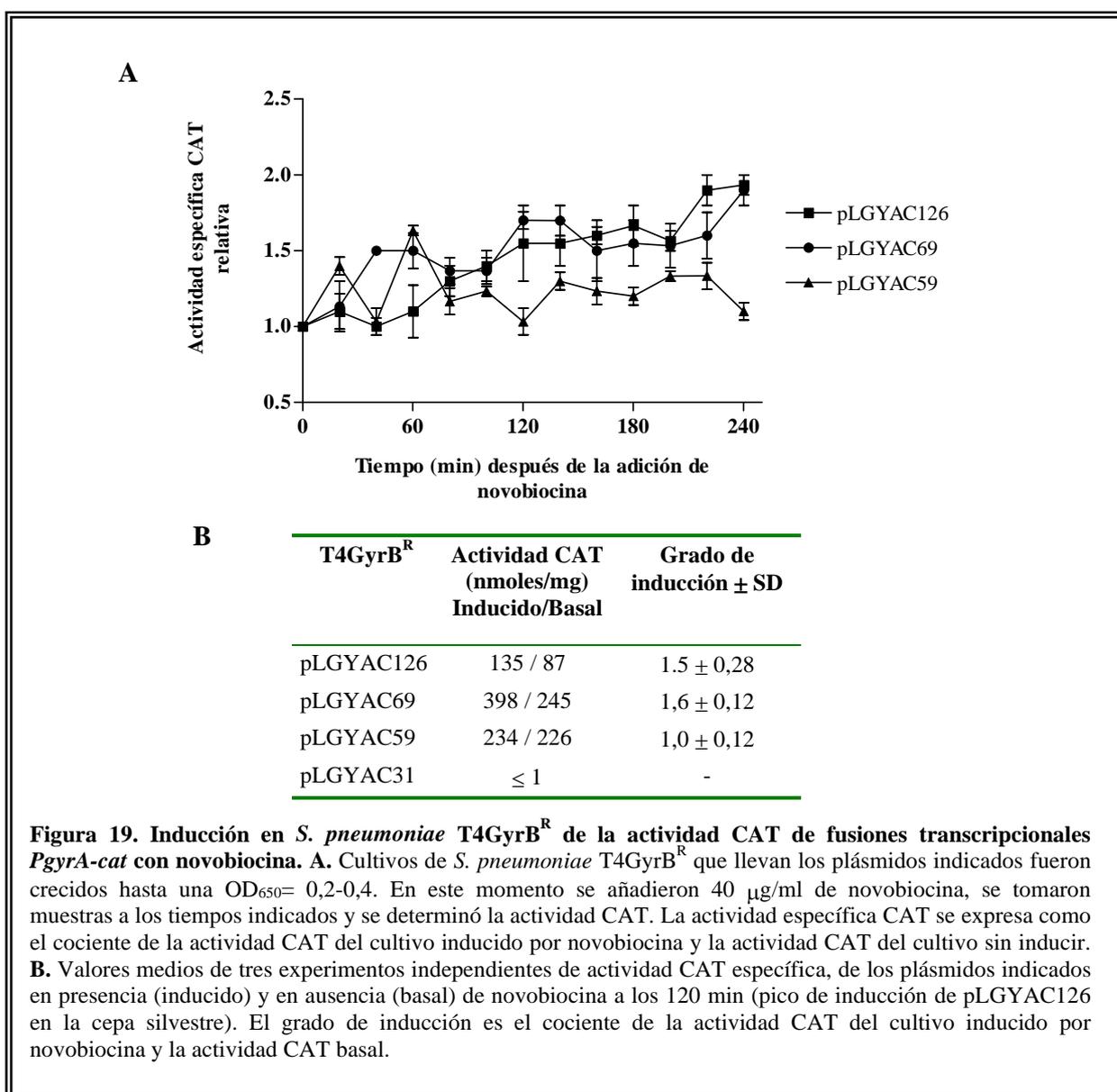
En la figura 18 se representan los resultados de los experimentos de inducción con ciprofloxacina. De forma similar a la inducción con novobiocina, la actividad CAT aumentó unas 2,5 veces en el plásmido pLGYAC126 y 3,2 veces en pLGYAC69, mientras que no aumentó significativamente en pLGYAC59.

Por tanto, en *E. coli*, la inducción de *gyrA* depende de la secuencia de nucleótidos presente en el plásmido pLGYAC69, es decir, de las regiones -35 y -10 del promotor, el sitio de inicio de la transcripción y las primeras bases del transcrito.



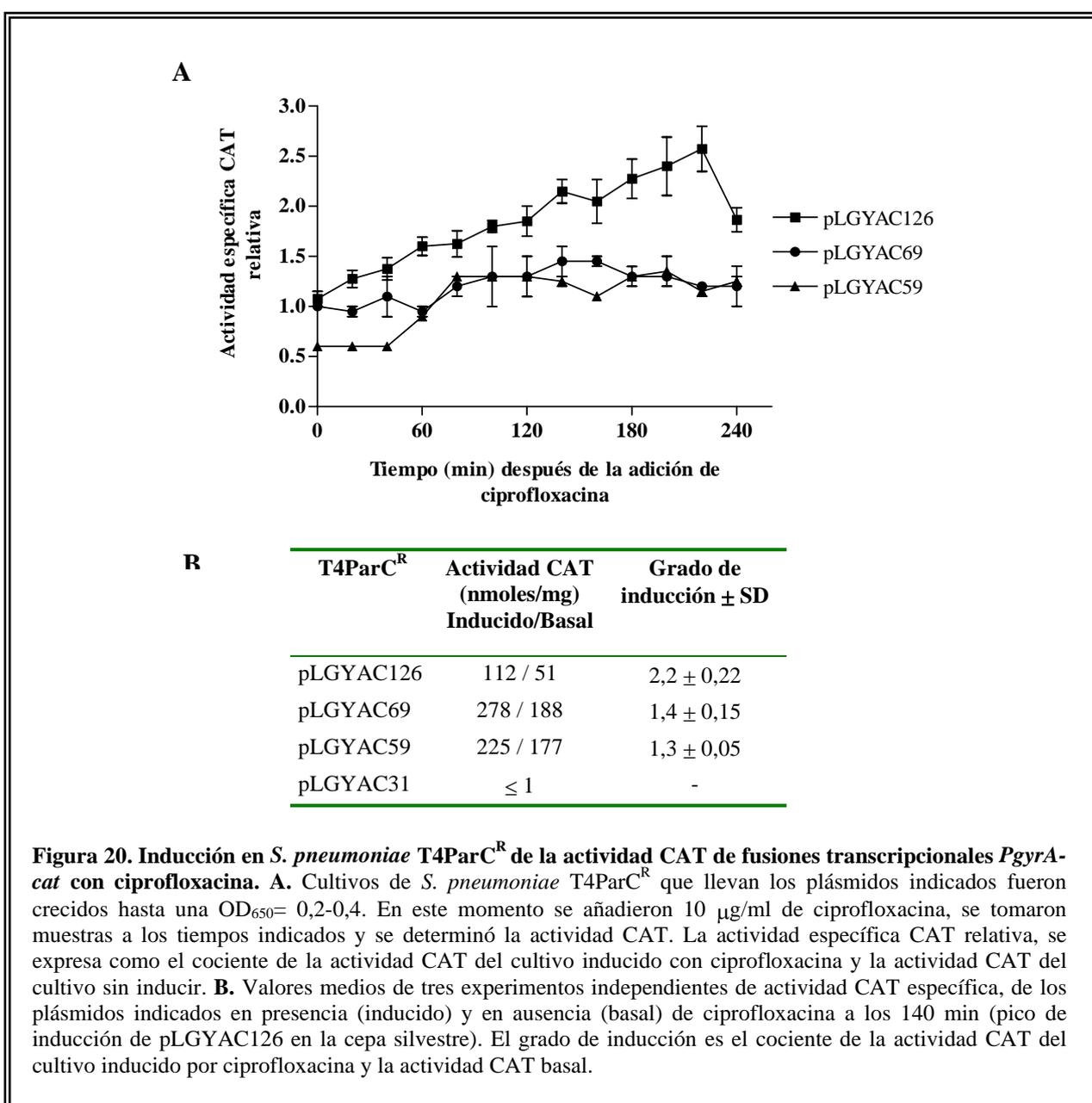
4.6.3. Respuesta RST en *S. pneumoniae* T4GyrB^R

Se construyó una cepa isogénica a T4 resistente a novobiocina (CMI = 128 µg/ml) que se denominó T4GyrB^R. Esta cepa lleva el cambio S127L (TTG→TCG) en GyrB y se construyó por transformación cromosómica de T4 con el plásmido pGYRN5 (Muñoz et al., 1995) que no replica en *S. pneumoniae*. La cepa T4GyrB^R fue transformada con los plásmidos pLGYAC126, -69, -59 y -31. Los resultados del experimento de inducción con novobiocina se representan en la figura 19. En ninguno de los plásmidos se observó inducción significativa de la actividad CAT.



4.6.4. Respuesta RST en *S. pneumoniae* T4ParC^R

Debido a que la girasa es un blanco secundario para las quinolonas en neumococo, los experimentos de inducción se realizaron en una cepa modificada genéticamente que lleva una mutación en *parC* y que fue construida en nuestro laboratorio. El producto de la amplificación por PCR de la región QRDR del gen *parC* de la cepa de R₂^{3429-C}, que lleva el cambio S79Y en ParC que confiere resistencia a ciprofloxacina (CMI = 4 µg/ml) (Muñoz and de la Campa, 1996), fue utilizado para transformar T4. Posteriormente, las células T4ParC^R fueron



transformadas con los plásmidos pLGYAC126, -69, -59 y -31. En la figura 20 se muestran los resultados de los experimentos de inducción con ciprofloxacina. Se observó un aumento en el nivel de expresión de *cat* de 2,2 veces en el plásmido pLGYAC126, pero el aumento no fue significativo en los plásmidos pLGYAC69 y pLGYAC59.

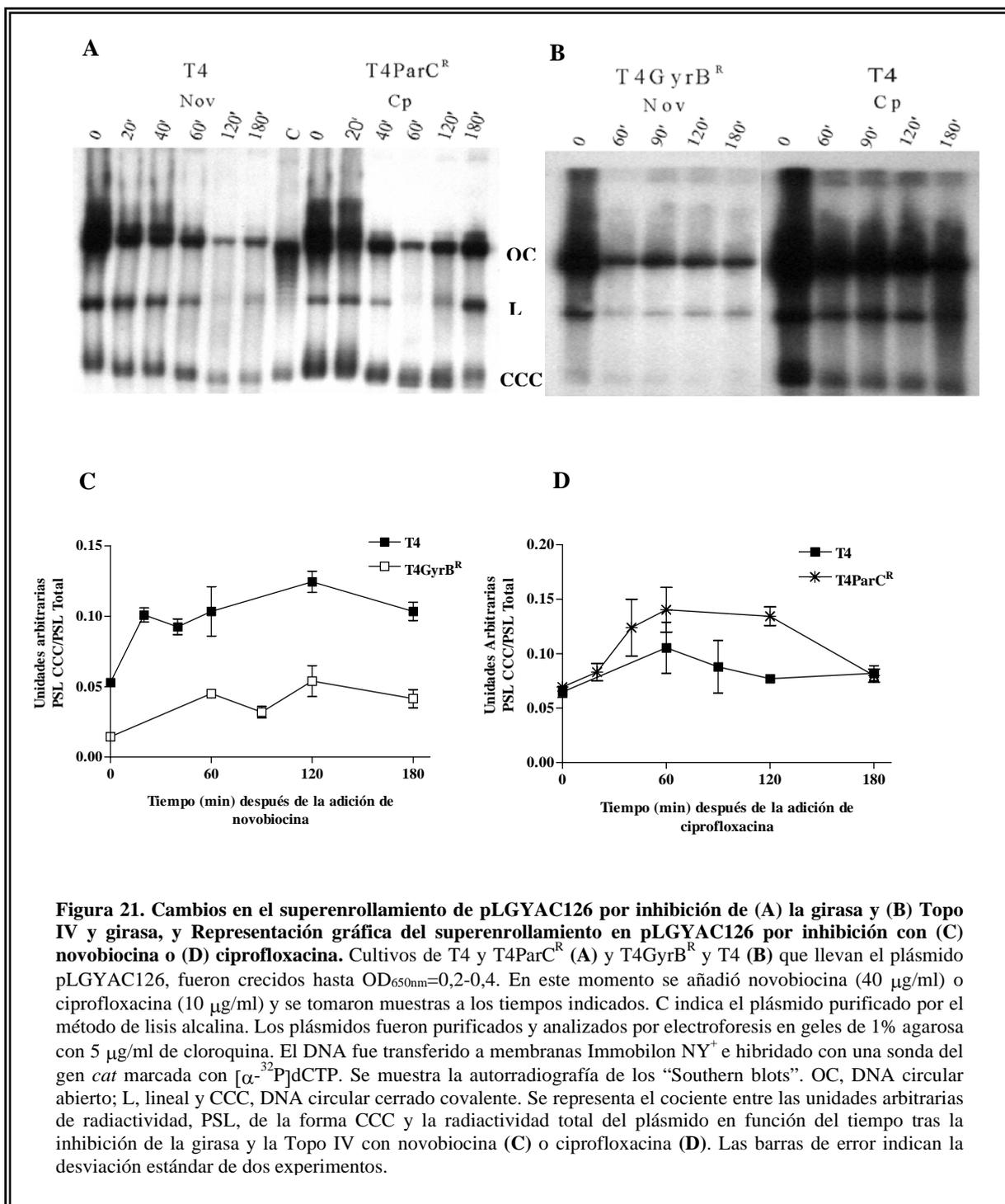
4.7. ANALISIS DEL SUPERENROLLAMIENTO DEL DNA PLASMIDICO

Los resultados de los experimentos de inducción indican que en respuesta a la relajación del DNA, por inhibidores de la girasa, se produce un aumento de la transcripción de *gyrA* de *S. pneumoniae*. El siguiente paso era conocer como la inhibición de la girasa con novobiocina y ciprofloxacina afectaba el nivel de superenrollamiento del DNA. Para ello, el plásmido pLGYAC126 fue purificado a partir de cultivos de *S. pneumoniae* T4, T4GyrB^R y T4ParC^R, sin tratamiento (t = 0) y a diferentes tiempos después del tratamiento con 40 µg/ml de novobiocina ó 10 µg/ml de ciprofloxacina, y analizado por electroforesis en geles de agarosa con cloroquina, que permite la separación de los topoisómeros superenrollados. El DNA fue transferido a membranas de nylon e hibridado con una sonda específica del gen *cat* con objeto de detectar y cuantificar formas plasmídicas. Los cambios en el nivel de superenrollamiento se midieron por la relación entre la cantidad de radiactividad de la forma CCC del plásmido y la radiactividad total en cada tiempo (Figs 21C y 21D).

Los efectos en el superenrollamiento del plásmido pLGYAC126 por inhibición de la girasa con novobiocina (cepa T4) y ciprofloxacina (cepa T4ParC^R) se muestran en la figura 21A. En T4, la novobiocina inhibe la girasa y en T4ParC^R, la mutación en *parC* de la topo IV confiere a la cepa resistencia a ciprofloxacina, por lo que la enzima inhibida es también la girasa. En ambos casos, la relajación del DNA, por inhibición de la girasa con novobiocina y ciprofloxacina, produce un aumento de la transcripción de la misma. Como consecuencia, la girasa cambia el plásmido a un nivel de superenrollamiento más negativo.

Por otro lado, se estudiaron los cambios en el superenrollamiento del plásmido pLGYAC126 por inhibición con novobiocina de la cepa T4GyrB^R y con ciprofloxacina de la cepa T4 (Fig. 21B). La mutación en *gyrB* de la girasa confiere a la cepa T4GyrB^R resistencia a novobiocina, por lo que la girasa no es inhibida por esta droga y no se producen cambios en el superenrollamiento del plásmido. En T4, tanto la topo IV (blanco primario a Fqs en

neumococo), como la girasa (blanco secundario) van a ser inhibidas por la ciprofloxacina, lo que se refleja en el plásmido por un aumento en el nivel de superenrollamiento negativo.



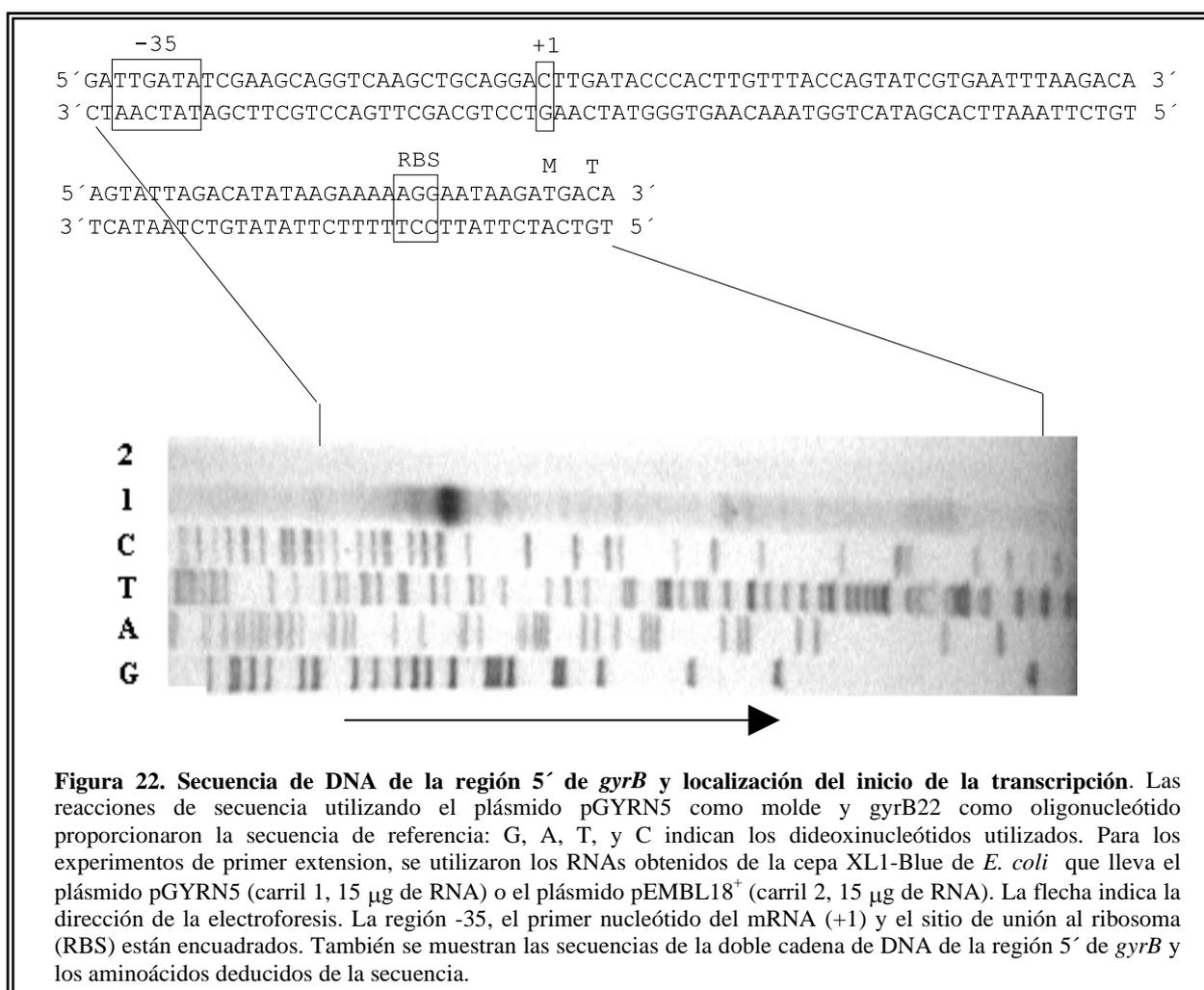
Estos resultados se representaron gráficamente en las figuras 21C y 21D. En la figura 21C se representan los cambios en el nivel de superenrollamiento del plásmido pLGYAC126 en la cepa T4 y T4GyrB^R, por inhibición de la girasa con novobiocina. En T4, se observa un aumento en el nivel de superenrollamiento negativo por la girasa, mientras que, en T4GyrB^R, el superenrollamiento plasmídico se mantiene prácticamente sin cambios debido a la resistencia de la girasa a la novobiocina. Cuando se comparan ambas cepas se observa, además, que la mutación de resistencia a novobiocina en *gyrB* (T4GyrB^R) hace que el nivel de superenrollamiento de la célula sea menos negativo que el de T4.

En la figura 21D se representan los cambios en el superenrollamiento del plásmido pLGYAC126 en la cepa T4 y T4ParC^R por inhibición con ciprofloxacina. La mutación en *parC* de la topo IV no parece afectar al nivel de superenrollamiento celular, ya que es el mismo que en la cepa silvestre. En ambos casos, la estimulación de la transcripción de la girasa en respuesta a la relajación del DNA, produce un aumento en el superenrollamiento negativo del plásmido. Este es más pronunciado en la cepa T4ParC^R que en T4.

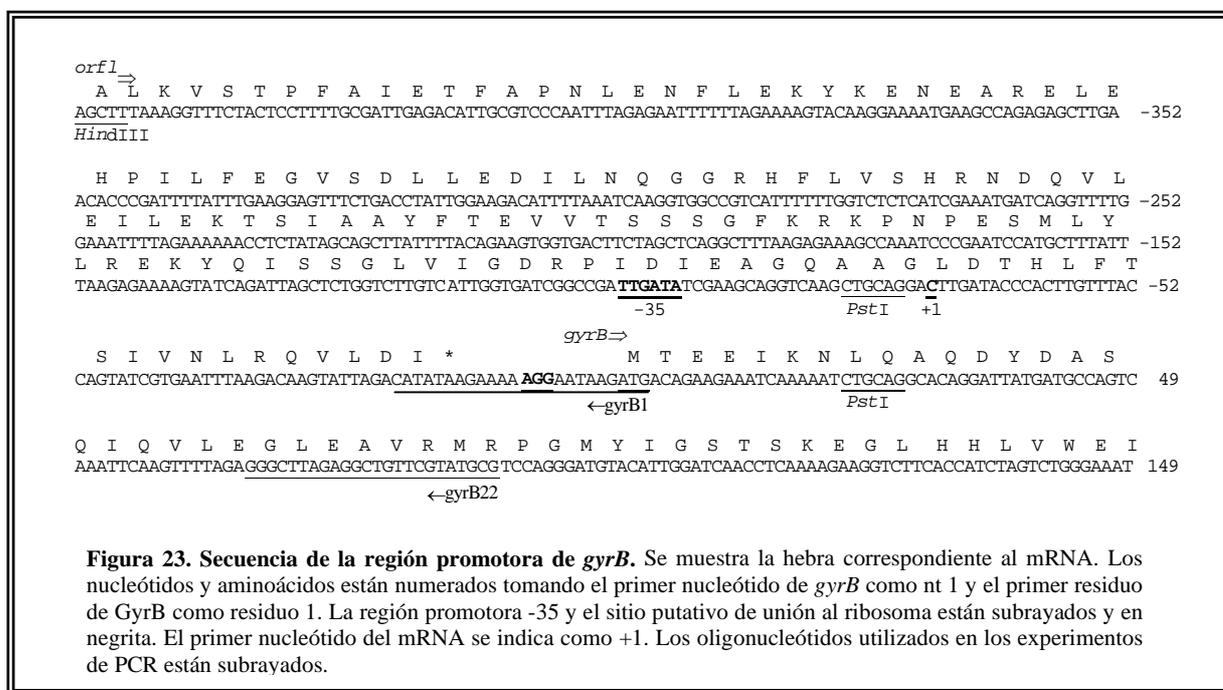
4.8. CARACTERÍSTICAS DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *gyrB* DE *S. pneumoniae*

4.8.1. Caracterización del inicio de la transcripción

El gen *gyrB* de *S. pneumoniae* había sido clonado y caracterizado previamente en nuestro laboratorio (Muñoz et al., 1995). Para localizar el inicio de la transcripción de este gen, se realizó el ensayo de “primer extension” con un oligonucleótido de 24 pb (*gyrB22*) (Fig. 23) y con RNA extraído de la cepa XL1-Blue de *E. coli* que lleva el plásmido pGYRN5 (Muñoz et al., 1995), y RNA de la misma cepa con el plásmido pEMBL18⁺ como control negativo. Este rindió un producto de 90 nucleótidos (Fig. 22), situando el inicio de la transcripción en la C, localizada en la posición -70 de la secuencia de la figura 23. Este nucleótido se encuentra a 23 pb del extremo 3´ terminal de la región -35 y a 70 pb del codon



de iniciación ATG (Fig. 22).



4.8.2. Secuencias implicadas en la transcripción

Al igual que para el gen *gyrA*, se construyó una fusión transcripcional de la región promotora de *gyrB* y el gen *cat*. Para ello, el inserto del plásmido pGYRN5 (Muñoz et al., 1995), que comprende los nucleótidos -452 a 1704 del gen *gyrB*, fue aislado de geles de agarosa tras digestión con *EcoRI*+*HindIII*, clonado en pUC18 cortado con las mismas enzimas y transformado a XL1-Blue de *E. coli*. El plásmido resultante, pGYRN8.1 (Fig. 24), fue linearizado por digestión con la enzima interna *BglIII*, amplificándose por PCR, con los oligonucleótidos *gyrB1* fosforilado y *gyrB555*, la mayor parte del plásmido: región promotora del gen *gyrB*, que comprende los nucleótidos -452 hasta el +3 (considerando el primer nucleótido de *gyrB* como la posición 1) (Fig. 23), y vector pUC18. El gen *cat* se amplificó por PCR a partir del plásmido pJS3. Los productos resultantes de ambas amplificaciones se digirieron con *SacI*, se ligaron y se transformaron en la cepa XL1-Blue de *E. coli*, seleccionando los clones que llevaban la fusión *PgyrB-cat* en 5 µg/ml de cloramfenicol (Fig. 24). Se seleccionó uno de los plásmidos, pGYBC1 y se secuenció su inserto. Posteriormente, la fusión *PgyrB-cat* de pGYBC1, fue clonada en pLS1. Para ello, el plásmido fue digerido con

EcoRI y *HindIII* (dianas incluidas en el sitio de multiclonado de pGYBC1), clonado en pLS1 cortado con las mismas enzimas y establecido en la cepa T4 de *S. pneumoniae*, realizando la selección de los plásmidos recombinantes en 1 µg/ml de tetraciclina y 2,5 µg/ml de cloramfenicol (Fig. 24).

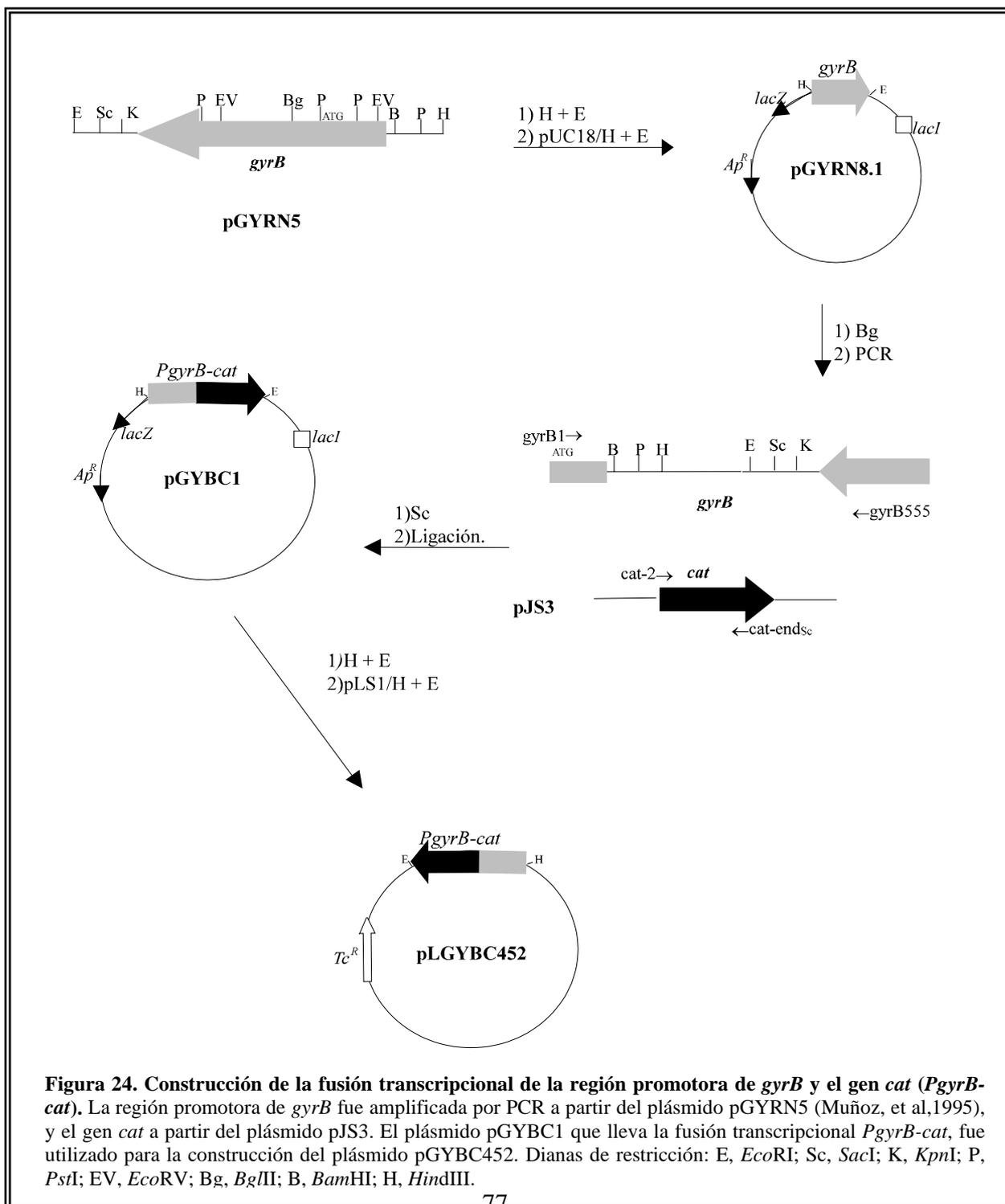


Figura 24. Construcción de la fusión transcripcional de la región promotora de *gyrB* y el gen *cat* (*PgyrB-cat*). La región promotora de *gyrB* fue amplificada por PCR a partir del plásmido pGYRN5 (Muñoz, et al,1995), y el gen *cat* a partir del plásmido pJS3. El plásmido pGYBC1 que lleva la fusión transcripcional *PgyrB-cat*, fue utilizado para la construcción del plásmido pLYBC452. Dianas de restricción: E, *EcoRI*; Sc, *SacI*; K, *KpnI*; P, *PstI*; EV, *EcoRV*; Bg, *BgIII*; B, *BamHI*; H, *HindIII*.

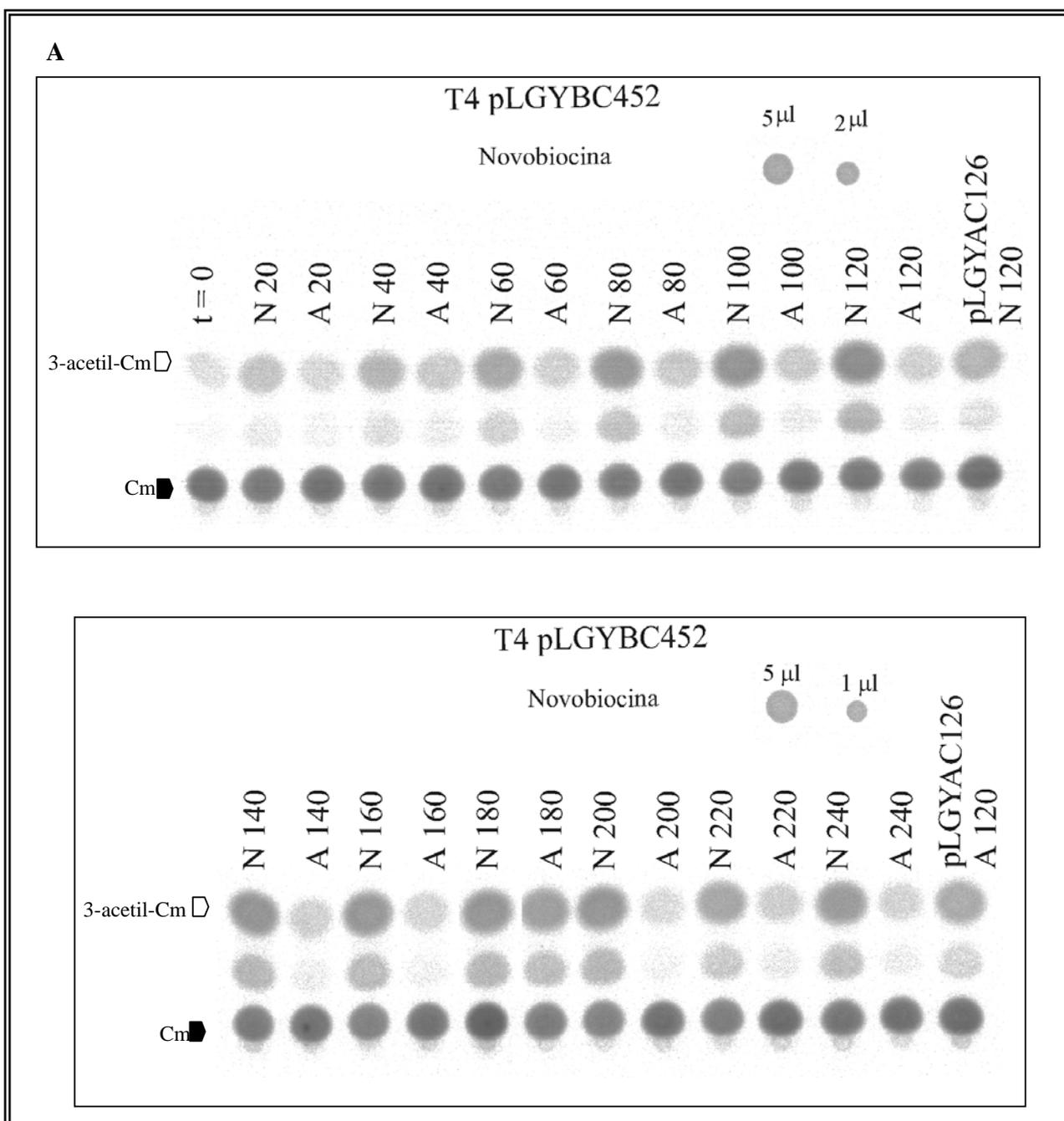
4.8.3. ¿Existe curvatura en la región promotora de *gyrB*?

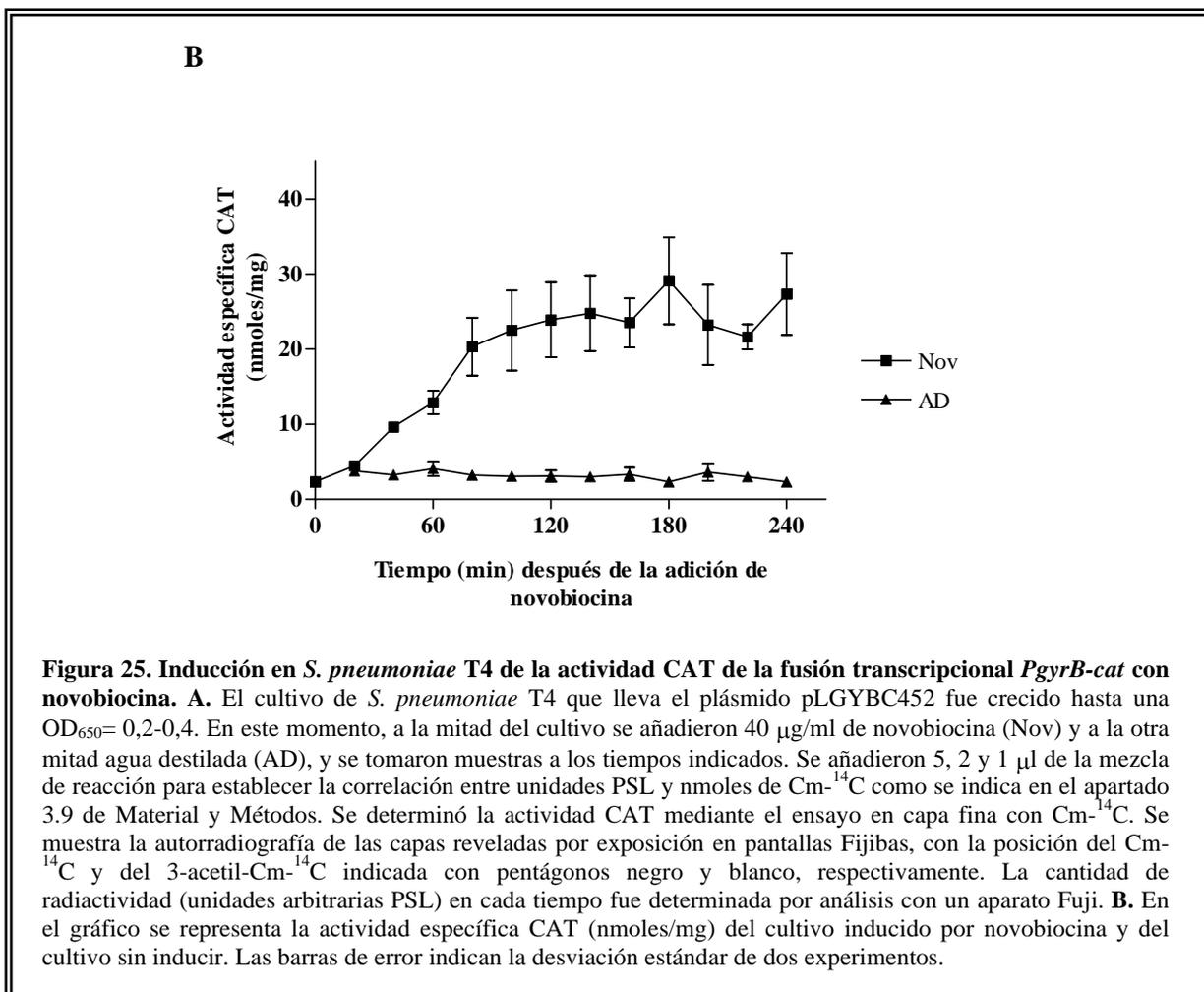
Se estudió la movilidad electroforética, en geles de acrilamida a tres temperaturas (6, 20 y 60°C), del inserto de DNA que lleva la región promotora de *gyrB* presente en el plásmido pLGYBC452 (Fig. 11). La fusión *PgyrB-cat* del plásmido pLGYBC452 (Fig. 24) fue cortada con las enzimas de restricción *HindIII* (diana localizada en el extremo 5' de la fusión) y *NcoI* (enzima localizada en la secuencia del gen *cat*), generando un fragmento de 884 pb. Se determinó el factor $R^{6/60}$ (Poljak and Gralla, 1987), cuyo valor fue de 1, por lo que se consideró como un fragmento recto.

4.8.4. Respuesta RST en la fusión *PgyrB-cat*

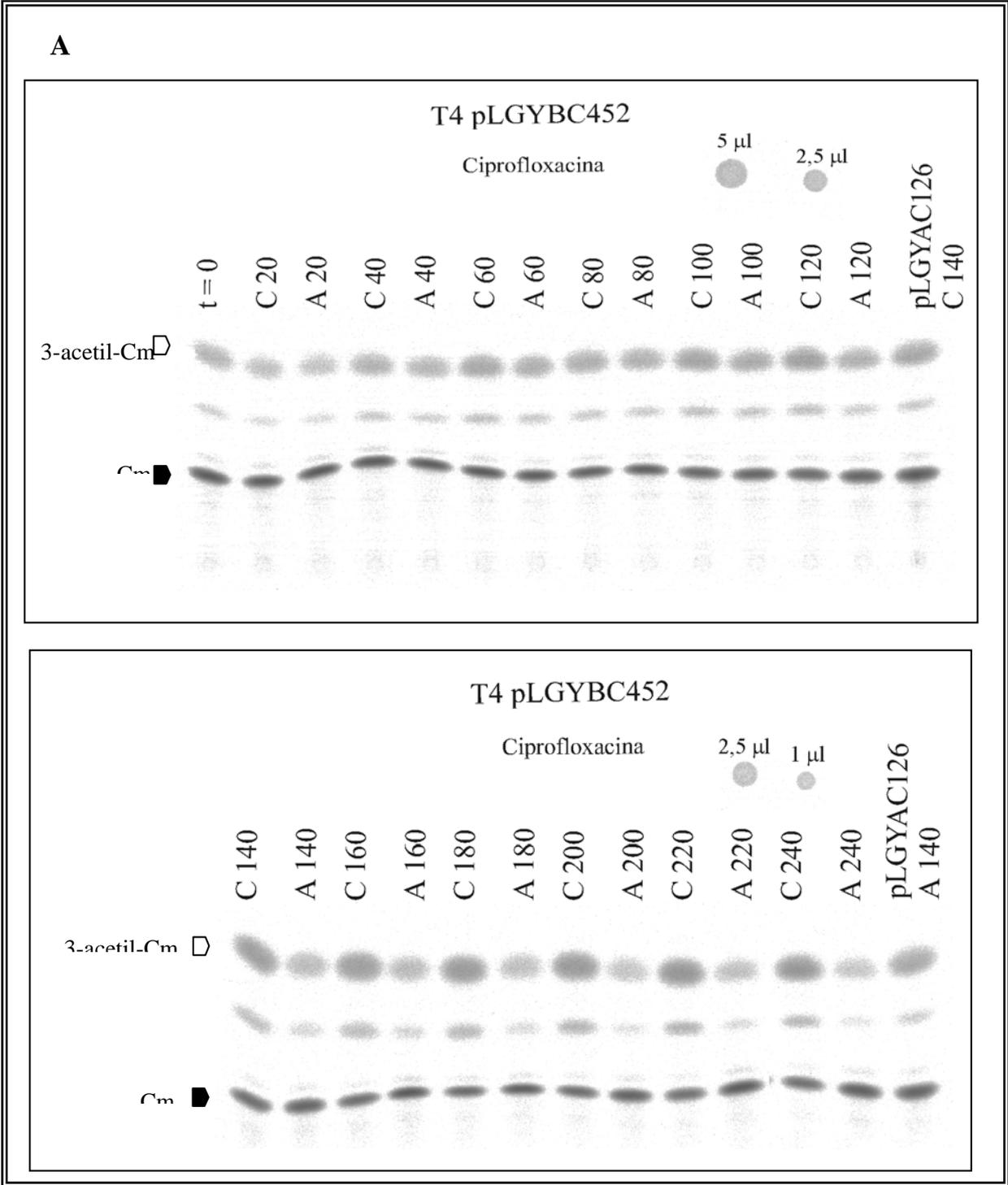
Para determinar si la transcripción del gen *gyrB* de *S. pneumoniae* era estimulada por la relajación del DNA como en el caso de *gyrA*, se midió el grado de inducción de la actividad CAT por novobiocina y ciprofloxacina en la fusión *PgyrB-cat* presente en el plásmido pLGYBC452. El método espectrofotométrico no fue suficientemente sensible para detectar la actividad de la fusión *PgyrB-cat*, indicando que el promotor de *gyrB* era más débil que el promotor de *gyrA*, por lo que se utilizó el ensayo de actividad CAT en capa fina con $Cm-^{14}C$. La determinación de la actividad CAT en capa fina se realizó como se describe en el apartado 3.9 de Material y Métodos, utilizando concentraciones de novobiocina y ciprofloxacina, de 40 μ g/ml y 10 μ g/ml, respectivamente. Como control de la reacción se incluyó el extracto del plásmido pLGYAC126 sin tratamiento con inhibidores ($t=0$), a los 120 min del tratamiento con novobiocina y a los 140 min del tratamiento con ciprofloxacina. Para poder medir la actividad CAT de los extractos control en el rango lineal del método, éstos fueron diluidos 500 veces en 0,25 M Tris-HCl pH 7.5, lo que parece indicar que la fuerza del promotor de *gyrA* es al menos 500 veces superior a la del promotor de *gyrB*. La cantidad de radiactividad (unidades arbitrarias PSL) en cada tiempo fue determinada por análisis con un aparato Fujibas.

En la figura 25 se muestra la inducción por novobiocina a varios tiempos después del tratamiento de la cepa de *S. pneumoniae* T4 con el plásmido pLGYB452. La adición de novobiocina indujo la expresión de *cat* en aproximadamente siete veces. El nivel de inducción se duplicó a los 40 min, alcanzó el máximo a los 120 min y se mantuvo constante hasta 4 horas después.





En la figura 26 se muestran los resultados de los experimentos de inducción con ciprofloxacina. La actividad CAT del plásmido pLGYBC452 fue inducida por ciprofloxacina en aproximadamente 5 veces. A diferencia de la novobiocina, la ciprofloxacina produjo un aumento progresivo de la actividad CAT a lo largo del tiempo.



B

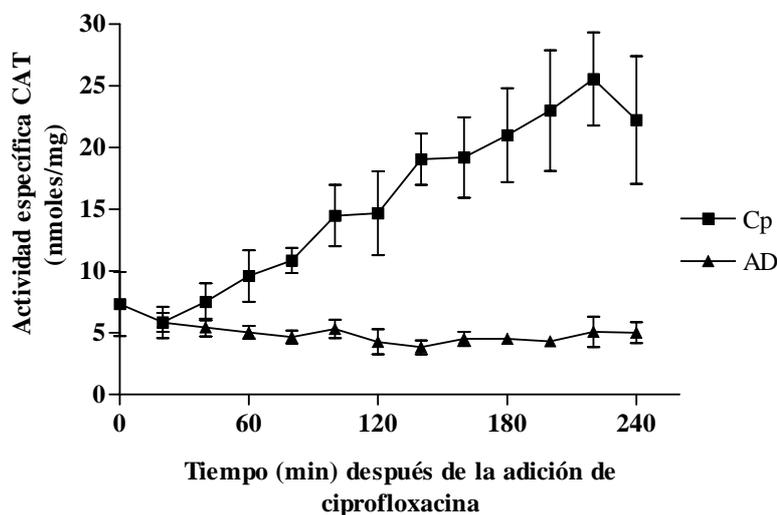


Figura 26. Inducción en *S. pneumoniae* T4 de la actividad CAT de la fusión transcripcional *PgyrB-cat* con ciprofloxacina. A. El cultivo de *S. pneumoniae* T4 que lleva el plásmido pLGYBC452 fue crecido hasta una $OD_{650} = 0,2-0,4$. En este momento, a la mitad del cultivo se añadieron 10 $\mu\text{g/ml}$ de ciprofloxacina y a la otra mitad agua destilada, y se tomaron muestras a los tiempos indicados. Se añadieron 5, 2.5 y 1 μl de la mezcla de reacción para establecer la correlación entre unidades PSL y nmoles de Cm^{-14}C como se indica en el apartado 3.9 de Material y Métodos. Se determinó la actividad CAT mediante el ensayo en capa fina con Cm^{-14}C . Se muestra la autorradiografía de las capas reveladas por exposición en pantallas Fijibas, con la posición del Cm^{-14}C y del 3-acetil- Cm^{-14}C indicada con pentágonos negro y blanco, respectivamente. La cantidad de radiactividad (unidades arbitrarias PSL) en cada tiempo fue determinada por análisis con un aparato Fuji. B. En el gráfico se representa la actividad específica CAT (nmol/mg) del cultivo inducido por ciprofloxacina y del cultivo sin inducir. Las barras de error indican la desviación estándar de dos experimentos.

5. DISCUSSION

5.1. CARACTERÍSTICAS DE LA SUBUNIDAD GyrA DE *S. pneumoniae*

La región que codifica los aminoácidos GyrA 44-170 de *S. pneumoniae* R6 (Fig. 5) había sido clonada previamente en nuestro laboratorio (Muñoz and de la Campa, 1996). Para realizar esta clonación se diseñaron oligonucleótidos degenerados que codificaban secuencias de aminoácidos de la QRDR conservados en otras proteínas GyrA (Belland et al., 1994; Ferrero et al., 1994). Sin embargo, no se había conseguido la clonación del gen *gyrA* completo, a pesar de que se había utilizado una librería comercial de DNA de neumococo en el fago λ gt11 (Muñoz and de la Campa, 1996).

En esta tesis se ha logrado la clonación de *gyrA* mediante el diseño de una estrategia basada en reacciones solapantes de PCR con oligonucleótidos degenerados y análisis físico de la región cromosómica de *gyrA* (Fig. 5). Esto ha permitido la determinación de la secuencia de nucleótidos de un fragmento de 2685 pb del cromosoma de R6 de *S. pneumoniae* que incluye el gen *gyrA* (Fig. 6). La proteína codificada por *gyrA* tendría un tamaño de 822 aminoácidos y un peso molecular de 92,096 kDa, valor que coincide con el tamaño de 92 kDa de la proteína expresada en *E. coli* (Fernández-Moreira et al., 2000).

La comparación de la secuencia de aminoácidos de GyrA de neumococo con la de otras especies bacterianas mostró una identidad de un 60% con GyrA de *B. subtilis* y *S. aureus*, y cerca de un 50% con GyrA de *E. coli* (Fig. 27). La secuencia comprendida entre los aminoácidos 414 y 447 de GyrA de *E. coli* es única cuando se compara con la secuencia de otras topoisomerasas (Fig. 27). Esta región de 34 aminoácidos comparte un alto grado de identidad con las secuencias correspondientes de *Klebsiella pneumoniae* (Dimri and Das, 1990), *Aeromonas salmonicida* (Oppegaard and Sorum, 1996) y *P. aeruginosa* (Kureishi et al., 1994), sin embargo está ausente en otras bacterias Gram-negativas como *Campylobacter jejuni* (Wang et al., 1993) y *Helicobacter pylori* (Moore et al., 1995) así como en bacterias Gram-positivas tales como *B. subtilis* y *S. aureus* (Fig. 27). Esta secuencia tampoco existe en ParC de *E. coli*, ni en otras topoisomerasas de tipo II (Kato et al., 1990) y hasta el momento se desconoce su significado biológico.

<i>Spn</i>	MDD---KNLV	NVNLTRKEMKA	SFIDYAMSVI	VARALPDVDR	GLKPVHRRLL	YGMNELGVTP	DKPHKKSARI	67	
<i>Bsu</i>	MSEQNTPQVR	ETNLSQEMRT	SFIDYAMSVI	VSRALPDVDR	GLKPVHRRLL	YAMNDLGMTS	DKPYKKSARI	70	
<i>Sau</i>	MAELPQSRIN	EHNITSEMRE	SFIDYAMSVI	VARALPDVDR	GLKPVHRRLL	YGLNECGMTP	DKSYKKSARI	70	
<i>Eco</i>	MSDLA-REIT	PVNTTEELKS	SFIDYAMSVI	VSRALPDVDR	GLKPVHRRLL	YAMNVLGNDW	NKAYKKSARI	69	
<i>Spn</i>	TGDMGKYHP	HGDSSIYEAM	VRMAQWWSYR	YMLVDGHGNF	GSM DGD SAAA	QRYTEARM SK	IALEMLRFDIN	137	
<i>Bsu</i>	VGEVIGKYHP	HGD SAVY ESM	VRMAQDFNYR	YMLVDGHGNF	GSV DGD SAAA	MRYTEARM SK	ISMELLRFDIT	140	
<i>Sau</i>	VGDVMGKYHP	HGDSSIYEAM	VRMAQDFSYR	YPLVDGQGNF	GSM DGD SAAA	MRYTEARM TK	ITLELLRFDIN	140	
<i>Eco</i>	VGEVIGKYHP	HGD SAVY DTI	VRMAQDFSLR	YMLVDGQGNF	GSD DGD SAAA	MRYTEIRLAK	IAHELMADLE	139	
<i>Spn</i>	KNTMDFVDNY	DANERHFLVL	PARFENLLVN	GATGIAVGMA	TNIPPHLLHE	TIDAVKLVMD	NPEVTTKDLM	207	
<i>Bsu</i>	KETIDYQDNY	DGSEHFPVVM	PSRFENLLVN	GAAGIAVGMA	TNIPPHLLGE	IIDGVLAVSE	NPDIPIPELM	210	
<i>Sau</i>	KETIDYQDNY	DGNERHPSVL	PARFENLLAN	GASGIAVGMA	TNIPPHLLHE	IINGVLSLSK	NPDISIAELM	210	
<i>Eco</i>	KETMDFVDNY	DGTEKLEDDVM	ETKLENLLVN	GSSGIAVGMA	TNIPPHLLHE	VINGCLAYID	DEDISIEGLM	209	
<i>Spn</i>	EVLPGDFPPT	GALVMGKSGI	HRAYETGRGS	IVLRSRTEIE	-TTKTGREHT	VVTEEPYMVN	KTKVHEHTVR	276	
<i>Bsu</i>	EVIPGDFPPT	AGQILGRSGI	RKAYESGRGS	ITIRAKAEIE	-QTSSKERT	IVTELEPYQVN	KAKLIEKIAD	279	
<i>Sau</i>	EDIEGDFPPT	AGLILGKSGI	RRAYETGRGS	IQMRSRAVIE	-ERGGGRQRI	VVTELEPYQVN	KARMIETIAE	279	
<i>Eco</i>	EHIPGDFPPT	AAIINGRGI	EEAYRTGRGK	VYIRARA EVE	VDAKTGRETI	IVHELEPYQVN	KARLIEKIIE	279	
<i>Spn</i>	LVQKRIEGL	TAVRDESN-R	EGMREVIIEVK	RDASANVILN	NLFKMTDMOT	NGENMLAIQ	NGLPKILSLR	345	
<i>Bsu</i>	LVRKIKIIEGL	TDLRDESD-R	TGMRIVIEIR	RDANANVILN	NLYKQTALQT	SEGINLIALV	DGQPKVLTIK	348	
<i>Sau</i>	LVRKIKIIEGL	TDLRDETSR	TGMRIVIEVK	KDANAVILN	NLYKQTALQT	SEGVNMLALV	NGRPKLNLK	349	
<i>Eco</i>	LVRKIKIIEGL	SALRDESD-K	DGMRIVIEIR	RDAVAVILN	NLYKQTALQT	SEGINLIALV	HEQPKIMNLK	348	
<i>Spn</i>	QILDAYIEHQ	KEVIVRRTRF	DKEKAEARAH	IIEGLLIALD	HIDEVTRITR	ASETDAHAQA	ELMSK-----	410	
<i>Bsu</i>	QCLEHYLDHQ	KVVIVRRRTAY	ELFKAEARAH	IIEGLRVALD	HIDAVISLIR	NSQTAETART	GLIEQ-----	413	
<i>Sau</i>	EALVHYLDHQ	KTVIVRRRTQY	NLFKAKIRAH	IIEGLRIALD	HIDEITSTIR	ESITDQVAME	SLDQR-----	414	
<i>Eco</i>	DIIAAFVRR	REVIVRRRTIF	ELFKAKIRAH	IIEGLVALA	NIDPIELIR	HAFTPAEAT	ALVANPWQLG	418	
<i>Spn</i>	-----	-----	-----	-F	KLSEFOQAQAI	LDMRLRLTG	LERIKIQSEY	DLLLALIAEL	451
<i>Bsu</i>	-----	-----	-----	-F	SLITEFOQAQAI	LDMRLRLTG	LERIKIEEY	QSLVKLIAEL	464
<i>Sau</i>	-----	-----	-----	-F	KLSEFOQAQAI	LDMRLRLTG	LERIKIEAEY	NELLNYSIEL	465
<i>Eco</i>	NVAAMLERAG	DDAARPEWLE	PEFGVRDGLY	YLLIEFOQAQAI	LDMRLRLTG	LEHEKLLDEY	KELLDQIAEL	488	
<i>Spn</i>	ADLLAKPERV	SQIKIEELDE	VKRKESDKRR	TELMVGVLS	LEDEDLIHEE	DVLITLSNRG	YIKRLDQDEF	527	
<i>Bsu</i>	KDILLANEYKV	LEIIRHELTE	IKERFENDERR	TEIVTSGLET	IEDEDLIHEE	NIVVTLTHNG	YVKRLPASTY	534	
<i>Sau</i>	EAILLADEEVL	LQLVREELTE	IRDRFEDDRR	TEIQGGFED	LEDEDLIHEE	QIVITLSHNN	YIKRLPVSTY	535	
<i>Eco</i>	LRILGSADRL	MEVIRELELE	VREQESDKRR	TEITANS-AD	INLEDLITQE	DVVVTLSHQG	YVKYQPLSEY	557	
<i>Spn</i>	TACKRGGGQV	QGTGVEDDF	VRELVSTSTH	DHILFEFTNKG	FVYRIKYEYI	PEYGRFAGKL	PVNNLLKLDE	597	
<i>Bsu</i>	RSQKRGGRV	QGMGTNEDDF	VEHLLSTSTH	DTILFEFTNKG	FVYRAKYEYI	PEYGRFAGKL	PIINLLEVEK	604	
<i>Sau</i>	RAQNRGGGQV	QGMNTLEEDF	VSQLVTLSTH	DHVLFEFTNKG	FVYRIKYEYI	PELSRQSKGI	PVNNALLEN	605	
<i>Eco</i>	EAQRGGGQV	SAARIKEEDF	IDRLLVANTH	DHILCESSRG	FVYSMKYDYL	PEATRARGGR	PIVNNLLPLEQ	627	
<i>Spn</i>	DESLQTVINV	ESDRSDDAYL	FFTTRHVLIR	RTSVKRFANI	RQNGLHALNL	KDEDELINVL	LAEGOMDIII	667	
<i>Bsu</i>	GEWLNALIEV	TEFNAE-LYL	FFTTRHGVSK	RTSLSCFANI	RNNGLIALSL	REDELMLCVR	LTDGTRKQIII	673	
<i>Sau</i>	DEVIPTMLAV	VEFATSEDNFL	VFATKRGVVK	RSALSNSFRI	NRNGKIALSF	REDELMLAVR	LTSQGEDILI	675	
<i>Eco</i>	DERITAILIEV	TEFE-EGVKV	FMATANGTVK	KTVLTFENRL	RTAKVAIKL	VDGDELICVD	LTSQGEDEVML	696	
<i>Spn</i>	GTKFGYAVRF	NQSAVREMSR	IATGVKGVNL	REGDITVVGAS	LITDQ--DEV	LIITEKGYGK	RTVATEYPTK	735	
<i>Bsu</i>	GTKNGLLIRF	PETDVRMGR	TAAGVKGITL	TDIDVVVGME	ILEEES--HV	LIVTEKGYGK	RTPAEYRTQ	747	
<i>Sau</i>	GTSHASLIRF	PESTLRPLGR	TATGVKGITL	REGDEVVGLD	VAHANSVDEV	LIVTENGYGK	RTPVNDYRLS	745	
<i>Eco</i>	FTSAEGRVRF	KESSVRAMGC	NATGVRGIRL	REGDEVVSLI	VPRGDGA--I	LIITATNGYGK	RTAVAEYPTK	764	
<i>Spn</i>	GRGGKMQTA	KITERNGLLA	GLMTVQGDDE	IMMITDTFVM	IRTNLANISQ	TGRATMGVAV	MRLDQDAQIV	805	
<i>Bsu</i>	SRGGKGLKTA	KITERNGLLV	AVKATKGEED	IMMITASGVL	IRMDINDISI	TGRVTCGVRL	IRMAEEHVVA	817	
<i>Sau</i>	NRGGKGLKTA	TITERNGLVV	CITTVTGEED	IMMITNAGVI	IRLDVADISQ	NGRAACGVRL	IRLGDDQFVS	815	
<i>Eco</i>	SRATKGVISI	KVTERNGLVV	GAVQVDDCQ	IMMITDAGTL	VTRVSELSI	VGRNTCGVIL	IRTAEDENVV	834	
<i>Spn</i>	TFTTVAVAEK	HEVGTENET-	-----	-----	-----	-----	-----	818	
<i>Bsu</i>	TVALVEKNEE	IENEEEQ--	-----	-----	-----	-----	-----	818	
<i>Sau</i>	TVARVKEDAE	IEFNEDEQST	STVSEDGTEQ	QREAVVNDET	PGNALHTEVI	DSEENDEDEGR	IEVRQDFMDR	875	
<i>Eco</i>	GLQRYAEFVD	HE-----	-----	-----	-----	-----	-----	861	
<i>Spn</i>	-----	EGEA	822	-----	-----	-----	-----		
<i>Bsu</i>	-----	-EEV	821	-----	-----	-----	-----		
<i>Sau</i>	VEEDIQQSLD	ELEE	889	-----	-----	-----	-----		
<i>Eco</i>	IAPEVDVDEE	PEEE	875	-----	-----	-----	-----		

Figura 27. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la DNA girasa de *S. pneumoniae* (*Spn*), *B. subtilis* (*Bsu*) (Moriya et al., 1985), *S. aureus* (*Sau*) (Magerrison et al., 1992), y *E. coli* (*Eco*) (Swanberg and Wang, 1987). Los aminoácidos idénticos se muestran encuadrados. Las flechas indican los residuos de GyrA en *E. coli* que forman el sitio activo de la reacción de rotura-reunión, incluyendo el residuo activo de Tyr-122 que se une al DNA. Las regiones QRDR se muestran en negrita y los aminoácidos implicados en la resistencia a quinolonas en *S. pneumoniae* se indican por círculos (Janoir et al., 1996), (Muñoz and de la Campa, 1996), (Pan et al., 1996), (Tankovic et al., 1996).

El mecanismo de acción de la girasa implica la introducción de una rotura de doble cadena en el DNA que se estabiliza mediante enlace covalente entre el extremo 5'-fosfato y un residuo Y de GyrA. Los residuos que forman el sitio activo de la reacción de rotura y reunión del DNA están conservados en la proteína GyrA de neumococo (Fig. 27), si se compara con la estructura cristalina de este dominio (residuos 2 a 523) de GyrA de *E. coli* (Morais Cabral et al., 1997). Las Y activas se encuentran en los extremos de la interfase del dímero. La región localizada alrededor del residuo activo Y122 de GyrA de *E. coli*, entre las proteínas de la figura 27 muestra elevada homología. Los residuos Y123 de *B. subtilis* y *S. aureus* y el Y120 de *S. pneumoniae*, serían los residuos activos en estas enzimas. Por otra parte, también se observa similitud entre las secuencias de las topo II de eucariotas y procariotas (Wang, 1987), deduciéndose que el residuo Y783 de la topo II de *S. cerevisiae* es el residuo activo. Los residuos Y122 y R121 de un monómero y H80, R32 y K42 del otro monómero, junto con otros residuos de carga positiva (R46 y R47), interaccionan mediante enlaces no covalentes con el extremo 3' terminal de la doble cadena de DNA rota (Morais Cabral et al., 1997).

La localización de mutaciones de resistencia a quinolonas en la estructura cristalina del dominio N-terminal de GyrA de *E. coli*, apoya la idea de que estos fármacos interaccionan con la proteína y el DNA en las bases adyacentes al sitio activo. Algunas de estas mutaciones se han localizado también en GyrA de *S. pneumoniae*, como responsables del alto nivel de resistencia a quinolonas (Fukuda and Hiramatsu, 1999; Janoir et al., 1996; Muñoz and de la Campa, 1996; Pan et al., 1996; Tankovic et al., 1996).

La mayor homología, entre las distintas especies, se encuentra en la región N-terminal de GyrA (residuos 1 a 485 de GyrA de *S. pneumoniae*). Cuando se comparan las secuencias de las regiones QRDR (correspondiente a las posiciones 67-106 de GyrA de *E. coli*) de ParC y GyrA de neumococo con la de bacterias gram-positivas (*S. aureus*, *B. subtilis*) y gram-negativas (*E. coli* y *N. gonorrhoeae*), la mayor identidad, 65 y 87,5% respectivamente, se encuentra entre *S. pneumoniae* y *S. aureus*; mientras que el nivel de identidad entre las QRDRs de ParC y GyrA para los otros microorganismos es menor de 53 y 70%, respectivamente (Muñoz and de la Campa, 1996). Este alto grado de identidad entre la secuencia de aminoácidos de *S. pneumoniae* y *S. aureus* se corresponde con la resistencia

intrínseca que presentan a la ciprofloxacina y al hecho de que ParC es más sensible a la ciprofloxacina que GyrA, en estas especies. Dado que las QRDRs son las regiones de interacción de GyrA y ParC con el DNA y las fluoroquinolonas (Gellert et al., 1977; Sugino et al., 1977; Kato et al., 1992), el resultado de estas comparaciones apoya que el blanco primario para las Fqs en las bacterias Gram-positivas es ParC (como ocurre en *S. aureus* y *S. pneumoniae*), mientras que GyrA es el blanco primario en las bacterias Gram-negativas.

La mayor divergencia entre las subunidades GyrA de *S. pneumoniae*, *B. subtilis*, *S. aureus* y *E. coli* (Fig. 27), se encuentra en el extremo C-terminal. En *S. pneumoniae*, este dominio C-terminal de GyrA comparte poca homología con el de la subunidad ParC de la topo IV (Fig. 28). Esto podría explicar las diferencias en el mecanismo de acción entre la girasa y la topo IV. Cuando se elimina el dominio C-terminal, la girasa “se convierte” en una topoisomerasa de tipo II, incapaz de catalizar el superenrollamiento del DNA, pero sí de relajarlo en una reacción dependiente de ATP (Kampranis and Maxwell, 1996), lo que sugiere que las propiedades de la girasa son atribuibles al modo de unión del DNA alrededor del dominio C-terminal de GyrA. La girasa enrolla el DNA alrededor de sí misma, mientras que otras topoisomerasas de tipo II no (Reece and Maxwell, 1991a; Peng and Marians, 1995).

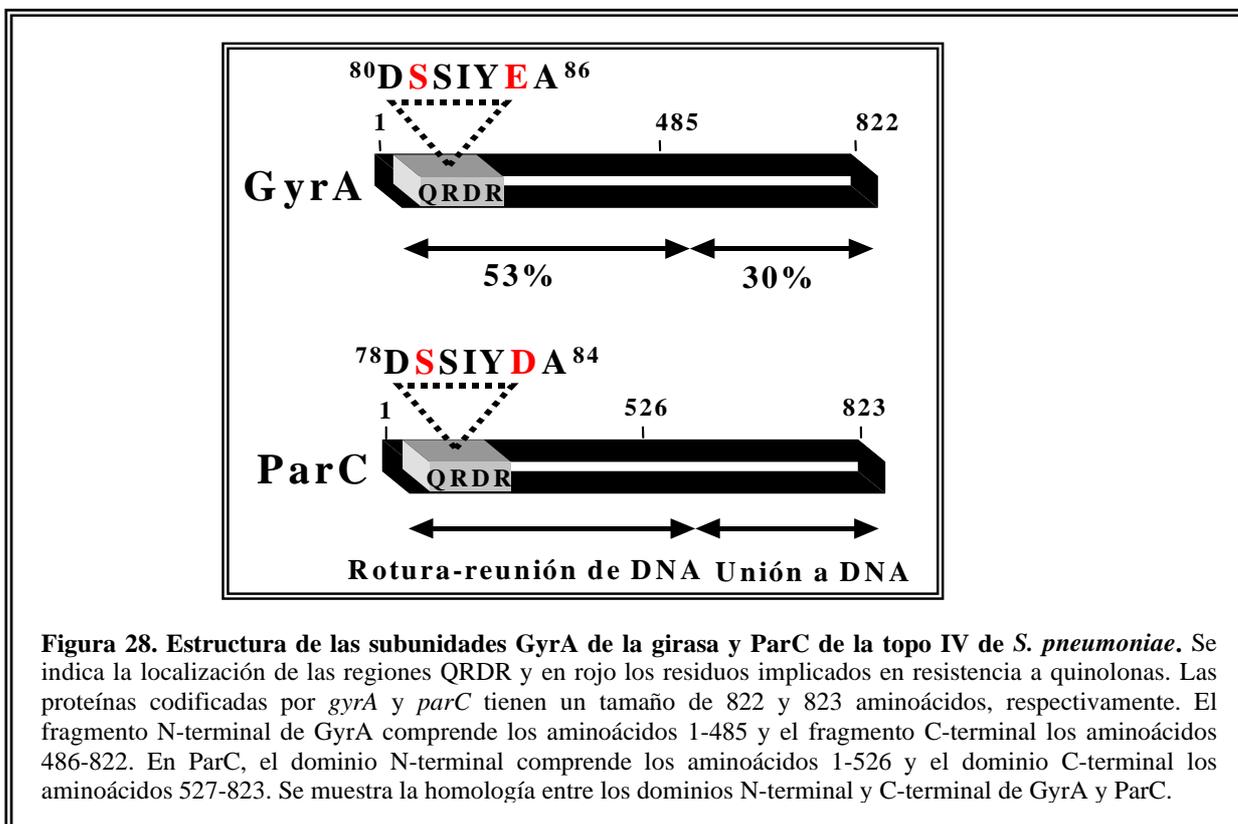
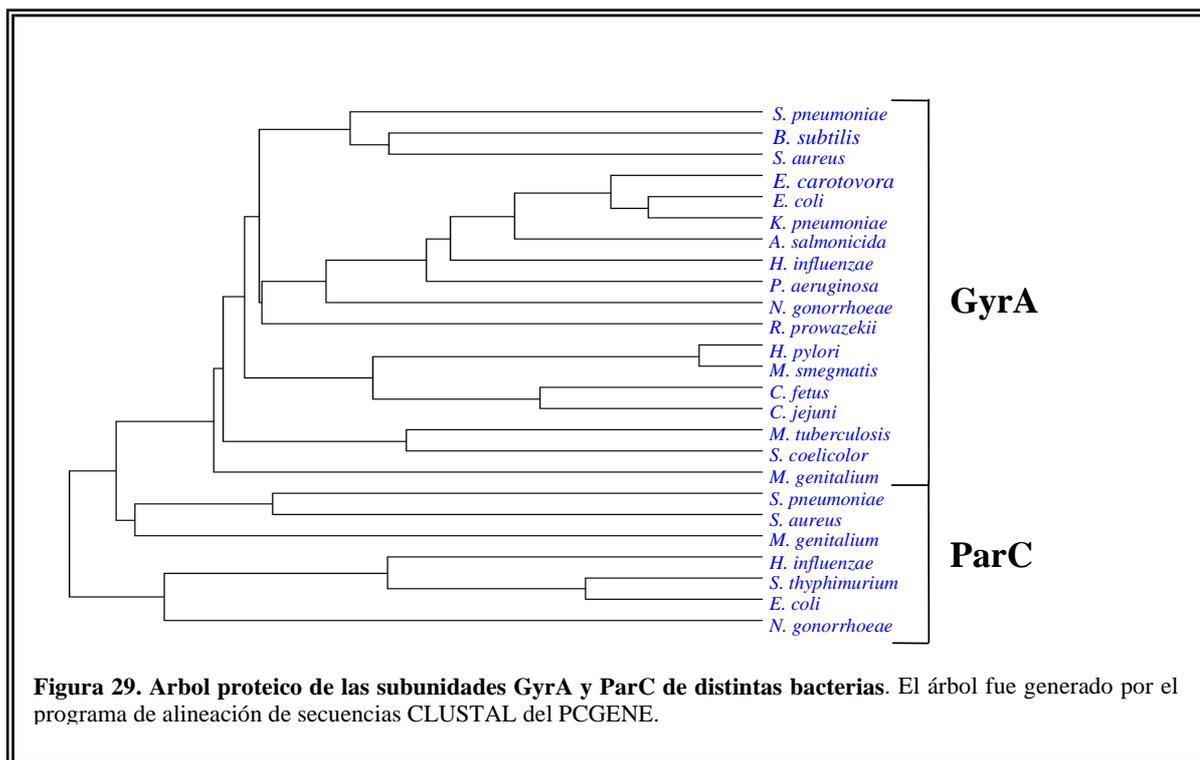


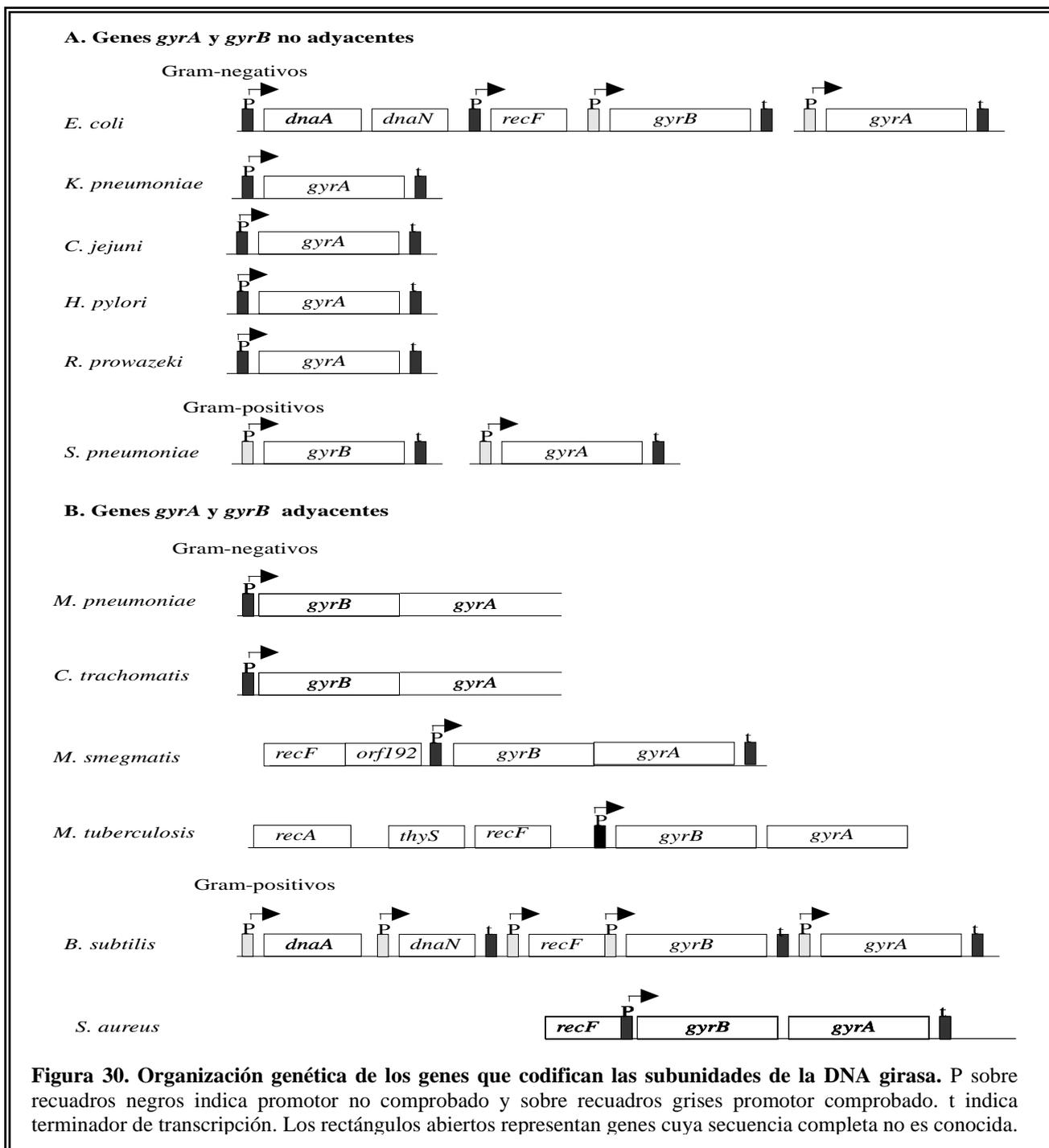
Figura 28. Estructura de las subunidades GyrA de la girasa y ParC de la topo IV de *S. pneumoniae*. Se indica la localización de las regiones QRDR y en rojo los residuos implicados en resistencia a quinolonas. Las proteínas codificadas por *gyrA* y *parC* tienen un tamaño de 822 y 823 aminoácidos, respectivamente. El fragmento N-terminal de GyrA comprende los aminoácidos 1-485 y el fragmento C-terminal los aminoácidos 486-822. En ParC, el dominio N-terminal comprende los aminoácidos 1-526 y el dominio C-terminal los aminoácidos 527-823. Se muestra la homología entre los dominios N-terminal y C-terminal de GyrA y ParC.

La búsqueda mediante el programa FASTA en la base de datos de secuencias Swiss-Protein permitió la selección de secuencias de aminoácidos para la construcción de un árbol filogenético (Fig. 29). Se utilizaron sólo las 25 secuencias proteicas completas más similares que se correspondieron a las subunidades GyrA de la girasa y ParC de la topo IV. Estas



secuencias formaron grupos separados en el árbol. La identidad entre GyrA de *S. pneumoniae* y las otras proteínas GyrA varió entre un 43 y un 60%, mientras que para ParC fue de 31 a 39%. Las secuencias de GyrA y ParC de *S. pneumoniae* mostraron una identidad de un 39%. El dominio N-terminal de GyrA y ParC de *S. pneumoniae* muestra una identidad de un 53% y el dominio C-terminal, una identidad de 30% (Fig. 28). Las secuencias de GyrA y ParC, al igual que las de GyrB y ParE (de la Campa et al., 1999) de bacterias gram-positivas con bajo contenido en G+C, forman grupos diferenciados. Estos datos coinciden con otras comparaciones filogenéticas de las topoisomerasas de tipo II (Huang, 1996) y apoyan, al igual que las comparaciones de las QRDRs, las diferentes características de inhibición por las Fqs en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

En cuanto a la organización génica de *gyrA* y *gyrB*, en *E. coli* (Hane and Wood, 1969), *K. pneumoniae* (Dimri and Das, 1990), *C. jejuni* (Wang et al., 1993), *H. pylori* (Moore et al., 1995), *Rickettsia prowazekii* (Wood and Waite, 1994) y *S. pneumoniae* (Muñoz and de la Campa, 1996) *gyrA* está localizado en una región del cromosoma diferente a la de *gyrB* mientras que en *Mycoplasma pneumoniae* (Colman et al., 1990), *Chlamydia trachomatis* (Dessusbabus et al., 1998), *Mycobacterium smegmatis* (Revel-Viravau et al., 1996), *Mycobacterium tuberculosis* (Takiff et al., 1994), *B. subtilis* (Moriya et al., 1985) y *S. aureus* (Magerrison et al., 1992), ambos genes están adyacentes (Fig. 30). Sin embargo, en todos los casos anteriores, la transcripción de *gyrA* es independiente de la de *gyrB*, aunque se ha propuesto que en *S. aureus* los dos genes pueden ser co-transcritos (Magerrison et al., 1992). Los resultados de esta tesis indican que, en *S. pneumoniae*, la transcripción de *gyrA* y *gyrB* se produce a partir de promotores independientes (Figs 6 y 22). Sin embargo, ambos genes deben de estar regulados conjuntamente, ya que la girasa sólo es activa como un tetrámero ($GyrA_2GyrB_2$). Esta regulación conjunta se lleva a cabo por el nivel de superenrollamiento del DNA, según se demuestra en este trabajo.



5.2. CARACTERÍSTICAS DEL PROMOTOR DE *gyrA*

El promotor de *gyrA* de *S. pneumoniae* muestra dos características singulares: una región -10 extendida (-10Ext) y una curvatura intrínseca en el DNA. Además, el promotor consta de una región -35 similar a la secuencia consenso en *E. coli* para la subunidad σ^{70} de la RNA polimerasa (RNAP) (Hawley and McClure, 1983). La transcripción de *gyrA* se inicia en el nt A (posición -31 de la secuencia de la Fig. 6), localizado a 6 pb del extremo 3' terminal de la región -10 extendida y a 30 pb del codon de iniciación. Asociado al sitio de inicio de la transcripción del gen, se encuentra un posible sitio de unión al ribosoma (Fig. 6) similar a la secuencia Shine-Dalgarno de *E. coli* (Shine and Dalgarno, 1975). En el espaciador entre las regiones -35 y -10 del promotor se localiza el centro de una curvatura intrínseca en el DNA (Fig. 8).

5.2.1. Región -10 extendida

Aunque los promotores con regiones -10Ext funcionan en *E. coli*, la frecuencia de este tipo de promotor es baja en esta especie bacteriana. Estudios con el promotor del gen *pre* del fago λ (Keilty and Rosenberg, 1987) y con el promotor P1 del gen *gal* (Ponnambalan et al., 1986), mostraron que dichos promotores funcionaban en ausencia de región -35 y que ambos presentaban una extensión TnTG (donde n indica cualquier nucleótido) en la región -10, lo que permitió definir la secuencia -10 extendida: TnTGnTATAAT. En el factor σ^{70} de la RNAP de *E. coli* existe una región de reconocimiento de la región -35 de los promotores (región 4.2), una para el reconocimiento de la región -10 (región 2.4) y otra para el reconocimiento del motivo TG de los promotores -10Ext (región 2.5) (Barne et al., 1997). Es posible que la región -10Ext sea utilizada por *E. coli* como una vía para aumentar la fuerza de algunos promotores dependientes de la secuencia -35 (Graña et al., 1985; Kumar et al., 1993). En una revisión de 263 promotores reconocidos por la RNAP de *E. coli*, no se encontraron ejemplos claros de promotor -10Ext “puro”, es decir, sin la secuencia -35 o un sitio de unión para una proteína reguladora (Harley and Reynolds, 1987). Kumar y colaboradores (Kumar et al., 1993) investigaron la presencia en *E. coli* de promotores similares a la secuencia consenso para el motivo -10Ext, TGnTATAAT, encontrando sólo ocho ejemplos, entre ellos el promotor del gen *gyrA*. Los ocho genes presentaban también una secuencia -35, de manera

que, ninguno podía considerarse como un ejemplo de promotor -10Ext “puro”. Sin embargo, el promotor de *cysG* de *E. coli* tiene una región -10Ext que no requiere la región -35 (Belyaeva et al., 1993). En un estudio de 36 promotores de *S. pneumoniae* (Sabelnikov et al., 1995) en los que en 12 se había determinado experimentalmente el sitio de inicio de la transcripción, se observó lo siguiente. Entre los promotores reales, el 67% tenían la extensión TnTGn, y el 75% el motivo TG. El promotor de *gyrA* de *S. pneumoniae* podría incluirse en el grupo del 67% puesto que tiene la secuencia extendida completa y una región -35 similar a la consenso (Fig. 6). Entre los promotores no probados como tales, el 58% presentaban la extensión completa y el 71% el motivo TG (Sabelnikov et al., 1995). Sólo el promotor -10Ext del gen *dpmM* de *S. pneumoniae* funciona sin el sitio -35 (Sabelnikov et al., 1995), lo que no ocurre para otros promotores de neumococo (Sabelnikov et al., 1995), entre los que podemos incluir al promotor del gen *gyrA*, puesto que tiene una región -35 y el espaciado entre las regiones -35 y -10 se encuentra en un rango de 15 a 20 nt.

Este tipo de secuencias extendidas se ha encontrado cuando se han estudiado las secuencias de DNA de neumococo que actúan como promotores en *E. coli* (Morrison and Jaurin, 1990). En 17 promotores se encontró semejanza con las secuencias consenso -35 y -10 para el factor σ^{70} de la RNAP de *E. coli*. Aunque cinco de los promotores presentaban el motivo TG, sólo dos tenían la extensión TnTG completa (Morrison and Jaurin, 1990). Sin embargo, estas secuencias fueron seleccionadas en *E. coli*, donde la extensión puede ser menos crítica para la transcripción, y estos promotores pueden no funcionar como tales en *S. pneumoniae*.

El análisis de la secuencia de 236 promotores reconocidos por la subunidad σ^A de la RNAP de *B. subtilis* (equivalente a σ^{70} de *E. coli*) reveló la existencia de estas regiones -10Ext , siendo la frecuencia del motivo TG de 40% y de la extensión completa (TnTG) de 20% (Helmann, 1995). Un estudio de 29 promotores de varias especies de bacterias Gram-positivas, entre las que no se encontraba *S. pneumoniae*, indicaba la importancia de la extensión -10 para el reconocimiento o unión de la RNAP en estas especies (Graves and Rabonowitz, 1986). El motivo TG estuvo presente en el 59% de los promotores, pero la extensión completa (TnTG) sólo fue encontrada en el 24% de los casos. Entre los promotores de *B. subtilis*, la frecuencia del motivo TG fue de 45%, y de la extensión completa de 20%

(Graves and Rabonowitz, 1986). De estos estudios se deduce que la frecuencia de regiones –10Ext, tanto en *B. subtilis* como en otras bacterias Gram-positivas, es considerablemente menor al 61% encontrado en los 36 promotores de *S. pneumoniae* estudiados (Sabelnikov et al., 1995). Por tanto, la extensión TnTG es más frecuente en bacterias gram-positivas (Graves and Rabonowitz, 1986) y una característica común en los genes de *S. pneumoniae* (Sabelnikov et al., 1995).

La funcionalidad de la secuencia –10Ext se ha estudiado en la transcripción mediada por la σ^A -RNAP. *In vitro*, el cambio del motivo TG por AC en tres promotores del bacteriófago ϕ 29 de *B. subtilis*, disminuyó la unión de la RNAP a los tres promotores, reduciendo la formación de los complejos cerrado y abierto (Camacho and Salas, 1999). La mutación eliminó asimismo la transcripción *in vitro* del promotor que no presenta secuencia –35, pero no la de los otros dos promotores con secuencias –35. Estos resultados indican que la secuencia –10Ext interacciona con σ^A -RNAP durante la formación de los complejos cerrado y abierto, no siendo esencial en etapas posteriores de la transcripción (Camacho and Salas, 1999).

Debido a que la secuencia –10 extendida es una característica conservada en los promotores de *S. pneumoniae*, como el promotor del gen *gyrA*, y que en los promotores de *E. coli* está débilmente conservada, sería posible que el factor σ^{70} de la RNAP de *S. pneumoniae* tuviese un requerimiento más estricto de los sitios –10Ext que la σ^{70} de *E. coli* y esto podría hacerse extensivo, aunque en menor grado, a otras bacterias Gram-positivas. Se ha sugerido que este requerimiento podría producir un fallo en la expresión de genes de bacterias Gram-negativas en especies Gram-positivas (Graves and Rabonowitz, 1986). Por el contrario, la presencia de secuencias –10Ext en los promotores de *S. pneumoniae*, muchos de los cuales también tienen regiones –35, podría resultar en una expresión excesiva en *E. coli*. Esto podría explicar, en parte, las dificultades encontradas para clonar fragmentos de DNA de neumococo en *E. coli*, bien por la producción de niveles tóxicos de proteína o por la interferencia con la replicación del vector (Stassi and Lacks, 1982; Chen and Morrison, 1987). Es posible que ésta sea una de las causas por las que no pudo encontrarse ningún clon recombinante que llevase el gen *gyrA* de *S. pneumoniae* cuando éste fue investigado en la librería del DNA de neumococo en el fago λ (Muñoz and de la Campa, 1996) y también de que el plásmido

pLGYAC59, que lleva la región -10Ext del promotor de *gyrA* de *S. pneumoniae*, quizás debido a un bajo número de copias, no pudiera ser purificado a partir de cultivos de *E. coli*. La eficiencia de transcripción de este plásmido en *E. coli* fue 3,4 veces superior a la del plásmido pLGYAC126 y 2,6 veces superior a la de pLGYAC69 (Tabla IX), lo que indica que la presencia de la región -10Ext produce una elevada expresión en *E. coli* y es posible que sea responsable, al interferir con la replicación del vector (pLS1), de una bajada del número de copias de pLGYAC59.

5.2.2. Curvatura y fuerza del promotor de *gyrA*

Un factor que condiciona la fuerza del promotor de *gyrA* es la presencia de una curvatura cuyo centro se localiza en el espaciador entre las regiones -35 y -10 (Fig. 8). El análisis de las deleciones de las fusiones *PgyrA-cat* indica una correlación inversa entre presencia de curvatura y eficiencia de transcripción, puesto que la pérdida de la curvatura conduce a un aumento de la actividad transcripcional *in vivo* (Fig. 12, Tabla IX). Por lo tanto, en el caso del promotor de *gyrA* de *S. pneumoniae*, la curvatura parece actuar como un represor *per se*. Una forma sencilla de explicar la represión ejercida por una curvatura se basa en la necesidad de la RNAP de doblar el DNA para iniciar la transcripción. Si existe una curvatura de sentido opuesto al necesario para iniciar la transcripción, la unión de la RNAP al promotor se vería afectada, así como la iniciación de la transcripción, quizás por dificultades en el paso de la RNAP de complejo cerrado a complejo abierto. En la figura 31 se presenta un modelo para la regulación de la transcripción de *gyrA* mediada por cambios en la curvatura a consecuencia de cambios en el superenrollamiento del DNA.

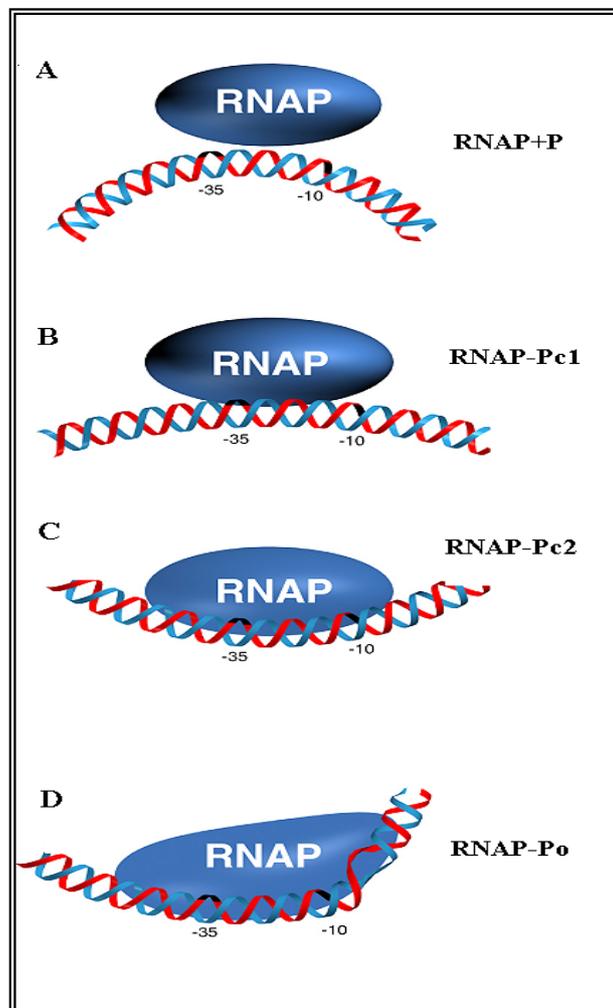


Figura 31. Modelo de regulación de la transcripción de *gyrA* de *S. pneumoniae*. **A.** Un posible factor inhibidor (represor), de mayor afinidad por DNA superenrollado, induciría una curvatura en dirección opuesta a la curvatura asociada a la unión de la RNAP. **B.** La relajación del DNA favorecería el cambio en la orientación de la curvatura, permitiendo el contacto de la RNAP con las secuencias de reconocimiento del promotor (P). La RNAP se une inicialmente a la región -35 formando el primer complejo cerrado (RNAP-Pc1). **C.** A continuación, la RNAP interacciona con la región -10 formando el segundo complejo cerrado (RNAP-Pc2) y favoreciendo el alineamiento de las secuencias -35 y -10 por distorsión en el espaciador. La formación de este complejo produce una curvatura en el DNA debido a la unión simultánea de la RNAP con las regiones -35 y -10. **D.** Por último, el paso del complejo RNAP-Pc2 a complejo abierto (RNAP-Po), produce la separación de las hebras del DNA como consecuencia de la tensión inducida por la curvatura y la distorsión producida por el alineamiento de las secuencias consenso, con el consiguiente inicio de la transcripción.

La iniciación de la transcripción ocurre en diferentes etapas que se resumen en el siguiente esquema:



El proceso implica la unión inicial de la RNAP al promotor (P), con una constante de unión K_b , para formar un complejo cerrado intermedio inactivo (RNAP-Pc). Este complejo es convertido, con una constante de velocidad K_f , en complejo abierto activo transcripcionalmente (RNAP-Po), en el cual las dos hebras son separadas en una región de 10 pb alrededor del sitio de inicio de la transcripción (Siebenlist, 1979). Sin embargo, datos obtenidos con promotores dependientes de σ^{70} (Kovacic, 1987; Schickor et al., 1990; Rivetti et al., 1999) sugieren un mecanismo más complejo que incluye una unión inicial de la RNAP a la región -35 para formar el primer complejo cerrado, RNAP-Pc1. Este complejo RNAP-Pc1 produce un patrón de protección a radical hidroxilo y a DNAasaI que se extiende desde las posiciones -60 a -1 con relación al sitio de inicio de la transcripción. Posteriormente se forma el segundo complejo cerrado, RNAP-Pc2, en el cual la RNAP interacciona con la región -10 y protege las posiciones -60 a $+20$. Los cambios más significativos en los patrones de protección entre los complejos RNAP-Pc1 y RNAP-Pc2 ocurren en el espaciador entre las regiones -35 y -10 , donde se detectan varias bandas de hipersensibilidad a DNAasaI como resultado de una curvatura inducida por la interacción simultánea de la RNAP con las secuencias -35 y -10 (Mecsas et al., 1991). Estas bandas de hipersensibilidad a DNAasaI se localizan en el DNA en la cara opuesta a la de la unión de la RNAP, lo que indica que el DNA se enrolla alrededor de la enzima produciéndose simultáneamente un nuevo alineamiento de las secuencias -35 y -10 por distorsión en el espaciador (Ayers et al., 1989). Por último, el paso del complejo RNAP-Pc2 a complejo abierto, RNAP-Po, provoca la separación de las hebras del DNA como consecuencia de la tensión inducida por la curvatura y la distorsión producida por el alineamiento de las dos secuencias consenso, con el consiguiente inicio de la transcripción (Siebenlist, 1979; Chan et al., 1990).

Además de la similitud de las regiones -35 y -10 con las secuencias consenso, la distribución espacial de dichas regiones puede predeterminar las transiciones entre los

diferentes tipos de complejos. Si el DNA debe envolver a la RNAP para el inicio de la transcripción, la actividad del promotor puede estar limitada por la orientación de una curvatura presente en la secuencia. Asimismo, la estructura del espaciador entre las secuencias -35 y -10 es determinante en la fuerza del promotor. Aunque la interacción de la RNAP con el espaciador es inespecífica, (Schickor et al., 1990), la presencia de una curvatura intrínseca en el espaciador, en la orientación adecuada, puede determinar la energía de activación necesaria para la actividad del promotor. Efectivamente, la presencia de una curvatura que localiza las secuencias promotoras en la parte convexa de la curva, produce una caída de la fuerza del promotor (Lozinski et al., 1991). Un modelo de este tipo podría explicar los resultados obtenidos con el promotor de *gyrA* de neumococo, en el cual la presencia de una curvatura en el espaciador disminuye unas 3 veces (Fig. 12, Tabla IX) la eficacia de la transcripción, quizás por una disminución de los contactos entre la RNAP y el promotor y una menor capacidad para pasar de complejo cerrado a abierto.

Existen otros ejemplos en los que se ha observado la influencia de la curvatura presente en el espaciador, tanto aumentando (Busby et al., 1987; Collis et al., 1989) como disminuyendo la actividad del promotor (Lozinski et al., 1991).

5.3. ESTIMULACION DE LA TRANSCRIPCION DE *gyrA* Y *gyrB* POR RELAJACION DEL DNA (RESPUESTA RST)

El superenrollamiento del DNA es un factor importante en el control de la expresión génica en bacterias (Pruss and Drlica, 1989). Entre los genes controlados por superenrollamiento se encuentran los que codifican las DNA topoisomerasas, implicadas a su vez en el mantenimiento del nivel de superenrollamiento. El mantenimiento de este nivel es importante para procesos tales como la iniciación de la replicación que requiere un DNA molde con superenrollamiento negativo (Funnell et al., 1987). Además, la separación de las cadenas y el desenrollamiento del DNA para la progresión de la maquinaria de replicación, produce la acumulación de superenrollamientos positivos que deberán ser eliminados por las topoisomerasas para completar la replicación (Wang, 1996).

La transcripción de algunos genes es favorecida por el aumento del superenrollamiento negativo del DNA. Se han descrito mutaciones en *topA* (el gen que

codifica la topo I) que suprimen el efecto de mutaciones en el promotor inactivo *leu-500* de *Salmonella typhimurium* (Gemmill et al., 1984; Trucksis et al., 1981). Estas mutaciones en *topA* producen un aumento del nivel de superenrollamiento negativo en la célula (Pruss and Drlica, 1985) y, por tanto, en el promotor, permitiendo su funcionalidad. Además, el tratamiento con inhibidores de la girasa disminuye tanto el nivel de superenrollamiento del DNA intracelular como la actividad del promotor *leu-500*, corroborando que este promotor es sensible a cambios en el superenrollamiento (Pruss and Drlica, 1985). La activación de *leu-500* por superenrollamiento negativo se produce en el cromosoma pero no en un plásmido, lo que sugiere que los cambios locales más que los globales en la topología del DNA, están implicados en la activación de este promotor (Richardson et al., 1988). En el caso de los operones *his* de *E. coli* y *S. typhimurium*, dos loci *hisW* e *hisU*, que han sido identificados como alelos de *gyrA* y *gyrB*, respectivamente, son regulados por superenrollamiento (Rudd and Menzel, 1987). Hay también algunos genes que no son regulados por cambios en el superenrollamiento del DNA, entre ellos el promotor del operón *trp* de *E. coli* (Yang et al., 1979).

Por otro lado, la transcripción de algunos genes es activada por relajación del DNA, lo que se ha denominado como estimulación de la transcripción por relajación (respuesta RST, “relaxation stimulation of transcription”), y ha sido observada en los promotores de *gyrA* y *gyrB* de *E. coli* (Menzel and Gellert, 1983; Menzel and Gellert, 1987a; Menzel and Gellert, 1987b) y para el promotor de la topoisomerasa de tipo II del cloroplasto de *Chlamydomonas* (Thompson and Mosig, 1987). Este promotor del cloroplasto es activado por relajación del DNA y depende de secuencias localizadas por delante del promotor (Thompson and Mosig, 1987). En *E. coli*, la transcripción de los genes *gyrA*, *gyrB* y *topA* responde al superenrollamiento, de manera que un incremento activa la transcripción *topA* y una disminución favorece la expresión de *gyrA* y *gyrB* (Menzel and Gellert, 1987a). El control es homeostático; los inhibidores de la DNA girasa producen la relajación del DNA (Drlica and Snyder, 1978), y ésta aumenta la expresión de *gyrA* y *gyrB* que produce un incremento de la cantidad de girasa, que, a su vez, debido a su actividad enzimática, incrementa el nivel de superenrollamiento.

Los resultados de esta tesis indican que la expresión de los genes *gyrA* y *gyrB* de *S.*

pneumoniae es estimulada por la relajación del DNA, producida por la inhibición de la DNA girasa con novobiocina y ciprofloxacina. Esta regulación se ejerce a nivel de transcripción. Para *gyrA*, la inducción de la actividad CAT en una fusión *PgyrA-cat* por la adición de novobiocina o ciprofloxacina fue de aproximadamente 2 veces para el plásmido pLGYAC126 mientras que los plásmidos pLGYAC69 y pLGYAC59 no mostraron inducción (Figs. 15 y 16). Esto indica que la activación depende de la secuencia situada en el extremo 5' de la región -35 (secuencia de nucleótidos -126 a -69 presente en el plásmido pLGYAC126 y no en los otros plásmidos) (Fig. 10). Del análisis de las deleciones (Tabla IX) de las fusiones transcripcionales *PgyrA-cat*, se deduce que la secuencia mínima necesaria para la función del promotor de *gyrA* incluye la región -10Ext, el sitio de inicio de la transcripción y las primeras bases del transcrito, sin embargo, la secuencia requerida para la respuesta RST incluye la región -126 a -69. Por tanto, la respuesta RST de *gyrA* de *S. pneumoniae* depende de la curvatura intrínseca (presente en el plásmido pLGYAC126) y está regulada por el superenrollamiento del DNA.

En *E. coli* se ha observado un aumento de 2-3 veces en la actividad galactokinasa de las fusiones transcripcionales *PgyrA* y *PgyrB* por tratamiento con cumermicina (Menzel and Gellert, 1987a). A diferencia de *gyrA* de *S. pneumoniae*, el análisis de las deleciones de la región promotora de *gyrA* de *E. coli* indica que sólo 20 pb, que incluyen la región consenso -10, el inicio de la transcripción y las primeras bases que son transcritas, son necesarias para la respuesta RST (Menzel and Gellert, 1987b).

Para el gen *gyrB*, la inducción de la actividad CAT en una fusión *PgyrB-cat* por novobiocina fue de unas 7 veces (Fig. 25), es decir, al menos 3 veces superior a la del *PgyrA*, y de 5 veces con ciprofloxacina (Fig. 26), es decir, alrededor de 2 veces superior a la de *PgyrA*. Estas diferencias en la activación de los promotores de *gyrA* y *gyrB* podrían deberse a modificaciones postranscripcionales. El hecho de que el promotor de *gyrB* lleve una región -35 con excelente homología a la secuencia consenso, que no presente región -10 y que el sitio de inicio de la transcripción se encuentre a 46 pb del codon de iniciación (Fig. 22) apoyaría esta hipótesis. Estas diferencias en la expresión de los genes *gyrA* y *gyrB* de *E. coli* han sido observadas por otros autores (Neumann and Quinones, 1997). Estos estudiaron la influencia *in vivo* de las quinolonas y las cumarinas en la expresión de *gyrA* y *gyrB* y en el nivel de

superenrollamiento intracelular, utilizando dos fusiones *gyrA-lacZ* y *gyrB-lacZ* en el cromosoma. La expresión de *gyrA* aumentó en respuesta a ambos tipos de compuestos pero la expresión de *gyrB* sólo fue inducida por las cumarinas. Estos resultados indican que la expresión de *gyrA* parece ser más sensible a los cambios en el superenrollamiento del DNA que la expresión de *gyrB* y sugieren que algún mecanismo de regulación postranscripcional podría estar implicado en la regulación del superenrollamiento celular y en la expresión de los genes de la girasa (Neumann and Quinones, 1997).

Por otro lado, la diferencia en el grado de inducción entre la novobiocina y la ciprofloxacina puede ser debida a los blancos de acción de estos antibióticos: la novobiocina tiene como blanco la girasa y la ciprofloxacina tiene como blanco primario la topo IV y la girasa como blanco secundario en *S. pneumoniae*. Con la novobiocina se inhiben sólo las reacciones catalizadas por la girasa en las que se requiere ATP (decatenación, superenrollamiento), ya que su blanco de acción es la subunidad B. Con la ciprofloxacina se inhiben las reacciones catalizadas tanto por la topo IV como por la girasa. La topo IV actúa, en conjunto con la girasa y la topo I, en el mantenimiento del nivel de superenrollamiento del DNA en la célula (Zechiedrich et al., 2000). Puesto que la actividad de relajación por la topo IV es más sensible a las Fqs que la decatenación (Zechiedrich et al., 2000), al utilizar ciprofloxacina se estaría inhibiendo asimismo la relajación del DNA.

Los resultados de esta tesis indican que la novobiocina y la ciprofloxacina inducen la expresión de la girasa de *S. pneumoniae* al inhibir la actividad enzimática. En el mutante resistente a novobiocina, T4GyrB^R (CMI = 128 µg/ml), a las concentraciones de novobiocina utilizadas (40 µg/ml) la girasa no es inhibida y, por tanto, no hay inducción de CAT en la fusión *PgyrA-cat* (Fig. 19). Este resultado indica que la expresión de *gyrA* está regulada por cambios en el superenrollamiento y es debida a la inhibición de *gyrB*. En la cepa resistente a ciprofloxacina (T4ParC^R) por una mutación en *parC* de la topo IV, se observa un aumento en el nivel de CAT de 2,2 veces para el plásmido pLGYAC126 (Fig. 20). Con la concentración de ciprofloxacina utilizada (10 µg/ml), se produce la inhibición de la girasa pero no de la topo IV, que es 10 veces más sensible a ciprofloxacina que la girasa (Fernández-Moreira et al., 2000). Este resultado indica que la expresión de *gyrA* es debida a la inhibición de la girasa y excluye los efectos de inhibición de la topo IV.

El cambio en el nivel del superenrollamiento del plásmido pLGYAC126 por inhibición de la girasa con novobiocina o ciprofloxacina, fue estudiado en las cepas T4, T4ParC^R y T4GyrB^R (Fig. 21). En T4, la novobiocina inhibe la girasa y en T4ParC^R, la mutación en *parC* de la topo IV confiere a la cepa resistencia a ciprofloxacina, por lo que la enzima inhibida es asimismo la girasa. Los resultados de los experimentos de inducción demuestran que la relajación del DNA, por inhibición de la girasa con novobiocina y ciprofloxacina, produce un aumento de la transcripción de la misma. Como consecuencia, la girasa incrementa el nivel de superenrollamiento del plásmido (Fig. 21A). La mutación en *gyrB* confiere a la cepa T4GyrB^R resistencia a novobiocina, por lo que la girasa no es inhibida por esta droga y no se producen cambios en el superenrollamiento del plásmido. En T4, tanto la topo IV (blanco primario de Fqs en neumococo), como la girasa (blanco secundario), van a ser inhibidas por la ciprofloxacina, lo que se refleja en el plásmido por un aumento en el nivel de superenrollamiento negativo (Fig. 21B). Es interesante resaltar que la presencia de una mutación en *gyrB* de la cepa T4GyrB^R hace que el nivel de superenrollamiento de la célula sea menos negativo que el de T4 (Fig. 21C), un hecho que ha sido descrito asimismo en *E. coli* (Lewis et al., 1996). Sin embargo, la mutación en *parC* de la cepa T4ParC^R no parece afectar el nivel de superenrollamiento celular, ya que es el mismo que en la cepa silvestre. Tanto en T4 como en T4ParC^R, la estimulación de la transcripción de *PgyrA* en respuesta a relajación del DNA por ciprofloxacina, produce un aumento en el superenrollamiento negativo del plásmido, siendo más pronunciado en T4ParC^R que en T4 (Fig. 21D). Una posible explicación es que, mientras que en T4ParC^R la única enzima inhibida es la girasa, en la cepa T4 silvestre, los efectos en el superenrollamiento del DNA son el resultado de la inhibición de las actividades opuestas en el mantenimiento del superenrollamiento celular de la topo IV y de la girasa (Zechiedrich et al., 2000).

5.4. POSIBLES FACTORES REGULADORES DE LA RESPUESTA RST

El superenrollamiento del DNA puede regular la influencia de la curvatura en la actividad del promotor (Pérez-Martín et al., 1994). En el caso del gen *gyrA* de *S. pneumoniae*, la presencia de una curvatura en la región promotora podría hacer al promotor muy sensible a los cambios en el superenrollamiento. La relajación del DNA estimula la transcripción del

gen posiblemente por una modificación de la curvatura. Sin embargo, los mecanismos que relacionan el superenrollamiento del DNA, la curvatura y la transcripción no son bien conocidos. Se ha descrito que la activación de la transcripción del promotor *lac* está mediada por un incremento en el nivel de superenrollamiento del DNA (Borowiec, 1985). Puesto que el superenrollamiento negativo favorece la apertura de la doble cadena de DNA necesaria para la formación del complejo abierto RNAP-DNA, se podría esperar que éste incrementase el nivel de transcripción, al menos para aquellos promotores en los que la formación del complejo abierto es el paso limitante (Borowiec, 1985). Sin embargo, no se conoce ningún mecanismo que explique la estimulación de un promotor cuya actividad está aumentada por una disminución en el superenrollamiento negativo del DNA. No se sabe si otros factores, además de la RNAP, son necesarios, y si la secuencia de DNA requerida incluye otras zonas además del promotor.

En esta tesis se ha estudiado la respuesta RST en el promotor de *gyrA* de *S. pneumoniae*, tanto en *S. pneumoniae* como en *E. coli*, con resultados diferentes. Mientras que en *S. pneumoniae*, la secuencia requerida comprende los nucleótidos -126 a -69, en *E. coli* sólo son necesarias las regiones -35 y -10 (Fig. 10). La transcripción del *PgyrA* de neumococo en *E. coli* no depende de la curvatura, sino de la secuencia de nucleótidos presente en el plásmido pLGYAC69, es decir, de las regiones -35 y -10 del promotor, el sitio de inicio de la transcripción y las primeras bases del transcrito (Figs 17 y 18). En *E. coli*, estas regiones serían las responsables de la respuesta RST, aunque para la función del promotor de *gyrA* de neumococo, tanto en *E. coli* como en *S. pneumoniae*, sólo se requiere la región -10Ext, el inicio de la transcripción y las primeras bases que son transcritas (Tabla IX). En *E. coli*, el plásmido pLGYAC59 que lleva la región -10Ext, tiene una actividad transcripcional superior a la de los otros plásmidos (3,4 veces con relación a pLGYAC126 y 2,6 veces con relación a pLGYAC69), lo que parece indicar que la secuencia -10Ext de *PgyrA* de neumococo es utilizada muy eficientemente en *E. coli* (Tabla IX). El gen *gyrA* de *E. coli* también tiene una región -10Ext (Hussain et al., 1987) y la secuencia que incluye, la región -10Ext, el sitio de inicio de la transcripción y las primeras bases que son transcritas, es la responsable de la respuesta RST (Menzel and Gellert, 1987b). Por tanto, los promotores de *gyrA* de *E. coli* y de *S. pneumoniae* dependen de regiones diferentes del promotor para la

respuesta RST cuando ambos están en *E. coli*. La dependencia, tanto de la región -35 como de la -10, para la expresión del *PgyrA* de *S. pneumoniae* en *E. coli*, está de acuerdo con el siguiente modelo. En este modelo (Stefano and Gralla, 1982) la variable importante es el desplazamiento angular (que depende de la longitud del espaciador) alrededor de la hélice entre las regiones -35 y -10 y que permiten la unión de la RNAP.

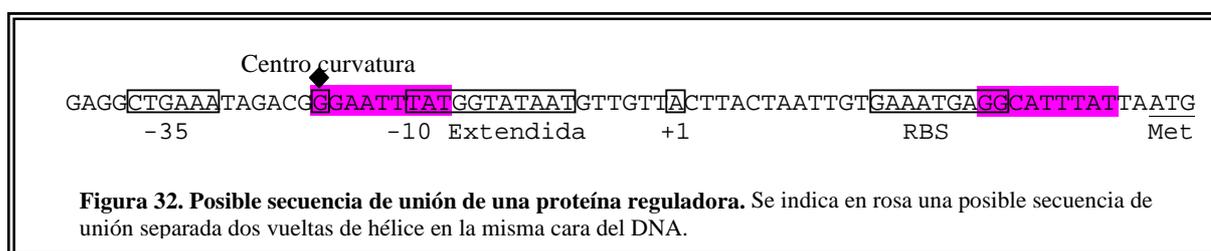
Una posibilidad para explicar la diferente respuesta RST del *PgyrA* de neumococo en *E. coli* y *S. pneumoniae*, sería suponer que la RNAP tiene que competir en su unión al promotor con otra proteína. Esta proteína podría ser un factor inhibidor que tuviera mayor afinidad por DNA superenrollado que relajado. Este factor inhibidor (represor) podría modificar la curvatura intrínseca, según el modelo propuesto en la figura 31, orientándola en la dirección opuesta a la necesaria para iniciar la transcripción, siendo el factor limitante para la iniciación de la transcripción. De acuerdo con esta hipótesis se ha descrito que en el promotor PA2B del fago $\phi 29$ de *B. subtilis*, la represión por la proteína p4 se debe a que induce curvatura en dirección opuesta a la curvatura asociada a la unión de la RNAP (Rojo and Salas, 1991). La explicación de la diferente respuesta RST del *PgyrA* de neumococo en *E. coli* y *S. pneumoniae*, podría ser la no existencia en *E. coli* de este posible represor que sería característico de *S. pneumoniae*. En este sentido se ha observado que la estimulación de la transcripción del gen *gyrA* de *E. coli* en respuesta a la relajación del DNA, depende de la concentración de DNA en un sistema *in vitro* de transcripción-traducción, lo que sugiere la existencia de un factor represor que se titula (Carty and Menzel, 1990). La curvatura podría ser modificada por proteínas de tipo histona, muy abundantes en bacterias (Drlica and Rouviere-Yaniv, 1987), como una proteína homóloga a la proteína HU de *E. coli*. Esta proteína tiene la capacidad de envolver y curvar el DNA *in vitro* sin especificidad de secuencia (Rouviere-Yaniv et al., 1979), se une preferentemente al DNA superenrollado (Shindo et al., 1992) y es capaz de modificar el reconocimiento del DNA por proteínas de unión específica dependiendo de si estas proteínas necesitan para su unión alguna estructura previa. Este efecto se atribuye a un cambio en la flexibilidad del DNA en presencia de la proteína HU (Flashner and Gralla, 1988). En ausencia de HU, *E. coli* forma colonias pequeñas, acumula mutaciones supresoras y es hipersensible a novobiocina (Malik et al., 1996). Hay tres hechos que implican a la girasa en la supresión de una deficiencia de HU. Primero, mutaciones supresoras en *gyrB* restablecen el crecimiento y reducen la sensibilidad a novobiocina. Segundo,

dos mutaciones definidas en *gyrB* (*gyrB-203* sensible a la temperatura y *gyrB-221* resistente a novobiocina) suprimen el defecto en HU, restableciendo el nivel de superenrollamiento. Tercero, la introducción de un plásmido que lleva *gyrB* restablece el tamaño normal de las colonias (Malik et al., 1996). Estos datos sugieren que HU tiene un papel, hasta ahora no identificado, en la topología del DNA, probablemente por facilitar la actividad de la girasa. En *S. pneumoniae*, una proteína homóloga a HU de *E. coli*, actuaría como un represor, uniéndose a DNA superenrollado y favoreciendo la curvatura en el promotor de *gyrA* en el sentido opuesto al necesario para iniciar la transcripción.

Otro ejemplo de posible represor transcripcional que podría existir en *S. pneumoniae* sería un homólogo de la proteína FIS. Recientemente se ha descrito que esta proteína FIS en *E. coli* disminuye la transcripción tanto de *gyrA* como de *gyrB* (Schneider et al., 1999). Esta proteína es sintetizada en cantidades elevadas durante el comienzo de la fase exponencial de crecimiento y está implicada en la adaptación del metabolismo celular a este crecimiento (Ninnemann et al., 1992). FIS modula el nivel de superenrollamiento del DNA plasmídico *in vivo*, y regula las actividades de relajación y superenrollamiento por las topoisomerasas *in vitro* (Schneider et al., 1997). Se ha demostrado que *in vivo*, la expresión de *fis* se correlaciona con una disminución de los niveles de mRNA de *gyrA* y *gyrB* y de las correspondientes proteínas, lo que produce una reducción de la actividad de superenrollamiento celular. *In vitro*, FIS se une a los promotores de ambos genes interfiriendo directamente con la iniciación de la transcripción por la RNAP, lo que indica que en estos promotores FIS actúa como un represor transcripcional (Schneider et al., 1999). Los sitios de unión de FIS son diversos pero se han propuesto algunas secuencias consenso, GNNYRNNA/TNNYRNNC, donde Y=C/T; R=A o G y N=cualquier nucleótido (Finkel and Johnson, 1992; Lazarus and Travers, 1993). Los experimentos de protección a digestión con DNAasaI indican que la unión de FIS protege una región de *gyrA* que incluye el promotor y se extiende desde las posiciones -68 hasta -16. Este patrón sugiere que la unión de FIS en esta región podría inhibir la transcripción por un impedimento estérico. FIS protege una región de *gyrB* que se extiende desde la posición -122 hasta -55 (Schneider et al., 1999). En este caso FIS no interfiere ni con la unión de la polimerasa ni con la formación del complejo abierto y se ha propuesto que la represión se produce en el paso limitante de la transcripción desde el promotor de *gyrB* (Schneider et al., 1999), que es la eliminación de la polimerasa del promotor

(Menzel and Gellert, 1987b). Asimismo, *fis* está implicado en el control homeostático del superenrollamiento del DNA en *E. coli*. La actividad del promotor *fis* varía en respuesta a cambios en la topología del DNA *in vivo* e *in vitro* (Schneider et al., 2000). La disminución del superenrollamiento celular, disminuye la expresión de *fis* y en consecuencia no se produce la represión de *gyrA* y *gyrB* por FIS (Schneider et al., 1999). El aumento de la expresión de *gyrA* y *gyrB* aumenta el nivel de girasa que introduce superenrollamiento negativo en el DNA. Debido a que la actividad máxima del promotor *fis* se alcanza a una densidad helicoidal superior a la fisiológica, el incremento inicial del superenrollamiento negativo va a producir la activación del promotor *fis* y la represión de *gyrA* y *gyrB* por FIS (Schneider et al., 2000). FIS es un regulador y las topoisomerasas son los efectores del mantenimiento de los niveles óptimos de superenrollamiento negativo del DNA.

Debido a que la regulación en *E. coli* y *S. pneumoniae* es diferente, la proteína homóloga a FIS podría reconocer secuencias diferentes y la proteína HU homóloga reconocería estructura. En la figura 32 se indica una posible secuencia de unión de una proteína homóloga a FIS. La unión de estas proteínas, cuya síntesis se activa con DNA superenrollado negativamente, favorecería la curvatura en el *PgyrA* de neumococo en dirección opuesta a la necesaria para la transcripción por la RNAP. La disminución de la síntesis de girasa disminuirá el nivel de superenrollamiento celular y, por tanto, la represión ejercida por las proteínas homólogas, favoreciéndose la expresión de la girasa.



6. CONCLUSIONES

1. El gen *gyrA* que codifica la subunidad A de la DNA girasa de *S. pneumoniae* ha sido clonado mediante una estrategia basada en reacciones solapantes de PCR y análisis físico de la región cromosómica, habiéndose determinado la secuencia de nucleótidos de un fragmento de 2685 pb del cromosoma de la cepa R6 que incluye este gen.
2. Un análisis filogenético ha demostrado identidades del 43 al 60% entre GyrA de *S. pneumoniae* y otras proteínas GyrA y del 31 al 39% con otras proteínas ParC. Las secuencias de GyrA y ParC de *S. pneumoniae* mostraron un 39% de identidad. Las secuencias de GyrA y ParC de bacterias gram-positivas con bajo contenido en G+C, formaron grupos diferenciados. Estos datos apoyan las diferentes características de inhibición por Fqs de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.
3. El promotor de *gyrA* consta de una región -35, similar a la secuencia consenso en *E. coli* para la subunidad σ^{70} de la RNAP y de una región -10 extendida. La transcripción del gen se inicia a 6 pb del extremo 3' terminal de la región -10 extendida y a 30 pb del codon de iniciación de traducción.
4. La región que contiene el promotor de *gyrA* tiene una curvatura intrínseca cuyo centro se localiza en el espaciador entre las regiones -35 y -10 del promotor. La curvatura parece actuar como un represor *per se* puesto que su presencia disminuye la eficiencia de transcripción.
5. El promotor de *gyrB* tiene una región -35 homologa a la secuencia consenso, no presenta región -10 y el sitio de inicio de la transcripción se encuentra a 46 pb del codon de iniciación de traducción.
6. La transcripción de *gyrA* y *gyrB* se produce a partir de promotores independientes, y es estimulada por la relajación del DNA, lo que se denomina respuesta RST (estimulación de la transcripción mediada por relajación).
7. La respuesta RST del promotor de *gyrA* en *S. pneumoniae* depende de la curvatura intrínseca, según se deduce de experimentos de inhibición de la actividad de la girasa con novobiocina y ciprofloxacina y de la determinación de la actividad promotora en fusiones del promotor de *gyrA* y el gen *cat*.
8. La respuesta RST del promotor de *gyrA* en *E. coli* no depende de la curvatura, sino de las regiones -35 y -10 del promotor, del sitio de inicio de la transcripción y de las

primeras bases del transcrito, aunque para la función del promotor, tanto en *E. coli* como en *S. pneumoniae*, sólo se requiere la región –10Ext y la secuencia posterior. La diferente respuesta RST del promotor de *gyrA* de neumococo en estas bacterias, podría deberse a la ausencia en *E. coli* de un posible represor característico de neumococo. Este represor, con mayor afinidad por DNA superenrollado que relajado, modificaría la curvatura intrínseca inhibiendo la transcripción.

9. La respuesta RST del promotor de *gyrB* en *S. pneumoniae*, según se deduce de experimentos de inhibición con novobiocina y ciprofloxacina y de la determinación de la actividad promotora en fusiones del promotor de *gyrB* y el gen *cat* fue de 3 veces superior a la del promotor de *gyrA* con novobiocina, y de 2 veces superior con ciprofloxacina.
10. La estimulación del promotor de *gyrA* con ciprofloxacina produjo efectivamente un aumento en el superenrollamiento negativo. Este efecto fue más pronunciado en un mutante para *parC*, que en la cepa silvestre, debido a la inhibición en la cepa silvestre de la actividad de relajación de la topo IV.
11. La estimulación del promotor de *gyrA* con novobiocina produjo asimismo un aumento en el superenrollamiento negativo. Este efecto no se observó en un mutante para *gyrB* resistente a esta droga.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adachi, T., Mizuuchi, K., Menzel, R. and Gellert, M. (1984) DNA sequence and transcription of the region upstream of the *E. coli gyrB* gene. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 6389-6395.
- Adachi, T., Mizuuchi, M., Robinson, E.A., Appella, E., O'Dea, M.H., Gellert, M. and Mizuuchi, K. (1987) DNA sequence of the *E. coli gyrB* gene: application of a new sequencing strategy. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 771-784.
- Adams, D.E., Shekhtman, E.M., Zechiedrich, E.L., Schmid, M.B. and Cozzarelli, N.R. (1992) The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell*, **71**, 277-288.
- Alcaide, F., Liñares, J., Pallarés, R., Carratala, J., Benítez, M.A., Gudiol, F. and Martín, R. (1995) *In vitro* activity of 22 β -lactam antibiotics against penicillin-resistant and penicillin-susceptible viridans group streptococci isolated from blood. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 2243-2247.
- Ali, J.A., Jackson, A.P., Howells, A.J. and Maxwell, A. (1993) The 43-Kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein hydrolyzes ATP and binds coumarin drugs. *Biochemistry*, **32**, 2717-2724.
- Alovero, F.L., Pan, X.S., Morris, J.E., Manzo, R.H. and Fisher, L.M. (2000) Engineering the specificity of antibacterial fluoroquinolones: Benzenesulfonamide modifications at C-7 of ciprofloxacin change its primary target in *Streptococcus pneumoniae* from topoisomerase IV to gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 320-325.
- Anderson, V.E., Gootz, T.D. and Osheroff, N. (1998) Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action. *J. Biol. Chem.*, **273**, 17879-17885.
- Anderson, V.E., Zaniewski, R.P., Kaczmarek, F.S., Gootz, T.D. and Osheroff, N. (1999) Quinolones inhibit DNA religation mediated by *Staphylococcus aureus* topoisomerase IV. Changes in drug mechanism across evolutionary boundaries. *J. Biol. Chem.*, **274**, 35927-35932.
- Appelbaum, P.C. (1992) Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin. Infect. Dis.*, **15**, 77-83.
- 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.

- Ayers, D.G., Auble, D.T. and deHaseth, P.L. (1989) Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase. Role of the spacer DNA in functional complex formation. *J. Mol. Biol.*, **207**, 749-756.
- 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.
- Baquero, F. (1996) Trends in antibiotic resistance of respiratory pathogens: an analysis and commentary on a collaborative surveillance study. *J. Antimicrob. Chemother.*, **38**, 117-132.
- Baquero, F., García-Rodríguez, J.A., García de Lomas, J., Aguilar, L. and Spanish surveillance group for respiratory pathogens. (1999) Antimicrobial resistance of 1113 *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients with respiratory tract infections in Spain: results of 1-year (1996-1997) multicenter surveillance study. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 357-359.
- Baquero, F., Martínez-Beltrán, J. and Loza, E. (1991) A review of antibiotic resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.*, **28**, 31-38.
- Baranova, N.N. and Neyfakh, A. (1997) Apparent involvement of a multidrug transporter in the fluoroquinolone resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 1396-1398.
- Barne, K.A., Bown, J.A., Busby, S.J.W. and Minchin, S.D. (1997) Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase $\sigma 70$ subunit is responsible for the recognition of the 'extended -10' motif at promoters. *EMBO J.*, **13**, 4034-4040.
- Bartlett, J.G., Breiman, R.F., Mandell, L. and File, T.M. (1998) Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for management. *Clin. Infect. Dis.*, **26**, 811-838.
- Belland, R., Morrison, S., Ison, C. and Huang, W. (1994) *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol. Microbiol.*, **14**, 371-380.
- Belyaeva, T., Griffiths, L., Minchin, S., Cole, J. and Busby, S. (1993) The *Escherichia coli* *cysG* promoter belongs to the "extended -10" class of bacterial promoters. *J. Biochem.*, **296**, 851-857.

- Berger, J.M., Gamblin, S.J., Harrison, S.C. and Wang, J.C. (1996) Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*, **379**, 225-232.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- Blanche, F., Cameron, B., Bernard, F.X., Maton, L., Manse, B., Ferrero, L., Ratet, N., Lecoq, C., Goniot, A., Bisch, D. and Crouzet, J. (1996) Differential behaviors of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* type II DNA topoisomerases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 2714-2720.
- Bluestone, C.D. (1990) *Pediatric otolaryngology*. WB Saunders Company, Philadelphia, PA.
- Boken, D.J., Chartrand, S.A., Goering, R.V., Kruger, R. and Harrison, C.J. (1995) Colonization with penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a childcare center. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **14**, 879-884.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heybecker, H.W., Boyer, H.W., Crose, J.H. and Falkow, S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. *Gene*, **4**, 121-136.
- Prentki, P., Pham, M.-H. and Galas, D.J. (1987) Plasmid permutation vectors to monitor DNA bending. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 10060.
- Borowiec, J.A., Gralla, G.J. (1985) Supercoiling response of the *lac ps* promoter *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, **184**, 587-598.
- Bossi, L. and Smith, D.M. (1984) Conformational change in the DNA associated with an unusual promoter mutation in a *tRNA* operon of *Salmonella*. *Cell*, **39**, 643-652.
- 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.
- Breines, D.M., Ouabdesslam, S., Ng, E.Y., Tankovic, J., Shah, S., Soussy, C.J. and Hooper, D.C. (1997) Quinolone resistance locus *nfxd* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 175-179.
- Brenwald, N.P., Gill, M.J. and Wise, R. (1998) Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*.

- Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 2032-2035.
- Bryskier, A. and Chantot, J. (1995) Classification and Structure-Activity Relationships of Fluoroquinolones. *Drugs*, **49 (Suppl.2)**, 16-28.
- Busby, S., Spassky, A. and Chan, B. (1987) RNA polymerase makes important contacts upstream from base pair-49 at *Escherichia coli* galactose operon P1 promoter. *Gene*, **53**, 145-152.
- Butler, J.C., Breiman, R.F., Campbell, J.F., Lipman, H.B., Broome, C.V. and Facklam, R.R. (1993) Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy: an evaluation of current recommendations. *JAMA*, **270**, 1826-1831.
- Butler, J.C., Breiman, R.F., Lipman, H.B., Hofmann, J. and Facklam, R.R. (1995) Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994: Implications for development of a conjugate vaccine. *J. Infect. Dis.*, **171**, 885-889.
- Camacho, A. and Salas, M. (1999) Effect of mutations in the "extended -10" motif of three *Bacillus subtilis* σ^A -RNA polymerase-dependent promoters. *J. Mol. Biol.*, **286**, 683-693.
- Carty, M. and Menzel, R. (1990) Inhibition of DNA gyrase activity in an *in vitro* transcription-translation system stimulates *gyrA* expression in a DNA concentration manner. *J. Mol. Biol.*, **214**, 397-406.
- Chan, S.S., Breslauer, K.J., Hogan, M.E., Kessler, D.J., Austin, R.H., Ojemann, J., Passner, J.M. and Wiles, N.C. (1990) Physical studies of DNA premelting equilibria in duplexes with ans without homo dA dT tracts: correlations with bending. *Biochemistry*, **29**, 6161-6171.
- Chen, D.K., McGeer, A., de Azavedo, J.C. and Low, D.E. (1999) Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *N. Engl. J. Med.*, **341**, 233-239.
- Chen, C.R., Malik, M., Snyder, M. and Drlica, K. (1996) DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage. *J. Mol. Biol.*, **258**, 627-637.
- Chen, J.D. and Morrison, D.A. (1987) Cloning of *Streptococcus pneumoniae* DNA fragments in *Escherichia coli* requires vectors protected by strong transcriptional terminators.

- Gene*, **55**, 179-187.
- Clewell, D.B. and Helinski, D.R. (1970) Properties of a supercoiled deoxyribonucleic acid-protein relaxation complex and strand specificity of the relaxation event. *Biochemistry*, **9**, 4428-4440.
- Clewell, D.B. and Helinski, D.R. (1972) Effect of growth conditions on the formation of the relaxation complex of supercoiled ColE1 deoxyribonucleic acid and protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **110**, 1135-1146.
- Coffey, T., Dowson, C.G., Daniels, M. and Spratt, B.G. (1995) Genetics and molecular biology of beta-lactam-resistant pneumococci. *Microb. Drug Resist.*, **1**, 29-39.
- Collis, C.M., Molloy, P.L., Both, G.W. and Drew, H.R. (1989) Influence of the sequence-dependent flexure of DNA on transcription in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 9447-9468.
- Colman, S.D., Hu, P.-C. and Bott, K.F. (1990) *Mycoplasma pneumoniae* DNA gyrase genes. *Mol. Microbiol.*, **4**, 1129-1134.
- Contreras, A. and Maxwell, A. (1992) *gyrB* mutations which confer coumarin resistance also affect DNA supercoiling and ATP hydrolysis by *Escherichia coli* DNA gyrase. *Mol. Microbiol.*, **6**, 1617-1624.
- CDC. Centers for Disease Control. (1997) Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP): Prevention of pneumococcal disease. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **46**, 1-25.
- Cundell, D., Masure, H.R. and Tuomanen, E.I. (1995) The molecular basis of pneumococcal infection: a hypothesis. *Clin. Infect. Dis.*, **21**, S204-S212.
- Dagan, R., Melamed, R. and Muallem, M. (1996) Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. *J. Infect. Dis.*, **174**, 1271-1278.
- de la Campa, A.G., Balas, D. and Fernández-Moreira, E. (1999) Molecular basis of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Recent Res. Devel. Antimicrob. Agents Chemother.*, **3**, 225-240.
- del Castillo, I., Vizán, J.L., Rodríguez-Saíenz, M.C. and Moreno, F. (1991) An unusual mechanism for resistance to the antibiotic coumermycin A1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA, **88**, 8860-8864.
- Dente, L., Cesareni, G. and Cortesse, R. (1983) pEMBL: a new family of single stranded plasmids. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1645-1655.
- 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.
- Dessusbabus, S., Bebear, C.M., Charron, A., Bebear, C. and Debarbeyrac, B. (1998) Sequencing of gyrase and topoisomerase IV quinolone-resistance-determining regions of *Chlamydia trachomatis* and characterization of quinolone-resistant mutants obtained *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 2474-2481.
- DiGate, R.J. and Marians, K.J. (1988) Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 13366-13373.
- DiGate, R.J. and Marians, K.J. (1989) Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17924-17930.
- Dimri, G.P. and Das, H.K. (1990) Cloning and sequence analysis of *gyrA* gene of *Klebsiella pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 151-156.
- DiNardo, S., Voelkel, K.A. and Sternglanz, R. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*, **31**, 43-51.
- Drlica, K. and Rouviere-Yaniv, J. (1987) Histonelike proteins of bacteria. *Microbiol. Rev.*, **51**, 301-319.
- Drlica, K. and Snyder, M. (1978) Superhelical *Escherichia coli* DNA: relaxation by coumermycin. *J. Mol. Biol.*, **120**, 145-154.
- Drlica, K. and Zhao, X. (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 377-392.
- Elsea, S.H., Hsiung, Y., Nitiss, J.L. and Osheroff, N. (1995) A yeast type II topoisomerase selected for resistance to quinolones. Mutation of histidine 1012 to tyrosine confers resistance to nonintercalative drugs but hypersensitivity to ellipticine. *J. Biol. Chem.*, **270**, 1913-1920.
- Elsea, S.H., McGuirk, P.R., Gootz, T.D., Moynihan, M. and Osheroff, N. (1993) Drug

- features that contribute to the activity of quinolones against mammalian topoisomerase II and cultured cells: correlation between enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage *in vitro* and cytotoxic potential. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 2179-2186.
- Elsa, S.H., Westergaard, M., Burden, D.A., Lomenick, J.P. and Osheroff, N. (1997) Quinolones share a common interaction domain on topoisomerase II with other DNA cleavage-enhancing antineoplastic drugs. *Biochemistry*, **36**, 2919-2924.
- 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., Martín-Bourgon, C., Muñoz, R., Vicioso, D. and Casal, J. (1991) Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989. *Rev. Infect. Dis.*, **13**, 56-60.
- 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 Resist.*, **6**, 259-267.
- Ferrándiz, 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.
- Ferrándiz, M.J., Oteo, J., Aracil, B., Gómez-Garcés, J.L. and de la Campa, A.G. (1999) Drug efflux and *parC* mutations are involved in fluoroquinolone resistance in viridans group streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 2520-2523.
- Ferrero, L., Cameron, B., Manse, B., Langeaux, D., Crouzet, J., Famechon, A. and Blanche, F. (1994) Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol. Microbiol.*, **13**, 641-653.
- File, T.M. and Slama, T.G. (2001) Fluoroquinolones: today and into the future. *Medical*

Education Collaborative and Medscape.

- Finkel, S.E. and Johnson, R.C. (1992) The FIS protein: it's not just for DNA inversion anymore. *Mol. Microbiol.*, **6**, 3257-3265.
- Flashner, Y. and Gralla, J.D. (1988) DNA dynamic flexibility and protein recognition: differential stimulation by bacterial histone-like protein HU. *Cell.*, **54**, 713-721.
- Froelich-Ammon, S.J. and Osheroff, N. (1995) Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J. Biol. Chem.*, **270**, 21429-21432.
- Fukuda, H. and Hiramatsu, K. (1999) Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 410-412.
- Funnell, B.E., Baker, T.A. and Kornberg, A. (1987) *In vitro* assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.*, **262**, 10327-10334.
- Gasc, A.M., Geslin, P. and Sicard, A.M. (1995) Relatedness of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* serogroup 9 strains from France and Spain. *Microbiology*, **141**, 623-627.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, H. and Nash, H.A. (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3872-3876.
- Gellert, M.K., Mizuuchi, M.H., O'Dea, T., Itho, T. and Tomizawa, J.-I. (1977) Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4772-4776.
- Gemmill, R.M., Tripp, M., Friedman, S.B. and Calvo, J.M. (1984) Promoter mutation causing catabolite repression of the *Salmonella typhimurium* leucine operon. *J. Bacteriol.*, **158**, 948-953.
- Georgiou, M., Muñoz, R., Roman, F., Canton, R., Gomez-Lus, R., Campos, J. and de la Campa, A.G. (1996) Ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* strains possess mutations in analogous positions of GyrA and ParC. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 11741-1744.
- Gilbert, E.J. and Maxwell, A. (1994) The 24 kDa N-terminal sub-domain of the gyrase B protein binds coumarin drugs. *Mol. Microbiol.*, **12**, 365-373.
- Gill, M.J., Brenwald, N.P. and Wise, R. (1999) Identification of an efflux pump gene, *pmrA*,

- associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 187-189.
- González, I., Georgiou, M., Alcaide, F., Balas, D., Liñares, J. and de la Campa, A.G. (1998) Fluoroquinolone resistance mutations in the *parC*, *parE*, and *gyrA* genes of clinical isolates of viridans group streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 2792-2798.
- Gootz, T.D., Zaniewski, R., Haskell, S., Schmieder, B., Tankovic, J., Girard, D., Courvalin, P. and Polzer, R.J. (1996) Activity of the new fluoroquinolone trovafloxacin (CP-99,219) against DNA gyrase and topoisomerase IV mutants of *Streptococcus pneumoniae* selected *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 2691-2697.
- Granton, J.T. and Grossman, R.F. (1993) Community-acquired pneumonia in the elderly patient: clinical features, epidemiology, and treatment. *Clin. Chest. Med.*, **14**, 537-553.
- Graña, D., Youderian, P. and Susskind, M. (1985) Mutations that improve the *ant* promoter of *Salmonella* phage P22. *Genetics*, **110**, 1-16.
- Graves, M.C. and Rabonowitz, J.C. (1986) *In vivo* and *in vitro* transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene. Evidence for extended promoter elements in gram-positive organisms. *J. Biol. Chem.*, **25**, 11409-11415.
- Gray, B.M., Converse, G.M. and Dillon, H.C. (1980) Epidemiologic studies of pneumococcal infection in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J. Infect. Dis.*, **142**, 923-933.
- Gray, B.M., Turner, M.E. and Dillon, H.C. (1982) Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants. *Am. J. Epidemiol.*, **116**, 692-703.
- Hanahan, D. (1985) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Hane, M.W. and Wood, T.H. (1969) *Escherichia coli* K-12 mutants resistant to nalidixic acid: genetic mapping and dominance studies. *J. Bacteriol.*, **99**, 238-241.
- Hansman, D. and Bullen, M.M. (1967) A resistant pneumococcus. *Lancet*, **2**, 264-265.
- Harley, C.B. and Reynolds, R.P. (1987) Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 2343-2361.
- Hausdorff, W.P., Bryant, J., Paradiso, P.R. and Siber, G.R. (2000) Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugative vaccine

- formulation and use, part I. *Clin. Infect. Dis.*, **30**, 100-121.
- Hawley, D.K. and McClure, W.R. (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 2237-2254.
- Heaton, V.J., Ambler, J.E. and Fisher, L.M. (2000) Potent antipneumococcal activity of gemifloxacin is associated with dual targeting of gyrase and topoisomerase IV, an *in vivo* target preference for gyrase, and enhanced stabilization of cleavage complexes *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 3112-3117.
- Heisig, P. (1996) Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 879-885.
- Helmann, J.D. (1995) Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* σ^A -dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2351-2360.
- Herrero, M. and Moreno, F. (1986) Microcin B17 blocks DNA replication and induces the SOS system in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 393-402.
- Hiasa, H. and Marians, K.J. (1996) Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *J. Biol. Chem.*, **271**, 21529-21535.
- Hiasa, H., Yousef, D.O. and Marians, K.J. (1996) DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone-DNA ternary complex. *J. Biol. Chem.*, **271**, 26424-26429.
- Higgins, N.P. and Cozzarelli, N.R. (1982) The binding of gyrase to DNA: analysis by retention by nitrocellulose filters. *Nucleic Acids Res.*, **10**, 6833-6847.
- Hooper, D.C. (1998a) Bacterial Topoisomerases, Anti-Topoisomerases, and Anti-Topoisomerase Resistance. *Clin. Infect. Dis.*, **27**, S 54-S 63.
- Hooper, D.C. (1998b) Clinical applications of quinolones. *Biochim. Biophys. Acta*, **1400**, 45-61.
- Hoshino, K., Kitamura, A., Morrissey, I., Sato, K., Kato, J. and Ikeda, H. (1994) Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 2623-2627.
- Howard, B.M., Pinney, R.J. and Smith, J.T. (1993) Function of the SOS process in repair of

- DNA damage induced by modern 4-quinolones. *J. Pharm. Pharmacol.*, **45**, 658-662.
- Huang, W.M. (1996) Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 79-107.
- Huang, W.M., Libbey, J.L., Vanderhoeven, P. and Yu, S.X.H. (1998) Bipolar localization of *Bacillus subtilis* topoisomerase IV, an enzyme required for chromosome segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4652-4657.
- Hussain, K., Elliott, E.J. and Salmond, G.P.C. (1987) The ParD- mutant of *Escherichia coli* also carries a *gyrA* mutation. The complete sequence of *gyrA*. *Mol. Microbiol.*, **1**, 259-273.
- Ito, H., Yoshida, H., Bogaki-Shonai, M., Niga, T., Hattori, H. and Nakamura, S. (1994) Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 2014-2023.
- Jackson, A.P., Maxwell, A. and Wigley, D.B. (1991) Preliminary crystallographic analysis of the ATP-hydrolysing domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase B protein. *J. Mol. Biol.*, **217**, 15-18.
- 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.
- Jernigan, D.B., Cetron, M.S. and Breiman, R.F. (1996) Minimizing the impact of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* (DRSP). A strategy from the DRSP Working Group. *JAMA*, **275**, 206-209.
- Kaatz, G.W., Seo, S.M. and Ruble, C.A. (1993) Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 1086-1094.
- Kaguni, J.M. and Kornberg, A. (1984) Replication initiated at the origin (*oriC*) of the *E. coli* chromosome reconstituted with purified enzymes. *Cell*, **38**, 183-190.
- Kampranis, S.C., Bates, A.D. and Maxwell, A. (1999) A model for the mechanism of strand

- passage by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8414-8419.
- Kampranis, S.C. and Maxwell, A. (1996) Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14416-14421.
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Higara, S. and Suzuki, H. (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*, **63**, 393-404.
- 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.
- Kato, J., Suzuki, H. and Ikeda, H. (1992) Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **267**, 25676-25684.
- Keilty, S. and Rosenberg, M. (1987) Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. *J. Biol. Chem.*, **262**, 6389-6395.
- Khodursky, A.B. and Cozzarelli, N.R. (1998) The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J. Biol. Chem.*, **273**, 27668-27677.
- Khodursky, A.B., Zechiedrich, E.L. and Cozarelli, N.R. (1995) Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11801-11805.
- Klugman, K.P. (1990) Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin. Microbiol. Rev*, **3**, 171-196.
- Korten, V., Huang, W.M. and Murray, B.E. (1994) Analysis by PCR and direct sequencing of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 2091-2094.
- Kovacic, R.T. (1987) The 0°C closed complexes between *Escherichia coli* RNA polymerase and two promoters, *T7-A3* and *lacUV5*. *J. Biol. Chem.*, **262**, 13654-13661.
- Kragsbjerg, P., Kallman, J. and Olcen, P. (1994) Pneumococcal meningitis in adults. *Scand. J. Infect. Dis.*, **26**, 659-666.
- Kreuzer, K.N. and Cozzarelli, N.R. (1979) *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth. *J. Bacteriol.*, **140**, 424-435.
- Kuikka, A., Syrjanen, J., Renkonen, O.-V. and Valtonen, V. (1992) Pneumococcal bacteremia during a recent decade. *J. Infect.*, **24**, 157-168.

- Kumagai, Y., Kato, J.-I., Hoshino, K., Akasaka, T., Sato, K. and Ikeda, H. (1996) Quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 710-714.
- Kumar, A., Malloch, R.A., Fujita, N., Smillie, D.A., Ishihama, A. and Hayward, R.S. (1993) The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* sigma 70 is inessential for initiation of transcription at an "extended minus 10" promoter. *J. Mol. Biol.*, **232**, 406-418.
- Kureishi, A., Diver, J.M., Beckthold, B., Schollaardt, T. and Bryan, L.E. (1994) Cloning and nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* DNA gyrase *gyrA* gene from strain PAO1 and quinolone-resistant clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 1944-1952.
- Lacks, S.A. (1966) Integration efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics*, **53**, 207-235.
- 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.
- Lampe, M.F. and Bott, K.F. (1985) Genetic and physical organization of the cloned *gyrA* and *gyrB* genes of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **162**, 78-84.
- Lazarus, L.R. and Travers, A.A. (1993) The *Escherichia coli* FIS protein is not required for the activation of *tyrT* transcription on entry into exponential growth. *EMBO J.*, **12**, 2483-2494.
- Lefevre, J.C., Bertrand, M.A. and Faucon, G. (1995) Molecular analysis by pulsed-field gel electrophoresis of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from Toulouse, France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **14**, 491-497.
- Leshner, G.Y., Froelich, E.D., Gruet, M.D. et al. (1962) 1, 8 naphthyridine derivatives: A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharmacol. Chem.*, **5**, 1063-1068.
- Lewin, C., Howard, B., Ratcliffe, N. and Smith, J. (1989) 4-Quinolones and the SOS response. *J. Med. Microbiol.*, **29**, 139-144.
- Lewis, R.J., Singh, O.M., Smith, C.V., Skarzynski, T., Maxwell, A., Wonacott, A. and Wigley, D.B. (1996) The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the

- cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *EMBO J.*, **15**, 1412-1420.
- Lima, C.D. and Mondragon, A. (1994) Mechanism of type II DNA topoisomerases: a tale of two gates. *Structure.*, **15**, 559-560.
- Liñares, J., de la Campa, A.G. and Pallarés, R. (1999) Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *N. Engl. J. Med.*, **341**, 1546-1548.
- Liñares, J., Pallarés, R., Alonso, T., Pérez, J.L., Ayats, J., Gudiol, F., Viladrich, P.F. and Martín, R. (1992) Trend in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge hospital, Barcelona, Spain (1979-1990). *Clin. Infect. Dis.*, **15**, 99-105.
- Liu, L.F., Liu, C.C. and Alberts, B.M. (1980) Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot topologically knotted DNA molecule via a reversible double-stranded break. *Cell*, **19**, 697-708.
- Liu, L.F. and Wang, J.C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 7024-7027.
- Lozinski, T., Adrych-Rozek, K., Markiewicz, W.T. and Wierzchowski, K.L. (1991) Effect of DNA bending in various regions of a consensus-like *Escherichia coli* promoter on its strength *in vivo* and structure of the open complex *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 2947-2953.
- Luttinger, A. (1995) The twisted life of DNA in the cell: bacterial DNA topoisomerases. *Mol. Microbiol.*, **15**, 601-606.
- Luttinger, A., Springer, A. and Schmid, M. (1991) A cluster of genes that affects nucleoid segregation in *Salmonella typhimurium*. *New Biol.*, **3**, 687-697.
- Magerrison, E.E.C., Hopewell, R. and Fisher, L.M. (1992) Nucleotide sequence of the *Staphylococcus aureus gyrB-gyrA* locus encoding the DNA gyrase A and B proteins. *J. Bacteriol.*, **174**, 1596-1603.
- Maki, S., Takiguchi, S., Horiuchi, T., Sekimizu, K. and Miki, T. (1996) Partner switching mechanisms in inactivation and rejuvenation of *Escherichia coli* DNA gyrase by F plasmid proteins LetD (CcdB) and LetA (CcdA). *J. Mol. Biol.*, **256**, 473-482.
- Maki, S., Takiguchi, S., Miki, T. and Horiuchi, T. (1992) Modulation of DNA supercoiling activity of *Escherichia coli* DNA gyrase by F plasmid proteins. Antagonistic actions of

- LetA (CcdA) and LetD (CcdB) proteins. *J. Biol. Chem.*, **267**, 12244-12251.
- Malik, M., Bensaid, A., Rouviere-Yaniv, J. and Drlica, K. (1996) Histona-like protein HU and bacterial DNA topology: suppression of an HU deficiency by gyrase mutations. *J. Mol. Biol.*, **256**, 66-76.
- Marians, K.J. (1987) DNA gyrase-catalyzed decatenation of multiply linked DNA dimers. *J. Biol. Chem.*, **262**, 10362-10368.
- Marton, A., Gulyas, M., Muñoz, R. and Tomasz, A. (1991) Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *J. Infect. Dis.*, **163**, 542-548.
- Maxwell, A. (1993) The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. *Mol. Microbiol.*, **9**, 681-686.
- McAllister, C.F. and Achberger, E.C. (1989) Rotational orientation of upstream curved DNA affects promoter function in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 10451-10456.
- McCullough, J.E., Muller, M.T., Howells, A.J., Maxwell, A., O'Sullivan, J., Summerill, R.S., Parker, W.L., Wells, J.S., Bonner, D.P. and Fernandes, P.B. (1993) Clerocidin, a terpenoid antibiotic, inhibits bacterial DNA gyrase. *J. Antibiotics*, **46**, 526-530.
- Mecsas, J., Cowing, D.W. and Gross, C.A. (1991) Development of RNA polymerase-promoter contacts during open complex formation. *J. Mol. Biol.*, **220**, 585-597.
- Menzel, R. and Gellert, M. (1983) Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell*, **34**, 105-113.
- Menzel, R. and Gellert, M. (1987a) Fusions of the *Escherichia coli* *gyrA* and *gyrB* control regions to the galactokinase gene are inducible by coumermycin treatment. *J. Bacteriol.*, **169**, 1272-1278.
- Menzel, R. and Gellert, M. (1987b) Modulation of transcription by DNA supercoiling: a deletion analysis of the *Escherichia coli* *gyrA* and *gyrB* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4185-4189.
- Miki, T., Park, J.A., Nagao, K., Murayama, N. and Horiuchi, T. (1992) Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress letD (*ccdB*) product growth inhibition. *J. Mol. Biol.*, **225**, 39-52.
- Millar, M., Grover, M., Osbourne, F. and Antoniou, A. (1991) Control of antibiotic-resistant

- Streptococcus pneumoniae* in Romania (letter). *Lancet*, **338**, 323.
- Mizuuchi, K., Mizuuchi, M., O'Dea, H. and Gellert, M. (1984) Cloning and simplified purification of *Escherichia coli* DNA gyrase A and B proteins. *J. Biol. Chem.*, **259**, 9199-9201.
- Moore, R., Beckthold, B., Wong, S., Kureishi, A. and Bryan, L.E. (1995) Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 107-111.
- Morais Cabral, J.H., Jackson, A.P., Smith, C.V., Shikotra, N., Maxwell, A. and Liddington, R.C. (1997) Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature*, **388**, 903-906.
- Moriya, S., Oogawara, N. and Yoshikawa, H. (1985) Structure and function of the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. III. Nucleotide sequence of some 10,000 base pairs in the origin region. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 2251-2265.
- Morrison, D.A. and Jaurin, B. (1990) *Streptococcus pneumoniae* possesses canonical *Escherichia coli* (sigma 70) promoters. *Mol. Microbiol.*, **4**, 1143-1152.
- Morrissey, I. and George, J.T. (1999) Activities of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* type II topoisomerases purified as recombinant proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 2579-2585.
- Morrissey, I. and George, J.T. (2000) Bactericidal activity of gemifloxacin and other quinolones against *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **45**, 107-110.
- Muñoz, R., Bustamante, M. and de la Campa, A.G. (1995) Ser-127-to-Leu substitution in the DNA Gyrase B subunit of *Streptococcus pneumoniae* is implicated in novobiocin resistance. *J. Bacteriol.*, **177**, 4166-4170.
- 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-Bellido, J.L., Alonzo Manzanares, M., Martinez Andres, J.A., Gutierrez Zufiaurre, M.N., Ortiz, G., Segovia Hernandez, M. and Garcia-Rodriguez, J.A. (1999) Efflux pump-mediated quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* strains wild type for

- gyrA*, *gyrB*, *grlA*, and *norA*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 354-356.
- Musher, D.M. (1992) Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin. Infec. Dis.*, **14**, 801-809.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1993) Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A3. NCCLS, Villanova.
- Nakada, N., Gmunder, H., Hirata, T. and Arisawa, M. (1994) Mechanism of inhibition of DNA gyrase by cyclothialidine, a novel DNA gyrase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 1966-1973.
- Nakamura, S., Nakamura, M., Kojima, T. and Yoshida, H. (1989) *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**, 254-255.
- Neumann, S. and Quinones, A. (1997) Discoordinate gene expression of *gyrA* and *gyrB* in response to DNA gyrase inhibition in *Escherichia coli*. *J. Basic Microbiol.*, **37**, 53-69.
- Neyfakh, A.A. (1992) The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus* NorA protein. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **36**, 484-485.
- Neyfakh, A.A., Bidnenko, V. and Chen, L.B. (1991) Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4781-4785.
- Neyfakh, A.A., Borsch, C.M. and G.W., K. (1993) Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 128-129.
- Ng, E.Y.W., Trucksis, M. and Hooper, D.C. (1994) Quinolone resistance mediated by *norA*: physiological characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 1345-1355.
- Nightingale, C.H. (2000) Moxifloxacin, a new antibiotic designed to treat community-acquired respiratory tract infections: A review of microbiologic and pharmacodynamic characteristics. *Pharmacotherapy*, **20**, 245-256.

- Ninnemann, O., Koch, C. and Kahmann, R. (1992) The *E. coli fis* promoter is subject to stringent control and autoregulation. *EMBO J.*, **11**, 1075-1083.
- Oppegaard, H. and Sorum, H. (1996) Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase *gyrA* gene from pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 1126-1133.
- Oram, M., Dosanjh, B., Gormley, N.A., Smith, C.V., Fisher, L.M., Maxwell, A. and Duncan, K. (1996) Mode of action of GR122222X, a novel inhibitor of bacterial DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 473-476.
- Orphanides, G. and Maxwell, A. (1994) Evidence for a conformational change in the DNA gyrase-DNA complex from hydroxyl radical footprinting. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 1567-1575.
- Osburne, M.S., Maiese, W.M. and Greenstein, M. (1990) *In vitro* inhibition of bacterial DNA gyrase by cinodine, a glycocinnamoyl spermidine antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**, 1450-1452.
- Otín, C.L., Morros, T.J. and Sala, I.S. (1988) Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* from paediatric patients. *J. Antimicrob. Chemother.*, **22**, 659-665.
- Pallarés, R., Gudiol, F., Liñares, J. and Viladrich, P.F. (1988) Bacteremic pneumonia caused by penicillin-resistant pneumococci. *N. Engl. J. Med.*, **318**, 124.
- Pallarés, R., Liñares, J., Vadillo, M., Cabellos, C., Manresa, F., Viladrich, P.F., Martín, R. and Gudiol, F. (1995) Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona, Spain. *N. Engl. J. Med.*, **333**, 474-480.
- 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.
- Pan, X.S. and Fisher, L.M. (1997) Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin-selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 471-474.
- Pan, X.S. and Fisher, L.M. (1998) DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 2810-2816.

- Pan, X.S. and Fisher, L.M. (1999) *Streptococcus pneumoniae* DNA gyrase and topoisomerase IV: Overexpression, purification, and differential inhibition by fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 1129-1136.
- Peltola, H. (2000) Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**, 302-317.
- Peng, H. and Marians, J. (1993) *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J. Biol. Chem.*, **268**, 24481-24490.
- Peng, H. and Marians, K.J. (1995) The interaction of *Escherichia coli* topoisomerase IV with DNA. *J. Biol. Chem.*, **270**, 25286-25290.
- Pérez, J.L., Liñares, J., Bosch, J., López de Goicoechea, M.J. and Martín, R. (1987) Antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* in childhood carriers. *J. Antimicrob. Chemother.*, **19**, 278-280.
- Pérez-Martín, J., Rojo, F. and de Lorenzo, V. (1994) Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression. *Microbiol. Rev.*, **58**, 268-290.
- Plaskon, R.R. and Wartell, R.M. (1987) Sequence distributions associated with DNA curvature are found upstream of strong *E. coli* promoters. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 785-796.
- Poljak, L.G. and Gralla, J.D. (1987) The SV40 termination region exhibits an altered helical conformation. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 5433-5442.
- Ponnambalan, S., Webster, C., Bingham, A. and Busby, S. (1986) Transcription initiation at the *E. coli* galactose operon promoters in the absence of the normal -35 region sequences. *J. Biol. Chem.*, **261**, 16043-16048.
- Prentki, P., Pham, M.-H. and Galas, D.J. (1987) Plasmid permutation vectors to monitor DNA bending. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 10060.
- Pruss, G.J. and Drlica, K. (1985) DNA supercoiling and suppression of the *leu-500* promoter mutation. *J. Bacteriol.*, **164**, 947-949.
- Pruss, G.J. and Drlica, K. (1989) DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell.*, **56**,

521-523.

- Pruss, G.J., Manes, S.H. and Drlica, K. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell.*, **31**, 35-42.
- Read, R.C., Morrissey, I. and Ambler, J.E. (2000) *Respiratory Tract Infections and Fluoroquinolones*. Science Press Ltd, London.
- Reece, R.J. and Maxwell, A. (1989) Tryptic fragments of the *Escherichia coli* DNA gyrase A protein. *J. Biol. Chem.*, **264**, 19648-19653.
- Reece, R.J. and Maxwell, A. (1991a) The C-terminal domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase A subunit is a DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res*, **19**, 1399-1405.
- Reece, R.J. and Maxwell, A. (1991b) Probing the limits of the DNA breakage-reunion domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase A protein. *J. Biol. Chem.*, **266**, 3540-3546.
- Rennels, M., Edwards, K.M., Keyserling, H.L., Reisinger, K.S., A., H.D., Madore, D.V., Chang, I., Paradiso, P.R., Malinoski, F.J. and Kimura, A. (1998) Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal vaccine conjugated to CRM197 in United States infants. *Pediatrics*, **101**, 604-611.
- Revel-Viravau, V., Truong, Q.C., Moreau, N., Jarlier, V. and Sougakoff, W. (1996) Sequence analysis, purification, and study of inhibition by 4-quinolones of the DNA gyrase from *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 2054-2061.
- Richardson, S.M., Higgins, C.F. and Lilley, D.M. (1988) DNA supercoiling and the *leu-500* promoter mutation of *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.*, **7**, 1863-1869.
- Rivetti, C., Guthold, M. and Bustamante, C. (1999) Wrapping of DNA around the *E. coli* RNA polymerase open promoter complex. *EMBO J.*, **18**, 4464-4475.
- Robinson, M.J., Martin, B.A., Gootz, T.D., McGuirk, P.R., Moynihan, M., Sutcliffe, J.A. and Osheroff, N. (1991) Effects of quinolone derivatives on eukaryotic topoisomerase II. A novel mechanism for enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage. *J. Biol. Chem.*, **266**, 14585-14592.
- Rojo, F. and Salas, M. (1991) A DNA curvature can substitute phage phi 29 regulatory protein p4 when acting as a transcriptional repressor. *EMBO J.*, **10**, 3429-3438.
- Rouviere-Yaniv, J., Germond, J.E. and Yaniv, M. (1979) *E. coli* DNA binding protein HU

- forms nucleosome-like structure with circular double-stranded DNA. *Cell*, **17**, 265-274.
- Rudd, K.E. and Menzel, R. (1987) *his* operons of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* are regulated by DNA supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 517-521.
- Russell, D.R., Auger, E.A., Vermersch, P.S. and Bennett, G.N. (1984) Role of DNA regions flanking the tryptophan promoter of *Escherichia coli*. I. Insertion of synthetic oligonucleotides. *Gene*, **32**, 337-348.
- Sabelnikov, A.G., Greenberg, B. and Lacks, S.A. (1995) An extended -10 promoter alone directs transcription of the *DpnII* operon of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol.*, **250**, 144-155.
- Sahm, D., Peterson, D.E., A., C.I. and Thornsberry, C. (2000) Analysis of ciprofloxacin activity against *Streptococcus pneumoniae* after ten years of use in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 2521-2524.
- 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.
- Samuels, D.S., Marconi, R.T., Huang, W.M. and Garon, C.F. (1994) *gyrB* mutations in coumermycin A1-resistant *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.*, **176**, 3072-3075.
- Schickor, P., Metzger, W., Werel, W., Lederer, H. and Heumann, H. (1990) Topography of intermediates in transcription initiation of *E. coli*. *EMBO J.*, **9**, 2215-2220.
- Schneider, R., Travers, A., Kutateladze, T. and Muskhelishvili, G. (1999) A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **34**, 953-964.
- Schneider, R., Travers, A. and Muskhelishvili, G. (1997) FIS modulates growth-phase dependent topological transitions of DNA in *E. coli*. *Mol. Microbiol.*, **26**, 519-530.
- Schneider, R., Travers, A. and Muskhelishvili, G. (2000) The expression of the *Escherichia coli fis* gene is strongly dependent on the superhelical density of DNA. *Mol. Microbiol.*, **38**, 167-175.
- Schofield, M.A., Agbunag, R., Michaels, M.L. and Miller, J.H. (1992) Cloning and sequencing of *Escherichia coli mutR* shows its identity to *topB*, encoding topoisomerase III. *J. Bacteriol.*, **174**, 5168-5170.

- Shaw, W.V. (1979) Chloramphenicol acetyltransferase from Chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol.*, **254**, 34-38.
- Shimizu, H., Yamaguchi, H. and Ikeda, H. (1995) Molecular analysis of lambda bio transducing phage produced by oxolinic acid-induced illegitimate recombination *in vivo*. *Genetics*, **140**, 889-896
- Shindo, H., Furubayashi, A., Shimizu, M., Miyake, M. and Imamoto, F. (1992) Preferential binding of *E.coli* histone-like protein HU- α to negatively supercoiled DNA. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1553-1558.
- Shine, J. and Dalgarno, L. (1975) Determinants of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature*, **254**, 34-38.
- Siebenlist, M. (1979) RNA polymerase unwinds an 11-base pair segment of a phage T7 promoter. *Nature*, **279**, 651-652.
- Snyder, M., Drlica, K. (1979) DNA gyrase on the bacterial chromosome: DNA cleavage induced by oxolinic acid. *J. Mol. Biol.*, **131**, 287-302.
- Sorensen, B.S., Sinding, J., Andersen, A.H., Alsner, J., Jensen, P.B. and Westergaard, O. (1992) Mode of action of topoisomerase II-targeting agents at a specific DNA sequence. Uncoupling the DNA binding, cleavage and religation events. *J. Mol. Biol.*, **228**, 778-786.
- Spratt, B.G. (1994) Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*, **264**, 388-393.
- Stassi, D.L. and Lacks, S.A. (1982) Effect of strong promoters on the cloning in *Escherichia coli* of DNA fragments from *Streptococcus pneumoniae*. *Gene*, **18**, 319-328.
- 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.
- Stefano, J.E. and Gralla, J. (1979) *lacUV5* transcription *in vitro*. Rate limitation subsequent to formation of an RNA polymerase-DNA complex. *Biochemistry*, **18**, 1063-1067.
- Stefano, J.E. and Gralla, J.D. (1982) Spacer mutations in the *lac ps* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 1069-1072.
- Sternglanz, R., DiNardo, S., Voelkel, K.A., Nishimura, Y., Hirota, Y., Becherer, K., Zumstein, L. and Wang, J.C. (1981) Mutations in the gene coding for *Escherichia coli*

- DNA topoisomerase I affect transcription and transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 2747-2751.
- Stieger, M., Angehrn, P., Wohlgensiger, B. and Gmünder, H. (1996) GyrB mutations in *Staphylococcus aureus* strains resistant to cyclotialidine, coumermycin, and novobiocin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 1060-1062.
- Sugino, A., Higgins, N.P., Brown, P.O., Peebles, C.L. and Cozzarelli, N.R. (1978) Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 4838-4842.
- Sugino, A., Peebles, C.L., Kreuzer, K.N. and Cozzarelli, N.R. (1977) Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* *nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase, a novel nicking-closing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 4767-4771.
- Swanberg, S.L. and Wang, J.C. (1987) Cloning and sequencing of the *Escherichia coli* *gyrA* gene coding for the A subunit of DNA gyrase. *J. Mol. Biol.*, **197**, 729-736.
- Takiff, H.E., Salazar, L., Guerrero, C., Philipp, W., Huang, W.M., Kreiswirth, B., Cole, S.T., Jacobs, W.R. and Telenti, A. (1994) Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* *gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 773-780.
- Tamamura, T., Tsuchiya, M., Isshiki, K., Sawa, T., Takeuchi, T., Hori, M. and Sakata, N. (1988) Terpentecin, an inhibitor of DNA synthesis. *J. Antibiotics*, **41**, 648-654.
- Tanaka, M., Onodera, Y., Uchida, Y., Sato, K. and Hayakawa, I. (1997) Inhibitory activities of quinolones against DNA gyrase and topoisomerase IV purified from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 2362-2366.
- Tanizawa, A., Kohn, K.W., Kohlhagen, G., Leteurtre, F. and Pommier, Y. (1995) Differential stabilization of eukaryotic DNA topoisomerase I cleavable complexes by camptothecin derivatives. *Biochemistry*, **34**, 7200-7206.
- 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.

- Thompson, J.F. and Landy, A. (1988) Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles: applications to lambda site-specific recombination complexes. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 9687-9705.
- Thompson, R.J. and Mosig, G. (1987) Stimulation of a *Chlamydomonas* chloroplast promoter by novobiocin *in situ* and in *E. coli* implies regulation by torsional stress in the chloroplast DNA. *Cell.*, **48**, 281-287.
- Tomasz, A. (1987) *Biochemistry and genetics of penicillin resistance in pneumococcus*. American Society for Microbiology., Washington, D.C.
- Trucksis, M. and Depew, R.E. (1981) Identification and localization of a gene that specifies production of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 2164-2168.
- Trucksis, M., Golub, E.I., Sabel, D.J. and Depew, R.E. (1981) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium supX* genes specify deoxyribonucleic acid topoisomerase I. *J. Bacteriol.*, **147**, 679-691.
- Tuomanen, E.I., Austrian, R. and Masure, H.R. (1995) Pathogenesis of pneumococcal infection. *N. Engl. J. Med.*, **11**, 1280-1284.
- Ullsperger, C. and Cozzarelli, N.R. (1996) Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 31549-31555.
- Varon, E., Janoir, C., Kitzis, M.-D. and Gutmann, L. (1999) ParC and GyrA may be interchangeable initial targets of some fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 302-306.
- Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P. and Jiménez de Anta, M.T. (1996) Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 491-493.
- Vizán, J.L., Hernández-Chico, C., del Castillo, I. and Moreno, F. (1991) The peptide antibiotic microcin B17 induces double-strand cleavage of DNA mediated by *E. coli* DNA gyrase. *EMBO J.*, **10**, 467-476.
- Wang, J.C. (1987) Recent studies of DNA topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta.*, **909**, 1-9.
- Wang, J.C. (1991) DNA topoisomerases: why so many? *J. Biol. Chem.*, **266**, 6659-6662.
- Wang, J.C. (1996) DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 635-692.

- Wang, Y., Huang, W.M. and Taylor, D.E. (1993) Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 457-463.
- Wenger, J.D., Hightower, A.W., Facklam, R.R., Gaventa, S., Broome, C.V. and the Bacterial Meningitis Study Group. (1990) Bacterial meningitis in the United States, 1986: report of a multistate surveillance study. *J. Infect. Dis.*, **162**, 1316-1323.
- Wentzell, L.M. and Maxwell, A. (2000) The complex of DNA gyrase and quinolone drugs on DNA forms a barrier to the T7 DNA polymerase replication complex. *J. Mol. Biol.*, **304**, 779-791.
- Wigley, D.B. (1996) A wasp head with relaxing bite. *Structure*, **4**, 117-120.
- Wigley, D.B., Davies, G.J., Dodson, E.J., Maxwell, A. and Dodson, G. (1991) Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature*, **351**, 624-629.
- Willmott, C.J., Critchlow, S.E., Eperon, I.C. and Maxwell, A. (1994) The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **242**, 351-361.
- Willmott, C.J. and Maxwell, A. (1993) A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 126-127.
- Wood, D.O. and Waite, R.T. (1994) Sequence analysis of *Rickettsia prowazekii gyrA* gene. *Gene*, **151**, 191-196.
- Wu, H.-M. and Crothers, D.M. (1984) The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature*, **308**, 509-513.
- Yang, H.L., Heller, K., Gellert, M. and Zubay, G. (1979) DNA supercoiling and the *leu-500* promoter mutation of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 3304-3308.
- 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.
- Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Yamanaka, L.M. and Nakamura, S. (1991)

- Quinolone resistance determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 1647-1650.
- Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M. and Nakamura, S. (1990) Quinolone resistance determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**, 1271-1272.
- Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D.M. and Cozzarelli, N.R. (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 8103-8113.
- Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B. and Cozzarelli, N.R. (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, **11**, 2580-2592.
- Zeller, V., Janoir, C., Kitzis, M.-D., Gutmann, L. and Moreau, N.J. (1997) Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 1973-1978.