

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**ESTUDIO GENETICO DE LA
SUBUNIDAD B DE LA DNA GIRASA DE
Escherichia coli: DIANA DEL PEPTIDO
ANTIBIOTICO MICROCINA B17 Y
DE LAS CUMARINAS**



José Luis Vizán Arroyo
Madrid, 1992

Colección Tesis Doctorales. N.º 100/92

© José Luis Vizán Arroyo

Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.
Madrid, 1992.
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-12186-1992



La Tesis Doctoral de D. JOSE LUIS VIRAN.....
... AYRDOYO.....
Titulada ESTUDIO GENETICO DE LA SUBUNIDAD B DE LA DNA
GIRASA DE E. COLI: DIANA DEL PEPTIDO ANTIBIOTICO
MICROCINA B17 Y DE LAS URMARINAS
Director Dr. D. ... FELIPE MORENO FERRERO...
fue leida en la Facultad de CIENCIAS QUIMICAS
de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, el día 12
de ... JULIO..... de 1971..., ante el tribunal
constituido por los siguientes Profesores:
PRESIDENTE JUAN RAMON LACADENA Y CALERO.....
VOCAL ... FERNANDO VAQUERO MOCUMLES.....
VOCAL ... RAMON DIAZ OBEJAS.....
VOCAL ... FRANCISCO PORTILLO PEREZ.....
SECRETARIO JOSE G. GAVILANES BRAYO.....
.....
habiendo recibido la calificación de ... BUENA...
... LAUDE ... POR UNANIMIDAD.....

Madrid, a 12 de JULIO de 1971.

EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL.

JOSE LUIS VIZAN ARROYO

**ESTUDIO GENETICO DE LA SUBUNIDAD B DE LA DNA
GIRASA DE *Escherichia coli*: DIANA DEL PEPTIDO
ANTIBIOTICO MICROCINA B17 Y DE LAS CUMARINAS.**

Director: Felipe Moreno Herrero.

Jefe de la Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Facultad de Ciencias Químicas.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

Madrid, 1991.

**Memoria que para optar al grado de
Doctor en Ciencias Químicas presenta
José Luis Vizán Arroyo.**

Madrid, Junio de 1991.

Vº Bº del Director de la Tesis:

Dr. Felipe Moreno Herrero.

Jefe de la Unidad de Genética Molecular.

Hospital Ramón y Cajal.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo que presento en esta memoria ha sido realizado en la Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal, bajo la dirección del Dr. Felipe Moreno Herrero, a quien quiero agradecer su afectuosa e inestimable ayuda e interés durante este período de formación por el cual he podido adentrarme en el apasionante tema de la genética bacteriana. Al Dr. Ignacio del Castillo quiero agradecerle su colaboración personal a lo largo del trabajo realizado, gracias a la cual éste se ha visto ostensiblemente enriquecido. Verdaderamente, mucho del trabajo descrito en esta memoria lo hicimos juntos en estrecha armonía. A la Dra. Concepción Hernández-Chico agradezco sus generosos consejos científicos y su decisiva intervención personal en los estudios consagrados a los efectos de la microcina B17 sobre el DNA, los cuales han facilitado una interpretación más completa y rica del conjunto de resultados obtenidos. A la Dra. María del Carmen Rodríguez-Sáinz quien contribuyó muy significativamente en la caracterización de los mutantes *Cou*^R. A la Dra. Magela Laviña por su concurso en el aislamiento de mutantes *Mcc*^R. Al Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) por concederme una beca predoctoral, que facilitó la realización de este trabajo.

Quiero hacer una mención especial de agradecimiento a mis compañeros de laboratorio: C. Barrio, J. Blázquez, L. Díaz-Guerra, O. Genilloud, J.M. Gómez, C. Martín, O. Mayo, B. Peral, C. Ruiz de Oña, R. Salomón, J.L. San Millán, J. Talavera, A. Valero, E. Velasco y C. Vidal por su afecto y amistad, aderezada con grandes dosis de paciencia. Al Dr. Fernando Baquero quiero expresar mi agradecimiento por su apoyo decidido y cordial al trabajo aquí presentado.

Quiero agradecer a mis padres, en particular, la infinita comprensión y estímulo que de ellos he recibido en todo momento, y que constituye una parte muy importante de la experiencia que he acumulado en este período.

Por último quiero expresar mi gratitud a todos aquellos que, de un modo u otro, han hecho posible que este instante se haga realidad.

A Josefina y Valentin

INDICE

	Pág.
1. INTRODUCCION	1
A.- MICROCINAS	2
1.1. MICROCTNA B17	3
1.1.1. El sistema genético MccB17 y su regulación	3
1.1.2. El plásmido pMM102	6
1.1.3. Estructura de la Microcina B17	7
1.1.4. Modo de acción de la MccB17	8
1.1.5. Mutantes resistentes y tolerantes a MccB17	10
B.- DNA TOPOISOMERASAS E INHIBIDORES ESPECIFICOS ...	12
1.2. DNA TOPOISOMERARAS	12
1.2.1. DNA Topoisomerasas caracterizadas en <i>E. coli</i>	13
I. DNA Topoisomerasas tipo I	14
II. DNA Topoisomerasas tipo II	15
III. Inhibidores de DNA girasa	19
IV. Estudio de la proteína GyrB: relación estructura-función	20
C.- OBJETIVOS DEL TRABAJO REALIZADO	22
2. MATERIALES	23
2.1. ESTIRPES BACTERIANAS, PLASMIDOS Y BACTERIOFAGOS	26

	Pág.
2.2. MEDIOS DE CULTIVO	26
2.3. ANTIBIOTICOS	29
2.4. SOLUCIONES Y TAMPONES	30
3. METODOS	38
3.1. METODOS RELACIONADOS CON LOS ANTIBIOTICOS	
MICROCINA B17 Y COUMERMICINA A ₁	39
3.1.1. Ensayo de producción de MccB17	39
3.1.2. Obtención de extractos crudos de microcina B17	39
3.1.3. Pruebas de sensibilidad a la microcina B17	40
I. Método del "Cross Streaking"	40
II. Método de la Dilución Crítica	40
III. Medida de la Actividad Bactericida	41
3.1.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de coumermicina A ₁ y novobiocina	41
3.2. SELECCION DE MUTANTES ESPONTANEOS	42
3.2.1. Método de obtención de mutantes resistentes a MccB17 ...	42
3.2.2. Método de obtención de mutantes resistentes a coumermicina A ₁	42
3.3. METODOS RELACIONADOS CON LA MANIPULACION DE BACTERIOFAGOS	43
3.3.1. Pruebas de sensibilidad a bacteriófagos	43
3.3.2. Técnicas de manipulación de fago transductor P1vir	43
3.4. MUTAGENESIS CON TRANSPOSONES	43

	Pág.
3.4.1. Mutagénesis con el transposón Tn5	44
3.4.2. Mutagénesis con el transposón Tn10.....	44
3.5. MANIPULACION DEL ALELO <i>recA</i>	45
3.5.1. Identificación fenotípica de clones <i>RecA</i> ⁺ versus <i>RecA</i> ⁻	45
3.5.2. Construcción de estirpes <i>recA56</i>	45
3.5.3. Construcción de estirpes <i>recA</i>	46
3.6. TRANSFORMACION	47
3.6.1. Preparación de células competentes	47
3.6.2. Transformación con DNA plasmídico	47
3.6.3. Transformación con DNA de vectores derivados de M13 ...	48
3.7. METODOS DE PURIFICACION DE DNA	48
3.7.1. Preparación de DNA cromosómico	48
3.7.2. Preparación de DNA plasmídico por lisis alcalina	49
3.7.3. Purificación del DNA: extracción con fenol	50
3.7.4. Purificación de DNA: ultracentrifugación a equilibrio de densidad en gradiente de CsCl	50
3.7.5. Preparación de DNA de cadena sencilla en derivados del fago M13	51
3.7.6. Preparación de formas replicativas de DNA de M13	52
3.8. MANIPULACION ENZIMATICA DEL DNA	52
3.8.1. Digestión del DNA con endonucleasas de restricción	53
3.8.2. Ligación de extremos de DNA	53
3.9. ELECTROFORESIS DE DNA	53

	Pág.
3.9.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	53
3.9.2. Electroforesis de DNA en geles de poliacrilamida	54
3.9.3. Purificación de fragmentos DNA a partir de geles de agarosa	54
3.9.4. Purificación de fragmentos DNA a partir de geles de acrilamida	55
3.10. METODOS DE CLONADO <i>in vivo</i> DE SECUENCIAS DE DNA CROMOSOMICO	56
3.10.1. Método basado en la utilización de derivados del bacteriófago mini-Mu	56
3.10.2. Método basado en la recombinación homóloga entre alelos de un mismo locus	59
3.11. SECUENCIACION DEL DNA	62
3.11.1. Hibridación del oligonucleótido iniciador al DNA molde	62
3.11.2. Reacciones con DNA polimerasa I (fragmento Klenow) ...	63
3.11.3. Reacciones con DNA polimerasa de T7	64
3.11.4. Electroforesis de DNA en geles desnaturalizantes de poliacrilamida	66
3.12. MAXICELULAS	66
3.12.1. Preparación de las maxicélulas y marcaje radiactivo de las proteínas sintetizadas	67
3.12.2. Análisis de proteínas en geles de poliacrilamida	68

	Pág.
3.12.3. Autorradiografía de geles de poliacrilamida	69
4. RESULTADOS	71
A.- ESTUDIO DE MUTANTES RESISTENTES A MICROCINA B17 ..	72
4.1. AISLAMIENTO DE MUTANTES RESISTENTES	
A MICROCINA B17 (Mcc^R)	72
4.2. CARACTERIZACION DE LOS MUTANTES	
D3.102 Y D4.73-4	74
4.3. LOCALIZACION GENETICA DE	
LAS MUTACIONES <i>sbmB1</i> Y <i>sbmB2</i>	78
4.3.1. Inserción de un transposón Tn10 próximo a <i>sbmB1</i>	78
4.3.2. Localización genética de la mutación <i>sbmB1</i>	79
4.3.3. Localización genética de la mutación <i>sbmB2</i>	84
4.3.4. Localización de la mutación <i>sbmB1</i> con relación al gen	
<i>gyrB</i>	87
4.4. CLONADO DE LAS MUTACIONES <i>sbmB1</i> Y <i>gyrB320</i>	89
4.4.1. Análisis de dominancia/recesividad de las mutaciones	
<i>sbmB1</i> y <i>gyrB320</i>	89
4.4.2. Clonado <i>in vivo</i> de las mutaciones <i>sbmB1</i> y <i>gyrB320</i>	90
4.4.3. Subclonado de las mutaciones <i>sbmB1</i> y <i>gyrB320</i> :	
construcción de los plásmidos pCID500 y pCID509	91
4.4.4. Las mutaciones <i>sbmB1</i> y Cou ^R afectan al gen <i>gyrB</i>	
verdaderamente	93

	Pág.
4.5. CLONADO DEL ALELO <i>gyrB</i> SILVESTRE	96
4.6. CLONADO DE LA MUTACION <i>gyrB302</i>	97
4.7. LOCALIZACION FISICA DE LAS MUTACIONES	
<i>gyrB301</i> y <i>gyrB302</i> DENTRO DE <i>gyrB</i>	98
4.7.1. Aislamiento de derivados delecionados de pCID500, pCID510 y pCID520	98
4.7.2. Los genes híbridos y sus fenotipos	99
4.8. SECUENCIACION DE LAS MUTACIONES	
<i>gyrB301</i> Y <i>gyrB302</i>	101
B.- EL GEN <i>gyrB</i> Y LA RESISTENCIA A COUMERMICINA A ₁	104
4.9. CLONADO DEL GEN <i>gyrB</i> DE LA ESTIRPE pop3351 (Cou ^B) ...	105
4.10. EFECTO DE LAS DELECCIONES DEL EXTREMO 3' DE <i>gyrB</i> EN LA RESISTENCIA A COUMERMICINA A ₁	106
4.11. EFECTO DE LA DOSIS GENICA DE <i>gyrB</i> EN LA RESISTENCIA A COUMERMICINA A ₁	110
4.12. LOCALIZACION FISICA DE LA MUTACION <i>gyrB320</i>	112
4.13. SECUENCIACION DE LA MUTACION <i>gyrB320</i>	114
6. CONCLUSIONES	116
I. La microcina B17 y la DNA girasa	117
II. El extremo carboxilo-terminal de GyrB es esencial para la actividad DNA girasa	123

	Pág.
III. Un nuevo mecanismo de resistencia a cumarinas:	
La titulación del antibiótico	126
IV. La mitad amino de GyrB se requiere y es suficiente para unir counermicina A ₁ y ATP	129
V. Sobre el sitio de unión del ATP a la DNA girasa	133
VI. Estructura-función de la DNA girasa de <i>E. coli</i>	134
6. CONCLUSIONES.....	137
7. BIBLIOGRAFIA.....	140

ABREVIATURAS

Ap	ampicilina
Ap ^R	resistencia a la ampicilina
BSA	seroalbúmina bovina
Cm	cloranfenicol
Cm ^R	resistencia al cloranfenicol
Cou	coumermicina A ₁
Cou ^R	resistencia a la coumermicina A ₁
DO	densidad óptica
DIT	ditiotreitol
EDTA	etilen diamino tetra acético
IPTG	isopropil-β-D-tio-galactopiranosido
kb	kilobase
Km	kanamicina
Km ^R	resistencia a la kanamicina
MccB17	microcina B17
Mcc ^R	resistencia a la microcina B17
Nx	ácido nalidíxico
Nx ^R	resistencia al ácido nalidíxico
pb	par de bases de DNA
PSA	persulfato amónico
rpm	revoluciones por minuto
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilen diamina

Tc	tetraciclina
Tc ^R	resistencia a la tetraciclina
Tris	tris hidroximetil amino metano
UA	unidad antibiótica
ufc	unidades formadoras de colonia
ufp	unidades formadoras de placa
UV	luz ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-galactopiranosido

1. INTRODUCCION

A) LAS MICROCINAS.

Las bacteriocinas son genericamente agentes antibacterianos de naturaleza proteica producidos por bacterias. Su espectro de acción está limitado a estirpes cercanas filogenéticamente a la productora. Las células bacteriocinogénicas sintetizan una proteína de inmunidad que neutraliza específicamente la acción bacteriolítica de la bacteriocina producida (Konisky, 1982).

Las colicinas son bacteriocinas de 30.000 a 80.000 Da, producidas concretamente por *Escherichia coli* y por otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Su producción es inducida, vía respuesta SOS, por los agentes que dañan el DNA, y su liberación al medio implica la lisis y muerte de la célula productora (Konisky, 1982).

Las microcinas constituyen una familia de antibióticos peptídicos producidos por diferentes enterobacterias, activos sobre diferentes generos y especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Estos nuevos antibióticos presentan diferencias fundamentales con las bacteriocinas previamente descritas, entre las que destacan las siguientes:

Las microcinas son compuestos de bajo peso molecular (500 – 5.000 Da) cuya síntesis no es inducida vía SOS por agentes que dañan el DNA. De hecho, las microcinas, como otros antibióticos, son producidas cuando las células alcanzan la fase estacionaria de crecimiento.

La secreción de estos antibióticos no implica la lisis de la célula productora, y por lo tanto no es letal para dicha célula.

Por último, las microcinas pueden ser bactericidas o bacteriostáticas, a diferencia de las bacteriocinas que son todas bactericidas (Asensio *et al.*, 1976; Baquero y Moreno, 1984).

Las microcinas caracterizadas hasta ahora están determinadas por plásmidos que contienen la información genética necesaria para la producción y la inmunidad a la correspondiente microcina (Baquero *et al.*, 1978; Pérez-Díaz y Clowes, 1980; Baquero y Moreno, 1984; San Millán *et al.*, 1985(a); Novoa *et al.*, 1986).

1.1. MICROCINA B17.

Las microcinas han sido clasificadas en cinco grupos diferentes, denominados A, B, C, D y E, atendiendo a criterios bioquímicos, genéticos y de inmunidad cruzada (Baquero y Moreno, 1984). Recientemente ha sido encontrada otra microcina que define un nuevo grupo, la microcina H47 (Laviña *et al.*, 1990).

Dentro de la familia de las microcinas la mejor caracterizada es la microcina B17 (MccB17) que constituye el prototipo de las microcinas del grupo B.

1.1.1. El sistema genético MccB17 y su regulación.

La MccB17 es producida por estirpes de *E.coli* portadoras del plásmido conjugativo pMccB17 de 70 kb. Este plásmido pertenece al grupo de incompatibilidad FII y está presente en 1 - 2 copias por genoma bacteriano (Baquero *et al.*, 1978).

Los determinantes genéticos implicados en la producción y en la inmunidad a la microcina han sido localizados en un fragmento *Bam*HI - *Bgl*II de 6,3 kb del plásmido pMccB17 (Figura 1A). Por estudios de complementación genética se ha demostrado que

cuatro genes, denominados *mcbABCD*, son necesarios para la producción del antibiótico (San Millán *et al.*, 1985(b); Garrido *et al.*, 1986). Estos genes han sido secuenciados y sus productos identificados en minicélulas (péptido McbA) y en maxicélulas (proteínas McbB, McbC y McbD) (Davagnino *et al.*, 1986; Genilloud *et al.*, 1989). *mcbA* es el gen estructural del precursor de la microcina. Los tres genes restantes *mcbBCD* son esenciales para la producción del antibiótico maduro. Aunque se postula la posible intervención de estos genes en el procesamiento de la molécula de premicrocina, se desconoce su función concreta.

La región de inmunidad a microcina B17, adyacente a la de producción, está constituida por tres genes, denominados *mcbEFG* (San Millán *et al.*, 1985(a); Garrido *et al.*, 1988). Estos genes han sido secuenciados y las proteínas McbF y McbG identificadas en maxicélulas (Garrido *et al.*, 1988).

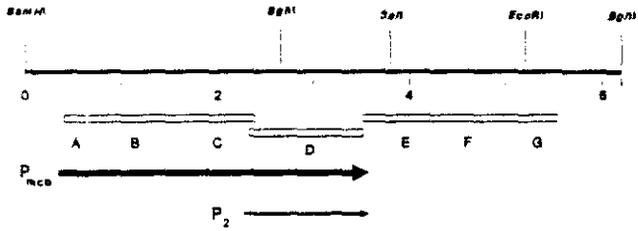
La inmunidad a MccB17 se establece por dos mecanismos diferentes, uno determinado por los productos de los genes *mcbEF*, y el otro por el producto del gen *mcbG*.

Las proteínas McbE y McbF podrían formar parte de un sistema de transporte específico de la microcina B17. El perfil hidropático derivado de la secuencia de McbE sugiere que ésta es una proteína integral de membrana interna con 6 posibles dominios transmembranales. Por otra parte, la proteína McbF puede tener una actividad ATPasa, puesto que presenta una secuencia similar a la consensuada para los sitios de unión de ATP (Garrido *et al.*, 1988). Ambas proteínas se requieren para la exportación del antibiótico endógeno. Por estas razones, se ha postulado que McbE y McbF constituyen una bomba que exporta la MccB17 del citoplasma.

La proteína citoplásmica McbG confiere por sí sola inmunidad al antibiótico MccB17. Cuantitativamente su acción es equivalente a la conferida por la pareja McbE - McbF. El

FIGURA 1.

A) MAPA FISICO Y GENETICO DE LA REGION MICROCINA B17



B) SECUENCIA DE AMINOACIDOS DEL PEPTIDO MICROCINA B17

Met	Glu	Leu	Lys	Ala	Ser	Glu	Phe	Gly	Val	Val	Leu	Ser	Val	Asp
Ala	Leu	Lys	Leu	Ser	Arg	Gln	Ser	Pro	Leu	Gly	Val	Gly	Ile	Gly
Gly	Ser	Cys	Gly	Gly	Gln	Gly								
Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Cys	Ser	Asn	Gly	Cys	Ser	Gly	Gly	Asn	Gly
Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	His	Ile						

(1) ENLACE PEPTIDICO HIDROLIZADO EN LA MAURACION DE LA MccB17

mecanismo por el cual McbG neutraliza la acción del antibiótico, permanece aún desconocido. Se ha postulado que McbG protege el blanco intracelular de la microcina B17 (Garrido *et al.*, 1988).

La transcripción de los genes *mcb* está dirigida por dos promotores, P_{mcb} y P_2 (Figura 1A). P_{mcb} , situado delante de gen *mcbA*, es el promotor principal del sistema genético MccB17 a partir del cual se transcriben *mcbABC*, y aproximadamente el 90% de los mensajeros del gen *mcbD*. Este promotor está regulado por la fase de crecimiento, de forma que la producción de MccB17 es máxima cuando las células productoras alcanzan la fase estacionaria. Además, P_{mcb} es dependiente del producto cromosómico OmpR, un regulador positivo de la transcripción (Hernández-Chico *et al.*, 1986; Connell *et al.*, 1987; Genilloud *et al.*, 1989). El promotor P_2 , localizado dentro del gen *mcbC*, no está regulado por la fase de crecimiento. Este promotor dirige la transcripción constitutiva de *mcbD* (Genilloud *et al.*, 1989). Los genes *mcbEFG* implicados en la inmunidad a MccB17, probablemente se transcriben también a partir de los promotores P_{mcb} y P_2 , no obstante la inmunidad se expresa constitutivamente con independencia de la fase de crecimiento celular (Hernández-Chico *et al.*, 1986).

1.1.2. El plásmido pMM102.

En el proceso de clonado de los genes *mcb* en un vector multicopia, se obtuvo el plásmido, denominado pMM102, derivado de pBR322 que porta un fragmento *BamHI* - *EcoRI* de 5.2 kb (San Millán *et al.*, 1985(a)). Este contiene los genes *mcbABCDEFG*, pero carece del gen de inmunidad *mcbG*. La ausencia de *mcbG* en el plásmido pMM102 provoca

un desequilibrio entre la producción de MccB17 y la inmunidad al antibiótico lo que desencadena, en las células portadoras del plásmido, una serie de fenómenos fisiológicos que en conjunto conforman lo que se ha denominado fenotipo de inmunodeficiencia. Estos fenómenos consisten en la reducción de la viabilidad de las células productoras, elevada expresión del sistema SOS de reparación del DNA, pérdida del plásmido productor de MccB17 y filamentación celular. Este fenotipo se manifiesta de forma extrema en células RecA⁻(pMM102) crecidas en medio mínimo, ya que éstas son incapaces de formar colonias en dicho medio (San Millán *et al.*, 1985(a)). Esta característica fenotípica peculiar del plásmido pMM102 ha sido aprovechada en este trabajo para la selección de mutantes resistentes a MccB17. Además, ha permitido clonar e identificar un nuevo locus, denominado *mprA*, situado en el minuto 57,5, muy próximo a *proU*. Este locus, clonado en un plásmido multicopia, bloquea la producción de MccB17 y, en consecuencia, suprime el fenotipo de inmunodeficiencia provocado por pMM102 (Castillo *et al.*, 1990).

1.1.3. Estructura de la Microcina B17.

La microcina B17 (MccB17) es un péptido de aproximadamente 3.200 Da de naturaleza hidrofóbica, termorresistente, no susceptible a valores extremos de pH y cargado positivamente a pH 7. Este péptido es sensible a la acción de la termolisina, pronasa y subtilisina y resistente a tripsina y quimotripsina (Herrero, 1984).

La actividad antibiótica MccB17, en cultivos líquidos de estirpes productoras, está asociada principalmente a las células y es máxima cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria de crecimiento. La microcina B17 se ha extraído por ebullición de las células

productoras en ácido acético 100 mM. Con estas preparaciones se ha purificado a homogeneidad en un único paso por cromatografía de HPLC, a través de una columna de C18 (Davagnino *et al.*, 1986).

La molécula de microcina B17 está constituida por 43 aminoácidos, 26 de los cuales son glicinas (Figura 1B). Este antibiótico se sintetiza en forma de un precursor de 69 aminoácidos. Los 26 primeros residuos del extremo N-terminal no están presentes en la molécula de microcina B17 madura. Este péptido N-terminal procesado no presenta las propiedades características de una secuencia señal, por lo que la microcina debe ser exportada por un mecanismo diferente al que usan la mayoría de las proteínas excretadas en *E.coli*. La molécula carece de los residuos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptófano, y de los básicos lisina y arginina, lo que explica que sea resistente a las proteasas quimotripsina y tripsina (Davagnino *et al.*, 1986).

1.1.4. Modo de acción de la MccB17.

La microcina B17 actúa sobre las células sensibles, inhibiendo la replicación del DNA de forma inmediata e irreversible. Como consecuencia directa de dicha inhibición se induce el sistema SOS de reparación celular, seguido de la degradación del DNA y finalmente la muerte celular (Herrero y Moreno, 1986).

La microcina B17 requiere, para la inducción del sistema SOS, los productos RecA y RecBC. Además, este antibiótico precisa una horquilla de replicación activa para inducir el sistema SOS. En efecto, se ha comprobado en mutantes *dnaA(ts)*, incapaces de iniciar nuevos ciclos de replicación a 42°C, pero que pueden completar los ciclos iniciados

previamente, que la inducción del sistema SOS mediada por microcina B17 se reduce de forma considerable, cuando las células son transferidas a 42°C, y es totalmente abolida cuando las células se precubaban a esta temperatura antes del tratamiento con el antibiótico (Herrero y Moreno, 1986).

El conjunto de los resultados anteriores sugiere que la microcina B17 se asemeja, en su modo de acción, más a los inhibidores de la replicación del DNA que actúan bloqueando la fase de elongación, tales como el ácido nalidíxico (Drlica y Franco, 1988), que a los que afectan directamente a la estructura del DNA, tales como la mitomicina C, la bleomicina o la luz ultravioleta. No obstante, hay una diferencia importante entre la microcina B17 y el ácido nalidíxico. El efecto de la microcina B17 sobre células sensibles es esencialmente irreversible. Sin embargo, los efectos del ácido nalidíxico se revierten si el antibiótico se elimina del medio lavando células tratadas durante 5 minutos con 10 µg/ml, una concentración inhibitoria del crecimiento (Herrero y Moreno, 1986).

Las células inmunes a microcina B17 tratadas con el antibiótico presentan muchos de los efectos fisiológicos encontrados en células sensibles, es decir la microcina B17 provoca también, en esas células, una inhibición casi inmediata de la replicación del DNA y una inducción del sistema SOS. Estos efectos que conducen de manera irreversible a la muerte de las células sensibles, son revertidos en las inmunes de modo que no afectan en último término a la viabilidad celular. Por lo tanto los mecanismos de inmunidad a microcina B17 no previenen de la acción primaria del antibiótico, pero evitan los efectos fisiológicos secundarios derivados de la acción de la microcina B17 que conducen a la muerte celular (Herrero *et al.*, 1986).

1.1.5. Mutantes resistentes y tolerantes a MccB17.

Con el fin de elucidar los mecanismos moleculares involucrados en el modo de acción de la MccB17, se han aislado y caracterizado mutantes resistentes y tolerantes a la acción del antibiótico. El estudio de estos mutantes ha llevado a la identificación de alguna de las etapas implicadas en la acción de la microcina B17.

Mutaciones espontáneas que reducen la sensibilidad a MccB17, aparecen con una frecuencia de 10^{-4} . Los loci afectados por estas mutaciones son: *sbmA*, *ompF* y *ompR*, situados en los minutos 9, 21 y 75 del mapa genético de *E.coli*, respectivamente.

El locus *sbmA* codifica una proteína de 406 aminoácidos con al menos 7 dominios hidrofóbicos que está asociada a la membrana interna de la célula (O. Mayo, comunicación personal).

El gen *ompR* (minuto 47), como es sabido, codifica un regulador positivo de la transcripción de los genes *ompF* y *ompC*, los genes estructurales de las porinas mayoritarias de la membrana externa OmpF y OmpC, respectivamente (Hall y Silhavy, 1981).

Los mutantes *sbmA* son resistentes a la microcina B17 exógena pero no a la microcina endógena, la que sintetizan ellos mismos cuando portan un plásmido productor; de hecho, en medio mínimo glucosa, las estirpes mutantes *sbmA* RecA⁻ (pMM102) son inviables como las isogénicas *sbmA*⁺. Los mutantes *ompR* y *ompF* toleran concentraciones moderadas de MccB17 exógena (Laviña *et al.*, 1986). El análisis de los fenotipos microcina asociados a estos mutantes sugiere fuertemente que los productos de *sbmA* y *ompF* están implicados en el transporte de la microcina B17 externa al interior celular, mientras que la

tolerancia a MccB17 exhibida por los mutantes *ompR* es una consecuencia indirecta de su fenotipo OmpF⁻.

Considerando que la MccB17 es un inhibidor de la replicación del DNA, resulta especialmente interesante el estudio de mutantes afectados en la diana intracelular del antibiótico. Con el fin de poder identificar nuevos mutantes resistentes y tolerantes a microcina B17, hemos aplicado dos métodos diferentes de aislamiento de mutantes. Estos métodos se diseñaron para obviar los mutantes de transporte *sbmA*, *ompF* y *ompR*, previamente descritos que aparecen con una frecuencia relativamente elevada. Uno de estos métodos se basa en las propiedades peculiares del plásmido pMM102; y el otro en la exclusión *a priori* de los posibles mutantes *sbmA*. Ambos procedimientos serán descritos y fundamentados más adelante.

Una parte fundamental del trabajo que aquí se presenta, está constituida por la caracterización genética y fisiológica de dos mutantes independientes, resistentes a microcina endógena y exógena, obtenidos por estos procedimientos.

B) DNA TOPOISOMERASAS E INHIBIDORES ESPECIFICOS.

1.2. DNA TOPOISOMERASAS.

Las DNA Topoisomerasas son las enzimas que catalizan la interconversión de los diferentes isómeros topológicos del DNA. Las reacciones que catalizan, incluyen la formación de estructuras anudadas en DNA circular de cadena sencilla, y la formación y resolución de estructuras anudadas y de moléculas engarzadas en DNA circular de doble cadena, covalentemente cerrado. De estas reacciones, la resolución de moléculas engarzadas puede tener importancia biológica, pues, como es sabido, tales estructuras se generan en algunos procesos de replicación y de recombinación genética, siendo necesaria la separación de las moléculas de DNA para que segreguen.

Las DNA Topoisomerasas intervienen en procesos biológicos tan esenciales como la replicación, la transcripción y la recombinación de moléculas de DNA, a través del control que ejercen sobre el grado de superenrollamiento del sustrato de DNA. Se clasifican atendiendo a su mecanismo enzimático en: Tipo I y Tipo II.

Las primeras son aquellas Topoisomerasas que producen un corte transitorio en una sola cadena del sustrato de DNA, a través del cual pasa un segmento de cadena sencilla antes de cerrarse el ciclo de topoisomerización con el resellado del corte generado.

Las Topoisomerasas Tipo II producen un corte transitorio en las dos cadenas complementarias del sustrato de DNA, a través del cual pasa un segmento de DNA de doble cadena durante el ciclo de topoisomerización del sustrato.

Una consecuencia directa del mecanismo de reacción seguido por las topoisomerasas tipo I y tipo II es que las primeras modifican el valor del número topológico α en una unidad entera por cada ciclo de topoisomerización, mientras que las segundas lo hacen con cambios de dos unidades. El número α , denominado también L (del inglés "Linking number"), representa el número de veces que las dos cadenas de la doble hélice de DNA se entrecruzan una con respecto a la otra en una molécula de DNA circular, covalentemente cerrada. El valor del número α es constante para cada topoisómero de una molécula de DNA circular, covalentemente cerrada. (Gellert, 1981; Wang, 1985; Maxwell y Gellert, 1986)

1.2.1. DNA Topoisomerasas caracterizadas en *E.coli*.

Las DNA Topoisomerasas identificadas en *E.coli* son las siguientes: DNA Topoisomerasa I (proteína ω), DNA Topoisomerasa III y DNA girasa, también denominada DNA Topoisomerasa II. Recientemente, se ha propuesto la existencia de una cuarta topoisomerasa en *E.coli*, a la que se ha denominado Topoisomerasa IV.

Las dos primeras son enzimas pertenecientes al Tipo I que relajan DNA superenrollado de doble cadena a través de un proceso que es independiente de la hidrólisis de ATP (Wang, 1971; Dean *et al.*, 1983). La DNA girasa, perteneciente al Tipo II, es la única topoisomerasa conocida que introduce vueltas superhelicoidales negativas en DNA de doble cadena, covalentemente cerrado y relajado, por un proceso que es dependiente de la hidrólisis de ATP. En ausencia de ATP, esta enzima relaja *in vitro* DNA superenrollado mediante un mecanismo análogo que implica la ruptura transitoria de las dos cadenas de

DNA (Gellert *et al.*, 1976(a)). La hipotética Topoisomerasa IV es una actividad relajadora de DNA superenrollado, que se manifiesta al combinar los productos de los genes *parC* y *parE* (min 65) de los que hablaremos más adelante (Kato *et al.*, 1990).

D) DNA Topoisomerasas tipo I.

Las Topoisomerasas I y III están codificadas por los genes *topA* (min 28) y *topB* (min 38.7), respectivamente. De la secuencia nucleotídica de estos genes se ha deducido que ambas enzimas, constituidas por una cadena polipeptídica de 97.4 kDa y de 73.2 kDa, respectivamente, presentan una alta homología en su secuencia de aminoácidos, principalmente en la zona central de ambas proteínas (Tse-Dinh y Wang, 1986; DiGate y Mariani, 1989).

El mecanismo de la reacción catalizada por la topoisomerasa I implica la ruptura de una de las cadenas del sustrato de DNA y la formación de un complejo covalente entre la proteína y el DNA, en donde un residuo de tirosina de la enzima está unido por un enlace éster al grupo 5'-fosfato de la cadena abierta de DNA.

El análisis genético de mutantes afectados en el gen *topA*, ha revelado aspectos importantes relativos al control que ejerce la actividad DNA topoisomerasa I sobre el grado de superenrollamiento del DNA en el interior de la célula. Los mutantes *topA* estudiados son de dos tipos. Mutantes puntuales que presentan una reducción parcial de la actividad DNA topoisomerasa I y que se caracterizan por tener incrementado el nivel de superenrollamiento intracelular, y mutantes que carecen por completo de dicha actividad, ya sea por la delección del gen, ya sea por la inserción de un transposón que lo inactiva.

Estos mutantes TopI^- son viables porque adquieren rápidamente mutaciones que compensan la ausencia de dicha actividad topoisomerasa I, reajustando así el grado de superenrollamiento del DNA a los niveles adecuados para la viabilidad celular. Estas mutaciones compensatorias que constituyen una respuesta adaptativa de la célula a la ausencia de la actividad DNA topoisomerasa I, afectan frecuentemente a los genes *gyrA* y *gyrB* que codifican a las dos subunidades de la DNA girasa y de los que hablaremos posteriormente, y a otro locus denominado *toe* (min 66), próximo a *tolC* (DiNardo *et al.*, 1982; Pruss *et al.*, 1982; Raji *et al.*, 1985). Las mutaciones compensatorias localizadas en *gyrA* y *gyrB* provocan una disminución de la actividad DNA girasa responsable del superenrollamiento negativo del DNA, sin embargo las mutaciones en *toe*, son consecuencia de una amplificación génica de la región cromosómica comprendida entre los minutos 65 y 66. Inicialmente, se postuló que el fenotipo asociado a las mutaciones *toe* era debido a la amplificación del locus altamente pleiotrópico *tolC* (min 66) (Dorman *et al.*, 1989). Recientemente, se ha demostrado que las mutaciones compensatorias *toe* son debidas en realidad a la amplificación de los genes *parC* y *parE* (min 65), cuyos productos constituirían la denominada topoisomerasa IV (Kato *et al.*, 1990).

II) DNA Topoisomerasas tipo II.

La DNA girasa está formada por dos subunidades, A y B de 97 kDa y 90 kDa respectivamente, que se integran en una holoenzima de estequiometría A_2B_2 . Ambas subunidades son necesarias para la reconstitución *in vitro* de las reacciones de ruptura y religación del sustrato de DNA y de hidrólisis de ATP que constituyen cada ciclo de

topoisomerización catalizado por la DNA girasa (Higgins *et al.*, 1978; Mizuchi *et al.*, 1978).

El aislamiento y caracterización genética de mutantes resistentes a quinolonas (ácido oxolínico, ácido nalidíxico y compuestos relacionados) y a cumarinas (novobiocina y coumermicina A₁), dos familias de inhibidores potentes de la replicación del DNA, ha permitido la identificación de los genes *gyrA* (mín 48) y *gyrB* (mín 83). Estos genes codifican respectivamente las subunidades A y B de la DNA girasa.

Inicialmente, se obtuvieron mutantes resistentes a quinolonas (ácido nalidíxico) en el gen *gyrA* y más recientemente se han obtenido también en *gyrB* (Gellert *et al.*, 1977; Yamagishi *et al.*, 1986). Las mutaciones Nx¹ en *gyrA* se localizan en el extremo amino terminal de la proteína, próximas al residuo Tyr₂₂₂ que interviene en la formación de un enlace covalente con el sustrato de DNA durante la reacción de topoisomerización (Yoshida *et al.*, 1988). Las mutaciones *gyrB*(Nx²) están situadas en la región central de la proteína GyrB. Se ha postulado que esta región de la subunidad B es la que interacciona con GyrA en la holoenzima A₂B₂ (Yamagishi *et al.*, 1986).

Las mutaciones de resistencia a cumarinas han sido identificadas únicamente en el gen *gyrB* (Gellert *et al.*, 1976(b); Ryan, 1976; Orr *et al.*, 1979). La naturaleza molecular de estas mutaciones no ha sido descrita hasta ahora.

A partir de estudios bioquímicos de reconstitución *in vitro* de la actividad DNA girasa se han caracterizado diferentes etapas del mecanismo de la reacción de topoisomerización. La DNA girasa forma inicialmente un complejo no covalente con el sustrato de DNA. En este complejo, la enzima protege segmentos de 120 - 150 pb de la degradación por nucleasas (Liu y Wang, 1978; Fisher *et al.*, 1981).

El tratamiento del complejo no covalente DNA girasa-DNA con ácido oxálfónico, seguido de la adición de un agente desnaturante de proteínas (SDS o álcali), congela la ruptura de la doble cadena de DNA, catalizada por DNA girasa, lo que permite detectar un complejo covalente girasa-DNA, intermediario de la reacción de topoisomerización (Gellert *et al.*, 1977; Sugino *et al.*, 1977). En este complejo covalente cada subunidad A de la holoenzima está unida al DNA por un enlace O'-fosfotirosina formado entre el residuo Tyr₁₂₂ de la proteína y el grupo 5'-P del DNA (Tse *et al.*, 1980; Horowitz y Wang, 1987). Como consecuencia de estos resultados, se ha postulado la formación de un complejo de reacción girasa-DNA, denominado complejo "cleavable" o susceptible de ruptura, que se estabilizaría por la acción de la quinolona y sería atrapado por el agente desnaturante (Kreuzer y Alberts, 1984). En el complejo "cleavable", la DNA girasa estaría unida covalentemente, a través de la subunidad A, al grupo 5'-P generado en la ruptura del DNA y mantendría atrapado, por una interacción no covalente, el extremo 3'-OH del DNA.

La ruptura del DNA mediada por DNA girasa se produce en sitios específicos de corte. Entre éstos hay sitios preferentes en los cuales la ruptura se da con una frecuencia mayor (Sugino *et al.*, 1978). Estos sitios preferentes, localizados dentro del segmento de 120 - 150 pb protegido por la enzima, generan un patrón definido de corte. La presencia de ATP modifica tanto el patrón como la frecuencia de corte de los sitios preferentes (Sugino *et al.*, 1978).

El superenrollamiento negativo del DNA es un proceso endergónico, desfavorecido termodinámicamente. La energía necesaria para este proceso se obtiene de la hidrólisis acoplada de una molécula de ATP a ADP y P_i. La DNA girasa contiene una actividad ATPasa intrínseca que está asociada a la subunidad B del holoenzima (Mizuuchi *et al.*,

1978; Sugino *et al.*, 1978). Esta subunidad puede hidrolizar ATP por si sola, aunque la presencia simultánea de la subunidad A y de DNA relajado de doble cadena estimula considerablemente dicha reacción de hidrólisis (Sugino y Cozzarelli, 1980; Staudenbauer y Orr, 1981; Maxwell y Gellert, 1984).

Estudios realizados con el análogo de ATP no hidrolizable, β,γ -imido ATP, indican que la DNA girasa puede catalizar cierto grado de superenrollamiento negativo en el DNA, sin la hidrólisis concomitante de un enlace rico en energía (Sugino *et al.*, 1978). Se ha postulado que el ATP y su análogo β,γ -imido ATP son efectores alostéricos de un cambio conformacional de la girasa que constituye el inicio de un ciclo de topoisomerización. La disociación del nucleótido, favorecida por la hidrólisis del ATP, restituiría la conformación inicial de la DNA girasa, necesaria para que la holoenzima pueda iniciar un nuevo ciclo de topoisomerización (Sugino *et al.*, 1978).

Llegados a este punto es preciso hacer un inciso para referirnos a la ya mencionada topoisomerasa IV. La existencia de esta nueva topoisomerasa se ha postulado en base a la siguiente observación. La combinación de extractos crudos de células sobreproductoras de los polipéptidos ParC y ParE, codificados por los genes *parC* y *parE* (min 65) esenciales para la partición del cromosoma de *E.coli*, provoca la relajación de DNA superenrollado (Kato *et al.*, 1990). Por otro lado, la secuenciación de los genes *parC* y *parE* ha revelado las siguientes características de los polipéptidos sintetizados. La proteína ParC de 730 aminoácidos (75 kDa) tiene homología con la subunidad GyrA de *E.coli* y de *Bacillus subtilis*. En concreto, la mitad amino-terminal de estos polipéptidos presenta una alta homología, siendo más remarcada en las proximidades del residuo Tyr₁₂₅. La proteína ParE (70 kDa), constituida por 601 aminoácidos, presenta una alta homología en su secuencia con las subunidades GyrB de *E.coli* y de *B.subtilis* (Kato *et al.*, 1990). Por todo ello, las

proteínas ParC y ParE constituirían las subunidades de una nueva topoisomerasa, denominada topoisomerasa IV, capaz de relajar un sustrato de DNA superenrollado.

III) Inhibidores de DNA girasa

Las quinolonas y cumarinas son dos familias de antibióticos que inhiben la replicación del DNA en *E.coli*, mediante el bloqueo de la actividad DNA girasa.

Compuestos tales como el ácido oxolinico y el ácido nalidíxico actúan atrapando el complejo de reacción girasa-DNA "cleavable", que se forma como intermediario de la reacción de topoisomerización (Gellert *et al.*, 1977; Sugino *et al.*, 1977). *In vitro*, las quinolonas se unen a DNA, preferentemente a moléculas de cadena sencilla (Shen y Pernet, 1985). No obstante, la presencia de la DNA girasa estimula la unión del antibiótico a DNA de doble cadena. Se ha postulado que la quinolona se fija, según una cinética de tipo cooperativo, a sitios específicos que se generan con la formación del complejo girasa-DNA (Shen *et al.*, 1989(a) y 1989(b)). La saturación de estos sitios específicos está estrechamente correlacionada con la inhibición del superenrollamiento del sustrato y con la inducción de la ruptura de la doble cadena de DNA (Shen *et al.*, 1989(a)). En base a estas observaciones se ha propuesto un modelo para la interacción de estos antibióticos con el complejo DNA girasa-DNA, según el cual la ruptura del sustrato de DNA de doble cadena, mediada por DNA girasa, generaría el sitio de unión de la quinolona. El antibiótico se uniría al segmento de cadena sencilla expuesto en el sitio activo de la enzima (Shen *et al.*, 1989(c)).

Las cumarinas (novobiocina y coumermicina A₁) son una familia de antibióticos que inhiben la actividad ATPasa de la DNA girasa. Su modo de acción consiste en la inhibición

competitiva de la unión del ATP a la subunidad B (Sugino *et al.*, 1978; Staudenbauer y Orr, 1981).

IV) Estudio de la proteína GyrB: relación estructura-función

La subunidad B de la DNA girasa es una proteína de 804 aminoácidos (90 kDa) que posee una actividad ATPasa (Adachi *et al.*, 1987; Mizuuchi *et al.*, 1978; Sugino y Cozzarelli, 1980). La caracterización bioquímica de esta proteína, junto con la caracterización molecular de diferentes mutaciones localizadas en el gen *gyrB*, ha permitido identificar ciertas regiones de la proteína que están implicadas muy probablemente en alguna de las actividades enzimáticas asociadas a la DNA girasa. Se han postulado dos posibles dominios funcionales en GyrB (Gellert *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1979). Uno de ellos se localizaría en la mitad carboxilo-terminal de la proteína e intervendría en la unión con la subunidad A (Adachi *et al.*, 1987). Los resultados experimentales que sugieren la existencia de este dominio, proceden de la caracterización bioquímica de un péptido de 50 kDa derivado de la proteína GyrB (péptido v) que asociado a la proteína GyrA reconstituye una actividad relajadora de DNA, denominada DNA Topoisomerasa II'. La actividad Topoisomerasa II' se caracteriza porque es inhibida específicamente por quinolonas y porque carece de actividad ATPasa. La secuencia del extremo amino-terminal del péptido v coincide con la secuencia de la proteína GyrB a partir del aminoácido de la posición 394 hacia su extremo carboxilo; es decir, el péptido v estaría constituido aparentemente por los 410 aminoácidos de la mitad carboxilo-terminal de la proteína GyrB (Adachi *et al.*, 1987). Además, la secuenciación de las mutaciones de resistencia a quinolonas caracterizadas en

gyrB ha revelado que éstas están situadas dentro de la parte de GyrB que corresponde al péptido v (Yamagishi *et al.*, 1986). Dadas las características fenotípicas de estas mutaciones y su localización dentro de GyrB, se ha propuesto que afectan al dominio de unión con la proteína GyrA.

El otro dominio funcional de GyrB, constituiría el sitio de unión a ATP y estaría localizado en la mitad amino terminal de la proteína, dentro de los 394 primeros aminoácidos (Adachi *et al.*, 1987). La localización hipotética de este dominio ATP se ha establecido al considerar, primero, las características de la actividad DNA Topoisomerasa II' que, estando constituida por el péptido v, carece de actividad ATPasa; y, segundo, en base a la homología en la secuencia de aminoácidos de la región amino-terminal de diferentes subunidades GyrB de procariotas y de DNA topoisomerasas II de eucariotas, se ha propuesto que esta región forma parte de un dominio estructural y/o funcional común a estas enzimas (Wyckoff *et al.*, 1989).

Recientemente se ha secuenciado una nueva mutación en *gyrB* que fue aislada en un contexto genético TopI'. Esta mutación que compensa la falta de actividad topoisomerasa I de la estirpe portadora, provocando una disminución de 10 veces de la actividad DNA girasa, consiste en la inserción de una secuencia de seis nucleótidos en la posición 1146 del gen, justo en un punto en donde aparece repetida dos veces la misma secuencia oligonucleotídica en una orientación directa. Este hecho se traduce en la inserción del dipéptido Ala - Arg en la posición 382 de la proteína GyrB (McEachern y Fisher, 1989). La proteína mutante posee esa secuencia repetida tres veces de forma consecutiva, en la región que muy probablemente conecta los dos dominios funcionales propuestos en GyrB. Esta mutación compensatoria podría provocar una distorsión de la disposición relativa de

dichos dominios en el espacio, lo que se traduciría en una alteración de la actividad DNA girasa (McEachern y Fisher, 1989).

C) OBJETIVOS DEL TRABAJO REALIZADO.

El modo de acción de la microcina B17 consiste en la inhibición de la replicación del DNA en *E.coli*. Basándonos en este resultado, postulamos que este antibiótico bloquearía alguna de las proteínas implicadas en la replicación de DNA. Con el fin de definir el blanco intracelular de la microcina B17, iniciamos el trabajo que aquí se presenta. El objetivo inicial del mismo fue el aislamiento y la caracterización de mutantes afectados en la diana intracelular de la microcina B17. Mutantes de esta clase se obtuvieron por dos procedimientos independientes que serán descritos en detalle. La caracterización genética y molecular de las mutaciones aisladas constituye la parte fundamental del trabajo realizado.

Nuestros resultados, junto con los estudios desarrollados *in vitro* por la Dra. C. Hernández-Chico en nuestro laboratorio, demuestran que el blanco de la microcina B17 es la DNA girasa. El conjunto de los resultados será discutido en este texto.

Por otra parte, durante estos estudios hemos descubierto un nuevo mecanismo de resistencia a cumarinas. Este mecanismo determinado por la superproducción de la subunidad GyrB de la DNA girasa consiste aparentemente en la titulación del antibiótico. Los datos experimentales que sustentan esta tesis serán también presentados en este texto.

2. MATERIALES

Tabla 1. Estirpes bacterianas, bacteriófagos y plásmidos.

ESTIRPES	GENOTIPOS	REFERENCIAS
MC4100	F ⁻ <i>araD139 ΔlacU169 rpsL relA thiA</i>	M. Casadaban.
pop3001.6	MC4100 <i>malT::Muets</i>	M. Schwartz.
pop3351	MC4100 <i>ΔmalB1</i>	Colección Lab.
RYC1000	F ⁻ <i>araD139 ΔlacU169 rpsL relA thiA Δrbs7 recA56 gyrA</i>	J. Beckwith.
RYC1010	RYC1000 (<i>λp recA clind</i>)	Este trabajo.
RYC1020	RYC1010 <i>gyrB320</i> (Cou ^h)	Este trabajo.
RYC1020.1	RYC1020 <i>zid::Tn10</i>	Este trabajo.
RYC1030	RYC1010 <i>zid::Tn10 gyrB320</i> (Cou ^h) <i>sbmB1</i>	Este trabajo.
D3	RYC1000 <i>sbmB1</i>	Este trabajo.
D4	RYC1000 <i>sbmB2</i>	Este trabajo.
D31	D3 (<i>λp recA clind</i>)	Este trabajo.
D41	D4 (<i>λp recA clind</i>)	Este trabajo.
VM11	D31 <i>zid::Tn10</i>	Este Trabajo.
VM41	D41 <i>zid::Tn10</i>	Este Trabajo.
VM215	RYC1010 <i>rbs' zid::Tn10</i>	Este trabajo.
TP2100	F ⁻ <i>ilv argH1 ΔlacK174 xyl</i>	Colección Lab.
CI1	RYC1010 <i>dnaA46 rbs'</i>	Este trabajo.
CI6	RYC1010 <i>dnaA46 zid::Tn10</i>	Este trabajo.
V5702	W3110 <i>thy recF143</i>	Armengod.
V5702.1	V5702 <i>zid::Tn10</i>	Este Trabajo.
LE234	F ⁻ <i>metB argE ilv tna supE ΔlacU169 rpsL relA</i>	E. Orr.
LE316	LE234 <i>gyrB(ts)</i>	E. Orr.
AB1157	F ⁻ <i>thr leu proA his4 argE thiA lacY gal rpsL xyl</i>	Colección Lab.

AB1157-1	AB1157 <i>met thyA ara14 ml1 pol45 Tn10</i>	Colección Lab.
BM21	F' <i>grrA</i> (Δ:)	Colección Lab.
RYC816	BM21 <i>recA56 srl::Tn10</i>	Colección Lab.
RYC893	pop3351(pMM102)	San Millán.
71.18	Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>supE thiA</i> (F' <i>proAB lacI^r lacZ</i> ΔM15)	Colección Lab.

FAGOS

λVb434	Utiliza OmpC como receptor	Colección Lab.
Tu1a	Utiliza OmpF como receptor	Colección Lab.
λ467	c1857 <i>rex::Tn5 Oam29 Pam80 b221</i>	Berg.
λ370	c1857 c1178::Tn10 <i>O_{ompA}261 b221</i>	Colección Lab.
λp(<i>recA clind</i>)		Colección Lab.
λ(c1b80 Δ <i>int9</i>)		Colección Lab.
M13mp18		Colección Lab.
M13mp19		Colección Lab.
M13gt130		Colección Lab.

PLASMIDOS

pBR322	<i>bla tet</i> (replicón ColE1)	Bolívar.
pMM102	pBR322 <i>bla mchABCDEF</i>	San Millán.
pMM73-4	pBR322 <i>tet sbm4</i>	M. Laviña.
pMK47	pKC16 <i>grrB</i>	Mizuuchi.
pEG109	Mud114042: <i>phaA proC</i>	Groisman.
pLG339	pSC101 <i>tet kan</i>	

2.1. ESTIRPES BACTERIANAS, PLASMIDOS Y BACTERIOFAGOS.

En la Tabla 1 se indican las estirpes bacterianas, bacteriófagos y plásmidos utilizados (Bachmann, 1990).

2.2. MEDIOS DE CULTIVO.

2.2.1. Medio Completo LB.

Contiene por litro de solución:

- bacto triptona	10 g
- extracto de levadura	5 g
- NaCl	5 g

El medio sólido se prepara añadiendo 15 g de agar por litro de medio de cultivo. El medio líquido se utilizó para la obtención de cultivos bacterianos y el sólido para la obtención de estrias y colonias bacterianas.

2.2.2. Medio Mínimo M63.

Contiene por litro de solución:

- KH_2PO_4	4,5 g
- K_2HPO_4	9 g

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g

Tras esterilizar el medio en autoclave se añaden 1 ml de MgSO_4 1 M, 1 ml de vitamina B1 (1 mg/ml) y 10 ml de solución al 20% del azúcar (20% p/v) que se utiliza como fuente de carbono.

El medio sólido se obtiene añadiendo 15 g de agar por litro. El medio líquido se utilizó para la obtención de cultivos bacterianos y el sólido para la obtención de estrias y colonias bacterianas.

2.2.3. Medio 2xTY.

Contiene por litro de solución:

- bacto triptona	16 g
- extracto de levadura	10 g
- NaCl	5 g

El medio sólido se prepara añadiendo 15 g de agar por litro de medio. Se utilizó para la obtención de cultivos celulares destinados a la propagación del fago M13.

2.2.4. Medio P75 o H.

Contiene por litro de solución:

- bacto triptona	10 g
- NaCl	8 g

- agar	12 g
--------	------

Este medio es utilizado para la propagación del fago λ y M13.

2.2.5. Medio P1.

Contiene por litro de solución:

- bacto triptona	10 g
- extracto de levadura	5 g
- NaCl	5 g
- agar	12 g

Después de esterilizar esta solución en autoclave, cada litro de medio se suplementa con 10 ml CaCl_2 0,5 M y 5 ml glucosa al 20%. Este medio es utilizado para la propagación del fago P1vir.

2.2.6. Agar Blando.

El agar blando mínimo contiene 6 g de agar por litro de agua destilada. El agar blando LB contiene 6 g de agar por litro de medio líquido LB. Se utilizó para la inoculación de cespedes bacterianos y fágicos en placa de Petri.

2.3. ANTIBIOTICOS.

- **Acido Nalidixico (Nx)**: se preparó en una disolución 0,05 M NaOH a una concentración de 8 mg/ml y se utilizó a una concentración final de 40 µg/ml.

- **Ampicilina (Ap)**: se preparó en agua a una concentración de 4 mg/ml y se utilizó a una concentración final de 20 µg/ml.

- **Cloranfenicol (Cm)**: se preparó en etanol a una concentración de 6 mg/ml y se utilizó a una concentración final de 30 µg/ml.

- **Coumermicina A₁ (Cou)**: se preparó en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 3,2 mg/ml y se utilizó a una concentración final de 16 µg/ml.

- **Kanamicina (Km)**: se preparó en agua a una concentración de 6 mg/ml y se utilizó a una concentración final de 30 µg/ml.

- **Novobiocina (Nov)**: se preparó en agua a una concentración de 40 mg/ml.

- **Tetraciclina (Tc)**: se preparó en una mezcla etanol:agua (1:1) a una concentración de 4 mg/ml y se utilizó a una concentración final de 20 µg/ml.

2.4. SOLUCIONES Y TAMPONES.

2.4.1. Solución Salina.

Contiene 8,5 g de NaCl por litro de agua. Se utilizó estéril para diluir suspensiones bacterianas.

2.4.2. Soluciones y tampones para la purificación de DNA.

I. Tampón TE:

- TrisHCl 10 mM, pH= 8
- Na₂ EDTA 1 mM, pH= 8

II. Solución GTE:

- Glucosa 50 mM
- TrisHCl 25 mM, pH= 8
- Na₂ EDTA 10 mM, pH= 8

III. Solución NaOH / SDS:

- NaOH 0.2 N
- SDS 1%

IV. Solución de acetato sódico 3 M, pH= 4,8:

Se preparó ajustando el pH de una disolución de acetato sódico a 4,8 con ácido acético glacial. Las concentraciones finales de los iones Na^+ y CH_3COO^- son 3 M y 5 M respectivamente.

V. Solución de acetato amónico 7,5 M:

Contiene 578,1 g de acetato amónico por litro de disolución.

VI. Solución de ribonucleasa A:

Se preparó a 2 mg/ml en agua destilada y se hirvió 2 min. Se conservó a -20°C .

VII. Solución TES:

- Tris ClH 10 mM, pH= 8
- Na_2 EDTA 100 mM, pH= 8
- NaCl 100 mM

VIII. Solución SSC:

- NaCl 15 mM
- citrato sódico 1,5 mM, pH= 7

IX. Solución de pronasa:

La pronasa se preparó a una concentración de 5 mg/ml en tampón SSC y se preincubó durante una hora a 37°C antes de su utilización.

X. Solución Holmes - Bonner:

- cloroformo 50 %
- fenol 50 %
- alcohol isoamílico 1 %
- (Saturado con Tris ClH 10 mM, pH= 8)
- hidroxiquinoleína 0.1 %

2.4.3. Tampones de digestión del DNA con nucleasas de restricción.

Tampón	NaCl	Tris HCl pH= 7,8	MgCl ₂	DTT
Bajo	-	10 mM	10 mM	1 mM
Medio	50 mM	10 mM	10 mM	1 mM
Alto	100 mM	50 mM	10 mM	1 mM

Estos tampones se prepararon concentrados diez veces.

Se emplearon los tampones especificos recomendados por las casas comerciales para los enzimas:

***Sma*I:**

- KCl 20 mM
- Tris HCl 6 mM, pH= 8
- MgCl₂ 6 mM
- β-mercaptoetanol 6 mM
- Albúmina de Suero Bovino (BSA) 100 ug/ml

***Sph*I:**

- NaCl 150 mM
- Tris HCl 6 mM, pH= 7,4
- MgCl₂ 6 mM
- β-mercaptoetanol 10 mM
- Albúmina de Suero Bovino (BSA) 100 ug/ml

2.4.4. Tampón de ligación del DNA.

El tampón se prepara concentrado diez veces.

- Tris HCl 50 mM, pH= 7,4
- MgCl₂ 10 mM

- ATP 1 mM
- Albúmina de Suero Bovino (BSA) 100 ug/ml

2.4.5. Tampones y Soluciones para la electroforesis del DNA.

I. Solución de depósito del DNA:

- Na₂ EDTA 80 mM, pH= 8
- Azul de bromofenol 0,1 %
- Glicerol 20 %

Si la solución de DNA contiene RNA, este último se elimina añadiendo a la solución de depósito 1/4 de su volumen de solución de ribonucleasa A. La solución de depósito se agrega a las muestras de DNA en la proporción de 1 volumen de ésta por 2 volúmenes de DNA.

II. Tampón de electroforesis Tris - Borato (TBE):

Este tampón se emplea en geles horizontales de agarosa y verticales de acrilamida.

Contiene por litro de solución:

- | | |
|--|--------|
| - Tris-base | 10,8 g |
| - Acido Bórico | 5,5 g |
| - Na ₂ EDTA 2H ₂ O | 0.9 g |

III. Solución de acrilamida al 7 % / Urea 8 M:

Esta solución contiene por litro, 180 ml de una solución de acrilamida al 40% (acrilamida:bisacrilamida en relación 38:2) y 420 g de urea. Una vez disuelta la urea, la solución se desioniza con amberlita, se filtra y tras añadir 100 ml de tampón TBE concentrado 10 veces se enrasa a un litro. La solución se conserva a 4°C en oscuridad.

2.4.6. Soluciones para la extracción del DNA de geles de agarosa con membranas de DEAE - celulosa.

I. Preparación de las membranas de DEAE - celulosa.

Las membranas se cortan en tiras de 1 cm de ancho y se lavan durante 10 minutos en EDTA 10mM, pH 7,6. A continuación se tratan durante 5 minutos con una solución de NaOH 0,5M. Por último, se aclaran varias veces en agua estéril y se almacenan a 4°C.

II. Solución Arg / NaCl:

- Arginina 50 mM
- NaCl 1 M

Esta solución se emplea para extraer el DNA de la membrana de DEAE-celulosa.

2.4.7. Soluciones para la extracción del DNA de geles de acrilamida

I. Solución de EDTA / acetato amónico:

- Na₂ EDTA 1 mM, pH= 8
- acetato amónico 0.5 M

Esta solución se emplea para extraer el DNA del gel de acrilamida.

2.4.8. Soluciones y Tampones para la electroforesis de proteínas en geles de acrilamida.

I. Solución de lisis y depósito de proteínas.

Se prepara mezclando en un volumen final de 10 ml.

- 1,25 ml de TrisHcl 0,5 M pH= 6,8
- 2 ml de SDS al 10 %
- 2 ml glicerol al 50 %
- 0,5 ml de β-mercaptoetanol
- 0,01 g de azul de bromofenol

II. Tampón Tris / Glicina / SDS:

- Tris-base	3 g
- Glicina	14,4 g
- SDS	1 g

3. METODOS

3.1. METODOS RELACIONADOS CON LOS ANTIBIOTICOS MICROCINA B17 Y COUMERMICINA A₁.

3.1.1. Ensayo de producción de MccB17.

Los clones cuya producción de MccB17 se deseaba probar, se inocularon por picada sobre un césped de la estirpe sensible RYC1000. Tras su incubación a 37°C durante 24 h., los clones productores de MccB17 formaron un halo de inhibición del crecimiento de la estirpe sensible. El diámetro del halo es un indicativo de la cantidad de microcina producida.

3.1.2. Obtención de extractos crudos de microcina B17.

Los extractos crudos de microcina B17 se obtuvieron sembrando una estirpe productora del antibiótico (RYC893) en placas de M63 glicerol cubiertas con celofán, según el método descrito por Herrero y Moreno, (1986). Las placas, después de incubadas a 37°C durante 30 - 40 horas, se congelaron a -20°C. Tras su descongelación, el agar se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 min. El sobrenadante filtrado constituyó el extracto crudo de MccB17 que se conservó a -20°C y se valoró su actividad por el método de la dilución crítica (Mayr-Harting *et al.*, 1972).

3.1.3. Pruebas de sensibilidad a la microcina B17.

I) Método del "Cross Streaking".

Este método consiste básicamente en generar un gradiente de concentración de MccB17, sembrando una banda de estirpe productora del antibiótico (RYC893) en placa de Petri. Los clones cuya sensibilidad al antibiótico se quería probar, se estriaron perpendicularmente a dicha banda y se incubaron a 37°C durante la noche. Sólo los clones resistentes a MccB17 crecen en la proximidad de la bacteria productora.

II) Método de la Dilución Crítica.

Este método, descrito por Mayr-Harting *et al.* (1972), permite una cuantificación más precisa de la sensibilidad de una estirpe. Alícuotas de 10 µl de diluciones crecientes y sucesivas (1, 1/2, 1/4,...) de un extracto crudo de MccB17 se depositaron sobre un césped de la estirpe a analizar. Las placas muestran halos de antibiosis en el césped bacteriano, tras ser incubadas a 37°C durante la noche. Se considera a la máxima dilución de MccB17 que produce un halo claro, una medida de la sensibilidad de la estirpe analizada.

Para valorar la actividad de extractos crudos de MccB17 hemos considerado como unidad de actividad antibiótica (UA) a la cantidad de MccB17 presente en 10 µl de la máxima dilución que produce un halo claro de antibiosis sobre la estirpe BM21. Las preparaciones obtenidas de MccB17 tenían una actividad entre 650 y 1.200 UA/ml.

III) Medida de la Actividad Bactericida.

El efecto bactericida de los extractos crudos de MccB17 sobre estirpes sensibles y resistentes se determinó de la siguiente manera. Cultivos de las estirpes, crecidos durante la noche en LB, se diluyeron 100 veces en 20 ml de medio líquido M63. Se cultivaron a 37°C hasta alcanzar la fase estacionaria ($DO_{600} = 2$). Las células, recogidas por centrifugación a 6.000 rpm durante 10 min., se resuspendieron en 4 ml de medio líquido M63. Alícuotas de 50 μ l de cada suspensión celular se trataron con diferentes dosis de MccB17. Las células tratadas se incubaron a 37°C durante 1 hora y se determinó el número de células viables (N_t). Este número se comparó con el título de las células no tratadas con MccB17 (N_0). La pérdida de la viabilidad se representó gráficamente como el logaritmo de la fracción de supervivientes (N_t/N_0) en función de la dosis de MccB17.

3.1.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de coumermicina A₁ y novobiocina.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de coumermicina A₁ y novobiocina de diferentes estirpes de *E. coli* se determinó en placas multipocillo que contenían medio mínimo M63 y diluciones consecutivas (1, 1/2, 1/4,...) del correspondiente antibiótico. Los cultivos, crecidos durante la noche en medio mínimo, se diluyeron en el mismo medio y se añadieron 2 10^6 bacterias/ml en cada pocillo. Las MICs fueron determinadas tras la incubación de las placas a 37°C durante 24 h.

3.2. SELECCION DE MUTANTES ESPONTANEOS.

3.2.1. Método de obtencion de mutantes resistentes a MccB17.

Doce cultivos independientes de la estirpe RYC1000 crecidos en medio LB hasta fase estacionaria ($DO_{600} = 2$), se trataron con un extracto crudo de MccB17 (270 UA/ml) durante 40 min a 37°C. Alícuotas de 0.2 ml de cada cultivo se extendieron sobre placas de LB suplementadas con MccB17 (40 UA/ml). Al cabo de 24 horas de incubación a 37°C, crecieron colonias con una frecuencia de $6 \cdot 10^{-4}$ del número de células sembradas. Estas colonias se recogieron en masa, lavando cada placa con 1 ml de solución salina. Con cada una de las suspensiones celulares así obtenidas, se prepararon subcultivos que se llevaron a competencia para ser transformados con el plásmido pMM102. Los transformantes Ap^R se seleccionaron en placas de M63 suplementadas con Ap (20 mg/ml), y se probaron posteriormente para la producción de MccB17 y la sensibilidad a luz ultravioleta.

3.2.2. Método de obtencion de mutantes resistentes a coumermicina A₁.

Se han obtenido mutantes espontáneos resistentes a coumermicina A₁ con una frecuencia aproximada de 10^{-7} , plaqueando la estirpe sensible *E.coli* K12 RYC1010 en medio mínimo M63 suplementado con concentraciones crecientes de coumermicina A₁ (8, 16 y 24 µg/ml). Tras incubar las placas a 30°C durante 3 – 4 días, crecieron colonias resistentes que fueron purificadas en el mismo medio de selección. Los mutantes Cou^R así obtenidos crecen perfectamente a cualquier temperatura en medio mínimo glucosa suplementado con 16

$\mu\text{g/ml}$ coumermicina A₁, concentración que inhibe completamente el crecimiento de la estirpe isogénica silvestre.

3.3. METODOS RELACIONADOS CON LA MANIPULACION DE BACTERIOFAGOS.

3.3.1. Pruebas de sensibilidad a bacteriófagos.

Las estirpes cuya sensibilidad se quería probar, se estriaron perpendicularmente a una banda del fago correspondiente, depositada sobre la superficie de una placa de Petri y obtenida a partir de un lisado de 10^7 ufp/ml. Después de incubar las placas durante la noche los clones sensibles no crecen en la franja donde ha sido inoculado el fago, mientras que los resistentes lo hacen normalmente.

3.3.2. Técnicas de manipulación de fago transductor P1vir.

Para la obtención de lisados del bacteriófago P1vir y la realización de transducciones via P1 se siguió el procedimiento descrito previamente por Miller, (1972).

3.4. MUTAGENESIS CON TRANSPOSONES.

3.4.1. Mutagénesis con el transposón Tn5.

Se obtuvieron inserciones del transposón Tn5 en el plásmido pCID500 empleando el fago λ 467 según el método descrito por Berg, (1977).

Un cultivo de la estirpe RYC1000 (pCID500) (DO_{600} = 1,5) se infectó con una suspensión del fago ($6 \cdot 10^9$ ufp/ml) a una multiplicidad de infección de 10:1. Tras la adsorción del fago durante 20 min a 30°C, la mezcla se diluyó 10 veces en LB y se dividió en alícuotas que se incubaron con agitación a 30°C durante 2 horas. De los transductantes Km^R , seleccionados en LB suplementado con kanamicina, se preparó DNA plasmídico con el que se transformó la estirpe RYC1000. Por último, se seleccionaron los transformantes $Ap^R Km^R$.

3.4.2. Mutagénesis con el transposón Tn10.

Se construyó un banco de inserciones Tn10 en el cromosoma de la estirpe de *E.coli* MC4100 empleando el fago λ 370 según el método que se describe a continuación.

Un cultivo de la estirpe MC4100 en LB suplementado con maltosa 0,2 % y $MgSO_4$ 10 mM, se creció hasta fase exponencial (DO_{600} = 0,6). Después de dividir el cultivo en alícuotas de 2 ml, se infectó cada una de ellas con una suspensión del fago ($2 \cdot 10^{10}$ ufp/ml) a una multiplicidad de 1:10. Tras la adsorción del fago durante 20 min a 37°C, añadimos 1 ml de LB suplementado con citrato sódico 40 mM a cada tubo y se incubaron con agitación a 37°C durante 75 min. Las células, recogidas por centrifugación y resuspendidas en 0,2 ml de LB con citrato sódico 20 mM, se plaquearon en LB suplementado con

tetraciclina y citrato sódico 15 mM. Los transductantes Tc^R obtenidos de cada transducción independiente se recogieron en masa. Con cada suspensión celular, se preparó un lisado del fago P1vir según el procedimiento descrito por Miller, (1972).

3.5. MANIPULACION DEL ALELO *recA*.

3.5.1. Identificación fenotípica de clones $RecA^+$ versus $RecA^-$.

Las células $RecA^-$ son hipersensibles a la luz ultravioleta (UV). Para distinguir los clones $RecA^-$ de los $RecA^+$ procedimos del modo siguiente. Gotas de diferentes suspensiones celulares, preparadas con los clones que se querían probar ($2 \cdot 10^8$ ufc/ml), se estriaron paralelas en placas de LB y se expusieron a la radiación ultravioleta durante diferentes tiempos. Con este fin, las estrias se cubrieron con un papel para que la radiación no les afectase. A lo largo de un minuto de exposición, el papel se fue retirando, de forma que porciones crecientes de las estrias quedaban al descubierto, hasta que al final quedaban totalmente expuestas a la luz ultravioleta. Por último, las placas se protegieron de la luz para impedir la fotorreparación y se incubaron a 37°C. Los clones $RecA^+$ crecían en la parte de la estria irradiada durante tiempos cortos, mientras que los $RecA^-$ no crecían o apenas lo hacían.

3.5.2. Construcción de estirpes *recA56*.

El alelo *recA56* de la estirpe RYC816 se introdujo en estirpes silvestres aprovechando su cotransducción con el marcador *srl::Tn10*. Los transductantes Tc^r portadores del alelo *recA56*, fueron identificados por su extrema sensibilidad a la radiación ultravioleta (UV^B).

3.5.3. Construcción de estirpes *recA*.

A las estirpes RecA⁻ (*recA56*) se les introdujo el alelo *recA* mediante el fago transductor λp *recA clind*, portador del gen silvestre *recA* y de la mutación *clind*. Este gen *clind* codifica un represor insensible a los agentes que inducen λ .

La estirpe receptora RecA⁻ se cultivó en LB suplementado con maltosa 0,4 % hasta fase exponencial (OD₆₀₀ = 0,5). Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en el mismo volumen de una solución de MgSO₄ 10 mM. Se mezclaron 0,1 ml de bacterias con 0,1 ml de fago λp *recA clind* (10⁹ ufp/ml) (multiplicidad de infección: 10). Tras la adsorción del fago durante 20 min a 37°C, se añadió 1 ml de LB a la mezcla de adsorción y se incubó durante 4 horas a 37°C. Las células se centrifugaron, se resuspendieron en 0,1 ml de MgSO₄ 10 mM, y se mezclaron con 0,1 ml de una suspensión del fago λ cI h80 Δ *int9* (4·10⁹ ufp/ml), con el fin de seleccionar las células lisogenizadas por el fago λp *recA clind*. La mezcla se incubó a 37°C durante 20 min para facilitar la adsorción del segundo fago y se diluyó 100 veces. Se sembraron, en placas de LB, 0,1 ml de las células diluidas más 0,1 ml de la suspensión del fago λ cI h80 Δ *int9*. Las placas se incubaron durante la noche a 37°C. Los clones lisogenizados por el fago λp *recA clind* se identificaron por su resistencia a la radiación ultravioleta (UV^B) y su inmunidad al fago λ cI h80 Δ *int9*.

Por este método se lisogenizó el mutante D3 (*gyrB301 recA56*) con el fago λp *recA clind*, obteniendo la estirpe D31 (*gyrB301 recA*⁺).

3.6. TRANSFORMACION.

3.6.1. Preparación de células competentes.

Las estirpes bacterianas se hicieron competentes para transformación siguiendo el método descrito por Dagert y Ehrlich, (1979).

La estirpe a transformar se cultivó en un volumen de LB hasta $DO_{600} = 0,2 - 0,3$. Las células, recogidas por centrifugación a 6.000 rpm durante 10 min, se resuspendieron en 1/2 volumen de $CaCl_2$ 100 mM frío y se mantuvieron en hielo durante 20 min. Por último, las células se recogieron nuevamente por centrifugación en las mismas condiciones y se resuspendieron en 0,01 volúmenes de $CaCl_2$ 100 mM. La suspensión celular concentrada se mantuvo al menos una hora en hielo, antes de ser utilizada en la transformación. Conservada a 4°C pudo ser utilizada durante varios días.

3.6.2. Transformación con DNA plasmídico.

Las células competentes se transformaron con DNA plasmídico según el procedimiento descrito previamente por Maniatis *et al.*, (1982).

Los transformantes se plaquearon en el medio selectivo apropiado y se estrilaron dos veces en el mismo medio de selección antes de ser caracterizados en detalle.

3.6.3. Transformación con DNA de vectores derivados de M13.

Se utilizó la estirpe de *E.coli* 71.18 como receptora. Las células se hicieron competentes por el método de Dagert y Ehrlich, (1979), a partir de un cultivo en medio 2xTY, crecido a 37°C hasta fase exponencial ($DO_{600} = 0.2 - 0.3$). Se creció otro cultivo en paralelo en las mismas condiciones hasta $DO_{600} = 0.8$ que fue utilizado como cesped para la propagación de los fagos.

Se transformaron 300 μ l de células competentes con 1 - 5 μ l de DNA. Tras un choque térmico de 5 min a 42°C se añadieron a la mezcla de transformación 200 μ l del cultivo de la estirpe 71.18 en fase exponencial, 40 μ l de IPTG y 40 μ l de X-Gal. Finalmente se añadieron 3 ml de agar blando LB y se extendió la mezcla sobre placas H que se incubaron a 37°C toda la noche.

3.7. METODOS DE PURIFICACION DE DNA.

3.7.1. Preparación de DNA cromosómico.

La estirpe de *E.coli* K12 pop3351 se cultivó en LB durante la noche. Un ml del cultivo se centrifugó durante 3 min en microcentrifuga. El precipitado celular se resuspendió en 0.5 ml de tampón TES, se mezcló suavemente con 80 μ l de una solución de SDS 20 % y

se incubó 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 75 μ l de una solución de acetato sódico 20 % y 0,32 ml de isopropanol. Se mezcló suavemente y se centrifugó durante 5 min. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente con una pipeta Pasteur. Tras secar el precipitado a vacío, se añadieron 0,2 ml de tampón SSC y 20 μ l de una solución de pronasa (5 mg/ml), y se incubó a 37°C durante la noche. La solución de DNA se extrajo varias veces con 0,2 ml de solución Holmes-Bonner hasta que en la interfase no hubo precipitado. Recogida la fase acuosa, se añadieron 25 μ l de acetato sódico 20 % y 0,14 ml de isopropanol. El precipitado de DNA, recogido por centrifugación durante 15 min, se resuspendió en 0,2 ml de tampón TES y se volvió a precipitar con 25 μ l de acetato sódico y 0,6 ml de etanol frío durante 10 min a -20°C. Tras centrifugación durante 15 min, el precipitado de DNA cromosómico se resuspendió en 50 μ l de tampón TES y se conservó a 4°C.

3.7.2. Preparación de DNA plasmídico por lisis alcalina.

Las preparaciones de DNA plasmídico se realizaron por el método de la lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly, (1979).

La estirpe portadora del plásmido se incubó durante la noche en 10 ml de LB. Las células se recogieron por centrifugación a 6.000 rpm durante 10 min, se resuspendieron en 0,32 ml de tampón GTE y se trataron con 80 μ l de una solución de lisozima (10 mg/ml) de preparación reciente. Se mantuvieron en hielo durante 10 min. A continuación se mezclaron muy suavemente 0,8 ml de una solución de NaOH 0,2N / SDS 1 % y se incubaron durante 5 min en hielo. Posteriormente se añadieron 0,45 ml de acetato sódico

3 M pH= 4.8. Al cabo de una hora en hielo se centrifugaron a 12.000 rpm durante 20 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante que se precipitó con 0,6 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente durante 10 - 15 min. Se centrifugó 10 min a 10.000 rpm y el DNA precipitado se resuspendió en 200 µl de agua. Se añadieron 100 µl de acetato amónico 7.5 M, se mezcló bien y se centrifugó para precipitar las proteínas. Se recuperó el sobrenadante y el DNA se precipitó añadiendo 2 volúmenes de etanol frío. Se mantuvo 30 min a -20°C o bien hasta congelación en hielo seco. Se centrifugó 10 min a 10.000 rpm y el DNA lavado con etanol al 70 % y secado al vacío, se resuspendió en 100 µl de tampón TE o de agua.

3.7.3. Purificación del DNA: extracción con fenol.

En ciertos casos las preparaciones de DNA plasmídico requirieron una purificación posterior y eliminación de proteínas contaminantes por extracción con fenol según el método descrito por Maniatis *et al.*, (1982).

3.7.4. Purificación de DNA: ultracentrifugación a equilibrio de densidad en gradiente de CsCl.

Las preparaciones de DNA obtenidas de una lisis alcalina escalada para un volumen de 500 ml de cultivo se resuspendieron en 5,6 ml de tampón TE junto con 4,55 g de ClCs y 0,35 ml de bromuro de etidio (10 mg/ml). La solución resultante se transfirió a tubos de

polialómero de 3 ml de capacidad. Estos, tras ser sellados térmicamente, se centrifugaron a 90.000 rpm durante 17 horas a 20°C en un rotor de ángulo fijo de una ultracentrífuga Beckman TL100.

La banda correspondiente al DNA plasmídico se visualizó con luz ultravioleta y se extrajo según el procedimiento descrito por Maniatis *et al.*, (1982). El DNA plasmídico se precipitó con etanol frío a -20°C durante la noche. El precipitado de DNA se recogió por centrifugación a 10.000 rpm durante 20 min. se resuspendió en 1 ml de TE y se dializó con 2 litros de TE durante la noche a 4°C, según el procedimiento descrito por Maniatis *et al.* (1982). Por último, a la solución de DNA dializada se le añadió 0,1 volúmenes de acetato sódico 0,3 M pH= 4,8 y dos volúmenes de etanol frío y se la incubó durante 5 min en hielo seco. El precipitado de DNA plasmídico se resuspendió en 0,5 ml de TE. La concentración de DNA se determinó por medida de la absorbancia a 260 nm de una dilución 1:1.000.

3.7.5. Preparación de DNA de cadena sencilla de derivados del fago M13.

Se inocularon 100 ml de medio 2xTY con 1 ml de un cultivo de la noche de la estirpe de *E.coli* 71-18 y se repartieron en alícuotas de 1,5 ml. En cada tubo se inoculó una placa de lisis del derivado de M13 cuyo DNA se quería purificar. Los cultivos, tras su incubación durante 5 horas a 37°C, se centrifugaron en microcentrífuga 5 min. El sobrenadante se volvió a centrifugar en las mismas condiciones para eliminar restos celulares y se le añadieron 200 µl de una solución de PEG 20 % - NaCl 2,5 M. Se agitó la mezcla y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min. Se centrifugó durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Los restos de sobrenadante que habían quedado adheridos a las paredes

del tubo se eliminaron centrifugando los tubos de nuevo durante 2 min y retirandolos con una pipeta Pasteur. El precipitado de partículas virales se resuspendió en 100 μ l de tampón TE y se añadieron 50 μ l de fenol saturado con TE. Se agitó y se dejó 15 min a temperatura ambiente. Se mezclaron de nuevo las fases antes de centrifugar los tubos durante 3 min. Se recogió la fase acuosa y se trató con 50 μ l de cloroformo. Se mezclaron las dos fases y se centrifugaron durante 3 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y el DNA se precipitó añadiendo 10 μ l de acetato sódico 3M pH= 4,5 y 250 μ l de etanol, y se mantuvo toda la noche a -20°C . El DNA se centrifugó durante 20 min, se lavó con 1 ml de etanol frío y se dejó secar. Finalmente se resuspendió en 50 μ l de TE y se conservó a -20°C hasta su utilización en las reacciones de secuenciación.

3.7.6. Preparación de formas replicativas de DNA de M13.

Para la preparación de las forma replicativa de derivados del fago M13 se transformó la estirpe 71.18 con DNA de cadena sencilla del correspondiente derivado de M13. Las placas de lisis obtenidas se inocularon en 1 ml de un cultivo de 71.18 en medio 2xTY preparado por dilución 1/100 de un cultivo de la noche. Los cultivos se incubaron durante 5 horas a 37°C y las células se recogieron por centrifugación. El DNA en forma replicativa se obtuvo por método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly, (1979).

3.8. MANIPULACION ENZIMATICA DEL DNA.

3.8.1. Digestión del DNA con endonucleasas de restricción.

Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes finales de 10 a 20 μ l utilizando de 0,5 a 1 μ g de DNA según el procedimiento recomendado por Maniatis *et al.*, (1982).

3.8.2. Ligación de extremos de DNA.

Se llevó a cabo por incubación durante la noche a 10°C en un volumen final de 20 a 30 μ l, utilizando de 0.5 a 10 μ g de DNA, según el procedimiento recomendado por Maniatis *et al.* (1982).

3.9. ELECTROFORESIS DE DNA.

3.9.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

El DNA se analizó en geles horizontales de agarosa de 0.8 a 1,5 %, en tampón Tris-borato (TBE), según el procedimiento descrito por Maniatis *et al.*, (1982).

Los tamaños de los fragmentos de DNA linearizado se estimaron utilizando como patrones de peso molecular el DNA del fago λ digerido con la enzima *Hind*III (Sanger *et al.*, 1982) y el DNA de la forma replicativa del fago Φ X174 digerido con *Hae*III (Sanger *et al.*, 1978).

3.9.2. Electroforesis de DNA en geles de poliacrilamida.

El DNA se analizó en geles verticales de acrilamida al 5 % y 6 % en tampón Tris-borato (TBE) para la determinación del tamaño de fragmentos de restricción inferiores a 500 pb, según el método recomendado por Maniatis *et al.*, (1982).

Los geles se prepararon a partir de una solución al 30 % de acrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1). El tamaño utilizado fue de 15 x 18 mm o 25 x 18 mm, con espaciadores de 1 - 2 mm.

3.9.3. Purificación de fragmentos DNA a partir de geles de agarosa.

La purificación de fragmentos lineales de DNA se realizó por el método descrito por Dretzen *et al.* (1981) y por Winberg y Hammarskjold, (1980).

La electroforesis del DNA se llevó a cabo en geles horizontales de agarosa al 0,8 % que contenían 1 µg/ml de bromuro de etidio. Los fragmentos de DNA se purificaron con membranas de DEAE-celulosa tipo Schleicher & Schuell NA45, previamente preparadas como se describe en el apartado 2.4.6. En frente de la banda de DNA que se quería purificar, visualizada con luz UV, se efectuó un corte en el gel de agarosa con una cuchilla, en el que se insertó un trozo de membrana de la misma longitud. La electroforesis se prosiguió de nuevo durante 2 min a 130 V hasta que el fragmento deseado quedó adsorbido a la membrana de DEAE-celulosa. Entonces, la membrana se recuperó con unas pinzas, se enjuagó en TE y se introdujo en un tubo de microcentrifuga que contenía 0,4 ml de

solución Arginina / NaCl. El tubo se incubó a 70°C durante 1 - 2 horas dependiendo del tamaño de la banda de DNA a purificar. Posteriormente se retiró la membrana de DEAE-celulosa y el DNA se precipitó con etanol durante la noche. Se centrifugó durante 15 min y el fragmento de DNA purificado se resuspendió en el volumen final de TE deseado (20 - 30 µl). Se conservó a -20°C.

3.9.4. Purificación de fragmentos DNA a partir de geles de acrilamida.

La preparación de los geles de acrilamida y la electroforesis del DNA se llevaron a cabo como se ha descrito previamente (Maniatis *et al.*, 1982).

La extracción de la banda de DNA del gel de acrilamida se realizó según el procedimiento descrito por Maxam y Gilbert, (1980).

El fragmento de acrilamida conteniendo la banda de DNA se cortó del gel y se trituró en un tubo de microcentrifuga o en un tubo Corex siliconizado, dependiendo del tamaño del trozo. Se añadieron 3 ml de una solución de acetato amónico 0,5 M / EDTA 1 mM y se mezclaron bien con la acrilamida. Se mantuvo durante la noche a 37°C en un baño con agitación. Al cabo de este tiempo se centrifugó 20 min a 9.000 rpm. El sobrenadante se filtró a través de lana de vidrio siliconizada en una punta de micropipeta P.1000. Se añadieron dos volúmenes de etanol y el DNA se precipitó durante la noche a -20°C. Se centrifugó otros 20 min y el DNA se secó a vacío y se resuspendió en 20 - 30 µl de TE finales. Se conservó a -20°C.

3.10. METODOS DE CLONADO *in vivo* DE SECUENCIAS DE DNA CROMOSOMICO.

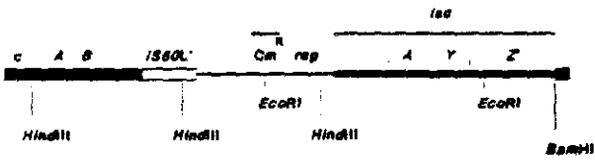
3.10.1. Método basado en la utilización de derivados del bacteriófago mini-Mu.

Este método para clonar *in vivo* secuencias de DNA bacteriano, es el descrito por Groisman *et al.* (1984). Consiste básicamente en la utilización del plásmido-transposón mini-MudII4042 (Figura 2A). Esta es una estructura quimérica que contiene el origen de replicación y el gen *cat* de resistencia a cloranfenicol del plásmido pACYC184, además de los genes de transposición A y B, el represor termosensible *cts62* y los extremos derecho e izquierdo del bacteriófago Mu. Los genes de transposición A y B de Mu, contenidos en la estructura mini-MudII4042, están reprimidos en bacterias lisógenas Mu $\text{c}ts$, crecidas a 30°C. es decir, en condiciones en las que el represor termosensible *cts* es activo. En estas condiciones el transposón mini-MudII4042 se replica como un plásmido autónomo a partir del origen de replicación de pACYC184 que contiene. Cuando dichos genes A y B se desreprimen a la temperatura de 42°C (represor *cts* inactivo), mini-MudII4042 se transpone con una alta frecuencia a numerosos sitios del genoma bacteriano, pudiendo ser complementado por el profago Mu $\text{c}ts$ para crecimiento en ciclo lítico (Figura 2B). Secuencias de DNA cromosómico, flanqueadas por dos copias de mini-MudII4042, o bien por una del Mu-replicón y otra de Mu, en la misma orientación, pueden ser empaquetadas en la cabeza del fago, hasta un total de 39 kb. Infectando con esta cosecha viral una célula huésped Mu $\text{c}ts$ *recA'*, pueden obtenerse plásmidos por recombinación entre las secuencias homólogas de Mu, portadores de fragmentos de DNA cromosómico clonados (Figura 2B).

Por este método clonamos el gen mutado *gyrB301* del minuto 83 del mapa genético de *E.coli*. En concreto, procedimos del siguiente modo. Sobre la estirpe RYC1030 portadora

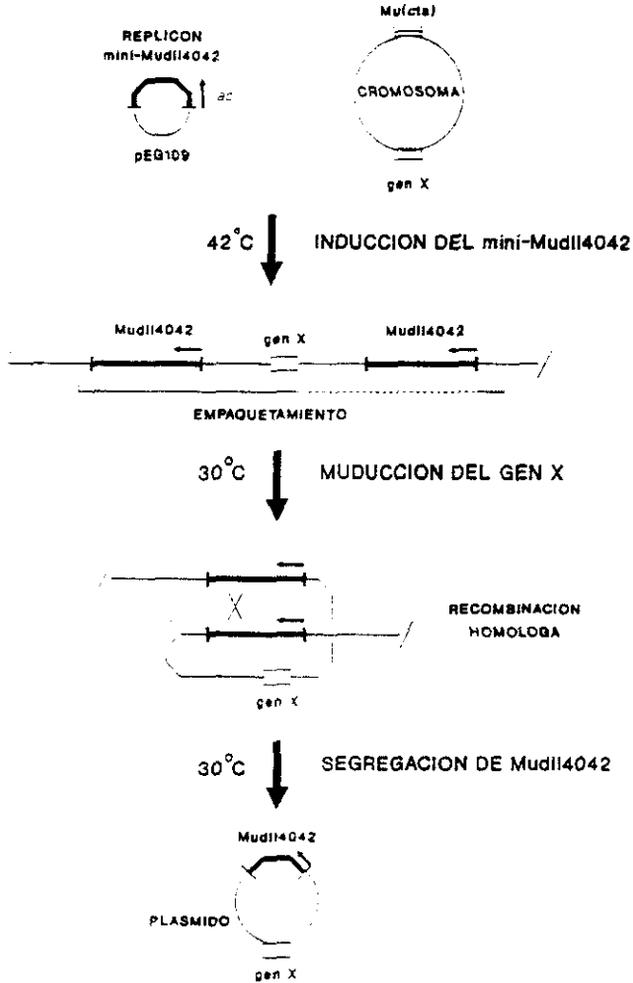
FIGURA 2A.

ESTRUCTURA DEL FAGO mini-MudII4042



- SECUENCIAS DEL FAGO Mu
- SECUENCIAS DE Tn6
- SECUENCIAS DE PLASMIDO pACYC184
- ▬ SECUENCIAS DEL OPERON *iss*

FIGURA 2B.

CLONADO *in vivo* DE MUTACIONES CROMOSOMICASMétodo de Groisman *et al.* (1984)

de las mutaciones *sbmB1* y *gyrB320*(Cou^R), y del transposón *zid::Tn10* (Tc^R) (su aislamiento se detalla en el apartado 4.3.4 de Resultados), se preparó un lisado del fago P1 con el que se transdujo la estirpe pop3001.6 (*malT::Muets*), seleccionando a 30°C los transductantes resistentes a tetraciclina (Tc^R) y entre éstos se identificaron los resistentes a microcina B17 y a coumermicina A₁. Con uno de estos transductantes Tc^R Cou^R Moc^R se prepararon células competentes que se transformaron con el plásmido-transposón mini-Mu pEG109. pEG109 es un plásmido que contiene el mini-MudII4042 y la región *phoA proC* del cromosoma de *E.coli*. Los clones transformantes se seleccionaron por resistencia a cloranfenicol (Cm^R) a la temperatura de 30°C. En uno de estos transformantes se indujo el fago a 42°C, obteniéndose así un lisado del fago Mu que se utilizó para transducir la estirpe pop3001.6. Los clones muductantes se seleccionaron a 30°C en placas de M63 suplementadas con coumermicina A₁ (16 µg/ml) y cloranfenicol (30 µg/ml). Los clones aislados se reestrieron dos veces en las mismas condiciones en las que fueron seleccionados.

3.10.2. Método basado en la recombinación homóloga entre alelos de un mismo locus.

Este método, descrito por Saarikallio y Palva, (1985) facilita la transferencia *in vivo* de mutaciones cromosómicas a plásmidos multicopia en *E.coli* K12 (ver Figura 3). En síntesis, consiste en la transformación de una estirpe PolA⁻ (*polA5*) portadora de la mutación deseada, con un plásmido multicopia derivado de ColE1 que contiene el alelo silvestre del gen afectado por la mutación. Como es sabido, la replicación de los plásmidos derivados

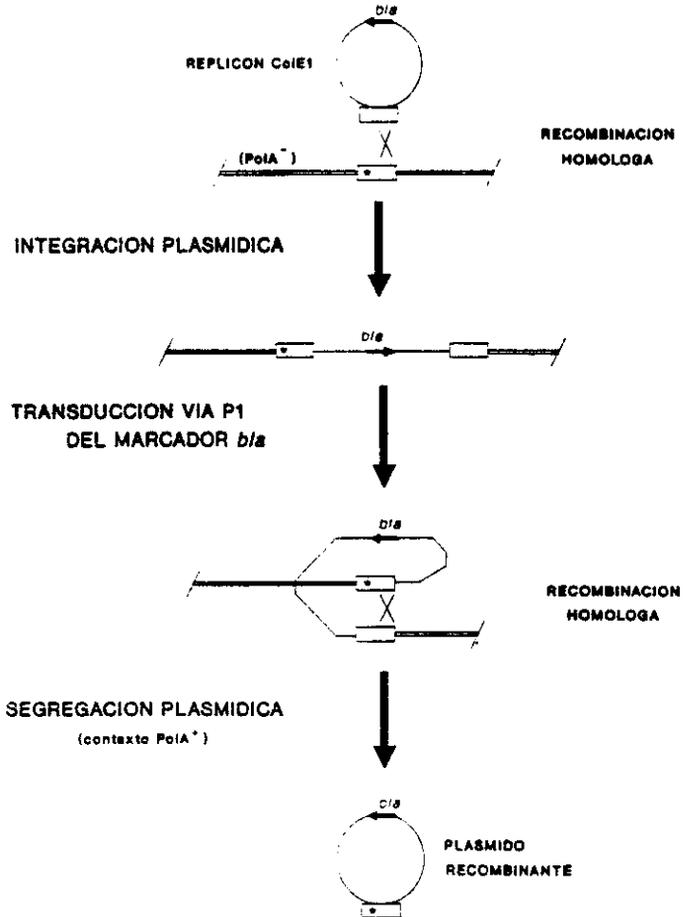
de ColE1 depende de DNA polimerasa I, enzima codificada por *polA*. Por consiguiente, estos plásmidos se mantienen de manera estable en estirpes *PolA*⁻, sólo si pueden integrarse, por recombinación homóloga, en el cromosoma bacteriano. A continuación, el plásmido cointegrado se transfiere, mediante un fago P1 transductor, a una estirpe *PolA*⁺ *RecA*⁻. En este contexto genético, el plásmido puede segregarse del cromosoma bacteriano por un nuevo proceso de recombinación homóloga. Por último, se seleccionan entre los transductantes aislados, aquellos que contienen el alelo mutante clonado en el plásmido multicopia. El mismo método puede aplicarse para intercambiar un alelo por otro sobre el plásmido.

En concreto, el clonado del alelo silvestre *sbmB*⁺ y mutante *sbmB2* responsables de los fenotipos *Mcc*^S y *Mcc*^T, respectivamente, y de los alelos *gyrB*⁺ y *gyrB320*(*Cou*^R) del gen *gyrB* se realizó, por este método de Saarilahti y Palva, (1985), empleando, en cada caso concreto, el plásmido derivado de pBR322 más apropiado. Los plásmidos utilizados en el clonado de estos alelos se describen en los apartados correspondientes de la sección de Resultados. Como ejemplo, describiremos aquí el procedimiento seguido para clonar el alelo *sbmB*⁺.

Con un P1 crecido sobre la estirpe AB1157 (*polA5* *Tn10*) se transdujo la cepa RYC1010 seleccionando los clones *Tc*^R, que fueron probados a continuación para la presencia de la mutación *polA5* (sensibilidad a UV) (*Tn10* y *polA5* están ligadas al 90%). Uno de los clones resultantes RYC1010 *Tc*^R *UV*^S *gyrB*⁺ se transformó con el plásmido pCID500, derivado de pBR322 (ver apartado 4.4.3 de Resultados), seleccionando los transformantes *Ap*^R, lo que conduce a la integración del plásmido pCID500 en el cromosoma bacteriano. Sobre uno de estos clones se preparó un lisado P1 con el que se transdujo la estirpe RYC1010 (*polA*⁺). Entre los transductantes *Ap*^R aislados, seleccionamos los clones *Mcc*^S.

FIGURA 3.

CLONADO *in vivo* DE MUTACIONES CROMOSOMICAS
 Método de Saarilahti *et al.* (1985)



De este modo obtuvimos el plásmido pCID510 (Figura 6A), análogo a pCID500, que porta el alelo silvestre *sōmB⁺*.

3.11. SECUENCIACION DEL DNA.

El método empleado para determinar la secuencia del DNA es el descrito por Sanger *et al.* (1977) de secuenciación con dideoxynucleótidos. Se ha llevado a cabo utilizando dos tipos de DNA polimerasas: DNA polimerasa I (fragmento Klenow) y DNA polimerasa de T7.

3.11.1. Hibridación del oligonucleótido iniciador al DNA molde.

El método de hibridación del oligonucleótido al DNA molde de cadena sencilla tiene ligeras diferencias dependiendo de la DNA polimerasa utilizada para la secuenciación.

Cuando se empleó el fragmento Klenow, la hibridación se llevó a cabo mezclando en un tubo de microcentrifuga 5 μ l de DNA molde, 1 μ l de oligonucleótido (0,5 pmol/ μ l) y 1,5 μ l de tampón de reacción Klenow concentrado diez veces (Tris HCL 100 mM pH= 8,5 y MgCl₂ 100 mM), completando hasta 10 μ l con agua destilada. La mezcla se calentó a 65°C durante dos min en un baño seco y se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar los 35°C.

Cuando se empleó la DNA polimerasa de T7, la hibridación se llevo acabo mezclando 7 μ l de DNA molde, 1 μ l de oligonucleótido (0.5 pmol/ μ l) y 2 μ l del tampón de reacción

de la DNA polimerasa de T7 concentrado cinco veces (Tris-HCl 40 mM pH= 7,5, MgCl₂ 20 mM y NaCl 50 mM).

3.11.2. Reacciones con DNA polimerasa I (fragmento Klenow).

Las condiciones utilizadas son las recomendadas por la firma Amersham, (1984).

A) Preparación de las mezclas: A°, C°, G° y T°.

	A°	C°	G°	T°
dCTP (0,5 mM)	20 µl	1 µl	20 µl	20 µl
dGTP (0,5 mM)	20 µl	20 µl	1 µl	20 µl
dTTP (0,5 mM)	20 µl	20 µl	20 µl	1 µl
tampón TE	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

B) Preparación de las mezclas dNTPs / ddNTP.

A°/ddATP: 25 µl A° + 25 µl ddATP 0,15 mM

C°/ddCTP: 25 µl C° + 25 µl ddCTP 0,02 mM

G°/ddGTP: 25 µl G° + 25 µl ddGTP 0,05 mM

T°/ddTTP: 25 µl T° + 25 µl ddTTP 0,50 mM

Una vez realizada la hibridación con el DNA molde se llevaron a cabo las reacciones.

Se añadieron a los 10 µl de mezcla de hibridación 2 µl de [α -³²P]dATP (10 mCi/ml; 800

Ci/mmol) y 1 μ l de Klenow (1 unidad/ μ l). Posteriormente 2,5 μ l de esta mezcla se transfirieron a cuatro pocillos marcados A, C, G y T en una placa multipocillo que contenía 2 μ l de las preparaciones A°/ddATP, C°/ddCTP, G°/ddGTP y T°/ddTTP respectivamente. Se incubaron las reacciones a temperatura ambiente 15 min, y se añadieron a cada pocillo 2 μ l de mezcla de caza que contiene los cuatro dNTPs a concentración 0,5 mM cada uno. Al cabo de 15 min las reacciones se detuvieron añadiendo 4 μ l de tampón de depósito con formamida. Las muestras se calentaron durante 2 min a 95°C antes de ser cargadas en un gel de secuencia desnaturalizante al 7 % en acrilamida.

3.11.3. Reacciones con DNA polimerasa de T7.

La secuenciación de DNA con DNA polimerasa de T7 se realizó en dos etapas: en primer lugar el oligonucleótido se extendió en condiciones limitantes de dNTPs y en presencia de [α -³⁵S]dATP. En este paso el marcaje se incorpora a cadenas de DNA cuya longitud se distribuye aleatoriamente desde varios nucleótidos a cientos de ellos. En el segundo paso se aumentó la concentración de los dNTPs y se añadieron los ddNTPs. En este paso, las cadenas de DNA se elongan varias decenas de nucleótidos hasta que la incorporación de un ddNTP detiene el proceso de elongación. Las reacciones se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones de la firma comercial USB (United States Biochemical).

I. Composición de las mezclas de reacción.

a) *Mezcla de dNTPs:*dGTP 1,5 μ MdCTP 1,5 μ MdTTP 1,5 μ Mb) *Mezclas de terminación.*

	dGTP	dATP	dCTP	dTTP
ddATP: 8 μ M ddATP	80 μ M	80 μ M	80 μ M	80 μ M
ddCTP: 8 μ M ddCTP	80 μ M	80 μ M	80 μ M	80 μ M
ddGTP: 8 μ M ddGTP	80 μ M	80 μ M	80 μ M	80 μ M
ddTTP: 8 μ M ddTTP	80 μ M	80 μ M	80 μ M	80 μ M

II. Reacciones de marcaje.

Se añadieron a los 10 μ l de la mezcla de hibridación 1 μ l de DTT 0,1 M, 2 μ l de mezcla de dNTPs y 0,5 μ l de [α - 35 S]dATP (10 Ci/ μ l; 1000 Ci/mmol). Finalmente se añadieron 2 μ l de DNA polimerasa de T7 (1-2 unidades/ μ l) y se mantuvo la reacción 7 min a temperatura ambiente.

III. Reacciones de terminación.

En una placa multipocillo se añadieron en pocillos marcados (A, C, G y T) 2.5 μ l de cada mezcla de terminación dATP, dCTP, dGTP y dTTP respectivamente. La placa se precalentó a 37°C y se añadieron posteriormente 3.5 μ l de cada mezcla de reacción de montaje en cada pocillo. Las reacciones se incubaron durante 5 min a 37°C y se detuvieron por adición de 4 μ l de tampón de carga con formamida.

3.11.A. Electroforesis de DNA en gels desnaturalizantes de poliacrilamida.

Se utilizaron gels desnaturalizantes de poliacrilamida al 7% en presencia de urea 8 M. Para la preparación de gels de 20 x 40 cm y de 0.5 mm de espesor, se utilizaron 40 ml de una solución de acrilamida 7 % con urea 8M, que se mezclaron con 80 μ l de PSA al 25 % y 80 μ l de TEMED. El gel se dejó polimerizar durante una hora y se precorrió 30 min a 21 mA. La electroforesis de las muestras disueltas en tampón de depósito con formamida, se llevó a cabo a 23 - 25 mA.

Los gels conteniendo muestras con 32 P y 35 S se secaron directamente y se expusieron durante la noche a temperatura ambiente frente a películas Kodak X.Omat y X.AR.

3.12. MAXICELULAS.

3.12.1. Preparación de las maxicélulas y marcaje radiactivo de las proteínas sintetizadas.

Los polipéptidos codificados por plásmidos fueron determinados *in vivo* empleando el sistema de maxicélulas descrito por Sancar *et al.*, (1979). El método está basado en la destrucción selectiva del cromosoma bacteriano de células portadoras de los plásmidos en estudio. Esta destrucción puede generarse con luz UV o con microcina B17 (Mayo *et al.*, 1988). Utilizando la dosis adecuada de luz UV o de microcina B17 se logra la destrucción total del cromosoma, conservándose copias plasmídicas que podrán dirigir la síntesis de proteínas. El método requiere la utilización de una estirpe RecA⁻ de manera que no se reparen los daños producidos por la irradiación. En concreto procedimos del modo siguiente.

La estirpe RYC1000 (*recA56*) se transformó con los plásmidos cuyas proteínas se querían analizar. Se inocularon 0,3 ml de un cultivo de la noche de los transformantes correspondientes en 15 ml de medio M63, suplementado con casaminoácidos (0,2 %), y se incubaron hasta alcanzar una DO₆₀₀ de alrededor de 0,7. Se irradiaron, con luz UV, 10 ml de cultivo en una placa Petri estéril durante un periodo de 60 segundos y a una distancia de 50 cm. Se plaquearon 50 µl del cultivo irradiado sobre LB para determinar el número de viables tras el tratamiento. El resto del cultivo se transfirió a un matraz ámbar para evitar la fotoreparación y se incubó durante una hora a 37°C. Al cabo de este tiempo se añadió cicloserina a una concentración final de 200 µg/ml y se incubó durante la noche en las mismas condiciones.

Se plaquearon de nuevo 50 µl de la suspensión celular para determinar el número de viables tras el tratamiento con cicloserina. Las células se recogieron por centrifugación a

5.000 rpm durante 10 min y se lavaron dos veces con medio M63. Finalmente las células se resuspendieron en 2 ml de medio M63 completo y se incubaron durante una hora a 37°C con gran agitación. Se añadieron 50 μ Ci de 35 S-Met y se incubó con agitación durante 3 min. Las maxicélulas marcadas se recogieron por centrifugación y el precipitado se resuspendió en 100 μ l de tampón de lisis. En los experimentos de pulso y caza, tras el marcaje de las maxicélulas se añadió Met fría en exceso y se reincubaron en las mismas condiciones durante 15 min adicionales. Las muestras se hirvieron durante 5 min antes de ser cargadas en el gel de poliacrilamida.

3.12.2. Análisis de proteínas en geles de poliacrilamida.

Se ha utilizado un sistema de geles verticales desnaturalizantes de poliacrilamida / SDS de 18 x 25 x 0.1 cm de tamaño. Los geles constan de dos partes, un gel superior de concentración de acrilamida constante y un gel inferior separador con concentraciones de acrilamida variables según el tamaño de las proteínas a analizar.

El gel inferior se preparó en un volumen total de 25 ml mezclando:

6,25 ml de Tris HCl 1,5 M; pH= 8,8

x ml de Acrilamida Bisacrilamida (30:0,8)

0,25 ml de SDS 10 %

(18,5 - x) ml de H₂O

La solución se desgasó a vacío y se añadieron 105 μl de persulfato amónico al 10 % y 25 μl de TEMED. El gel se dejó polimerizar durante una hora antes de añadir el gel superior.

El gel superior se preparó mezclando en un volumen final de 10 ml:

2,5 ml de Tris:HCl 0,5 M; pH= 6,8

1,7 ml de Acrilamida:Bisacrilamida (30:0,8)

0,1 ml de SDS 10 %

100 μl de persulfato amónico 10 %

10 μl de TEMED

La electroforesis se llevó a cabo en tampón Tris / glicina / SDS. El gel superior se corrió a 70 V hasta que el frente de colorante rebasó la interfase entre ambos geles. A partir de este punto se migró a 80 – 100 V durante toda la noche hasta que el frente alcanzó el borde inferior del gel.

3.12.3. Autorradiografía de geles de poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida con proteínas marcadas con ^{35}S requirieron un tratamiento previo. Los geles fueron fijados durante una hora en una mezcla de ácido acético 10 % / metanol 30 % / glicerol 3 %. El acético se eliminó con dos lavados de 15 min con metanol 30 % / glicerol 3 %. Posteriormente el gel se mantuvo una hora en salicilato sódico 1 M / metanol 30 % / glicerol 3 %. Los geles se secaron de una a dos horas a 80°C en un

secador de geles y se expusieron frente a una película Kodak X.Omat XS5 durante 48 a 96 horas a -20°C .

4. RESULTADOS

A) ESTUDIO DE MUTANTES RESISTENTES A MICROCINA B17.

4.1. AISLAMIENTO DE MUTANTES RESISTENTES A MICROCINA B17 (*Mcc^B*).

Con el fin de investigar el modo de acción de la microcina B17, nos propusimos seleccionar mutantes resistentes al antibiótico. Entre éstos los habría afectados en la diana intracelular del antibiótico. Caracterizando éstos podríamos definir dicha diana. La selección de esta clase de mutantes es difícil en el caso de la microcina B17, debido a la elevada frecuencia de aparición de mutantes *sbmA* (10^{-4}). Estos mutantes, resistentes a la microcina exógena, carecen del receptor de la microcina B17, situado en la membrana interna (Laviña *et al.*, 1986). Sin embargo, hemos podido soslayar este inconveniente y aislar mutantes del tipo deseado mediante la aplicación de dos procedimientos diferentes. El primero se fundamenta en la capacidad teórica que tendrían los mutantes de diana para neutralizar la acción bactericida del antibiótico endógeno. El segundo, en el carácter recesivo de los alelos *sbmA* con relación al alelo silvestre *sbmA*⁺.

Como se señaló en la Introducción, el plásmido pMM102, productor de *MccB17*, carece del gen de inmunidad *mcbG*. Este plásmido inhibe el crecimiento de células *RecA*⁻ en medio mínimo glucosa, debido a la acción de la microcina endógena producida y no neutralizada, a causa de la inmunodeficiencia del sistema *MccB17* clonado en pMM102 (*McbG*⁻). Esta propiedad de las células *RecA*⁻(pMM102) puede ser aprovechada para aislar mutantes afectados en la diana intracelular de la microcina B17. Los mutantes hipotéticos deberían crecer en medio mínimo sin perder la capacidad de sintetizar el antibiótico, mientras que los mutantes *sbmA* no deberían crecer.

En la práctica se procedió de la manera indicada en el apartado 3.2.1 de Métodos. Concretamente, se trataron células RYC1000 con *MccB17* (270 UA/ml) durante 40 min.

Los clones aislados *Mcc*⁺ se transformaron con el plásmido pMM102, y se sembraron en medio M63 glucosa suplementado con ampicilina (20 µg/ml) y *Mcc*B17 (40 UA/ml). Los clones que aparecieron se probaron para producción de *Mcc*B17 y sensibilidad a radiación UV, con el fin de verificar que el plásmido pMM102 mantenía intacta su capacidad de producir microcina y que el contexto genético seguía siendo *RecA*⁻. La mayoría de las colonias eran *RecA*⁻ *Mcc*⁻. Este resultado no nos sorprendió. En efecto, San Millán *et al.* (1985(b)) habían encontrado previamente que mutantes *Mcc*⁻ en células *RecA*⁻(pMM102) aparecían con elevada frecuencia (10^{-4} - 10^{-5}). Las mutaciones responsables de este fenotipo se debían a la inactivación de alguno de los genes de producción del plásmido. Esta inactivación era originada por la inserción de secuencias IS, transpuestas del cromosoma bacteriano al plásmido.

Una minoría de las colonias eran *RecA*⁺ *Mcc*⁻; es decir, resultaban de la reversión de la mutación *recA56*. Solamente, se encontró una colonia con el fenotipo buscado, *RecA*⁻ *Mcc*⁺, entre un total de $5 \cdot 10^9$ células; es decir, la frecuencia de los mutantes espontáneos deseados fue extremadamente baja ($2 \cdot 10^{-10}$).

El segundo método de selección de mutantes afectados en la diana de la microcina B17 consistió en soslayar las eventuales mutaciones *sbmA* aumentando el número de copias del gen *sbmA* silvestre, que como se dijo previamente es dominante sobre los alelos mutados (Laviña *et al.*, 1986).

En la práctica se sembraron células RYC1000 *sbmA*⁺ (pMM73-4) en M63 glucosa suplementado con tetraciclina (30 µg/ml) y *Mcc*B17 (50 UA/ml). El plásmido pMM73-4 es un derivado de pBR322 que contiene el gen silvestre *sbmA*⁺. En principio toda mutación *sbmA* debería ser complementada por las copias de *sbmA*⁺, y las células tendrían que ser sensibles al antibiótico. Solamente en el caso de una mutación sobre la copia *sbmA*

cromosómica y una mutación sobre una copia plasmídica, seguida de segregación de esta última, podría conducir a clones resistentes a MccB17, una posibilidad muy improbable.

En el medio de selección podrían crecer sin embargo otras clases de mutantes resistentes a microcina, como son los mutantes *ompR* y *ompF* que confieren tolerancia (resistencia parcial) a microcina exógena, los cuales aparecen con una frecuencia elevada (10^{-7}) (Laviña *et al.*, 1986). Por lo tanto, se comprobó rutinariamente la presencia de proteína OmpF activa en los clones crecidos en el medio de selección (sensibilidad al bacteriófago Tu1a). Como se esperaba la mayoría de las colonias (unas 200) eran resistentes al bacteriófago (*ompF*⁻).

Sólo una exhibía el fenotipo Mcc^R Tu1a^S. Es decir también por este método la frecuencia de los mutantes deseados fue extremadamente baja ($5 \cdot 10^{-10}$).

Al mutante obtenido por el primer método se le denominó D3.102 y al obtenido por el segundo D4.73-4.

4.2. CARACTERIZACION DE LOS MUTANTES D3.102 Y D4.73-4.

El fenotipo del mutante D3.102 era el esperado para un hipotético mutante de diana. Crece perfectamente a cualquier temperatura en medio completo LB y en medio mínimo M63, produce normalmente microcina B17 (fenotipo Mcc⁺) y es sensible a la luz ultravioleta (fenotipo UV^S asociado a las células RecA⁺).

D3.102 se diferencia básicamente de los mutantes *ompR*, *ompF* y *sbmA* productores de microcina, en su capacidad para suprimir el fenotipo de inmunodeficiencia del plásmido pMM102, es decir, en su capacidad para resistir la acción de la microcina B17 intracelular.

No obstante, verificamos que D3.102 era sensible a los bacteriófagos Tula y λ Vh434 (*ompR⁺ ompF⁺*) y que conservaba la capacidad de absorber el antibiótico exterior (*sbmA⁻*). Este último carácter se comprobó curando el mutante del plásmido pMM102 y valorando la sensibilidad a microcina de los clones curados. Estos eran tan sensibles como células silvestres *sbmA⁻ recA⁻*, pero más resistentes que la estirpe RYC1000 *recA⁻* original de la que se obtuvo el mutante D3.102. Este resultado indicaba que la nueva mutación suprimía la hipersensibilidad a microcina típica de los mutantes *recA*, los cuales son de 8 a 10 veces más sensibles que la estirpe isogénica silvestre (*recA⁻*).

Para excluir la intervención de posibles mutaciones plasmídicas responsables por sí solas, o en colaboración con una mutación cromosómica, del fenotipo de supresión de inmunodeficiencia se extrajo el plásmido pMM102 del mutante y con él se transformaron la estirpe RYC1000 original, los dobles mutantes *sbmA recA* y *ompF recA*, y el mutante D3, derivado curado de D3.102. Mientras que los transformantes del mutante D3 crecían en M63, los transformantes de las otras tres estirpes no lo conseguían.

En conclusión todos estos datos indicaban que el mutante original D3.102 contenía un plásmido pMM102 no mutado y que su capacidad de crecer en medio mínimo le venía dada por una mutación cromosómica y exclusivamente por esta mutación.

A continuación, valoramos la resistencia a microcina exógena del mutante curado D3 con respecto a la estirpe isogénica silvestre siguiendo dos métodos. Por una parte se determinaron, por el método de la dilución crítica, las dosis mínimas de MccB17 que inhibían el crecimiento de estas estirpes en placa de Petri M63; por la otra se comparó la actividad bactericida de la microcina sobre ambas estirpes, cuantificando el número de células viables después de ser tratadas con diferentes dosis de MccB17 (Figura 4). En

ambos casos se encontró que el mutante D3 era entre 8 y 10 veces más resistente a la microcina B17 exógena que la estirpe isogénica silvestre.

El mutante D4.73-4 se caracterizó de una manera similar al D3. En este caso se constató, en particular, lo siguiente:

a) El fenotipo del mutante no cambiaba al curarlo del plásmido pMM73-4. La sensibilidad al antibiótico no se modificaba y era comparable a la exhibida por mutantes *ompF*. Sin embargo el mutante era normalmente sensible a los bacteriófagos Tula y λ Vh434 como las estirpes silvestres *ompF*.

b) El derivado curado (D4) exhibía una sensibilidad al antibiótico exógeno similar a la del mutante D3.

c) Al introducir en D4 el plásmido pMM102, los clones transformantes crecían normalmente en LB y M63 glucosa, y producían microcina B17. En realidad D4(pMM102) era indistinguible de D3(pMM102). Ello se corroboró valorando cuantitativamente su resistencia a MccB17 (CMI y actividad bactericida).

Por lo tanto concluimos que los mutantes D3 y D4 resultaban de mutaciones cromosómicas que protegen a las bacterias de la MccB17, tanto de la exógena como de la sintetizada por las mismas bacterias mutantes. En otras palabras, la carencia de inmunidad debida a la ausencia del gen *mbcG* podría ser suprimida por esas mutaciones.

Hay que resaltar que la resistencia a MccB17 exógena de los mutantes D3 y D4 no es total, como lo es la de los mutantes *sbmA* (Laviña *et al.*, 1986).

A la mutación responsable de la resistencia parcial a MccB17 del mutante D3, la denominamos *sbmB1* (sensitivity to B17 microcin, locus B). Por analogía, designamos *sbmB2* a la mutación cromosómica de D4.

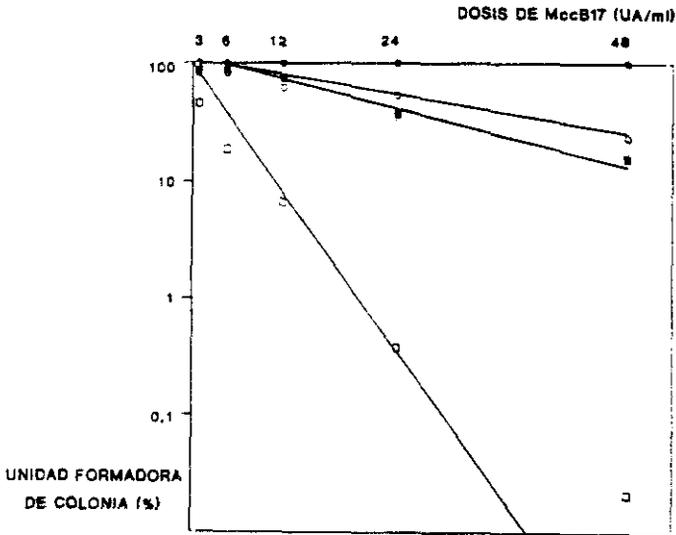


Figura 4. Sensibilidad a MccB17 de varias estirpes de *E.coli*.

Las células fueron tratadas con diferentes dosis de MccB17 (10^{-1} UA/ml) durante 1 h. Alicuotas de 0.1 ml de cada cultivo se plaquearon en medio LB y se incubaron a 37°C durante la noche para determinar la viabilidad. (□) RYC1000 (*recA56 sbmB*⁺); (○) D3 (*recA56 sbmB1*); (■) RYC1010 (*recA*⁺ *sbmB*⁺); (●) D31 (*recA*⁺ *sbmB1*).

4.3. LOCALIZACION GENETICA DE LAS MUTACIONES *sbmB1* Y *sbmB2*.

4.3.1. Inserción de un transposón Tn10 próximo a *sbmB1*

Puesto que el fenotipo de resistencia parcial a MccB17 conferido por *sbmB1* y *sbmB2* no es fácilmente seleccionable, decidimos colocar el marcador Tc^r (transposón Tn10) cerca de *sbmB1* para facilitar la localización genética de la mutación. Para ello se construyó previamente un banco de inserciones Tn10 en la estirpe MC4100 (*sbmB*^r) empleando el fago λ370 como se describe en el apartado 3.4.2 de Métodos. Sobre este banco se prepararon lisados independientes del fago P1vir con los que se transdujo la estirpe D31 [D3(λp(recA⁺ *clind*)) *sbmB1*] construida como se describe en el apartado 3.5.3. de Métodos.

Se seleccionaron los transductantes resistentes a tetraciclina (Tc^r) y entre éstos se identificaron, por replica en medio mínimo M63 suplementado con MccB17 (40 UA/ml), seis clones que habían perdido la resistencia a microcina. Al probar estos clones Tc^r Mcc^s para los otros marcadores de la estirpe D31 se encontró que dos de ellos crecían en medio M63 ribosa (sin glucosa). Este resultado indicaba que habíamos colocado un Tn10 cerca del locus *sbmB*^r y que con ese Tn10 habíamos cotransducido no sólo el alelo *sbmB*^r sino también el alelo *rbs*^r (recuérdese que la estirpe D31, como la D3, es *rbs*Δ7 (Rbs^r)). El locus *rbs* está situado en el minuto 84 del mapa de *E.coli* (Bachmann, 1990). Este resultado sorprendente, pero afortunado, facilitó los experimentos destinados a localizar de forma precisa la mutación. En efecto ya sabíamos que la mutación *sbmB1* estaba en la proximidad del minuto 84.

4.3.2. Localización genética de la mutación *sbmB1*.

Para precisar la localización genética de la mutación *sbmB1*, realizamos varios experimentos de transducción con P1, que implicaron a dos, a tres y a cuatro marcadores genéticos del minuto 84 del cromosoma o próximos a esta región. Además de *sbmB1*, *rbs* y *Tn10*, se emplearon marcadores: *ilv*, *dnaA* y *recF* (Bachmann, 1990).

Con el fin de establecer el grado de ligamiento entre los marcadores *sbmB1*, *rbs* y *Tn10* y su orden relativo, se infectó inicialmente la estirpe D31 ($Rbs^- Tc^s sbmB1(Mcc^s)$) con un lisado de fago P1 crecido sobre la estirpe VM215 ($Rbs^+ Tc^s sbmB^+(Mcc^s)$). Se seleccionaron los transductantes Tc^s y Rbs^+ , que fueron analizados para los marcadores no seleccionados. Los resultados, mostrados en la Tabla 2A, indican que el transposón *Tn10* se ha insertado muy próximo a *sbmB1*, puesto que el 95% de los transductantes Tc^s son Mcc^s (*sbmB^+*); y sugieren que el transposón está situado entre los marcadores *rbs* y *sbmB1*.

Para determinar la localización de *sbmB1* con relación al locus *rbs*, se empleó el marcador *ilv* situado a la derecha de este último. Para ello se infectó la estirpe TP2100 ($Ilv^- Rbs^- Tc^s sbmB^+(Mcc^s)$) con un lisado de fago P1 crecido sobre la estirpe VM11 ($Ilv^+ Rbs^- Tc^s sbmB1(Mcc^s)$) y se seleccionaron los transductantes Tc^s e Ilv^+ , que fueron analizados para los marcadores no seleccionados. De los resultados obtenidos (ver Tabla 2B) se deduce que la mutación *sbmB1* y el transposón *Tn10* están situados a la izquierda de *rbs*, ya que el 29% de los transductantes Tc^s son Rbs^- y solamente el 16% son Ilv^+ . Esta conclusión se confirmó con el análisis de los transductantes Ilv^+ de los cuales el 88% son Rbs^- , el 13% Tc^s y el 8% Mcc^s .

A la izquierda de *rbs* en el minuto 83 del cromosoma de *E.coli*, se encuentran los genes *dnaA* y *recF* con respecto a los cuales se localizó a continuación *sbmB1*. Para ello, se infectó la estirpe CI1 (DnaA⁺ Tc^s *sbmB*⁺(Mcc^s)) con un lisado de fago P1 crecido sobre la estirpe VM11 (DnaA⁺ Tc^s *sbmB1*(Mcc^s)). Se seleccionaron los transductantes Tc^s a 30°C, que fueron analizados para los marcadores no seleccionados. Además, se infectó la estirpe D31 (DnaA⁺ Tc^s *sbmB1*(Mcc^s)) con un lisado de fago P1 crecido sobre la estirpe CI6 (CI1 *cid::Tn10*) (DnaA⁺ Tc^s *sbmB*⁺(Mcc^s)), obtenida en el cruzamiento anterior. Los transductantes Tc^s seleccionados a 30°C se analizaron para los marcadores no seleccionados. Los resultados obtenidos en ambos cruzamientos (ver Tabla 2C) indican que el transposón Tn10 está insertado a la derecha de *dnaA* (en el primer cruzamiento el 97% de los transductantes Tc^s son DnaA⁺ y el 95% Mcc^s (*sbmB1*); en el segundo, el 87% son DnaA⁻ y el 86% Mcc^s (*sbmB*⁺)). Además de estos cruzamientos se deduce que *sbmB1* está a la izquierda de *dnaA* (los transductantes minoritarios son Mcc^s DnaA⁻ y Mcc^s DnaA⁺ respectivamente).

Después se infectó la estirpe V5702 (RecF⁻ Tc^s *sbmB*⁺(Mcc^s)) con un lisado de fago P1 crecido sobre la estirpe VM11 (RecF⁺ Tc^s *sbmB1*(Mcc^s)). Se seleccionaron los transductantes Tc^s, que fueron analizados para los marcadores no seleccionados. De los resultados obtenidos (ver Tabla 2D) concluimos que la mutación *sbmB1* está a la izquierda del locus *recF* (el fenotipo minoritario es RecF⁻ Mcc^s). Esta conclusión fue confirmada con el cruzamiento recíproco: La estirpe D31 (RecF⁺ Tc^s *sbmB1*(Mcc^s)) transducida con un P1 crecido sobre la estirpe V5702 *cid::Tn10* (RecF⁻ Tc^s *sbmB*⁺(Mcc^s)).

TABLA 2A.
LOCALIZACION DE *sbmB1* CON RESPECTO A *rbs*

DONADOR	RECEPTOR	MARCADOR SELECCIONADO	MARCADORES NO SELECCIONADOS		NUMERO TRANSDUCTANTES (FRECUENCIA)
			Mcc	Rbs	
VM215	D31	Tc	Mcc	Rbs	100 (100)
			R	+	4 (4)
			R	-	1 (1)
			S	+	10 (10)
			S	-	85 (86)
VM215	D31	Rbs	Mcc	Tc	100 (100)
			R	R	8 (8)
			R	S	87 (87)
			S	R	5 (5)
			S	S	0 (-)

VM215 (1) p^{recA} clind^r Tc::TcD rbs⁺

D31 (1) p^{recA} clind^r sbmB1

TABLA 2B.
LOCALIZACION DE *sbmB1* CON RESPECTO A *ilv*

DONADOR	RECEPTOR	MARCADOR SELECCIONADO	MARCADORES NO SELECCIONADOS			NUMERO TRANSDUCTANTES (FRECUENCIA)	
			Mcc	Rbs	Ilv	100	(100)
VM11	TP210D	Tc	R	-	-	12	(12)
			R	-	+	6	(6)
			R	+	-	80	(80)
			R	+	+	1	(1)
			S	-	-	2	(2)
			S	-	+	9	(9)
			S	+	-	10	(10)
			S	+	+	0	(-)

DONADOR	RECEPTOR	MARCADOR SELECCIONADO	MARCADORES NO SELECCIONADOS			NUMERO TRANSDUCTANTES (FRECUENCIA)	
			Mcc	Rbs	Tc	100	(100)
VM11	TP2100	Ilv	R	-	S	0	(-)
			R	-	R	6	(6)
			R	+	S	1	(1)
			R	+	R	1	(1)
			S	-	S	78	(78)
			S	-	R	6	(6)
			S	+	S	10	(10)
			S	+	R	0	(-)

VM11 (C) p. recat. clindl. rfd. Tn10. *sbmB1*

TP2100 *ilv*

TABLA 2C.
LOCALIZACION DE *sbmB1* CON RESPECTO A *dnaA*

DONADOR	RECEPTOR	MARCADOR SELECCIONADO	MARCADORES NO SELECCIONADOS		NUMERO TRANSDUCTANTES (FRECUENCIA)
			Mcc	Dna(ts)	
VM11	C11	Tc 30°C	Mcc	Dna(ts)	513 (100)
			R	+	488 (95,1)
			R	-	0 (-)
			S	+	9 (1,8)
			S	-	16 (3,1)
C18	D31	Tc 30°C	Mcc	Dna(ts)	535 (100)
			R	+	66 (12,3)
			R	-	8 (1,5)
			S	+	3 (0,6)
			S	-	458 (85,6)

VM11 (λ p recA⁺ clind^r zid:Tn10 *sbmB1*

C11 (λ p recA⁺ clind^r *dnaA46* *recA*⁻

C18 (λ p recA⁺ clind^r zid:Tn10 *dnaA46*

D31 (λ p recA⁺ clind^r *sbmB1*

TABLA 2D.
LOCALIZACION DE *sbmB1* CON RESPECTO A *recF*

DONADOR	RECEPTOR	MARCADOR SELECCIONADO	MARCADORES NO SELECCIONADOS		NUMERO TRANSDUCTANTES (FRECUENCIA)
			Mcc	RecF	
VM11	V5702	Tc	Mcc	RecF	464 (100)
			R	+	439 (94,6)
			R	-	0 (-)
			S	+	8 (1,7)
			S	-	17 (3,7)
V5702.1	D31	Tc	Mcc	RecF	162 (100)
			R	+	12 (7,4)
			R	-	3 (1,9)
			S	+	0 (-)
			S	-	147 (90,7)

VM11 (λ p recA⁺ clind^r zid:Tn10 *sbmB1*

V5702 *recF143*

V5702.1 zid:Tn10 *recF143*

D31 (λ p recA⁺ clind^r *sbmB1*

4.3.3. Localización genética de la mutación *sbmB2*.

Puesto que la mutación *sbmB2* producía idéntico fenotipo que la mutación *sbmB1* asumimos que debía afectar al mismo gen y por lo tanto debía estar muy próxima a *sbmB1*. Por esta razón comprobamos directamente si la mutación *sbmB2* estaba a la izquierda de *recF143*. Los resultados de la Tabla 2E muestran que efectivamente este es el caso.

Con el fin de establecer cual de las dos mutaciones aisladas, *sbmB1* o *sbmB2*, estaba más próxima a *recF* se realizaron los siguientes cruzamientos. Las estirpe D31 (*sbmB1*) fue transducida con un lisado de fago P1 crecido sobre VM41 (*sbmB2* *cid::Tn10*) y la estirpe D41 (*sbmB2*) lo fue con un lisado P1 crecido sobre VM11 (*sbmB1* *cid::Tn10*). Se seleccionaron, en ambos casos, los transductantes Tc^R que fueron analizados para el marcador *MccB17*. Los resultados de la Tabla 2F muestran que todos los transductantes Tc^R eran *Mcc*^R. Hay que resaltar que no se obtuvo ni un solo recombinante y, por consiguiente, no se pudo establecer el orden de *sbmB1* y *sbmB2* con respecto a *recF*. Este resultado indicaba claramente que ambas mutaciones estaban muy próximas, y afectaban quizá al mismo triplete.

Todos los resultados obtenidos en estos estudios genéticos están representados de forma esquemática en la Figura 5. De estos resultados concluimos que las mutaciones *sbmB1* y *sbmB2* están situadas a la izquierda del locus *recF* y muy próximas entre si.

TABLA 2E.
LOCALIZACION DE *sbmB2* CON RESPECTO A *recF*

DONADOR	RECEPTOR	MARCADOR SELECCIONADO	MARCADORES NO SELECCIONADOS		NUMERO TRANSDUCTANTES (FRECUENCIA)	
			Mcc	RecF	208	(100)
V5702.1	D41	Tc	R	+	13	(6,2)
			R	-	1	(0,5)
			S	+	0	(-)
			S	-	194	(93,3)

V5702.1 *zid:Tn10 recF143*

D41 (Δ p *recA*⁺ *clind*) *sbmB2*

TABLA 2F.
LOCALIZACION RELATIVA DE *sbmB1* Y *sbmB2*

DONADOR	RECEPTOR	MARCADOR SELECCIONADO	MARCADORES NO SELECCIONADOS		NUMERO TRANSDUCTANTES	
			Mcc		528	
VM11	D41	Tc			528	0
			R		528	0
			S		0	0
VM41	D31	Tc			480	0
			R		479	0
			S		0	0

VM11 (Δ p *recA*⁺ *clind*) *zid:Tn10 sbmB1*

D41 (Δ p *recA*⁺ *clind*) *sbmB2*

VM41 (Δ p *recA*⁺ *clind*) *zid:Tn10 sbmB2*

D31 (Δ p *recA*⁺ *clind*) *sbmB1*

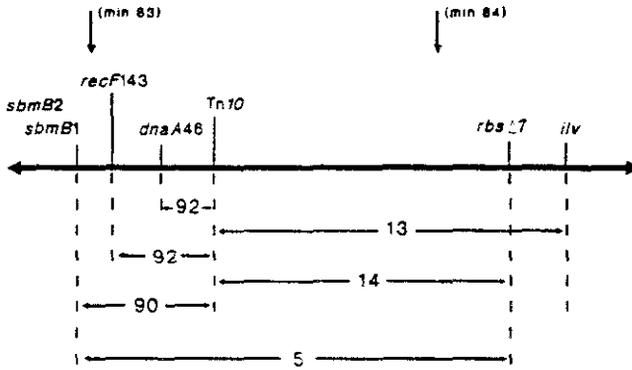


Figura 5. Disposición de los marcadores empleados en la localización genética de *sbmB1* y *sbmB2*. Los números representan los tantos por ciento de cotransducción entre los respectivos marcadores.

4.3.4. Localización de la mutación *sbmBI* con relación al gen *gyrB*.

Los datos genéticos expuestos hasta el momento, sugerían que la mutación *sbmBI* está muy próxima a *gyrB* y, probablemente, dentro de este gen. El locus *gyrB* codifica la subunidad B de la DNA girasa (DNA Topoisomera II de *E.coli*) (Gellert, *et al.* 1976(a)), que es una de las enzimas que controlan y modifican el estado topológico del DNA. Mutaciones de este gen confieren resistencia a cumarinas (novobiocina y coumermicina A₁) (Gellert, *et al.* 1976(b); Ryan, 1976; Orr, *et al.* 1979), una familia de antibióticos que inhiben competitivamente la unión del ATP a la subunidad B de la DNA girasa (Sugino *et al.*, 1978; Staudenbauer y Orr, 1981).

Con el fin de establecer la localización de *sbmBI* con respecto a *gyrB* aislamos mutantes espontáneos resistentes a coumermicina A₁ (Cou^r) de la estirpe RYC1010. El grado de ligamiento entre la mutación *gyrB320*(Cou^r) de uno de estos mutantes (RYC1020) y la mutación *sbmBI* se determinó mediante experimentos de transducción. Para ello se infectó la estirpe RYC1020 (Tc^s Cou^r *sbmB*^r(Mcc^s)) con un lisado de fago P1 crecido sobre la estirpe VM11 (Tc^r Cou^s *sbmBI*(Mcc^r)). Se seleccionaron los transductantes Tc^r, los cuales se analizaron para los marcadores no seleccionados. Posteriormente, se infectó la estirpe D31 (Tc^s Cou^s *sbmBI*(Mcc^r)) con un lisado crecido sobre la estirpe RYC1020.1 (Tc^r Cou^r *sbmB*^r(Mcc^s)), obtenida en el cruzamiento anterior. Como antes los transductantes Tc^r se analizaron para los marcadores no seleccionados.

Los resultados obtenidos, mostrados en la Tabla 2G, indican de forma inequívoca que ambas mutaciones están estrechamente asociadas. Además, el análisis de los transductantes obtenidos en el segundo cruzamiento, sugiere que *sbmBI* está a la izquierda de la mutación *gyrB320*(Cou^r). En efecto, la clase minoritaria en el segundo cruzamiento, la que exige un

TABLA 2G.
LOCALIZACION DE *sbmB1* CON RESPECTO A *gyrB(Cou)*

DONADOR	RECEPTOR	MARCADOR SELECCIONADO	MARCADORES NO SELECCIONADOS		NUMERO TRANSDUCTANTES (FRECUENCIA)
			Mcc	Cou	
VM11	RYC1020	Tc	Mcc	Cou	377 (100)
			R	R	3 (0,8)
			R	S	343 (91)
			S	R	28 (7,4)
			S	S	3 (0,8)
RYC1020.1	D31	Tc	Mcc	Cou	362 (100)
			R	R	7 (2)
			R	S	40 (11)
			S	R	315 (87)
			S	S	0 (-)

VM11 (: p recA* clind) xid:tn10 *sbmB1*

RYC1020 (: p recA* clind) *gyrB320(Cou)*1*

RYC1020.1 (: p recA* clind) xid:tn10 *gyrB320(Cou)*1*

D31 (: p recA* clind) *sbmB1*

doble entrecruzamiento, la constituyen los transductantes $Mcc^S Cou^S$. Los resultados del cruzamiento recíproco no confirman esta conclusión de forma concluyente, pero tampoco la contradicen. Uno de los transductantes minoritarios $Tc^R Cou^R Mcc^R$, denominado RYC1030, portador de las mutaciones *sbmB1* y *gyrB320*, se empleó en el clonado de las mismas, como se describe a continuación.

En resumen, estos resultados confirmaron un ligamiento estrecho entre la mutación *sbmB1* y el gen *gyrB*, situado en el minuto 83 del mapa genético de *E.coli*.

4.4. CLONADO DE LAS MUTACIONES *sbmB1* Y *gyrB320*.

4.4.1. Análisis de dominancia/recesividad de las mutaciones *sbmB1* y *gyrB320*.

Los resultados de los cruzamientos anteriores indicaban que las mutaciones *sbmB1* y *sbmB2* estaban a la izquierda de *recF143*, muy próximas a la mutación *gyrB320*(Cou^R), probablemente a su izquierda. Por consiguiente, *sbmB1* y *sbmB2* podrían afectar al locus *gyrB* o a otro situado inmediatamente a su izquierda.

Partiendo de la hipótesis de que las mutaciones *sbmB1* y *gyrB320*(Cou^R) afectaban al gen *gyrB*, transformamos las estirpes D31 y RYC1020 con el plásmido pMK47 (Km^R) y examinamos los fenotipos de los transformantes para ver si esas mutaciones eran dominantes o recesivas sobre el tipo silvestre. El plásmido pMK47 es un derivado del plásmido multicopia pKC16 en el que se ha clonado el gen *gyrB* (Mizuuchi, *et al.* 1984). Los transformantes Km^R de la estirpe D31 (Mcc^R) recuperaron la sensibilidad a microcina B17, mientras que los transformantes Km^R de la estirpe RYC1020 (Cou^R) permanecieron Cou^R . En otros términos, la mutación *sbmB1* se comportaba como recesiva y la mutación

gyrB320 como dominante. Sorprendentemente, al transformar estirpes silvestres con el mismo plásmido encontramos que los transformantes Km^R , aunque conservaban la sensibilidad a microcina B17, eran resistentes a la coumermicina A_1 . En otras palabras, *gyrB* en alto número de copias confiere resistencia a coumermicina A_1 .

Estos resultados sugerían que *sbmBI* afectaba verdaderamente a *gyrB*. Por otra parte, dado su carácter aparentemente recesivo, era claro que no podía ser clonada por selección directa. Sin embargo, la mutación *sbmBI* podría clonarse dentro de un fragmento que contuviese el gen *gyrB*, seleccionando para resistencia a coumermicina A_1 .

4.4.2. Clonado *in vivo* de las mutaciones *sbmBI* y *gyrB320*.

Teniendo en cuenta los resultados y consideraciones anteriores, decidimos clonar *gyrB301* y la región cromosómica adyacente en un vector multicopia, seleccionando clones resistentes a coumermicina A_1 . Para ello se utilizó el plásmido pGE109 que contiene el mini-MudII4042. Las bases teórica y práctica de este método se describen en detalle en el apartado 3.10.1 de Métodos. Concretamente, se procedió como sigue. Células pop3001.6 *Muets sbmBI gyrB320* (Mec^R Cou^R) se transformaron con pEG109, seleccionando los clones Cm^R . Después de incubar a 42°C la replicación y la transposición de Mu se recuperaron las partículas virales con las que se infectó pop3001.6 *Muets* seleccionando los clones Cm^R Cou^R , a 30°C. Estos clones debían albergar plásmidos constituidos por el mini-Mu replicón MudII4042 y fragmentos de DNA cromosómico de la región *gyrB* de RYC1030 (*sbmBI gyrB320*).

En efecto, cuando se aislaron los plásmidos de varios de estos clones y se digirieron con diferentes enzimas de restricción, encontramos que todos ellos contenían un fragmento cromosómico de 12 - 14 kb cuyo mapa físico coincide con el de la región genómica que contiene el gen *gyrB* (Hansen y Meyenburg, 1979; Kohara *et al.*, 1987). Al introducir estos plásmidos en otras estirpes se encontró que, como se esperaba, no modificaban el fenotipo Mcc^R de la estirpe D3 (*Mucts*). En cambio alteraban el fenotipo Mcc^S de RYC1000 (*Mucts*), la cual adquirió una débil resistencia a microcina B17 (fenotipo Mcc^T). De hecho esta resistencia era dos veces superior a la exhibida por los controles isogénicos silvestres. Volveremos sobre este fenotipo peculiar Mcc^T más adelante.

De estos resultados, concluimos que los plásmidos aislados portaban realmente el gen *gyrB* de la estirpe RYC1030 (*sbmB1 gyrB320*) y secuencias adyacentes de DNA cromosómico.

4.4.3. Subclonado de las mutaciones *sbmB1* y *gyrB320*: Construcción de los plásmidos pCID500 y pCID509

A partir de uno de los derivados mini-Mu Cou^R analizados clonamos un fragmento *Bam*HI de 8,5 kilobases en la diana *Bam*HI del pBR322. Los plásmidos pCID500 y pCID509 (Figura 6A y 6J) resultantes de clonar este fragmento en las dos orientaciones posibles, complementaban la mutación *gyrB(ts)* para crecimiento a 42°C, y la mutación *recF143* para resistencia a radiación UV, y además conferían resistencia a coumermicina A₁ a estirpes Cou^S. Estos plásmidos no modificaban la resistencia a *MccB17* de estirpes *sbmB1*, y conferían el fenotipo Mcc^T de tolerancia a *MccB17* a estirpes silvestres.

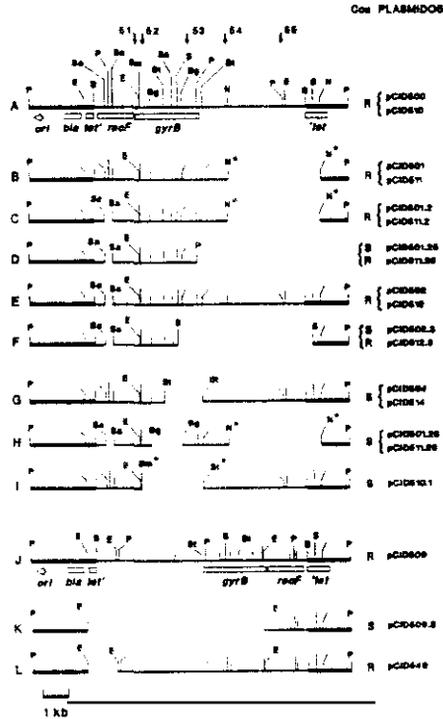


Figura 6. Mapa físico y características relevantes de los plásmidos empleados en este trabajo. La columna Cou indica el fenotipo coumermicina A, que cada plásmido confiere a células *gyrB*⁺ (Cou⁺) en presencia de 16 μ g/ml de coumermicina A. Las líneas gruesas representan secuencias de pBR322, y las finas secuencias de DNA cromosómico. Las fechas indican la localización de transposones Tn5 insertos en el plásmido pCIB500. Los símbolos significan: B: *Bam*HI; Bg: *Bgl*II; E: *Eco*RI; N: *Nru*I; P: *Pvu*II; S: *Sa*I; Sa: *Sac*II; SII: *Sma*I; St: *Stu*I. El asterisco indica dianas de restricción que se pierden en el correspondiente plásmido de delección.

Estos resultados indicaban que el fragmento de 8,5 kb contenía los genes *recF* y *gyrB*, y muy probablemente la mutación *sbmB1*.

La confirmación de las conclusiones anteriores se obtuvo como sigue. El nivel de resistencia a MccB17 expresado por la estirpe LE316 (*gyrB(ts)*) (Orr y Staudenbauer, 1981) portadora de estos plásmidos (pCID500 y pCID509) dependía de la temperatura a la que las células eran crecidas. En concreto, los transformantes Ap^R presentaban el fenotipo Mcc^T (tolerancia a MccB17) a 30°C, mientras que a 42°C eran tan resistentes al antibiótico como las estirpes *sbmB1* (fenotipo Mcc^R).

4.4.4. Las mutaciones *sbmB1* y Cou^R afectan al gen *gyrB* verdaderamente.

Con el fin de confirmar la localización de *sbmB1* en *gyrB*, mutagenizamos el plásmido pCID500 con el transposón Tn5 tal y como se describe en Métodos (apartado 3.4.1). Así obtuvimos plásmidos derivados de pCID500 con inserciones Tn5 dentro y fuera del gen *gyrB* (Figura 6A).

Con estos derivados transformamos varias estirpes isogénicas (Cou^S Mcc^S, Cou^R Mcc^S, Cou^S Mcc^R y Cou^R Mcc^R) y analizamos los fenotipos de los transformantes. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Los plásmidos con el transposón Tn5 fuera de *gyrB* no modificaban el fenotipo microcina de las estirpes Mcc^R, pero sí el de las estirpes Mcc^S. Estas últimas adquirían el fenotipo Mcc^T de tolerancia al antibiótico. Los transformantes Mcc^T eran aproximadamente dos veces más tolerantes a MccB17 que una estirpe Mcc^S. Como se esperaba todos los transformantes eran Cou^R.

Los plásmidos con el transposón Tn5 dentro de *gyrB* no cambiaban el fenotipo MccB17 de la estirpe receptora, ya fuese ésta Mcc^A o Mcc^S, y tampoco su fenotipo Cou, ya fuese Cou^A o Cou^S. Es decir, el fenotipo Cou^A conferido por el plásmido pCID500 a una estirpe Cou^S, desaparece en aquellos derivados pCID500::Tn5 que tienen el transposón dentro del gen *gyrB*.

A continuación, analizamos el fenotipo conferido por los plásmidos pCID500::Tn5 a la estirpe LE316 (*gyrB(ts)*). Como se esperaba, los plásmidos con el transposón Tn5 fuera de *gyrB* complementan a la mutación *gyrB(ts)*. Es decir, las células transformadas crecían a la temperatura restrictiva de 42°C. Además, a esta temperatura, manifiestan un fenotipo de resistencia a MccB17 (Mcc^A), idéntico al exhibido por la estirpe control *sbmB1* (pCID500). Cuando las condiciones de crecimiento eran las permisivas (30°C), entonces los transformantes LE316 (pCID500::Tn5) presentaban el fenotipo Mcc^T previamente definido. En cambio, los plásmidos pCID500::Tn5 con el transposón dentro de *gyrB* no modificaban, a 30°C, el fenotipo Mcc^S de la estirpe LE316.

Estos resultados demostraron claramente que las mutaciones *sbmB1* y *gyrB320* están ambas dentro del gen *gyrB*. Por ello, a partir de ahora nos referiremos a la mutación *sbmB1* con la denominación de *gyrB301*. Análogamente, la mutación *sbmB2* se denominará *gyrB302*.

El fenotipo Mcc^T, más próximo al Mcc^S que al Mcc^A, puede ser reinterpretado a la luz del conjunto de resultados obtenidos hasta aquí. Ese fenotipo se manifiesta siempre en células que contienen ambos alelos, el silvestre *gyrB^A* y el mutado *gyrB301*. De hecho el nivel de resistencia a la microcina depende del cociente entre el número de alelos mutados y de alelos silvestres en la célula. Cuanto mayor es esa relación, mayor es el nivel de tolerancia, y cuanto más pequeño es el cociente, más se aproxima el fenotipo Mcc^T al

HUESPED	FENOTIPO DEL HUESPED	FENOTIPO DEL TRANSFORMANTE		
		PLASMIDO SIN Tn5	PLASMIDO CON Tn5 FUERA DE <i>gyrB</i>	PLASMIDO CON Tn5 DENTRO DE <i>gyrB</i>
LE316 <i>gyrB(ts)</i>	NO CRECE A 42°C Cou ^S Mcc ^S A 30°C	CRECE A 42°C Cou ^R Mcc ^T A 30°C Cou ^R Mcc ^R A 42°C	CRECE A 42°C Cou ^R Mcc ^T A 30°C Cou ^R Mcc ^R A 42°C	NO CRECE A 42°C Cou ^R Mcc ^S A 30°C
RYC1010	Cou ^S Mcc ^S	Cou ^R Mcc ^T	Cou ^R Mcc ^T	Cou ^S Mcc ^S
RYC1020	Cou ^R Mcc ^S	Cou ^R Mcc ^T	Cou ^R Mcc ^T	Cou ^R Mcc ^S
D31	Cou ^S Mcc ^R	Cou ^R Mcc ^R	Cou ^R Mcc ^R	Cou ^S Mcc ^R
RYC1030	Cou ^R Mcc ^R	Cou ^R Mcc ^R	Cou ^R Mcc ^R	Cou ^R Mcc ^R

Tabla 3. Fenotipos conferidos por plásmidos pCID500::Tn5, con el transposón inserto dentro o fuera de *gyrB*, a las estirpes RYC1010 (*gyrB*⁻), RYC1020 (*gyrB320*(Cou^R)), D31 (*gyrB301*(Mcc^R)), RYC1030 (*gyrB320*(Cou^R) *gyrB301*(Mcc^R)) y LE316 (*gyrB*(*ts*)). Los símbolos significan: Cou^S, sensibilidad a coumermicina A₁; Cou^R, resistencia a coumermicina A₁; Mcc^S, sensibilidad a MccB17; Mcc^T, tolerancia a MccB17; Mcc^R, resistencia a MccB17. La tolerancia relativa a MccB17 establecida por el método de la dilución crítica es: Mcc^S: 1; Mcc^T: 2; Mcc^R: 10.

exhibido por células silvestres. Ello indica, en contra de lo sugerido previamente, que el alelo mutado no es recesivo respecto al silvestre. Más bien estos alelos son codominantes.

4.5. CLONADO DEL ALELO *gyrB* SILVESTRE.

Para clonar el gen silvestre isogénico de las mutaciones *gyrB* que hemos seleccionado, seguimos el método de Saarilahti y Palva, (1985) descrito previamente en el apartado 3.10.2. Este método permite la transferencia *in vivo* de genes cromosómicos a un plásmido, siempre que éste porte un gen homólogo al que se quiere clonar. Además se requiere que el alelo presente en el plásmido sea distinguible del cromosómico, es decir, que confieran fenotipos distintos.

La técnica aprovecha el hecho siguiente bien conocido: el replicón ColE1 necesita la actividad DNA polimerasa I de *E.coli* para replicarse. El plásmido ColE1 y sus derivados (como pBR322) no pueden mantenerse como replicones autónomos en los mutantes PolA⁻, a no ser que se integren en el cromosoma. Esta integración es posible si el plásmido porta una secuencia cromosómica y la bacteria posee las funciones necesarias a la recombinación homóloga. En este caso, la integración plasmídica se produce por un suceso de recombinación entre la secuencia común del plásmido y del cromosoma. Estos integrados pueden identificarse si el plásmido posee un marcador selectivo específico.

A continuación, el cointegrado plasmídico más las secuencias cromosómicas adyacentes se transfieren mediante un fago transductor a una estirpe RecA⁺ PolA⁻, en donde el cointegrado plasmídico se resuelve por recombinación homóloga, generando así plásmidos autónomos, unos portando el alelo original, otros el alelo cromosómico. Se trata ahora de

distinguir entre las dos clases de plásmidos aprovechando el conocimiento previo sobre las propiedades físicas o fenotípicas de los alelos en causa.

Concretamente procedimos del modo siguiente: El alelo *polA5* ($PolA^-$) se transdujo a la estirpe RYC1010 *gyrB*^R; como se indica en Métodos. Un transductante $PolA^-$ se transformó con el plásmido pCID500 (*gyrB320*(*Cou*^R) *gyrB301*(*Mcc*^R)) seleccionando los clones *Ap*^R. Sobre uno de estos transformantes se hizo un lisado P1 con el que se transdujo RYC1010 seleccionando los clones *Ap*^R. Unas decenas de estos clones se reaislaron y probaron para los fenotipos *Cou* y *Mcc*. Como se esperaba todos eran *Cou*^R. Algunos eran *Mcc*^T, como pCID500, y otros claramente *Mcc*^S. Se guardó el plásmido de uno de éstos al que se denominó pCID510 (Figura 6A). Este plásmido tenía la misma estructura física que pCID500. Al reintroducirlo en una estirpe *Mcc*^S no modificaba este fenotipo. En cambio rendía sensibles a las estirpes *Mcc*^R. Concluimos que pCID510 portaba el alelo silvestre *gyrB*^R de RYC1010.

4.6. CLONADO DE LA MUTACION *gyrB302*.

Para clonar la mutación *sbmB2* seguimos el mismo procedimiento de Saarilahti y Palva, (1985), pero utilizando en este caso el plásmido pCID510 como sonda y vector. Con este plásmido se transformó un derivado *polA5* de D41 (RYC1010 *sbmB2*), seleccionando los transformantes *Ap*^R. Sobre uno de ellos se hizo el lisado P1 correspondiente con el que se transdujo el mutante D41. Los transductantes *Ap*^R se examinaron para el fenotipo *MccB17*. Como antes, los había *Mcc*^S y *Mcc*^R. Uno de los transductantes *Mcc*^R se purificó y se extrajo el plásmido que contenía. Este plásmido, denominado pCID520 (Figura 6A), tenía

la misma estructura física que pCID500 y pCID510. Como pCID500, sólo confería una débil tolerancia a MccB17 cuando se introducía en estirpes Mcc^S y, como ya hemos dicho, no modificaba en absoluto el nivel de resistencia de las estirpes Mcc^R. Concluimos que el plásmido pCID520 contenía la mutación *gyrB302*.

4.7. LOCALIZACION FISICA DE LAS MUTACIONES *gyrB301* y *gyrB302* DENTRO DE *gyrB*.

Para determinar la región de *gyrB* afectada por las mutaciones *gyrB301* y *gyrB302* decidimos, construir genes híbridos que llevaran diferentes fragmentos del alelo *gyrB*^R y de cada uno de los alelos mutados, y examinar los fenotipos que conferían a estirpes Mcc^S y Mcc^R. Sobre la base de los conocimientos previamente adquiridos debería así poderse identificar el fragmento físico que contenía a cada una de esas mutaciones.

Dado el gran tamaño de los derivados pCID500, pCID510 y pCID520, y el elevado número de dianas de restricción existentes en estos plásmidos se imponía preparar derivados más adecuados a nuestro fin, lo que se hizo del modo siguiente.

4.7.1. Aislamiento de derivados delecionados de pCID500, pCID510 y pCID520.

Construimos, en primer lugar, los plásmidos pCID501, pCID511 y pCID521 (Figura 6B), eliminando el fragmento *Nru*I de 3,8 kb de pCID500 (*gyrB301 gyrB320*(Cou^R)), pCID510 (*gyrB*^R) y pCID520 (*gyrB302*) respectivamente. Esta deleción no afecta ni a *gyrB*

ni a *recF*. Por consiguiente, estos plásmidos derivados confieren el mismo fenotipo MccB17 que el descrito previamente para los plásmidos originales.

Los plásmidos pCID501.2, pCID511.2 y pCID521.2 (Figura 6C) se construyeron a partir de pCID501, pCID511 y pCID521, respectivamente, eliminando el fragmento *SacII* de 340 pb situado dentro de *recF* que contiene una diana *PvuII*. Esta manipulación no afecta al gen *gyrB* y, por lo tanto, los nuevos derivados confieren el fenotipo MccB17 propio del alelo *gyrB* que portan.

4.7.2. Los genes híbridos y sus fenotipos.

Con el fin de localizar físicamente la mutación *gyrB301*, construimos genes híbridos *gyrB*, *in vitro*, intercambiando los fragmentos *BglIII* y *StuI* de los plásmidos pCID501 y pCID511, y los fragmentos *SacII* y *PvuII* de pCID501.2 y pCID511.2. A continuación, transformamos células isogénicas *gyrB*⁺ (RYC1000) y *gyrB301* (D3) con los plásmidos híbridos construidos y analizamos la sensibilidad a MccB17 de los transformantes. Los resultados obtenidos (ver Figura 7) indican que los genes híbridos portadores del extremo 3' del alelo mutante *gyrB301*, concretamente del segmento *PvuII* (posición 2247) – *StuI* (posición 2460) de 213 pb (Adachi *et al.*, 1987), no modifican el fenotipo Mcc^s de la estirpe *gyrB301*, pero confieren resistencia parcial a MccB17 (fenotipo Mcc^r) en la estirpe *gyrB*⁺. En cambio, los genes híbridos portadores del correspondiente segmento *PvuII* – *StuI* del alelo silvestre, confieren el fenotipo Mcc^s a la estirpe portadora, ya sea ésta *gyrB301* o *gyrB*⁺. El segmento considerado, *PvuII* – *StuI* de 213 pb, contiene la secuencia que codifica los 55 aminoácidos del extremo carboxilo de la proteína GyrB (Yamagishi *et al.*, 1986; Adachi *et al.* 1987).

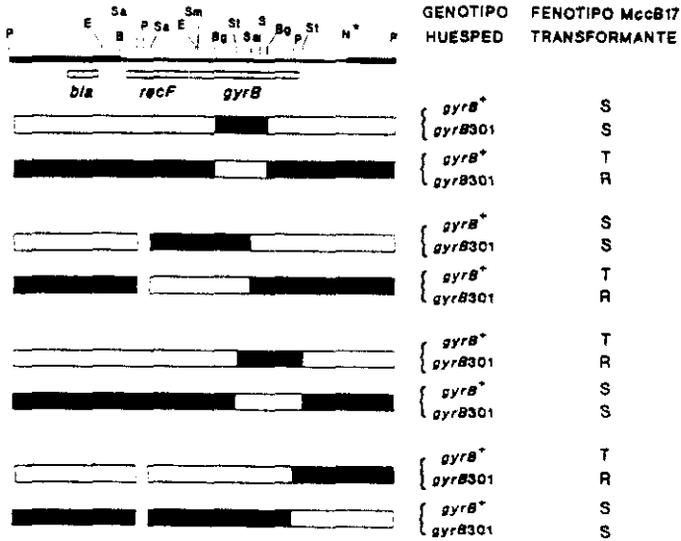


Figura 7. Plásmidos híbridos construidos por intercambio de fragmentos de restricción *Bgl*III, *Sac*II, *Stu*I y *Pvu*II de los plásmidos pCID501 (*gyrB301*) y pCID511 (*gyrB*⁺), o de sus derivados de delección. El fenotipo transformante indica la resistencia relativa a MccB17 de las células transformantes, establecida por el método de la dilución crítica (Mcc^S: 1; Mcc^T: 2; Mcc^R: 10). Las barras negras representan secuencias de pCID501 o pCID501.2, y las blancas secuencias de pCID511 o pCID511.2. Los símbolos significan: B: *Bam*HI; Bg: *Bgl*III; E: *Eco*RI; N: *Nru*I; P: *Pvu*II; S: *Sal*I; Sa: *Sac*II; Sm: *Sma*I; St: *Stu*I.

De estos resultados concluimos que la mutación *gyrB301* se localiza en el extremo 3' de *gyrB*, a la derecha de la diana *PvuII* (posición 2247). Además, estos resultados excluyen la existencia de una segunda mutación a la izquierda de la diana *PvuII* (posición 2247), hacia el extremo 5' del gen.

Basados en estos resultados y los datos genéticos que revelaban un ligamiento estrecho entre las mutaciones *gyrB301* y *gyrB302*, decidimos construir genes híbridos intercambiando los fragmentos *PvuII* de los plásmidos pCID511.2 (*gyrB'*) y pCID521.2 (*gyrB302*). El análisis del fenotipo *MecB17* conferido por estos plásmidos híbridos a estirpes isogénicas *gyrB'* (RYC1000) y *gyrB302* (D4) indicó que la mutación *gyrB302* se localiza, como *gyrB301*, en el extremo 3' de *gyrB*, a la derecha de la diana *PvuII* (posición 2247).

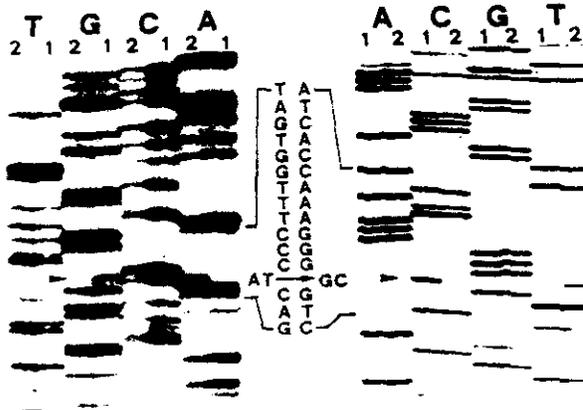
4.8. SECUENCIACION DE LAS MUTACIONES *gyrB301* Y *gyrB302*.

Los fragmentos *PvuII* – *StuI* (213 pb) del extremo 3' de los alelos mutantes y del alelo silvestre de *gyrB* se purificaron en geles de poliacrilamida como se describe en Métodos y se clonaron en la diana única *EcoRV* de la forma replicativa del fago M13gt130 en las dos orientaciones posibles (los cortes producidos por *PvuII*, *StuI* y *EcoRV* tienen extremos romos). La selección de los clones recombinantes se hizo de la manera convencional, identificando placas de lisis blancas en presencia del indicador de β -galactosidasa, X-Gal. Las moléculas de DNA de cadena única se prepararon por el método habitual y se utilizaron los cebadores universales para iniciar la reacción de polimerización (ver Métodos). Las condiciones de la reacción de secuenciación de las dos cadenas de DNA de cada fragmento y de su detención por dideoxinucleótidos fueron las descritas por Sanger

et al. (1977). La secuencia encontrada en el fragmento *PvuII* – *SmaI* del alelo silvestre era idéntica a la encontrada por Yamagishi *et al.* (1986) y Adachi *et al.* (1987). En cambio como puede constatarse en la Figura 8, las secuencias de los alelos mutantes *gyrB301* y *gyrB302* diferían en el mismo nucleótido respecto de la secuencia silvestre. En ambos casos el par de bases AT en posición 2251 del gen silvestre está sustituido por el par GC. Esta transición afecta al primer nucleótido del codón 751 del gen y genera el cambio TGG a CGG. Es decir, el residuo Trp₇₅₁ es sustituido por un residuo Arg (Figura 8).

Hay que resaltar que las mutaciones *gyrB301* y *gyrB302* fueron aisladas en condiciones diferentes.

A)



B)

Secuencia: *gyrB*⁺

```

2240           2250           2260           2270
ACCCGGAACAGCTGTGGGAAACCACTATGGACCCG
ProGluGlnLeuTrpGluThrThrMetAspPro

```

Secuencia: *gyrB301*(Mcc⁺)

```

2240           2250           2260           2270
ACCCGGAACAGCTGCGGGAAACCACTATGGACCCG
ProGluGlnLeuArgGluThrThrMetAspPro

```

Figura 8. Comparación de las secuencias del gen *gyrB* y del mutante *gyrB301*. A): El lado derecho de la figura muestra parte de la secuencia de la cadena codificante del fragmento *PvuII* (posición 2247) – *StuI* (posición 2460) y el izquierdo, la secuencia de la cadena complementaria. Los símbolos representan: A, C, G y T; carriles de las reacciones de secuenciación con ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP, respectivamente; 1 carriles correspondientes a la secuencia del alelo mutante *gyrB301*; 2: carriles correspondientes a la secuencia de alelo silvestre *gyrB*⁺. Las flechas señalan la posición del nucleótido 2251 cambiado. B): Secuencia de la región 3' de los alelos *gyrB301* y *gyrB*⁺, mostrando el cambio Trp₂₅₁ → Arg.

B) EL GEN *gyrB* Y LA RESISTENCIA A COUMERMICINA A₁.

Como ya hemos indicado la subunidad B de la DNA girasa es el blanco de acción de las cumarinas. De hecho el gen *gyrB* se identificó gracias a las mutaciones de resistencia a estos antibióticos. También hemos descrito el aislamiento de mutantes Cou^R. La mutación *gyrB320*(Cou^R) de uno de ellos (RYC1020), se utilizó como marcador selectivo en el experimento de clonado del alelo *gyrB301*(Mcc^R), en base a la hipótesis falsa por la cual asumíamos implícitamente la dominancia de las mutaciones Cou^R. No obstante, clonamos con éxito la mutación *gyrB301* a partir de la estirpe RYC1030 (*gyrB301 gyrB320*(Cou^R)), utilizando el mini-MudII4042 y seleccionando transductantes Cou^R de una estirpe Cou^S (pop3001.6) (ver apartado 4.4.2).

Los resultados del primer experimento de sustitución alélica mediada por P1, cuyo objetivo era clonar el alelo *gyrB* silvestre de la estirpe RYC1010, obligaron a replantearnos la cuestión de la dominancia de los alelos Cou^R. De hecho este replanteamiento nos ha conducido al descubrimiento de un nuevo mecanismo de resistencia a cumarinas. Recordemos ese experimento y sus resultados.

El plásmido pCID500 (Ap^R, *gyrB301*, *gyrB320*(Cou^R)) se introdujo en la estirpe RYC1010 *polA5 gyrB*^R. Sobre un clón Ap^R se preparó un lisado del fago P1 con el que se infectó RYC1010 *polA*^R *gyrB*^R seleccionando los transductantes Ap^R. En estos clones (PolA^R) se reconstituyeron plásmidos por recombinación homóloga. Unas centenas de esos clones se resuspendieron juntos y se extrajeron sus plásmidos, con los que se retransformó la estirpe RYC1010, seleccionando como antes los clones Ap^R. Cuando estos transformantes Ap^R se probaron para resistencia a MccB17 y coumermicina A₁ encontramos que unos eran Mcc^R y otros Mcc^S como esperábamos. En cambio todos ellos eran Cou^R, un resultado

realmente inesperado. La existencia de plásmidos *Mcc^s* indicaba que la mutación *gyrB301* no estaba en estos plásmidos, es decir que la sustitución génica de *gyrB* había sido un éxito. Normalmente estos plásmidos, o al menos la mayoría de ellos, no deberían contener la mutación *gyrB320*, y sin embargo todos ellos conferirían el fenotipo *Cou^r*.

Dos hipótesis podrían ser avanzadas para explicar estos resultados:

a) La estirpe RYC1010 contiene una mutación *Cou^r* que sólo se manifestaría en alto número de copias.

b) El gen *gyrB^r* en alto número de copias confiere resistencia a coumestricina A₁.

Estas hipótesis se pusieron a prueba como se describe a continuación.

4.9. CLONADO DEL GEN *gyrB* DE LA ESTIRPE pop3351 (*Cou^s*).

A partir del plásmido pCID510 (*Mcc^s*), generado en el experimento anterior de sustitución alélica, se construyó el derivado deleciónado pCID510.1, que conserva el extremo 5' de *gyrB*, hasta la diana *Sma*I, es decir, los 69 nucleótidos iniciales del gen (Figura 6I). Este plásmido contiene además las secuencias 5' y 3' adyacentes a *gyrB*, que permiten su utilización en experimentos de reemplazamiento alélico. Con pCID510.1 se clonó el gen *gyrB* de la estirpe pop3351 por el procedimiento de Saarihati y Palva, como se hizo previamente para obtener el plásmido pCID510. Una vez más todos los clones Ap^r que se obtuvieron, eran *Cou^r*.

Este resultado podría ser explicado si la hipotética mutación *Cou^r* de RYC1010 clonada en pCID510 estuviese en el pequeño fragmento no deleciónado en pCID510.1, en concreto el segmento de 69 nucleótidos. Por ello decidimos clonar el gen *gyrB* de pop3351 *in vitro*.

Con este fin construimos un derivado de pCID509 eliminando dos de sus fragmentos *EcoRI* como muestra la Figura 6K. El plásmido resultante, pCID509.8, conserva solamente los 6 primeros nucleótidos del extremo 5' de *gyrB*. A este plásmido abierto por la diana *EcoRI* ligamos *in vitro* fragmentos *EcoRI* de 6 a 8 kb de tamaño, generados por una digestión total del cromosoma de pop3351 y purificados por electroforesis en gel de agarosa, como se describe en Métodos (apartado 3.9.3.). Con los plásmidos obtenidos transformamos la estirpe LE316 *recA56 gyrB(ts)*, seleccionando los clones Ap^r que crecían a la temperatura restrictiva (42°C). El análisis de restricción de los plásmidos portados por estos clones demostró que llevaban clonado el gen *gyrB* de pop3351, dentro de un fragmento *EcoRI* de 7.5 kb. Este plásmido, denominado pCID549 (Figura 6L) también confiere resistencia a coumermicina A₁ a una estirpe sensible. El mismo resultado se obtuvo con pMK47, un plásmido que contiene el gen *gyrB* silvestre de un origen diferente (Mizuuchi *et al.*, 1984).

De estos resultados concluimos que la hipótesis de una segunda mutación en *gyrB* es muy improbable, puesto que alelos silvestres *gyrB* pertenecientes a estirpes Cou^s de orígenes diferentes confieren el mismo fenotipo Cou^r. Por consiguiente, la resistencia a coumermicina A₁ se debería a la presencia de numerosos alelos *gyrB* silvestres.

4.10. EFECTO DE LAS DELECCIONES DEL EXTREMO 3' DE *gyrB* EN LA RESISTENCIA A COUMERMICINA A₁.

Durante los experimentos dirigidos a localizar físicamente la mutación *gyrB301* dentro de *gyrB*, construimos genes híbridos intercambiando fragmento *PvuII* de pCID501.2 y

pCID511.2 (Figura 6C). En este experimento obtuvimos plásmidos constituidos únicamente por el fragmento mayor *PvuII* que contiene el origen de replicación y el marcador *bla* (Figura 6D). Estos plásmidos, denominados pCID501.25 y pCID511.25, tienen deletado el extremo 3' del gen *gyrB* desde la diana *PvuII*, es decir, carecen de los 168 nucleótidos finales de este gen. Como cabía esperar, ninguno de estos plásmidos deletados complementaba la mutación *gyrB(ts)* de la estirpe LE316, para crecimiento a 42°C. Sin embargo, constatamos el siguiente hecho sorprendente: los clones portadores de la deleción 3'-*PvuII* del alelo *gyrB320*(Cou^R) (plásmido pCID501.25) eran Cou^S, mientras que los portadores de la misma deleción 3'-*PvuII* del alelo silvestre *gyrB*^{*} (plásmido pCID511.25) eran Cou^R, cuando se crecieron a 30°C. En otras palabras, la eliminación de los 168 nucleótidos finales del extremo 3' de *gyrB*^{*} no afecta a la capacidad del gen de conferir resistencia a coumermicina A₁ cuando está presente en alto número de copias. Sin embargo, la deleción del mismo fragmento del alelo *gyrB320*(Cou^R) provoca la pérdida de esta resistencia.

Un resultado similar obtuvimos con el plásmido pCID540.25 de estructura análoga *gyrB*(3'- Δ *PvuII*), construido a partir de pCID540 (*gyrB*^{*} de pop3351). Este plásmido confiere el mismo fenotipo de resistencia a coumermicina A₁ que pCID511.25.

Estos resultados sugieren que la resistencia conferida por el gen *gyrB*^{*}, en alto número de copias, es debida a la sobreproducción de proteína GyrB, que titularia la coumermicina A₁ intracelular. Esta hipótesis está apoyada muy fuertemente por el hecho de que el gen deletado (3'- Δ *PvuII*) y clonado del alelo silvestre protege como el gen silvestre completo, mientras que el derivado Δ *PvuII* del gen mutado no confiere resistencia en absoluto.

Nos preguntamos si fragmentos más pequeños del extremo 5' de *gyrB*' conservarían la capacidad de proteger a las células de la coumermicina A₁. Con este propósito, deletamos los fragmentos *SalI* y *StuI* del extremo 3', así como el fragmento interno *BglIII* del gen silvestre *gyrB* (Figura 6F, G, H respectivamente). Los derivados de delección *gyrB*(3'- Δ *SalI*) (plásmido pCID512.3) también conferían resistencia al antibiótico. Sin embargo los derivados *gyrB*(3'- Δ *StuI*) y *gyrB*(3'- Δ *BglIII*) (plásmidos pCID514 y pCID511.26, respectivamente) habían perdido esta propiedad.

En paralelo, construimos los derivados de delección homólogos 3'- Δ *SalI*, 3'- Δ *StuI* y 3'- Δ *BglIII* en el alelo mutado *gyrB320* (plásmidos pCID502.3, pCID504 y pCID501.26). Ninguno de estos plásmidos confería resistencia al antibiótico a células Cou^s.

Para determinar si la pérdida de resistencia de los truncados *gyrB320* era debida a la degradación de los polipéptidos que sintetizan, examinamos su estabilidad en maxicélulas. Los productos plasmídicos fueron marcados con [³⁵S]-metionina en experimentos de pulso, y de pulso y caza, y analizados en genes de poliacrilamida-SDS como se describe en Métodos. La Figura 9 muestra las proteínas generadas por estos plásmidos portadores de genes truncados *gyrB*, tanto del alelo silvestre como del mutado. Todos los plásmidos analizados sintetizan polipéptidos estables del tamaño esperado: 84 kDa para los derivados *PvuII*, 55 kDa para los *SalI*, 43 kDa para los *BglIII* y 36.5 kDa para los *StuI* (Figura 9). El producto de 36,5 kDa, sintetizado por los derivados de delección 3'- Δ *StuI*, es un polipéptido híbrido constituido por los 318 aminoácidos del extremo NH₂-terminal de la proteína GyrB más 11 residuos adicionales codificados por una secuencia extragenética situada a la derecha del extremo 5' de *gyrB*. Esto se deduce de la secuencia de *gyrB* y regiones adyacentes publicada por Yamagishi *et al.*, 1986 y Adachi *et al.*, 1987.



Figura 9. Identificación de la proteína GyrB y de sus derivados por detección del extremo carboxilo. Las maxicélulas fueron preparadas, marcadas y sometidas a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (10%) como se describe en Métodos. A) Carriles: 1, pCID501.2 (*gyrB320*); 2, pCID511.2 (*gyrB'*); 3 y 5, pCID501.25 (*gyrB320*(Δ PvuII)); 4 y 6, pCID511.25 (*gyrB'*(Δ PvuII)); 7, pBR332; 8, RYC1000; 5 y 6 representan experimentos de pulso y caza. B) Carriles: 1, pCID511.2 (*gyrB'*); 2, pCID511.25 (*gyrB'*(Δ PvuII)); 3 y 5, pCID502.3 (*gyrB320*(Δ SalI)); 4 y 6, pCID512.3 (*gyrB'*(Δ SalI)); 5 y 6 representan experimentos de pulso y caza. C) Carriles: 1 y 2, pCID511.26 (*gyrB'*(Δ BglII)); 3 y 4, pCID501.26 (*gyrB320*(Δ BglII)); 5 y 6, pCID514 (*gyrB'*(Δ StuI)); 7 y 8, pCID504 (*gyrB320*(Δ StuI)); 1, 3, 5 y 7 representan experimentos de pulso y caza. Los números del lado derecho de la cada figura indican el tamaño (en kilodaltons) de los diferentes polipéptidos y los del lado izquierdo, el tamaño de los patrones de peso molecular.

Estos resultados indican que la secuencia de *gyrB* desde su extremo 5' hasta la diana *SalI* (posición 1501) es suficiente para proteger de la coumermicina A₁ a las células Cou^s, y que la secuencia comprendida entre el nucleótido 953 (diana *StuI*) y el 1501 es necesaria para que esta protección sea eficaz. Además, sugieren que la mutación *gyrB320* debe estar situada a la izquierda de la diana *SalI*, hacia el extremo 5' del gen.

4.11. EFECTO DE LA DOSIS GENICA DE *gyrB* EN LA RESISTENCIA A COUMERMICINA A₁.

En base a los resultados anteriores, decidimos valorar el efecto de la dosis génica sobre el nivel de resistencia a coumermicina A₁ conferido a células Cou^s. Con este fin construimos inicialmente los plásmidos oligocopia pCID507 y pCID517, clonando el fragmento *Bam*HI de 8.5 kb de pCID500 y pCID510 en el replicón pSC101 que produce de 6 a 8 copias por genoma bacteriano.

Transformamos la estirpe RYC1010 (Cou^s) con la colección de plásmidos multicopia (derivados de pBR322) portadores de secuencias de los alelos *gyrB320* y *gyrB'* y con los plásmidos oligocopia pCID507 y pCID517. Para valorar el grado de resistencia a coumermicina A₁ conferido por estos plásmidos, determinamos la concentración mínima de antibiótico que inhibía el crecimiento de las estirpes transformantes y del mutante cromosómico RYC1020. Los resultados obtenidos, mostrados en la Tabla 4, indican que la resistencia al antibiótico es 32 veces mayor en el mutante cromosómico (RYC1020) que en la estirpe silvestre (RYC1010), y 8 veces mayor en células portadoras de los genes *gyrB* en multicopia (plasmidos pCID500 y pCID510). Este mismo nivel de resistencia es

ESTIRPE	COUMERMICINA A ₁ ($\mu\text{g/ml}$)
{ RYC1000 (<i>gyrB</i> ⁺ <i>recA58</i>)	5
{ RYC1010 (<i>gyrB</i> ⁺ <i>recA</i> ⁺)	5
{ RYC1020 (<i>gyrB320</i> (<i>Cou</i> ^R))	180
{ RYC1021 (<i>gyrB322</i> (<i>Cou</i> ^R))	320
{ RYC1022 (<i>gyrB322</i> (<i>Cou</i> ^R))	180
{ RYC1010 (pCID617) (<i>gyrB</i> ⁺ , oligocopia)	10
{ RYC1010 (pCID607) (<i>gyrB320</i> (<i>Cou</i> ^R), oligocopia)	40
{ RYC1010 (pCID610) (<i>gyrB</i> ⁺ , multicopia)	40
{ RYC1010 (pCID600) (<i>gyrB320</i> (<i>Cou</i> ^R), multicopia)	40
{ RYC1010 (pCID611.25) (<i>gyrB</i> ⁺ ΔPwA , multicopia)	40
{ RYC1010 (pCID601.26) (<i>gyrB320</i> ΔPwL , multicopia)	5
{ RYC1010 (pCID612.3) (<i>gyrB</i> ⁺ $\Delta SstI$, multicopia)	20
{ RYC1010 (pCID602.3) (<i>gyrB320</i> ΔSaA , multicopia)	5
{ RYC1010 (pCID614) (<i>gyrB</i> ⁺ $\Delta SstI$, multicopia)	5
{ RYC1010 (pCID604) (<i>gyrB320</i> $\Delta SstA$, multicopia)	5
{ RYC1010 (pCID611.26) (<i>gyrB</i> ⁺ $\Delta BglA$, multicopia)	5
{ RYC1010 (pCID601.26) (<i>gyrB320</i> $\Delta BglA$, multicopia)	5

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de coumermicina A₁ para las estirpes isogénicas silvestre y mutantes y para bacterias transformantes sobreproductores de diferentes polipéptidos GyrB. La CMI fue determinada en medio mínimo como se describe en el apartado 3.1.4. de métodos. Las MICs de novobiocina para las estirpes RYC1010 (*wr gyrB*) y RYC1020 (*gyrB320*) fueron de 0,5 y >4 mg/ml, respectivamente.

conferido por el derivado de delección 3'- Δ *PvuII* y la mitad por el derivado 3'- Δ *Sall* del gen silvestre (plásmidos pCID511.25 y pCID512.3). Los derivados de delección homólogos construidos en el alelo mutado no confieren resistencia a coumermicina A₁ (plásmidos pCID501.25 y pCID502.3). Por último, las células portadoras del gen silvestre *gyrB* clonado en un vector oligocopia (plásmido pCID517) son dos veces más resistentes al coumermicina A₁ que las células silvestre. Este resultado sugiere que la resistencia al antibiótico es dependiente de la dosis génica de *gyrB*.

4.12. LOCALIZACION FISICA DE LA MUTACION *gyrB320*.

En base a los resultados anteriores, es posible distinguir el alelo mutado *gyrB*(Cou^R) del alelo *gyrB*^S, analizando la resistencia a coumermicina A₁ que confieren sus derivados delecionados 3'-*PvuII* en plásmidos multicopia. Por otra parte, estos resultados abren la posibilidad de cartografiar mutaciones de resistencia a coumermicina A₁ en fragmentos específicos de *gyrB*.

Para localizar físicamente la mutación *gyrB320* intercambiamos inicialmente los fragmentos de restricción homólogos *BglII* y *StuI* entre los plásmidos pCID501.2 y pCID511.2 (Figura 6). A continuación, eliminamos el extremo 3' de los genes híbridos *gyrB* mediante la delección del fragmento *PvuII* correspondiente. Por último, analizamos la capacidad de estos derivados delecionados de conferir resistencia a coumermicina A₁ a estirpes Cou^S. Los resultados obtenidos, representados en la Figura 10, indican claramente que la mutación *gyrB320* está en el extremo 5' de *gyrB*, a la izquierda de la diana *BglII* situada en la posición 428.

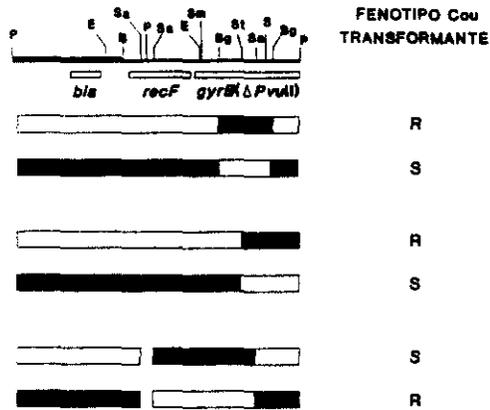


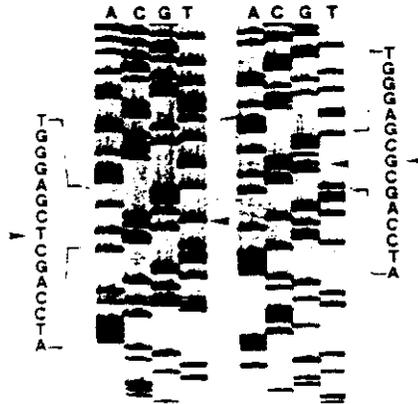
Figura 10. Localización física de la mutación *gyrB320*(Cou^r) mediante el análisis de los fenotipos Cou conferidos por derivados $\Delta PvuII$ de genes híbridos *gyrB*, construidos intercambiando fragmentos homólogos *BglII*, *SacII* y *StuI* de los plásmidos pCID501/pCID501.2 (*gyrB320*) y pCID511/pCID511.2 (*gyrB**). El fenotipo transformante indica resistencia a 16 $\mu\text{g/ml}$ de coumermicina A, de los transformantes de la estirpe RYC1000. Las barras negras representan secuencias de pCID501 o pCID501.2, y las blancas secuencias de pCID511 o pCID511.2. Los símbolos significan: B: *Bam*HI; Bg: *Bgl*II; E: *Eco*RI; P: *Pvu*II; S: *Sal*I; Sa: *Sac*II; Sm: *Sma*I; St: *Stu*I.

4.13. SECUENCIACION DE LA MUTACION *gyrB320*.

Basados en el resultado anterior, purificamos los fragmentos *EcoRI* (posición 6) - *BglII* (posición 428) de 422 pb del extremo 5' del alelo mutante *gyrB320* y del alelo silvestre de *gyrB* en geles de poliacrilamida y se digirieron con la enzima *Sau3A* que los corta en un único punto. De esta forma obtuvimos dos fragmentos de cada uno de ellos, uno *EcoRI* - *Sau3A* de 272 pb y otro *Sau3A* - *BglII* de 150 pb. Los primeros se subclonaron entre las dianas *EcoRI* y *BamHI* de la forma replicativa de los fagos M13mp18 y M13mp19, y los segundos en la diana *BamHI* de M13mp18 en las dos orientaciones posibles. La secuencia de las dos cadenas de DNA de cada fragmento fue determinada por el método de terminación de la cadena por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). La secuencia procedente del alelo silvestre era idéntica a la publicada anteriormente para el gen *gyrB* (Yamagishi *et al.*, 1986; Adachi *et al.*, 1987). Únicamente apreciamos un cambio en la secuencia del fragmento *Sau3A* - *BglII* del alelo *gyrB320*. Este cambio consistía en una transversión GC → TA en la posición 407 (Figura 11), que produce la sustitución del residuo Arg₁₃₆ por Leu en la secuencia de aminoácidos de la proteína GyrB (Figura 11).

Posteriormente se han clonado dos nuevas mutaciones independientes *gyrB*(Cou^R) (*gyrB321* y *gyrB322*) por el método del reemplazamiento génico via P1 de Saarihati y Palva, empleando como vector de clonado el plásmido pCID510.1. La secuenciación de los fragmentos correspondientes *EcoRI* - *BglII* del extremo 5' de estos nuevos alelos ha revelado que ambas mutaciones afectan también al codón 136. La mutación *gyrB322* es idéntica a *gyrB320* (transversión GC → TA en la posición 407) y la mutación *gyrB321* es una transición CG → TA en la posición 406 que provoca la sustitución del mismo residuo de Arg₁₃₆ por uno de Cys.

A)



B)

Secuencia: *gyrB*'

400 410 420
 GGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTC
 ValIleGlnArgGluGlyLysIle

Secuencia: *gyrB320* (Cou^s)

400 410 420
 GGTTATCCAGCTCGAGGGTAAAATTC
 ValIleGlnLeuGluGlyLysIle

Figura 11. Comparación de las secuencias del gen *gyrB* y del mutante *gyrB320*. A): El lado derecho de la figura muestra parte de la secuencia de la cadena codificante del fragmento *EcoRI* (posición 6) - *BglII* (posición 428) del alelo *gyrB*' y el izquierdo, la secuencia correspondiente del alelo *gyrB320*. Los símbolos significan: A, C, G y T, carriles correspondientes a las reacciones de secuenciación con *ddATP*, *ddCTP*, *ddGTP* y *ddTTP*, respectivamente. Las flechas señalan la posición del nucleótido 407 cambiado. B): Secuencia de la región 5' de los alelos *gyrB320* y *gyrB*', mostrando el cambio Arg₁₄ → Leu.

5. DISCUSSION

I. La microcina B17 y la DNA girasa.

El efecto fisiológico primario de la MccB17 es la inhibición de la síntesis de DNA (Herrero y Moreno, 1986). Este efecto es seguido por la inducción del sistema SOS de reparación celular y, más tarde por la degradación del DNA. Puesto que en ausencia de replicación semiconservativa no se observó inducción del sistema SOS, los anteriores autores concluyeron que la MccB17 bloqueaba el complejo de replicación, más concretamente el progreso de la horquilla. Ello sugería que alguna de las proteínas implicadas en la replicación podía ser inhibida por la microcina B17.

Con el objetivo de profundizar en el modo de acción de la MccB17 a nivel molecular se ha efectuado el trabajo aquí presentado. Se han utilizado dos aproximaciones distintas, una de naturaleza genética que aquí se ha descrito en detalle, y otra de naturaleza bioquímica. Brevemente, la aproximación genética ha conducido al aislamiento y caracterización de los mutantes parcialmente resistentes al antibiótico. Las mutaciones han sido cartografiadas, clonadas y secuenciadas. Ambas mutaciones aisladas por métodos distintos, han resultado ser la misma. Se trata de una transición AT → GC en el par de nucleótidos 2251 del gen *gyrB*, lo que genera el cambio del codón TGG por el codón CGG de la posición 751. En otras palabras, el residuo Trp₇₅₁ de la subunidad B de la DNA girasa es cambiado a Arg. Este resultado sugiere que la microcina B17 inhibe la replicación del DNA, mediante el bloqueo de la actividad DNA girasa.

Como ya hemos señalado anteriormente, la DNA girasa es un tetrámero, compuesto de 2 subunidades A y 2 subunidades B, que cataliza una variedad de interconversiones topológicas de las moléculas de DNA (superenrollamiento negativo de DNA de doble cadena covalentemente cerrado en un proceso dependiente de la hidrólisis de ATP,

relajación de DNA superenrollado negativamente en ausencia de ATP, y de DNA superenrollado positivamente en presencia del nucleótido según una reacción análoga a la de introducción de supervueltas negativas, formación y resolución de estructuras anudadas y de moléculas engarzadas de DNA de doble cadena). En concreto, la DNA girasa bacteriana es la única topoisomerasa con capacidad para superenrollar negativamente un sustrato de DNA, en una reacción que implica los siguientes pasos: unión de la holoenzima al DNA, ruptura específica de sitio de ambas cadenas de DNA, formación de enlaces covalentes transitorios entre los grupos 5'-P del DNA y las Tyr₁₂₂ de las subunidades A de la holoenzima, paso de un segmento de DNA de doble cadena a través de la ruptura generada y resellado del corte transitorio de las dos cadenas de DNA. Esta reacción está acoplada a la hidrólisis de ATP (Gellert, 1981; Wang, 1985).

La reacción de topoisomerización catalizada por DNA girasa es congelada en la etapa de ruptura del DNA por las quinolonas, cuya acción se revela en presencia de agentes desnaturizantes de proteínas (SDS o álcali). En esas condiciones, el DNA cromosómico aparece fragmentado en trozos de tamaño variable y discreto (Gellert *et al.*, 1977; Snyder y Drlica, 1979; Franco y Drlica, 1988).

Los otros inhibidores conocidos de la DNA girasa son las cumarinas. Estos antibióticos, a diferencia de las quinolonas, inhiben el superenrollamiento del DNA impidiendo competitivamente la fijación del ATP a la DNA girasa (Sugino *et al.*, 1978; Staudenbauer y Orr, 1981).

Puesto que las dos mutaciones parcialmente resistentes a MccB17 afectaban a la subunidad GyrB, se planteó en el laboratorio la caracterización *in vitro* e *in vivo* del efecto de la microcina B17 sobre las reacciones catalizadas por la DNA girasa. El estudio, realizado por la Dra C. Hernández-Chico, consistió en lo siguiente:

a) Análisis del efecto de la MccB17 sobre la replicación del plásmido ColE1 en extractos acelulares que contienen la maquinaria de replicación celular y preparados según Díaz y Staudenbauer, (1982). Estos extractos han sido utilizados previamente para estudiar la replicación de diferentes plásmidos. En particular, la replicación de ColE1 que depende absolutamente de la maquinaria del huésped, requiere específicamente la actividad DNA girasa en las etapas de iniciación y elongación. Por ello, este sistema *in vitro* es útil para caracterizar la acción de antibióticos que inhiben presumiblemente la DNA girasa, tales como la MccB17.

Ese experimento demostró que la MccB17 inhibe la replicación de ColE1 superenrollado en los extractos de células sensibles. Al separar en geles de agarosa los productos de los ensayos de replicación, pudo observarse que la MccB17 no produce ningún cambio en el superenrollamiento del DNA, a diferencia de la novobiocina que provoca una relajación del sustrato. Sin embargo, en los ensayos con MccB17, se constató que buena parte del DNA plasmidico incluido en el ensayo había desaparecido, es decir, había sido degradado. Puesto que el antibiótico, por sí solo, no provocaba dicha degradación, se postuló que la MccB17 inducía la ruptura del DNA, el cual era a continuación degradado por nucleasas presentes en los extractos celulares. La ruptura putativa del DNA debía ser mediada por la DNA girasa.

b) Con el fin de detectar la presunta ruptura del DNA inducida por MccB17, se efectuaron experimentos con este antibiótico análogos a los efectuados previamente con el ácido oxolínico. Como se indicó antes, en esos experimentos se había demostrado que el ácido oxolínico bloqueaba el complejo DNA-DNA girasa produciendo la ruptura irreversible de la doble cadena de DNA (Gellert *et al.*, 1977).

Como con el ácido oxolínico, la incubación con MccB17 de ColE1 en extractos de

células sensibles, seguida de la adición de SDS y proteinasa K, produjo la linealización de ColE1. Esta ruptura de la doble cadena de DNA, como la inducida por el ácido oxolinico, no es inhibida por novobiocina (Sugino *et al.*, 1978). Cuando se realizaron experimentos similares con extractos de células resistentes (*gyrB301*) no se observó ninguna banda de ColE1 lineal. Este resultado sugiere claramente que la ruptura del DNA inducida por MccB17 está mediada por la DNA girasa.

c) Por último se estudió el efecto de la MccB17 *in vivo* sobre el DNA cromosómico.

Cultivos exponenciales de una estirpe sensible (*gyrB*⁺) fueron tratados con MccB17 durante 7 minutos. El DNA cromosómico de las células tratadas fue purificado y digerido con las enzimas *EcoRI* y *AvaI*. Los fragmentos, separados por electroforesis y desnaturalizados, fueron transferidos por capilaridad a un filtro de nitrocelulosa. Tras su fijación al filtro, los fragmentos se hibridaron con sondas radiactivas específicas de dos regiones diferentes del cromosoma de *E.coli*, el gen *gyrB* y el locus *proU*. Previamente se había descrito el patrón de fragmentos de DNA generado por ácido oxolinico en la región de *gyrB* (Franco y Drluca, 1988). En la proximidad del locus *proU* se han encontrado dos secuencias palindrómicas repetidas extragénicas (secuencias REP) a las cuales se une específicamente la DNA girasa, habiéndose propuesto que estas secuencias REP son el sitio fisiológico de acción de la girasa en el cromosoma (Yang y Ferro-Luzzi Ames, 1988; Gowrishankar, 1989).

Estos experimentos *in vivo* revelaron que la MccB17 ejerce, en células sensibles, un efecto similar al del ácido oxolinico. Ambos antibióticos indujeron la ruptura del cromosoma de células sensibles, produciendo un patrón discreto de bandas. Al estudiar el efecto de la MccB17 en otros contextos genéticos, se observó que el patrón de corte inducido por MccB17 en células *recA* era idéntico al obtenido en células *recA*⁺. El patrón

de fragmentos producido por la MccB17 era similar, pero no idéntico, al producido por el ácido oxolínico en el experimento que se efectuó en paralelo como control. Sin embargo, al estudiar el efecto del antibiótico sobre células isogénicas resistentes *gyrB301* se observó que la MccB17 no producía fragmentación significativa del DNA en las mismas condiciones.

En conclusión, tanto los resultados genéticos como los bioquímicos indican claramente que la microcina B17 inhibe la replicación del DNA bloqueando la reacción de topoisomerización catalizada por la DNA girasa. La microcina B17 al interactuar *in vivo* con su diana intracelular, ya sea ésta, DNA girasa o el complejo girasa-DNA no inhibiría el corte de la doble cadena de DNA de la reacción de topoisomerización, pero bloquearía las etapas siguientes. De ahí que el DNA aparezca extensamente fragmentado en bandas discretas. Que dicha fragmentación requiere la DNA girasa lo indican claramente los experimentos descritos. En realidad, la microcina B17 no produjo ningún efecto sobre el DNA *in vitro* cuando se incubaron juntos, en ausencia de extractos de replicación.

Con el fin de analizar los posibles cambios estructurales introducidos por la mutación, comparamos la estructura secundaria de la región carboxilo-terminal de las proteínas GyrB, silvestre y mutante, que pueden predecirse aplicando los algoritmos de Garnier *et al.* (1978) y de Chou y Fasman, (1978). Ambos algoritmos predicen una alta probabilidad de estructura α -hélice en el extremo carboxilo de la subunidad B (Figura 12). Concretamente, el algoritmo de Garnier *et al.* predice la existencia de estructuras α -hélice, alternadas con giros β , delante de la posición 751 y dos estructuras α -hélice consecutivas detrás de ella. El algoritmo de Garnier *et al.* revela un cambio significativo en la estructura secundaria de la proteína mutada (Figura 12). La sustitución del Trp₇₅₁ por Arg provocaría un cambio conformacional en los aminoácidos adyacentes a la posición 751 de GyrB que pasarían de

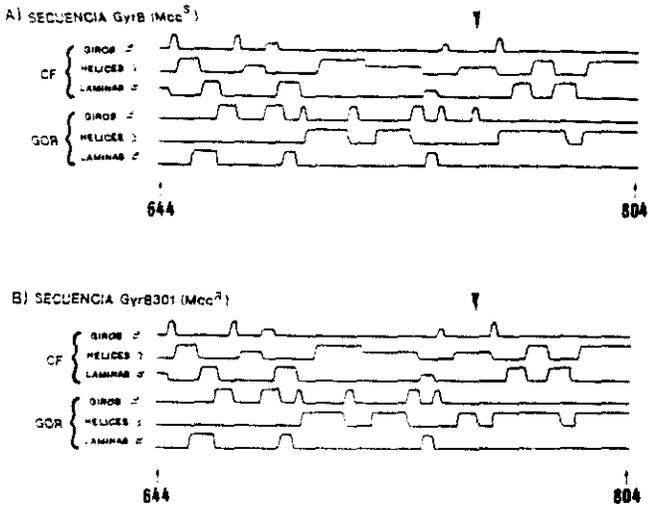


Figura 12. Estructura secundaria de los 160 residuos finales del extremo carboxilo de la proteína GyrB de *E.coli* determinada según el algoritmo de Chou y Fasman, (1978) (CF) y el de Garnier *et al.*, (1978) (GOR). A) Estructura secundaria deducida de la secuencia de aminoácidos de la proteína sintetizada por el alelo *gyrB*⁺; B) Estructura secundaria deducida de la secuencia de aminoácidos de la proteína sintetizada por el alelo *gyrB301*. Las flechas indican la posición del residuo 751 de GyrB.

una estructura giro β , en la proteína silvestre, a una α -hélice, en la proteína mutante. Es posible que la desaparición del giro β , motivada por el cambio Trp₇₅₁ \rightarrow Arg, provoque una distorsión en la disposición topológica de este conjunto de α -hélices, de manera que podría afectarse la interacción putativa de la microcina B17 con la DNA girasa. Sin embargo, hay que tener en cuenta que al aplicar el algoritmo de Chou y Fasman a esta región de GyrB, no se predice ninguna diferencia entre las estructuras secundarias de la proteína mutante y silvestre (Figura 12).

Una alternativa a la interpretación anterior es la siguiente. El cambio Trp₇₅₁ \rightarrow Arg provoca un cambio de la carga local de la región que podría afectar a la interacción MccB17 - DNA girasa. La introducción del residuo básico Arg (cargado positivamente a pH 7) podría repeler a la microcina, cuyo único residuo cargado lo está positivamente, la His₂ (Figura 1B).

El bacteriófago T4 de *E.coli* codifica su propia topoisomerasa II. Esta está constituida de tres subunidades p39, p52 y p60. La proteína p52 es homóloga a GyrA de *E.coli* y la p39 a GyrB (Huang, 1986(a); Huang, 1986(b)). Sin embargo la proteína p39 carece de la región carboxilo-terminal de GyrB de *E.coli*. El hecho de que la replicación de T4 no sea inhibida por la MccB17 (resultados no mostrados) apunta a la importancia de la región carboxilo de GyrB en la interacción con la MccB17.

II. El extremo carboxilo-terminal de GyrB es esencial para la actividad DNA girasa.

Diferentes datos indican que la región del extremo carboxilo de GyrB, constituida por los 50 - 60 aminoácidos finales de la proteína, es esencial para la actividad topoisomerasa

II.

En primer lugar, nosotros hemos demostrado aquí que la eliminación de esa región (delección $\Delta PvuII$) se traduce en la pérdida de la capacidad que tiene GyrB de complementar una mutación girasa termosensible (*gyrB(ts)*). En segundo lugar, la región presenta una elevada homología en todas las topoisomerasas secuenciadas, excepto en la de T4, la cual, como ya hemos dicho, carece de una secuencia homóloga a dicha región. Específicamente, una secuencia de cuatro residuos (K G L K), situada hacia el lado amino del W₇₅₁, a una distancia de 7 aminoácidos, está conservada en todas ellas, y otra de 9 aminoácidos (Q L W E T T M D P), en donde W ocupa la posición 751 de GyrB de *E.coli*, se conserva íntegramente en *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* (Figura 13). La proximidad entre sí de esas secuencias tan altamente conservadas sugiere que esa región de la proteína es esencial para su funcionalidad. Es posible que la región interactúe directamente con el DNA, con la subunidad A o con ambos.

El residuo Trp₇₅₁ está presente en todas las topoisomerasas II bacterianas, excepto en ParE. El hecho de que las dos mutaciones espontáneas de resistencia a microcina B17, aisladas independientemente, consistan en el mismo cambio Trp₇₅₁ → Arg apoya también la importancia de esta región para la funcionalidad biológica de GyrB. En efecto, de las 9 posibles mutaciones puntuales del codón 751 (TGG) dos conducen a un codón de parada de la traducción (TAG, TGA), una genera Leu (TTG), otra Ser (TCG), otra Gly (GGG), dos Cys (TGC, TGT) y, finalmente, otras dos Arg (AGG, CGG). Entre los siete posibles cambios "missense", se han seleccionado, en las dos mutaciones aisladas *gyrB301* y *gyrB302*, uno de los dos que se traduce en Arg, y no otros. Justamente son residuos de Arg los que ocupan la misma posición en ParE y en la topoisomerasa II de *Saccharomyces cerevisiae*. En las otras topoisomerasas eucarióticas secuenciadas, el residuo que ocupa esa

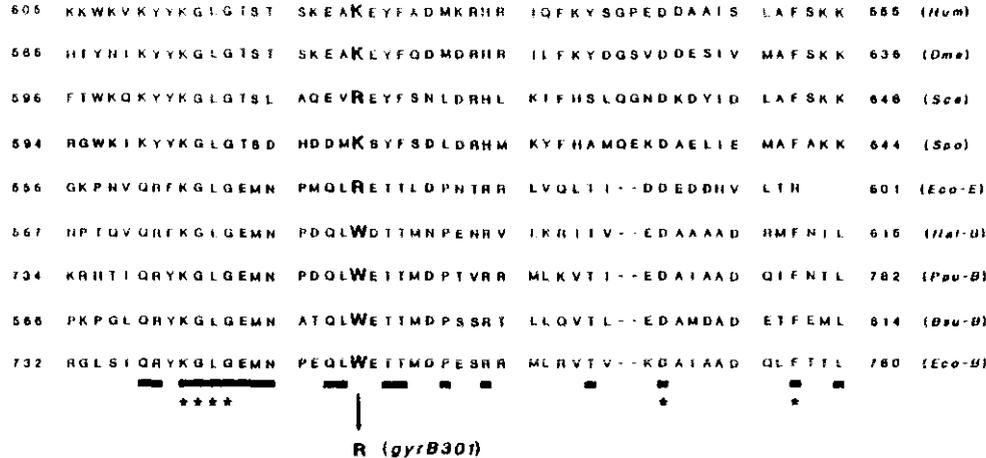


Figura 13. Alineamiento de la secuencias de aminoácidos de DNA Topoisomerasas II de diferentes orígenes en la región en donde las mutaciones de resistencia a microcina B17 están localizadas en GyrB de *Escherichia coli* (Yamagishi *et al.*, 1986; Tsai-Pflugfelder *et al.*, 1988; Wyckoff *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1990; Parales y Harwood, 1990; Holmes y Dyal-Smith, 1991). Las secuencias son designadas de la siguiente forma: (Eco-B), GyrB de *Escherichia coli*; (Bsu-B), GyrB de *Bacillus subtilis*; (Ppu-B), GyrB de *Pseudomonas putida*; (Hal-B), GyrB de *Halofarax*; (Eco-E), ParE de *Escherichia coli*; (Spu), *Schizosaccharomyces pombe*; (Sce), *Saccharomyces cerevisiae*; (Dme), *Drosophila melanogaster* y (Hum), *Homo sapiens*. La línea gruesa marca los residuos idénticos en los diferentes polipéptidos GyrB de procaríotas comparados. Los asteriscos están situados debajo de los residuos conservados en todas las topoisomerasas comparadas. La flecha indica la localización de la mutación *gyrB301*(Mcc^r).

posición, es también un aminoácido básico, en concreto la Lys (Figura 13). Es posible que cualquiera de los otros cambios generados por la sustitución de un par de bases conduzca a la pérdida de funcionalidad de la proteína GyrB. La mutagénesis dirigida a la región carboxilo-terminal de la subunidad B de la DNA girasa proporcionará más información sobre el papel de esta región de la proteína en la actividad biológica de la holoenzima DNA girasa y sobre su interacción putativa con la MccB17.

Es curioso que justo antes de estas secuencias tan altamente conservadas del extremo carboxilo-terminal, las subunidades B de *E.coli* y *P.putida* contienen una larga secuencia de aproximadamente 170 aminoácidos ausentes en todas las otras girasas y topoisomerasas II conocidas. Además, resulta también curioso que esas secuencias "suplementarias" presenten homología entre ellas. Puesto que la subunidad B de *B.subtilis* puede combinarse *in vitro* con la subunidad A de *E.coli* y reconstituir todas las actividades de la girasa de *E.coli* (Lothar et al., 1984), la cuestión del origen y papel funcional de tal secuencia es un misterio.

A continuación discutiremos los resultados de este trabajo que han permitido descubrir un nuevo mecanismo de resistencia a cumarinas, y que han proporcionando información adicional sobre la relación estructura-función en la DNA girasa.

III. Un nuevo mecanismo de resistencia a cumarinas: La titulación del antibiótico.

Esta aceptado de modo general que la inhibición competitiva de DNA girasa por cumarinas se suprime mediante mutaciones en el gen *gyrB*. La subunidad mutante GyrB perdería afinidad por el antibiótico, pero conservaría su capacidad de unir de modo eficiente

ATP y, por consiguiente, generaría una molécula de DNA girasa fisiológicamente activa. Apoya esta hipótesis el trabajo siguiente. El gen *gyrB* de *Streptomyces sphaeroides*, un organismo productor de novobiocina, clonado e introducido en una estirpe sensible de *Streptomyces lividans*, confiere a esta última resistencia al antibiótico. Por cromatografía de afinidad en columna de novobiocina-sepharosa, se han purificado dos formas enzimáticas A₁B₂ de la actividad DNA girasa en extractos celulares de transformantes de *S.lividans* sobreproductores de la subunidad B de *S.sphaeroides*. Una de ellas que se fija fuertemente a las columnas de novobiocina, eluye con tampones de elevada fuerza iónica y se caracteriza porque es inhibida por concentraciones bajas de novobiocina (1,6 µg/ml) (enzima sensible). La inhibición de la otra actividad, que se fija débilmente a la columna (eluye con tampones de baja fuerza iónica), requiere una concentración de antibiótico 100 veces superiores a la anterior (enzima resistente) (Thiara y Cundliffe, 1988). Estos resultados sugieren que el mecanismo de resistencia a novobiocina de *S.sphaeroides* consiste en una pérdida de afinidad de la enzima por el antibiótico.

Nuestros resultados, mostrados en la Tabla 4, revelan que el aumento de la dosis génica del alelo silvestre *gyrB*(Cou⁵) de *E.coli* confiere resistencia a coumermicina A₁ a estirpes sensibles Cou⁵. Esta resistencia se conserva en diferentes derivados de delección de *gyrB'* que carecen del extremo 3' (derivados *gyrB*(Δ*PvuII*) y *gyrB*(Δ*SalI*)). Estos derivados sintetizan polipéptidos estables GyrB de 749 aminoácidos y 500 aminoácidos, respectivamente, constituidos por los residuos del extremo amino-terminal de la proteína GyrB (804 aminoácidos). Sin embargo, el derivado *gyrB*(Δ*StuI*) que sintetiza también un polipéptido estable portador de los 318 primeros aminoácidos de GyrB, no confiere resistencia al antibiótico (Tabla 4). Por otro lado, ninguno de los derivados de delección homólogos 3'-Δ*PvuII*, 3'-Δ*SalI* y 3'-Δ*StuI*, construidos a partir del alelo mutante

gyrB(Cou^R) (*gyrB320*), confiere resistencia a coumermicina A₁. Estos resultados sugieren que la resistencia conferida por el gen *gyrB*^R, en alto número de copias, es debida a la sobreproducción de proteína GyrB, que titularía la coumermicina A₁ intracelular.

Atendiendo a los resultados mostrados en la Tabla 4, podemos apreciar que las células mutantes exhiben una resistencia alta a coumermicina A₁. Sin embargo, células silvestres, sobreproductoras del polipéptido GyrB mutado, son ocho veces menos resistentes, un valor similar al obtenido con células sobreproductoras de GyrB silvestre. Este resultado, aparentemente paradójico, puede ser explicado del siguiente modo. En células de *E.coli* sobreproductoras de GyrB mutado, la mayoría de los tetrámeros de DNA girasa deberán contener dos subunidades B mutadas y por consiguiente, no deberían unir coumermicina A₁. Los otros tetrámeros (10–20%), contendrán al menos una subunidad silvestre y por consiguiente, deberían ser susceptibles al antibiótico. Los tetrámeros no funcionales (bloqueados por el antibiótico) competirían con los funcionales (resistentes al antibiótico) para ocupar los sitios de unión de la DNA girasa al DNA cromosómico. De este modo la cantidad relativa de tetrámeros no funcionales, sensibles al antibiótico, en la célula debe ser el factor determinante en la susceptibilidad celular a coumermicina A₁. Si uno, varios o todos estos sitios deben ser inactivados para la inhibición del crecimiento celular requiere otros estudios.

Apoyados en los resultados descritos, proponemos un nuevo mecanismo de resistencia a cumarinas basado en la capacidad que tiene la subunidad GyrB de unir estos antibióticos. La sobreproducción de polipéptidos que contienen el sitio silvestre de unión causaría la titulación del antibiótico intracelular. En estas condiciones habría moléculas de DNA girasa, no inhibidas por el antibiótico, que podían unir ATP y, por consiguiente, desarrollar su actividad fisiológica. Por el contrario, la sobreproducción de polipéptidos truncados de la

proteína mutante, al unir coumermicina A_1 con menor afinidad que los polipéptidos silvestres, no producirían una disminución en la concentración intracelular del antibiótico y, por lo tanto, no modificarían la susceptibilidad de las células al antibiótico.

Esta hipótesis está substantiada además por los dos hechos siguientes: a) El nivel de resistencia al antibiótico depende de la dosis génica (Tabla 4). b) las mutaciones que confieren resistencia a coumermicina A_1 están situadas en la mitad amino-terminal de GyrB, es decir, en la región de la proteína implicada en el secuestro de la coumermicina A_1 .

Las mutaciones Cou^A *gyrB320* y *gyrB322* son debidas a una transversión GC → TA en la posición 407 del gen *gyrB* que provoca la sustitución del codón CGC de la posición 136 por el codón CTC, es decir, el residuo Arg₁₃₆ de la proteína GyrB silvestre cambia a Leu en la mutante. La mutación *gyrB321* es una transición CG → TA en la posición 406 que afecta al mismo codón 136 del gen *gyrB*. Esta mutación se traduce en el cambio del residuo Arg₁₃₆ por uno de Cys.

IV. La mitad amino de GyrB se requiere y es suficiente para unir coumermicina A_1 y ATP.

El polipéptido que contiene los 500 residuos amino-terminales de GyrB (derivado Δ *Sall*) es aparentemente tan eficaz para secuestrar el antibiótico como la proteína completa GyrB. Sin embargo, el polipéptido constituido por los 318 primeros residuos (derivado Δ *StuI*) no confiere ninguna resistencia a coumermicina A_1 . Este resultado sugiere que el segmento polipeptídico comprendido entre el residuo 319 y el 500 (diana *Sall*), o al menos

parte de él, es necesario para la titulación de la cumarina.

A este propósito, sería interesante conocer si la inserción del dipéptido Ala-Arg entre los residuos 382 y 383 de GyrB afecta a la titulación de cumarinas (Figura 15). Esta mutación que se aisló por su efecto compensatorio de la falta de actividad topoisomerasa I, *in vitro* (McEachern y Fisher, 1989). En su día este efecto se atribuyó a la alteración espacial entre los dos dominios presumidos de GyrB. Aquí se propone una interpretación alternativa, a saber que la mutación puede afectar a la unión del ATP.

Por otra parte, el hecho de que el residuo afectado (Arg₃₃₆) por las mutaciones Cou^r esté situado 180 aminoácidos a la izquierda de la diana *StuI*, sugiere que una gran parte de la mitad amino de GyrB, sino toda ella, es necesaria para la correcta conformación estructural del sitio de unión de cumarinas.

Junto con la purificación de la DNA girasa, se ha aislado otra topoisomerasa II (Topo II') en *E. coli* (Brown *et al.*, 1979; Geilert *et al.*, 1979)). Esta topoisomerasa está constituida de dos subunidades GyrA y dos copias de un polipéptido de 50.000 Da, denominado v. Este polipéptido es el fragmento carboxilo-terminal de GyrB que comienza en la posición 394 (Adachi *et al.*, 1987) (Figura 15). La Topoisomerasa II' que carece de la actividad ATPasa, puede relajar DNA superenrollado tanto negativa como positivamente en un proceso independiente de la hidrólisis de ATP, pero es incapaz de superenrollar un sustrato relajado. En base a estos hechos, se ha postulado la existencia de dos dominios funcionales independientes en la subunidad GyrB (Brown *et al.*, 1979; Adachi *et al.*, 1987). El dominio carboxilo-terminal (fragmento v, presente en Topo II'), con la capacidad de unirse a GyrA y de estimular la reacción de corte y resellado del DNA; y el dominio amino-terminal (ausente en Topo II') capaz de unir y posiblemente hidrolizar ATP. A partir de esta hipótesis podían establecerse dos predicciones. La primera es que las mutaciones *gyrB* que

confieren resistencia a agentes que atrapan la reacción de ruptura y resellado de la actividad DNA girasa, deberían localizarse dentro del dominio carboxilo-terminal. De hecho este es el caso de dos mutaciones de resistencia a quinolonas localizadas en *gyrB* (Yamagishi *et al.*, 1986) y de las dos mutaciones *gyrB301* y *gyrB302* estudiadas en este trabajo. La segunda predicción es que las mutaciones que confieren resistencia a compuestos que inhiben la unión del ATP a la subunidad B, tales como las mutaciones Cou^R, deberían localizarse dentro del dominio amino-terminal, lo que ha sido demostrado en este trabajo. Puesto que las cumarinas bloquean competitivamente el acceso del ATP a su sitio de unión en la subunidad B (Sugino *et al.*, 1978; Staudenbauer y Orr, 1981), todos nuestros resultados sugieren fuertemente que el dominio amino de GyrB realmente contiene el sitio de unión al nucleótido.

El hecho de que tres mutaciones Cou^R (*gyrB320*, *gyrB321* y *gyrB322*) que afectan al aminoácido Arg₁₃₄ producen una alta resistencia a coumermicina A₁, es decir una reducción importante de la afinidad por el antibiótico, indica que este residuo es esencial para la unión de la coumermicina. Sin embargo, el residuo Arg₁₃₄ no parece estar implicado directamente en la unión del ATP ya que las células mutantes crecen normalmente, es decir contienen una DNA girasa activa.

Recientemente se han clonado y secuenciado el gen *gyrB* de *Haloferax* y el de un mutante resistente a novobiocina. En la proteína mutante los residuos Asp₈₃, Ser₁₂₂ y Arg₁₃₇ de la proteína silvestre son sustituidos por Gly, Thr e His, respectivamente. Las secuencias de la mitad amino de las subunidades B de procariontes (*E.coli*, *B.subtilis*, *P.putida* y *Haloferax*) presentan un 65% de homología (Figura 14) (Yamagishi *et al.*, 1986; Parales *et al.*, 1990; Holmes y Dyall-Smith, 1991). Los tres residuos mutados en GyrB de *Haloferax* (Asp₈₃, Ser₁₂₂ y Arg₁₃₇) son idénticos en GyrB de *P.putida* (posiciones 83, 123

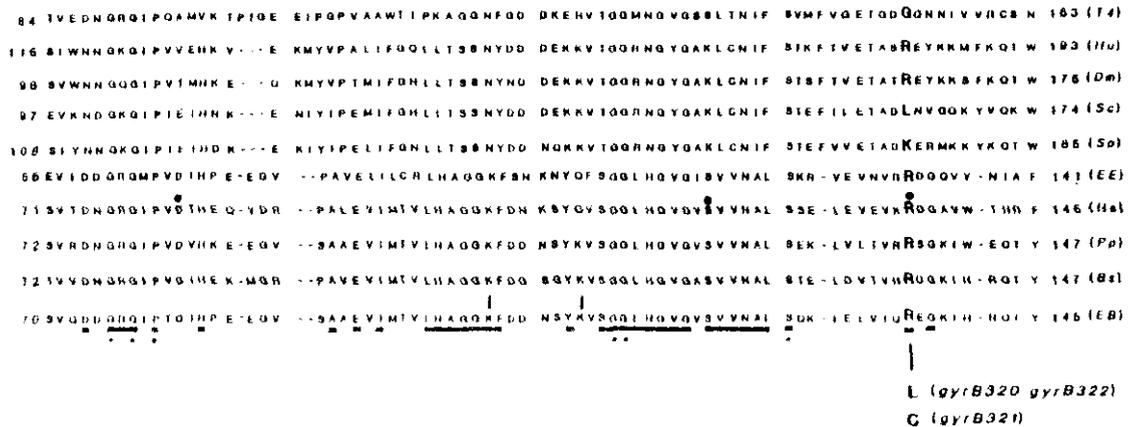


Figura 14. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de DNA Topoisomerasas II de diferentes orígenes en la región en donde las mutaciones de resistencia a coumermicina A, están localizadas en GyrB de *Escherichia coli* (Yamagishi *et al.*, 1986; Huang, 1986(b); Tsai-Pflugfelder *et al.*, 1988; Wyckoff *et al.*, 1989; Kuo *et al.*, 1990; Parales y Harwood, 1990; Holmes y Dyall-Smith, 1991). Las secuencias son designadas de la siguiente forma: (EB), GyrB de *Escherichia coli*; (Bs), GyrB de *Bacillus subtilis*; (Pp), GyrB de *Pseudomonas putida*; (Ha), GyrB de *Haemofelis*; (EE), ParE de *Escherichia coli*; (Sp), *Schizosaccharomyces pombe*; (Sc), *Saccharomyces cerevisiae*; (Dm), *Drosophila melanogaster*; (Hv), *Homo sapiens* y (T4), P39 del fago T4. La línea gruesa marca los residuos idénticos en los diferentes polipéptidos GyrB de procariontes comparados. Los asteriscos están situados debajo de los residuos conservados en todas las topoisomerasas comparadas. La flecha indica la localización de la mutación *gyrB301(Mcc^r)*.

y 138 en dicha proteína). Los residuos Ser₁₂₂ y Arg₁₃₇ se conservan en GyrB de *E.coli* (posiciones 121 y 136 de esta proteína) y de *B.subtilis* (posiciones 123 y 138) (Figura 14). Presumiblemente, el cambio Asp₈₂ → Gly en *Haloferax* no es esencial en la atribución del fenotipo de resistencia a novobiocina, puesto que las proteínas GyrB silvestres de *E.coli* y *B.subtilis* tienen justamente el residuo de Gly en las posiciones correspondientes (posiciones 81 y 83, respectivamente). Puesto que el cambio Ser₁₂₂ → Thr es conservativo, permanece como único cambio significativo el de Arg₁₃₇ por His. El Arg₁₃₆ está conservado en todas las proteínas GyrB de procariotas conocidas. El hecho de que nuestros tres mutantes Cou⁸ resulten de la simple sustitución del residuo Arg₁₃₆ apunta a la importancia de esa Arg en la interacción de la subunidad B con el antibiótico.

Independientemente otros acaban de demostrar que el polipéptido amino GyrB truncado de 393 aminoácidos posee actividad ATPasa sensible a novobiocina (Jackson *et al.*, 1991).

Todos estos resultados indican que el extremo amino de GyrB constituye un dominio funcional independiente del resto de la proteína.

V. Sobre el sitio de unión del ATP a la DNA girasa.

Las topoisomerasas II de eucariotas están constituidas por homodímeros de una única proteína (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* y *Homo sapiens*) (Figura 14) (Tsai-Pflugfelder *et al.*, 1988; Wyckoff *et al.*, 1989). Las regiones amino de estas son homologas a las subunidades B bacterianas y las regiones carboxilo son homólogas a las subunidades GyrA. A pesar de estas homologías entre eucariotas y procariotas no se ha logrado identificar de forma clara una secuencia de

topoisomerasas análoga a las consensuadas para los sitios de unión a ATP (Walker *et al.*, 1982; Chin *et al.*, 1988). Entre la gran lista de enzimas que requieren ATP, solamente las DNA topoisomerasas II de eucariotas y procariotas, y la DNA topoisomerasa I del virus vaccinia son inhibidas por cumarinas a baja concentración (Drlica y Franco, 1988). Puesto que las cumarinas inhiben competitivamente la fijación de ATP, este hecho sugiere que estas enzimas pueden tener un sitio de unión de ATP atípico. Por otra parte, debido a la parca homología entre la molécula de ATP y las cumarinas es posible que ATP y cumarinas se unan a sitios diferentes de la subunidad B (Sugino *et al.*, 1978). En cualquier caso, hay que notar que la región adyacente del lado amino a Arg₁₅₆ es posiblemente el mejor candidato para el sitio de fijación del ATP (Figura 14). En efecto, esta región, altamente conservada en todas las topoisomerasas, es rica en Gly, una característica común de los sitios de fijación de ATP de muchas proteínas (Walker *et al.*, 1982; Chin *et al.*, 1988). Se ha postulado que estas secuencias ricas en Gly funcionan como lazos flexibles con capacidad de promover cambios conformacionales que dirigen las interacciones de los residuos catalíticos de la proteína con los grupos fosforilo del ATP. De hecho, se ha demostrado muy recientemente que los residuos Lys₂₀₃ y Lys₂₁₀ de GyrB de *E.coli* (Figura 14) localizados dentro de esta secuencia altamente conservada, son modificados específicamente por análogos de ATP, tales como el PLP-AMP (piridoxal 5'-difosfato-5'-adenosina) (Tamura y Gellert, 1990) (ver Figura 14).

VI. Estructura-función de la DNA girasa de *E.coli*.

Nuestros resultados, junto con los de otros, demuestran que la subunidad GyrB de *E.coli*

está organizada en dos dominios estructurales independientes con entidad funcional (Figura 15). La región amino (hasta el aminoácido 393) contiene el sitio(s) de fijación de ATP y cumarinas y se requiere para introducir y mantener el superenrollamiento negativo del DNA. La mitad carboxilo de GyrB, desde el residuo 394 hasta el residuo C-terminal, contiene el sitio de unión a GyrA. Este dominio se requiere y es suficiente para la reacción de ruptura y resellado del DNA, acoplada con GyrA.

Otros investigadores han demostrado recientemente que la mitad amino de GyrA (exactamente el fragmento amino de 64 kDa) es suficiente para catalizar la reacción anterior de ruptura y resellado, en presencia de la subunidad GyrB (Reece y Maxwell, 1989). Según estos autores el fragmento restante estaría implicado en la estabilidad del complejo DNA-DNA girasa.

Por consiguiente hasta tres dominios funcionales independientes han sido definidos en la DNA girasa de *E.coli* hasta la fecha. Muy probablemente todas las topoisomerasas II bacterianas respondan al mismo modelo, dada la alta homología existente entre ellas a nivel de secuencia.

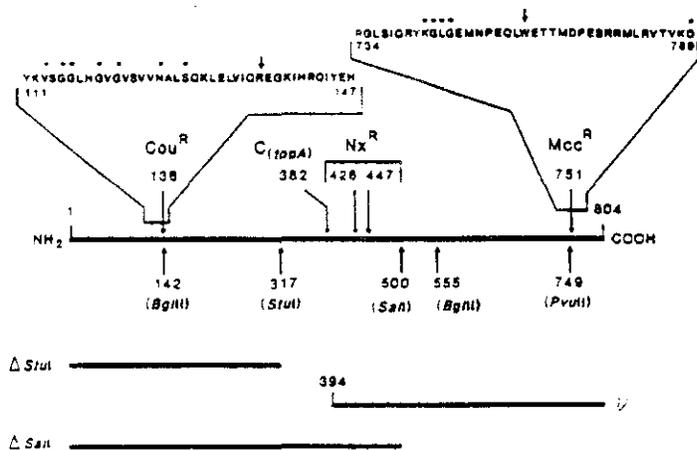


Figura 15. Estructura del polipéptido GyrB *E.coli* y algunos de sus derivados truncados. Los números indican residuos de aminoácidos. La localización de las diferentes mutaciones caracterizadas hasta ahora se muestran en la parte superior de la figura. Estas incluyen: *gyrB301*, confiere resistencia a microcina B17 (Mcc^R, W₂₁ → R); *nal-24* y *nal-31*, confieren resistencia a ácido nalidíxico (Nx^R, D₂₈ → N y K₆₀ → E, respectivamente) (Yamagishi *et al.*, 1986); C_{topA}, mutación compensatoria de deleciones *topA* (duplicación de una secuencia de 6 pb que codifican el dipéptido Ala-Arg en la posición 382) (McEachern y Fisher, 1989); y las mutaciones Cou^R descritas en este trabajo (*gyrB320* y *gyrB322*, R₁₃₆ → L; *gyrB321*, R₁₃₆ → C). Se muestra la secuencia de aminoácidos de las regiones en donde se localizan las mutaciones Cou^R y *gyrB301*. Las flechas señalan la Arg de la posición 136 y el Trp de la posición 751. Los asteriscos indican residuos conservados en las DNA Topoisomerasas II cuyas secuencia se conoce.

6. CONCLUSIONES

La microcina B17 es un péptido antibiótico cuyo efecto fisiológico primario es la inhibición de la síntesis de DNA. Esta inhibición conduce a la inducción del sistema SOS de reparación de DNA, seguido de la degradación del DNA y muerte celular. Con el objetivo de profundizar en el conocimiento del modo de acción de la microcina B17 se planteó inicialmente el trabajo que aquí se presenta. El desarrollo del trabajo nos llevó a interesarnos en otras cuestiones relacionadas con la diana de la microcina B17, es decir, la subunidad B de la DNA girasa de *E.coli*.

Los hechos y conclusiones más importantes de este trabajo se resumen a continuación:

1. Dos mutantes resistentes a MccB17 endógena y exógena han sido aislados por dos procedimientos diferentes.
2. Experimentos de transducción con P1 (implicando hasta cuatro marcadores genéticos) nos permitieron localizar ambas mutaciones en el minuto 84 del mapa genético de *E.coli*, a la izquierda del locus *recF*.
3. Clonada la región cromosómica del minuto 84 de las estirpes silvestre y mutantes se determinó mediante análisis genético (mutantes de inserción y deleción y experimentos de complementación) que las mutaciones de resistencia afectaban al gen *gyrB*.
4. Las mutaciones de resistencia a microcina B17 *gyrB301* y *gyrB302* se localizaron físicamente en el extremo 3' de *gyrB*, construyendo genes híbridos y estudiando sus propiedades. La secuenciación de esta región de los genes *gyrB* reveló que *gyrB301* y *gyrB302* consisten en el mismo cambio, una transición AT → GC en la posición 2251

del gen, lo que provoca la sustitución del residuo Trp₇₅₁ por Arg en la proteína.

5. Se demostró *in vivo* e *in vitro* que la microcina B17 en presencia de DNA girasa sensible induce el corte de la doble cadena de DNA, mientras que en presencia de DNA girasa resistente el DNA permanecía intacto.

El conjunto de los resultados anteriores indica que la microcina B17 interactúa con la DNA girasa bloqueando el religamiento de los extremos del DNA previamente cortados en la reacción de topoisomerización.

6. Se aislaron tres mutaciones resistentes a la coumermicina A₁. Las tres afectaban a *gyrB* y las tres provocaron la sustitución del aminoácido Arg₁₃₄ por otros, en dos casos por Leu y en el otro por Cys.

7. Se ha identificado un nuevo mecanismo de resistencia a cumarinas. Consiste éste en el secuestro del antibiótico mediado por la sobreproducción de subunidades GyrB. El nivel de resistencia depende de la dosis del gen *gyrB*.

8. Este nuevo e inusual mecanismo de resistencia es asegurado con eficacia normal por la mitad amino de GyrB, en ausencia del resto de la proteína, como lo confirma los resultados descritos con genes truncados.

Nuestros resultados, junto con los de otros, establecen que la subunidad GyrB de *E.coli* está constituida por dos dominios funcionales independientes: la mitad amino fija ATP y cumarinas, siendo esencial para el superenrollamiento negativo del DNA que cataliza la DNA girasa; la mitad carboxilo es necesaria en el corte y resellado del DNA, durante la reacción de topoisomerización.

7. BIBLIOGRAFIA

Adachi, T.; M. Mizuuchi; E.A. Robinson; E. Appella; M.H. O'Dea; M. Gellert and K. Mizuuchi. (1987). DNA sequence of the *E.coli gyrB* gene: Application of a new sequencing strategy. *Nucleic. Acids. Res.* 15: 771-784.

Amersham. (1984). M13 cloning and sequencing handbook.

Asensio, C.; J.C. Pérez-Díaz; M.C. Martínez and F. Baquero. (1976). A new family of low molecular weight antibiotics from Enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 69: 7-14.

Bachman, B.J. (1990). Linkage map of *E.coli*. *Microbiol. Rev.* 54: 130-197.

Baquero, F.; D. Bouanchaud; M.C. Martínez-Pérez and C. Fernández. (1978). Microcin plasmids: a group of extrachromosomal elements coding for low-molecular-weight antibiotics in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 135: 342-347.

Baquero, F. and F. Moreno. (1984). The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* 23: 117-124.

Berg, E.D. (1977). Insertion and excision of a transposable kanamycin resistance determinant Tn5. En "*DNA insertion elements, plasmids and episomes*". pag. 205-212. Ed. Bukhari, A.I.; J.A. Shapiro and S.L. Adyha. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.

Bolivar, F.; R.L. Rodriguez; P.J. Greene; M.C. Betlech; H.L. Heynecker and H.W.

Boyer. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A purpose cloning system. *Gene*. **2**: 95-113.

Birnboim, H.C. and J. Doly. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.

Brown, P.O.; C.L. Peebles and N.R. Cozzarelli. (1979). A topoisomerase from *Escherichia coli* related to DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 6110-6114.

Castillo, I. del; J.M. Gómez and F. Moreno. (1990). *mprA*, an *Escherichia coli* gene that reduces growth-phase-dependent synthesis of microcins B17 and C7 and blocks the osmoinduction of *proU* when cloned on a high-copy-number plasmid. *J. Bacteriol.* **172**: 437-445.

Chin, D.T.; S.A. Goff; T. Webster; T. Smith and A.L. Goldberg. (1988). Sequence of the *lon* gene in *Escherichia coli* a heat-shock gene which encodes the ATP-dependent protease LA'. *J. Biol. Chem.* **263**: 11718-11728.

Chou, P.Y. and G.D. Fasman. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acids sequence. *Adv. Enzymol.* **47**: 45-148.

Connell, N.; Z. Han; F. Moreno and R. Kolter. (1987). An *E.coli* promoter induced by the cessation of growth. *Mol. Microbiol.* **1**: 195-201.

Dagert, M. and S.D. Ehrlich. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*. 6: 23-28.

Davagnino, J.; M. Herrero; D. Furlong; F. Moreno and R. Kolter. (1986). The DNA replication inhibitor microcin B17 is a forty-three-amino acid protein containing sixty percent glycine. *Proteins: Structure, function and Genetics*. 1: 230-238.

Dean, F.; M. Krasnow; R. Otter; M. Matzuk; S. Spengler; M. Pastorcio and N Cozzarelli. (1983). *Escherichia coli* Type I topoisomerases: identification, mechanism and role in recombination. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 769-777.

Díaz, R. and W.L. Staudenbauer. (1982). Replication of the broad host range plasmid RSF1010 in cell-free extracts of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 10: 4687-4701.

DiGate, R.J. and K.J. Marians. (1989). Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J. Biol. Chem.* 264: 17924-17930.

DiNardo, S.; K.A. Voelkel; R. Sternglanz; A.E. Reynolds and A. Wright. (1982). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*. 31: 43-51.

Dorman, C.J.; A.S. Lynch; N. NiBhriain and C.F. Higgins. (1989). DNA supercoiling

in *Escherichia coli*: *topA* mutations can be suppressed by DNA amplifications involving the *tolC* locus. *Mol. Microbiol.* **3**: 531-540.

Dretzen, G.; M. Bellard; P. Sassone-Corsi and P. Chambon. (1981). A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **112**: 295-298.

Drlica, K. and R. J. Franco. (1988). Inhibitors of DNA Topoisomerases. *Biochemistry.* **27**: 2253-2259.

Fisher, L.M.; K. Mizuuchi; M.H. O'Dea; H. Ohmori and M. Gellert. (1981). Site-specific interaction of DNA gyrase with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 4165-4169.

Fisher, L.M.; H.A. Barot and M.E. Cullen. (1986). DNA gyrase complex with DNA: determinants for site-specific DNA breakage. *EMBO J.* **5**: 1411-1418.

Franco, R.J. and K. Drlica. (1988). DNA gyrase on the bacterial chromosome. Oxolinic acid-induced DNA cleavage in the *dnaA-gyrB* region. *J. Mol. Biol.* **201**: 229-233.

Garnier, J.; D.J. Osguthorpe and B. Robson. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* **120**: 97-120.

Garrido, M.C.; J.L. San Millán and F. Moreno. (1986). A novel plasmid vector allowing positive selection for cloned fragments. *FEMS Microbiol. Lett.* **34**: 261-264.

Garrido, M.C.; M. Herrero; R. Kolter and F. Moreno. (1988). The export of the DNA replication inhibitor microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO. J.* **7**: 1853-1862.

Gellert, M.; K. Mizuuchi; M.H. O'Dea and H.A. Nash. (1976(a)). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 3872-3876.

Gellert, M.; M.H. O'Dea; T. Itoh and J. Tomizawa. (1976(b)). Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalysed by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 4474-4478.

Gellert, M.; K. Mizuuchi; M.H. O'Dea; T. Itoh and J. Tomizawa. (1977). Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 4772-4776.

Gellert, M.; L.M. Fisher and M.H. O'Dea. (1979). DNA gyrase: Purification and catalytic properties of a fragment of gyrase B protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 6289-6293.

Gellert, M. (1981). DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* **50**: 879-910.

Genilloud, O.; F. Moreno and R. Kolter. (1989). DNA sequence, products and transcriptional pattern of the genes involved in production of the DNA replication inhibitor microcin B17. *J. Bacteriol.* **171**: 1126-1135.

Gowrishankar, J. (1989). Nucleotide sequence of the osmoregulatory *proU* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 1923-1931.

Groisman, E.A.; B.A. Castilho and M. Casadaban. (1984). *In vivo* DNA cloning and adjacent gene fusing with a mini-Mu-lac bacteriophage containing a plasmid replicon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 1480-1483.

Hall, M.N. and T.J. Silhavy. (1981). The *ompB* locus and the regulation of the major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* **146**: 23-43.

Hansen, F.G. and K. Meyenburg. (1979). Characterization of the *dnaA*, *gyrB* and other genes in the *dnaA* region of the *Escherichia coli* chromosome on specialized transducing phages λ *tna*. *Mol. Gen. Genet.* **175**: 135-144.

Hernández-Chico, C.; J.L. San Millán; R. Kolter and F. Moreno. (1986). Growth phase and OmpR regulation of transcription of microcin B17 genes. *J. Bacteriol.* **167**: 1058-1065.

Herrero, M. (1984). Estudios sobre el modo de acción de la microcina B17. *Tesis*

Doctoral. Fac. Ciencias. UAM.

Herrero, M. and F. Moreno. (1986). Microcin B17 blocks DNA replication and induces the SOS system in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 393–402.

Herrero, M.; R. Kolter and F. Moreno. (1986). Effects of microcin B17 on microcin B17-immune cells. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 403–410.

Higgins, N.P.; C.L. Peebles; A. Sugino and N. Cozzarelli. (1978). Purification of subunits of *Escherichia coli* DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 1773–1777.

Holmes, M.L. and M.L. Dyal-Smith. (1991). Mutations in DNA gyrase result in novobiocin resistance in halophilic archaeobacteria. *J. Bacteriol.* **173**: 642–648.

Horowitz, D.S. and J.A. Wang. (1987). Mapping the active site tyrosine of *Escherichia coli* DNA gyrase. *J. Biol. Chem.* **262**: 5339–5344.

Huang, W.M. (1986(a)). The 52-protein subunit of T4 DNA topoisomerase is homologous to the *gyrA*-protein of gyrase. *Nucleic Acids Res.* **14**: 7379–7390.

Huang, W.M. (1986(b)). Nucleotide sequence of a type II DNA topoisomerase gene. Bacteriophage T4 gene 39. *Nucleic Acids Res.* **14**: 7751–7765.

Jackson, A.P.; A. Maxwell and D.B. Wigley. (1991). Preliminary crystallographic analysis of the ATP-hydrolysing domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase B protein. *J. Mol. Biol.* **217**: 15-17.

Kato, J.; Y. Noshimura; R. Imamura; H. Niki; S. Hiraga and H. Suzuki. (1990). New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E.coli*. *Cell.* **63**: 383-394.

Kohara, Y.; K. Akiyama and K. Isono. (1987). The physical map of the *E.coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell.* **50**: 495-508.

Konisky, J. (1982). Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Ann. Rev. Microbiol.* **36**: 125-144.

Kreuzer, K.N. and B.M. Alberts. (1984). Site-specific recognition of bacteriophage T4 DNA by T4 type II DNA topoisomerase and *Escherichia coli* gyrase. *J. Biol. Chem.* **259**: 5339-5346.

Laviña, M.; A.P. Pugsley and F. Moreno. (1986). Identification, mapping, cloning and characterization of a gene (*sbmA*) required for microcin B17 action on *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1685-1693.

Laviña, M.; C. Gaggero and F. Moreno. (1990). Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 6585-6588.

Lother, H.; R. Lurz and E. Orr. (1984). DNA binding and antigenic specifications of DNA gyrase. *Nucleic Acids Res.* **12**: 901-914.

Liu, L.F. and J.C. Wang. (1978). DNA-DNA gyrase complex: the wrapping of the DNA duplex outside the enzyme. *Cell.* **15**: 979-984.

Maniatis, T.; E.F. Fritsch and J. Sambrook. (1982). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Lab. CSH. New York.

Maxam, A. M. and W. Gilbert. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65**: 499-560.

Maxwell, A. and M. Gellert. (1984). The DNA dependence of the ATPase activity of DNA gyrase. *J. Biol. Chem.* **259**: 14472- 14480.

Maxwell, A. and M. Gellert. (1986). Mechanistic aspects of DNA topoisomerases. *Advances in Protein Chemistry.* **38**: 69-107.

Mayo, O.; C. Hernández-Chlco and F. Moreno. (1988). Microcin B17, a novel tool for preparation of maxicells: Identification of polypeptides encoded by the IncFII minireplicon pMccB17. *J. Bacteriol.* **170**: 2414-2417.

Mayr-Harting, A.; Hedges, A.J. and Berkeley, R.C.W. (1972). Methods for studying

bacteriocins. En "*Methods in Microbiology*". 7A. pag. 315-422. Ed. Norris, J.R. and Ribbons, D.N. Academic Press, London.

McEachern, F. and L.M. Fisher. (1989). Regulation of DNA in *Escherichia coli*: genetic basis of a compensatory mutation in DNA gyrase. *FEBS Lett.* **253**: 67-70.

Miller, J.H. (1972). *Experiments in Molecular Genens*. Cold Spring Harbor lab. CSH. New York.

Mizuuchi, K.; M.H. O'Dea and M. Gellert. (1978). DNA gyrase: Subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 5960-5963.

Mizuuchi, K.; M. Mizuuchi; M.H. O'Dea and M. Gellert. (1984). Cloning and simplified purification of *Escherichia coli* DNA gyrase A and B proteins. *J. Biol. Chem.* **259**: 9199-9201.

Novoa, M.A.; L. Díaz-Guerra; J.L. San Millán and F. Moreno. (1986). Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin C7 production and immunity. *J. Bacteriol.* **168**: 1384- 1391.

Orr, E.; N.F. Fairweather; I.B. Holland and R.H. Pritchard. (1979). Isolation and characterization of a strain carrying a conditional lethal mutation in the *cou* gene of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **177**: 103-112.

Orr, E. and W.L. Staudenbauer. (1981). An *Escherichia coli* mutant thermosensitive in the B subunit of DNA gyrase: effect on the structure and replication of the colicin E1 plasmid *in vitro*. *Mol. Gen. Genet.* **181**: 52-56.

Parales, R.E. and S.H. Harwood. (1990). Nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Pseudomonas putida*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 5880.

Pérez-Díaz, J.C. and R.C. Clowes. (1980). Physical characterization of plasmids determining the synthesis of microcin which inhibits methionine synthesis in *E.coli*. *J. Bacteriol.* **141**: 1015-1023.

Pruss, G.J.; S.H. Manes and K. Drlica. (1982). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell.* **31**: 35-42.

Raji, A.; D.J. Zabel; C.S. Laufer and R.E. Depew. (1985). Genetic analysis of mutations that compensate for loss of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Bacteriol.* **162**: 1173-1179.

Reece, R.J. and A. Maxwell. (1989). Tryptic fragments of the *Escherichia coli* DNA gyrase A protein. *J. Biol. Chem.* **264**: 19648-19653.

Ryan, M.J. (1976). Coumermycin A1: A preferential inhibitor of replicative DNA synthesis in *Escherichia coli*. I. *in vivo* characterization. *Biochemistry.* **15**: 3769-3777.

Saarilabti, H.T. and E.T. Palva. (1985). *In vivo* transfer of chromosomal mutations onto multicopy plasmids utilizing *polA* strains: Cloning of an *ompR2* mutation in *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**: 27-33.

Sancar, A.; A.M. Hack and W.D. Rupp. (1979). Simple method for identification of plasmid-coded proteins. *J. Bacteriol.* **137**: 692-693.

Sau Millán, J.L.; C. Hernandez-Chico; P. Pereda and F. Moreno. (1985(a)). Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin B17 production and immunity. *J. Bacteriol.* **163**: 275-281.

Sau Millán, J.L.; R. Kolter and F. Moreno. (1985(b)). Plasmid genes required for microcin B17 production. *J. Bacteriol.* **163**: 1016-1020.

Sanger, F.; S. Nicklen and A.R. Coulson. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.

Sanger, F.; A.R. Coulson; T. Friedmann; A.M. Air; B.G. Barrell; N.L. Brown; J.C. Fidoles; C.A. Aitchison III; P.H. Slocombe and M. Smith. (1978). The nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174. *J. Mol. Biol.* **125**: 225-246.

Sanger, F.; A.R. Coulson; G.F. Hong; D.F. Hill and G.B. Petersen. (1982). Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA. *J. Mol. Biol.* **162**:729-773.

Shen, L.L. and A.G. Pernet. (1985). Mechanism of inhibition of DNA gyrase by analogues of nalidixic acid: The target of the drugs is DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82:** 307-311.

Shen, L.L.; W.E. Kohlbrenner; D. Weigl and J. Baranowski. (1989(a)). Mechanism of quinolone inhibition of DNA gyrase: Appearance of unique norfloxacin binding sites in enzyme-DNA complexes. *J. Biol. Chem.* **264:** 2973-2978.

Shen, L.L.; J. Baranowski and A.G. Pernet. (1989(b)). Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterial agents: Specificity and cooperativity of drug binding. *Biochemistry.* **28:** 3879-3885.

Shen, L.L.; L.A. Mitscher; P.N. Sharma; T.J. O'Donnell; D.W.T. Chu; C.S. Cooper; T. Rosen and A.G. Pernet. (1989(c)). Mechanisms of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: A cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry.* **28:** 3886-3894.

Snyder, M. and K. Drlica. (1979). DNA gyrase on the bacterial chromosome: DNA cleavage induced by oxolinic acid. *J. Mol. Biol.* **131:** 287-302.

Staudenbauer, W. L. and E. Orr. (1981). DNA gyrase: affinity chromatography on novobiocin-Sepharose and catalytic properties. *Nucleic Acids Res.* **9:** 3589-3603.

Sugino, A.; C.L. Peebles; K.N. Kreuzer and N.R. Cozzarelli. (1977). Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* *nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74: 4767-4771.

Sugino, A.; N.P. Higgins; P.O. Brown; C.L. Peebles and N.R. Cozzarelli. (1978). Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75: 4838-4842.

Sugino, A. and N.R. Cozzarelli. (1980). The intrinsic ATPase of DNA gyrase. *J. Biol. Chem.* 255: 6299-6306.

Tamura, J.K. and M. Gellert. (1990). Characterization of the ATP binding site on *Escherichia coli* DNA gyrase: Affinity labeling of Lys-103 and Lys-110 of the B subunit by pyridoxal 5'-diphospho-5'-adenosine. *J. Biol. Chem.* 265: 21342-21349.

Thiara, A. S. and E. Cundliffe. (1988). Cloning and characterization of a DNA gyrase B gene from *Streptomyces sphaeroides* that confers resistance to novobiocin. *EMBO J.* 7: 2255-2259.

Tsai-Pflugfelder, M.; L.F. Liu; A.A. Liu; K.M. Tewey; J. Whang-Peng; T. Knutsen; K. Huebner; C.M. Croce and J.C. Wang. (1988). Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 7177-7181.

Tse, Y.C.; K. Kirkegaard and J.C. Wang. (1980). Covalent bonds between protein and DNA: formation of phosphotyrosine linkage between certain DNA topoisomerases and DNA. *J. Biol. Chem.* **255**: 5560-5565.

Tse-Dinh, Y. and J.C. Wang. (1986). Complete nucleotide sequence of the *topA* gene encoding *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Mol. Biol.* **191**: 321-331.

Wang, J.C. (1971). Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein. *J. Mol. Biol.* **55**: 523-533.

Walker, J.E.; M. Saraste; M.J. Runswick and N.J. Gay. (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**: 945-951.

Winberg, G. and M-L Hammarskjöld. (1980). Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper. Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**: 253-264.

Wyckoff, E.; D. Natalie; J. M. Nolan; M. Lee and T. Hsieh. (1989). Structure of the *Drosophila* DNA Topoisomerase II gene. Nucleotide sequence and homology among Topoisomerases II. *J. Mol. Biol.* **205**: 1-13.

Yamagishi, J.; H. Yoshida; M. Yamayoshi and S. Nakamura. (1986). Nalidixic

acid-resistant mutations of the *gyrB*. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 367-373.

Yang, Y. y G. F.-L. Ames. (1988). DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 8850-8859.

Yoshida, H.; T. Kojima; J. Yamagishi and S. Nakamura. (1988). Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **211**: 1-7.