

JOSE MARIA GOMEZ GOMEZ



REGULACION DE LA EXPRESION GENICA DE LOS OPERONES MICROCINA B17 y
C7 POR EL LOCUS CROMOSOMICO *hns* DE *Escherichia coli*.



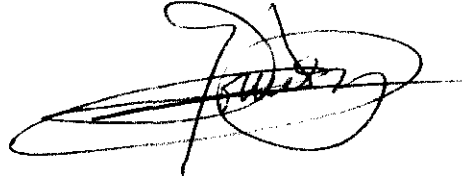
Director: Dr. Felipe Moreno.

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

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Madrid, 1993

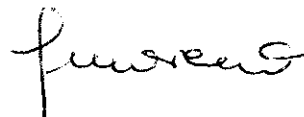
R- 22.007

Memoria que para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas presenta
José María Gómez Gómez



Madrid, Noviembre de 1993.

V^o B^o del Director de la Tesis:



Dr. Felipe Moreno Herrero.
Jefe de la Unidad de Genética Molecular.
Hospital Ramón y Cajal.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en la Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal, bajo la dirección del Dr. Felipe Moreno, al que quiero agradecer su continuo esfuerzo por "encarrilarme" en el mundo de la genética bacteriana. Desco agradecer a la Dra Paloma Bosch el haber encaminado mis pasos al laboratorio del Dr. Moreno, después de haber terminado mis estudios de licenciatura. Al Ministerio de Educación y Ciencia por haberme concedido una beca de Formación de Personal Investigador que facilitó la realización de este trabajo.

Descaría mostrar también mi agradecimiento más sincero a la siguientes personas:

A la Dra. Concepción Hernández por su ayuda tanto a nivel moral como experimental mostrada en los momentos más críticos de la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Ignacio del Castillo, sin la ayuda del cual esta memoria posiblemente no hubiera visto la *luz*.

Al Dr. Jesús Blázquez por su continuo afecto y comprensión mostrados a lo largo de todos los años que he permanecido en el laboratorio. Nuestras continuas charlas, discusiones y algún que otro trabajo experimental sirvieron para mantener un buen espíritu científico.

A J. E. González Pastor, por su participación en la realización de alguno de los experimentos descritos en esta memoria, así como en la elaboración de alguna de sus figuras.

A Olga Mayo, la estrecha colaboración científica y humana que nos unió durante la realización de cierto trabajo experimental ajeno a la realización de esta Tesis Doctoral permanecerá para siempre en mi memoria.

A la Dra. M^º del Carmen Rodríguez por su profunda amistad y comprensión durante los años más duros y "excéntricos" que pasé en el laboratorio.

A Eladio Velasco por su gran amistad y cariño mostrado durante todos estos años. Recuerdo con nostalgia los días de paz y tranquilidad pasados en su pueblo de *Otones de Benjumea*.

A Rosario Baquero y Madeleine Bouzon por su amistad y el haber soportado estoicamente mis duros *días cuánticos*.

A Ana Valero, Carmen Martín y Concha Vidal, su amistad y ayuda técnica, que permitieron que el trabajo experimental descrito en esta Tesis se pudiera llevar a cabo.

Al Dr. Juan Pedro González Kirchner. Fue el contacto con él durante los estudios de licenciatura lo que permitió que mis pasos se encaminaran por la senda de la investigación. Su profunda y sincera amistad durante los once años que han transcurrido desde que nos conocimos ha sido fuente de satisfacción y de conocimiento.

A Marta Sáinz de la Maza por su amistad, la cual se ha ido incrementando desde que nos conocimos.

A Antonio Alonso del Hierro, por la paciencia mostrada durante la elaboración de gran parte de las figuras presentadas en esta memoria.

A todos los restantes miembros del laboratorio del Dr. Moreno que pasaron o permanecen en el mismo, su amistad ha permitido que mi estancia fuera mucho más agradable.

A todos los residentes de la INDIMA que me han apoyado moralmente durante los años que ha durado la realización de esta Tesis Doctoral.

A María, Mari Luz y al Dr. José Claudio Pérez-Díaz, su amistad y comprensión me ha sido muy valiosa durante los últimos tiempos.

Al Dr. Fernando Baquero. Las charlas científicas mantenidas con él fueron fuente de discusión y debate.

A mis padres y hermana por su decidido y continuado apoyo, sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible.

A MIS PADRES Y

A MI HERMANA

Al igual que las moléculas primitivas de DNA incrementaron su abundancia por replicación, una trayectoria del falso vacío pudo inflarse para producir una infinidad de universos, uno de los cuales podría ser el Universo en el cual nosotros vivimos.

Alan Guth

La experiencia religiosa cósmica es la fuerza más poderosa y noble que impulsa la investigación científica.

Albert Einstein

El esfuerzo por entender el Universo es una de las pocas cosas que eleva la vida humana un poco por encima del nivel de la farsa, y le confiere un poco de gracia a la tragedia.

Steven Weinberg

El orgullo es la ruina de todo ser humano. Nuestro objetivo debería ser vivir sin orgullo. Uno tiene que ser humilde ante el problema, si quiere ser un buen científico.

Alan Sandage

La ciencia es una empresa esencialmente anarquista, el anarquismo teórico es más humanista y más adecuado para estimular el progreso que las alternativas basadas en la ley y el orden.

Paul Feyerabend

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Las microcinas	2
1.2. La microcina B17	3
1.2.1. El sistema de producción del antibiótico: determinantes plasmídicos y cromosómicos	4
1.2.2. Regulación de la expresión génica del operón <i>mcb</i> en fase estacionaria	6
1.2.2.1. Regulación del promotor <i>Pmcb</i>	7
1.3. La microcina C7	9
1.3.1. El sistema genético de producción e inmunidad	10
1.3.2. Regulación de la expresión del operón <i>mccABC</i> en fase estacionaria	11
1.4. Objetivos del trabajo	12
2. MATERIALES	15
2.1. Estirpes bacterianas, plásmidos y bacteriófagos	16
2.2. Medios de cultivo	16
2.3. Antibióticos e indicadores	16
3. METODOS	20
3.1. Condiciones de cultivo	21
3.2. Técnicas Genéticas Generales	21
3.2.1. Obtención de lisados de fagos y transducción con el bacteriófago P1 <i>vir</i>	21
3.2.2. Mutagénesis con el transposón Tn10	21
3.2.3. Conjugación	22
3.2.4. Técnica de sustitución alélica	22
3.3. Clonado con el elemento mini-MudII4042	23
3.3.1. Clonado del alelo <i>hns-90::Tn10</i>	23
3.3.2. Aislamiento del plásmido pGG500	23
3.4. Pruebas de producción de microcina C7 y B17	23

3.5. Pruebas de resistencia y/o inmunidad a fagos	.24
3.6. Ensayos enzimáticos	.24
3.7. Técnicas de manipulación de DNA	.25
3.8. Mapeo con nucleasa S1	.26
4. RESULTADOS	.28
4.1. Mutagénesis de la estirpe RYC150(pMM500) con el transposón <i>Tn10</i>	.29
4.1.1. Aislamiento del mutante JMG89	.29
4.1.2. Caracterización fenotípica del mutante JMG89	.30
4.2. Identificación del gen inactivado por la inserción <i>Tn10</i> en el mutante JMG89	.32
4.2.1. Localización del <i>Tn10</i>	.32
4.2.2. Clonado del <i>Tn10</i> y regiones cromosómicas adyacentes: localización física dentro del gen <i>hns</i>	.36
4.3. Efecto de la mutación <i>hns-90::Tn10</i> sobre la expresión de una fusión <i>mcbA-lacZ</i>	.38
4.4. Efecto de la mutación <i>hns-90::Tn10</i> y <i>rpoS::Kan</i> sobre la expresión de una fusión <i>mccB-lacZ</i>	.40
4.5. Estudio del sitio de iniciación de la transcripción en el promotor <i>Pmcc</i> en ausencia de H-NS y/o RpoS	.41
4.6. Transcripción del promotor <i>Pmcc</i> en contexto <i>hns⁻ crp⁻</i>	.44
4.7. Aislamiento de un fragmento cromosómico de unas 19 Kb que en alto número de copias reprime la expresión de una fusión <i>mccB-lacZ</i>	.48
4.7.1. Aislamiento del plásmido pGG500	.48
4.7.2. Localización del fragmento cromosómico del pGG500 en el mapa físico de <i>E. coli</i> .	.49
4.7.3. Identificación de un nuevo locus cercano al gen <i>hns</i> : efecto del mismo en la expresión de la fusión <i>mccB-lacZ</i>	.52
4.7.3.1. Construcción del plásmido pGG800 y análisis de delección e inserción del mismo	.55

4.7.4. Efecto del incremento del número de copias de <i>hns</i> y <i>hnr</i> en la expresión de la fusión <i>mccB-lacZ</i> a lo largo del ciclo de crecimiento	57
4.7.5. Construcción de un mutante cromosómico <i>hnr-1::Kan</i>	60
4.7.5.1. Construcción del plásmido pGGK200	60
4.7.5.2. Sustitución del alelo silvestre por el alelo mutante <i>hnr-1::Kan</i>	60
4.7.5.3. Localización de la mutación <i>hnr-1::Kan</i> en el cromosoma de la estirpe JMG200	61
4.7.6. Efecto de las mutaciones <i>hns-90::Tn10</i> y <i>hnr-1::Kan</i> sobre la expresión de la fusión <i>mccB-lacZ</i>	61
5. DISCUSION	65
5.1. La proteína H-NS regula negativamente la expresión de los operones <i>mcb</i> y <i>mccABC</i>	66
5.1.1. El gen <i>hns</i> y su producto	67
5.1.2. La proteína H-NS y la regulación del promotor <i>Pmcb</i>	71
5.1.3. La proteína H-NS y la regulación del promotor <i>Pmcc</i>	72
5.2. Identificación de un nuevo locus, <i>hnr</i> , que regula negativamente la expresión del operón <i>mccABC</i>	75
6. CONCLUSIONES	77
7. BIBLIOGRAFIA	80

ABREVIATURAS

Ap	ampicilina
Cm	cloranfenicol
Da	dalton
D.O.	densidad óptica
his	histidina
Kb	kilobases (kilo-par de bases)
kDa	kilodalton
Km	kanamicina
leu	leucina
Nx	ácido nalidíxico
ONPG	orto-nitrofenil- β -D-galactósido
pro	prolina
Sm	estreptomicina
Tc	tetraciclina
thr	treonina
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

1. INTRODUCCION

1.1.-LAS MICROCINAS.

Las microcinas constituyen una familia de antibióticos peptídicos de bajo peso molecular producidos por diversas especies de enterobacterias. Fueron descubiertas durante los estudios encaminados a caracterizar sustancias antibióticas producidas por microorganismos intestinales, posiblemente implicadas en los sucesivos desplazamientos microbianos que ocurren en la flora intestinal humana (Asensio *et al.*, 1976). Se definieron inicialmente como aquellas sustancias producidas por bacterias Gram-negativas capaces de pasar a través de una membrana de celofán e inhibir el crecimiento de una cepa indicadora de *E.coli* (Asensio *et al.*, 1976). Se distinguen de las colicinas por su menor peso molecular (menos de 10 kDa) y debido a que su síntesis no es inducida por las condiciones que disparan el sistema de reparación S.O.S, sino que ocurre durante la entrada de las células en la fase estacionaria del crecimiento.

Estudios bioquímicos y de inmunidad cruzada de las cepas microcinogénicas han permitido clasificarlas en seis grupos (A, B, C, D, E y H) (Baquero y Moreno, 1984; Laviña *et al.*, 1990). Los determinantes genéticos de producción e inmunidad a las microcinas se encuentran generalmente en plásmidos (Baquero y Moreno, 1984); sólo en el caso de la microcina H47 (grupo H) los determinantes genéticos de producción e inmunidad están en el cromosoma (Laviña *et al.*, 1990; Gaggero *et al.*, 1993).

Otras sustancias con actividad antibiótica, inicialmente clasificadas como colicinas, se pueden incluir dentro del grupo de las microcinas: así, la sustancia conocida como colicina X es en realidad microcina B17 (San Millán *et al.*, 1987); también estarían incluidas dentro de este grupo la colicina V (Kolter y Moreno, 1992) y la colicina G (J. Blázquez,

comunicación personal).

Hay que destacar por último que el estudio de las microcinas, inicialmente de naturaleza ecológica, se ha ido ampliando y diversificando, de tal manera que ha servido como modelo de estudio de diferentes aspectos de la fisiología y genética bacteriana: ha permitido analizar los determinantes genéticos implicados en la biosíntesis de pequeñas moléculas antibióticas, ha servido de modelo para el análisis de la secreción, entrada y modo de acción de moléculas peptídicas, y ha facilitado el estudio de la base genética que subyace a la producción de las mismas en fase estacionaria del crecimiento. Este estudio, actualmente en curso, puede aportar luz a varios sucesos que ocurren en esta fase, uno de los periodos peor comprendidos del ciclo de crecimiento bacteriano.

1.2.- LA MICROCINA B17.

La microcina B17 (MccB17), representante de las microcinas del grupo B, es un antibiótico péptidico de 3200 Da, termoresistente, y no susceptible a pHs extremos (Herrero y Moreno, 1986).

El estudio del modo de acción de la microcina B17 se ha efectuado mediante aislamiento y caracterización de mutantes de *E.coli* resistentes al antibiótico, lo que ha permitido definir las vías de entrada y el blanco de acción del mismo.

La entrada al interior celular estaría facilitada inicialmente por la porina de la membrana externa OmpF, puesto que mutantes cromosómicos en *ompF* (el gen estructural) o en *ompR* (gen regulador del anterior) resisten a concentraciones moderadas de microcina B17. El producto codificado por el gen *sbmA*, una proteína localizada en la membrana interna,

estaría implicado en la importación final de la microcina B17 al interior celular (Mayo y Moreno, en preparación). Mutaciones en *sbm4* confieren resistencia total a la microcina B17 (Laviña *et al.*, 1986).

Una vez dentro de las células, la microcina B17 ejerce su acción bactericida a través de la inhibición de la síntesis del DNA. Como consecuencia de esta inhibición se induce el sistema S.O.S de reparación y después ocurre la degradación masiva del DNA (Herrero y Moreno, 1986). El blanco de la acción intracelular de la microcina B17 es la DNA girasa (Vizán *et al.*, 1991). El mecanismo de acción es similar al de otros antibióticos inhibidores de la DNA girasa tales como las quinolonas. Este grupo de sustancias actúan sobre un intermedio de reacción al que se denomina "complejo cortable" (*cleavable complex*). La microcina MccB17 es el primer antibiótico de naturaleza peptídica que muestra tales propiedades.

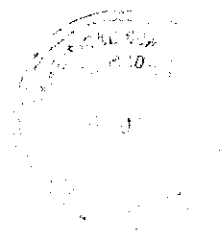
1.2.1.- El sistema de producción del antibiótico: determinantes plasmídicos y cromosómicos.

La microcina B17 está producida por cepas de *E.coli* que portan el plásmido conjugativo pMccB17 de 70 Kb, presente en una o dos copias por célula y perteneciente al grupo de incompatibilidad IncFII (Baquero *et al.*, 1978). Los determinantes genéticos de producción e inmunidad al antibiótico se agrupan en un operón constituido por siete genes denominados *mcbABCDEFG* (San Millán *et al.*, 1985a y 1985b; Genilloud *et al.*, 1989) (Figura 1.1A).

mcbA codifica el precursor de la microcina B17, un polipéptido de 69 aminoácidos que sufre un complicado procesamiento post-traducciona para rendir la molécula de MccB17 madura. Tal procesamiento implica una serie de etapas secuenciales de modificación química de naturaleza desconocida, plegamiento y escisión endoproteolítica del precursor, con la consiguiente eliminación de los 26 residuos N-terminales (Davagnino *et al.*, 1986; Yorgey *et al.*, 1993). Recientemente se ha descrito que la molécula madura, de 43 aminoácidos, de los cuales 26 son residuos de glicina (60 %), tiene varios cromóforos unidos covalentemente (Yorgey *et al.*, 1993).

Los productos de los tres genes siguientes (*mcbBCD*) están implicados en la producción del antibiótico, participando en el proceso secuencial de maduración (modificación y plegamiento) del producto primario codificado por el gen *mcbA* (Yorgey *et al.*, 1993). La inactivación de cualquiera de estos genes conduce a la ausencia de actividad antibiótica (San Millán *et al.*, 1985a y 1985b). Sin embargo, aún falta por asignar funciones específicas a cada uno de sus productos. Recientemente, una alta homología de secuencia (80%) ha sido encontrada entre McbC y TfxB, el producto del gen *tfxB*, el cual está implicado en la producción del antibiótico peptídico bactericida Trifolitoxina (TFX), producido por la estirpe T2Y de *Rhizobium leguminosarum* (Breil *et al.*, 1993). Esta observación sugiere que ambos péptidos comparten una etapa similar en el proceso de maduración.

La producción del antibiótico requiere también el gen cromosómico *pmbA*, cuyo producto, una proteína de 50 KDa, estaría posiblemente implicado en la maduración del antibiótico, habiéndose sugerido que esta función podría consistir en la escisión del precursor McbA para la eliminación de los 26 residuos N-terminales del precursor McbA (Rodríguez-



Sáinz *et al.*, 1990).

Los genes *mcbEFG* codifican las funciones de inmunidad a la microcina B17. Dos mecanismos complementarios son responsables de la misma. El primero se debe a los productos de los genes *mcbEF*. El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica ha indicado que McbE sería una proteína integral de la membrana citoplásmica, mientras que McbF sería posiblemente una ATPasa. Esta observación ha permitido sugerir que estas dos proteínas constituirían una "bomba" situada en la membrana interna que estaría encargada de exportar activamente la microcina a través de la misma (Garrido *et al.*, 1988).

El otro sistema de inmunidad estaría mediado por el producto del gen *mcbG*, a través de un mecanismo aún no determinado, aunque se ha sugerido que podría consistir en una protección más directa del blanco de la microcina B17 (Garrido *et al.*, 1988).

1.2.2.- Regulación de la expresión génica del operón *mcb* en fase estacionaria.

La producción de la microcina B17 tiene lugar en la fase estacionaria del crecimiento. Esta producción es una consecuencia de la expresión de los genes *mcb* en esta fase del ciclo de crecimiento.

La aplicación de la técnica de mapeo S1 y el estudio de la expresión de fusiones *mcb-lacZ* han permitido establecer que todos los genes *mcb* son transcritos en la misma dirección a partir del promotor *Pmcb*, que está localizado unas 60 pares de bases delante del gen estructural *mcbA* (Hernández-Chico *et al.*, 1986; Connell *et al.*, 1987; Genilloud *et al.*, 1989) (Fig 1.1A).

Un segundo promotor P2, que está localizado dentro del gen *mcbC*, dirige la transcripción de *mcbD* y de los genes situados detrás, aunque la mayoría de la transcripción (80–90%) de los genes distales está dirigida a partir de *Pmcb* (Genilloud *et al.*, 1989).

1.2.2.1.– Regulación del promotor *Pmcb*.

El promotor *Pmcb* es un ejemplo típico de un grupo de promotores denominados colectivamente "gearbox", cuyo nivel de expresión es inversamente proporcional al ritmo de crecimiento (Vicente *et al.*, 1991). Estos promotores tienen una secuencia de DNA característica, altamente conservada dentro del grupo, alrededor de las regiones –10 y –35 del promotor (Vicente *et al.*, 1990) (Fig 1.1A).

La expresión del operón *mcb* a partir del promotor *Pmcb* tiene lugar cuando los cultivos entran en la fase estacionaria del crecimiento (Hernández-chico *et al.*, 1986; Connell *et al.*, 1987). Los productos de varios genes cromosómicos regulan positiva (OmpR, IHF) o negativamente (MprA) esta expresión.

La expresión óptima del operón *mcb* en fase estacionaria, estimada a partir de la actividad β -galactosidasa de fusiones *mcb-lacZ*, requiere el activador OmpR. Esta proteína de unión al DNA pertenece a la amplia familia de proteínas que constituyen el componente regulador en los sistemas sensor-regulador de procariontes, los cuales están implicadas en la transmisión de señales ambientales al interior celular (Stock *et al.*, 1990; Parkinson S.J., 1993). El par EnvZ–OmpR es un ejemplo típico de esta familia. EnvZ (sensor) es una proteína histidina quinasa (HPK)/fosfatasa que se encuentra situada en la membrana interna de la célula. Dependiendo de la osmolaridad del medio, EnvZ controla los niveles de fosforilación

de OmpR (regulador). Según su estado de fosforilación, esta última proteína regula diferencialmente, activando o reprimiendo, la transcripción de los genes que codifican las porinas OmpC y OmpF (Mizuno y Mizushima, 1990).

El estudio de la expresión de una fusión *mcbA-lacZ* en contexto deficiente en OmpR, así como del efecto de la delección de los presuntos sitios de unión a OmpR en el promotor *Pmcb*. (ver Figura 1.1A), han permitido concluir que *Pmcb* estaría organizado en dos regiones funcionales: una comprendida entre las posiciones +1 y -54 que sería responsable de la inducción de *Pmcb* en fase estacionaria, y otra situada entre -54 y -166, requerida para que OmpR ejerza su efecto de activación (Fig 1.1A). Este efecto de activación repercute en un aumento de los niveles de expresión de *mcb* obtenidos tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria (Bohannon *et al.*, 1991).

El segundo regulador positivo de la expresión del operón *mcb* es el factor de integración del huésped (IHF). Se trata de una proteína heterodimérica ($\alpha\beta$), del tipo "histone-like", que se une a secuencias específicas de DNA, induciendo una fuerte curvatura en las mismas. Este modo de unión al DNA le permite participar en diversos procesos, tales como la recombinación específica de sitio (integración del DNA del bacteriófago λ en el cromosoma bacteriano); la transposición (*ISI*, *Tn10*); la regulación de la expresión génica tanto a nivel transcripcional como postransduccional; la replicación, y otros procesos celulares (revisado en Friedman, 1988; Freundlich *et al.*, 1992).

Mutaciones en los genes *himA* y *himD*, los cuales codifican respectivamente las subunidades α y β del IHF, provocan un fuerte descenso en los niveles de actividad de una fusión *mcbA-lacZ*, anulando la inducción en fase estacionaria. Este descenso se acompaña

además de una fuerte disminución de la producción de microcina B17. Estos resultados han sugerido la posibilidad de que IHF controle directa o indirectamente la expresión del operón *mcb* (del Castillo, I., Tesis Doctoral). En la figura 1.1A se señalan los posibles sitios de unión de IHF a *Pmcb* que pudieran ser utilizados en la regulación de la expresión de los genes *mcb*.

Por último, un regulador negativo del operón *Pmcb* es el producto del gen *mprA*, situado en el minuto 57.5 del mapa genético de *E. coli*. Fue identificado porque en alto número de copias reducía la producción de microcina B17. Posteriormente se comprobó que esta reducción se correlacionaba con la represión de la expresión en fase estacionaria de fusiones *mcb-lac* tanto de operones como de proteínas (del Castillo I. *et al.*, 1990). La obtención de mutantes nulos ($MprA^-$), en los que se observa una fuerte desrepresión de dichas fusiones a lo largo de todo el ciclo de crecimiento, indica que MprA es un regulador negativo de la transcripción del operón *mcb*, a nivel del promotor *Pmcb* (del Castillo *et al.*, 1991).

1.3.- LA MICROCINA C7.

La microcina C7 (MccC7) es un heptapéptido que tiene modificados los extremos N y C terminales (García-Bustos *et al.*, 1985). La microcina C7 inhibe la síntesis de proteínas (García-Bustos *et al.*, 1984). Recientemente se ha determinado que el residuo de metionina N-terminal se halla formilado, mientras que el residuo C-terminal (Asp) llevaría un sustituyente complejo, en cuya composición se encuentra un nucleótido. (J. L. San Millán y J. E. González-Pastor, comunicación personal).

1.3.1.– El sistema genético de producción e inmunidad.

La microcina C7 (MccC7) es producida por células portadoras del plásmido de 43 Kb pMccC7, perteneciente al grupo de incompatibilidad IncX (Novoa *et al.*, 1986). Los determinantes genéticos para la producción e inmunidad a la microcina están contenidos en un segmento de 6.5 Kb del pMccC7 (J. E. González–Pastor comunicación personal). Dentro de este segmento se definieron originalmente por estudios de complementación cuatro regiones, α , β , γ y δ (Novoa *et al.*, 1986). Recientemente se ha completado la determinación de su secuencia, lo que ha permitido establecer el esquema de organización del sistema genético *mcc* representado en la figura 1.1B (González–Pastor J. E., comunicación personal). Al examinar la secuencia de DNA inmediatamente delante de la región α , se detectó un cuadro de lectura abierta (ORF) de 21 nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos casi idéntica a la del heptapéptido de la microcina C7 (Asn en vez de Asp en la posición 7). Recientemente se ha podido demostrar que este ORF es en realidad el gen estructural de la microcina C7 (González–Pastor *et al.*, en preparación). En las regiones α y γ se encuentran localizados los genes *mccB* y *mccD*, respectivamente, cuyos productos están implicados en la producción del antibiótico. Por otra parte, en las regiones β y δ se encuentran situados los genes *mccC* y *mccE*, respectivamente. MccC y MccE estarían implicados tanto en la producción como en la inmunidad a la microcina C7. Por último, MccF, producto del gen *mccF*, solamente conferiría inmunidad al antibiótico (Fig 1.1B).

1.3.2.- Regulación de la expresión del operón *mccABC* en fase estacionaria.

Los genes *mccABC* constituyen un operón cuya expresión tiene lugar en la fase estacionaria del crecimiento (Fig 1.1B). La transcripción en esta fase está dirigida por el promotor principal *Pmcc* situado al principio del operón (González-Pastor *et al.*, manuscrito en preparación). *Pmcc* dirige la transcripción de los genes proximales situados en las regiones inicialmente denominadas α y β (*mccABC*), aunque no se conoce si la transcripción de los genes más distales del operón se origina también en *Pmcc* (Fig 1.1B).

El promotor *Pmcc* es regulado positivamente por los productos de los genes *crp* y *rpoS* (*appR*). El gen *crp* codifica la proteína receptora de AMPc (CRP, también conocida como CAP). La actividad de CRP está regulada por la concentración de AMPc, la cual a su vez está modulada por la fuente de carbono en la que las células crecen. Cuando las células son cultivadas en fuentes de carbono pobres, sube la concentración de AMPc, que se une a CRP produciendo un cambio conformacional en la proteína, que le permite unirse a sitios localizados dentro o cercanos a los promotores que controla, para activar o reprimir la transcripción (Para revisión, de Crombrughe *et al.*, 1984; Botsford *et al.*, 1992; Kolb *et al.*, 1993). Una mutación de delección del gen *crp* ($\Delta crp-39$) provoca que la expresión de una fusión *mccB-lacZ* sea totalmente nula en fase estacionaria (González-Pastor *et al.*, en preparación).

El locus *appR* fue identificado originalmente como un gen regulador cuyo producto era necesario para activar la expresión en fase estacionaria de *appA*, el gen estructural de la fosfatasa ácida (AppA) (Touati *et al.*, 1986). Mutaciones en *appR* provocan un fuerte descenso en los niveles de producción de la microcina C7 y en la expresión en fase estacionaria de una

fusión *mccB-lacZ* (Díaz-Guerra *et al.*, 1989). Estos resultados sugerían que AppR era un activador requerido para la expresión óptima de los genes *mcc* en fase estacionaria.

Las mutaciones en el locus *appR*, *katF*, *nur*, *csi-2*, han sido identificadas como alélicas de un gen conocido con el nombre de *rpoS* (Lange y Hengge-Aronis, 1991). La alta homología de RpoS con los factores sigmas vegetativos de la RNA polimerasa (Mulvey y Loewen, 1989; Lonetto *et al.*, 1992) había permitido sugerir que RpoS sería un factor sigma alternativo utilizado por la RNA polimerasa para la expresión de genes expresados en la fase estacionaria del crecimiento y/o en condiciones de privación de nutrientes (Lange y Hengge-Aronis, 1991). Recientemente ha sido demostrado, mediante estudios de transcripción *in vitro*, que el producto del gen *rpoS* es realmente un factor sigma utilizado por la RNA polimerasa, denominado indistintamente σ^s o σ^{38} (Tanaka *et al.*, 1993).

1.4.- OBJETIVOS DEL TRABAJO.

Como ya se ha comentado en los párrafos anteriores, estudios previos realizados en nuestro laboratorio habían permitido identificar varios genes cromosómicos cuyos productos están implicados en la regulación de la expresión del operón *mcb* o del operón *mcc*. Sin embargo, aún no se había identificado ninguna función cromosómica cuya ausencia por mutación afectara a la vez a la expresión de ambos sistemas. Dado que la expresión de los dos operones se induce en la fase estacionaria del crecimiento, era razonable hipotetizar que existieran genes que controlaran la expresión de ambos sistemas durante dicha fase. Con el objeto de identificar esos hipotéticos genes, se procedió al aislamiento de mutantes por

inserción del transposón *Tn10* que tuvieran afectadas tanto la producción de microcina C7 como la expresión de la fusión *mcbA-lacZ*. Los resultados obtenidos se presentan en los apartados 4.1-4.6.

Por otra parte, consideramos interesante buscar presuntos reguladores negativos de la expresión del operón *mcc*. Con este objetivo, se procedió a clonar fragmentos del cromosoma de *E.coli* en un vector multicopia. La idea subyacente era buscar genes, en principio silvestres, que en alto número de copias regulasen negativamente la expresión de una fusión *mccB-lacZ*. Esta estrategia ha sido utilizada previamente en nuestro laboratorio para buscar reguladores negativos del operón *mcb*, y ha permitido identificar el gen *mprA* (del Castillo *et al.*, 1990) (ver apartado 1.2.2.1). Los resultados de este trabajo se presentan en el apartado 4.7.

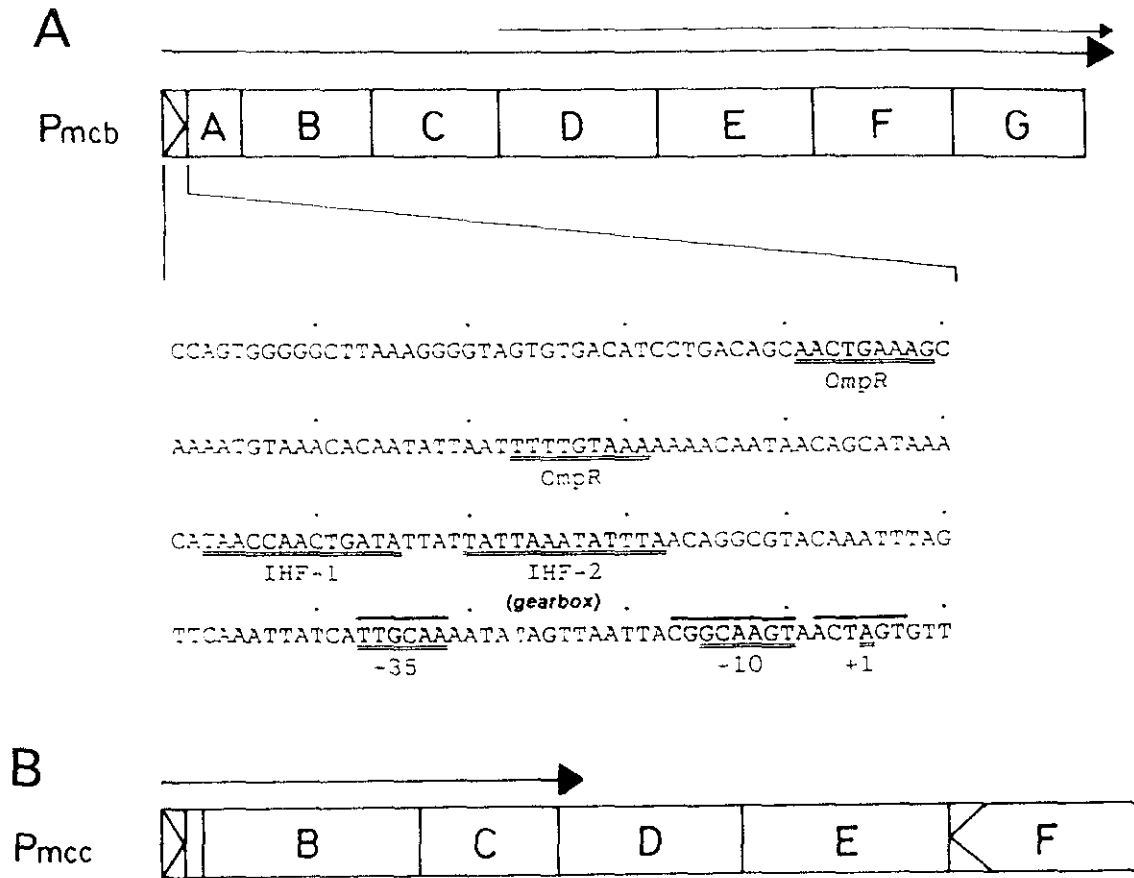
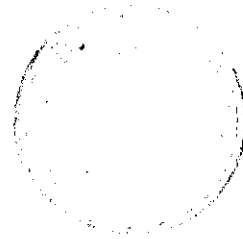


Fig 1.1.- A) Esquema de la organización de los genes *mcb* (microcina B17). Se representa la secuencia de DNA del promotor *Pmcb* y zonas adyacentes. Se han subrayado las regiones -10 y -35, los posibles sitios de unión de las proteínas activadoras OmpR (Genilloud *et al.*, 1989; Bohannon *et al.*, 1991) y IHF (del Castillo I., Tesis doctoral), así como la secuencia de tipo "gearbox" (Vicente *et al.*, 1990). B) Esquema de la organización de los genes *mcc* (microcina C7). El promotor *Pmcc* dirige la transcripción de los genes *mccABC*.



72809009085

2. MATERIALES

2.1.– Estirpes bacterianas, plásmidos y bacteriófagos.

Las estirpes bacterianas, plásmidos y bacteriófagos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 2.1.

2.2.– Medios de cultivo.

El medio rico LB (Luria–Bertani) y el medio mínimo M63, tanto sólidos (placas) como líquidos, fueron preparados como se describe en Miller (1972). El medio mínimo líquido (por litro) fue suplementado con 10 ml de glucosa 20%, 1 ml de vitamina B1 1mg/ml, y 1 ml de $MgSO_4$ 1M. El medio LBON fue preparado omitiendo el NaCl de la composición descrita para el LB. Los medios P1 y P75, utilizados para la preparación de los lisados de P1 $_{vir}$ y λ 370 respectivamente, así como el medio rico 2XTY, utilizado para cultivar la estirpe 71–18, fueron preparados según Miller (1972).

2.3.– Antibióticos e indicadores.

Los antibióticos fueron utilizados a las siguientes concentraciones finales (μ g/ml): ampicilina (Ap), 40; kanamicina (Km), 30; cloranfenicol (Cm), 30; tetraciclina (Tc), 20 (generalmente) o 4 (para el clonado del Tn10 con mini–MudII4042 (ver sección 3.3); bleomicina (ble), 15; estreptomycin (Sm), 20. El indicador 5–bromo–4–cloro–3–indolil– β –D–galactósido (X–gal) fue añadido a las placas a una concentración final de 50 μ g/ml.

Tabla 2.1. Lista de estirpes de *E. coli* K12, plásmidos y bacteriófagos utilizados en este trabajo.

Estirpes	Genotipo/Fenotipo	Fuente y /o Referencia
BM21	F ⁻ <i>gyrA</i> (λ^+)	Colección del Laboratorio
JMG89	RYC150 <i>hns-90::Tn10</i> (pMM550)	Este trabajo
JMG90	RYC150 <i>hns-90::Tn10</i>	Este trabajo
JMG92	pop3000 <i>hns-90::Tn10</i>	Este trabajo
JMG93	KL16 <i>hns-90::Tn10</i>	Este trabajo
JMG94	KL14 <i>hns-90::Tn10</i>	Este trabajo
JMG96	po3001.6 <i>hns-90::Tn10</i>	Este trabajo
JMG100	MC4100 <i>hns-90::Tn10</i>	Este trabajo
JMG102	MC4100 <i>rpoS::Kan</i>	Este trabajo
JMG103	JMG102 <i>hns-90::Tn10</i>	Este trabajo
JMG104	SBS688 <i>hns-90::Tn10</i>	Este trabajo
JMG200	MC4100 <i>hnr-1::Kan</i>	Este trabajo
JMG300	JMG200 <i>hns-90::Tn10</i>	Este trabajo
JC7623	F ⁻ <i>thr leu proA2 lacY1 galR his</i> <i>argE rpsL supE mtl syl recB21</i> <i>recC22 sbcB15 pil⁻</i>	Winans <i>et al.</i> (1985)
KL14	<i>Hfr thi1 rel1</i>	Colección del Laboratorio
KL16	<i>Hfr thi1 rel1</i>	Colección del Laboratorio
MC4100	F ⁻ Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>araD139 flbB5301</i> <i>fruA25 relA1 rpsL150 rbsR</i>	Colección del Laboratorio
pop3000	<i>HfrH</i>	Colección del Laboratorio
pop3001.6	MC4100 <i>malT::Mu cts</i>	Colección del Laboratorio
RYC1000	MC4100 Δ <i>rbs7 recA56 gyrA</i>	Colección del Laboratorio
RYC22	F ⁻ <i>thr leu proA his4 argE thiA</i> <i>gal xyl lacY rpsL gyrA</i>	Colección del laboratorio Colección del laboratorio
RYC150	MC4100 $\lambda_{lac tet}$ Φ (<i>mcbA-lacZ</i>)37	Colección del Laboratorio
SBS688	MC4100 Δ <i>crp-39</i>	P. L. Boquet
W3110	F ⁻ IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1	Colección del Laboratorio
ZK126	W3110 Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>tna-2</i>	Bohannon <i>et al.</i> (1991)

ZK1000	ZK126 <i>rpoS::Kan</i>	Bohannon <i>et al.</i> (1991)
71-18	$\Delta(\textit{pro-lac})$ <i>thi supE</i> (F' <i>proAB lac^a lacZ</i> Δ M15)	Messing 1983

Bacteriófagos	Genotipo/Fenotipo	Fuente y/o Referencia
P1 <i>vir</i>		Colección del Laboratorio
TuIa		Colección del Laboratorio
λ <i>vir</i>		Colección del Laboratorio
Φ 80 <i>vir</i>		Colección del Laboratorio
λ 370	<i>b221 cI857 cI178::Tn10 O_{UGA}261</i>	Colección del Laboratorio
M13tg131	<i>lacZ_{α}</i>	Colección del Laboratorio
Plásmidos		
pEG109	MudII4042:: <i>phoA-proC</i>	Groisman <i>et al.</i> (1984)
pDG250	fusión génica <i>mccB-lacZ</i> ; replicón pMccB17	Díaz-Guerra <i>et al.</i> (1989)
pMM501	pMccC7:: <i>Tn5 MccC7⁺ ImmB17⁺</i>	Novoa <i>et al.</i> (1986)
pMM550	pBR322 portando los genes <i>mccABCDE</i>	Novoa <i>et al.</i> (1986)
pMM833	pMccB17:: <i>Tn5 MccB17⁺ ImmB17⁺</i>	Colección del Laboratorio
pBR322	replicón pMB1 Ap ^r Tc ^r	Colección del Laboratorio
pACYC184	replicón p15A Cm ^r Tc ^r	Colección del Laboratorio
pUC18	Ap ^r <i>lacZ_{α}</i> replicón colE1	Colección del Laboratorio
pUC4K	Ap ^r plásmido portador de un cassette de resistencia a kanamicina (<i>Kan</i>)	Farmacia
pKT254 Ω -Ap	plásmido portador de un cassette de resistencia a ampicilina (Ap ^r)	Fellay <i>et al.</i> (1987)

Notas a la Tabla 2.1.

1. La mutación *rpoS::Kan* se transfirió mediante transducción P1*vir* desde la estirpe ZK1000 a la estirpe MC4100 para dar origen a la estirpe JMG102. La estirpe JMG102 mostraba dos fenotipos característicos conferidos por mutaciones en el gen *rpoS*.

a) Deficiencia en la catalasa HPII (codificada por el gen *katE*), la cual se manifiesta en una ausencia de burbujeo (con respecto al control silvestre (MC4100) después de depositar una

gota de H₂O₂ al 30 % sobre una estría crecida toda la noche en placas de LB (Bohannon *et al.*, 1991; Lange y Henge-Aronis 1991).

b) Disminución en la actividad fosfatasa alcalina (AppA) comparada con la estirpe MC4100 (Touati *et al.*, 1986; Lange y Henge-Aronis 1991; Bohannon *et al.*, 1991).

2. La transferencia de la mutación *hns-90::Tn10* a los distintos contextos (JMG102, JMG104) fue realizada mediante transducción P1*vir*, seleccionándose los transductantes como clones Tc^r.

3. El plásmido monocopia pDG250 portador de la fusión *mccB-lacZ* fue introducido en las estirpes JMG102, JMG103, JMG200 y JMG300 seleccionando los transformantes como clones resistentes al antibiótico bleomicina (a una concentración final en placa de 15 µg/ml).

3. METODOS

3.1.- Condiciones de cultivo.

La incubación de los cultivos en medio líquido se llevó a cabo en baños termostatzados con agitación. El crecimiento de estos cultivos se siguió mediante medidas de turbidez (absorbancia a 600nm).

Para los cultivos en medio sólido se utilizaron placas de petri, que se incubaron de 12 a 48 horas en estufas termostatzadas.

La temperatura de incubación fue para la mayor parte de las estirpes utilizadas de 37 °C. Ocasionalmente se emplearon las temperaturas de 30 °C y 42 °C en la manipulación de las bacterias termosensibles.

3.2.- Técnicas Genéticas Generales.

3.2.1.- Obtención de lisados de fagos y transducción con el bacteriófago P1vir.

Para la preparación de lisados, así como para la transducción con P1vir procedimos según los protocolos standard descritos por Miller (1972). Para la obtención de lisados de los fagos Tu1a y Φ 80vir se procedió del mismo modo que con el P1vir. Para la preparación de lisados de λ vir se utilizó como medio de propagación P75 (Miller 1972) al que se le añadieron SO_4Mg_2 (20mM) y maltosa (0.4%).

3.2.2.- Mutagénesis con el transposón Tn10.

En primer lugar preparamos un banco de inserciones Tn10 sobre la estirpe silvestre MC4100, mediante infección con el fago λ 370 (*b221 cI857 cI178::Tn10 O_{UGA}261*) seleccionando las inserciones como clones Tc^r resistentes. Sobre este pool de inserciones se

preparó un lisado de P1vir con el que se infectó la cepa RYC150(pMM550) obteniéndose de este modo aproximadamente unos 3000 transductantes ($Ap^r Tc^r$) a 30 °C en placas de LB suplementadas con el indicador X-gal.

3.2.3.- Conjugación.

Se mezclaron un cultivo de la estirpe donadora (Hfrs o células portadoras de plásmidos conjugativos) con uno de la estirpe receptora (bacterias F^-) en la proporción 1:10 (célula/célula). La incubación se efectuó sin agitación durante un tiempo variable, normalmente 60 minutos para la conjugación con plásmidos (pMM833 y pMM501). La interrupción de las conjugaciones JMG92 x BM21 y JMG93 x BM21 (Fig 4.2) fue llevada a cabo mediante fuerte agitación con vortex.

3.2.4.- Técnica de sustitución alélica (Winans *et al.*, 1985).

Esta técnica de sustitución alélica se basa en el empleo de la estirpe JC7623, portadora de las mutaciones *recB21 recC22 sbcCB15* (Tabla 2.1). La sustitución del alelo silvestre cromosómico por el alelo mutante (normalmente portador de una inserción que confiere resistencia a un antibiótico) tiene lugar mediante recombinación homóloga. El alelo mutante es suministrado en un plásmido que se ha linealizado previamente. Con este DNA en forma lineal se transforma la estirpe JC7623, seleccionándose los transformantes como clones resistentes al antibiótico adecuado.

3.3.- Clonado con el elemento miniMudII4042 (Groisman *et al.*, 1984).

3.3.1- Clonado del alelo *hns-90::Tn10*.

Se procedió según el método de clonado "*in vivo*" descrito por Groisman *et al.* , (1984). El alelo *hns-90::Tn10* fue transferido mediante transducción P1*vir* desde la estirpe JMG100 a la cepa pop3001.6 (pEG109). El plásmido pEG109 porta un elemento mini-MudII4042 que lleva el replicón p15A y el gen *cat* (Cm^r) procedentes del pACYC184. Se obtuvo un lisado de Mu mediante termoinducción a partir de un transductante Tc^r, Cm^r (JMG96). Con este lisado se infectó la estirpe pop3001.6. Varios clones Cm^r Tc^r (a una concentración final de Tc en placa de 4µg/ml) fueron obtenidos de la muducción. El DNA plasmídico de uno de ellos (pGG300) fue purificado para posterior análisis.

3.3.2.- Aislamiento del plásmido pGG500.

Con un lisado de Mu obtenido mediante termoinducción a partir de la estirpe pop3001.6(pEG109) se infectó la estirpe receptora pop3001.6(pDG250). Los muductantes fueron seleccionados como clones Cm^r Km^r en placas de LB suplementadas con el indicador X-gal a 37 °C.

3.4.- Pruebas de producción de microcina C7 y B17.

La producción de las microcinas B17 y C7 se evaluó mediante detección de los halos de antibiosis producidos sobre un césped de una estirpe sensible (RYC1000). Se preparó un césped bacteriano sembrando sobre medio mínimo M63, 0.1 ml de una suspensión de células RYC1000. La adición de 3 ml de agar blando mínimo contribuyó a la distribución uniforme



de la suspensión celular. A continuación se inocularon por picada los clones cuya producción se deseaba probar. Tras incubación de 12 horas, los clones productores del antibiótico formaron halos claros de antibiosis debidos a la inhibición del crecimiento de la estirpe sensible causada por el antibiótico difundido a través del agar. El diámetro de los halos reflejó el grado de producción.

3.5.- Pruebas de resistencia y/o inmunidad a fagos.

Para determinar la sensibilidad de las distintas estirpes bacterianas a un fago se utilizó el método del "cross-streaking". En el borde de placas de LB se depositaron gotas (100 μ l) de la suspensión fágica (10^8 u.f.p/ml), que se extendieron hasta el extremo opuesto, colocando la placa en posición vertical. Las colonias a probar se estriaban perpendicularmente cruzando la zona impregnada con la suspensión fágica. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C. En las placas así preparadas, las estrías sensibles crecen solamente hasta la zona con fago, las resistentes o inmunes mantienen un crecimiento homogéneo a lo largo de toda la estría.

3.6.- Ensayos enzimáticos.

Los ensayos cuantitativos de β -galactosidasa fueron realizados utilizando orto-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) como sustrato según el procedimiento descrito por Miller (1972). La actividad fosfatasa alcalina fue cuantificada según el procedimiento descrito por Michaelis *et al.*, (1983).

3.7.- Técnicas de manipulación de DNA.

Todas las manipulaciones estándar tales como preparación de DNA plasmídico, digestiones con enzimas de restricción, transformación, electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida fueron hechas como se describe en Sambrook *et al.*, (1989).

Para la secuenciación de la mutación *hns-90::Tn10* se procedió según la siguiente estrategia: un fragmento de 4,1 Kb *Bgl*III (constituido por aproximadamente 2,2 Kb de la región adyacente al punto de inserción y por 1.9 Kb conteniendo la *IS10R* del transposón, fue purificado a partir del plásmido pGG300, y digerido con *Sph*I y *Pst*I para obtener un fragmento de 1,6 Kb, que fue clonado en el vector M13tg131 (según el protocolo descrito por Messing *et al.*, 1983) dando origen al fago recombinante pGG950.

Las formas SS (DNA de hebra sencilla) del pGG950 fueron utilizadas como molde en la reacción de secuencia y como cebador se usó el oligonucleótido 5'CGCGAACCATTTGATCATAT 3', complementario a la *IS10R* del transposón *Tn10*. La secuencia del DNA fue determinada por el método de los didesoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1982) mediante el uso de la enzima Sequenase (según el protocolo de los fabricantes).

La extracción del DNA genómico de la estirpe W3110 se realizó según el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 1989. Para la extracción del DNA genómico de las estirpes MC4100 y JMG200 se procedió según el protocolo descrito por Alonso *et al.*, 1993. El marcaje de las sondas se realizó por el método de "cebado al azar con hexanucleótidos" (Feinberg y Vogelstein, 1983), o bien por la técnica de "nick translation" (Sambrook *et al.*, 1989). Los Southern blots se realizaron según los protocolos descritos por Sambrook *et al.*, 1989.

3.8.- Mapeo con nucleasa S1.

El oligonucleótido 5' CCAACAATCCACCGCTCCC 3' complementario a la posición (+120) situada detrás del inicio de la transcripción del promotor *Pmcc* (González-Pastor *et al.*, en preparación) fue marcado en el extremo 5' con (γ ^{32}P)ATP utilizando la polinucleótido quinasa del T4, según el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 1989. Este oligo fue hibridado a DNA de hebra sencilla obtenido a partir del plásmido pMM111 (Fig 3.1) (González-Pastor., J.E. en preparación) y elongado con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. Después de digerir con *Pst*I el producto de elongación, la hebra de DNA sintetizada y marcada en 5' fue extraída de los geles de acrilamida al 7% en condiciones desnaturalizantes, e hibridada a 50 μg de RNA total extraído de cultivos de LB en fase exponencial o estacionaria de las estirpes que se indican en la Fig 4.6. Los productos de hibridación fueron tratados con nucleasa S1 y los heterodúplex de RNA-DNA resistentes a la degradación fueron separados en geles de poliacrilamida al 7% (Fig 4.6). Las condiciones de hibridación y tratamiento con nucleasa S1 fueron descritas por Ausubel *et al.*, 1987. Aproximadamente 20 μg de RNA tratado fueron cargados en cada pocillo.

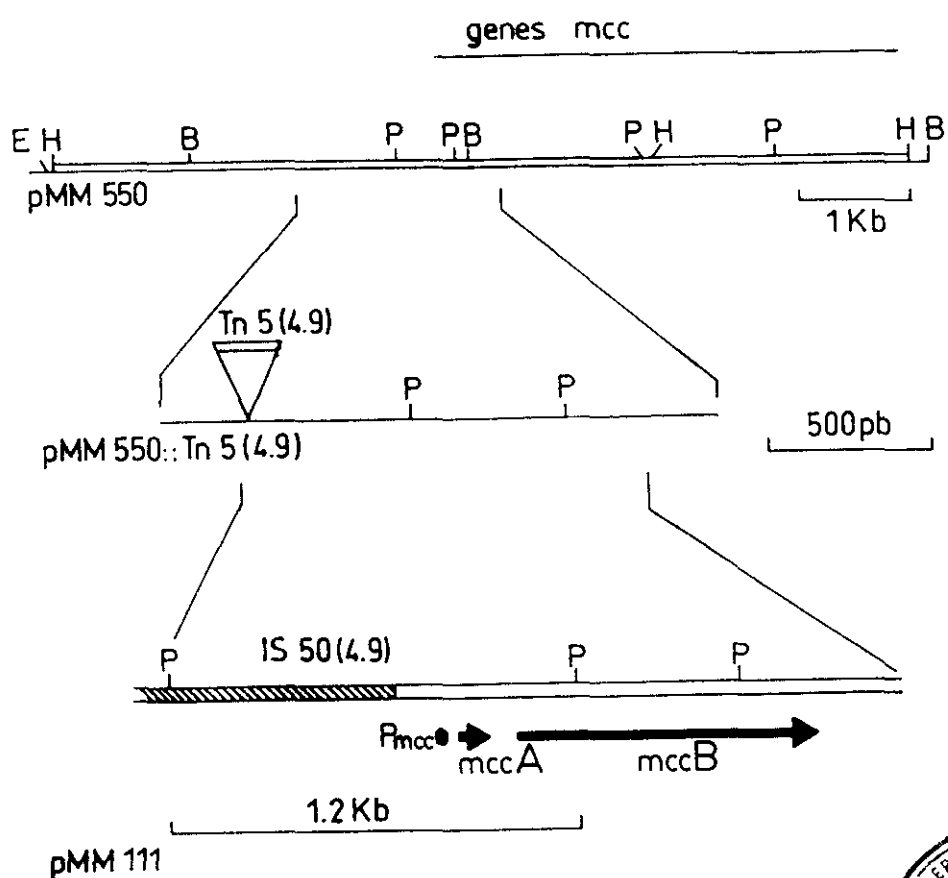


Fig 3.1.- Estructura del plásmido pMM111. El plásmido pMM550 es un derivado del pBR322, que lleva de los genes *mccABCDE* (Tabla 2.1). El plásmido pMM550::Tn5(4.9) es un derivado del pMM550 con una inserción del transposón Tn5 localizada fuera de la región donde se encuentran los genes *mcc*. El plásmido pMM111 se construyó mediante el clonado de un fragmento *Pst*I de 1,2 Kb procedente del plásmido pMM550::Tn5(4.9) en el único sitio *Pst*I del vector M13tg131.

4. RESULTADOS

4.1.- Mutagénesis de la estirpe RYC150(pMM550) con el transposón Tn10.

La cepa RYC150 contiene un profago lambda lisógeno que porta una fusión (de proteínas) entre el primer gen del operón *mcb* y el gen de la β -galactosidasa (*mcbA-lacZ*). El plásmido pMM550 es un derivado de pBR322 que porta los genes de producción de la microcina C7 (genes *mccABCDE*-Novoa *et al.*, 1986; González-Pastor., comunicación personal). Este plásmido fue introducido en RYC150 mediante transformación, y la estirpe resultante, RYC150(pMM550), fue mutagenizada con el transposón Tn10 como se describe en Métodos (ver sección 3.2.2.). Nuestra intención era seleccionar aquellos mutantes cromosómicos por inserción del transposón Tn10 que tuvieran afectadas tanto la regulación de la expresión de la fusión *mcbA-lacZ* como la producción de microcina C7.

4.1.1.- Aislamiento del mutante JMG89.

Las colonias Tc^r, Ap^r obtenidas en el experimento de mutagénesis se clasificaron en los siguientes grupos, atendiendo a su coloración en medio LB suplementado con el indicador X-gal:

a) Clones de color azul claro, semejantes al control RYC150(pMM50), en los que la inserción del transposón Tn10 no había afectado a la expresión de la fusión *mcbA-lacZ*.

b) Clones totalmente blancos; todos ellos eran Cm^s, lo que indicaba que habían perdido el profago lambda portador del gen *cat* (el producto del cual confiere resistencia al cloranfenicol) y de la fusión *mcbA-lacZ*, explicando dicha ausencia la falta de color en X-gal.

c) Un clon de pequeño tamaño que mostraba un color azul intenso, lo que indicaba que en el mismo la expresión de la fusión *mcbA-lacZ* se encontraba fuertemente aumentada.

Dicho mutante recibió el nombre de JMG89. Cuando ensayamos la producción de microcina C7 en medio LB, se observó que el halo de antibiosis producido por la estirpe JMG89 era ligeramente mayor que el originado por la estirpe isogénica silvestre RYC150(pMM550), lo que sugería que la producción de microcina C7 estaba incrementada en el mutante.

4.1.2.- Caracterización fenotípica del mutante JMG89.

Para verificar que la mutación era únicamente debida a una inserción del Tn10 en el cromosoma, se preparó un lisado del bacteriófago P1vir sobre la cepa JMG89. Con este lisado se transdujo de nuevo la estirpe parental RYC150(pMM550), y se seleccionaron los transductantes resistentes a tetraciclina. En todos ellos observamos que tanto el incremento en la actividad β -galactosidasa de la fusión *mcbA-lacZ*, como el aumento de la producción de microcina C7 se reproducían, indicando que una única inserción del transposón Tn10 era responsable de la mutación en la estirpe JMG89.

A continuación pasamos a caracterizar en detalle el efecto que la inserción Tn10 aislada en la estirpe JMG89 tenía sobre la producción de las microcinas C7 y B17. Por una parte, dado que la inserción Tn10 provocaba un incremento en la expresión de la fusión *mcbA-lacZ*, queríamos verificar si este efecto tenía alguna repercusión en la producción de microcina B17. Por otra parte, queríamos verificar que el incremento de producción de microcina C7 observado con el plásmido multicopia pMM550 se observaba también con plásmidos productores monocopia. Para este propósito, la mutación Tn10 fue transferida mediante transducción P1vir desde el mutante JMG89 a la estirpe MC4100 para dar origen a la estirpe mutante JMG100. Los plásmidos pMM501 y pMM833 son derivados de inserción

Tn5 de los plásmidos monocopia productores de microcina C7(pMccC7) o de microcina B17(pMccB17) respectivamente, los cuales portan los genes que codifican las funciones de producción e inmunidad a los antibióticos (*mccABCDEF* y *mcbABCDEFG*, respectivamente) (ver Tabla2.1). Los plásmidos pMM501 y pMM833 fueron introducidos independientemente por conjugación en las estirpes MC4100 y JMG100, dando origen a las estirpes microcinogénicas silvestres MC4100(pMM501) y MC4100(pMM833), y a las mutantes JMG100(pMM501) y JMG100(pMM833).

La capacidad de producción de microcina B17 de las cepas silvestre y mutante fue ensayada en medio mínimo M63. Se observó un significativo incremento del tamaño de los halos de antibiosis producidos por la estirpe JMG100(pMM833) al compararlos con los de su isogénica silvestre MC4100(pMM833), indicando por tanto que el incremento de la expresión de la fusión *mcbA-lacZ* observada en el mutante JMG89 se correlacionaba con un incremento en la producción de microcina B17.

La capacidad de producción de microcina C7 de las estirpes MC4100(pMM501) y JMG100(pMM501) fue ensayada en medio LB. Este ensayo se realizó en medio completo debido a que la mutación Tn10 que estamos estudiando provoca deficiencia de crecimiento en medio mínimo (ver más adelante). Observaciones no publicadas de nuestro laboratorio indican que, en ausencia de crecimiento de las cepas microcinogénicas, la producción de microcina C7 no se lleva cabo. En contraste, la producción de la microcina B17 puede realizarse en ausencia de crecimiento de las cepas productoras. Cuando la producción de microcina C7 fue ensayada en medio completo LB, se observó un significativo incremento del tamaño de los halos de antibiosis originados por la estirpe mutante JMG100(pMM501) con respecto

a los halos producidos por la estirpe silvestre MC4100(pMM501). Este resultado era consistente con los resultados obtenidos con el plásmido multicopia pMM550 en la estirpe original JMG89.

En el curso del estudio del mutante JMG89 se observaron varios fenotipos en principio no relacionados con la producción de las microcinas C7 y B17:

a) Tanto la estirpe JMG89 como la estirpe JMG100 producían colonias altamente mucoides en placas de medio LB y crecían deficientemente en placas de M63, con respecto a sus controles silvestres RYC150(pMM550) y MC4100.

b) Las estirpes mutantes mostraban también resistencias a fagos: eran totalmente resistentes a λ vir y Tula y parcialmente resistentes a Φ 80vir, según el método del "cross-streaking" (ver Métodos).

Esta diversidad de fenotipos conferidos por la mutación Tn10 en contexto genético MC4100, indicaba que ésta afectaba a un locus que además de regular negativamente la producción de microcina C7 y B17, regulaba la expresión de otros genes bacterianos.

4.2.- Identificación del gen inactivado por la inserción Tn10 en el mutante JMG89.

4.2.1.- Localización del Tn10.

Para localizar en el mapa genético el Tn10 responsable de la mutación presente en la estirpe JMG89, utilizamos la técnica del mapeo por conjugación.

En primer lugar, procedimos a transferir el Tn10(Tc^r) mediante transducción vía P1vir al cromosoma de varias estirpes Hfr (pop3000, KL16 y KL14), cuyos orígenes de transferencia se muestran en la Fig 4.1. Cada una de las cepas resultantes, a las que denominamos JMG92,

JMG93 y JMG94, se conjugó con la estirpe RYC22. El análisis de los recombinantes Thr^+ Leu^+ Sm^r , Pro^+ Sm^r e His^+ Sm^r y Tc^r Sm^r para la presencia o ausencia de los marcadores no seleccionados sugirió que el $\text{Tn}10$ estaba insertado entre los marcadores *proAB* (min. 6) e *his* (min. 44) del mapa de *E. coli* (Fig. 4.1).

Para situar con más precisión el $\text{Tn}10$, realizamos experimentos de conjugación interrumpida, utilizando JMG92 y JMG93 como estirpes donadoras, y BM21 como estirpe receptora (ver Métodos). En la figura 4.2 se muestra el número de transconjugantes Tc^r Nx^r en función de la duración del tiempo de la conjugación. El cálculo del tiempo de entrada del marcador (en nuestro caso, el determinante de resistencia a tetraciclina del $\text{Tn}10$) permite posicionarlo sobre el mapa de ligamiento, cuyas unidades básicas, los minutos, fueron definidas originalmente en experimentos de conjugación interrumpida. El tiempo de entrada del marcador se calcula a partir del tiempo en que aparecen los primeros transconjugantes, descontando un periodo de cinco minutos (tiempo transcurrido desde que las bacterias donadora y receptora se ponen en contacto hasta que empieza la transferencia del DNA).

Como se puede observar, en la conjugación JMG92 X BM21, los primeros transconjugantes Tc^r Nx^r aparecen a los 35 minutos de comenzar la conjugación. El tiempo de entrada del $\text{Tn}10$ es, por tanto, 30 minutos. Puesto que el origen de transferencia del Hfr JMG92 está en el minuto 98 (Fig 4.1) y su sentido de transferencia es el horario, el $\text{Tn}10$ debe estar situado cercano al minuto 28 del mapa genético.

Por otra parte, los primeros transconjugantes Tc^r Nx^r aparecen a los 38 minutos del inicio de la conjugación JMG93 X BM21. Por tanto, el tiempo de entrada del $\text{Tn}10$ es de 33 minutos. Puesto que el origen de transferencia del Hfr JMG93 está en el minuto 61 (Fig 4.1)

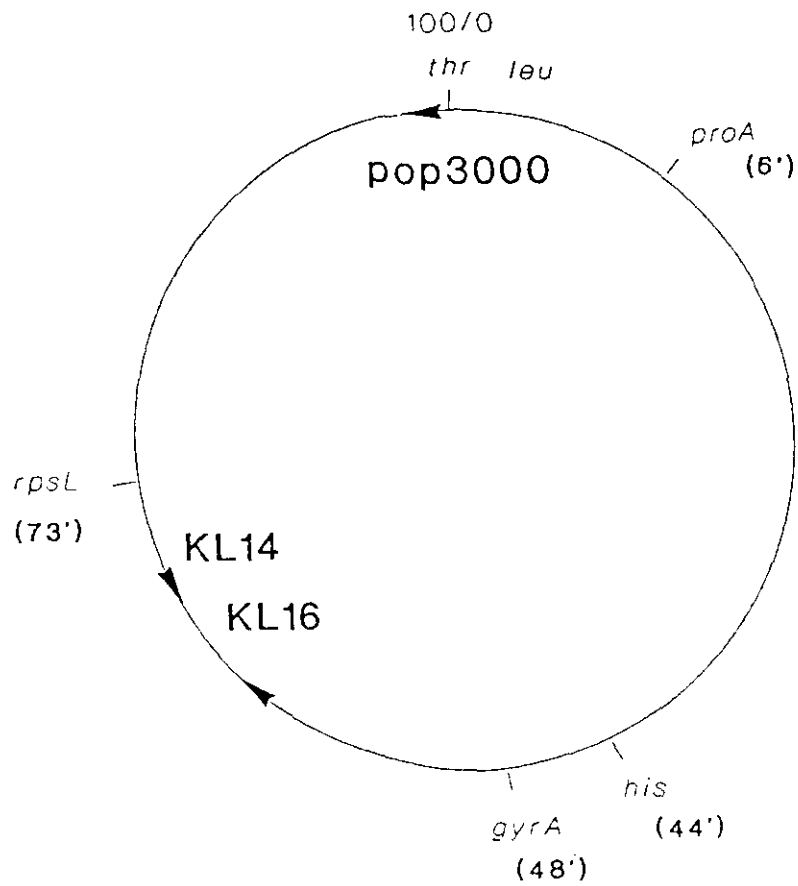


Fig-4.1.- Origen y sentido de transferencia de los Hfrs KL14, KL16 y pop3000. Se indica la localización de algunos de los marcadores utilizados en nuestros experimentos de conjugación.

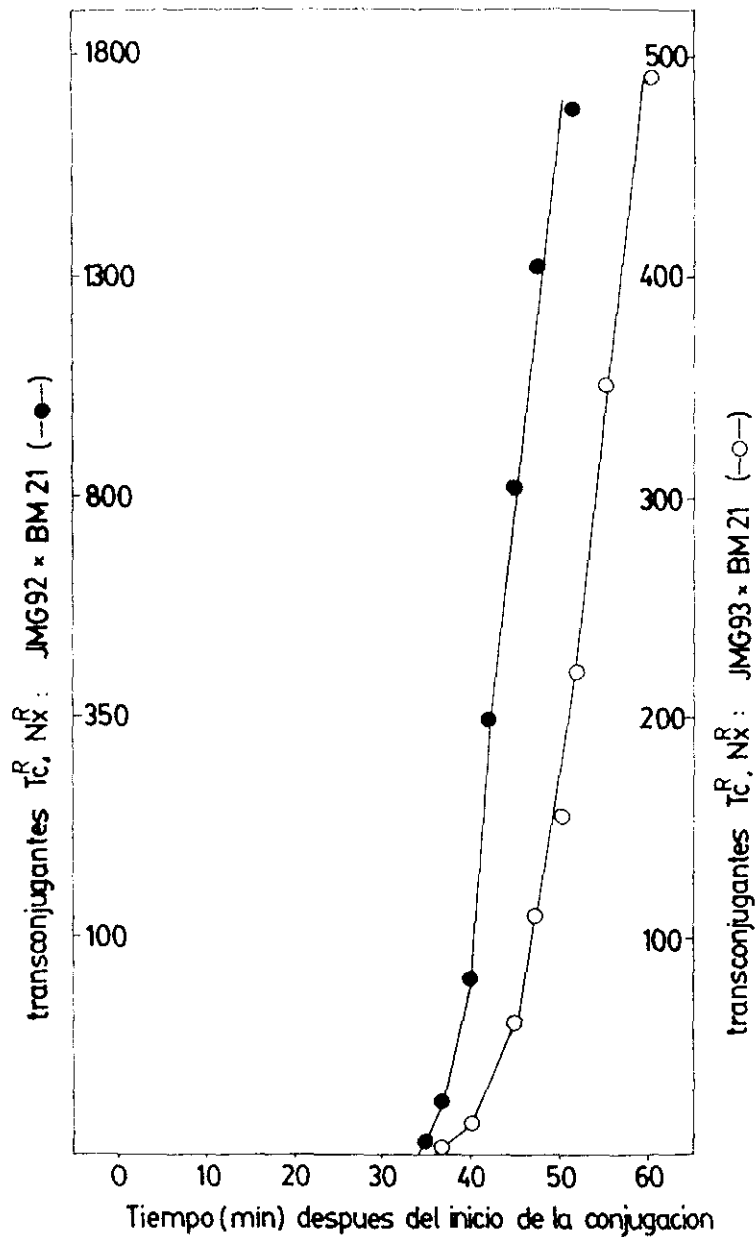


Fig. 4.2.- Representación del número de transconjugantes $Tc' Nx'$ obtenidos a distintos tiempos del inicio de la conjugación.

(●) conjugación: JMG92 x BM21

(○) conjugación: JMG93 x BM21

y su sentido de transferencia es antihorario, este resultado situaría también el Tn10 alrededor del minuto 28 del mapa genético de *E. coli*.

4.2.2.- Clonado del Tn10 y regiones cromosómicas adyacentes: localización física dentro del gen *hns*.

Simultáneamente al mapeo del Tn10 mediante experimentos de conjugación y como aproximación complementaria del mismo, procedimos a clonar la región cromosómica que contenía la inserción Tn10, mediante el método de clonado *in vivo* descrito por Groisman *et al.* (1984), que requiere el empleo del elemento mini-MudII4042 (ver Métodos). En este experimento, se obtuvieron doce muductantes Cm^r Tc^r. El DNA plasmídico de uno de ellos (pGG300) fue purificado y digerido con varias enzimas de restricción: *Bam*HI, *Bgl*III, *Eco*RI, *Hind*III y *Pst*I (digestiones simples y dobles). El mapa físico del segmento cromosómico clonado en el pGG300 se muestra en la Fig 4.3. Para situar el Tn10 dentro del fragmento clonado nos servimos del mapa físico del transposón publicado por Way *et al.*, 1984.

Dado que sabíamos por los experimentos de conjugación interrumpida que el Tn10 se localizaba alrededor del minuto 28 del mapa genético de *E.coli*, comparamos visualmente el mapa físico del segmento cromosómico que contenía el Tn10 (Fig 4.3) con el mapa de restricción para las enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III y *Pst*I de la región comprendida entre los minutos 25–30 de Kohara *et al.* , 1987. Una perfecta similitud fue encontrada entre nuestro mapa físico y la región cromosómica comprendida entre las coordenadas 1301–1311 Kb del mapa físico de Kohara *et al.*, que se corresponde con los minutos 27.1–27.4 del mapa genético. Entre los genes situados en dicha zona se encuentra el gen *hns*, el cual codifica la

proteína H-NS, una de las proteínas bacterianas similares a histonas (*histone-like*) (Görransson *et al.*, 1990; Hulton *et al.*, 1990; May *et al.*, 1990). Mutaciones en *hns* son altamente pleiotrópicas (vease Higgins *et al.*, 1990, para revisión, y sección 5.1.1).

La localización física del Tn10 dentro de la región cromosómica (ver Fig 4.3) y la pleiotropía asociada a su inserción, sugerían que probablemente afectaba al gen *hns*. La secuenciación del punto de inserción (ver Métodos) demostró que el Tn10 está efectivamente insertado en el gen *hns*. La inserción interrumpe el codón que codifica para la arginina-90 de la proteína "histone-like" H-NS (Fig 4.3). La mutación recibió el nombre de *hns-90::Tn10*.

4.3.- Efecto de la mutación *hns-90::Tn10* sobre la expresión de una fusión *mcbA-lacZ*.

La inserción *hns-90::Tn10* fue aislada por su capacidad de provocar un incremento en la intensidad del color azul de las colonias de la estirpe JMG89, con respecto a las de la estirpe silvestre, en placas de LB-Xgal.

Con el objeto de cuantificar este efecto a lo largo del ciclo de crecimiento, transferimos la mutación mediante transducción P1vir a la estirpe RYC150, para dar origen a la estirpe JMG90.

La actividad β -galactosidasa de la fusión *mcbA-lacZ* en las estirpes RYC150 y JMG90 fue medida a distintos tiempos a lo largo del ciclo de crecimiento (Fig 4.4).

Como se puede apreciar, en la estirpe control (RYC150) se observa la característica inducción de la fusión en la fase estacionaria del crecimiento. En contraste, la estirpe mutante (JMG90) muestra un desplazamiento del inicio de la inducción de la fusión *mcbA-lacZ* hacia densidades ópticas (D.O.600nm) más bajas, cuando el cultivo aún está creciendo en fase

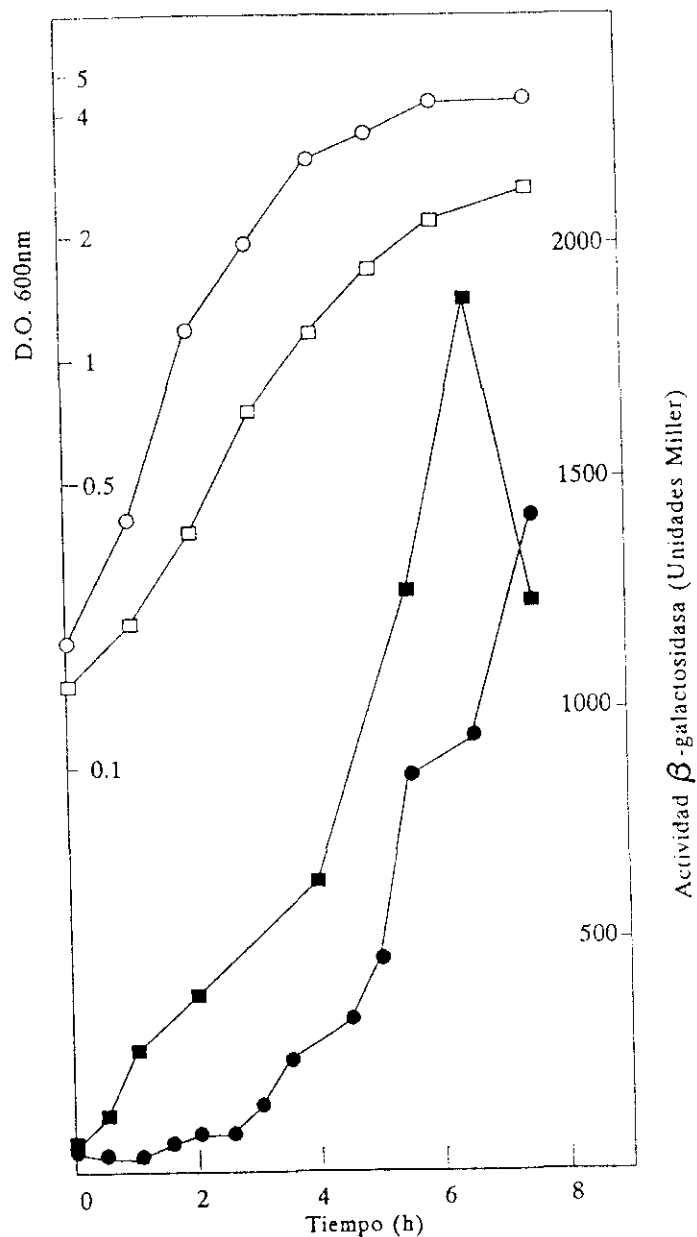


Fig 4.4.- Efecto de la mutación *hns-90::Tn10* en la expresión de la fusión *mcbA-lacZ*. Las estirpes RYC150 y JMG90 fueron cultivadas en medio LB a 30 °C para evitar la inducción del profago lambda portador de la fusión. La actividad β-galactosidasa se determinó a distintos tiempos del ciclo de crecimiento. Símbolos: (○) RYC150, (□) JMG90. Símbolos abiertos, D.O. 600nm; cerrados: actividad β-galactosidasa.

exponencial.

Este resultado indica, por lo tanto, que el producto del gen *hns*, la proteína "histona-like" H-NS, regula negativamente, directa o indirectamente, la expresión del operón *mcb*, durante la fase exponencial del crecimiento.

4.4.- Efecto de las mutaciones *hns-90::Tn10* y *rpoS::Kan* sobre la expresión de la fusión *mccB-lacZ*.

La mutación *hns-90::Tn10* aislada en este estudio provoca un incremento en la producción de microcina C7 (ver sección 4.1.2). Para comprobar si este incremento en la producción se debía a un aumento en la expresión de los genes *mcc*, la estirpe JMG100 (MC4100 *hns-90::Tn10*) fue transformada con el plásmido monocopia pDG250, portador de la fusión *mccB-lacZ* (Díaz-Guerra *et al.*, 1989; González-Pastor *et al.*, manuscrito en preparación).

El aumento en la intensidad del color azul de las colonias de JMG100(pDG250) con respecto a las de MC4100(pDG250) en placas de LB-Xgal, sugería que la mutación *hns-90::Tn10* provoca un incremento de la actividad β -galactosidasa de la fusión *mccB-lacZ*. Este efecto fue cuantificado en medio líquido (Fig 4.5). En contexto silvestre, la expresión de la fusión *mccB-lacZ* sufre una fuerte inducción al alcanzar los cultivos la fase estacionaria. La mutación *hns-90::Tn10* provoca un incremento de la actividad β -galactosidasa de la fusión *mccB-lacZ* a lo largo de todo el ciclo de crecimiento, desplazando la inducción dependiente de fase hacia densidades ópticas más bajas (fase exponencial).

Como se mencionó en la Introducción, el producto del gen *rpoS* es requerido para la

óptima inducción del operón *mccABC* en fase estacionaria. Dado que la mutación *hns-90::Tn10* provocaba la desrepresión de la fusión *mccB-lacZ*, nos planteamos la posibilidad de que en este contexto deficiente en H-NS, la necesidad de RpoS para la expresión de *mccABC* en fase estacionaria fuera suprimida. Para verificar esta hipótesis se construyó el doble mutante (*rpoS⁻ hns⁻*) (véase Tabla 2.1).

La actividad β -galactosidasa de la fusión *mccB-lacZ* en los diferentes contextos fue medida en LB a distintos tiempos del ciclo de crecimiento (Fig 4.5).

La introducción de la mutación *rpoS::Kan* reduce a la décima parte el nivel de inducción silvestre de la fusión *mccB-lacZ*, aunque aún se mantiene la inducción dependiente de fase de crecimiento. La introducción de la mutación *hns-90::Tn10* en contexto deficiente en RpoS restaura los niveles silvestres de expresión de la fusión *mccB-lacZ* en fase estacionaria. Este resultado indica que en un contexto deficiente en H-NS no se requiere el producto del gen *rpoS* para la expresión de los genes *mccABC* en esta fase del ciclo celular.

Estos resultados tomados en conjunto sugieren que la proteína "histona-like" H-NS se comporta como un regulador negativo de la expresión del operón *mccABC* a lo largo de todo el ciclo de crecimiento. Por su parte, RpoS(σ^S) liberaría directa o indirectamente esta represión en fase estacionaria, siendo sólo necesario para alcanzar la máxima inducción en esta fase.

4.5.- Estudio del sitio de iniciación de la transcripción en el promotor *Pmcc* en ausencia de H-NS y/o RpoS.

El producto del gen *rpoS* es un factor sigma alternativo de la RNA polimerasa (σ^S),

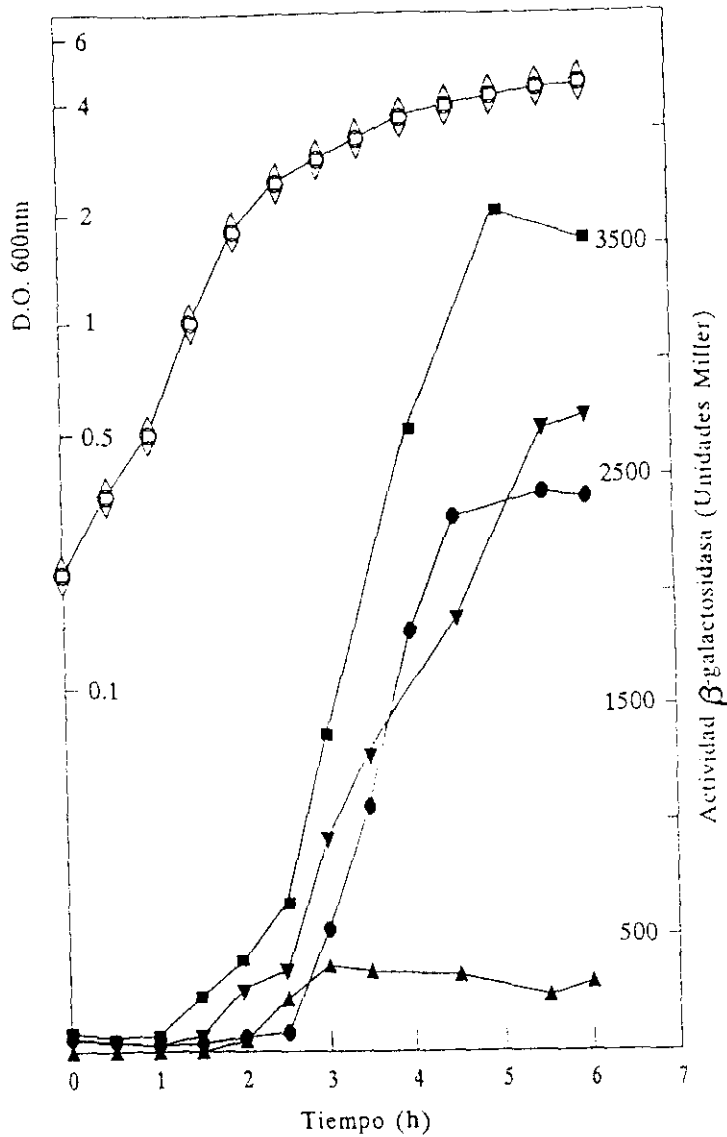


Fig 4.5.- Efecto de las mutaciones *hns-90::Tn10* y *rpoS::Kan* en la expresión de la fusión *mcbB-lacZ*. Las estirpes MC4100 (*rpoS⁺ hns⁺*), JMG100 (*rpoS⁺ hns-90::Tn10*), JMG102 (*rpoS::Kan hns⁺*) y JMG103 (*rpoS::Kan hns-90::Tn10*) portando el plásmido pDG250 con la fusión *mcbB-lacZ* fueron cultivadas a 37 °C, y la actividad β-galactosidasa fue determinada a distintos tiempos. Símbolos: MC4100 (○), JMG100 (□), JMG102 (△) y JMG103 (▽). Símbolos abiertos, D.O. 600nm; cerrados: actividad β-galactosidasa.

utilizado para la expresión de genes en la fase estacionaria del crecimiento (Hengge–Aronis *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 1993). Para explicar la supresión del requerimiento de RpoS(σ^S) para la expresión de la fusión *mccB-lacZ* en fase estacionaria, en bacterias deficientes en H–NS, formulamos las siguientes hipótesis:

1. La existencia de un promotor alternativo utilizado en contexto *rpoS⁻ hns⁻*, distinto al empleado para transcribir el operón *mcc* (*P_{mcc}*) en contexto silvestre.
2. La existencia de un único promotor *P_{mcc}* responsable de la transcripción del operón *mcc* en todos los contextos.

Para decidir entre ambas posibilidades, determinamos el sitio de iniciación de los transcritos del operón *mcc* en los diferentes contextos, mediante la técnica de mapeo con la nucleasa S1 (ver Métodos). Además, esta metodología debía permitirnos determinar si el efecto sobre la expresión del operón *mcc* de las distintas mutaciones (*rpoS::Kan* / *hns-90::Tn10*) se produce a nivel transcripcional, ya que la fusión génica *mccB-lacZ* empleada en todos los estudios de regulación es una fusión de proteínas, y por lo tanto no es posible excluir algún tipo de regulación postranscripcional.

Como fuente de transcritos específicos *mcc* empleamos el plásmido pMM501 (plásmido monocopia portador del operón *mcc*). Las cepas MC4100(pMM501), JMG100(pMM501), JMG102(pMM501) y JMG103(pMM501) fueron construidas introduciendo el plásmido pMM501 mediante conjugación.

Todas las cepas fueron cultivadas en medio LB a 37 °C. El RNA fue extraído entonces en fase exponencial o en fase estacionaria y la aparición de transcritos específicos *mcc* y el inicio de los mismos fue seguida mediante mapeo con la nucleasa S1 (ver Métodos).

Transcritos específicos *mcc* fueron detectados en las cepas MC4100, JMG100 y JMG103 (líneas 1–6, Fig 4.6) aunque la señal obtenida era muy débil en la estirpe JMG102 (*rpoS::Kan*, línea 7). Estos resultados están cualitativamente de acuerdo con los resultados obtenidos para la expresión de la fusión *mccB-lacZ* (Fig 4.5). Además, todos los transcritos se iniciaban en el mismo sitio (Fig 4.6), indicando que un único promotor *Pmcc* es utilizado tanto en presencia como en ausencia de H-NS y RpoS.

La transcripción detectada en las estirpes JMG100 y JMG103 cuando los cultivos alcanzan una D.O.600nm de 2,3 (Fig 4.6 líneas 3 y 5) es consistente con el patrón observado en la expresión de la fusión *mccB-lacZ* (Fig 4.5), confirmando que la mutación *hns-90::Tn10* provoca una inducción más temprana del promotor *Pmcc*. Este fenómeno no parece depender de RpoS(σ^S), ya que se produce tanto en contexto *rpoS*⁺ como *rpoS::Kan*.

4.6.- Transcripción del promotor *Pmcc* en contexto *hns*⁻-*crp*⁻.

Otro de los activadores positivos requeridos para transcribir los genes *mcc* en fase estacionaria es el producto del gen *crp*, el cual codifica la proteína receptora del AMPc (CRP, también denominada CAP). Una mutación de delección en el gen *crp* ($\Delta crp-39$) anula la expresión de la fusión *mccB-lacZ* en fase estacionaria (González-Pastor *et al.*, en preparación). Al igual que en el caso de *rpoS*, nos planteamos la posibilidad de que la mutación *hns-90::Tn10* suprimiera la necesidad de CRP para transcribir los genes *mccABC*. Para verificar esta hipótesis construimos el doble mutante $\Delta crp-39 hns-90::Tn10$ en contexto genético MC4100 (estirpe SBS688).

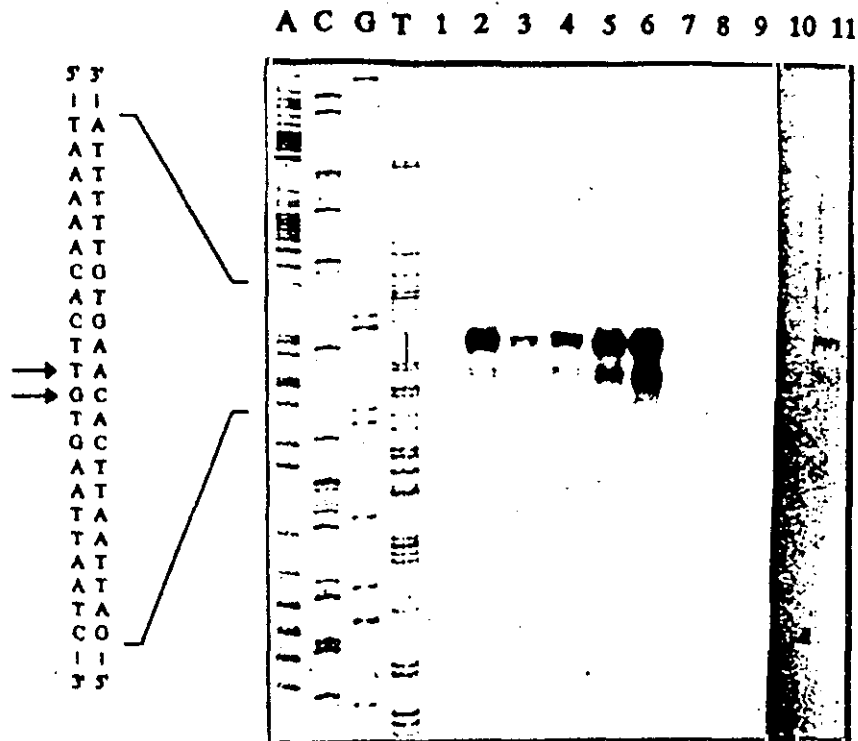


Fig 4.6.- Determinación del sitio de iniciación de la transcripción en el operón *mcc* en diferentes contextos genéticos. El mismo oligonucleótido cebador fue utilizado para los experimentos de mapeo con nucleasa S1 (ver Métodos) y para las reacciones de secuencia mostradas como referencia a la izquierda de la Fig 4.6. Las flechas indican los dos posibles sitios de iniciación de la transcripción. El RNA fue extraído a partir de las cepas que llevan el plásmido pMM501 (líneas 1-9) a una D.O.600nm de 2,3 (líneas 1, 3, 5) o 4 (líneas 2, 4, 6-9), o el plásmido pMM550 a D.O.600nm de 4 (líneas 10 y 11). Las autoradiografías fueron expuestas un día (líneas 1-9) o tres días (líneas 10-11). MC4100 (*hns⁺ rpoS⁺*) (línea 1 y 2); JMG103 (*hns-90::Tn10 rpoS::Kan*) (líneas 3, 4); JMG100 (*hns-90::Tn10 rpoS⁺*) (líneas 5 y 6); JMG102 (*hns⁺ rpoS::Kan*) (línea 7); SBS688 (*hns⁺ Δcrp-39*) (línea 8 y 10) y JMG104 (*hns-90::Tn10 Δcrp-39*) (línea 9 y 11).

La actividad β -galactosidasa de la fusión *mccB-lacZ* en los distintos contextos se muestra en la Tabla 4.1. Un ligero pero significativo incremento de 0 a 10 unidades Miller fue observado en la estirpe JMG104, cuando los cultivos alcanzan la fase estacionaria tardía, mientras que ninguna actividad β -galactosidasa podía ser detectada a partir de la estirpe SBS688 ($\Delta crp-39 hns^+$) en ningún momento de la curva de crecimiento (de hecho las colonias de la estirpe JMG104 ($\Delta crp-39 hns-90::Tn10$) con el tiempo adquieren color azul en placas de LB-Xgal mientras que las colonias de la estirpe SBS688 ($\Delta crp-39 hns^+$) permanecen blancas con el tiempo en las mismas condiciones).

Cuando se realizó el experimento de mapeo con nucleasa S1, ningún transcrito específico *mcc* fue detectado a partir de las estirpes SBS688(pMM501) ó SBS688(pMM550) después de 1 a 3 días de exposición de las autoradiografías (Fig 4.6, líneas 8 y 10). Sin embargo, cuando el RNA fue extraído de la estirpe JMG104(pMM550), transcritos específicos *mcc* fueron detectados durante el mismo tiempo de exposición (Fig 4.6, línea 11).

De nuevo se observaba una correlación entre la expresión de la fusión *mccB-lacZ* y la presencia de transcritos *mcc*. Tomados en conjunto, estos datos indican que una transcripción residual de los genes *mcc*, a partir del promotor *Pmcc*, puede ser obtenida en contexto $\Delta crp-39$ en ausencia de la proteína H-NS.

Tabla 4.1.– Efecto de las mutaciones *hns-90::Tn10* y Δ *crp-39* en la expresión de la fusión *mccB-lacZ*.

Estirpe	Genotipo relevante	Actividad β -galactosidasa (Unidades Miller) ^a	
		Fase exponencial	Fase estacionaria
MC4100	tipo silvestre	86	2209
SBS688	<i>hns</i> ⁺ Δ <i>crp-39</i>	0	0
JMG104	<i>hns-90::Tn10</i> Δ <i>crp-39</i>	0	10

^a Las estirpes MC4100, SBS688 y JMG104 llevando el plásmido pDG250 con la fusión *mccB-lacZ* fueron cultivadas a 37 °C y su actividad β -galactosidasa fue determinada en la fase exponencial y a las dos horas después de entrar en la fase estacionaria.

4.7.- Aislamiento de un fragmento cromosómico de aproximadamente 19 Kb que en alto número de copias reprime la expresión de una fusión *mccB-lacZ*.

Como estrategia alternativa para la identificación de nuevos genes cuyos productos estuvieran implicados en la regulación de la expresión del operón *mccABC* en fase estacionaria, realizamos una búsqueda de genes que en alto número de copias alteraran la expresión de una fusión *mccB-lacZ*.

4.7.1.- Aislamiento del plásmido pGG500.

Como método para obtener un banco de genes cromosómicos en multicopia, utilizamos de nuevo el sistema de clonado *in vivo* de Groisman *et al.* (1984). La estirpe pop3001.6(pDG250), portadora de la fusión *mccB-lacZ*, fue utilizada como receptora del banco de genes cromosómicos (ver Métodos). Entre un gran número de clones Cm^r Km^r azules, se seleccionó para posterior estudio un clon que mostraba una coloración blanca en placas de LB suplementadas con el indicador X-gal. Se preparó, mediante lisis alcalina, DNA plasmídico del clon blanco, con el que se retransformó la estirpe pop3001.6, seleccionándose por separado clones Cm^r y Km^r a fin de segregar los dos plásmidos. Entre los clones Km^r, todos aquellos que eran además Cm^s mostraban en placas de LB-Xgal un nivel de expresión de la fusión *mccB-lacZ* comparable al silvestre. Este resultado indicaba que todos ellos llevaban el plásmido pDG250 intacto, lo cual descartaba que la fusión *mccB-lacZ* se hubiera perdido en el clon blanco original. A partir de un clon Cm^r que era además Km^s, se extrajo el DNA plasmídico (pGG500) con el que se retransformó de nuevo la estirpe parental pop3001.6(pDG250). Todos los clones Cm^r Km^r mostraban unos niveles de expresión de la fusión *mccB-lacZ* similares a los del clon blanco original.

Sobre el DNA plasmídico del pGG500 se realizó un análisis de restricción para las enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III y *Pst*I. El mapa físico resultante para el segmento cromosómico contenido en el pGG500 se muestra en la figura 4.7. Como se puede observar, el tamaño del fragmento cromosómico portado por el pGG500 era de aproximadamente 19Kb. Dentro del mismo deberían encontrarse uno o varios genes cuyos(s) producto(s) en principio, al hiperproducirse, provocaría/n la represión observada de la fusión *mccB-lacZ*.

4.7.2.- Localización del fragmento cromosómico del pGG500 en el mapa físico de *E.coli*.

Uno de los primeros objetivos en el estudio del fragmento cromosómico contenido en el plásmido pGG500 era situar el mismo en el mapa físico del cromosoma de *E.coli* elaborado por Kohara *et al.* (1987). La comparación visual inicial entre el mapa físico del fragmento cromosómico del pGG500 para las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III y *Pst*I con el mapa de restricción del cromosoma de *E. coli* para las mismas enzimas (Kohara *et al.*, 1987) no nos permitió localizar nuestro fragmento. Sin embargo, al comparar el mapa físico del pGG500 con el del pGG300 (portador de un fragmento de DNA que contiene la mutación de inserción *hns-90::Tn10*, ver sección 4.2.2), encontramos que había una zona de solapamiento entre ambos fragmentos, entre las coordenadas 1301–1311 Kb del mapa de Kohara *et al.* Este resultado sugería que el fragmento cromosómico contenido en el pGG500 procedía también de la región del minuto 27 del mapa genético de *E. coli*, y que contenía el gen *hns* silvestre.

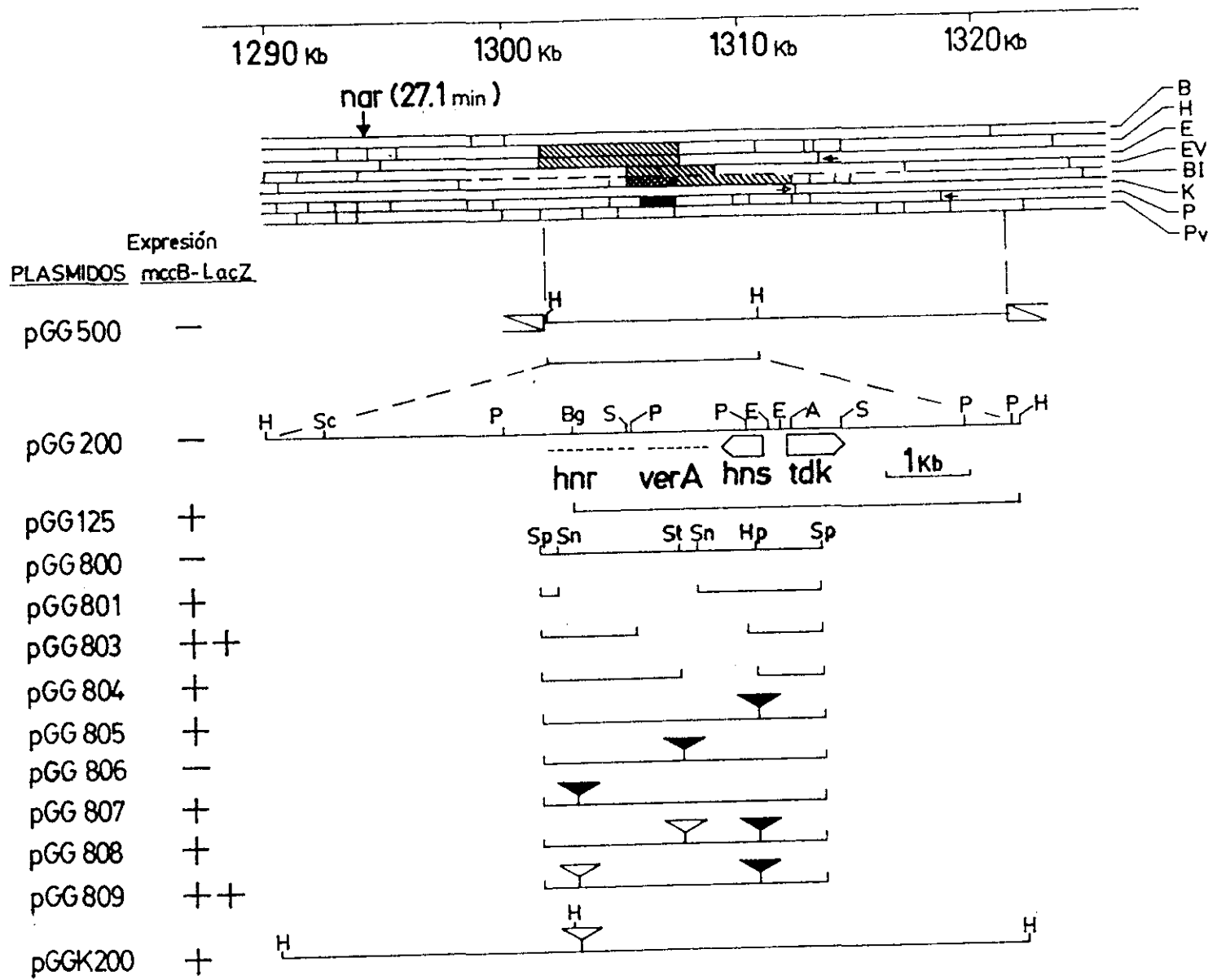


Fig 4.7.- Mapa físico y genético del fragmento cromosómico portado por el plásmido pGG500. En la parte superior se dan las coordenadas en Kb según Kohara *et al.*, 1987. Se muestran las distintas construcciones realizadas en nuestro estudio. El efecto de todos los plásmidos sobre la expresión de la fusión *mccB-lacZ* se estudió mediante transformación de la estirpe MC4100(pDG250), y por observación de la actividad β -galactosidasa de los transformantes en placas de LB-Xgal. Los símbolos (++) corresponden a una expresión silvestre de la fusión *mccB-lacZ*; (-) a una expresión baja de la fusión y (+) a una expresión intermedia. Símbolos: A, *AccI*; B, *BamHI*; BI, *BglI*; BgII, *BglII*; E, *EcoRI*; EV, *EcoRV*; Hp, *HpaI*; K, *KpnI*; P, *PstI*; Pv, *PvuII*; S, *Sall*; Sc, *ScaI*; Sn, *SnaBI*; Sp, *SphI*; St, *StuI*. Los cassettes de resistencia a ampicilina (Ap^r) procedentes del pKT254- Ω A (Fellay *et al.*, 1987) son representados por un triángulo invertido relleno. Los cassettes de resistencia a kanamicina (*Kan*) procedentes del pUC4K (Pharmacia) se representan con un triángulo invertido hueco. La zona rayada de la figura se corresponde con el patrón obtenido en la hibridación del fragmento *PstI* (señalado totalmente en negro) utilizado como sonda radiactiva frente a digestiones genómicas de la estirpe W3110 (ver Fig 4.8). Con flechas negras o flechas blancas se indican aquellos puntos de restricción presentes o ausentes, respectivamente, en el segmento cromosómico portado por el plásmido pGG500 con respecto al mapa físico completo de *E. coli* de Kohara *et al.* Se muestra también la posición de los genes *tdk* (Black *et al.*, 1992) y *verA* (Casaregola *et al.*, 1990 y I. B. Holland, comunicación personal a Felipe Moreno) situados también en dicha región cromosómica, así como la posible extensión del locus *hnr*.

Una vez establecida la localización genética del fragmento, observamos varias diferencias entre el mapa físico de éste y el de Kohara *et al.* (señaladas con flechas en la figura 4.7). Esta divergencia era responsable de nuestras dificultades iniciales para situar el fragmento del pGG500. Las diferencias observadas podrían ser atribuibles en principio a la existencia de polimorfismo para dichas dianas de restricción en las distintas cepas empleadas en la elaboración de los mapas físicos: mientras que en nuestro estudio se utilizaron los derivados de la estirpe MC4100 (RYC150, pop3001.6), Kohara *et al.* realizaron su mapa sobre el cromosoma de la estirpe W3110.

Para verificar estas hipótesis, un fragmento *Pst*I de 1,4 Kb (Fig 4.7) fue utilizado como sonda radiactiva frente a un blot con digestiones genómicas de la estirpe W3110 (Fig 4.8). El patrón de hibridación obtenido coincidía con el esperado para la zona donde se encontraba el gen *hns* en el mapa de Kohara *et al.* (Göransson *et al.*, 1990; May *et al.*, 1990; Hulton *et al.*, 1990). Por último, un fragmento *Hind*III de 1Kb contenido dentro de dicho fragmento *Pst*I fue clonado en M13tg131 y uno de sus extremos fue secuenciado. La secuencia determinada (unos 200pb) coincidía con la secuencia del extremo 3' del gen *hns* (Pon *et al.* 1988; Göransson *et al.*, 1990; May *et al.*, 1990), verificando de esta manera todos nuestros datos de mapeo.

4.7.3.- Identificación de un nuevo locus cercano al gen *hns*: efecto del mismo en la expresión de la fusión *mccB-lacZ*.

Los resultados presentados en la sección 4.4 y 4.5 nos habían permitido concluir que el producto del gen *hns*, la proteína de unión al DNA "histone-like" H-NS se comportaba como un regulador negativo del promotor *Pmcc*, el cual dirige la transcripción de los genes

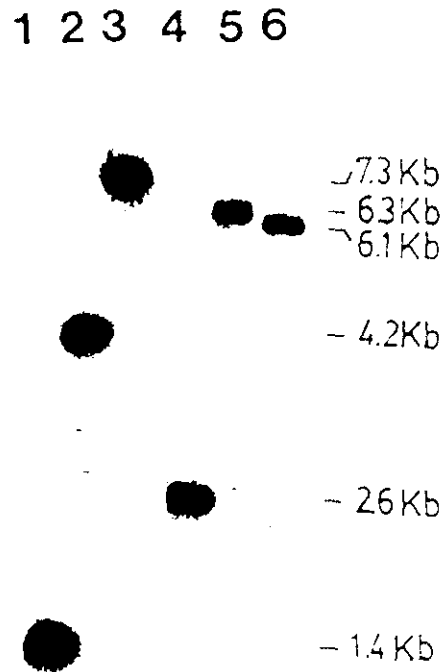


Fig 4.8.– Patrón obtenido al hibridar un fragmento *Pst*I de 1,4 Kb utilizado como sonda frente a diferentes digestiones genómicas de la estirpe W3110. Línea 1 , *Pst*I ; 2, *EcoRV*; 3, *Bgl*I; 4, *Bgl*I-*Eco*RI; 5, *Eco*RI; y 6, *Eco*RI-*Hind*III.

mccABC en fase estacionaria. Era lógico suponer que el aumento de dosis génica de *hns* produciría un incremento en los niveles intracelulares de H-NS, la cual, a través de su efecto represor sobre el promotor *Pmcc* provocaría el descenso en los niveles de expresión de la fusión *mccB-lacZ*, observado en células portadoras del plásmido pGG500.

Para verificar que el gen *hns* y su producto, la proteína de unión al DNA "histone-like" H-NS, se encontraban efectivamente involucrados en la represión de la expresión de la fusión *mccB-lacZ*, se procedió a realizar un análisis de delección mediante subclonaje, con el objetivo de identificar un fragmento mínimo de DNA que contuviera el determinante o determinantes genéticos responsables de la represión observada. Con tal propósito, subclonamos un fragmento *HindIII* de 9 Kb, procedente del pGG500, en la diana *HindIII* del vector pUC18, dando origen al plásmido recombinante pGG200. El mapa físico detallado de dicho plásmido se muestra en la figura 4.7. El pGG200 era capaz de provocar el mismo descenso en los niveles de la actividad β -galactosidasa de la fusión *mccB-lacZ* que el plásmido original pGG500. A partir del pGG200, se subclonó un fragmento *BglII-HindIII* de 5,3 Kb en las dianas *BamHI-HindIII* del plásmido pACYC184, dando origen al plásmido pGG125 (ver Fig 4.7). Sorprendentemente, a pesar de que el pGG125 portaba el gen *hns* silvestre intacto, la represión de la fusión *mccB-lacZ* no era equiparable a la que provocaban el pGG500 o el pGG200. De hecho, las colonias de MC4100(pDG250, pGG125) no eran blancas, sino que mostraban un ligero color azul, aunque menos intenso que el de las colonias de la estirpe control MC4100(pDG250, pACYC184) en placas LB-Xgal.

Este resultado sugería que, para provocar los bajos niveles de expresión de la fusión *mccB-lacZ* observados con el plásmido original pGG500, se requería no sólo el efecto

regulador del producto del gen *hns*, sino además el producto codificado por un nuevo locus situado al menos a unas 2 Kb por detrás del gen *hns*. A este locus, no descrito anteriormente, lo denominamos *hnr*.

4.7.3.1.- Construcción del plásmido pGG800 y análisis de delección e inserción del mismo.

Para continuar el estudio, necesitábamos subclonar un fragmento de DNA que contuviera ambos loci (*hns* y *hnr*) con el que se pudiera realizar un análisis detallado del fenómeno de represión. Un fragmento *SphI* de 3,3 Kb procedente del pGG200 fue clonado en la única diana *SphI* del pACYC184, dando origen al plásmido pGG800 (Fig 4.7). El pGG800 fue introducido mediante transformación en la estirpe MC4100(pDG250). En la estirpe resultante, los niveles de actividad β -galactosidasa eran similares a los niveles observados en la estirpe pop3001.6(pDG250, pGG500). De hecho las colonias de la estirpe MC4100 (pDG250, pGG800) eran también blancas en LB-Xgal, indicando que el fragmento *SphI* de 3,3 Kb presente en el pGG800 contenía, además del gen *hns*, el locus *hnr*. La diana *BglII*, utilizada para construir el plásmido pGG125 (sección 4.7.3), se encontraba dentro del fragmento *SphI* portado por el pGG800 (Fig 4.7). Los diferentes resultados de expresión de la fusión *mccB-lacZ* obtenidos con los plásmidos pGG800 y pGG125 indicaban que el locus *hnr* estaba delimitado por un extremo por la diana *SphI*, y que la diana *BglII* se encontraría, bien dentro del locus, bien delimitando su otro extremo.

Para determinar la situación y la extensión del locus *hnr* dentro del fragmento *SphI*, así como la contribución de los productos del gen *hns* y del locus *hnr* al fenómeno de

represión de la fusión *mccB-lacZ*, se procedió a construir varios derivados de inserción y de delección del pGG800.

a) Derivados de delección.

Los plásmidos pGG801, pGG803 y pGG804 fueron construidos eliminando los siguientes fragmentos internos del fragmento *SphI* contenido en el pGG800: *SnaBI* de 1,75 Kb (pGG801); *PstI* de 1,4 Kb (pGG803); y *HpaI-StuI* de 0,75 Kb (pGG804) (Fig 4.7).

b) Derivados de inserción (Ap^r).

Los plásmidos pGG805, pGG806 y pGG807 fueron construidos insertando respectivamente en los puntos únicos para las enzimas de restricción *HpaI*, *StuI* y *BglIII* del pGG800, un cassette de resistencia al antibiótico ampicilina (Ap^r). Este cassette (2,7 Kb) fue obtenido a partir del plásmido pKT25A- ΩA (Fellay *et al.*, 1987) mediante digestión, con la enzima de restricción *SmaI* para la inserción en los puntos *HpaI* (pGG805) y *StuI* (pGG806) o con la enzima de restricción *BamHI* para la inserción en el punto *BglIII* (pGG807)(Fig 4.7).

c) Derivados de inserción (Ap^r , Kan^r).

Los plásmidos pGG808 y pGG809 fueron construidos a partir del pGG805, mediante inserción en los puntos únicos *StuI* y *BglIII*, respectivamente, de una cassette de resistencia al antibiótico Kanamicina (Kan^r). Esta cassette (1,2 Kb) fue obtenida a partir del plásmido pUC4K mediante digestión con la enzima de restricción *HindIII* para la inserción en el punto *StuI* (pGG808) o con *BamHI* para la inserción en el sitio *BglIII* (pGG809) (Fig 4.7).

Todos los derivados de delección e inserción del pGG800 fueron introducidos mediante transformación en la estirpe MC4100(pDG250) y el efecto de los mismos sobre la expresión de la fusión *mccB-lacZ* fue observado en placas de LB-X-gal (Fig 4.7).

Varias son las conclusiones que se pueden extraer al examinar la figura 4.7:

1.- Solamente los plásmidos pGG800 y pGG806, portadores del gen *hns* y del locus *hnr* funcionales provocaban unos bajos niveles de expresión de la fusión *mccB-lacZ*. El pGG806 porta una inserción $\Omega::Ap^r$ que debe estar localizada en un locus no involucrado en el fenómeno de represión.

2.- Los niveles de expresión de la fusión *mccB-lacZ* obtenidos con los plásmidos pGG801 y pGG807 eran intermedios entre los del pACYC184 y los del pGG800, indicando que la funcionalidad del locus *hnr* en estos plásmidos se había perdido, observándose sólo el efecto de regulación negativa del producto del gen *hns*.

3.- Interesantemente, los plásmidos pGG804, pGG805 y pGG808, a pesar de no llevar el gen *hns* funcional, provocaban que los niveles de actividad de la fusión *mccB-lacZ* fueran también intermedios entre los obtenidos con el pACYC184 y los del pGG800. Este resultado sugería que el incremento de dosis génica del locus *hnr* también regulaba negativamente la expresión de la fusión *mccB-lacZ*.

4.- Con el plásmido pGG809, portador de las inserciones *hns::Ap^r* y *hnr::Kan*, se recuperan los niveles silvestres de expresión de la fusión *mccB-lacZ*. Análogamente ocurre con el derivado pGG803 (pGG800 Δ *PstI*), indicando que esta delección debería estar afectando tanto al gen *hns* como al locus *hnr*.

4.7.4.- Efecto del incremento del número de copias de *hns* y *hnr* en la expresión de la fusión *mccB-lacZ* a lo largo del ciclo de crecimiento.

Los resultados presentados en el apartado anterior eran cualitativos, obtenidos a partir

del color de las colonias de las distintas estirpes en placas de LB-Xgal.

Para cuantificar los efectos observados, las estirpes resultantes de transformar la estirpe MC4100(pDG250) con los plásmidos pGG800, pGG801, pGG805, pGG806, pGG807, pGG808 o pGG809, fueron cultivadas a 37 °C en medio LB y la actividad de la fusión *mccB-lacZ* fue medida a distintos tiempos del ciclo de crecimiento (Fig 4.9).

Como se puede apreciar, las medidas de la actividad β -galactosidasa están de acuerdo con los resultados cualitativos. Los plásmidos que incrementan la dosis génica del gen *hns* y del locus *hnr* (pGG800 y pGG806) provocan un fuerte descenso (10 veces) de la actividad β -galactosidasa de la fusión *mccB-lacZ*. Los plásmidos pGG801(*hns*⁺ Δ *hnr*) y pGG807(*hns*⁺ *hnr*:: Ω -Ap^r), que incrementan únicamente la dosis génica del gen *hns*, provocan un descenso de unas dos veces en los niveles de la actividad β -galactosidasa de la fusión *mccB-lacZ*. Por último, los plásmidos que incrementan únicamente la dosis génica del locus *hnr* (pGG805 y pGG808) producen un descenso de unas 3-4 veces en los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *mccB-lacZ* en fase estacionaria.

Tomados en conjunto los resultados anteriores sugerirían lo siguiente: el incremento de la dosis génica de *hns* provocaría un aumento de los niveles intracelulares de H-NS, y esta proteína sería responsable de provocar un descenso de unas 2 veces en los niveles de expresión de la fusión *mccB-lacZ*, a través de la regulación negativa del promotor *Pmcc*. El incremento de dosis génica del locus *hnr* sería responsable de provocar un descenso de 3-4 veces en los niveles de expresión de *mccB-lacZ*; y ambos efectos serían aditivos, dando cuenta de la baja expresión de la fusión *mccB-lacZ* observada en presencia del plásmido pGG800.

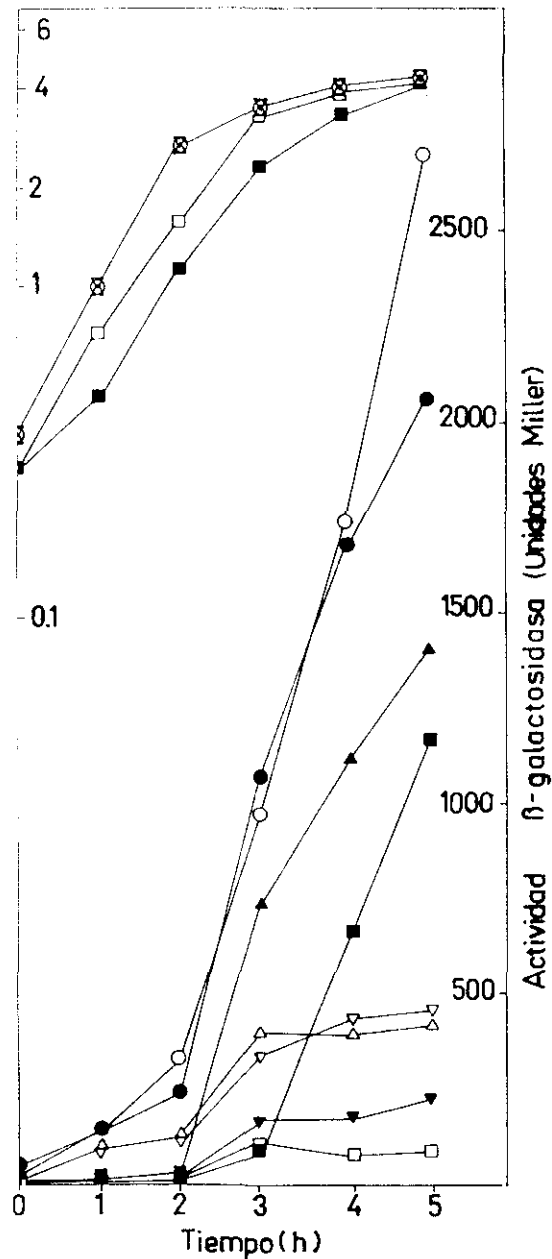


Fig 4.9.— Efecto del aumento de la dosis génica de *hns* y *hnr* en la expresión de la fusión *mccB-lacZ* durante el ciclo de crecimiento. Todos los plásmidos fueron introducidos por transformación en la estirpe MC4100(pDG250) y las cepas resultantes fueron cultivadas en medio LB a 37 °C. La actividad β -galactosidasa fue cuantificada a distintos tiempos del ciclo del crecimiento. Símbolos: (○) pACYC184, (□) pGG800, (■) pGG801, (▽) pGG805 ; (▼) pGG806, (▲) pGG807, (△) pGG808, y (●) pGG809.

4.7.5.- Construcción de un mutante cromosómico *hnr-1::Kan*.

Con el objeto de obtener más información sobre la funcionalidad del locus *hnr*, decidimos sustituir el alelo cromosómico silvestre por un alelo *hnr* nulo.

4.7.5.1.- Construcción del plásmido pGGK200.

Un cassette de resistencia al antibiótico Kanamicina (*Kan*) de 1,2 Kb, obtenido mediante digestión *Bam*HI del plásmido pUC4K, fue insertado en el sitio único *Bgl*II del plásmido pGG200, para dar origen al plásmido pGGK200 (Fig-4.7). El plásmido pGGK200 fue introducido mediante transformación en la estirpe MC4100(pDG250). En la estirpe resultante los niveles de expresión de la fusión *mccB-lacZ* eran intermedios entre los obtenidos con el pGG200 y el plásmido control pUC18, indicando que la inserción había inactivado el locus *hnr* (Fig 4.7). El alelo mutante recibió el nombre de *hnr-1::Kan*.

4.7.5.2.- Sustitución del alelo silvestre por el alelo mutante *hnr-1::Kan*.

Para transferir el alelo mutante *hnr-1::Kan* al cromosoma, empleamos la técnica de sustitución alélica descrita por Winans *et al.*(1985). El DNA del plásmido pGGK200 (Fig 4.9), fue linealizado con la enzima de restricción *Kpn*I, la cual corta únicamente en el polilinker del pUC18, pero no en el fragmento cromosómico que contiene la inserción *hnr-1::Kan* del pGGK200. Con el DNA en forma lineal se transformó la estirpe JC7623 *recB21 recC22 sbcB15* (Winans *et al.*, 1985). Un transformante $Km^r Ap^r$ fue elegido para posterior análisis. Sobre este clon (JC7623 *hnr-1::Kan*) se preparó un lisado de P1vir con el que se infectó la estirpe MC4100. Se obtuvieron varios transductantes Km^r y uno de ellos (JMG200) fue

elegido para posterior estudio.

4.7.5.3.- Localización de la mutación *hnr-1::Kan* en el cromosoma de la estirpe JMG200.

Se procedió a realizar experimentos de Southern blot, para verificar la sustitución alélica. Un fragmento *Pst*I de 1,4 Kb procedente del pGG800 (Fig 4.7) y un fragmento *Bam*HI de 1,2 Kb portador de la resistencia a kanamicina (*Kan*) procedente del pUC4K, fueron utilizados como sondas radiactivas frente a digestiones *Eco*RI, *Hind*III y *Sph*I del DNA genómico de las estirpes MC4100 y JMG200 (Fig 4.10).

El patrón de hibridación obtenido coincidía con lo esperado si la sustitución alélica se hubiera realizado (Fig 4.10) indicando que la mutación *hnr-1::Kan* se encontraba correctamente localizada en el cromosoma de la estirpe JMG200.

4.7.6.- Efecto de las mutaciones *hns-90-Tn10* y *hnr-1::Kan* sobre la expresión de la fusión *mccB-lacZ*.

Dado que tanto el gen *hnr* como el gen *hns* reducen la expresión de la fusión *mccB-lacZ* cuando se encuentran en alto número de copias, decidimos ensayar el efecto conjunto de las mutaciones *hnr-1::Kan* y *hns-90::Tn10* sobre dicha expresión.

La estirpe JMG300 (*hnr-1::Kan hns-90::Tn10*) fue construida transfiriendo via P1vir la mutación *hns-90::Tn10* a la estirpe JMG200. Se verificó que las mutaciones *hns-90::Tn10* y *hnr-1::Kan* segregaban a la frecuencia esperada (de entre 100 transductantes Tc^r Km^r ensayados el 98% eran Tc^r Km^s, los restantes Tc^r Km^r). Un transductante Tc^r Km^r fue elegido



Fig 4.10.– Patrón de hibridación obtenido después del Southern blot realizado para verificar la sustitución alélica en el cromosoma de *E. coli*. Los DNAs genómicos de la estirpe MC4100 (líneas 1, 3, 5, 7, 9 y 11) y JMG200 (líneas 2, 4, 6, 8, 10 y 12) fueron digeridos con *Hind*III (líneas 1, 2, 7 y 8), *Eco*RI (líneas 3, 4, 9 y 10) o *Sph*I (líneas 5, 6, 11 y 12). Un fragmento *Bam*HI procedente del pUC4K (líneas 1–6) o un fragmento *Pst*I procedente del pGG800 (líneas 7–12) fueron usados como sondas marcadas radiactivamente (32 P).

(JMG300) para posterior estudio. Las estirpes MC4100 (*hnr*⁺ *hns*⁺); JMG100 (*hnr*⁺ *hns*-90::Tn10); JMG200 (*hnr*-1::Kan *hns*⁺) y JMG300 (*hnr*-1::Kan *hns*-90::Tn10) fueron transformadas con el plásmido pDG250, portador de la fusión *mccB-lacZ*, y la actividad β-galactosidasa fue ensayada a distintos tiempos del ciclo de crecimiento (Fig 4.11).

El patrón de inducción de la expresión de la fusión *mccB-lacZ* provocado por la mutación *hnr*-1::Kan es comparable al provocado por la mutación *hns*-90::Tn10. Sorprendentemente, el nivel máximo de expresión de la fusión *mccB-lacZ* en el contexto doble mutante (JMG300) es similar el obtenido en contexto *hns*-90::Tn10, indicando la no aditividad de los efectos de ambas mutaciones.

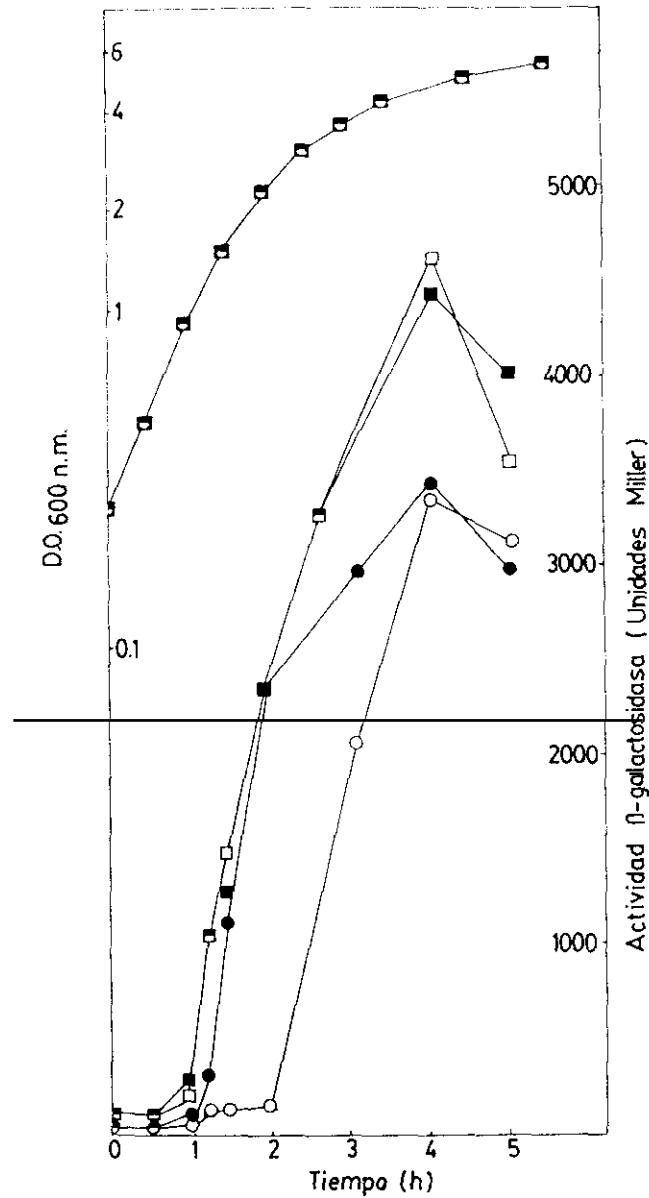


Fig. 4.11.— Efecto de las mutaciones *hnr-1::Kan* y/o *hns-90::Tn10* sobre la expresión de la fusión *mcb-lacZ* en medio LB. Las estirpes MC4100(pDG250); JMG100(pDG250) y JMG 200 (pDG250) fueron cultivadas a 37 °C en medio LB, y la actividad β -galactosidasa de la fusión *mcb-lacZ* fue cuantificada a distintos tiempos del ciclo de crecimiento. Símbolos (○) MC4100 (*hns*⁺ *hnr*⁺), (■) JMG100 (*hns-90::Tn10 hnr*⁺), (●) JMG200 (*hns*⁺ *hnr-1::Kan*) y (□) JMG300 (*hns-90::Tn10 hnr-1::Kan*).

5. DISCUSSION

La expresión de los operones *mcb* (microcina B17) y *mccABC* (microcina C7) tiene lugar durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano. Sin embargo, los estudios realizados previamente en nuestro laboratorio no habían identificado ningún regulador común a ambos sistemas. La expresión del operón *mcb* depende del promotor principal *Pmcb* (Fig 1.1A). La proteína OmpR y el factor de integración del huesped (IHF) regulan positivamente la expresión a partir de *Pmcb*, mientras que la proteína MprA se comporta como un regulador negativo de la misma. Por otra parte la expresión del operón *mccABC* depende del promotor principal *Pmcc* (Fig 1.1B). La transcripción dirigida por *Pmcc* está regulada positivamente por los productos de los genes *crp* y *rpoS*. El trabajo descrito en la presente memoria estaba destinado a identificar nuevos genes cuyos productos regulasen a la vez la expresión de ambos operones.

5.1.- La proteína H-NS regula negativamente la expresión de los operones *mcb* y *mccABC*.

El seguimiento simultáneo de la expresión de ambos operones se hizo posible mediante un diseño experimental que combina el uso de dos fenotipos fácilmente observables (color de las colonias portadoras de la fusión *mcbA-lacZ* y halo de antibiosis debido a la producción de microcina C7). En un experimento de mutagénesis con el transposón *Tn10* se obtuvo un clon (JMG89) con un alto nivel tanto de expresión de la fusión como de producción de la microcina. Pudo observarse también que la inserción tenía efectos pleiotrópicos, resultando en un fenotipo mucoide y resistencia a diversos bacteriófagos. La caracterización de la mutación, mediante mapeo físico y genético, así como mediante secuenciación del sitio de

inserción del transposón, permitió concluir que el *Tn10* está dentro del gen previamente descrito *hns*.

En paralelo, la búsqueda de genes silvestres capaces de alterar la expresión de una fusión *mccB-lacZ* dio como resultado el aislamiento de un fragmento cromosómico que en alto número de copias reducía la expresión de la fusión. Esta reducción de la expresión se debe a la acción de dos genes presentes en el fragmento. De nuevo, uno de ellos es *hns*, de cuya participación en la regulación de los operones *mcb* y *mccABC* nos ocuparemos en este apartado. El segundo gen (locus), al que se denominó *hnr*, no había sido descrito antes de la realización de este trabajo. Sus efectos serán discutidos en el apartado 5.2.

5.1.1.- El gen *hns* y su producto.

Antes de discutir los efectos reguladores del producto del gen *hns* sobre la expresión de los operones *mcb* y *mccABC*, es conveniente revisar brevemente el estado actual de las investigaciones sobre esta proteína, implicada en numerosas funciones celulares.

El gen *hns* fue inicialmente mapeado en el minuto 6,1 del mapa genético de *E. coli* (Pon *et al.*, 1988), pero posteriormente otros autores demostraron que tal conclusión era errónea y lo localizaron en el minuto 27,3 (Hulton *et al.*, 1990; May *et al.*, 1990; Göransson *et al.*, 1990). Las mutaciones en el gen *hns* son altamente pleiotrópicas, siendo múltiples los genes y operones cuya expresión está regulada positiva o negativamente por la proteína que codifica (véase una compilación de los mismos en la Tabla 5.1). Debido a esta pleiotropía, el gen fue designado con numerosos nombres diferentes (*osmZ*, *bglY*, *drdX*, *pilG*, *virR*, *cur*), dependiendo de la función que se observó afectada en cada caso. En los últimos años, diversos

autores han establecido que todos esos genes mutados eran alelos de *hns*.

El producto del gen *hns* es la proteína neutra de 15,5 KDa H-NS (también denominada H1), la cual ha sido incluida entre las proteínas de pequeño tamaño que se unen al DNA y se suponen implicadas en la estructuración de la cromatina bacteriana. Debido a estas características que las asemejan a las histonas eucarióticas, a estas proteínas se les ha denominado "similares a histonas" (*histone-like*). En *Escherichia coli* se han incluido dentro de este grupo las proteínas HU($\alpha\beta$), IHF($\alpha\beta$) y FIS (Drlica and Rouviere-Yaniv, 1987; Pettijohn, 1988; Schmid, 1990). Recientemente otros dos nuevos componentes han sido añadidos al grupo: la proteína Dps, implicada en la protección del DNA y en la regulación transcripcional de la expresión génica en fase estacionaria tardía (Almirón *et al.*, 1993), y la proteína Lrp, mediadora de la respuesta a leucina (Newman *et al.*, 1992; D'ari *et al.*, 1993).

La proteína H-NS es una de las más abundantes, habiéndose estimado que hay unas 20.000 moléculas por célula, lo que representaría una molécula cada 400 nucleótidos de DNA cromosómico. En geles de poliacrilamida bidimensionales del tipo O'Farrell, H-NS presenta tres isoformas, denominadas H1_a, H1_b y H1_c, cuyas cantidades relativas varían con la fase de crecimiento (Spassky *et al.*, 1984). Asimismo, varias bandas correspondientes a posibles isoformas de la H-NS han sido detectadas utilizando anticuerpos anti-H-NS, y se ha observado que la abundancia relativa de cada forma depende del medio (rico, LB, o mínimo, M63) en el que son cultivadas las bacterias (Falconi *et al.*, 1993). El origen de estas isoformas aún no ha sido determinado.

La unión de la proteína H-NS al DNA ha sido ampliamente estudiada. El seguimiento de la formación de los complejos DNA circular-proteína H-NS a través de los cambios en

la velocidad de sedimentación de los mismos, permitió concluir que H-NS provoca una fuerte condensación o compactación del DNA (Spassky *et al.*, 1984; Friedrich *et al.*, 1988). Por otra parte, los estudios de microscopía electrónica e inmunocitoquímica del nucleoide, llevados a cabo tanto en células con la dosis normal de H-NS como en células en las que se hiperproduce la proteína, apoyan la misma idea (Dürrenberg *et al.*, 1992; Spurio R. *et al.*, 1992). Existe una cierta especificidad de secuencia para la unión de H-NS al DNA (consenso TNTNAN) (Rimsky *et al.*, 1990), mostrando preferencia hacia regiones de DNA con curvatura intrínseca (Bracco *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1990; Owen-Hughes *et al.*, 1992; Ueguchi *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1993). H-NS se une al DNA probablemente en forma dimérica (Falconi *et al.*, 1988).

Para explicar la capacidad de H-NS para regular la expresión génica, se han propuesto varios mecanismos:

a) La proteína H-NS actuaría como un "silenciador" de la transcripción, inactivando parte del cromosoma mediante la formación de una estructura similar a la cromatina (*chromatin-like*) (Göransson *et al.*, 1990). Este fenómeno de represión (*silencing*) sería local, efectuado por medio de la unión de H-NS a zonas curvadas del DNA situadas en la proximidad de las regiones promotoras de los genes controlados por esta proteína (Yoshida *et al.*, 1992; Ueguchi *et al.*, 1993; Owen-Hughes *et al.*, 1992).

b) La regulación de la expresión génica por H-NS sería ejercida de una manera indirecta, al provocar cambios en el nivel de superenrollamiento del DNA, que afectarían en último termino a los promotores de los genes controlados por la proteína (Higgins., *et al.*, 1988; Hulton *et al.*, 1990).

Tabla 5.1.- Genes y operones de *Escherichia coli* cuya expresión es regulada por la proteína H-NS.

Genes u operones	min	Función	Regulación	Otros reguladores/inducción	Referencia
<i>ompF</i>	20.7	Porina (permeabilidad)	+ ⁱ	IHF, EnvZ-OmpR/Osmoinducible	Higgins <i>et al.</i> , 1988
<i>sulA</i>	22	Desconocida	+ ⁱ	Inducible por S.O.S y en fase estacionaria	Dri y Moreau, 1993
<i>csgA</i>	23.1	Curlina (adhesión)	- ⁱ	RpoS(σ^s)/Fase estacionaria	Olsen <i>et al.</i> , 1992
<i>treA</i>	26.6	Trealasa periplásmica	- ⁱ	RpoS(σ^s)/Osmoinducible	Repoila <i>et al.</i> , 1991
<i>hns</i>	27.3	Proteína H-NS	- ^d	CspA, FIS/Fase estacionaria	Ueguchi <i>et al.</i> , 1992; Dersch <i>et al.</i> , 1993; Falconi <i>et al.</i> , 1993
<i>osmC</i>	32.4	Desconocida	- ⁱ	Osmoinducible	Gutierrez <i>et al.</i> , 1991
<i>ompC</i>	47.8	Porina (permeabilidad)	- ⁱ	EnvZ-OmpR/Osmoinducible	Higgins <i>et al.</i> , 1988
<i>proVWX</i>	58	Transporte de betaína	- ^d	Osmoinducible	Higgins <i>et al.</i> , 1988; Hulton <i>et al.</i> , 1990; Ueguchi <i>et al.</i> , 1992
<i>bglBCS</i>	83	Fermentación de β -glucósidos	- ⁱ	BglF	Defez y De Felice, 1981; Higgins <i>et al.</i> , 1988;
<i>adi</i>	93.4	Arginina descarboxilasa	- ⁱ	Inducible por Δ pH	Shi <i>et al.</i> , 1993
<i>cad</i>	94	Lisina descarboxilasa	- ⁱ	Inducible por Δ pH	Shi <i>et al.</i> , 1993
<i>fim</i>	cromosómica	Fimbrias de tipo 1	- ⁱ	IHF	Kawula y Orndorff, 1990
<i>pap</i>	cromosómica	Fimbrias de tipo pap	- ⁱ	CRP, Lrp/Termorregulado	Göranson <i>et al.</i> , 1992
<i>cfa</i>	plasmídica	Fimbrias de tipo CFAL/I	- ⁱ	CfaD/Termorregulado	Jordi <i>et al.</i> , 1992
<i>ipa</i>	plasmídica	Fimbrias de tipo EIEC	- ⁱ	VirB, VirF/Termorregulado	Dagberg <i>et al.</i> , 1992
<i>mcb</i>	plasmídica	Producción de MccB17.	- ⁱ	MprA, IHF/Fase estacionaria	Este trabajo
<i>mccABC</i>	plasmídica	Producción de MccC7.	- ⁱ	CRP, RpoS(σ^s)/Fase estacionaria	Este trabajo

Notas a la Tabla 5.1.

Símbolos: (+) regulación positiva; (-) regulación negativa.

(i) demostración indirecta: estudio de la expresión de fusiones génicas *lacZ* o variación fenotípica en mutantes deficientes en H-NS.

(d) demostración directa: estudios de unión de la proteína H-NS a DNA, mediante técnicas de retraso en gel o *footprinting* con DNAasa I.



c) Finalmente, la proteína H-NS podría influir en la transcripción actuando como proteína auxiliar, por estabilización de complejos DNA-represor (Falconi *et al.*, 1991).

5.1.2.-La proteína H-NS y la regulación del promotor *Pmcb*.

La mutación *hns-90::Tn10* provoca un incremento de la producción de la microcina B17. El estudio de la expresión de la fusión *mcbA-lacZ* en contexto *hns-90::Tn10* (Figura 4.4) indica que la proteína H-NS regula negativamente la expresión de los genes *mcb*, lo cual explica el incremento de la producción de la microcina en dicho contexto.

El principal efecto observado de la mutación *hns-90::Tn10* sobre la expresión de una fusión *mcbA-lacZ* consiste en desplazar el momento de la inducción, que normalmente ocurre al entrar las bacterias en fase estacionaria, hacia la fase exponencial (Fig 4.4). Este resultado indica que la proteína H-NS regula negativamente la expresión del operón *mcb* en fase exponencial. Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente acerca de los mecanismos propuestos para el control de la expresión génica por H-NS, la regulación de los genes *mcb* podría ser ejercida de las siguientes maneras:

a) Por medio de la unión directa a las regiones de DNA adyacentes al promotor *Pmcb*. En este sentido, hay que destacar que esta región promotora no parece mostrar curvatura intrínseca (Espinosa-Urgel y Tormo, 1993), lo cual iría en contra de las preferencias de unión de la proteína H-NS, aunque no excluye dicha unión. La elucidación de esta cuestión deberá ser proporcionada por los experimentos de retraso en gel y *footprinting* con H-NS, que están proyectados para su próxima realización en nuestro laboratorio.

b) Mediante cambios en el nivel de superenrollamiento que afectarían a la topología

del DNA en la región del promotor *Pmcb*.

c) Como proteína auxiliar, quizá estabilizando presuntos complejos DNA–repressor. El promotor *Pmcb* es regulado negativamente por el producto del gen *mprA*. Sin embargo, aún no se conoce si esta regulación es directa, mediante unión al DNA, o indirecta, mediante un mecanismo por ahora desconocido. La purificación de la proteína MprA se requeriría para, en primer lugar, concretar su papel regulador; y, en segundo lugar, para estudiar presuntas interacciones entre el promotor, MprA y H–NS.

d) De forma indirecta, afectando a la expresión de algún otro regulador del promotor, sea uno ya conocido (OmpR, IHF, MprA) o por descubrir.

5.1.3.–La proteína H–NS y la regulación del promotor *Pmcc*.

La mutación *hns–90::Tn10* provoca un incremento de la producción de la microcina C7. El estudio de la expresión de la fusión *mccB–lacZ* en contexto *hns–90::Tn10* (Figura 4.5) indica que la proteína H–NS regula negativamente la expresión de los genes *mccABC*, lo cual explica el incremento de la producción de microcina en dicho contexto.

Análogamente a como ocurre en el caso del operón *mcb*, el principal efecto observado de la mutación *hns–90::Tn10* sobre la expresión de una fusión *mccB–lacZ* consiste en desplazar el momento de la inducción de la fase estacionaria a la fase exponencial, si bien en este caso el desplazamiento va acompañado de un ligero incremento en los niveles máximos de expresión (Figura 4.5). Este resultado sugiere que la proteína H–NS controla negativamente la expresión del operón *mccABC* en fase exponencial.

Los resultados de mapeo S1 (Figura 4.6) indican que este efecto de regulación negativa

de *mccABC* se lleva a cabo a nivel transcripcional, a través de la represión del promotor *P_{mcc}*.

La regulación por H-NS del promotor *P_{mcc}* podría ser ejercida de diversas maneras:

a) Por medio de la unión directa a las regiones de DNA adyacentes al promotor *P_{mcc}*.

De hecho, el DNA de esta región promotora muestra una amplia curvatura intrínseca (González-Pastor, J. E. y San Millán, J. L., comunicación personal). Dado que H-NS se une preferentemente a regiones que tienen tal propiedad, resulta verosímil que en el caso del promotor *P_{mcc}* sea éste el mecanismo que esté funcionando. No obstante, esta hipótesis deberá ser confirmada mediante experimentos de retraso en gel y *footprinting* con la proteína H-NS.

b) Mediante cambios en el nivel de superenrollamiento que afectarían a la topología del DNA en la región del promotor *P_{mcc}*.

c) Como proteína auxiliar, quizá estabilizando presuntos complejos DNA-represor. Esta hipótesis requiere cuidadosa atención, dado el reciente descubrimiento del locus *hnr*, cuyo(s) producto(s) se comporta(n) como regulador(es) negativo(s) de la expresión de los genes *mccABC*. En espera de profundizar en el mecanismo de regulación en el que están implicados este producto o productos, no se pueden descartar presuntas interacciones entre éstos y H-NS a nivel del promotor.

d) De forma indirecta, afectando a la expresión de algún otro regulador del promotor, sea uno ya conocido (RpoS, CRP) o por descubrir.

La expresión de los genes *mccABC* requiere el producto del gen *rpoS* (Fig 4.5). Recientemente ha sido demostrado que RpoS es un nuevo factor sigma (σ^S), utilizado por la RNA polimerasa preferentemente para la expresión de genes en la fase estacionaria del crecimiento. Los resultados presentados en las figuras 4.5 y 4.6 indican que la transcripción

de los genes *mccABC*, a partir del promotor *Pmcc* y en fase estacionaria, se hace independiente de σ^S en contexto *hns-90::Tn10*. Este resultado sugiere: 1) que H-NS regula negativamente la expresión de los genes *mccABC* tanto en fase exponencial como en fase estacionaria. 2) que la funcionalidad de σ^S en la expresión de *Pmcc* sea la de liberar en fase estacionaria la regulación negativa ejercida por la proteína H-NS. Este efecto podría ser ejercido de una manera directa o indirecta (a través de otro regulador positivo controlado por RpoS). Un fenómeno similar ha sido descrito para la transcripción del gen *csgA*, que codifica la subunidad estructural (curlina) de un nuevo tipo de apéndice celular, los curli (Olsén *et al.*, 1993). En conjunto, estos dos resultados permiten sugerir que el fenómeno pudiera ser más global, y ocurrir también en otros genes regulados positivamente por σ^S y negativamente por H-NS. En este contexto recientemente ha sido demostrada la existencia de proteínas antirepresoras que liberarían la represión ejercida por H-NS (Jordi *et al.*, 1992; Forsman *et al.*, 1993; Kano *et al.*, 1993; Liu y Richardson, 1993; Falconi *et al.*, 1993; revisado por Dorman *et al.*, 1993).

La expresión de los genes *mccABC* requiere también el producto del gen *crp*. De hecho, el complejo CRP-AMPC es un activador transcripcional de estos genes (González-Pastor *et al.*, manuscrito en preparación). Los niveles de expresión obtenidos en fase estacionaria a partir de *Pmcc*, en contexto *crp⁻ hns⁻* (Tabla 4.1 y Fig 4.6), indican que existe en esta fase una pequeña pero significativa transcripción residual, que es independiente del complejo CRP-AMPC. Esta transcripción residual también sería silenciada por H-NS.

5.2.- Identificación de un nuevo locus, *hnr*, que regula negativamente la expresión del operón *mccABC*.

La búsqueda de genes que en alto número de copias fueran capaces de alterar la expresión de una fusión *mccB-lacZ* condujo al aislamiento de un fragmento cromosómico de 19 Kb, capaz de provocar una fuerte reducción de la expresión de dicha fusión. Este fragmento cromosómico, proveniente del minuto 27 del mapa genético de *E.coli*, portaba el gen silvestre *hns*. Este resultado sugería que la hiperproducción de la proteína H-NS, debida al incremento del número de copias del gen *hns*, sería responsable de provocar la fuerte reducción observada en los niveles de expresión de la fusión.

Sin embargo, el análisis de subclonado de la región mínima de DNA responsable de la reducción de la expresión condujo a un sorprendente hallazgo: en el fragmento existía un segundo locus, al que denominamos *hnr*, necesario para obtener la reducción máxima de la expresión observada con el fragmento total. Los plásmidos que incrementan únicamente la dosis génica del gen *hns* son capaces de provocar un descenso de 2-3 veces en los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *mccB-lacZ* (Fig 4.9). Por otra parte, el incremento del número de copias del locus *hnr* provoca por sí solo un descenso de 3-4 veces en los niveles de expresión de la fusión *mccB-lacZ* en fase estacionaria (Fig 4.9). Estos efectos parecen ser aditivos, porque el incremento simultáneo de la dosis génica de *hns* y *hnr* produce una reducción de unas 10 veces en los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión.

Dado que el estudio de la expresión génica usando construcciones multicopia puede en ocasiones ser engañoso, se construyó un alelo *hnr* mutante nulo, que fue situado en el cromosoma mediante técnicas de sustitución alélica. La expresión de la fusión *mccB-lacZ* fue

estudiada en medio LB en los diferentes contextos genéticos: *hnr*⁻, *hns*⁻, y *hnr*⁻ *hns*⁻. Sorprendentemente, el momento de la inducción de la fusión sufre un desplazamiento de fase estacionaria a fase exponencial en los tres contextos. Sin embargo, los niveles máximos de expresión sólo se ven aumentados en contexto *hns*⁻ o *hnr*⁻ *hns*⁻ (Figura 4.11).

Estos resultados sugieren que el producto(s) del locus *hnr* se comporta(n) como un regulador negativo de la expresión en fase exponencial de la expresión del operón *mccABC*. Resulta interesante la falta de efectos aditivos de las mutaciones *hnr*⁻ y *hns*⁻: a nivel de la expresión de la fusión *mccB-lacZ*, un doble mutante *hnr*⁻ *hns*⁻ es indistinguible de un mutante simple *hns*⁻. Futuros experimentos deberán elucidar el mecanismo por el que *hnr* lleva a cabo la regulación de los genes *mccABC*: secuenciación del segmento de DNA que contiene el locus *hnr*; purificación de la proteína o proteínas codificadas; y estudios *in vitro* de las interacciones DNA-proteína y proteína-proteína entre los diversos reguladores del operón y el DNA del promotor *Pmcc*. Asimismo, será interesante examinar si esta función reguladora de *hnr* se extiende a otros genes u operones de *E. coli*.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer del trabajo descrito en la presente memoria son las siguientes:

- 1.- En experimentos de mutagénesis con el transposón *Tn10*, se aisló un mutante de *Escherichia coli* que mostraba incrementadas tanto la expresión del operón *mcb* (microcina B17) como la producción de la microcina C7.
- 2.- La inserción del transposón *Tn10* en dicho mutante fue localizada dentro del gen *hns* mediante las siguientes aproximaciones: 1) Mapeo genético por conjugación. 2) Clonado de un fragmento que contiene el *Tn10* y regiones adyacentes, seguido de mapeo físico del fragmento y secuenciación del punto de inserción del transposón. La mutación recibió el nombre de *hns-90::Tn10*.
- 3.- El efecto de la mutación *hns-90::Tn10* sobre la expresión de las fusiones *mcbA-lacZ* y *mccB-lacZ* indica que el producto del gen *hns*, la proteína similar a las histonas (*histone-like*) H-NS regula negativamente la expresión de los operones *mcb* y *mccABC*.
- 4.- Los estudios de expresión del operón *mccABC* en contexto genético *hns⁻ rpoS⁻*, mediante la utilización de una fusión *mccB-lacZ* y por mapeo con nucleasa S1, indican que el factor sigma alternativo de la RNA polimerasa σ^8 no es requerido para la expresión de dicho operón en ausencia de la proteína H-NS.
- 5.- La expresión de la fusión *mccB-lacZ* en contexto *hns⁻ crp⁻* permite detectar cierto nivel residual de expresión del operón *mccABC*, que es independiente del activador CRP.

- 6.- Se aisló un plásmido multicopia que portaba un fragmento cromosómico que reducía la expresión de una fusión *mccB-lacZ*. El análisis de delección e inserción de dicho fragmento demostró que el fenotipo de reducción de la expresión observado se debía a la presencia de dos genes: uno de ellos era *hns*, y el otro era un locus no descrito previamente, al que denominamos *hnr*.

- 7.- Mediante técnicas de sustitución alélica, se construyó un mutante cromosómico *hnr⁻*. Estudios realizados con una fusión *mccB-lacZ* en dicho contexto mutante indican que el producto(s) del locus *hnr⁻* regula(n) negativamente la expresión del operón *mccABC* en fase exponencial.

7. BIBLIOGRAFIA

- Almirón, M., J. J. Link, D. Furlong, and R. Kolter.** (1993). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes and Dev.* **6**: 2646–2654.
- Alonso, R., P. S. Nicholson, and T.L. Pitt.** (1993). Rapid extraction of high purity chromosomal DNA from *Serratia Marcescens*. *Letters in Applied Microbiology.* **16**: 77–79.
- 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. Commun.* **69**: 7–14.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl.** (1987). *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley Sons, New York.
- Baquero, F., D. Bouanchaud, M. C. Martínez, and C. Fernández.** (1978). Microcin plasmid: 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**: 342–347.
- Black, M. E., and D. E. Hruby.** (1991). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* thymidine kinase gene provides evidence for conservation of functional domains and quaternary structure. *Mol. Microbiol.* **5**: 373–379.
- Bohannon, D. E., N. Connell, J. Keener, A. Tormo, M. Espinosa-Urgel, M. M. Zambrano, and R. Kolter.** (1991). Stationary-phase-inducible 'gearbox' promoters: differential effects of *katF* mutations and role of σ^{70} . *J. Bacteriol.* **173**: 4482–4492.
- Botsford, L. J., and J. G. Harman.** (1992). Cyclic AMP in Prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **56**: 100–122.

Bracco, L., D. Kotlarz, A. Kolb, S. Diekmann, and H. Buc. (1989). Synthetic curved DNA sequences can act as transcriptional activators in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **8**: 4289–4296.

Breil, B. T., P. W. Ludden, and E. W. Triplett. (1993). DNA sequence and mutational analysis of genes involved in the production and resistance of antibiotic peptide Trifolitoxin. *J. Bacteriol.* **175**: 3693–3702.

Casaregola, S., M. Chen, N. Bouquin, V. Norris, A. Jacq, M. Goldberg, S. Margaron, M. Tempete, S. Mckenna, H. Sweetman, S. Bernard, G. Mac Gurk, S. Seror, and I. B. Holland. (1991). Analysis of a myosin-like protein and the role of calcium in the *E. coli* cell cycle. *Res. Microbiol.* **142**: 201–207

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.

D'ari, R., R. T. Lin, and E. B. Newman. (1993). The leucine-responsive regulatory protein: more than a regulator?. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 260–263.

Dargberg, B., and B. E. Uhlin. (1992). Regulation of virulence associated plasmid genes in enteroinvasive *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 7606–7612.

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

de Crombrughe, B., S. Busby, H. Buc. (1984). Cyclic AMP receptor protein : role in transcription activation. *Science* **224**: 831–838.

del Castillo, I. (1991). Aislamiento y caracterización del gen *mprA*, regulador negativo de la producción del antibiótico peptídico microcina B17 a nivel transcripcional. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

del Castillo, I., 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 osmoinduction of *proU* when cloned on a high-copy-number plasmid. *J. Bacteriol.* **172**: 437–445.

del Castillo, I., J. E. González-Pastor, J. L. San Millán, and F. Moreno. (1991). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* regulatory gene *mprA* and construction and characterization of *mprA*-deficient mutants. *J. Bacteriol.* **173**: 3929–3942.

Defez, R., and M. De Felice. (1981). Cryptic operon for β -glucoside in *Escherichia coli* K-12: genetic evidence for a regulatory protein. *Genetics* **97**: 11–25.

Dersch, P., K. Schmidt, and E. Bremer. (1993). Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation. *Mol. Microbiol.* **8**: 875–889.

Díaz-Guerra, L., F. Moreno, and J. L. San Millán. (1989). *appR* gene product activates transcription of microcin C7 plasmid genes. *J. Bacteriol.* **171**: 2906–2908.

Dorman, C. J., and N. N. Bhriain. (1993). DNA topology and bacterial virulence gene regulation. *Trends in Microbiology.* **1**: 92–99.

Drlica, K., and J. Rouvière-Yaniv. (1987). Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol. Rev.* **51**: 301–319.

Dri, A. M., and P. L. Moreau. (1993). Phosphate starvation and low temperature as well as ultraviolet irradiation transcriptionally induce the *Escherichia coli* *lexA*-controlled gene *sfiA*. *Mol. Microbiol.* **8**: 697–706.

Dürrenberg, M., A. La Teana, G. Citro, F. Venanzi, C. O. Gualerzi, and C. L. Pon. (1991). *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS is localized in the nucleoid. *Res. Microbiol.* **142**: 373–380.

Espinosa-Urgel, M., and A. Tormo. (1993). σ^S -dependent promoters in *Escherichia coli* are located in DNA regions with intrinsic curvature. *Nucl. Acids. Res.* **12**: 5321–5340.

Falconi, M., M. T. Gualteri, A. Le teana, M.A. Losso, and C.L. Pon. (1988). Proteins from the prokaryotic nucleoid: primary and quaternary structure of the 15 KDa *Escherichia coli* DNA binding protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **2**: 323–329.

Falconi, M., V. McGovern, C. Gualerzi, D. Hilyard, P. N. Higgins. (1991). Mutations altering chromosomal protein H-NS induce mini-Mu transposition. *New. Biol.* **3**: 615–625.

Falconi, M., N. P. Higgins, R. Spurio, L. C. Pon, and C. O. Gualerzi. (1993). Expression of the gene encoding the major bacterial nucleoid protein H-NS is subject to transcriptional autorepression. *Mol. Microbiol.* **10**: 273–282.

Feinberg, A., and B. Vogeltein. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6–13.

Fellay, R., J. Frey, and H. Kirsch. (1987). Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* **52**: 147–154.

Forsman, K., B. Sondén, M. Göransson, and B. E. Uhlin. (1992). Antirepression function in *Escherichia coli* for the cAMP–CRP receptor protein transcriptional activator. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**: 9880–9884.

Freundlich, M., N. Ramani, E. Mathew, A. Sirko, and P. Tsui. (1992). The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **6**: 2557–2563.

Friedman, D. I. (1988). Integration host factor: a protein for all reasons. Cell **51**: 545–554.

Friedrich, K., C. O. Gualerci, M. Lammi, M.A. Losso, and C. L. Pon. (1988). Protein from the prokaryotic nucleoid: interaction of nucleic acids with the 15 KDa *Escherichia coli* histone–like H–NS. FEBS Lett. **229**: 197–202.

Gaggero, C., F. Moreno, and M. Laviña.(1993). Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system. J. Bacteriol. **175**: 5420–5427.

García–Bustos, J. F., N. Pezzi, and C. Asensio. (1984). Microcin 7: purification and properties. Biochem. Biophys. Res. Commun. **119**: 779–785.

García–Bustos, J. F., N. Pezzi, and E. Méndez. (1985). Structure and mode de action of microcin 7, an antibacterial peptide produced by *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents. Chemother. **27**: 791–797.

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.

- 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.
- Göransson, M., B. Sonden, P. Nilsson, B. Dagberg, K. Forsman, K. Emanuelsson, and B. E. Uhlin.** (1990). Transcriptional silencing of thermoregulation and gene expression in *Escherichia coli*. *Nature* **344**: 682–685.
- Groisman, E. A., B. A. Castilho, and M. J. 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.
- Gutierrez, C., and J. C. Devedjian.** (1991). Osmotic induction of gene *osmC* expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* **220**: 959–973.
- 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., and F. Moreno.** (1986). Microcin B17 blocks DNA replication and induces the S.O.S system in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 393–402.
- Higgins, C. F., C. J. Dorman, D. A. Stirling, L. Waddell, I. R. Booth, G. May, and E. Bremer.** (1988). A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**: 569–584.
- Higgins, C.F., J. C. D. Hinton, C. S. J. Hulton, T. Owen-Hughes, G. D. Pavitt, and A. Seirafi.** (1990). Protein H1: a role for chromatin structure in the regulation of bacterial gene expression and virulence?. *Mol. Microbiol.* **4**: 2007–2012.

Hulton, C. S. J., A. Seirafi, J. C. D. Hinton, J. M. Sidebotham, L. Waddell, G. D Pavitt, T. Owen-Hughes, A. Spassky, H. Buc, and C. F. Higgins. (1990). Histone-like protein H1 (H-NS), DNA supercoiling and gene expression in bacteria. *Cell* **63**: 631-642.

Jordi, B. J. A. M., B. Dagberg, L. A. M. de Haan, A. M. Hamers, B. M. A. van der Zeijst, W. Gaastra, and B. E. Uhlin. (1992). The positive regulator CfaD overcomes the repression mediated by histone-like protein H-NS (H1) in the CFA/I fimbrial operon of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **11**: 2627-2632.

Kano, Y., K. Yazuzawa, H. Tanaka, and F. Imamoto. (1993). Propagation of phage Mu in IHF-deficient *Escherichia coli* in the absence of the H-NS histone-like protein. *Gene* **126**: 93-97.

Kawula, T. M., P. E. Orndorff. (1991). Rapid site-specific DNA inversion in *Escherichia coli* mutants lacking the histone-like protein H-NS. *J. Bacteriol.* **173**: 4416-4123.

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

Kolb, A., S. Busby, H. Buc, S. Gorges, and S. Adhya. (1993). Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Ann. Rev. Biochem.* **62**: 749-795.

Kolter, R., and F. Moreno. (1992). Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**: 141-163.

Lange, R., and R. Hengge-Aronis. (1991). Identification of a central regulator of stationary phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **5**: 49-59.

- Laviña, M., A. P. Pugsley, and F. Moreno.** (1986). Identification, mapping, cloning and characterization of a gene (*smbA*) 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.
- Liu, Q., and C.C Richardson.** (1993). Gene 5.5 protein of bacteriophage T7 inhibits the nucleoid protein H–NS of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 1761–1765.
- Lonetto, M., M. Gribbskov, and C. Gross.** (1992). The σ^{70} family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* **174**: 3843–3849.
- May, G., P. Dersch, M. Haardt, A. Middendorf, and E. Bremer.** (1990). The *osmZ(bglY)* gene encodes the DNA–binding protein H–NS(H1a), a component of the *Escherichia coli* K–12 nucleoid. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 81–90.
- Messing, J. H.** (1983). New M13 vectors for cloning. *Method Enzymol.* **101**: 20–78.
- Miller, J. H.** (1972). *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Michaelis, S., H. Inouye, D. Oliver, and J. Beckwith.** (1983). Mutations that alter the signal sequence of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **154**: 366–374.
- Mizuno, T., and S. Mizushima.** (1990). Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol. Microbiol.* **4**: 1077–1082.



- Mulvey, M. R., and P. C. Loewen.** (1989). Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggests *KatF* protein is a novel σ transcription factor. *Nucl. Acids. Res.* **17**: 9979–9991.
- Newman, B. E. R. D'ari, and R. T. Lin.** (1992). The Leucine-Lrp regulon in *E. coli*: a global response in search of a *raison d'être*. *Cell* **68**: 617–619.
- Novoa, M. A., L. Díaz-Guerra, J. L. San Millán, F. Moreno.** (1986). Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin C7 production and immunity. *J. Bacteriol.* **168**: 1384–1391.
- Olsén, A., A. Arnqvist, M. Hammar, S. Sukupolvi, and S. Normark.** (1993). The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol* **7**: 523–536.
- Owen-Hughes, T. A., G. D. Pavitt, S. S. Diogenes, J. M. Sidebotham, C. S. J. Hulton, C. D. H. Jay, and Higgins. C. F.** (1992). The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. *Cell* **71**: 255–265.
- Parkinson, S. J.** (1993). Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**: 857–871.
- Pettijohn, D. E.** (1988). Histone-like proteins and bacterial chromosome structure. *J. Biol. Chem.* **263**: 12793–12796.
- Pon, C. L., A. R. Calogero, and C. O. Gualerzi.** (1988). Identification, cloning, nucleotide sequence and chromosomal map location of *hns*, the structural gene for *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 199–202.

- Repoila, F., and C. Gutierrez.** (1991). Osmotic induction of the periplasmic trehalase in *Escherichia coli* K-12: characterization of the *treA* gene promoter. *Mol. Microbiol.* **5**: 747-755.
- Rimsky, S., and A. Spassky.** (1990). Sequence determinants for H1 binding on *Escherichia coli lac* and *gal* promoters. *Biochemistry* **29**: 3765-3771.
- Rodríguez-Sáinz, M. C., C. Hernández-Chico, y F. Moreno.** (1990). Molecular characterization of *pmbA*, an *Escherichia coli* chromosomal gene required for the production of the antibiotic peptide MccB17. *Mol. Microbiol.* **4**: 1921-1932.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd edn (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- San Millán, J. L., C. Hernández-Chico, P. Pereda, and F. Moreno.** (1985a). Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin B17 production and immunity. *J. Bacteriol.* **163**: 275-281.
- San Millán, J. L., R. Kolter, and F. Moreno.** (1985b). Plasmid genes required for microcin B17 production. *J. Bacteriol.* **163**: 1016-1020.
- San Millán, J. L., R. Kolter, and F. Moreno.** (1987). Evidence that colicin X is microcin B17. *J. Bacteriol.* **169**: 2899-2901.
- Schmid, M. B.** (1990). More than just "histone-like" proteins. *Cell* **63**: 451-453.

- Shi, X., B. C. Waasdorp, and G. N. Bemmet.** (1993). Modulation of acid-induced amino acid decarboxylase gene expression by *hns* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 1182–1186.
- Spassky, A., S. Rimsky, H. Garreau, and H. Buc.** (1984). H1a, an *E. coli*. DNA-binding protein which accumulates in stationary phase, strongly compacts DNA *in vitro*. *Nucl. Acids. Res.* **12**: 5321–5340.
- Spurio, R., M. Dürrenberger, M. Falconi, A. La teana, C. L. Pon and C. O. Gualerzi.** (1992). Lethal overproduction of the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS: ultramicroscopic and molecular autopsy. *Mol. Gen. Genet.* **231**: 201–211.
- Stock, J. B., A. M. Stock, and J. Mottonen.** (1990). Signal transduction in bacteria. *Nature* **344**: 395–400.
- Tanaka, K., Y. Takayanagi, N. Fujita, A. Ishihama, and H. Takahashi.** (1993). Heterogeneity of the principal σ factor in *Escherichia coli*: The *rpoS* gene product, σ^{38} , is a second principal σ factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3511–3515.
- Touati, E., E. Dassa, and P. L. Boquet.** (1986). Pleiotropic mutations in *appR* reduce pH 2.5 and phasphatase expression and restore succinate utilization in CRP-deficient strains of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 257–264.
- Ueguchi, C., and T. Mizuno.** (1993). The *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS functions directly as a transcriptional repressor. *EMBO J.* **12**: 1039–1046.
- Vicente, M., S. R. Kushner, T. Garrido, and M. Aldea.** (1991). The role of the 'gearbox' in the transcription of essential genes. *Mol. Microbiol.* **5**: 2085–2091.

Vizán, J. L., C. Hernández-Chico, I. del Castillo, and F. Moreno. (1991). The peptide antibiotic microcin B17 induces double strand cleavage of DNA mediated by gyrase. *EMBO J.* **10**: 467–476.

Way, J. C., M. A. Davis, D. Morisato, D. E. Roberts, and N. Kleckner. (1984). New *Tn10* derivatives for transposon mutagenesis and construction of *lacZ* operon fusions by transposition. *Gene* **32**: 369–379.

Winans, S. C., E. J. Stephen, J. H. Krueger, and G. C. Walker. (1985). Site-directed insertion and deletion mutagenesis with cloned fragments in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **161**: 1219–1221.

Yamada, H., S. Muramatsu, T. Mizuno. (1990). An *Escherichia coli* protein that preferentially binds to sharply curved DNA. *J. Biochem. (Tokyo)*. **108**: 420–425.

Yorgey, P., J. Davagnino, and R. Kolter. (1993). The maturation pathway of microcin B17, a peptide inhibitor of DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* **9**: 897–905.

Yoshida, T., C. Ueguchi, H. Yamada, and T. Mizuno. (1993). Function of the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS: molecular analysis of a subset of proteins whose expression is enhanced in a *hns* deletion mutant. *Mol. Gen. Genet.* **237**: 113–122.