Universidad de Granada
Facultad de Ciencias

Dapartamento de Microbiología

Estudio de los determinantes genéticos de un antibiótico y una bacteriocina producidos por *Enterococcus faecalis*

TESIS DOCTORAL

Biblioteca Universitaria de Granada
01534018

Manuel Martínez Bueno

Granada, 1990

T
14
34

F A C U L T A D D E C I E N C I A S

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIOS DE LOS DETERMINANTES GENETICOS DE UN ANTIBIOTICO Y UNA BACTERIOCINA PRODUCIDOS POR *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Manuel Martínez Bueno

UNIVERSIDAD DE GRANADA
15 NOV. 1990

U N I V E R S I D A D D E G R A N A D A

1990

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento b19661064
Nº Copia 12208657

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 13 DIC. 1990
ENTRADA NUM. 2124

ESTUDIOS DE LOS DETERMINANTES GENETICOS DE UN ANTIBIOTICO Y UNA BACTERIOCINA PRODUCIDOS POR *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas por el Licenciado D. Manuel Martínez Bueno, dirigida por las Dras. M.D. Eva Valdivia Martínez y Mercedes Maqueda Abreu

Directoras:

Dra. Eva Valdivia Martínez

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS

Dra. Mercedes Maqueda Abreu

Fdo. Manuel Martínez Bueno
Aspirante al grado de Doctor en Ciencias

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada durante los años 1986 a 1990.

La realización del trabajo experimental ha sido sufragado en parte por una beca de Formación de Personal Investigador (Junta de Andalucía) y un Proyecto de Investigación concedido por el mismo organismo.

Parte de los resultados de esta Tesis han sido presentados en el el 19th Meeting FEBS (Roma, 1989) y 20th Meeting FEBS (Budapest, 1990), y publicados en J. Bacteriology vol. 172 (1990).

Pag.

INTRODUCCION 15

1. Anotaciónes taxonómicas sobre los Enterococos 16

2. Producción de antagonistas por microorganismos 19
   2.1. Situación actual de la investigación sobre el carácter inhibidor de *E. faecalis* S-48 22
   2.2. Sustancias antimicrobianas producidas por especies del género *Enterococcus -Streptococcus* 23
   2.3. Determinántes genéticos de antibióticos peptídicos y bacteriocinas 28
      2.3.1. Determinantes genéticos de la nisina.
      2.3.2. Determinantes genéticos del Pep-5 y otros antibióticos similares 30
   2.4. Determinantes genéticos que codifican bacteriocinas/hemolísinas en *E. faecalis* 35

3. Plásmidos y "elementos moviles" en enterococos 39
   3.1. Plásmidos conjugativos 40
      3.1.1 Plásmidos conjugativos de amplio rango de hospedador o promiscuos 41
      3.1.2. Plásmidos conjugativos de rango limitado de hospedador: el sistema de feromonas sexuales de *E. faecalis* 42
      3.1.2.1. Características de las feromonas ...45
      3.1.2.2. Modulación de la respuesta

Pag.

de la agregación 49
3.1.2.3. Características e identificación de la sustancia de unión 50

4. Primeras evidencias genéticas del control por plásmidos del carácter inhibidor del carácter inhibidor de *E. faecalis* S-48 52

OBJETO DEL TRABAJO 53

MATERIAL Y METODOS 56

1. Productos y reactivos empleados
1.1. Medios de cultivo 57
1.2. Electroforesis 57
1.3. Enzimas 57
1.4. Productos radiactivos 58
1.5. Antibióticos 58
1.6. De cromatografía 58
1.7. Otros productos 58

2. Microorganismos 58

3. Medios de cultivo y condiciones culturales 60
3.1. Medios empleados para el crecimiento y conservación de las estirpes bacterianas 60
3.2. Medios empleados en la producción de las sustancias antagonistas AS-48 y Bc-48 62
3.3. Condiciones culturales 62

4. Curvas de crecimiento y producción de sustancias antibacterianas 62

5. Ensayo de la actividad antibacteriana 63
   5.1. Detección en medio sólido: técnica de la doble capa 63
   5.2. Detección en medio líquido: técnica de los pocillos 64

6. Métodos de aislamiento de ADN plasmídico 65
   6.1. Aislamiento rápido a partir de pequeños volúmenes de cultivo: minipreparaciones 65
      6.1.1. Minipreparación de plásmidos de *E. faecalis* 65
      6.1.2. Minipreparación de plásmidos de *E. coli*.....66
   6.2. Aislamiento en gran escala 67
      6.2.1. Extracción del ADN de los cultivos ...67
      6.2.2. Purificación de los plásmidos en gradiente de Cloruro de Cesio (Maniatis, 1982) 68

7. Determinación de la concentración de ADN 69

8. Separación e identificación de plásmidos o fragmentos de ADN por electroforesis en gel de agarosa 70

9. Estimación del tamaño de los plásmidos y fragmentos de restricción por electrofo-resis en gel de agarosa 71

10. Recuperación de ADN tras una electroforesis en gel de agarosa 71
10.1. Estracción de ADN a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión ...71
10.2. Purificación de ADN mediante DEAE celulosa 72
10.3. Métodos de GENCLEAN 73

11. Experimentos de conjugación 73
11.1. Transferencia del carácter AS-48^R 73
11.2. Transferencia del carácter Bc-48^R 75

12. Experimentos de transferencia génica por transformación 75
12.1. Obtención de protoplastos.....75
12.2. Transformación de protoplatos.....76
12.3. Regeneración de protoplastos y enriquecimiento sobre alginato 77

13. Determinación del mapa físico de los plásmidos con endonucleasas de restricción 78
13.1. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción 78

14. Transferencia de ADN a filtros de nitrocelulosa (Southerm blotting) 79

15. Preparación de sondas de ADN para hibridación 81
15.1. Marcaje de ADN con Dig-11-dUTP 81
15.2. Marcaje radiactivo del ADN 82
15.3. Purificación de ADN por cromatografía en columna 83

16. Técnica de hibridación ADN-ADN 84
16.1. Hibridación son sonda no radiactiva 84
16.2. Hibridación con sonda radiactiva 85

17. Secuenciación aminoacídica de AS-48 86
17.1. Digestión de AS-48 con proteasas y purificación de los fragmentos originados 86
17.1.1. Digestión con carboxipeptidasa 86
17.1.2. Digestión con endopeptidasa V_8 de *S. aureus* 87
17.1.3. Digestión con tripsina 87
17.2. Purificación de los péptidos originados por digestión proteolítica del antibiótico AS-48 87
17.3. Secuenciación parcial del antibiótico peptídico AS-48 88

18. Preparación de muestras para microscopía electronica de barrido 88

19. Técnicas inmunológicas 89
19.1. Inmunización de conejos 89
19.2. Purificación de la Ig G del suero inmune 89
19.3. Titulació de anticuerpos por el método ELISA 90
19.4. Transferencia de AS-48 a un soporte de nitrocelulosa 92

RESULTADOS 94

(I) ESTUDIOS SOBRE PLASMIDOS DE *E. FAECALIS* SUBSP. *LIQUEFACIENS* S-48.....95

1. Perfil plasmídico de las estirpes de *Enterococcus* 95
1.1. Análisis del perfil plasmídico de estirpe S-48 de *E. faecalis* 95
1.2. Estudio del perfil de plásmidos de los mutantes AS-48$^-$ y Bc-48$^-$ derivados de la cepa silvestre de *E. faecalis* S-48 99
1.3. Selección de nuevos mutantes y análisis de su perfil plasmídico 100

2. Otras propiedades codificadas por los plásmidos de *E. faecalis* S-48: respuesta de *E. faecalis* a feromonas 104

(II) ESTUDIO SOBRE LOS DETERMINANTES GENETICOS DE Bc-48

3. Transferencia por conjugación de la bacteriocina Bc-48 106
3.1. Caracterización de los transconjugantes Bc-48 108

4. Localización plasmídica de los genes Bc-48 en la estirpe silvestre S-48 113
4.1. Estudios de híbridos ADN-ADN 113
4.2. Transferencia de pMB1.1 a mutantes curados de Bc-48 115
4.2.1. Transformación de B-48-47 con el plásmido pIL 253 115
4.2.2. Retroconjugación de pMB1.1 a mutantes curados de Bc-48 115
4.3. Identificación del plásmido pMB1.1 de los retrotransconjugantes mediante homología con el plásmido pMB1 120

4.4. Producción en medio líquido de Bc-48 por los transconjugantes que albergan el plásmido pMB1.1 122

5. Análisis de restricción del plásmido pMB1.1 124

(III) ESTUDIO SOBRE LOS DETERMINANTES GENETICOS DE AS-48

6. Transferencia por conjugación del carácter de resistencia al antibiótico AS-48 127
6.1. Obtención de transconjugantes AS-48^R 129
6.2. Característica de los transconjugantes AS-48^R 129
6.3. Actividad inhibidora de los transconjugantes AS-48^R 131
6.3.1. Producción de AS-48 en medio sólido .131
6.3.2. Producción de AS-48 en medio líquido 134
6.3.3. Observación de los agregados celulares originados por el transconjugante AS-48^R mediante microscopía electrónica de barrido 137
6.3.4. Identificación de la actividad inhibidora producida por los transconjugantes con el antibiótico AS-48 140
6.3.4.1. Obtención, purificación y valoración de Ig G anti AS-48.....140
6.3.4.2. Comprobación de la identidad de AS-48 con la actividad inhibidora de los transconjugantes 143

7. Estudio del contenido plasmídico de los transconjugantes AS-48^R 146
7.1. Perfil plasmídico de los transconjugantes AS-48^R 146
7.2. Estudio del ADN plasmídico de los transconjugantes 147
7.2.1. Hibridación ADN-ADN.
7.2.2. Análisis de restricción 147

8. Transformación de *E. faecalis* OG1X con el plásmido pMB2 151

(IV) ESTRATEGIA PARA LA LOCALIZACION DEL SEGMENTO QUE CODIFICA EL ANTIBIOTICO AS-48 EN EL PLASMIDO pMB2.
9. Determinación parcial de la estructura primaria de AS-48 156

10. Análisis de restricción del plásmido pMB2 162

11. Mapeo de la región que codifica para el péptido AS-48 170

DISCUSION 179

CONCLUSIONES 210

BIBLIOGRAFIA 213

A mis padres

Me complace citar mi más sincero y especial agradecimiento a las Dras. Mercedes Maqueda y Eva Valdivia, directoras de esta Tesis Doctoral, con quienes he tenido la suerte de poder trabajar y cuya formación científica asi como el interés y ayuda prestada en todo momento, han constituido para mi un continuado estímulo, influyendo de manera notable en mi formación.

Quiero dejar constancia del importante papel que ha desarrollado en la elaboración de esta Tesis, mi compañero de laboratoria Antonio Gálvez, por su sincera amistad, capacitación profesional y continuos consejos han significado para mi una ayuda insustituible.

A Esther por su amistad en todos los momentos de trabajo y mis compañeras Alicia e Isabel por su agradable y simpática compañía.

Al Dr. Giménez-Gallego, por su inestimable ayuda en la secuenciación de AS-48.

Por último, a todos mis compañeros y amigos del Dpto. de Microbiología que facilitaron mi rápida integración en un agradable clima de trabajo.

Abreviaturas usadas en este trabajo

BrEt: Bromuro de etidio
BHI: medio infusión cerebro corazón
EDTA: Acido etilendiamido tetraacético
ELISA: Enzyme Linked Immusorbent Assay
Ig: Inmunoglobulina
Kb: kilobase
PEG: polietilenglicol
SDS: lauril sulfato sódico
SSC: tampón citrato sódico-cloruro sódico
THB: medio Tood Hewitt
Tris: Tris (hidroximetil-aminoetano)
TE: tampón Tris-EDTA (10 mM-1 mM)
TAE: tampón tris-ácido acético-EDTA
TBE: tampón tris-ácido bórico-EDTA
UA: unidad arbitraria de actividad antibacteriana
u.f.c.: unidad formadora de colonia

INTRODUCCION

UNIVERSIDAD DE GRANADA
15 NOV. 1993
COMISION DE DOCTORADO

[illegible] de los casos crecen entre [illegible] concentraciones de 6,5 % de ClNa, crecen a [illegible] sobreviven durante 30 min a 60 °C.

[illegible] clasificación de Sherman, también se relacio

1. ANOTACIONES TAXONOMICAS SOBRE LOS ENTEROCOCOS.

El término "enterococo" fue utilizado por primera vez en 1899 por Thiercelin, para referirse a un diplococo gram-positivo encontrado en el intestino humano. En el mismo año, MacCallun y Hastings, describieron un caso de endocarditis atribuido a un microorganismo que ellos llamaron *Micrococcus zymogenes*, y que posteriormente se identificó como un enterococo hemolítico (Sherman, 1937).

El nombre de *Streptococcus faecalis*, lo acuñaron Andrewes y Horder en 1906, para designar a un microorganismo aislado de un paciente con endocarditis, ya que al ser este estreptococo componente habitual de la flora del intestino humano, consideraron este nombre específico el más apropiado para él.

Desde entonces, se han mantenido diferentes opiniones sobre la nomenclatura de esta bacteria que han estado relacionadas con la polémica en torno a la clasificación del género *Streptococcus*. Así, Sherman en 1937 propuso una clasificación esquemática, que estructuraba a los estreptococos en 4 grupos: piógenos, viridans, lácticos y

enterococos. El último término, hace referencia a organismos que en la mayoría de los casos crecen entre 10-45 °C, resisten concentraciones de 6,5 % de ClNa, crecen a pH 9,6, y que además sobreviven durante 30 min a 60 °C.

La clasificación de Sherman, también se relaciona con los grupos de Lancefield, basada en la presencia de un antígeno de pared, la sustancia C. En este sistema, el enterococo reacciona con el antisuero del grupo D, mientras que los estreptococos piogenes reaccionan con los antisueros de los grupos A, B, C, E, F, ó G, los estreptococos viridans no eran agrupables, y los estreptococos lácticos son aglutinables por los sueros anti N. Desde entonces, hasta comienzos de los 80, estos microrganismos han sido designados como enterococos, término que engloba a las especies de *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. avium*, *S. gallinarum* y algunas otras menos aceptadas.

Los estudios de hibridación ADN-ARN y ADN-ADN, realizados en los últimos años por Farrow *et al.*, (1983), y posteriormente por Schleifer y Kilpper-Bälz en 1984, han puesto de manifiesto que estas especies poseen diferencias lo suficientemente significativas como para constituir un nuevo género, al que se ha designado como *Enterococcus*, para diferenciarlo de otros microorganismos pertenecientes al género *Streptococcus*. A su vez, los estreptococos lácticos, han pasado a constituir el género *Lactococcus*.

Dentro del género *Enterococcus*, se incluyen entre otras las especies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. gallinarum* y *E. hirae*.

Los enterococos se consideran microorganismos comensales relativamente inofensivos, integrantes de la

flora intestinal del hombre y otros animales, que a pesar de su ubicuidad en la naturaleza, han sido escasamente referidos como los principales causantes de infecciones serias. En general esto es exacto, puesto que los enterococos no poseen los factores de virulencia presentes en otras especies de *Streptococcus*; sin embargo, poseen otros características que los capacitan para sobrevivir en ambientes hostiles y causar infecciones importantes en individuos debilitados, comportándose como patógenos oportunistas. A este respecto, el más frecuentemente aislado ha sido *E. faecalis*, encontrado sobre todo en infecciones de vías urinarias y endocarditis.

Otra particularidad encontrada en los enterococos con bastante frecuencia, es la producción de proteínas citolíticas, las hemolisinas, que lisan eritrocitos de sangre de humanos, conejos y caballos (Clewell, 1981; LeBlanc *et al.*, 1983). La actividad hemolítica, quizás contribuya a la virulencia de las razas que la poseen (Ike *et al.*, 1984).

Finalmente otro grupo de proteínas citotóxicas producidas por estas bacterias, son las bacteriocinas y sustancias tipo bacteriocina (Gálvez *et al.*, 1985). Entre ellas cabe destacar el antibiótico peptídico AS-48, que posee características intermedias entre los antibióticos típicos y las bacteriocinas, dado su bajo peso molecular y su amplio espectro de acción que afecta a estirpes Gram-positivas y Gram-negativas (Gálvez *et al.*, 1986, 1989a, b, c, d).

Estos microorganismos, son intrinsecamente resistentes a un número de agentes antimicrobianos, incluyendo antibióticos β-lactámicos (y otros agentes que inhiben la

síntesis de la pared bacteriana), las polimixinas y lincosamidas (Murray, 1990; Moellering, 1990).

Estos 3 factores son, probablemente junto con las características metabólicas de resistencia frente a condiciones adversas propias del microorganismo, los que tienen mayor importancia a la hora de colonizar un determinado hábitat. A ellos, habría que añadir el hecho que los enterococos, a semejanza de otras bacterias, poseen una gran variedad de elementos que facilitan el movimiento de información genética intra e intercelular, y que están representados por plásmidos (codificantes de hemolisinas, bacteriocinas y resistencia a antibióticos) y transposones. La localización intestinal de estas bacterias y la abundancia en ellas de elementos genéticos extracromosómicos, podría asignarle un papel de reservorio de información genética que estaría disponible para otras bacterias Gram-positivas intestinales, e incluso para algunas bacterias Gram-negativas. El aumento de las infecciones enterocócicas en los últimos años, junto con los problemas derivados de la aparición, cada vez más frecuente de resistencias a antibióticos, producción de hemolisinas-bacteriocinas, acentúan la importancia de realizar investigaciones dirigidas a elucidar los factores relacionados con la colonización y supervivencia de estas bacterias.

2. PRODUCCION DE ANTAGONISTAS POR MICROORGANISMOS.

La capacidad antagonista de un microorganismo, es de indudable importancia a la hora de colonizar un determinado habitat.

A este respecto, habría que diferenciar entre 2 tipos de sustancias encontradas: I) aquellas inespecíficas derivadas del metabolismo normal de la célula, tales como ácidos, peróxido de hidrógeno, iones amonio, etc. y, II) aquellas específicas como los antibióticos, bacteriocinas y microcinas. En general, la producción de sustancias tóxicas por parte de algunos integrantes de las comunidades microbianas, es un hecho ampliamente extendido. A pesar de elloo, su papel e incidencia en la composición de la micloflora del ecosistema no es bien conocida.

Hay varios argumentos en contra de que se le atribuya a la antibiosis un papel importante a la hora de regular la composición de las comunidades microbianas:

-No hay evidencias de que la capacidad para producir antagonistas específicos, favorezca la supervivencia de las razas productoras, ya que éstas no son más frecuentes que las no productoras.

- No se ha demostrado que exista relación entre las especies predominantes en un determinado hábitat y su sensibilidad o resistencia a los antagonistas que puedan producirse en él. Distinta es, sin embargo, la situación de ciertas poblaciones microbianas sometidas a una presión alogénica por antibióticos. Tal es el caso de la selección de bacterias intestinales resistentes en individuos sometidos a terapia antibiótica.

- La rapida desaparición, en ecosistemas tales como el suelo, de microorganismos ajenos a él no parece asociada con el contenido en antagonistas específicos efectivos frente al invasor.

- No está claro si estas sustancias tóxicas se producen en el hábitat natural, pues a menudo los requerimientos necesarios para su síntesis y producción no se dan en el mismo. Además, es frecuente su inactivación por adsorción, reacción química o inactivación enzimática.

Cabe hacer aquí una clara distinción entre los antibióticos en el sentido clásico y el mas reciente grupo de antagonistas bacterianos descritos, las bacteriocinas. Si bien los primeros son producto del metabolismo secundario de la célula, cuya síntesis se dispara cuando se detienen las rutas biosintéticas principales, las segundas son proteínas no estructurales, de síntesis ribosómica, cuya producción va casi siempre paralela al crecimiento celular. Es, en este sentido, mas difícil cosiderarlas como errores metabólicos tal cual se ha querido interpretar a los primeros.

Dentro de las sustancias antibacterianas que actúan de un modo más específico, y fundamentalmente sobre cepas o especies afines susceptibles de ocupar el mismo nicho ecológico, nos encontramos a las bacteriocinas y sustancias "tipo bacteriocinas". Estos inhibidores son agentes antibacterianos con un espectro de acción más ó menos reducido a especies filogenéticamente próximas a las productoras. Su estructura es básicamente proteínica o peptídica, de Pm variado, siendo a veces su síntesis inducible por agentes que dañan el ADN (mitomicina C, luz UV, etc.), y tanto su producción como la inmunidad frente a si mismas está frecuentemente determinada por plásmidos (Konisky, 1978). Se ha descrito un gran número de bacteriocinas producidas por una amplia gama de bacterias tanto gram-positivas como Gram-negativas, siendo las mejor conocidas las pertenecientes al grupo de las colicinas (Hardy, 1975), término aplicado para designar a las

bacteriocinas producidas por Enterobacterias.

Por lo que respecta a su mecanismo de acción, es muy variado, incluyendo como blancos la membrana, la síntesis de proteínas, ADN, ARN, pero todas presentan un común mecanismo de acción en 2 etapas: 1) fijación a un receptor específico que se encuentra en las estructuras externas bacterianas, y 2) paso hacia el interior celular y actuación sobre el blanco correspondiente (KonisKy, 1982; Tagg et al., 1976; Pugsley 1984a,b).

2.1. Situación actual de la investigación sobre el carácter inhibidor de *E. faecalis* S-48.

En un estudio previo, Gálvez *et al.*, (1985), analizaron la producción de bacteriocinas en 90 estirpes de enterococos procedentes de muestras clínicas, la mayoría de ellos aislados de infecciones urinarias, exudados de heridas, esputo, exudados vaginales y sangre, asi como muestras de heces y meconio; y encontraron un 36 % de estirpes productoras, que fueron clasificadas en cuatro grupos en base a su espectro de antagonismo cruzado. Estos grupos mostraron por otra parte una gran heterogeneidad en su sensibilidad al calor, cloroformo y la pronasa, asi como su difusión a través de membranas de diálisis. Con la excepción de una estirpe, en todos los casos se detectó autoinmunidad.

De entre ellas, destacaba la estirpe de *E. faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48, productoras de un inhibidor de amplio espectro, denominado AS-48, y de la bacteriocina Bc-48.

El péptido AS-48 destaca por su capacidad de inhibir de un modo general a bacterias Gram-positivas y también a diversas especies Gram-negativas (*Escherichia, Klebsiella,*

Pseudomonas, Salmonella) (Gálvez *et al.*, 1986). Este antibiótico es un péptido de peso molecular 7400 daltons, básico (pI 10,5) y con un alto contenido en aminoácidos Ala, Gly y Lis. Su actividad es sensible al calor y al tratamiento con enzimas proteolíticos (*Gálvez et al.*, 1989a). AS-48, actúa inhibiendo rápidamente todos los procesos metabólicos ligados a la membrana citoplasmática: transporte de precursores, respiración, y regulación del contenido de iones de la célula, tanto en *E. faecalis* como *E. coli* (Gálvez *et al.*, 1989 b,c). Recientemente además, Galvez *et al.*, (manuscrito enviado a publicación a J. Bacteriol), han puesto de manifiesto el efecto "in vitro" de AS-48 sobre membranas bacterianas y membranas artificiales, que en cualquier caso origina la formación de canales, con un diámetro estimado entre 0,7 y 1 nm, que permiten el paso de solutos de bajo peso molecular, tales como aminoácidos e iones.

La bacteriocina Bc-48, producida por la misma especie, presenta un tamaño mucho mayor (75,400) y es muy sensible al calor y a las proteasas. Su espectro de acción es muy restringido, afectando sólo a estirpes de enterococos relacionadas. Su acción antibacteriana se debe 1) a una inhibición de la síntesis de proteínas de células sensibles y 2) a la inducción de la lisis celular (I. López-Lara, 1990, enviado a Can. J. Microbiol.)

2.2. Sustancias antimicrobianas producidas por especies del género *Enterococcus-Streptococcus*

La producción de sustancias con actividad inhibidora por parte de *Streptococcus* ha sido extensamente documentada. Desde que Sherwood *et al.* (1949) describieran la producción de varios tipos de sustancias antibacterianas a las que

denominaron estreptostasinas. Se ha demostrado su existencia en prácticamente todos los grupos de Lancefield establecidos para la clasificación de este amplio género, según se recoge en la tabla 1.

TABLA 1. Producción de bacterionas y sustancias tipo bacteriocinas por estreptococos y enterococos.

Sustancia o bacteria productora	Pm	Modo y espectro de acción	Plásmidos responsable	Referencia
GRUPO A				
Esteptostasinas	ND	ER		1
Estreptococina A	8.000	G+		2
DS-1912-65, S23g y S716	200	EA		3
Estreptococina (M-57)	133.000	ER		4
P-777 (varios tipos)	ND	EA,G+		5
GRUPO B				
S. agalactiae	10.000	ER,G+		6

TABLA 1 (*Continuación*)

Estreptocina B	variado	G+		7
GRUPO D				
E. faecalis E1 (enterococina)	10.000	ER		8
E. faecalis E1B	$4x10^6$	ER		9
E. zymogenes X14	ND	G+		10
E. zymogenes JH1	ND	H,G+	pJHI (57Kb)	11
E. faecalis AD1	38.000	H,G+	pAD1 (59,6 Kb)	12
E. faecalis	ND	EA,G+		13
E. faecium Sf3 (enterococina)	9.000	ER, G+	Sfp2,4 y Sfp4,7 (2,4 y 4,7 Kb)	14
E. faecium 25 (enterococina)	ND	ER, G+		15
E. faecalis (90 estires)	variado	ER		16
E. faecalis S-48 antibiótico AS-48	7.500	AE	pMB2 (68 Kb)	17
bacteriocina Bc-48	75.400	ER	pMB1 (90 Kb)	18

TABLA 1. *(Continuación)*

GRUPO N (lácticos)				
S. cremoris nisina	7.000	EA, G+	variados (25-60 Kb)	19
S. cremoris diplococina	5.300	ER		20
Lactostrepsinas	variado	ER		21
L. lactis WM4	ND	ER	pWM4 (120 Kb)	22
L. lactis 9B4 (2 bacteriocinas)	ND	ER	p9B4-6 (60 Kb)	23
GRUPO VIRIDANS				
S. sanguis STH1 (estreptocina STH1)	110.000	G+		24
S. mutans (130 cepas)	variado	ER		25
S. mitis 42885	ND	AE, G+		26
S. salivarius anocina	ND	ER		27
S. salivarius P (estreptoc. Sal-P)	8.000	G+		28

TABLA 1 (*Continucación*)

Bacteriocina C3603	4.800	G+	29
mutacina Rm-10	973.000	G+	30
Mutacina B	3.500	G+	31
Mutacina MT3791	ND	G+	32
Mutalipocinas	1.000	ER	33

[1]Serwood et al. (1949); [2]Tagg et al., (1973); [3]Wolf & Duncan (1974); [4]Simpson et al (1983); [5]Hynes & Tagg (1985); [6]Kramer & Brandis (1972); [7]Tagg et al (1975); [8]Brandis et al (1965); [9]Tagg (1981); [10]Brock & Davie (1963); [11]Jacobs (1974), [12]Granato & Jackson (1971b); [13]Harasawa et al (1980); [14] Kramer et al (1983); [15]Reichelt et al (1984); [16] Gálvez et al (1985); [17]Gálvez & Richardson (1986); [18]López-Lara (1988); [19]Mattick et al (1944); [20]Davey et al (1981); [21]Dobzansky et al (1982); [22]Scherwitz et al (1983); [23]Neve et al (1984); [24]Schlegel & Slade (1972); [25]Hameda & Ooshima (1975); [26]Dajani et al (1976); [27]Sanders & Sanders (1978); [28]Tagg et al (1981); [29]Ikeda et al (1982); [30]Fukushima et al (1982); [31]Delisle (1986); [32]Hamada et al (1986); [33]Kurita et al (1988).

TABLA 1 (*Continuación*)

ND: no determinado
ER: espectro de acción restrigido, sólo afecta a cepas relacionadas.
G+: afecta a distintos géneros de bacterias Grampositivas.
EA: amplio espectro
H: hemolisina

2.3. Determinantes genéticos de bacteriocinas y péptidos antibióticos.

En general, los genes responsables de la síntesis y resistencia de bacteriocinas y antibióticos en estreptococos estan relativamente poco conocidos, a diferencia de otras bacteriocinas como las colicinas y microcinas, algunas de las cuales estan perfectamente caracterizadas. Quizás la particularidad común a todas ellas, es que los genes responsables para su producción e inmunidad, están ligados a ADN plasmídico.

Estos elementos extracromosómicos pueden ser eliminados de la bacteria portadora mediante experimentos de curación de plásmidos, resultando la pérdida del carácter productor y de la inmunidad, lo que sugiere el origen plasmídico de ambos fenotipos. Una segunda evidencia de tipo fisiológico, es la transmisión del carácter desde una estirpe donadora a otra receptora, asociada con la adquisición de un nuevo plásmido por esta última.

Los genes de producción de bacteriocina y antibióticos peptídicos de síntesis ribosómica, constituyen un sistema complejo que en la mayoría de los casos forman un sólo

operón, y se transcriben de forma simultánea. Si bien en la mayoría de las bacteriocinas descritas no se han llevado a cabo estudios en profundidad a este respecto, se se ha hecho en el caso de las colicinas y de algunas microcinas. A grandes rasgos, el esquema de organización de estos genes se basa en la existencia de al menos un promotor y de varios sitios de iniciación de la transcripción (*ori T*), que dan lugar a diversos productos génicos, entre los que hay que destacar: la propia bacteriocina, la proteína de la inmunidad, la proteína de transporte (o péptido señal en su caso), así como proteínas modificadoras y de regulación. A veces el producto génico de la proteína no coincide con la molécula liberada al medio, existiendo etapas de modificación de este precursor (Pugsley 1984a,b; Kaleta & Entian, 1989).

La primera evidencia de que genes que controlan la producción e inmunidad de bacteriocinas en enterococos, estaban localizados en plásmidos, se debe a los trabajos de Jacob et al (1974, 1975), quienes asociaron al plásmido pJH2 (38 MDa) el caracter bacteriocinogénico de la cepa S. faecalis var zymogenes, mediante experimentos de curación y transferencia plasmídica. Diversos autores describieron posteriormente que la curación del carácter antagonista en *E. faecalis* estaba asociado siempre con la pérdida de un determinado plásmido (Oliver et al., 1977; Siegrist et al., 1987). En este sentido, practicamente todas las bacteriocinas descritas en la tabla 1 en las cuales se han estudiado los determinantes genéticos responsables de la producción de bacteriocinas y antibióticos, se han relacionado con ADN extracromosómico, que en la mayoría de los casos resulta ser un plásmido conjugativo.

No obstante, de entre todos los antagonistas producidos

por estreptococos y organismos relacionados, un nuevo grupo de inhibidores ha polarizado recientemente la atención de diversos investigadores, y es el constituido por ciertos péptidos básicos producidos por una gama heterogénea de células procariotas e incluso eucariotas, con características comparables con el péptido AS-48 (bajo Pm, punto isoelectrico básico, amplio espectro de acción, síntesis ribosómica y presumiblemente de origen extracromosómico), entre los que cabe destacar el antibiótico nisina, la gallidermina (Kellner et al., 1988), epidermina (Allgaier, 1986), pep-5, subtilisina (Gross & Kiltz, 1973). Estos péptidos, además de las características antes mencionadas, presentan una particularidad y es el contenido en azufre y aminoácidos raros tales como la lantionina y ß-metil-lantionina, por lo que comunmente se les ha venido asignando el término de lantibióticos (Schnell et al., 1988).

La presencia de estos aminoácidos raros, en principio hizo presumir la existencia de una modificación enzimática post-traduccional que generaría el antibiótico maduro. En este sentido, reaccones entre residuos de serina y cisteína o treonina y cisteínas fueron propuestas por Ingram (1970).

2.3.1. Determinantes genéticos de la nisina.

La nisina es un antibiótico polipeptídico producido por distintas cepas de estreptococos del grupo láctico (Hurst, 1966), y de peso molecular variando desde 3.500-7.500 daltons (Hurst, 1981), ya que en realidad es un mezcla de diversos péptidos, y dependiendo de una cepa u otra predomina uno de estos péptidos. La nisina presenta actividad sobre células vegetativas de algunas bacterias

Gram-positivas (*Listeria, Clostridium, Streptococcus, Staphylococcus, Bacillus, Corynebacterium,...*) y las esporas son extremadamente sensibles. Carece de interés médico, pero no obstante tiene un amplio campo de aplicación en las conservas alimenticias (Hurst, 1981; 1983).

Los determinantes genéticos para la producción de nisina, forma un bloque que puede curarse y transmitirse por conjugación, y que también codifica resistencia al antibiótico y los genes necesarios para la metabolización de la sacarosa (Gasson, 1984; Steele & McKay, 1986). Estas propiedades normalmente estan codificadas por un plásmido transferible por conjugación (KozaK et al., 1974; Fuchs et al., 1975; LeBlanc et al., 1980; McKay & Baldwin, 1984; Klaenhammer & Sanozky, 1985; González & Kunka, 1985). Tsai & Sandine (1987), demostraron la transferencia por conjugación de los determinantes de la nisina de *L. lactis* a *Leuconostoc dextericum*, relacionándose con la adquisición de un plásmido de 28 Kb. Froseth et al (1988) y von Wright et al (1990), clonaron un fragmento *Eco* RI de 7,6 Kb procedente del plásmido pNP40 de *L. lactis* DRC3, en el cual se encontraba los determinantes genéticos de la resistencia a la nisina.

Sin embargo, la adquisición de plásmidos que determinan o codifican para la nisina por transformación, aún no ha podido demostrarse. En este sentido, algunos trabajos han sugerido además de una localización plasmídica de los determinantes genéticos, un posible origen cromosómico de los mismos (Fuchs et al., 1975; Davey & Pearce, 1982).

El aislamiento del gen que codifica par la nisina, ha demostrado que este antibiótico se sintetiza ribosómicamente en forma de prepéptido y posteriormente sufre un proceso

post-traduccional (Kaleta & Entian, 1989). Concretamente se aisló un fragmento *Hind* III de 4,3 Kb, que fue clonado y secuenciado posteiormente. De esta forma se caracterizó el gen estructural de la nisina (*nis A*). Este prepeptido ó prenisina, consta de 57 aminoácidos, de los cuales 24 se situan en la zona C-terminal del antibiótico maduro. Concretamente, en este extremo C-terminanal se identifico una secuencia de Prolina-Arginina-Isoleucina (Pro^{-2}-Arg^{-1}-Ile^{+1}), que es una estructura típica que es reconizada por determinados enzimas proteolíticos, y sería en este lugar donde se eliminaría el resto de pro-nisina, para rendir el antibiótico maduro (Kaleta & Entian, 1989).

Por otra parte esta secuencia aminoacídica deducida de la secuencia nucleotídica era totalmente identica a la estructura formulada previamete por Gross & Morell (1971).

Paralelamente a estos trabajos, Buchman *et al.* (1988), aislaron el gen estructural de la nisina (*nis A*) a partir de ADN genómico, sin embargo la secuencia del mismo era similar a las obtenidas por Kaleta & Entian (1989) con el gen *nis* A aislado a partir de ADN plasmídico. Esta divergencia en los resultados se ha interpretado mas que en una diferencia sobre el origen cromosómico o plasmídico de *nis A*, como una diferencia debida a los métodos usados en la extracción y purificación del ADN (Kaleta & Entian, 1989).

2.3.2. Determinantes genéticos del Pep-5 y otros antibióticos similares

El Pep-5 es un antibiótico peptídico producido por un aislado clínico de *Staphylococcus epidermis* 5 (Sahl &

Brandis, 1981). Posee una potente actividad bactericida sobre bacterias Gram-positivas basada en la despolarización de la membrana citoplasmática de bacterias energetizadas (Sahl & Brandis, 1983; Sahl, 1985). Este modo de acción ha sido establecido para otros péptidos similares: nisina, subtilisina, AS-48, etc. La producción e inmunidad del Pep-5 se ha asociado sobre un plásmido (pED503) de 18,6 Kb (Ersfeld-DreBen *et al.*, 1984; Kaletta *et al.*, 1989).

El aislamiento del gen que codifica para el Pep-5 (Kaletta *et al.*, 1989), ha demostrado que este antibiótico al igual que los de su grupo como por ejemplo la gallidermina, epidermina y nisina, se sintetiza ribosómicamente en forma de prepéptido de 60 residuos, que posteriormente sufre un proceso de maduración y rotura proteolítica hasta originar el antibiótico maduro de 33 aminoácidos (Fig. 1) (Kaletta *et al.*, 1989).

En el caso de la gallidermina, es un antibiótico producido por la cepa Tü3928 de *S. gallinarum*, que presenta actividad frente a especies de Propionibacterias. Pertenece también al grupo de los lantibióticos, y presenta un mecanismo de acción similar a la nisina, Pep-5 y AS-48 (Kellner *et al.*, 1988). Sin embargo, a diferencia de los otros péptidos, la gallidermina esta determinado cromosómicamente (Schell *et al.*, 1989). Estos autores, aislaron el gen *gdmA* que codifica dicho antibiótico en las siguientes etapas: 1) dirigiendo la síntesis de un prepeptido de 52 aminoácidos, 2) que pierde una secuecia señal (propeptido) hasta finalmente originar el antibiótico maduro.

Relacionado con la gallidermina, se ha descrito un

antibiótico similar: la epidermina (Hörner *et al.*, 1989). También es producido por una raza de *Staphylococcus epidermis* que transporta el plásmido pEpi32 (54 Kb) (Schnell, et al., 1988). La secuencia nucleotídica de este antibiótico (*epiA*), muestra que al igual que los casos anteriores, se sintetiza en forma de un prepeptido que tras un proceso de proteolísis y maduración, origina el antibiótico maduro.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
15 NOV. 1999
COMISIÓN DEL DOCTORADO

2.4. Determinantes genéticos que codifican bacteriocinas-hemolisinas en *E. faecalis*

La producción de hemolisinas es común entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas; aunque en la mayoría de los casos su papel en la virulencia no está claro. *Enterococcus faecalis*, miembro normal de la flora intestinal es, con cierta frecuencia, el agente causante de infecciones en el tracto urinario y además está relacionado con infecciones tales como endocarditis. La subespecie *zymogenes* se distingue de las otras,*faecalis* y *liquefaciens* por la producción de una citotoxina capaz de lisar eritrocitos humanos, de conejos y de caballos. Las cepas ß-hemolíticas, en muchos casos también llevan asociadas actividades antagonistas tipo bacteriocina, y se cree que estas hemolisinas-bacteriocinas, están codificadas por el mismo determinante genético (Bassinger & Jackson, 1968; Brock & Davie, 1963; Clewell, 1981; Granato & Jackson, 1969).

En un reciente estudio realizado en Japón, se encontró que aproximadamente el 60 % de las razas de *E. faecalis* asociadas con infecciones parenterales eran hemolíticas, en contraste al 17 % de las de procedencia fecal (Ike *et al.*, 1987). La actividad hemolítica en estos casos parece contribuir a la virulencia (Granato & Jackson, 1971).

En *E. faecalis*, el fenotipo hemolisina/bacteriocina, reside usualmente en un plásmido (Ike & Clewell, 1987). Las células que transportan estos plásmidos generalmente responden además a una de las feromonas sexuales producidas por la raza JH2-2, de forma que las primeras sintetizan en respuesta a las segundas, las adhesinas o proteínas de agregación. Ike & Clewell (1987), han realizado un estudio en este sentido, encontrando que la mayoría de las razas que

exhiben actividad hemolítica (85 %) responden positivamente a la acción de las feromonas producidas por la raza JH2-2 de *E. faecalis*. Asimismo de un total de 58 razas hemolíticas, 32 (55 %) transferían el caracter hemolítico a otras nuevas razas con alta frecuencia ($>10^{-3}$). Esta transferencia del carácter, iba además asociada con la adquisición de un nuevo plásmido por la célula receptora.

Por otra parte, de las 26 razas que no transferían el carácter en medio líquido, 17 respondían positivamente a la acción de las feromonas de la estirpe JH2-2, aunque sólo una de ellas era capaz de transferir el carácter mediante conjugación sobre superficies sólidas, con una frecuencia de 10^{-8} por donador (Yagi *et al.*, 1983).

Por lo que respecta a la estructura de estos plásmidos, se vió que aquellas estirpes que respondían a una misma feromona (cAD1), presentaban unos perfiles de restricción con *Eco* RI bastante semejantes al del plásmido pAD1 (Ike & Clewell, 1987), e incluso algunos de ellos totalmente similares, aún tratándose de plásmidos distintos. Estos resultados están apoyados por los de otros autores, habiéndose propuesto una estructura y organización molecular similar y/o relacionada para los plásmidos que responden a las mismas feromonas.

Los determinantes genéticos de hemolisinas más estudiados en *E. faecalis*, residen en los plásmidos pAD1, pAMg1, pJH2 y pOB1, todos ellos confieren respuesta a feromonas, y los estudios de hibridación realizados han demostrado que están estrechamente relacionados (LeBlanc *et al.*, 1983). De estos plásmidos, pAD1 y pAMg1 tienen perfiles iguales *Eco* RI a los de un conjunto de plásmidos que codifican hemolisinas/bacteriocinas, y codifican además una

respuesta al peptido cAD1 (Clewell & Weaver, 1989; Ike *et al.*, 1987).

El más estudiado de todos los plásmido hemolíticos de *E. faecalis*, es el pAD1. La organización genética y mecanismo de acción de la hemolisina que codifica, difieren de aquellos complejos hemolíticos descritos en otras bacterias Gram-positivas.

El sistema hemolisina/bacteriocina codificada por el plásmido pAD1, presenta 2 componentes: un factor activador (A) y otro lítico (L), de tal forma que cuando los mutantes defectivos en A, crecen sobre agar-sangre cerca de mutantes defectivos en L, se genera una zona de hemolisis en la zona del agar comprendida entre ambas estirpes. Las dos proteínas han sido purificadas y parcialmente caracterizadas (Granato & Jackson, 1971b) y presentan pesos moleculares de 27.000 y 11.000 daltons respectivamente.

El determinante hemolisina/bacteriocina (*hly/bac*) del pAD1, ha sido recientemente analizado por mutagénesis con transposones y clonación. Una región de aproximadamente 8,4 Kb de ADN, se ha encontrado que es necesario para la expresión de *hly/bac*. Se ha identificado una fase de lectura abierta (open reading frame) iniciado por un codón ATG (metionina), en una región hidrofóbica de 26 residuos, que actuaría como péptido señal de los componentes A y L (Gilmore *et al.*, 1987).

Se ha comprobado además que las proteínas A y L estan codificadas por genes separados por 1.090 pares de bases, transcribiéndose como unidades independientes, a diferencia de otras hemolisinas de bacterias Gram positivas que se transcriben como un ARNm policistrónico. Al componente A,

además se ha asociado con la inmunidad a la bacteriocina relacionada.

En la zona correspondiente al determinante *hly/bac* del pAD1, se ha identificado una "zona caliente" donde se insertan con una elevada frecuencia algunos transposones conjugativos de *E. faecalis* (Clewell & Gawron-BurKe, 1986). Estas inserciones en la "zona caliente", producen bien una hiperexpresión del carácter hem/bac ó bien una inactivación total del gen. En el caso de la hiperexpresión, la zona de hemolisis es 4 veces superior a la habitual, además se induce con la presencia de tetraciclina en el medio. Se ha considerado la posible existencia de un promotor extero que actuara sobre el transposon, aunque esto no ha podido ser comprobado (Clewell *et al.*, 1988).

3. PLASMIDOS Y "ELEMENTOS GENETICOS MOVILES" EN ENTEROCOCOS.

Las primeras referencias sobre ADN plasmídico en estreptococos son relativamente recientes. Concretamente, en 1972 Courvalin *et al.* describieron una ADN satélite en lisados de enterococos que eran resitentes a determinados antibióticos, y que no se detectaban en variantes sensibles a los mismos. Posteriormente, Dunny *et al* (1973) describieron y caracterizaron un miniplásmido críptico de *S. mutans*. Desde entonces, se han identificado en numerosas razas de estreptococos (Clewell, 1981), codificando principalmente resistencias a antibióticos, bacteriocinas, hemolisinas y respuesta a feromonas sexuales (Clewell, 1981).

En términos generales, los plásmidos son frecuentes en estreptococos, sin embargo se han encontrado más fácilmente en unas especies que en otras. Por ejemplo, en el caso de *E. faecalis* (Clewell, 1990) es más fácil encontrar razas que albergan entre 2-5 plásmidos que aislados bacterianos libres de losmismos. Por el contrario, es menos frecuente en cepas de *S. mutans* (Macrina *et al.*, 1977) y *S. pneumoniae* (Buu-hoi & Horodniceau, 1980; Smith & Guild, 1980). El rango de tamaño de los plásmidos varía desde unos pocos Md hasta no más de 76 Md (Clewell, 1981). El número de copias es usualmente alto (10-30 copias por cromosoma) para los plásmidos no superiores a 7 Md y generalmente 1-2 copias en el caso de plásmidos más grandes.

3.1. Plásmidos conjugativos.

Hasta el momento, se han descrito 2 sistemas de transferencia genética por conjugación en los enterococos:

1) La que ocurre sólo sobre superficies sólidas (por ejemplo, un filtro de membrana), y con una frecuencia usualmente menor de 10^{-3}. Los plásmidos implicados pueden compartir un amplio rango de hospedadores. Algunos de estos plásmidos (por ejemplo el pAMBß1) pueden transfererirse a células de especies e incluso géneros distintos. Así puede darse la transferencia desde *E. faecalis* a especies de *Streptococcus, Staphylococcus, Lactobacillus, Bacillus* (Brunton, 1984; Clewell, 1981; Clewell, 1986). La transferencia de este tipo de plásmidos depende del contacto forzado célula-célula, y es muy ineficaz en medio líquido. Estos plásmidos de "amplio rango de hospedador" o promiscuos, según algunos autores (Schaberg & Zervos, 1986), podrían ser los causantes de que estafilococos y enterococos compartan algunos determinates de resistencia a antibióticos (por ejemplo a la gentamicina, eritromicina y penicilina).

2) Aquella que ocurre en cultivos líquidos con una frecuencia relativamente alta, y está mediada por plásmidos que presentan un limitado rango de hospedador (Clewell *et al.*, 1987)

Ha sido demostrado por distintos investigadores que, los plásmidos que se transfieren en medio líquido, codifican una respuesta a feromonas sexuales producidas por las razas receptoras.

3.1.1. Plásmidos conjugativos de amplio rango de hospedador o promiscuos en *Enterococcus*.

Se han descrito en los últimos años, ciertos plásmidos de *Enterococcus* que presentan todos ellos una característica común: la capacidad de expresarse en distintos hospedadores. Principalmente codifican genes de resistencia a antibióticos, y no generan respuesta a feromonas sexuales. Además suelen transferirse con baja frecuencia.

El más estudiado ha sido el plásmido pAMß1, originalmente identificado en *E. faecalis* DS5 (Clewell *et al.*, 1974). Este plásmido con un Pm de 26 Kb, porta la resistencia al grupo de antibióticos MLS (macrólidos, lincosamida y estreptogramina B). El fenotipo MLS, está asociado normalmente con los determinates *Em*, y ha sido descrito con bastante frecuencia en cocos Grampositivos (Horaud *et al*, 1985; Weisblum, 1983).

La caracteristica principal de este plásmido es que puede transferirse, siempre sobre superficie sólida, a un gran número de especies de estreptococos (Gibson *et al.*, 1979; LeBlanc *et al.*, 1978), incluyendo *S. lactis* (Gasson & Davies, 1980), varias especies de *Lactobacillus* (Gibson *et al.*, 1979; Vescovo *et al.*, 1983; Shrago *et al.*, 1986), y varias especies de *Bacillus* (Lereclus *et al*, 1983; Orzech & Burke, 1984; Oultram & Young, 1985).

pAMß1, fue caracterizado inicialmente por LeBlanc & Lee (1984), quienes localizaron las posiciones del gen *erm*, la región relacionada con la transferencia, y la región de replicación. Además, pusieron de manifiesto que ciertas zonas tienden a deleccionarse específicamente, cuando el plásmido se introduce en *S. sanguis* (Macrina *et al*, 1980) ó

Bacillus subtilis (van der Lelie & Venema, 1987).

El determinante *Em*, ha sido secuenciado recientemente (Martin *et al.*, 1981), y expresado en *E. coli*, empleándose para la construcción de vectores bifuncionales *E. coli*-*Enterococcus* (pVA838, Macrina *et al.*, 1982 y 1983). Recientemente, Trieu-Cuot *et al.*, (1987, 1988), construyeron vectores plasmídicos utilizando componentes de los plásmidos pAMß1, pBR322 y RKZ, al objeto de que el plásmido quimérico resultante fuese capaz de transferirse desde *E. coli* a varias especies de bacterias Gram-positivas y desde *E. faecalis* a *E. coli*.

Otros plásmidos de *E. faecalis*, tales como pAM81 y pAM490 (Clewell *et al.*, 1985), también pueden transferirse y replicarse entre distintos organismos Gram-positivos, y probablemente presenten semejanza con otros plásmidos identificados en distintas especies de estreptococos (Horaud, 1985). Estos plásmidos, suelen tener un tamaño similar y usualmente determinan resistencia a eritromicina. Uno de tales plásmidos, el pIP501 (Horodniceau et al, 1976), originalmente descubierto en *S. agalactiae*, se transfiere fácilmente a enterococos y ha sido caracterizado completamente por distintos autores (Herhfield, 1979; Evans & Macrina, 1983; Behnke & Gilmore, 1981).

3.1.2. Plásmidos conjugativos de rango limitado de hospedador: el sistema de feromonas sexuales de *E. faecalis*

Estos plásmidos son responsables de una respuesta de agregación por parte de la célula donadora, inducida por las

feromonas sexuales excretadas al medio por las células receptoras.

Las feromonas sexuales (tambien llamadas CIA: "cumpling inductory agents") fueron descubiertas en *E. faecalis* por Dunny *et al.* (1978), y son de naturaleza oligopeptídica, con peso inferior a 1000 daltons.

Hasta el momento, parece ser un fenómeno exclusivo de estas bacterias, y podría ser considerado como un sistema especializado de transferencia plásmídica. El proceso está tan extendido en enterococos, que aproximadamente un tercio de los aislados clínicos de estas bacterias, dan una respuesta de agregación positiva cuando se exponen a filtrados de cultivos de razas que no poseen plásmidos (Dunny *et al.*, 1979; Ike *et al.*, 1987; Clewell, 1990).

El modelo propuesto para la inducción de esta respuesta por Ike & Clewell (1984), consta de dos etapas:

1) la célula receptora carente de plásmidos, excreta un péptido (feromona) que actúa como una señal y 2) la raza receptora portadora del adecuado plásmido, produce una sustancia de agregación en respuesta a esta señal. Si ambos tipos de células coexisten en un medio, el correspondiente plásmido se transferirá desde la célula donadora a la receptora por conjugación.

La respuesta requiere 30-40 min, y se caracteriza por la síntesis de una(s) sustancia(s) de naturaleza proteica por parte de las células donadoras (Yagi et al, 1983; Tortorello & Dunny, 1985; Ehrenfeld et al., 1986), que se distribuye sobre su superficie celular y facilita la formación de agregados al azar entre ellas y las receptoras.

Al nuevo material sintetizado, se le ha llamado "sustancia de agregación" (SU), y se cree que se une a un material existente en la célula receptora, designado como "sustancia de unión" (BS). La SU, también se detecta en la superficie de la célula donadora, de forma que se puede inducir la autoagregación con filtrados de cultivos procedentes de la receptora.

En ciertas cepas libres de plásmidos de *E. faecalis*, FA2-2 y OG1X, se ha referido la excreción de al menos 5 tipos de feromonas sexuales, diferentes y específicas para un plásmido conjugativo determinado (Clewell & Weaver, 1989). Una vez que la célula receptora adquiere una copia del plásmido, cesa bruscamente la síntesis de la feromona relacionada, pero continúan produciéndose otras feromonas específicas para otras células donadoras con distinto contenido plasmídico (Dunny *et al.*, 1979).

Asi por ejemplo, no es sorprendente, que algunas estirpes de enterococos, como *E. faecalis* DS5 y HH22, posean más de un plásmido y desarrollen varias respuestas positivas a distintas feromonas sexuales excretadas por una misma bacteria (Murray *et al.*, 1988). Ahora bien si la raza en cuestión es expuesta a una única feromona, sólo uno de los plásmidos, aquel que esté relacionado con ella, será el que se transferirá. Asi, Ehrenfeld *et al.* (1986), describieron 3 plásmidos en *E. faecalis* DS5, cada uno de los cuales daba una respuesta diferente a filtrados de la raza OG1X.

Los agregados celulares resultantes de la respuesta de la célula donadora a una feromona específica, requieren para su estabilización la presencia de cationes divalentes, tales como Mg^{++}, así como iones fosfato (Yagi et al., 1983). También la exposición de cultivos inducidos, a proteasas,

SDS (0,05 %) o calor (98 °C, 5 min), destruyen la capacidad de agregación de estas células (Yagi et al, 1983).

3.1.2.1.Características de las feromonas

En la tabla 2, se exponen las estructuras y algunas propiedades de 4 feromonas sexuales descritas hasta la fecha (cPD1, cAD1, cAM373 y cCF10), que han sido caracterizadas por Suzuki *et al* (1984). La nomenclatura de las mismas, hace referencia al plásmido sobre el que actúan, asi por ejemplo, la feromona específica del plásmido pAD1, se llamó cAD1.

En general, todas corresponden a hepta u octapéptidos muy hidrofóbicos, y cada una contiene un residuo hidroxiácido. Son generalmente producidas por una estirpe de *E. faecalis*, poseen una alta actividad muy específica, y son activas a concentraciones tan bajas como $5x10^{-11}$ M (Mori et al., 1984, 1986, 1987 y 1988).

TABLA 2. Estructura de alguna feromonas sexuales producidas por *E. faecalis*.

Feromona (Pm)	Estructura primaria	Referencia
cPD1 (912)	H-Phe-Leu-Val-Met-Phe-Leu-Ser-Gly-OH	(Suzuki, 1984)
cAD1 (818)	H-Leu-Phe-Ser-Leu-Val-Leu-Ala-Gly-OH	(Mori, 1984)
cAM373 (733)	H-Ala-Ile-Phe-Ile-Leu-Ala-Ser-OH	(Mori, 1986)
cCF10 (789)	H-Leu-Val-Thr-Leu-Val-Phe-Val-OH	(Mori, 1986)

3.1.2.2. Características de las proteínas de agregación

La inducción a la respuesta de las feromonas, conlleva la aparición de diversas proteínas de superficie de naturaleza antigénica inmunológica, con un tamaño que varía entre 52.000-190.000 daltons. En el caso del plásmido pAD1, estas proteínas se han denominado AD52, AD74, AD130, AD170 y AD190, siendo la predominante la proteína AD74. La nomenclatura hace referencia al plásmido que las codifica y a su peso molecular (Tortorello & Dunny, 1985; Ehrenfeld, 1986).

En el caso de pPD1, también la proteína predominante es

AD74. Una proteína similar aparece en el caso del plásmido pCF10 (Ehrenfeld *et al.*, 1986).

Estas proteínas de superficie que aparecen, bien cuando la célula donadora se expone a filtrados celulares de la estirpe receptora (en este caso se habla de inducción de la respuesta), o bien cuando la donadora se mezcla con la célula receptora (se habla entonces de conjugación), se pueden poner de manifiesto por distintas técnicas, ya sea de microscopía electrónica o bien inmunológicas mediante el empleo de anticuerpos dirigidas contra ellas. En este sentido, Galli *et al.* (1989) y Wanner *et al.* (1989), han realizado recientemente un estudio de las modificaciones ultraestructurales que aparecen con la respuesta a la agregación celular. El examen con microscopía electrónica de transmisión, de células inducidas con feromonas sexuales de *E. faecalis*, muestra un cambio en las estructuras de superficie, apareciendo las células densamente cubiertas con protuberancias rugosas ("hair-like": semejante a pelos), para las que estos autores han sugerido una estructura tubular (13 nm ancho y 33 nm longitud). Estas rugosidades aparecen sólo sobre cubiertas celulares viejas (por ejemplo, no aparecen sobre la pared celular recién sintetizada y próxima al septo de división) y lo hacen con bastante rapidez a partir del momento en que se produce la inducción (<40 min).

No se sabe el por qué de la distribución no uniforme de estas proteínas, se sospecha que las zonas límpias de ellas podrían servir como base para facilitar la disociación posterior de las células donadoras y receptoras después de la conjugación.

Paralelamente y mediante técnicas inmunológicas

(western-blot), se han puesto de manifiesto estas proteínas de agregación, viéndose que existen diferencias para cada plásmido estudiado. Asi, por ejemplo, la proteína AD74 es específica del plásmido pAD1, y la proteína AD78 específica del plásmido pPD1. Ambas constituyen las proteínas mayoritarias de sus respectivas respuestas de agregación, y son inmunológicamente distintas.

Por lo demás estos 2 sistemas, pAD1 y pPD1, sólo difieren en las proteinas de 74 y 78 Kd, manteniendo en común las otras tres proteínas minoritarias que también se sintetizan en respuesta a la feromona. Asi, antisueros frente a la totalidad de las proteínas productos del plásmido pAD1, dan reacción cruzada con las proteínas de 130, 153 y 157 Kd de pPD1 (Yagi *et al.*, 1983).

Además de la diversidad del tamaño y especificidad inmunológica de las proteínas AD74 y AD78, también existen diferencias en cuanto a las características de los agregados que se producen en cada caso; mientras que en el sistema pPD1 produce agregados grandes y muy largos, el sistema pAD1 en cambio produce unos agregados de aspecto más granular (Clewell *et al.*, 1987).

En el caso del plásmido pCF10, Tortorello & Dunny (1985), identificaron también algunas sustancias antigénicas que aparecen en el medio de cultivo después de la exposición de las células a la acción de las feromonas. De esta forma, uno de estos antígenos, el SA73 (73 KDa), parece ser similar al pPD78; los otros antígenos tienen pesos moleculares por encima de 100.000 Da.

3.1.2.3 Modulación de la respuesta de agregación

Otra particularidad de este sistema de conjugación es la existencia de péptidos inhibidores de la respuesta de agregación. Se trata de octapéptidos hidrófobos muy semejantes en cuanto a la secuencia aminoacídica a la feromona con la cual se relacionan.

Se han descrito 2 péptidos inhibidores de la respuesta a la feromona: iPD1 (Mori *et al.*, 1987) e iAD1 (Mori *et al.*, 1986). Actúan como inhibidores competitivos que son excretados por las células donadoras que portan el plásmido pPD1 ó pAD1 respectivamente.

El péptido iAD1 presenta un 50 % de homología con su correspondiente feromona, mientras que iPD1 y cPD1 sólo comparten un 25 % de homología. Curiosamente, ambos inhibidores comparten la secuencia Thr-Leu-Val (fig. 2).

Figura 2. Secuencias aminoacídicas de los péptidos inhibidores iAD1 e iPD1 y de sus correspondientes feromonas cAD1 y cPD1. Los pesos moleculares de iAD1 e iPD1 son 846 y 828 respectivamente. Los asteriscos representan las semejanzas entre inhibidor y feromona.

```
cAD1    H-Leu-Phe-Ser-Leu-Val-Leu-Ala-Gly-OH
iAD1    H-Leu-Phe-Val-Val-Thr-Leu-Val-Gly-OH
           *   *             *       *

cPD1    H-Phe-Leu-Val-Met-Phe-Leu-Ser-Gly-OH
iPD1    H-Ala-Leu-Ile-Leu-Thr-Leu-Val-Ser-OH
              *               *
```

Existen evidencias de que los genes estructurales para estos inhibidores están albergados en los mismos plásmidos que codifican la respuesta a la feromona. Esto se ha demostrado, ya que al introducir el plásmido pAD1 en la estirpe *E. faecium* 9790, (que no excreta feromonas ni ningún tipo de inhibidor) se ha podido aislar el citado inhibidor en los cultivos de esta bacteria. Por otra parte, se ha relacionado la secuencia nucleotídica de iAD1 con el plásmido pAD1 (D.B. Clewell *et al.*, datos no publicados). Dicha secuencia sugiere que probablemente se sintetiza como un precursor de 22 aminoácidos siendo los 8 residuos del extremo carboxilo terminal, los correspondientes al péptido iAD1. Similares evidencias se han obtenido para el plásmido pPD1 (Mori *et al.*, 1987).

El papel fisiológico de estos inhibidores en el sistema de conjugación de *Enterococcus*, no está claro. Se han apuntado distintas hipótesis, una de las cuales, sostiene que serían útiles para prevenir la agregación por niveles bajos de feromonas endógenas relacionadas (Clewell, 1990). No obstante, esto está de acuerdo con el hecho de que existe una alta especificidad entre una feromona concreta y su inhibidor, de forma que éste elimina la actividad total sólo de su feromona, cuando ambos estan en concentraciones equimoleculares.

3.1.2.4. Características e identificación de la sustancia de unión.

El modelo de respuesta a feromonas (Dunny *et al.*, 1979), predice que en la célula que transporta un determinado plásmido se induce una sustancia de agregación,

la cual se uniría a una sustancia de unión (SU), presente tanto en la específica célula donadora como en la célula receptora. Como ya se ha expuesto en los apartados anteriores, la agregación es un fenómeno dependiente de iones divalentes (especialmente Mg^{++}) y de iones fosfatos. Ehrenfeld *et al.* (1986), propusieron que los ácidos lipoteicoicos (LTA), actuaban como sustancia de unión a las adhesinas.

Los LTA, están presentes sobre la superficie de las bacterias Grampositivas, incluyendo a *E. faecalis* (Wicken & Knox, 1974). Estos autores, demostraron que los LTA inhibían la agregación a concentraciones relativamente bajas (inferiores a 1 µg/ml), sugiriendo entonces un papel en la asociación célula-célula de los LTA, posiblemente como sustancias de agregación (Ehrenfeld *et al.*, 1986).

Al pH fisiológico, los iones fosfatos y cationes divalentes podrían estabilizar la asociación de la sustancia de agregación y los LTA negativamente cargados (Ehrenfeld *et al.*, 1986). Anteriormente a estos resultados, Beachey *et al.*, 1976, 1982), ya habían demostrado la intervención de los LTA en la unión a las células epiteliales, ya que anticuerpos anti-LTA, bloqueaban esta unión).

4. PRIMERAS EVIDENCIAS DEL CONTROL POR PLASMIDOS DEL CARACTER INHIBIDOR DE *E. FAECALIS* S-48

Una de las formas por las cuales se podía demostrar la existencia de 2 tipos de inhibidores en *E. faecalis* S-48, fue la mutagénesis con agentes tales como el bromuro de etidio, y anaranjado de acridina, de forma que se podían obtener cepas bacterianas derivadas de S-48, curados de uno o de ambos inhibidores (Martínez-Bueno 1986; Martínez-Bueno *et al.*, 1990). Concretamente se establecieron varios grupos de mutantes, caracterizados todos por su sensibilidad frente a la sustancia que dejaban de producir:

- Grupo I: engloba a mutantes curados de Bc-48. Eran sensibles a esta bacteriocina y producían sólo el antibiótico AS-48 (mutantes A-48-32 y E-48-36)

- Grupo II: engloba a mutantes curados de la producción del antibiótico AS-48. Sólo producían Bc-48 y eran sensibles a AS-48 (mutantes A-48-9, A-48-15, B-48-28).

- Grupo III: engloba a mutantes curados de ambos inhibidores. Estos mutantes (B-48-2, B-48-47) eran sensibles a ambos inhibidores.

La elevada frecuencia de obtención de estos mutantes, tras el tratamiento con agentes mutagénicos que actúan preferencialmente a nivel del ADN plasmídicos, constituye normalmente la primera evidencia sobre el origen extracromosómico de estos caracteres (Hopwood, 1978).

OBJETO DEL TRABAJO

suposición inicial de que los caracteres
[illegible] plasmídico, y que los plásmidos porta
[illegible] planteó la necesidad de estudiar

Una vez estudiados los antagonistas producidos por *E. faecalis* S-48, la bacteriocina Bc-48 y el antibiótico AS-48, en lo referente a su caracterización y mecanismo de acción, era obvia e inedudible la necesidad de conocer sus determinantes genéticos.

Aparte del interés puramente básico que nos suscitaba el tema, es éste un aspecto imprescindible a la hora de abordar la mejora en la producción de las mencionadas sustancias y su transferencia a otras bacterias con vistas a una futura aplicación.

Asi pues, la localización de los determinantes genéticos fue el objetivo de esta Tesis desde el principio y en una manera muy general.

La profundización en el tema había de estar muy condicionada, como de hecho lo ha estado, por el desarrollo de los experimentos previos. Se trataba pues en principio de localizar los genes de la producción e inmunidad de Bc-48 y AS-48, bien en ADN cromosómico, bien en ADN plasmídico. Para ello era de rigor científico recurrir a evidencias físicas y fisiológicas. Estas últimas se relacionan con la transferencia de los caracteres investigados a estirpes bacterianas que no las poseen.

La comprobación inicial de que los caracteres eran ambos de origen plasmídico, y que los plásmidos portadores eran conjugativos planteó la necesidad de estudiar este proceso.

Asi mismo, el diseño del mapa físico de restricción de los plásmidos, era en lo posible, un objetivo a lograr, asi como la localización de los caracteres dentro de ellos.

Los avatares de la investigación diaria y sus resultados han ido superando en unos aspectos los planteamientos iniciales y restringiendolos en otros.

MATERIAL Y METODOS

1. PRODUCTOS Y REACTIVOS EMPLEADOS

1.1. Medios de cultivo.

Fosfato mono y disódico (PanReac), Glucosa (Analema), agar (Pronadisa, Difco), medio infusión de cerebro corazón (BBL), medio Tood-Hewitt (Difco), medio Mueller-Hinton (BBL), bacto-triptona (BBL), extracto de levadura (BBL).

1.2. Electroforesis.

Tris (Boehringer Manheim), ácido acético (Probus), EDTA-Na_2 (Boehringer Manheim), ácido bórico (PanReac), Agarosa tipo 1A de baja electroendósmosis (Sigma), agarosa bajo punto de fusión (Sigma), bromuro de etidio (Sigma), acrilamida (BioRad), nitrocelulosa 0,45 µm (Schleicher and Schuell), DEAE-celulosa (Schleicher and Schuell). Como patrón de pesos moleculares de los fragmentos de restricción se usó el digerido *Hind* III del fago lambda (BioRad)

1.3. Enzimas.

Las enzimas de restriccion usadas fueron suministradas por Boehringer Manheim, a excepción de *Hind* III (New Englands Biolabs, Inc). Igualmente las enzimas: proteasa V_8 de *Staphylococcus aureus*, carboxipeptidasa A y B, y polinucleótido kinasa, fueron adquiridas en Boehringer Manheim (RFA). La tripsina y lisozima proceden de la casa Sigma (Chemical Co., USA).

1.4. Productos radiactivos.

ATP-gamma-[P^{32}] fue suministrado por NEN Research products (Dupont).

1.5. Antibióticos.

Los antibióticos eritromicina y esptreptocina, fueron suministrados por Sigma (Chemical Co., USA).

1.6. De cromatografía.

Convencional: Sephadex G-50 (Pharmacia), S-Sepharosa (Pharmacia). De alta resolución: columna C_{18} de fase reversa (Vydac).

Acetonitrilo, isopropanol, ácido trifluoroacético de alta pureza para HPLC (Carlo Erba).

1.7. Otros productos.

Fenol, polietilenglicol 4000, azul de bromofenol, sacarosa, etanol absoluto, isopropanol, n-butanol, hidroxido sódico, succinato sódico, ácido clorhídrico (todos de Merck). Cloruro sódico, citrato sódico, cloroformo (PanReac). Dodecil sulfato sódico (Sigma).

2. MICROORGANISMOS.

Las estirpes bacterianas empleadas en este trabajo, junto con sus características fenotípicas y procedencia, se exponen en la tabla 1.

TABLA 1. Razas bacterianas usadas en este estudio.

Cepa	Características relevantes	Referencia
Enterococcus faecalis		
S-48	AS-48^{+}, Bc-48^{+}, Gel^{+}, Sm^{s}	1
A-48-32	AS-48^{+}, Bc-48^{-}, Gel^{+}, Sm^{S}	2
A-48-9	AS-48^{-}, Bc-48^{+}, Gel^{+} Sm^{s}	2
A-48-15	AS-48^{-}, Bc-48^{+}, Gel^{+} Sm^{s}	2
B-48-28	AS-48^{-}, Bc-48^{+}, Gel^{+} Sm^{s}	2
B-48-2	AS-48^{-}, Bc-48^{-}, Gel^{+} Sm^{s}	2
B-48-47	AS-48^{-}, Bc-48^{-}, Gel^{+} Sm^{s}	2
OG1X	AS-48^{-}, Bc-48^{-}, Gel^{-} Sm^{r}	3
T1-4	transconjugante Bc-48 AS-48^{-}, Bc-48^{+}, Sm^{R}, Gel^{-}	Este estudio
B-48-47E	mutante B-48-47, con el plásmido pIL253 (Em^{r})	Este estudio
B-48-47E1	cepa B-48-47E, Bc-48^{+}	Este estudio
T4-31	transconjugante AS-48 AS-48^{+}, Gel^{-}, Sm^{r}, se agrega en medio líquido	Este estudio
Escherichia coli V517	Marcador de pesos moleculares	4

AS-48^{+}: productor de AS-48; AS-48^{-}: no productor de AS-48; Bc-48^{+}: productor de Bc-48; Bc-48^{-}: no productor de Bc-48; Gel^{+}: gelatinasa positivo; Gel^{-}: gelatinasa negativo; Sm^{r}: resistente a estreptomicina; Sm^{s}: sensible a estreptomicina, Em^{r}: resistente a eritromicina.

1) Gálvez *et al* (1986), 2) Martínez-Bueno 1986; 3) Ike *et al* (1983); 4) Macrina *et al* (1978)

3. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES CULTURALES.

La composición de los medios de cultivo se expresa en gramos por litro de agua destilada, con las excepciones indicadas.

3.1. Medios empleados para el crecimiento y conservación de las estirpes bacterianas.

Medio de infusión de cerebro-corazón (BHI): Fue el medio mas comúnmente utilizado; la composición en gramos por litro de agua destilada (BHI) o tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,2, (BHI-T) es la siguiente:

Infusión de cerebro de ternera	200,0
Infusión de corazón de buey	250,0
Peptona de gelatina	10,0
Cloruro sódico	5,0
Fosfato disódico	2,5
Glucosa	2,0

Para su uso en forma sólida, fue suplementado con agar al 1,5 % .

Medio de tripticaseína y soja (TSI): Fue empleado alternativamente para el crecimiento de diversos organismos. Su composición es la siguiente:

Peptona de caseina	15
Extracto de levadura	5
Cloruro sódico	5

Medio de Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972): Fue utilizado para el crecimiento de razas de *Escherichia coli*. Su composición es la siguiente:

Bacto-triptona.....10
Extracto de levadura.....5
Cloruro de sódico.....1
pH 7-7,5

Es el medio empleado para el aislamiento en pequeña escala de plásmidos de *E. coli*.

Agar de Mueller-Hinton (MH-T). Este medio, suministrado por BBL, fue el empleado como capa base para el ensayo de la actividad antibacteriana. Su composición en gramos por litro de tampón fosfato sódico 150 mM, pH 7,2, es:

Extracto de carne.....2,0
Hidrolizado de caseína.....17,5
Almidón.....15,5
Agar.....12,0

Medio de Todd-Hewitt (THB). Fue utilizado para la regeneración de protoplastos de *E. faecalis*, suplementado bien con sacarosa (500 mM) o con succinato sódico (500 mM), como estabilizador osmótico.

Infusión de corazón de ternera.....500,0
Peptona.....20,0
Glucosa.....2,0
Cloruro sódico.....2,0
Fosfato sódico anhidro.....2,0
Bicarbonato sódico.....2,5
pH 7,8

3.2. Medios empleados en la producción de las sustancias antagonistas AS-48 y Bc-48.

BHI-T: fue el medio utilizado para ambos. En el caso de AS-48, se adicionó glucosa al 1 % .

3.3. Condiciones culturales.

Todos los cultivos se incubaron en reposo a 37 °C, a excepción de los de *E. coli* (37 °C en agitación).

4. CURVAS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE SUSTANCIAS ANTIBACTERIANAS.

Tubos de ensayo o bien matraces conteniendo medio de cultivo apropiado, se inocularon al 4 % con la raza indicada previamente crecida durante una noche en el mismo medio, y se incubaron en las condiciones adecuadas en cada caso. A intervalos regulares de tiempo se efectuaron medidas de la turbidez en un espectofotómetro Spectronic 20-D (Bausch & Lomb), y se retiraron alícuotas de los mismos, que

se centrifugaron inmediatamente para eliminar las células. Los sobrenadantes así obtenidos, fueron neutralizados mediante adición de hidróxido sódico diluído, y se determinó su actividad antibacteriana por la técnica de los pocillos, bien directamente o tras un proceso de concentración, por evaporación a vacío en un evaporador rotatorio R (Buchi), o en el caso de AS-48 por filtración en minicolumnas de Sepharosa-S (1 ml de lecho aproximadamente). Para equilibrar y empaquetar el gel, se pasaron varios volúmenes de agua destilada.

La muestra (25 ml de sobrenadante) se aplicó suavemente a la columna mediante jeringa, y finalmente se eluyó con 2 ml de ClNa 1 M.

5. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

5.1. Detección en medio sólido. Técnica de la doble capa (Gratia & Fredericq, 1946).

Se inocularon las placas de Petri que contenían 15 ml de una capa base de medio BHA-T, con gotas de un cultivo líquido en fase estacionaria de la estirpe productora. Una vez incubados durante 18 h a 37 °C, las placas se cubrieron con 6 ml de medio BHA semisólido (BHI al 1,5 % en tampón fosfato, agar al 0,75 %) mantenido en sobrefusión, e inoculado con 0,1 ml de un cultivo de 18 h de la estirpe indicadora.

Una vez solidificada la sobrecapa, las placas se incubaron durante 18 h a 37 °C, para permitir el crecimiento de la indicadora y el desarrollo de zonas de inhibición de la misma.

5.2. Detección en medio líquido. Técnica de los pocillos (Tagg & McGiven, 1971).

El ensayo de la actividad antibacteriana se realizó siguiendo la técnica de difusión en placa. Para ello se utilizaron placas de Petri con una capa base de 10 ml de medio MHA-T con la superficie bien seca, sobre la que se depositaron pocillos estériles de acero inoxidable de 8 mm de diámetro. Seguidamente se vertieron sobre las placas 6 ml de sobrecapa adicionados de 0,1 ml de un cultivo en fase estacionaria de la bacteria sensible.

Una vez solidificada la sobrecapa se retiraron los pocillos quedando los huecos correspondientes, en los que se depositó 0,1 ml de la muestra a ensayar. A continuación las placas se dejaron en predifusión durante 1 h a 4 °C, y se incubaron nuevamente a 37 °C. Tras 18 h de incubación se midió el diámetro del halo de inhibición producido alrededor de cada pocillo.

La titulación de las muestras se llevó a cabo por ensayo mediante esta técnica, de diluciones seriadas de las mismas (Gálvez et al., 1986). Se definió como Unidad Arbitraria (UA) la mínima concentración de inhibidor capaz de producir una inhibición de 9 mm de diámetro (mínimo halo detectable) sobre una capa de agar inoculada con $3,8 \times 10^6$ unidades formadoras de colonias (UFC) de *E. faecalis* S-47 (Gálvez et al, 1986).

6. METODOS DE AISLAMIENTO DE ADN PLASMIDICO.

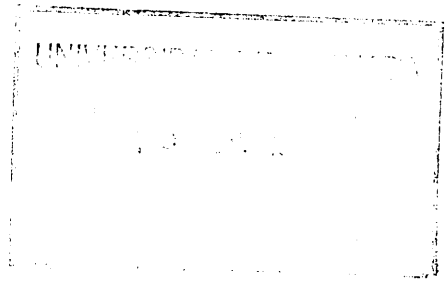
6.1 Aislamiento rápido a partir de pequeños volúmenes de cultivo: minipreparaciones.

6.1.1. Minipreparación de plásmidos de *E. faecalis*.

La técnica de aislamiento de plásmidos a pequeña escala, se basó en la modificación de dos métodos utilizados habitualmente en *Lactococcus* (Anderson & McKay, 1983; Neve *et al.*,1984).

La estirpe a estudiar, se inoculó en 5 ml de caldo BHI durante 8-10 h a 37 °C. El cultivo se centrifugó (3,000xg, 15 min) y posteriormente se lavó con 1 ml de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). Las células así lavadas y sedimentadas se congelaron rápidamente a -70 °C (30 min) hasta el momento de su uso.

El sedimento se descongeló a 37 °C y se resuspendió en 458 µl de sacarosa al 6,7 % (p/v) en Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8. A continuación se adicionaron 115 µl de solución de lisis (10 mg/ml de lisozima en Tris-HCl 25 mM, pH 8) y se incubó a 37 °C durante 30 min. Finalmente la lisis se desencadenó adicionando con agitación suave 58 µl de EDTA 250 mM ,pH 8 y 35 µl de SDS (SDS al 20 % [p/v] en Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM, pH 8) e incubando a 55 °C durante 5 min. El ADN se desnaturalizó mediante la adición de 35 µl de una solución recién preparada de NaOH 3M, realizando suaves inversiónes durante 10 min. El lisado se neutralizó rápidamente con 60 µl de Tris-HCl 2 M, pH 7 a 4 °C durante 3 min. Finalmente gran parte del ADN cromosómico ya parcialmente desnaturalizado, se precipitó por adición de 86 µl de NaCl 5 M en hielo durante 30-60 min, y posterior



centrifugación a 4 °C durante 10 min en microfuga.

El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se extrajo con un volumen igual de fenol saturado con NaCl al 3 % en Tris-HCl 100 mM (pH 8). La fase acuosa se volvió a extraer con cloroformo-isoamílico (24:1). Al sobrenadante finalmente se le adicionó un volumen igual de isopropanol (preenfriado a -20 °C), se mezcló y se incubó a -20 °C 4 h ó -70 °C (30 min). El precipitado fue recogido por centrifugación (10 min), lavado con etanol 70 %, y desecado por centrifugación a vacío (en centrífuga Vaccum-Speed, Savant). Finalmente se resuspendió en 30 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6), pudiéndose guardar a 4 ° C para posterior análisis por electroforesis en geles de agarosa.

6.1.2. Minipreparación de plásmidos de *Escherichia coli*.

El aislamiento rápido de plásmidos de esta bacteria se llevó a cabo por el procedimiento de Birmboin & Doly (1979).

A partir de un cultivo de *E. coli* en fase estacionaria, se extrajeron 1,5 ml que fueron centrifugados en una microfuga durante 1 min. El sobrenadante fue retirado cuidadosamente y las células se resuspendieron en 100 µl de solución I (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8, lisozima 5 mg/ml) y se dejaron 5-10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 200 µl de solución II (NaOH 0.2 M, SDS 1 %), se mezclaron suavemente invirtiendo el tubo tres o cuatro veces y se mantuvieron en hielo 5 min. Entonces se adicionaron 150 µl de acetato potásico 5 M (pH 4,8) preenfriado, y se agitó el tubo en posición invertida durante 10 seg. Después de 15 min en hielo, el lisado se centrifugó durante 10 min, recogiéndose cuidadosamente el

sobrenadante, el cual se extrajo con 1 volumen de fenol-cloroformo. Entonces se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se le añadieron 2,5 vol de etanol, mezclándose y manteniéndose durante 10-15 min a -70 °C. El precipitado se recogió por centrifugación durante 15 min, se lavó con etanol 70 %, se desecó al vacío y se resuspendió en 50 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

6.2. Aislamiento en gran escala.

Se realizó en dos fases, en las cuales se extrae en primer lugar el ADN a partir de los cultivos bacterianos, y posteriormente se purifica el ADN plasmídico por ultracentrifugación en un gradiente de densidad CsCl-EtBr.

6.2.1. Extracción del ADN de los cultivos.

Se llevó a cabo según la técnica descrita por Anderson & McKay (1983). A partir de un cultivo bacteriano en fase estacionaria se inocularon (2 %) 700 ml de medio BHI adicionado de D-L treonina 20 mM, para favorecer la formación de células osmóticamente frágiles (Chassy, 1976), incubándose a 37 °C durante 4-5 h. Las células se recogieron por centrifugación a 5000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor GSA) durante 15 min, resuspendiéndose en 30 ml de solución I (sacarosa al 6,7 % en Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Se añadieron entonces 7,5 ml de solución de lisozima (10 mg/ml disuelta en Tris-HCl 25 mM, pH 8). Esta suspensión se incubó a 37 °C durante 30 min. La lisis de las células osmóticamente frágiles se efectuó por adición de 3,75 ml de EDTA 250 mM pH 8 y 2,25 ml de SDS (20 % [p/v] en Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM, pH 8), durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 2,4 ml de NaOH 3 M, mezclándose por inversión suave durante 10 min, y neutralizándose

posteriormente con 3,9 ml de Tris-HCl 2 M, pH 7 (3 min en hielo) y 5,7 ml de NaCl 5 M. Se agitó y se incubó a 4 °C durante 1h. Parte del ADN cromosómico y los restos celulares se precipitaron y se separaron del resto por una centrifugación a 6.000 rpm durante 30 min y al sobrenadante, que contenía mayoritariamente el ADN plasmídico, se le adicionaron 55 ml de fenol saturado con NaCl 3 % en Tris-HCl 100 mM, pH 8. Las dos fases, acuosa y fenólica, se separaron tras una centrifugación de 15 min a 5.000 rpm y la fracción acuosa se extrajo con un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1).

Finalmente, la fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol preenfriado, y se incubó a -20 °C durante una noche. El ADN plasmídico se recogió por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min, y una vez seco se disolvió en tampón TE. El contenido en ADN plasmídico de la preparación se estimó por electroforesis en gel de agarosa.

6.2.2. Purificación de los plásmidos en gradiente de cloruro de cesio (Maniatis, 1982).

A la preparación de ADN obtenida según la técnica descrita en 6.2.1., se le añadieron 1,1 gr de CsCl por cada ml, mezclándose hasta conseguir la disolución de la sal. Se adicionó entonces bromuro de etidio (10 mg/ml en TE) hasta una concentración final de 400 µg/ml, y se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 min, para eliminar los restos de proteína. Tras ajustar el sobrenadante a una densidad de 1,55 g/ml se transfirió a tubos apropiados centrifugándose en una ultracentrífuga Beckman (modelo L5-50, rotor SW41) a 39.000 rpm y a 18 °C, durante al menos 48 h. Pasado este tiempo se hacían visibles bajo luz ultravioleta dos bandas: la inferior, correspondiente al ADN plasmídico, se recogió

tras pinchar el tubo con ayuda de una jeringa.

Para eliminar los restos de bromuro de etidio, se adicionó a la solución de ADN plasmídico, un volumen igual de n-butanol saturado con agua, agitándose ambas fases y retirándose finalmente la superior alcohólica. Este proceso se repitió varias veces hasta que desapareció el color rosado de la fase acuosa.

El ADN plasmídico se dializó frente a 2 litros de TE, durante 36 h a 4 °C, y se precipitó finalmente por adición de acetato sódico 3 M (1/10 del volumen de la solución) y 2 volúmenes de etanol absoluto, agitándose y manteniendo a -20 °C una noche. Entonces se centrifugó a 12.000 xg durante 15min, y se secó al vacio. Por último se disolvió en un volumen inicial de TE y se fraccionó en alícuotas, guardándose a -20 °C.

7. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ADN.

Las preparaciones purificadas de ADN se valoraron rutinariamente por determinación de su absorción a 260 nm, en un espectrofotómetro Hitachi 100-80A.

Para el ADN de cadena doble se asumió que una preparación con Ab_{260}= 1, equivalía a una concentración de 50 µg/ml (Maniatis, 1982). En todas las preparaciones se determinó asi mismo la absorbancia a 280 nm. La relación A_{260}/A_{280} es un índice de la pureza de la preparación. Se consideran aceptables preparaciones de ADN con indices 1,8-2,0 (Maniatis, 1982).

Para muestras de ADN muy impuras o de baja concentración, se empleó el método de comparación de la

fluorescencia emitida bajo luz ultravioleta en gel de agarosa, frente a marcadores de ADN de concentración conocida.

8. SEPARACION E IDENTIFICACION DE PLASMIDOS O FRAGMENTOS DE ADN POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

La separación de plásmidos o fragmentos de restricción de los mismos, se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (Sigma tipo 1A, baja electroendósmosis) del 0,6 al 0,8 % según el tamaño de los fragmentos a resolver, sumergidos en tampón TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,2) o TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2,5 mM, ajustado a pH 8,1 con ácido acético glacial). Antes de depositarlas en el gel, las muestras fueron adicionadas (1/10 de su volumen) de solución de carga (50 % glicerol, 0,25 % de azul de bromofenol, en tampón TE).

Tras la electroforesis, el gel se coloreó mediante inmersión durante 30 min en una solución de bromuro de etidio, a concentración de 1 µg/ml, observándolo posteriormente bajo luz ultravioleta (302 nm) en un transiluminador (Spectroline).

El fotografiado de los geles se realizó con una cámara Praktica MTLB, provista de película KodaK Tri-X PAN de 400 ASA.

9. ESTIMACION DEL TAMAÑO DE LOS PLASMIDOS Y FRAGMENTOS DE RESTRICCION POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

La determinación del tamaño de los plásmidos se ha hecho a partir de una gráfica en la que se representaron los logarítmos de los pesos moleculares, frente a las movilidades relativas en geles de agarosa (distancia de migración dividida por la longitud del gel), de los plásmidos de la estirpe *E. coli* V517.

Cuando se quiso determinar el tamaño de los fragmentos de restricción, se utilizaron como patrones los fragmentos *Hind* III del fago lambda.

10. RECUPERACIÓN DE ADN TRAS UNA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Para la purificación de los ADNs a partir de los geles de agarosa, se utilizaron diferentes técnicas según el peso molecular de los mismos.

10.1. Extracción de ADN a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión.

Se ha utilizado preferentemente para purificar ADN plásmidico.

Despues de finalizada la electroforesis, el gel de agarosa (bajo punto de fusión, Sigma) se tiñó con bromuro de etidio y se observaron las bandas de ADN con una lámpara de luz UV de 360 nm de longitud de onda. Una vez localizadas las mismas, se recortó la porción del gel que interesaba, se transfirió a un tubo eppendorf y se adicionó de 5-10 volúmenes de tampón TE. El gel se fundió por calentamiento a

65 °C 5 min, y el ADN separó de la agarosa mediante dos extracciones con fenol y una tercera con cloroformo-alcohol isoamílico. A la fracción acuosa (superior), se le adicionó 1/10 de su volúmen de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol. Tras incubar a -20°C durante una noche, el precipitado de ADN se recogió por centrifugación a 12.000xg, 10 min, y se lavó con etanol al 70 % . Finalmente, después de secar a vacío, el ADN se resuspendió en tampón TE.

10.2 Purificación de ADN mediante DEAE celulosa.

Esta técnica se ha utilizado principalmente para purificar fragmentos de restricción de tamaño inferior a 15 Kb. Una vez visualizada las bandas en el gel de agarosa, se practicó una incisión justo delante de la banda que se quería aislar, en el sentido de la migración, y otra por detrás, atravesando completamente el gel.

Posteriormente se insertó un trozo de una membrana de DEAE-celulosa (Schleicher & Schuell), y se sometió de nuevo a un campo eléctrico. Cuando el ADN estuvo adherido a la membrana (lo que se constató iluminando con luz ultravioleta) se detuvo la electroforesis. Entonces la membrana se introdujo en un tubo eppendorf y se añadieron 300 µl de tampón de elución (Tris-HCl 20 mM, NaCl 1,5 M, EDTA 1 mM, pH 7,5), y se incubó un mínimo de 1 h a 65 °C, agitándose de vez en cuando. Cuando todo el ADN se hubo separado de la membrana se retiró ésta y se añadieron 2,5 vol de etanol incubándose a -20 °C durante una noche. Transcurrido este tiempo se centrifugó 10 min a 12.000xg, y se lavó con etanol al 70 %, desecándose posteriormente a vacío. Finalmente el sedimento de ADN se resuspendió en un volumen adecuado de tampón TE.

10.3. Método de GENCLEAN (Vogelstein B. & Gillespie, 1979).

Una vez realizada la electroforesis en gel de agarosa, y visualizadas las bandas de ADN, se cortó el trozo de agarosa correspondiente al fragmento de ADN que se quería recuperar. Se añadieron 2 vol de NaI 5 M y se fundió en un baño a 55 °C durante 5 min. Posteriormente se adicionó 1 µl de "glassmilk" (BIO 101, La Jolla, California) por cada µg de ADN, agitando vigorosamente, y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación se dió un pulso de microfuga (30 seg), y el sedimento se resuspendió en 10-15 vol (respecto de la cantidad de "glassmilk" añadida) de solución de lavado (50 % de etanol diluido en 20mM Tris-HCl, pH 7,4, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM), centrifugándose 5 min. Este proceso se repitió 3 veces.

Finalmente se eluyó el ADN retenido a esta cerámica, adicionando al sedimento 25 µl de TE, e incubando 45-55 °C durante 2-3 min. Se centrifugó durante 30 seg y se recuperó cuidadosamente el sobrenadante, el cual cuando fue requerido se repurificó mediante precipitación con etanol.

11. EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA GENETICA POR CONJUGACION.

La transferencia de caracteres por conjugación se realizó mediante cruce simple sobre filtro, mezclándose las razas donadoras y receptoras en proporción 1:1 ó 1:10 (Reichelt et al., 1984).

11.1. Transferencia del carácter AS-48^R.

Esta transferencia se realizó entre *E. faecalis* A-48-32 (Sm^R, $AS\text{-}48^+$) y *E. faecalis* OG1X (Sm^R, $AS\text{-}48^-$) mediante conjugación. Los cultivos en fase estacionaria de la donadora (A-48-32) y de la receptora (OG1X) se diluyeron en medio fresco BHI y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar la fase exponencial temprana. En un tubo con 4,5 ml de BHI se mezclaron 0.25 de la donadora con un volumen igual de la receptora, depositándose posteriormente sobre un filtro de membrana de 0,45 µm de tamaño de poro, y aplicando vacío para forzar el paso del líquido. El filtro con las células retenidas sobre él, se colocó sobre una placa de medio BHA y se incubó a 37 ° C durante una noche. Pasado este tiempo, se lavó el filtro con 4,5 ml de solución salina (0,85 %), y la suspensión celular se sembró sobre placas de BHA-T conteniendo 200 UA/ml de AS-48 y 600 µg/ml de estreptomicina.

Se realizaron diversos controles con cruces en presencia de ADNasa I, sobrenadantes libres de células y células donadoras no viables.

El control de sensibilidad de la transferencia a la ADNasa I, se realizó por tratamiento del cultivo donador con ADNasa I (Sigma, 100 µg/ml en SO_4Mg 1 mM), antes de mezclar con la célula receptora. También se incluye en el medio BHA.

Para hacer no viables a las células donadoras, se trataron éstas con un volumen de cloroformo durante 15 min, y se procedió según se describe antes.

El sobrenadante libre de células donadoras, se obtuvo por filtración de un cultivo de las mismas a través de un filtro bacteriológico (tamaño de poro 0,45 µm, Millipore). Dicho sobrenadante se mezcló con las células receptoras en

un experimento paralelo y se consideró como control de transformación genética.

11.2. Transferencia del carácter Bc-48$^+$.

Se realizó de la misma forma que para AS-48, pero empleando como donadora se utilizó la estirpe mutante de *E. faecalis* A-48-15 (Bc-48$^+$) y como receptora la estirpe OG1X. En este caso la selección de los transconjugantes se efectuó en base a la inhibición del crecimiento sobre OG1X en medio BHA-T adicionado de estreptomicina (600 µg/ml).

12. EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA GENETICA POR TRANSFORMACION.

Se ha llevado a cabo transformando protoplastos de *E. faecalis*.

12.1. Obtención de protoplastos.

La técnica de obtención de protoplastos se basó en la descrita por Wirt *et al.* (1986).

Para obtener células susceptibles de ser transformadas, se inocularon 500 ml de THB adicionando de glicina al 2 %, con 0,5 ml de un cultivo de un noche en el mismo medio, de la estirpe a transformar. Las células se dejaron crecer hasta alcanzar ña fase logarítmica, se recogieron por centifugación a 5.000 rpm (Sorvall, rotor GSA) a 4 °C, resuspendiéndose posteriormente en 5 ml de THB más 5 ml de glicerol, y congelándose rápidamente a -70 °C en alícuotas

de 1 ml.

Para la obtención de protoplastos, cada alícuota de 1 ml (equivalente a 50 ml del cultivo original), se descongeló rápidamente a 37 °C, centrifugándose a 12,000xg durante 5 min. Las células se resuspedieron en 10 ml de tampón TSCM (100 mM Tris-HCl, pH 8, succinato sódico 500 mM, Ca_2Cl 40 mM, Mg_2Cl 10 mM) que contenía 10 mg de albúmina bovina (BSA, Serva) y 1 mg de lisozima (Sigma) por ml. Esta suspensión se incubó a 37 °C durante 90 min.

Después del tratamiento con lisozima, las protoplastos ya formados, se centrifugaron a 3.000 xg (15 min), y se lavaron con 10 ml de tampón TSCM conteniendo 100 µg BSA/ml. Finalmente, se resuspendieron en 1 ml del mismo medio.

12.2. Transformación de protoplastos.

Se tomaron 100 µl de la suspensión de protoplastos, que se centrifugaron a 3.000xg durante 10 min, dejándolos entonces en hielo durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 25 µl de solución de ADN (1-5 µg disuelto en 500 mM de succinato), y se incubó en hielo 5 min. Posteriormente se añadió suavemente 1 ml de polietilenglicol 4000 (PEG 4000, 40 % disuelto en TSCM), y la mezcla se incubó 3 min en hielo y después 5 min a 37 °C. Finalmente, el PEG se eliminó tras sucesivos lavados, primero con 5 ml de tampón TSCM y en segundo lugar con 5 ml de medio THB conteniendo succinato sódico 500 mM, y BSA 100 µg/ml, centrifugando en cada caso a 3,000xg (10 min). El sedimento de protoplastos se resuspendió en 1 ml del mismo medio y se incubó 60-90 min para permitir la expresión fenotípica de los caracteres en los transformantes.

La selección de los transformantes, se realizó inoculando alícuotas de 50-100 µl en tubos de medio THB mantenidos en sobrefusión, succinato sódico 500 mM, BSA 100 µg/ml, agar 0,7 %, que se vertieron sobre placas con una capa base de igual medio pero con agar al 1,5 %, e incubando durante 48 h a 37 °C para permitir la regeneración de protoplastos.

12.2.1. Regeneración de protoplastos y enriquecimiento sobre alginato.

Esta técnica ha sido desarrollada en nuestro laboratorio, y está basada en el cultivo de protoplastos inmobilizados sobre alginato (L. Ferenczy, e I. Guerra, comunicación personal).

El procedimiento de obtención de protoplastos y transformación fue similar al descrito en los apartados 12.1 y 12.2, pero en este caso los protoplastos se inocularon a temperatura ambiente en una solución de alginato (Sigma) 2 % en 500 mM sacarosa (p/v); esta mezcla se dejó solidificar sobre placas de THB conteniendo agar 2 %, sacarosa 500 mM, Ca_2Cl 50 mM. Tras incubar a 37 °C durante 12-16 h, la sobrecapa de alginato se redisolvió en una solución de citrato sódico 2 %, y se centrifugó a 5.000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. El sedimento, que contenía las células con pared celular regenerada, se lavó varias veces con tampón citrato sódico y se resuspendió finalmente en 5 ml de THB conteniendo la mínima concentración del antibiótico con el que se desea seleccionar (AS-48). Después de incubar durante 5 h a 37 °C, las células se sembraron en placas de medio BHA-T conteniendo el marcador a seleccionar.

13. DETERMINACION DEL MAPA FISICO DE LOS PLASMIDOS CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION.

13.1. Digestion del ADN con endonucleasas de restricción.

Las restrictasas son endonucleasas que rompen el ADN bicatenario a nivel de secuencias específicas, originando fragmentos con extremos bien definidos, ya sean cohesivos ó romos.

La construcción del mapa de restricción de una molécula de ADN tiene dos fases: a) digestión del ADN con una colección de restrictasas, y b) determinación del tamaño de los fragmentos producidos por medio de una electroforesis en gel.

La digestión del ADN se ha llevado a cabo en las condiciones óptimas para cada tipo de enzima de restricción. Normalmente, las reacciones contenían 0,5-1 µg de ADN (purificado mediante gradiente en CsCl) y 3-5 U de enzima en un volumen final de 25 µl.

Los tampones de incubación, asi como las condiciones óptimas de incubación fueron las indicadas por los proveedores (Boehringer Manheim, RFA).

Las reacciones enzmáticas normalmente se incubaron durante 2-5 h, y se detuvieron con Na_2-EDTA pH 8 (concentración final de 10 mM).

Las endonucleasas de restricción utilizadas han sido las siguientes: *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III, *Pst* I, *Sal* I, *Sac* I, *Sma* I, *Xba* I, y *Xho* I.

Las digestiones dobles o triples se realizaron en distintas fases. Primero se digirió con el enzima activo a una concentración de NaCl mas baja, y posteriormente se añadió la cantidad apropiada de NaCl 1 M hasta alcanzar la concentración óptima para el enzima siguiente.

Alternativamente se extrajeron los fragmentos de restricción a partir de geles de agarosa (mediante alguno de los procedimientos antes descrito), para ser digeridos a continuación con otra restrictasa.

14. TRANSFERENCIA DE ADN A FILTROS DE NITROCELULOSA (SOUTHERM BLOTTING).

La transferencia de los plásmidos y los fragmentos de restricción de los mismos de a filtros de nitrocelulosa se realizó según la técnica de Southerm (1975).

El ADN se sometió a una depurinización ácida para mejorar la transferencia, sumergiendo éste en una solución de HCl 0,25 M durante 20-30 min con agitación suave. Después de lavar brevemente con agua destilada, el ADN del gel se desnaturalizó con NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M durante 30 min, tras lo que se neutralizó mediante dos lavados sucesivos con Tris-HCl 0,5 M, NaCl 3 M, pH 7 (30 min cada uno). Finalmente se lavó ligeramente con agua destilada.

Mientras tanto, la nitrocelulosa se humedeció en agua destilada y posteriormente se saturó en tampón SSCx20, al igual que varios trozos de papel Whattman 3 MM.

Para hacer la transferencia (blotting), se colocaron varias piezas de papel Whatman 3 M, conectados con un

reservorio de tampón SSCx20, sobre una superficie lisa, y sobre estas el gel, teniendo cuidado de no dejar burbujas entre ambos. A continuación, se colocó el filtro de nitrocelulosa (ya preparado), 3 trozos de papel Whattman 3 M, y una tanda de 3-4 cm de grosor de papeles de filtro secos. Sobre este sistema, se colocó un peso (0,5 Kg) para mantenerlo todo comprimido y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. El papel Whatman inferior, se aisló con plástico para evitar que se resecara y también para que no entrara en contacto con el papel de filtro colocado por encima del gel.

Una vez terminada la transferencia, la nitrocelulosa se deja en una solución SSCx6 durante varios minutos a temperatura ambiente para eliminar los restos de agarosa. Finalmente se dejó secar el filtro sobre 3MM, y a continuación se calentó en un horno a 80 °C durante 2 h. El filtro se puede guardar desecado entre papel Whatmann a temperatura ambiente por varios meses.

La composición del tampón SSC (x20) es: 3 M Cloruro sódico-0,3 M citrato sódico, pH 7.

15. PREPARACION DE SONDAS DE ADN PARA HIBRIDACION.

15.1. Marcaje de ADN con digoxigenina-11-dUTP.

La preparación de sondas de ADN no radiactivas, se llevó a cabo por el método conocido como "multicebador" descrita por Feinberg & Vogeslteim (1983; 1984) y posteriormente modificado por Boehringer Manheim (RFA). Consiste en la síntesis parcial de ADN a partir de un molde de ADN, usado como sonda, utilizando como cebadores una mezcla de hexanucleótidos (Boehringer Manheim), digoxigenina-11-dUTP como nucleótido marcado (Boehringer Manheim), y el enzima Klenow (Boehringer Manheim). La presencia del nucleótido sintético en el ADN permite su detección mediante una reacción inmunológica específica.

Para marcar cantidades de 0,2-1 µg de ADN se procedió de la siguiente forma:

ADN a marcar (en tamón TE).....0,2 µg
Mezcla de hexanucleótidos (1 µM).....2 µl
Mezcla de dNTP*.....2 µl
Agua desionizada.....hasta 19 µl
Enzima Klenow (2 U/µl).....1 µl

(*) La mezcla de los dNTP contiene: dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 0,65 mM, Dig-dUTP 0,35 mM, pH 6,5.

La mezcla se incubó a 37 °C entre 1-12 h. Para detener la reacción e inactivar el enzima, se añadió Na_2-EDTA (pH 8) a una concentración final de 10 mM.

Para separar el ADN sonda de los nucleótidos no incorporados, se añadieron 2 µl de LiCl 4M y 60 µl de etanol absoluto preenfriado, y se incubó durante una noche a -20 °C. El ADN se recogió por centrifugación a 12,000xg (10 min), y posteriormente se lavó con etanol 70 %, resuspendiéndose, una vez seco, en 50 µl de tampón TE.

15.2. Marcaje radioactivo del ADN.

Se utilizó la polinucleótido kinasa (PNK) del bacteriófago T4 (Boehringer Manheim, RFA), que cataliza la transferencia de un grupo fosfato de la molécula de ATP sobre el extremo 5' de la molécula de ADN. Ello permite marcar con P^{32} el ADN en posición 5'.

Esta reacción se ha utilizado para marcar sondas de oligonucleótidos sintéticos. Los oligómeros sintéticos liofilizados se disuelven en agua bidestilada hasta una concentración de 20 pmol/µl. La mezcla de reacción consiste en:

Oligonucleótido (20 pmo/µl)	1,5 µl
gamma-[^{32}P]ATP (3.000 Ci/mmol)	5,0 µl
Tampón kinasa* (x 10)	2,0 µl
Agua bidestilada	11,5 µl
Polinucleótido kinasa T4 (10U/µl)	1,0 µl

La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min, y a continuación se adicionó otro µl mas de PNK, incubándose de nuevo 30 min. Transcurrido este tiempo, la reacción se detuvo sobre hielo.

(*) Tampón PNK T4 (x 10):

Tris-HCl (pH 7,6) .....500 mM
$MgCl_2$ .....100 mM
DTT (ditiotreitol) .....50 mM
espermidina (pH 7,6) .....1 mM
Na_2.EDTA (pH 8) .....1 mM

El oligonucleótido sintético fue suministrado Ingenasa S. A., sin purificar.

15.3. Purificación de ADN por cromatografía en columna.

Para eliminar el exceso de gamma-[^{32}P]ATP no incorporado al ADN se sometió a filtración en Sephadex G-50 (tipo "fine", Pharmacia), utilizando como columna una pipeta Pasteur desechable, provista en su extremo inferior de lana de vidrio o gasa estéril. Para equilibrar y empaquetar el gel (0,08 g/l), se hicieron pasar varios volúmenes de tampón TE.

El rango de resolución de la columna se estableció pasando una solución de azul dextrano-rojo fenol (20 µl, 10 mg/ml).

La muestra se aplicó en la columna dejándola resbalar suavemente por las paredes y entonces se eluyó con volumen de 100 µl de TE. La radiactividad de las diferentes fracciones se midió con un contador Geiger. Se recogió el primer pico que correspondía al ADN marcado.

La eficiencia de la reacción, se realizó midiendo la

radioactividad de 1 µl del eluato en 2 ml de agua destilada, en un contador de centelleo (Beckman).

16. TECNICAS DE HIBRIDACION ADN-ADN.

16.1. Hibridación con no sonda radiactiva.

El filtro de nitrocelulosa utilizado en la hibridación del ADN, se humedeció 2 veces durante 30 seg en SSCx6 a temperatura ambiente, y después se introdujo en una bolsa con la mezcla de prehibridación (20 ml para filtros de 10x10 cm^2), incubándose a 68 °C durante 5 h.

La composición de la mezcla de prehibridación es la siguiente: dodecil sulfato sódico (0,02 % , p/v), N-lauril-sarcosina (0,1 % p/v) y reactivo de bloqueo (0,5 % p/v, Boehringer Manheim, RFA) en SSCx5.

Transcurrido este tiempo de incubación se reemplazó esta mezcla por la de hibridación (3 ml), de igual composición a la anterior pero adicionada del ADN sonda desnaturalizado (calentado durante 10 min, a 95 °C), y se incubó a 68 °C durante una noche en bolsas herméticamente selladas.

Una vez realizada la hibridación, el filtro se lavó dos veces con una solución SSCx2 adicionada de SDS al 0,1 % (p/v), durante 5 min a temperatura ambiente, y dos veces más con una solución más diluida (SSCx0,1, SDS al 0,1 %), en este caso a 68 °C y en agitación continua.

Terminado el proceso de hibridación, se procedió a la detección immunológica del ADN hibridado, usando para ello

anticuerpos antidigoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Boehringer Manheim, RFA). Este enzima, en presencia de azul de tetrafolio y X-fosfato (5-bromo-4cloro-3-indolil-fosfato) como sustrato origina un precipitado de color púrpura. El procedimiento seguido fue el siguiente: la membrana de nitrocelulosa ligeramente humedecida en tampón I (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5- NaCl 150 mM) se incubó en 20 ml de tampón II que contenia 0,5 % reactivo de bloqueo (Boehringer Manheim) disuelto en tampón I durante 30 min. Tras un breve lavado en tampón I, la membrana se incubó de nuevo durante 30 min en 20 ml de tampón I adicionado de 150 mU/ml de solución de anticuerpos (anti-digoxigenina) conjugados con fosfatasa alcalina. El exceso de anticuerpos se eliminó por sucesivos lavados con tampón I durante 15-30 min. Seguidamente la membrana se equilibró con 20 ml del tampón III (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 50 mM, pH 9) durante 2 minutos. El revelado se realizó en 20 ml del tampón III adicionado de 6,75 mg de la sal sódica de azul tetrazolio (NBT) y 3,5 mg de X-fosfato, disueltos previamente en dimetilformadida.

Los filtros, una vez secos, pueden ser fotografiados.

16.2. Hibridación con sonda radiactiva.

Se procedió igual que en el caso anterior con ligeras modificaciones:

1) La sonda marcada con ^{32}P, no necesita ser desnaturalizada antes de añadirla a la mezcla de hibridación, al tratarse de ADN monocatenario. La sonda adicionó a una concentración final de $1x10^6$ cpm/ml de solución de hibridación.

2) Se usaron condiciones menos restrictivas, siendo la temperatura de incubación comprendida entre 38-50 °C.

3) Los lavados, se realizaron con agitación continua a temperatura ambiente; primero en SSCx2 más SDS al 0,1 % (2 x 5 min), y luego con SSCx0,1 más SDS al 0,1 % (2 x 15 min).

Finalmente, una vez secado el filtro sobre papel Whatman a temperatura ambiente, se cubrió con papel de plástico, y se puso en contacto con una película autorradiográfica Kodac X-AR5 ó bien Cronex 4 (Dupont) en un chasis con pantalla intensificadora (Ligthplus, Dupont) a -70 °C entre 2-7 días, dependiendo de la radioactividad existente en el filtro.

17. SECUENCIACION AMINOACIDICA DE AS-48.

17.1. Digestión de AS-48 con proteasas y purificación de los fragmentos originados.

Se emplean fracciones activas del antibiótico AS-48 purificadas a homogeneidad (Galvez *et al.*, 1989d).

17.1.1. Digestión con carboxipeptidasa A:

Alícuotas liofilizadas del antibiótico AS-48 (50 µg) se disolvieron en 100 µl de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 500 mM, y entonces se adicionaron de carboxipeptidasa A hasta una concentración final de 0,3 mg/ml.

Paralelamente se realizó una digestión con carboxipeptidasa B (0,15 mg/ml) en Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM.

Ambos tratamientos se incubaron a 28 °C durante una noche.

Después de la digestión se comprobó la actividad inhibidora frente a la estirpe sensible *E. faecalis* S-47.

17.1.2. Digestión de AS-48 con endopeptidasa V_8 de *Staphylococcus aureus*.

Una fracción del antibiótico liofilizada (300 µg) fue suspendida en 100 µl de bicarbonato amónico 100 mM pH 7,8, y adicionada de 40 µg de endopeptidasa V_8, llevándose a incubar durante una noche a 35 °C.

17.1.3. Digestión de AS-48 con tripsina.

Al igual que en el apartado anterior, 300 µg de AS-48 fueron digeridos durante 2 h a 37 °C, con 20 µg de tripsina disuelta en tampón fosfato sódico 20 mM pH 7.

17.2. Purificación de los péptidos originados por digestión proteolítica del antibiótico AS-48.

Los fragmentos de AS-48 obtenidos tras el tratamiento con las distintas proteasas ensayadas, se separaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), en una columna de fase reversa Vydac C_{18}. La columna fue equilibrada con 10 mM de ácido trifluoroacético (TFA). La separación se efectuó mediante un gradiente entre 0-100 % de isopropanol-acetonitrilo (2:1) en TFA, durante 40 min, con un flujo de

0,5 ml/min, midiéndose la absorbancia del eluyente a 280 nm.

Previamente se llevaron a cabo controles de elución de las enzimas empleadas en los diferentes tratamientos.

17.3. Secuenciación parcial del antibiótico peptídico AS-48.

La secuenciación de los péptidos se llevó a cabo mediante la técnica de degradación secuencial de Edman. El proceso se llevó a cabo en filtros recubiertos con polibreno, en un secuenciador automático a pulsos líquidos Applied Biosystems modelo 747 (California, USA) acoplado en serie a un detector de feniltiohidantoinaminoácidos (Applied Biosystems modelo 190 A). La identificación de los aminoácidos se llevó a cabo automáticamente mediante los programas incluidos en el sistema, siendo posteriormente corroborada mediante inspección visual de los cromatogramas.

18. PREPARACION DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.

Cultivos celulares crecidos en fase logarítmica tardía (5 ml), se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,2. Las células se unieron a un soporte de cristal (portaobjetos) con polilisina, y fijadas posteriormente con glutaraldehido (TAAB) al 2 % en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4. Después de lavar suavemente con tampón cacodilato sódico, las muestras fueron deshidratadas con gradiente de acetona, y en la cámara de Punto crítico y posteriormente metalizadas con oro. La visualización se realizó en un microscopio de barrido Zeiss DSM (Digital Scanning Microscope) 950.

19. TECNICAS INMUNOLOGICAS.

19.1. Inmunización de conejos.

Para la obtención de anticuerpos específicos frente al antibiótico AS-48, se inmunizó un lote de 4 conejos albinos de raza Nueva Zelanda con un peso entre 2-2,5 Kg cada uno. Los conejos fueron inyectados intramuscularmente en hombros y patas con 0,5 ml del antibiótico purificado por cromatografía de intercambio iónico (CM-25), y las cuales fueron emulsionadas con un volumen igual de coadyuvante completo de Freund.

Para la obtención de títulos apreciables de inmunoglobulinas fue necesaria la administración de dosis de recuerdo a las 2, 5, 7 y 15 semanas de la primera inmunización.

El sangrado de los animales a partir de la arteria de la oreja se realizó, antes de la inmunización y a las 3, 8, 10 y 13 semanas siguientes. La sangre obtenida en cada caso se dejó reposar a 28 °C durante una noche y entonces se centrifugó durante 20 min a 2.500xg para la obtención de suero.

19.2. Purificación de la Ig G del suero inmune.

Las fracciones del suero (50 ml), obtenidas de los conejos inmunizados frente a AS-48, se procesaron mediante precipitación con sulfato sódico y posterior cromatografía sobre resina de intercambio iónico DE 52 de Whatman (Johnstone & Thorpe, 1985).

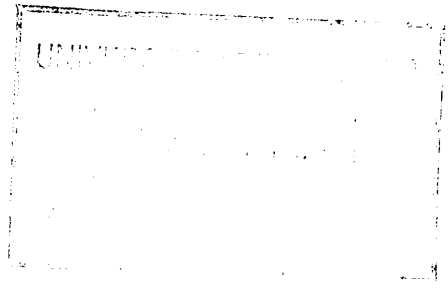
Un primer fraccionamiento con la sal, se realizó al 18 % (p/v). El precipitado obtenido tras 30 min a temperatura ambiente, fue recogido por centrifugación a 3.000xg durante 30 min, y redisuelto hasta 25 ml con agua destilada; y nuevamente precipitado por adición de la misma sal hasta conseguir una concentración del 14 % (p/v). A continuación, se incubó y se recogió el precipitado en las condiciones descritas, disolviéndose finalmente en 15 ml de agua destilada. Por último se dializó frente a tampón fosfato sódico 0,07 M pH 6,3 durante 24 h a 4 °C.

La fracción sometida a diálisis se aclaró mediante centrifugación, y posteriormente fue aplicada a una columna de DE 52 (cm X cm), previamente equilibrada con tampón fosfato 0,07 M pH 6,3. La elución de la muestra se llevó a cabo con este tampón y se midió la absorbancia del eluido a 280 nm recogiéndose fracciones de 10 ml.

En esta cromatografía, las Ig G eluyen con el tampón de equilibrado en un primer pico asimétrico, mientras que las impurezas quedan retenidas en la resina intercambiadora.

19.3. Titulación de anticuerpos por el método ELISA.

Tanto a determinación del grado de inmunización del suero, como la titulación de las fracciones purificadas, se llevó a cabo mediante la técnica ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Para ello, se emplearon placas de poliestireno para microtitulación, con 96 pocillos (Costar, Cambridge MA). Los pocillos se recubrieron con 2 µg del antígeno (AS-48) en 200 µl de tampón PBS a 4 °C durante una noche, para favorecer la unión de AS-48 al pocillo. El exceso de antígeno, se eliminó mediante varios lavados con PBS.



Los pocillos recubiertos de antígeno, se incubaron durante 2 h a 37 °C, con diferentes diluciones de los anticuerpos específicos (anticuerpos primarios) para permitir la formacion de complejos antígeno-anticuerpo. El exceso de anticuerpos se eliminó mediante 3 lavados sucesivos con tampón PBS. Tras el lavado, se añadió el antisuero secundario (diluído 1/2000) anti-Ig de conejo (Invesgen, Instituto Pasteur) marcado con peroxidasa y se incubó durante 2 h a 37 °C.

Las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios, se hicieron en PBS (fosfato sódico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2) adicionado de 1 % y 0,1 % de gelatina respectivamente.

La presencia de anticuerpos específicos anti AS-48 se estableció por la aparición de un precipitado insoluble, debido a la acción de la peroxidasa con el H_2O_2, con el que forma un complejo que reacciona con una sustancia cromógena, capaz de ceder electrones, originándose una molécula coloreada, cuya concentración puede ser determinada por la absorción a 440 nm.

El sustrato de la reacción fue preparado de la siguiente forma: 0,17 ml de una solución al 1 % de ortodianisidina (Merck) en etanol 96 %, se añadieron a 25 ml de PBS que contenía 25 µl de H_2O_2 (30 %). En cada pocillo, se adicionaron 200 µl de esta mezcla de reacción la cual, una vez desarrollado el color, se detuvo por adición de una solución acuosa de ácido sulfúrico (1/8, v/v).

La recta de calibrado realizada para determinar el título de anticuerpos, se llevó a cabo empleando

concentraciones crecientes de antígeno en los pocillos (0-100 ng/pocillo).

19.4. Transferencia de AS-48 a un soporte de nitrocelulosa.

La presencia de AS-48 se reveló en membranas de nitrocelulosa (NC) mediante el empleo de anticuerpos específicos. Las muestras problemas, fueron en primer lugar sometidas a electroforesis en PAGE-SDS (14 %), empleando el equipo "Miniprotein" (BioRad), a corriente constante de mA, hasta que el colorante de azul de bromofenol alcanzó el final del gel.

Los geles fueron entonces electroforéticamente transferidos a hojas de nitrocelulosa, como describen Tobcoin *et al* (1979), usando el equipo semiseco Novablot (LKB) en sistema continuo. El tampón de transferencia empleado tenía la siguiente composición: glicina 192 mM, Tris-HCl 25 mM, SDS al 0,01 %, metanol 12 %, pH 8,3.

La transferencia se llevó a cabo durante una hora a corriente constante de 0,8 mA/cm^2 de la unidad de transferencia.

La presencia de AS-48 en la membrana de NC, se puso de manifiesto mediante revelado con anticuerpos anti AS-48. Las hojas de NC una vez bloqueadas con PBS adicionado de BSA Al 3 %, se incubaron en bolsas de plástico herméticamente selladas, con una dilución adecuada del anticuerpo primario durante 2 h a 37 °C con agitación continua, y entonces se lavaron con PBS varias veces. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (diluida 1/200), y se incubó durante 90 min a 37 °C con agitación suave. Terminada la incubación, la NC se

lavó tres veces con tampón PBS.

Finalmente se adicionó el sustrato de la reacción y la NC se incubó en la oscuridad durante 10 min. Es sustrato de la reacción estaba formado por:

Una vez que aparecieron las bandas, la reacción se detuvó con una solución de $CoSO_4$ durante una noche a 4 °C. La NC una vez seca, se fotografió y se guardo en la oscuridad.

RESULTADOS

I) ESTUDIO SOBRE LOS PLASMIDOS DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* SUBSP. LIQUEFACIENS S-48

1. Perfil plasmídico de las estirpes de *Enterococcus*.

1.1 Análisis del perfil plásmidico de la estirpe S-48 de *Enterococcus faecalis*.

Actualmente hay evidencias más que suficientes, para asegurar que los genes involucrados en la producción e inmunidad de bacteriocinas, y sustancias tipo bacteriocinas (por ejemplo ciertos antibióticos peptídicos, microcinas) en la mayoría de los casos, se encuentran localizados sobre ADN extracromosómico, tal como fue comentado en el apartado de Introducción de esta Memoria. Así, y como paso previo para el estudio más en profundidad de los determinantes genéticos responsables de la producción de los antagonistas por *E. faecalis* S-48, fue necesario conocer el perfil plasmídico de esta bacteria.

Siguiendo la técnica de Anderson y McKay (1983) modificada en este trabajo, en la cual se realiza una precipitación previa de gran parte del ADN cromosómico de alto peso molecular, se identificaron en la raza silvestre S-48 de *E. faecalis*, al menos 4 formas de ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc), que denominamos: pMB1,

pMB2, pMB3, pMB4 con pesos moleculares respectivamente de ...
(Fig. 1). La determinación de los pesos moleculares (en Kb) se ha realizado tal y como se indica en el apartado de Material y Métodos. Como patrón de Pm, hemos utilizado los plásmidos de *Escherichia coli* V517 (Macrina *et al.*, 1978), con Pm de 53,7; 7,2; 5,5; 3,9; 3; 2,7; 2,1 Kb.

Los restos de fragmentos de ADN cromosómico que están presentes en estas preparaciones, generalmente aparecen como bandas más o menos difusas en la región de 30-35 Kb en los geles de agarosa (0,6 %), (Fig. 1).

Este perfil es similar al obtenido en preparaciones a gran escala de ADN plásmidico, purificado mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad de ClCs-BrEt. Sin embargo en estas preparaciones, siempre aparecían restos de los plásmidos de mayor peso molecualr, pMB1 y pMB2, en la región del ADN cromosómico debido a rotura de los mismos durante el procesado del ADN (Fig. 2).

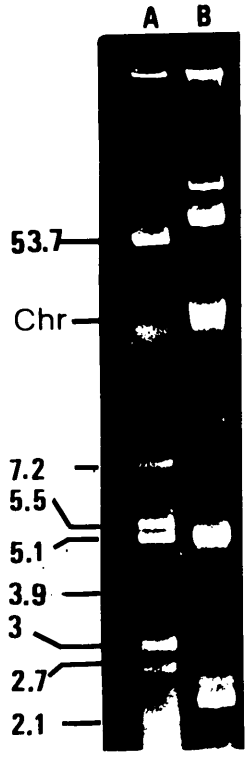


Figura 1. Perfil plasmídico de la estirpe silvestre S-48 de *E. faecalis* obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa (0,6 %). A) *E. coli* 1730 (plásmidos de referencia de pesos moleculares); B) *E. faecalis* S-48.

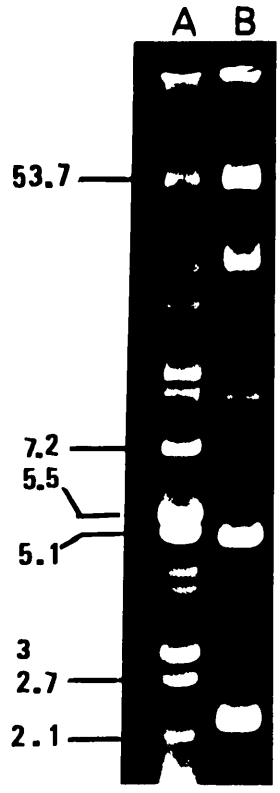


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa (0,6 %) de plásmidos procedentes de la cepa silvestre S-48 de *E. faecalis*, purificado mediante grandiente de densidad de CsCl-EtBr. A) *E. coli* 1730 (plásmidos de referencia de pesos moleculares); B) *E. faecalis* S-48.

UNIVERSIDAD

1.2. Estudio del perfil de plásmidos de los mutantes AS-48⁻ y Bc-48⁻ derivados de la cepa silvestre de *E. faecalis* S-48.

El empleo de tratamientos mutagénicos, crecimiento en presencia de bromuro de etidio y anaranjado de acridina, así como crecimiento a altas temperaturas (45 °C), nos permitió en trabajos previos (Martínez-Bueno, 1986; Martínez-Bueno *et al.*, 1990) corroborar la existencia de 2 inhibidores bacterianos antes mencionados, AS-48 y Bc-48., mediante la selección y aislamiento de mutantes que habían perdido la capacidad de producir alguno de ellos.

Así se pudieron establecer 3 grupos de mutantes cuyo perfil plasmídico ha sido estudiado en la presente memoria. Ls resultados obtenidos a partir de minipreparaciones de los mismos se exponen en la figura 3.

A) Grupo I: a el pertenece el mutante A-48-32, curado de la producción e inmunidad frente a la bacteriocina Bc-48, mediante tratamiento con anaranjado de acridina. En el perfil plasmídico del mismo (Fig. 3, línea B), aparecen los 4 plásmidos presentes en la estirpe salvaje, pudiéndose apreciar una clara delección en el plásmido pMB1, puesto que presenta un Rf mayor que el de S-48 (Fig. 3, línea A).

B) Grupo II: engloba mutantes que habían sido curadas de la producción del antibiótico peptídico AS-48. Entre ellos sin embargo cabe hacer una nueva subdivisión, en función de los niveles de bacteriocina Bc-48 que producen:

- mutantes con niveles de producción similares a los de la estirpe salvaje: A-48-9 y A-48-15, obtenidos mediante tratamiento con anaranjado de acridina. Se pueden observar la pérdida del plásmido

pMB2 (Fig. 3, líneas C, D, E, F).

- el mutante B-48-28 (AS-48$^-$), seleccionado tras el tratamiento con bromuro de etidio, y caracterizado claramente como hiperproductor de Bc-48, lo que va acompañado de una nueva banda de ADNccc no encotrada en la estirpe de partida, a más de la desaparición de la banda correspondiente a pMB2 (Fig. 3, línea I .

C) Finalmente el grupo III, que incluye a dobles mutantes, es decir, a mutantes que habían perdido la capacidad de producir las dos sustancias antagonistas, y corresponden con los mutantes B-48-2 y B-48-47. El análisis de los plásmidos de estos mutantes, mostró la desaparición del plásmido pMB2 y la aparición de una banda pMB1 con mayor movilidad electroforética, poniendo de manifiesto la existencia de una delección similar a la del mutante perteneciente al grupo anterior (A-48-32) (Fig. 3, B, G, H).

Ninguno de los mutantes estudiados, mostró la pérdida total del plásmido pMB1. Tampo se obtuvieron datos que permitieran establecer la existencia de alteraciones físicas en los miniplásmidos pMB3 y pMB4 de S-48.

1.3. Selección de nuevos mutantes y análisis de su perfil plasmídico.

Con objeto de obtener mutantes totalmente curados del plásmido pMB1, hasta el momento no disponibles, se incubó la estirpe S-48 en presencia de concentraciones crecientes de bromuro de etidio (1-5 µg/ml) durante 48 horas (Stanisich, 1988).

En estos experimentos se obtuvieron, con una tasa relativamente alta (1,8 %), mutantes no productores de AS-48 (denominados como mutantes B1-B9), y también con una frecuencia del 0,2 % , dobles mutantes curados de AS-48 y Bc-48. El perfil de plásmidos de estos nuevas cepas, mostró unos resultados muy similares a los anteriormente comentados. En todos los casos, las cepas no productoras de AS-48 habian pérdido el plásmido pMB2, y en los dobles mutantes, carentes igualmente de pMB2, el plásmido pMB1 aparecía de nuevo deleccionado.

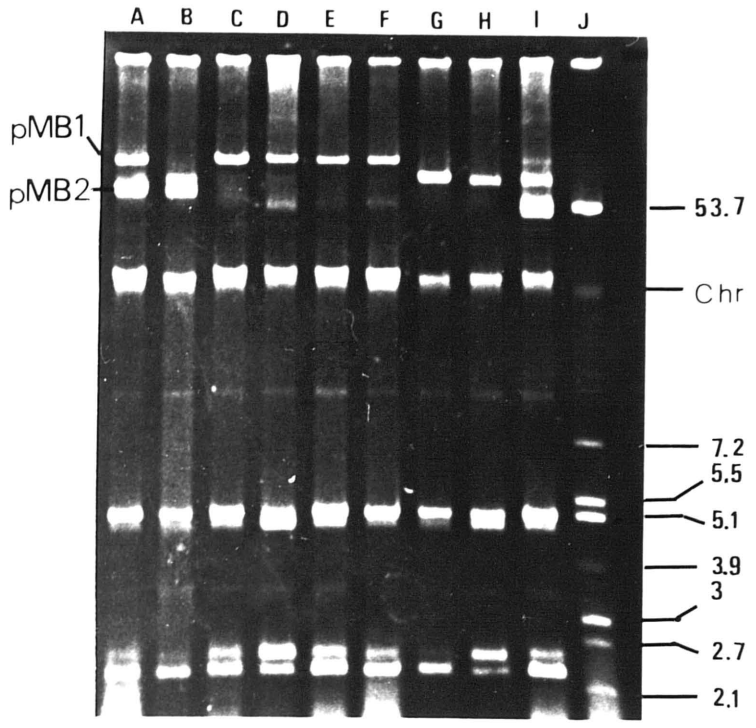


Figura 3. Perfil de plásmidos de *E. faecalis* S-48 y de los mutantes derivados del mismo. A) S-48, cepa salvaje; B) mutante Bc48⁻ perteneciente al grupo I: A-48-32, con el plásmido pMB1 deleccionado; C) y D) dos colonias del mutante AS-48⁻: A-48-9, curadas del plásmido pMB2; E) y F) dos colonias del mutante AS-48⁻: A-48-15, curadas del plásmido pMB2; G y H) mutantes AS-48⁻ Bc-48⁻ del grupo III: B-48-2 y B-48-47, ambos curados del plásmido pMB2 y con el pMB1 deleccionado; I) mutante hiperproductor de Bc-48: B-48-28, curado del plásmido pMB2 y con el pMB1 deleccionado; J) *Escherichia coli* V517, plásmidos de referencia. Los números de la derecha representan el tamaño molecular de los plásmidos de referencia expresado en kilobases (Kb). Chr, posición del ADN cromosómico. El ADN fue separado electroforéticamente en gel de agarosa a 75 V durante 4 h.

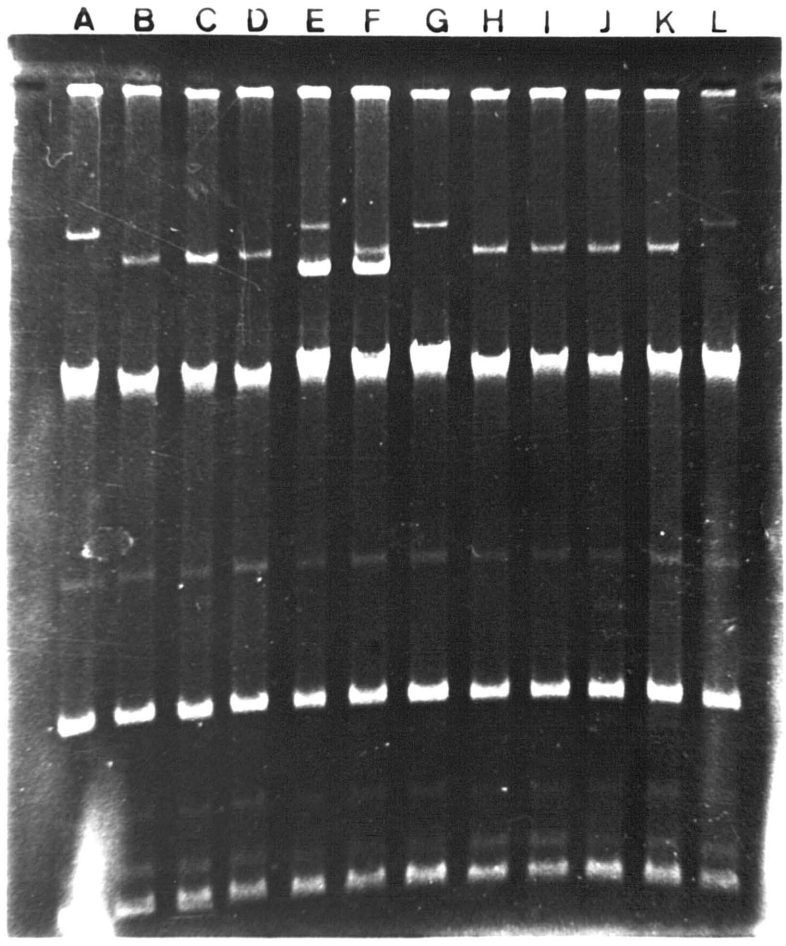


Figura 4. Perfil plasmídico de los mutantes obtenidos tras crecimiento continuado en presencia concentracioes crecientes de bromuro de etidio. Líneas A, G y L), mutantes AS-48$^-$, Bc-48$^+$ (designados como B1-B9). Líneas B, C, D, H, I, J, K) dobles mutantes AS-48$^-$ Bc-48$^-$; E) cepa salvaje S-48; F) mutante AS-48$^-$ Bc-48$^+$, A-48-32 (perteneciente al grupo I, anteriormente descrito). La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 0,6 % en TBE, a 75 V durante 4 h.

2. Otras propiedades codificadas por los plásmidos de *E. faecalis* S-48: Respuesta de *E. faecalis* a feromonas.

La cepa OG1X de *E. faecalis* (Ike *et al.*, 1983), fue seleccionada para los experimentos de transferencia de material genético por varias circunstancias. En primer lugar es una cepa libre de plásmidos, que excreta al medio de cultivo durante su crecimiento exponencial, diversos péptidos denominados feromonas sexuales que inducen a razas portadoras de algunos plásmidos, la expresión de ciertos genes responsables de unas proteínas de superficie, que conducen a la agregación celular. Por otra parte, OG1X es sensible a los inhibidores AS-48 y Bc-48, y presenta otras características bien diferenciadas de la estirpe salvaje S-48, como son la resistencia a estreptomicina (600 µg/ml) y no hidroliza la gelatina porque carece de actividad proteásica extracelular (gelatinasa$^-$).

Así pues, la respuesta a las feromonas de OG1X de S-48 y de los diferentes mutantes, nos podrían indicar la capacidad de transmisión de los diferentes plásmidos mediante proceso de conjugación. Para ello, se suspendieron las células a ensayar en fase exponencial, con sobrenadantes procedentes de la estirpe OG1X en fase logaritmica (3-5 h). Tras 30 min de contacto, se podían observar la presencia de agregados celulares, a modo de grumos, en aquellas que respondían positivamente a las feromonas (Tabla 1).

TABLA 1. Respuesta a feromonas producidas por *E. faecalis* OG1X de S-48 y los mutantes.

	Estirpes ensayadas				
	S-48	A-48-32	A-48-15	B-48-47	B-48-28
Respuesta a la agregación	+	+	+	−	−

(+) Agregación celular; (−) no hay agregación celular

Fenotipo de las estirpes ensayadas. S-48 : $AS\text{-}48^{-}$ $Bc\text{-}48^{+}$; A-48-32: $AS\text{-}48^{+}$ $Bc\text{-}48^{-}$; A-48-15: $AS\text{-}48^{-}$ $Bc\text{-}48^{+}$; B-48-47: $AS\text{-}48^{-}$ $Bc\text{-}48^{-}$; B-48-28: $AS\text{-}48^{-}$ $Bc\text{-}48^{+}$.

II) ESTUDIO SOBRE LOS DETERMINANTES GENETICOS DE BC-48

3. Transferencia por conjugación de la bacteriocina Bc-48.

Para determinar si el carácter bacteriocinogénico Bc-48 podría ser transmitido de forma conjugativa, el mutante A-48-15 Bc-48$^+$, curado del plásmido pMB2, se seleccionó como donador en el experimento de conjugación con la raza OG1X de *E. faecalis* (Sm^r, gel$^-$ y Bc-48^s), siguiendo la técnica de cruce en filtro descrita en Material y Métodos (apartado 11.2). La selección de los transconjugantes se llevó a cabo en base a la resistencia a estreptomicina y producción de Bc-48 sobre la misma estirpe OG1X utilizada como receptora en este experimento. Los transconjugantes aparecidos se denominaron T1-4.

La frecuencia de la transferencia del carácter bacteriocinogénico Bc-48 en estos cruces fue de $8x10^{-3}$ por célula donadora (tabla 2).

Como controles, estos cruces se realizaron además en presencia de ADNasa I, no observándose reducción apreciable en la frecuencia de transferencia obtenida, lo que descartaba la transformación (tabla 2). Tampoco obtuvieron transconjugantes Bc-48$^+$, cuando los cruces se realizaron con sobrenadantes libres de células donadoras o bien cuando se emplearon células donadoras tratadas con cloroformo para hacerlas no viables (tabla 2).

TABLA 2. Transferencia del carácter Bc-48^{+} mediante conjugación, empleando A-48-15 como donadora y OG1X como receptora.

Donador en el cruce[A)]	Frecuencia/donador[B)]
A-48-15	8×10^{-3}
A-48-15 en presencia de ADNasaI	$3,2 \times 10^{-2}$
Sobrenadante de A-48-15	$<10^{-10}$
A-48-15 tratada con cloroformo	$<10^{-10}$

A) 0,05 ml del donador mezclado con 0,5 ml del receptor
B) Calculado de $1,25 \times 10^{7}$ UFC (unidades formadoras de colonias)

3.1. Caracterización de los transconjugantes Bc-48.

Las nuevas razas T1-4 se seleccionaron como transconjugantes de la bacteriocina Bc-48 en base a sus caracteristicas fenotípicas: Sm^r, **Gelatinasa**$^-$ (tabla 3), a más de la producción e inmunidad frente a Bc-48 (tabla 4).

El comportamiento frente a la estreptomicina se determinó mediante el crecimiento de los transconjugantes en placas que contenían 600 µg/ml del antibiótico. La actividad gelatinasa se estableció por la aparición de un halo transparente alrededor de las colonias con dicha actividad encimática crecidas en placas de BHA adicionadas de gelatina al 1 %. La producción de Bc-48 se ensayó frente a OG1X, siguiendo el método de la doble capa, descrito en el apartado 5.1 de Material y Métodos.

TABLA 3. Características fenotípicas de A-48-15 y OG1X, y de los transconjugantes obtenidos.

	Sm (600 µg/ml)	Gelatinasa	Inhibición sobre OG1X
A-48-15	S	+	+
OG1X	R	-	-
T1-4	R	-	+

S: sensibilidad a 600 µg/ml; R: resistencia a 600 µg/ml de estreptomicina; (+): respuesta positiva; (-): respuesta negativa

El espectro de acción de los transconjugantes T1-4, fue similar al de la estirpe donadora A-48-15. Se muestra en la tabla 4. Igualmente en ella se puede apreciar la resistencia de los mismos a la bacteriocina Bc-48 producida por las otras cepas.

TABLA 4. Espectro de acción de los transconjugantes y sensibilidad cruzada frente a S-48 y a las estirpes productoras de bacteriocina Bc-48.

	Estirpes productoras			
	T1-4	A-48-15	B-48-28	S-48
Estirpes indicadoras				
S-47	+	+	+	+
S-72	+	+	+	+
S-29	-	-	-	+
OG1X	+	+	+	+
B-48-47	+	+	+	+
A-48-15	-	-	-	+
A-48-9	-	-	-	+
B-48-28	-	-	-	+
T1-4	-	-	-	+
A-48-32	+	+	+	+

(+): inhibición; (-): no inhibición

Por otra parte y para completar la caracterización de la bacteriocina producida por los transconjugantes, se comprobó su producción en medio líquido BHI-T, así como la curva de producción a las diferentes horas de crecimiento de T1-4. Sin embargo sólo se detectó actividad inhibidora entre las 5-6 h y en niveles muy inferiores a los de la cepa donadora A-48-15. Los resultados de este experimento, aparecen reflejados en el apartado 4.2.

La confirmación del carácter plasmídico de Bc-48, fue obtenida al examinar el perfil de los transconjugantes T1-4 mediante electroforesis en gel de agarosa (0,6 %) (Fig. 5). En todos ellas se podía apreciar una única banda de aproximadamente 52 Kb (de acuerdo con su movilidad electroforética) que sorprendentemente no coincidía con alguna de las bandas presentes en la estirpe donadora A-48-15.

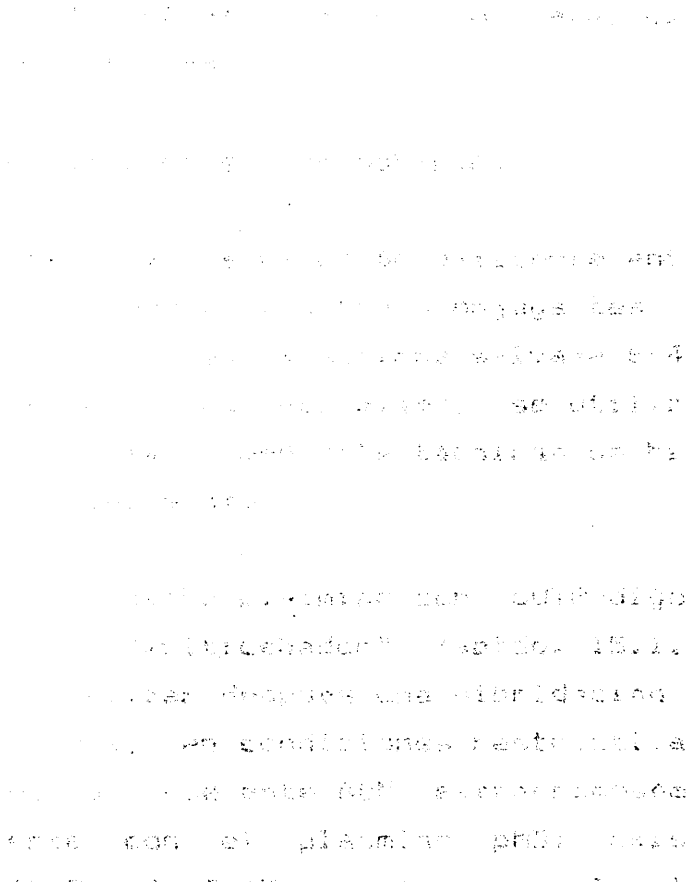


Figura 6. Perfil plasmídico de las estirpes empleadas en la transferencia de conjugación y de los transconjugantes seleccionados Bc-48^{+}. A) estirpe OG1X, receptora; B), C) y D) diferentes colonias caracterizadas como transconjugantes Bc-48^{+}: T1-4; E) estirpe A-48-15, donadora; ( ) corresponde al nuevo plásmido de 52 Kb correspondiente a los transconjugantes, obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa (0,6 % a 75 V durante 4 h).

4. Localización plasmídica de los genes de Bc-48 en la estirpe silvestre S-48.

4.1. Estudios de hibridación ADN-ADN.

Para determinar la relación existente entre el plásmido de 52 Kb albergado en los transconjugantes Bc-48$^+$ y los plásmidos existentes en la estirpe salvaje S-48, asi como en los mutantes derivados del mismo, se utilizó aquel como sonda para localizar, mediante técnicas de hibridación ADN-ADN, el origen del mismo.

Trás marcar dicho plásmido con dUTP-digoxigenina, por el método del "multicebador" (aptdo. 15.1, Material y Métodos), y realizar después una hibridación sobre membrana de nitrocelulosa, en condiciones restrictivas (68 °C), se puedo demostrar que este ADN extracromosómico hibridaba específicamente con el plásmido pMB1 existente en los mutantes A-48-9, A-48-15 y en la raza silvestre S-48 (Fig. 7B, líneras 4, 5, 6). De igual forma se puede observar hibridación con el plásmido deleccionado pMB1 (pMB1-del) del mutante B-48-47 (Fig. 7B, línea 3).

Este plásmido en los transconjugantes Bc-48$^+$, al transconjugantes T1-4 con pMB1, fue denominado pMB1.1.

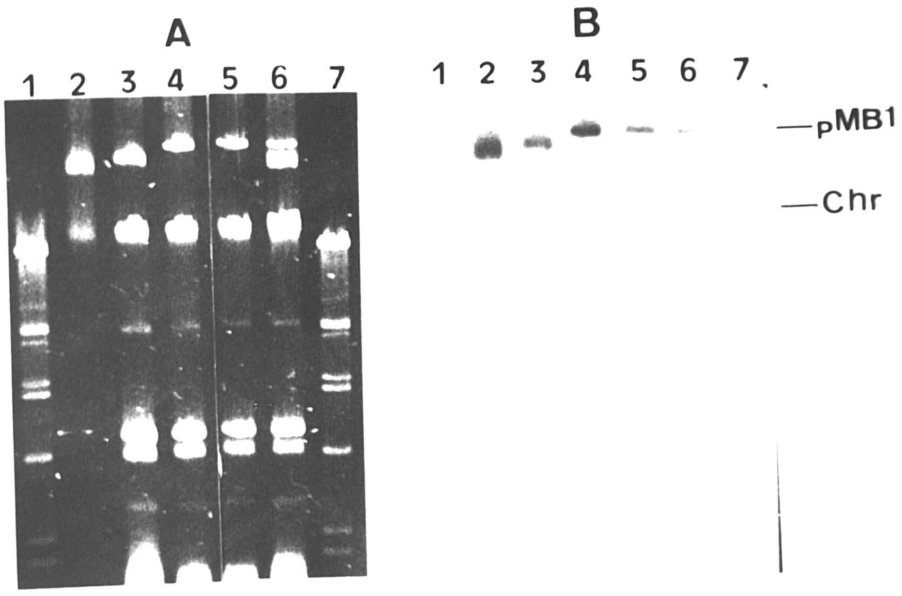


Figura 7. Análisis plasmídico en gel de agarosa (0,6 %) (A) e hibridación del plásmido pMB1.1 con los de *E. faecalis* (B), marcado con dUTP-Dig. Las condiciones experimentales se describen en el apartado correspondiente de Material y Métodos. 1) lambda *Hind* III; 2) transconjugante T1-4; 3) B-48-47; 4) A-48-9; 5) A-48-15; 6) S-48; 7) lambda *Hind* III

4.2. Transferencia de pMB1.1 a mutantes curados de Bc-48

4.2.1. Transformación de B-48-47 con el plásmido pIL253.

Para ello se obtuvieron protoplastos del mutante B-48-47, curado de AS-48 y Bc-48, (apartado 12 de Material y Métodos), a los cuales se les introdujo mediante experimentos de transformación genética, el plásmido pIL253 que confiere resistencia a eritromicina (10 µg/ml), con objeto de disponer de una maracador para poder selecionar los posibles retro-transconjugantes que se produjeran. El plásmido pIL253 fue aislado a gran escala a partir de un cultivo de *Lactococcus lactis* IL1837 (Simon, 1988), mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad CsCl-EtBr.

La frecuencia de transformación del plásmido pIL253 sobre protoplastos de B-48-47, fue de 5 x 10^3 transformantes por µg de ADN empleado. A estas nuevas razas, se les denominaron B-48-47-E.

4.2.2. Retroconjugación de pMB1.1 a mutantes curados de Bc-48.

Se ha estudiado la restauración del fenotipo Bc-48 en *E. faecalis*, mediante la transferencia del citado carácter de los transconjugantes T1-4 (OG1X: pMB1.1) a B-48-47-E, un doble mutante curado del plásmido pMB2 y con el pMB1 deleccionado, y resistente a eritromicina (10 µg/ml), para observar la influencia que pudiera tener la coexistencia de 2 plásmidos similares en la misma cepa, así como la estabilidad de los mismos.

La transferencia de pMB1.1 a B-48-47-E, se realizó según la técnica de conjugación sobre filtro. La selección

de los posibles transconjugantes se hizo en base a la resistencia a la eritromicina (5 µg/ml) y a la producción del inhibidor Bc-48 sobre la propia estirpe receptora empleada como indicadora B-48-47-E.

El carácter Bc-48$^+$ se logró transferir a estos mutantes con una elevada frecuencia ($5x10^{-2}$ por célula donadora). Estos nuevos transconjugantes, además de producir la bacteriocina Bc-48, adquirieron la inmunidad frente a la misma, como se demuestra en los resultados expuestos en las tablas 5 y 6.

En la tabla 5 se expone el comportamiento de las estirpes seleccionadas como indicadoras en este trabajo, para establecer el espectro de acción de los 10 transconjugantes seleccionados aleatoriamente en base a sus características fenotípicas: eri^r, Gel$^+$ y producción del inhibidor. Igualmente se muestra la inmunidad de los mismos frente a la bacteriocina producidos por los mutantes pertenecientes al grupo II: A-48-15, A-48-9, B-48-28, todos ellos productores de Bc-48.

El perfil plasmídico de los nuevos transconjugantes seleccionados, realizado como habitualmente en gel de agarosa (0,6 %), se exponen en la figura 8. La presencia del plásmido pMB1.1 en todos ellos, demostraba la retro-transferencia del mismo y la confirmación de que en dicho plásmido se hallan presentes los genes responsables de la producción e inmunidad a Bc-48. Curiosamente estas razas mostraban además la banda pMB1-del, lo que demostraba la compatibilidad entre las mismas.

Asimismo, se comprobó la estabilidad del carácter adquirido mediante sucesivas resiembras en medio BHA-T, así

como el perfil plasmídico que permaneció estable en todas las generaciones ensayadas. A estas nuevas cepas se las designaron como B-48-47E1.

TABLA 5 . Espectro de acción de los nuevos transconjugantes (B-48-47E1) resultantes del cruce T1-4 (OG1X:pMB1) x B-48-47-E

	Estirpes productoras (transconjugantes)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
E. indicadoras										
S-47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B-48-47-E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A-48-32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A-48-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) sensibilidad frente al inhibidor producido por los re-trotransconjugantes del cruce T1-4 x B-48-47-E.

(-) resistencia y/o inmunidad frente al inhibidor producido por los retrotransconjugantes.

TABLA 6. Sensibilidad frente a Bc-48 de los nuevos transconjugantes resultantes del cruce T1-4 (OG1X: pMB1.1) X B-48-47-E, por diferentes razas productoras de Bc-48.

	Estirpes indicadoras (transconjugantes)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
E. productoras (grupo II)										
A-48-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-48-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B-48-28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S-48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) inhibición sobre estirpes indicadoras; (-) no inhición sobre las estirpes indicadoras.

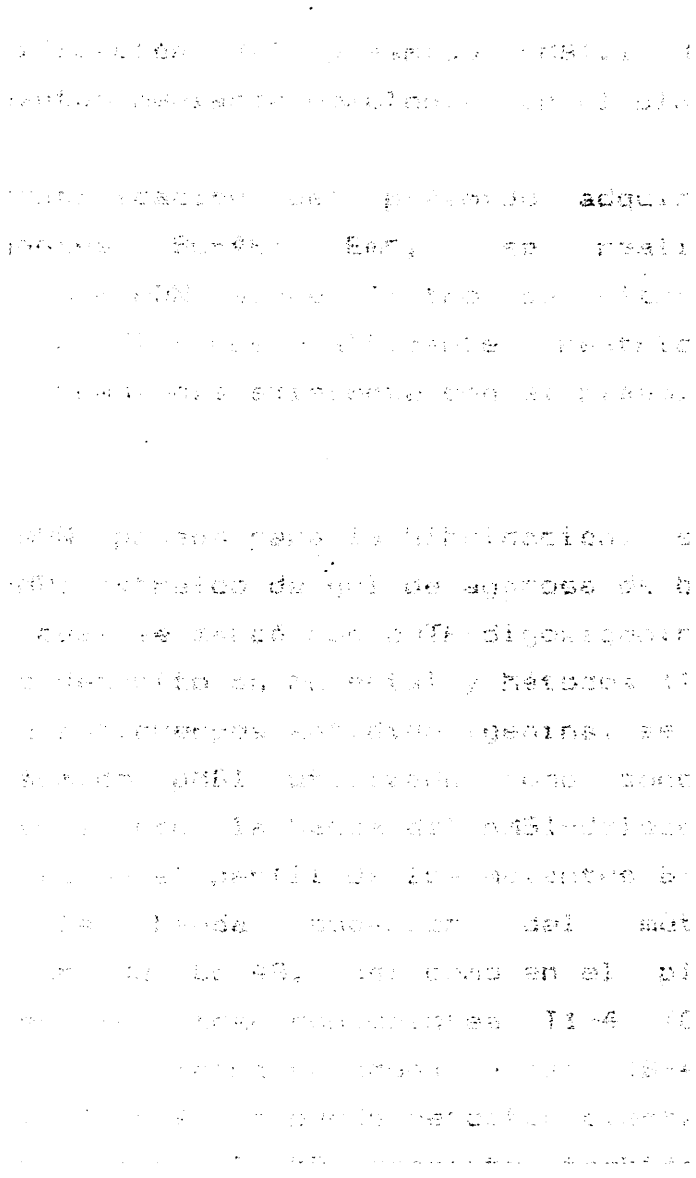


Figura 8. Detección de plásmidos en *E. faecalis* S-48, mutantes, y retro-transconjugantes.

4.3. Identificación del plásmido pMB1.1 de los retro-transconjugantes mediante homología con el plásmido pMB1.

La identificación del plásmido adquirido por los transconjugantes Bc-48+ Em^r, se realizó mediante hibridación ADN-ADN sobre filtro de nitrocelulosa, y utilizando condiciones altamente restrictivas, para comprobar la homología existente con el plásmido silvestre pMB1.

Como ADN prueba para la hibridación, se utilizó el plásmido pMB1 extraído de gel de agarosa de bajo punto de fusión, el cual se marcó con dUTP-digoxigenina, siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos (15.1). Tras el revelado con anticuerpos antidigoxigenina, se pudo compropar que el plásmido pMB1 utilizado como sonda, hibridaba específicamente con la banda del pMB1-deleccionado (pMB1-del) presente en el perfil de los mutantes B-48-47 y B-48-47E, con la banda superior del mutante B-48-28 hiperproductor de Bc-48, asi como en el plásmido pMB1-1 existente en los transconjugantes T1-4 (OG1X:pMB1.1) y transferido a los retrotransconjugantes (B-48-47-E:pMB1.1) (Figura 9). También se puede detectar cierta homología del plasmido pMB1 con el pMB2 descrito también en la cepa salvaje S-48, asi como con una banda de ADN de aproximadamente 50-69 Kb, y que se detecta tanto en S-48 como en el mutante productor de Bc-48 (A-48-15), posiblemente por tratarse de formas derivadas del mismo plásmido.

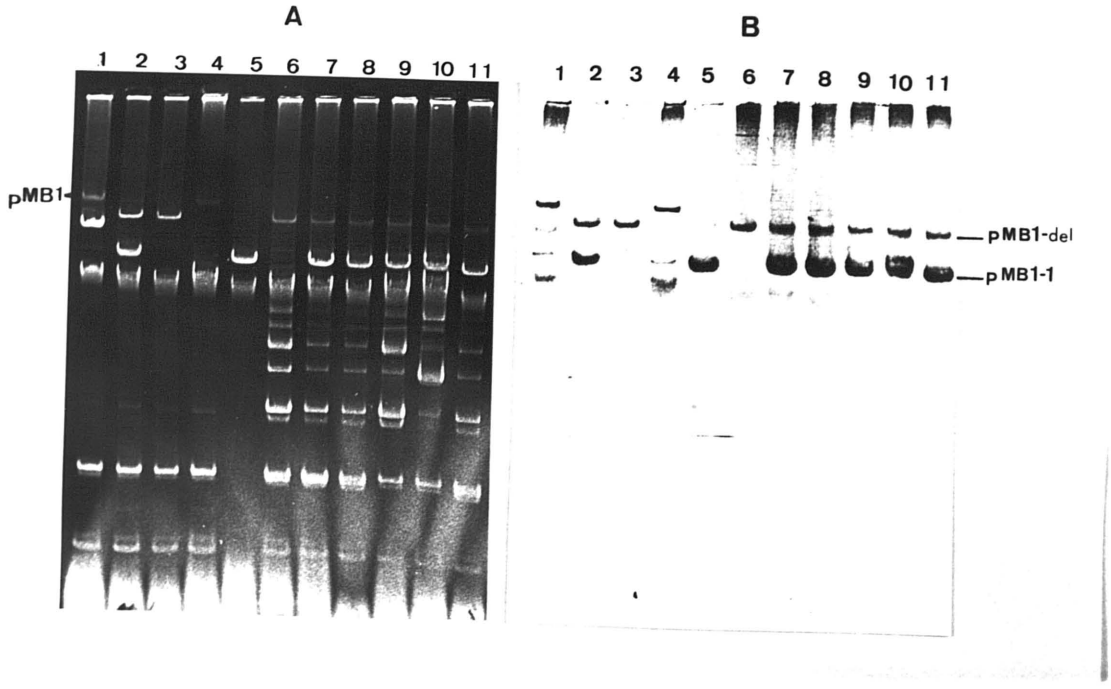


Figura 9. (A) Análisis de plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa y (B) hibridación del plásmido pMB1 marcado con dUTP-Dig en membranas de nitrocelulosa. 1: S-48; 2: B-48-28; 3: B-48-47; 4: A-48-15; 5: transconjugante T1-4 (OG1X:pMB1.1); 6: B-48-47-E, transportando pIL253; 7, 8, 9, 10, 11: diferentes retro-transconjungantes albergando pMB1.1, pMB1-del y pIL253, y designados como B-48-47E1. pMB1-del, es la forma deleccionada de pMB1.

4.4. Producción en medio líquido de Bc-48 por los transconjugantes que albergan el plásmido pMB1.1

El ensayo se realizó sobre las cepas T1-4 (OG1X: pMB1.1) y B-48-47E1 (B-48-47E: pMB1.1), del modo descrito en el apartado 5.2 de Material y Métodos. Los resultados obtenidos muestran que la producción de Bc-48 es cuantitativamente diferente en cada una de las cepas que contienen el plásmido pMB1.1 (Fig. 10). De modo que mientras que en T1-4 apenas se obtenían títulos visibles (sólo se detectaba un ligera inhibición sobre la estirpe indicadora S-47 a las 5 horas de crecimiento), en cambio los mutantes inicialmente no productores de Bc-48 y a los que se le habían transferido el plásmido pMB1.1, eran superproductores de la bacteriocina Bc-48, con respecto de las células A-48-15, obteniéndose títulos de Bc-48 similares a los del mutante hiperproductor B-48-28.

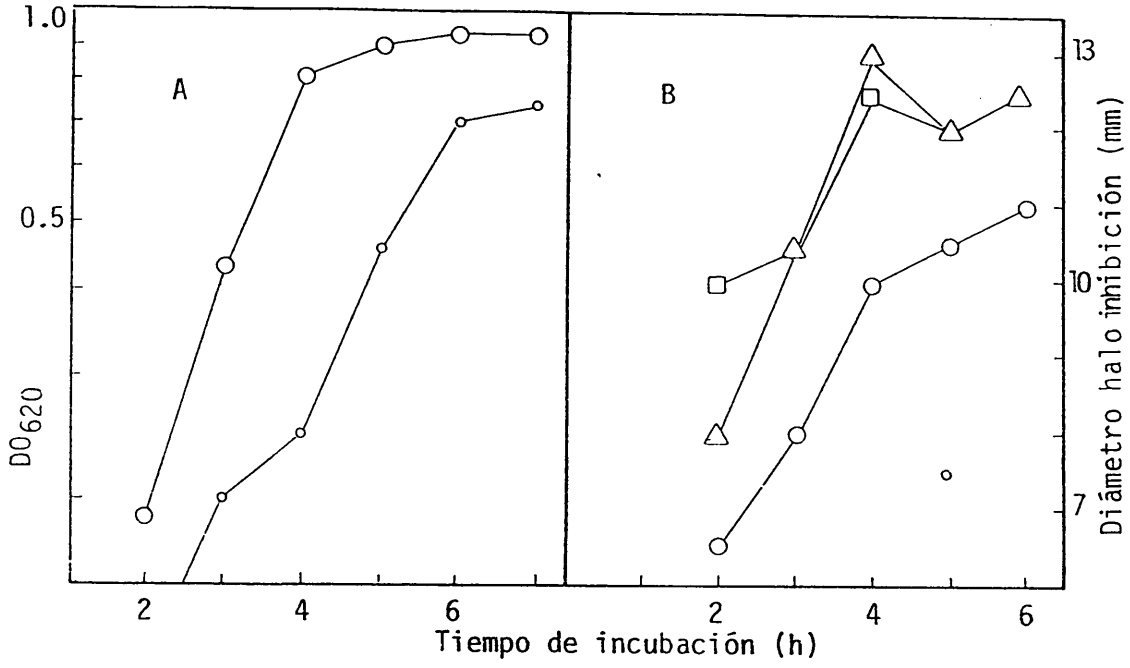


Figura 10. Curvas de crecimiento (A) y producción (B) de actividad inhibidora Bc-48 frente a *E. faecalis* S-47. En (A) se representan los resultados obtenidos con A-48-15, B-48-28, B-48-47E: pMB2 ( ) y T1-4 ( ). En (B) se representan los resultados obtenidos con las estirpes A-48-15 ( ), B-48-28 ( ), B-48-47E :pMB2 ( ) y T1-4.

5. Análisis de restricción del plásmido pMB1.1

Un total de 10 enzimas han sido utilizadas para analizar mediante endonucleasas de restricción el plásmido pMB1.1, purificado mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad CsCl-EtBr. No se ha investigado los sitios de corte del plásmido original pMB1, debido a la dificultad de obtención y purificación del mismo, que en las necesarias manipulaciones se rompe, dado su alto peso molecular, y se recupera en muy bajo rendimiento.

El plásmido pMB1.1, fue digerido con las endonucleasas *Eco* RI, *Eco* RV, *Bam* HI, *Bgl* II, *Hind* III, *Sma* I, *Xba* I, *Sac* I, y *Xho* I. Los distintos fragmentos de restricción hallados, aparecen en la figura 11.

De todas las enzimas ensayadas, sólo *Sac* I, tenía un sitio único de corte, no existiendo puntos de reconocimiento para *Xho* I (línea I).

En la tabla 7, se detallan los Pm de los fragmentos de restricción obtenidos con estas enzimas. La suma total nos permite asignar un tamaño molecular aproximado para el plásmido pMB1.1 de 52 Kb, concordante con el valor dado anteriormente.

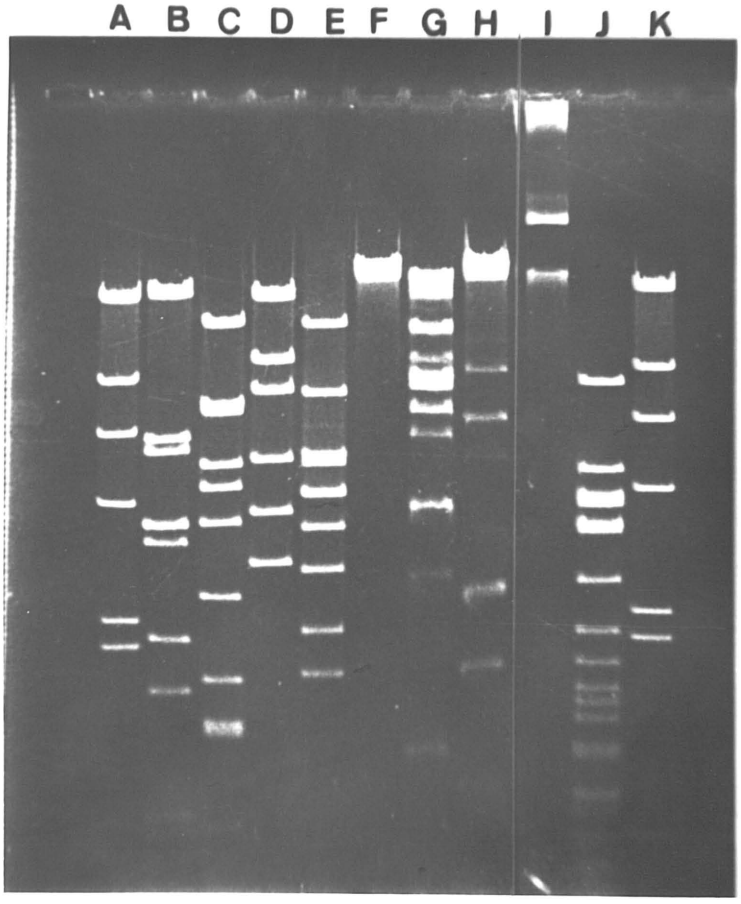


Figura 11. Restricción del plásmido pMB1.1 con las endonucleasas de restricción indicadas. A) lambda *Hind* III; B) *Eco* RI; C) *Eco* RV; D) *Bam* HI; E) *Bgl* II; F) *Sac* I; G) *Pst* I; H) *Xba* I; I) *Xho* I; J) *Hind* III; K) lambda *Hind* III.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
15 NOV. 1990
COMISION DE DOCTORADO

TABLA 7. Peso molecular del plásmido pMB1.1 digerido con distintas enzimas.

Enzima	No. fragmentos	Peso molecular fragmentos
Eco RI	10	28, 6.2, 5.7, 3.7, 3.3, 2.1 1.5, 0.72, 0.66, 0.6
Eco RV	11	6, 7.6, 7.1, 5.2, 4.7, 3.8, 2.5, 1.7, 1.2, 1.1, 0.7
Bam HI	6	22, 10, 8.5, 5.4, 4.2, 3.1
Bgl II	9	17, 8.5, 6, 5.4, 4.6, 3.9, 3, 2.15, 1.7
Sac I	1	52
Xba I	6	30, 9.5, 7, 2.6, 1.8, 1.1
Hind III	ND	ND

El tamaño de los distintos fragmentos van expresados en kilobases de aucerdo con la movilidad electroforética respecto a los patrones del digerido *Hind* III del fago lambda (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2, 0.6 Kilobases respectivamente).

ND: no determinado

III) ESTUDIOS SOBRE LOS DETERMINANTES GENETICOS DE AS-48

6. Transferencia por conjugación del carácter de resistencia al antibiótico AS-48 (AS-48^R).

6.1. Obtención de transconjugantes AS-48^R.

En este experimento, se usó como donador el mutante hiperproductor de AS-48 *E. faecalis* A-48-32, que al mismo tiempo estaba curado de la producción de Bc-48, y como receptor la raza OG1X de *E. faecalis* carente de plásmidos (Sm^r, Gel$^-$, y AS-48$^-$), que se mezclaron en una proporción 1:1).

La conjugación se realizó sobre filtro según se indica en Material y Métodos y la selección de los transconjugantes se llevó a cabo en base a las resistencias a estreptomicina (600 µg/ml) y AS-48 (100 UA/ml). La transferencia del fenotipo AS-48^R en estos cruces fue de $2,6x10^{-7}$ por célula donadora (Tabla 8).

Para descartar otros sistemas posibles de transferencia, como pudiera ser la transformación y transducción se realizaron experimentos controles. Asi, la transferencia en presencia de ADNasa I no disminuyó; de igual modo, no se obtuvieron transconjugantes cuando la conjugación se efectuó con sobrenadantes libres de células donadoras, o bien con células donadoras tratadas con cloroformo, lo cual demuestra que se necesita la viabilidad de la célula donadora para que suceda la transferencia genética de AS-48. Los resultados de estos experimentos, aparecen expuestos en la tabla 8.

Resultados similares, se obtuvieron cuando la raza silvestre S-48 se usó como donadora en los experimentos de conjugación.

TABLA 8 : Transferencia por conjugación del carácter AS-48^R desde *E. faecalis* A-48-32 a OG1X.

Donador	No. colonias[a] AS-48^R	Frecuencia/donador[b]
A-48-32	42	$2,6 \times 10^{-7}$
Filtrado libre de células	0	-
A-48-32 con DNasa I	85	$5,3 \times 10^{-7}$
células con cloroformo	0	-
S-48	53	$3,3 \times 10^{-7}$

a) colonias aparecidas sobre agar BHA-selectivo, conteniendo 600 µg/ml de estreptomicina y AS-48 (100 UA/ml).
b) calculado a partir de un recuento de 1,6 x 10^8 U.F.C.

6.2. Características de los transconjugantes AS-48^R

Las nuevas estirpes bacterianas resultantes del cruce de A-48-32 con OG1X, aisladas en medio selectivo (Sm, AS-48), se identificaron como transconjugantes en base a las siguientes características fenotípicas:

- Ausencia de actividad gelatinasa (tabla 9)

- Resistencia a estreptomicina: superior a 600 µg/ml (tabla 9).

- Resistencia frente a AS-48: similar a la de la estirpe utilizada como donadora, superior a 460 UA/ml (tabla 9).

TABLA 9: Características fenotípicas de las estirpesA-48-32, OG1X y y los transconjugantes AS-48R.

	Resistencia a		Gelatinasa
Estirpes	Sm (600 µg/ml)	AS-48 (MIC)	
A-48-32	<200 µg/ml	>460 UA/ml	+
OG1X	>600 µ/ml	<11 UA/ml	-
Transconjug.	>600 µg/ml	>460 UA/ml	-

(+): hidrólizan la gelatina

(-): no hidrólizan de la gelatina

6.3. Actividad inhibidora de los transconjugantes AS-48^R.

Para comprobar si además de ser resistentes a AS-48 los transconjugantes AS-48^R tenían capacidad de producirlo y excretarlo se determinó su actividad antagonista sobre estirpes sensibles a AS-48. Para ello se realizaron varios experimentos, todos ellos encaminados a detectar la presencia del antibiótico AS-48 en dichas estirpes bacterianas.

6.3.1. Producción de AS-48 en medio sólido.

Se realizó según la técnica descrita en el apartado 5.1 de Material y Métodos. Según se indica en la tabla 10, los nuevos transconjugantes AS-48^R presentan el mismo espectro de acción que la estirpe donadora (A-48-32). Son activos frente a todos los mutantes curados de la producción de AS-48: A-48-15, A-48-9, B-48-28, B-48-2 y B-48-47, asi como sobre la estirpe OG1X, utilizada como receptora en los experimentos de conjugación. Asimismo, estos transconjugantes, como es de esperar, no presentan actividad inhibidora sobre A-48-32 y S-48. Finalmente, son activos también sobre *E. faecium*, que es la estirpe indicadora para detectar la producción de AS-48 (Martínez-Bueno, 1986; Martínez-Bueno *et al.*, 1990).

No obstante, los halos de inhibición en medio sólido de estos transconjugantes eran mucho menores que los producidos por la estirpe donadora A-48-32 pudiéndose apreciar una disminución superior al 50 % en el diámetro de halo, respecto de la raza donadora A-48-32 (Fig. 12).

TABLA 10. Espectro de acción de las estirpes S-48, donadora (AS-48) receptora (OG1X) y los transconjugantes AS-48^{R},

	Estirpes productoras		
E.indicadoras	S-48	A-48-32	Transconjugantes*
S-47	+	+	+
S-29	+	+	+
B-48-47	+	+	+
A-48-15	+	+	+
B-48-28	+	+	+
A-48-32	+	−	−
S-48	−	−	−
OG1X	+	+	+

(+): inhibición de estirpes indicadoras; (−): ausencia de inhibición sobre las estirpes indicadoras.

(*): corresponden a la actividad de al menos 10 colonias seleccionadas al azar de los transconjugantes AS-48^{R}.

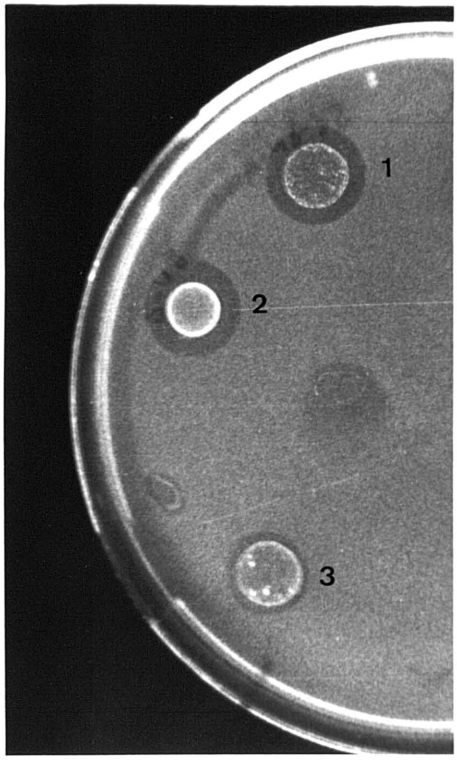


Figura 11. Halos de inhibición producidos por las estirpes de S-48, A-48-32 y transconjugantes AS-48^{R}, sobre la cepa S-47. 1) A-48-32; 2) S-48; 3) transconjugante.

6.3.2. Producción de AS-48 en medio líquido.

La producción de AS-48 en medio líquido BHI-T y detección de la actividad inhibidora en los sobrenadantes de cultivo se hizo según la técnica descrita en Material y Métodos (técnica de los pocillos, apartado 5.2). Sin embargo, no se encontró actividad alguna durante la fase de crecimiento de estos transconjugantes.

Se observó además que cuando los tranconjugantes crecían en medio líquido presentaban la particularidad de formar unos gruesos grumos algodonosos, de tal manera, que tras algunas horas de incubación la mayor parte de las células se encontraban en el fondo y el medio de cultivo estaba notablemente transparente (Fig. 13).

El aspecto de estos agregados recuerda al de los agregados de las cepas S-48, A-48-32 y A-48-15 de *E. faecalis* cuando estos crecían en presencia de sobrenadantes de la raza OG1X. Este fenómeno ha sido descrito previamente por otros autores (Dunny *et al.*, 1978; Ike *et al.*, 1983), y ocurre en ciertas estirpes de *E. faecalis*, que actúan como donadora en procesos de conjugación, cuando se ponen en presencia de la raza OG1X, aunque nunca se ha referido que afecte a las estirpes resultantes de una conjnugación. Para dilucidar la naturaleza de esta agregación, e determinó la acción sobre la misma de diversos factores, tales como la presencia de iones divalentes y la actividad de la pronasa. Los resultados aparecen en la tabla 11, y corresponden a los obtenidos con cultivos en fase exponencial de crecimiento, a los que se les adicionó EDTA (concentración final de 50 mM) y pronasa (25 µg/ml). Como se puede observar, esta agregación se disocia cuando en el medio existe bien pronasa

(25 µg/ml) ó bien EDTA (50 mM), y en cambio se aumenta cuando en el medio se adiciona de fosfato (100 mM, pH 7,2).

La sensibilidad a la pronasa de estos agregados, hace pensar en la existencia de proteínas de nueva síntesis, responsables de esta agregación. Este tipo de respuesta, es similar a la descrita por Dunny *et al.* (1978), e Ike *et al.* (1983), con la salvedad mencionada anteriormente.

TABLA 11. Acción de diversos factores frente a la agregación producida por los transconjugantes AS-48^R del cruce A-48-32 x OG1X.

	EDTA (50 mM)	Fosfato (100 mM)	Pronasa (25 µg/ml)
Aparición de grumos tras 1 h a 37 °C	-	+	-

(+): aparición de grumos. En este caso incluso aumentaron con respecto al cultivo control
(-): ausencia de agregados.

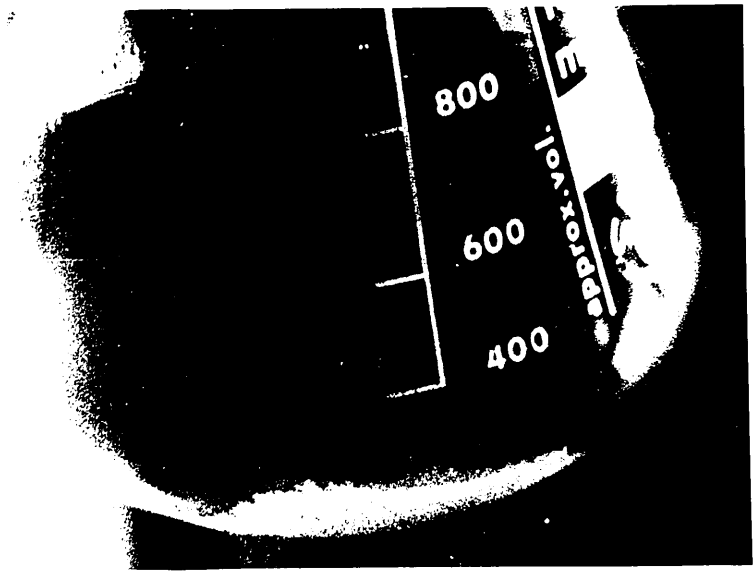


Figura 13. Agregación en medio líquido producida por los transconjugantes AS-48R. Bajo apropiadas condiciones, estos agregados pueden ser de varios centímetros de tamaño. Se forman por la acción de proteínas de superficie (adhesinas) ó también llamadas proteínas de agregación. A) cultivo control; B) transconjugante T4-31.

6.3.3. Observación de los agregados originados por el transconjugante AS-48^R mediante microscopio electrónico de barrido.

De todos los transconjugantes AS-48^R seleccionados, se eligió a uno de ellos, el designado como T4-31 para realizar sobre el este experimento.

La formación de agregados en células de *E. faecalis* OG1X AS-48^R fue estudiada a microscopía electrónica de barrido (MEB). Los transconjugantes mostraban la capacidad de formar agregados en medio líquido de forma constitutiva, y presentaban estructuras superficiales filamentosas similares a pelos, asi como agregados de proteínas, como los que se muestran en la Figura 14.2. Estas estructuras eran muy similares a las descritas por otros autores (Wanner *et al.*, 1989) en células de OG1X que transportaban determinados plásmidos (pAD1, pCF10) e inducidas con feromonas sexuales, y corresponden por tanto a las sustancias de agregación.

En nuestros experimentos, dichas sustancias sólo aparecían en los transconjugantes AS-48^R ya que en células control de OG1X no se observó ninguna estructura de este tipo a MEB (Fig. 14.1).

Con respecto a la localización de las sustancias de agregación, éstas muestran una distribución por zonas en la superficie celular, similar a la descrita por Wanner *et al.*, 1989, observándose zonas carentes de estas estructuras tales como la zona de constricción del septo de división, así como en las zonas polares de la célula (Fig. 14.2, c).

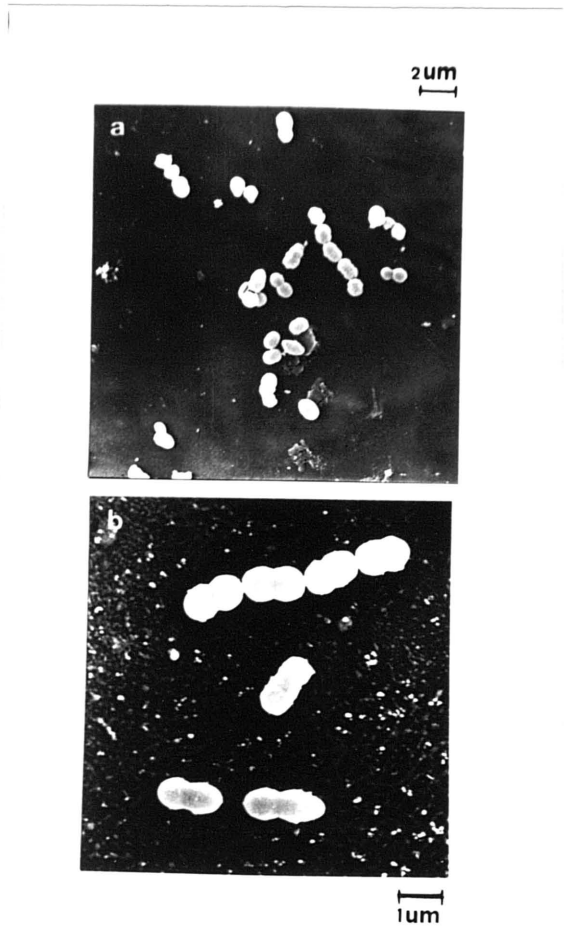


Figura 14.1.Observación a MEB de células de *Enterococcus faecalis* OG1X procedentes de un cultivo en medio líquido.

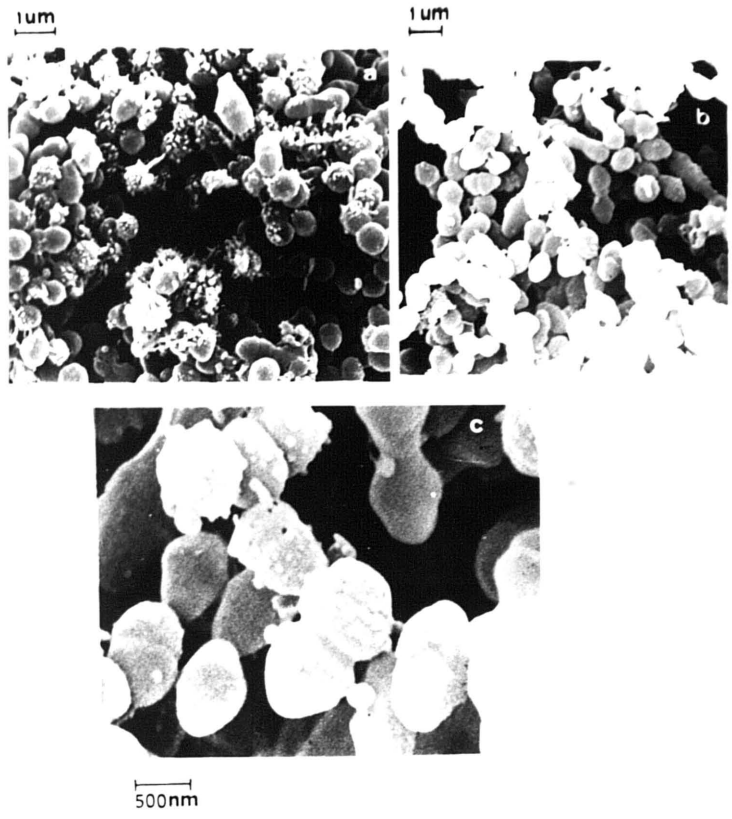


Figura 14.2. Observación a MEB de células de transconjugantes AS-48^{R} procedentes de un cultivo en medio líquido, en las que se observan la aparición de estructuras superficiales implicadas en la formación de agregados.

6.3.4. Identificación de la actividad inhibidora producida por los transconjugantes con el antibiótico AS-48.

Para establecer dicha identidad se intentó demostrar la presencia de AS-48 por métodos inmunológicos, empleando anticuerpos anti AS-48.

6.3.4.1. Obtención, purificación y valoración de Ig G anti AS-48.

Para ello, se inmunizaron conejos con el antibótico AS-48 (Material y Métodos, apartado 19.1). Los sueros inmunes fueron procesados para obtener las correspondientes Ig G anti AS-48 mediante precipitación con sulfato sódico y posterior cromatografía en DE52.

En la Figura 15 se muestra el perfil de elución en DE52 de una fracción de 50 ml de suero inmune previamente precipitado y dializado. Los dos primeros picos P-1 y P-2 debían corresponder con las fracciones que contenían a las Ig G; éstas fueron reunidas y valoradas ambos picos por separado mediante la técnica ELISA. Para ello se empleó una cantidad fija de antígeno (2 µg/pocillo) y diluciones crecientes de las muestras a valorar, obteniéndose unos títulos de aproximadamente 1/6250 , 1/1200 respectivamente (Figura 16). Igualmente se valoraron los picos menores que aparecen el el cromatograma, no encotrándose anticuerpos en ninguno de ellos.

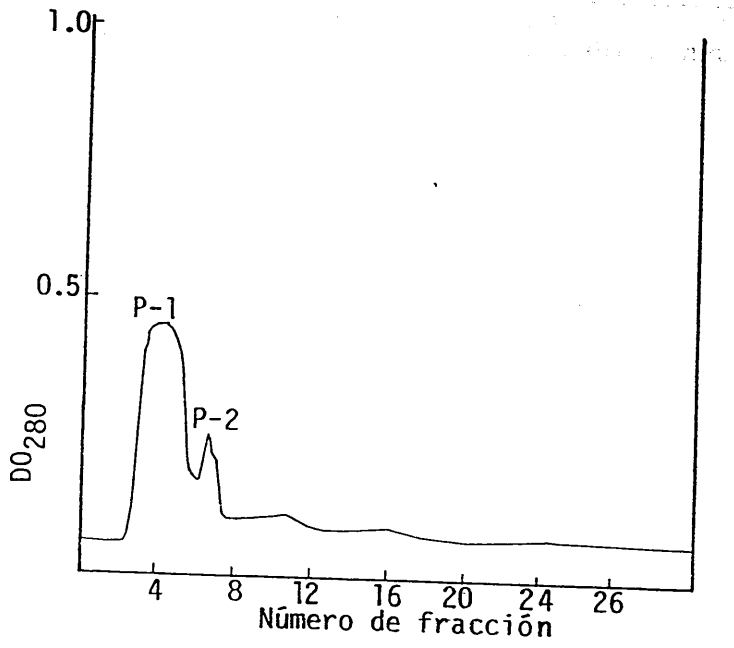


Figura 15. Perfil de elución en DE-52 de suero de conejo inmunizado frente a AS-48, previamente precipitado con sulfáto amónico. los picos eluidos se valoraron mediante la técnica de ELISA estando restringidas las Ig G a los denominados P-1 y P-2.

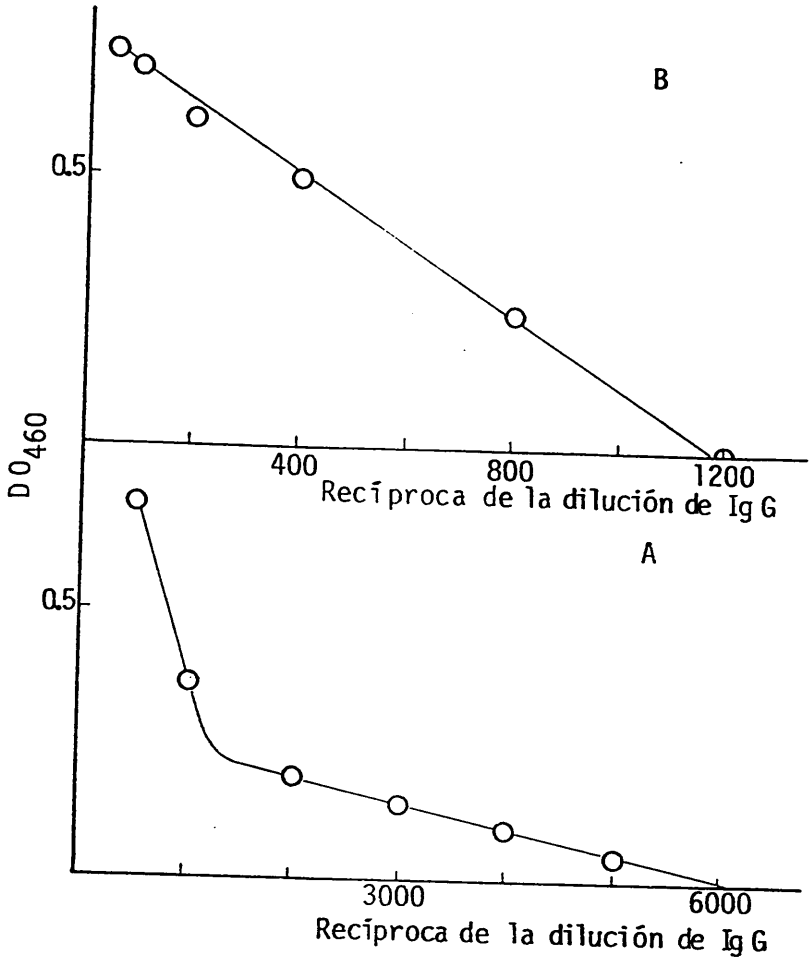


Figura 16. Valoración mediante la técnica de ELISA de los picos P-1 (A) y P-2 (B) eluidos en la cromatografía sobre DE-52 del suero de conejo inmunizado frente a AS-48. La concentración de AS-48 empleada fue en todos los casos de 2 µg por pocillo

6.3.4.2. Comprobación de la identidad de AS-48 con la actividad inhibidora de los transconjugantes.

De los 42 colonias AS-48^R seleccionados, se eligió, al transconjugante T4-31 para realizar sobre el este experimento.

Los sobrenadantes de T4-31, se concentraron 25:1 con S-Sepharose según se indica en Material y Métodos (apartado 4) y posteriormente se sometieron a estudio mediante Western blot, según se indica en el apartado 19.4 de Material y Métodos. La figura 17 muestra los resultados obtenidos. La presencia de una sola banda, coindicidiendo con el antibiótico AS-48 previamente purificado, demostraba pues la presencia del mismo en el sobrenadante del transconjugante T4-31.

Asimismo, se ensayó mediante la técnica de los pocillos la actividad inhibidora sobre S-47 y sobre S-29, de los concentrados a partir de sobrenadantes de T4-31 obtenidos por cromatografía por Sepharosa-S. Los resultados de tales experimentos aparecen en la tabla 12.

TABLA 12. Actividad inhibidora de los sobrenadantes de cultivo concentrados 25 veces mediante S-Sepharose de los transconjugantes AS-48^R y del mutante A-48-32. Los sobrenadantes se ensayaron mediante la técnica de los pocillos, y los resultados se expresan en mm del diámetro del halo de inhibición.

	Estirpes indicadoras		
Productoras	S-47	S-29	OG1X
Transconjugante(*)	13	13	15
A-48-32	22	22	22
OG1X	-	-	-

(*) Corresponde a un transconjugante aislado en función de su mayor halo de inhibición frente a S-47 en medio sólido BHA-T, y designado como transconjugante T4-31.

Estos resultados, demostraron pues la producción de AS-48 por los transconjugantes AS-48^R.

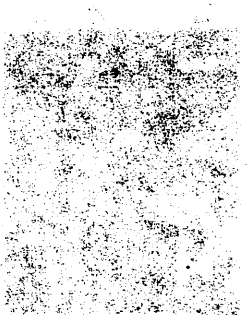


Figura 17. Inmunoblotting de sobrenadantes concentrados por S-Sepharose de las estirpes A-48-32, S-48 y transconjugantes AS-48^{R}. 1) transconjugante AS-48^{R}; 2) AS-48 purificado por CM-25; 3: mutante A-48-32; 4: cepa salvaje S-48.

7. Estudio del contenido plasmídico de los transconjugantes AS-48^R.

7.1. Perfil plasmídico de los transconjugantes AS-48^R.

A continuación se examinó el perfil del ADN plasmídico de los diferentes transconjugantes AS-48^R, por electroforesis en gel de agarosa. Se pudo observar que todos albergaban un único plásmido, que comigraba con el pMB2 de la estirpe silvestre S-48 ó del mutante A-48-32. Los resultados aparecen en la figura 18.

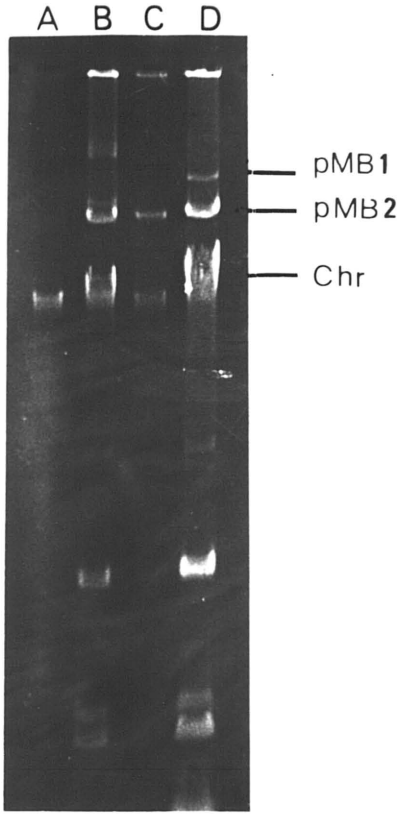


Figura 18. Perfil plasmídico de las estirpes OG1X (A); A-48-32 (B); transconjugante T4-31 (C); S-48 (D). La electroferesis se realizó en un gel de agarosa (0,6 %), a 75 V durante 4 h.

7.2. Estudio del ADN plasmídico de los transconjugantes.

La identidad del plásmido existente en los transconjugantes, con el plásmido pMB2, se demostró mediante dos tipos de experimento de hibridación ADN-ADN.

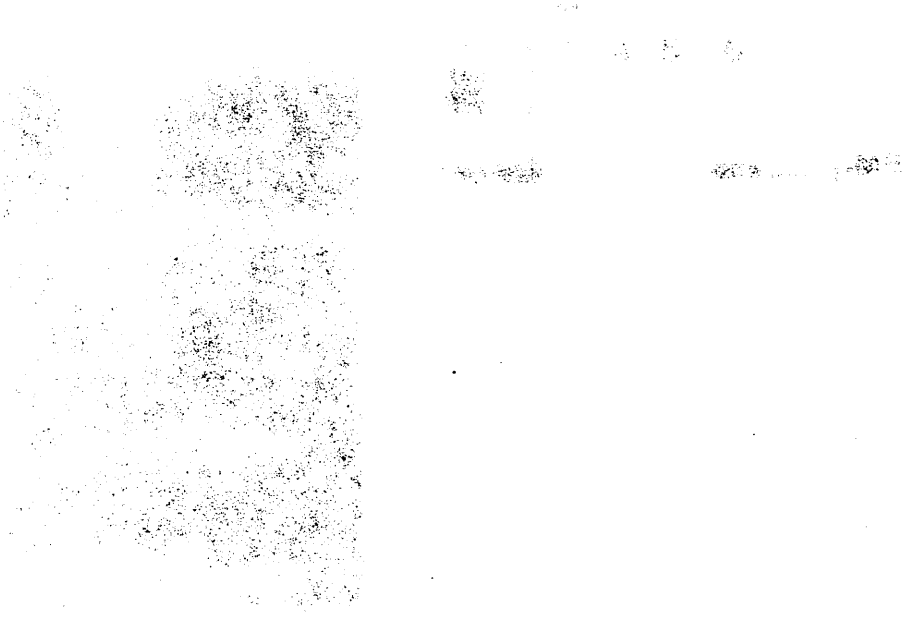
7.2.1. Hibridación ADN-ADN.

Para ello, se aisló el plásmido pMB2 de la estirpe silvestre S-48, por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión, y trás marcarlo con dUTP-digoxigenina, se utilizó como sonda en experimentos de hibridación sobre nitrocelulosa en condiciones restrictivas (temperaturas de hibridación y de los y posteriores lavados a 68°C). Tal como aparece en la fig. 19 , el plásmido pMB2 se podía detectar en la estirpe silvestre S-48, asi como en el mutante hiperproductor de AS-48 (A-48-32). No se detectaba hibridación en los mutantes curados de AS-48: A-48-9 ó A-48-17, B-48-2 y B-48-47. Asi mismo, se puso de manifiesto en el transconjugante AS-48^R, T4-31, lo cual demostraba la identidad del plasmido pMB2 en las estirpes referidas.

7.2.2. Análisis de restricción.

Un último experimento realizado para demostrar la identidad del plásmido existente en los transconjugantes con el pMB2 de las donadoras, fue el análisis por restricción de los mismos. De este modo, cuando el pMB2 se aisló a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión, y se digirió con diferentes endonucleasas (*Eco* RI, *Bgl* II y *Bam* HI), se observaron los mismos fragmentos de restricción que en el plásmido existente en el transconjugante T4-31, lo cual indicaba su total homología a este respecto. Los resultados aparecen en la figura 20. En este sentido, el

transconjugante T4-31, ofreció grandes ventajas para estudiar al plásmido pMB2, puesto que fue fácilmente purificado por gradiente de densidad ClCs-BrEt sin necesidad de ulterior electroforesis en agarosa y extracción de la misma.



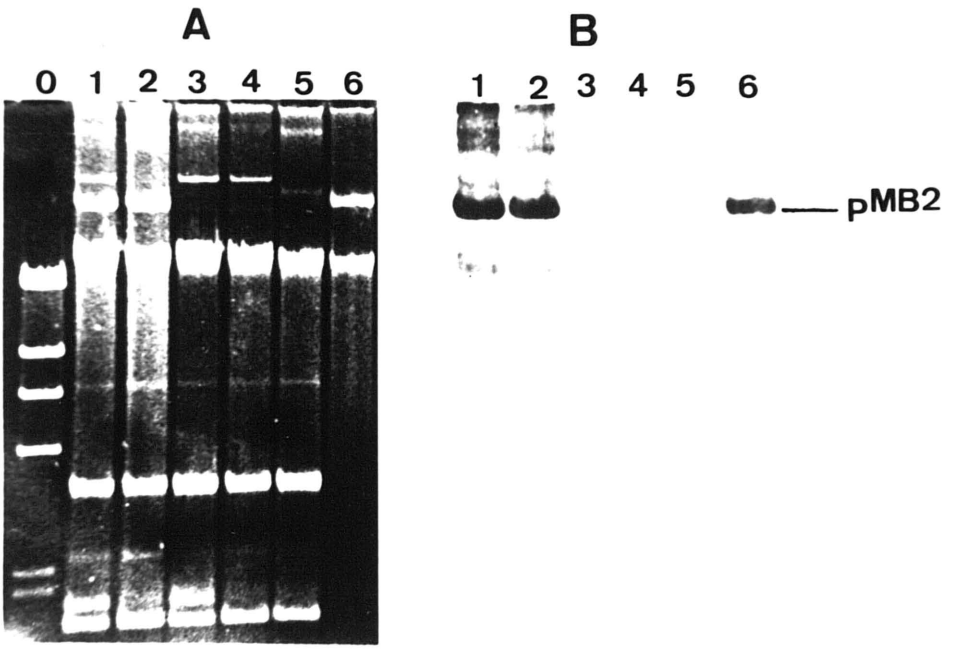


Figura 19. (A) Detección del plásmido pMB2 en *E. faecalis* S-48, mutantes y transcojugantes de AS-48. (B) Hibridación de los plásmidos con pMB2 marcado con dUTP-11-Dig. 0) lambda *Hind* III; 1) S-48; 2) A-48-32; 3) A-48-9; 4) A-48-15; 5) B-48-47; 6) transconjugante T4-31.

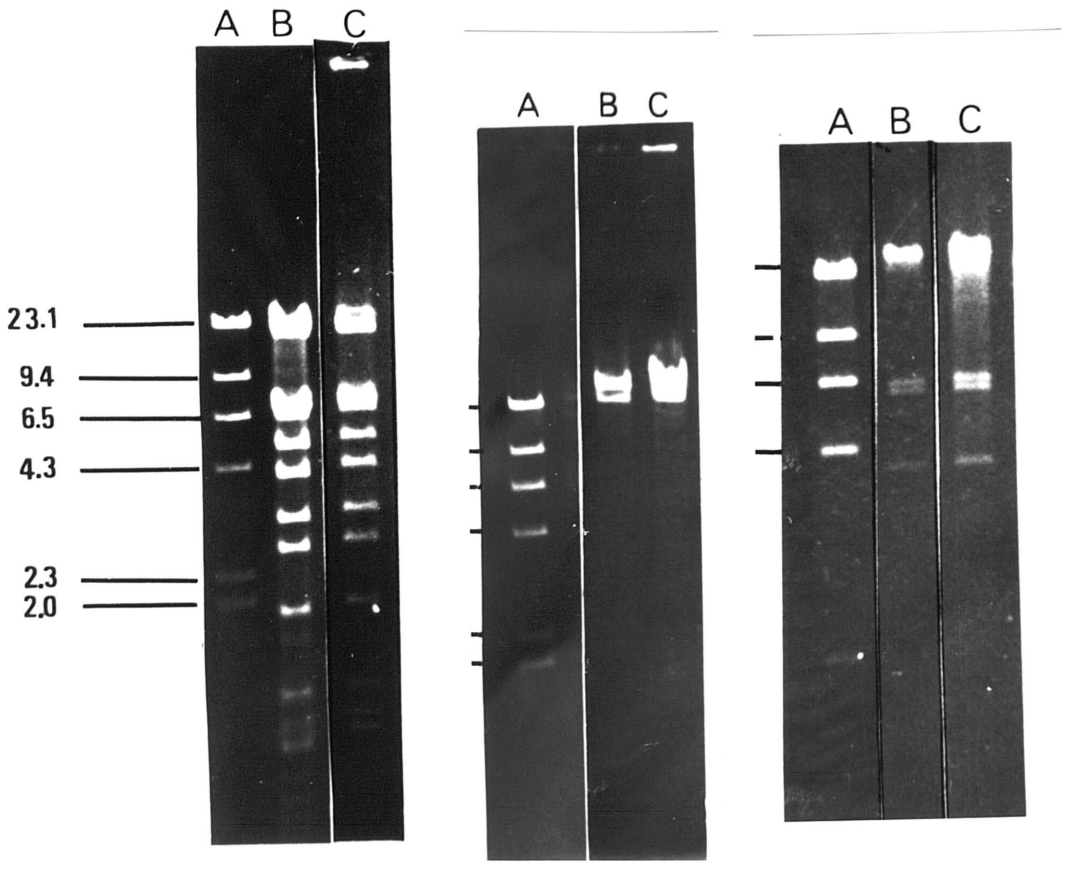


Figura 20. Análisis con diferentes enzimas de restricción del plásmido pMB2 de S-48 y del plásmido presente en el trasconjugante T4-31. (1): digestión con *Eco* RI. (2): digestión con *Bgl* II; (3): digestión con *Bam* HI. A) lambda *Hind* III; B) pMB2 de S-48; C) plásmido del transconjugante T4-31. Los fragmentos se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa 0,7 % a 75 V durante 4 h; los números de la izquierda indican su tamaño molecular en Kb.

8. Transformación de *E. faecalis* OG1X con el plásmido pMB2.

De acuerdo con los resultados mostrados en los apartados anteriores, parecía claro la relación existente entre producción e inmunidad del antibiótico AS-48, con el plásmido pMB2 de *E. faecalis* S-48. Sin embargo, fue necesario demostrar que era exclusivamente este plásmido el que estaba ligado a dicho carácter, puesto que en ciertas ocasiones plásmidos conjugativos, pueden promover la movilización, bien de otros plásmidos, o bien de regiones cromosómicas específicas (Hopwood, 1972).

Así pues para determinar con toda seguridad si el plásmido pMB2 era el responsable directo de la producción e inmunidad del antibiótico AS-48, dicho plásmido fue expresamente introducido en la raza OG1X de *E. faecalis* mediante transformación. Para ello se promovió la captación del pMB2 por protoplastos de dicha estirpe mediante la adición de polietilenglicol (PEG), y posterior regeneración de los mismos en medio sólido isotónico.

La técnica empleada ha sido la de Wirth *et al.* (1986) con algunas modificaciones, y variando además las condiciones de regeneración. See han empleado en concreto 2 sistemas de regeneración en medio sólido, consistente el primero en la regeneración de protoplastos en un medio isotónico con sales de succinato sódico (0,5 M) y el segundo en la regeneración en un medio isotónico conteniendo sacarosa (0,5 M), Cl_2Ca (50 mM), y alginato (2 %. p/v).

En ambos tipos de experimentos, el plásmido pMB2 aislado y purificado a partir de E. faecalis S-48, fue el ADN usado para la transformación de protoplastos de *E.*

faecalis OG1X.

10^{8}–10^{9} protoplastos se mezclaron en hielo con 1 µg del plásmido pMB2. Después de la adición de 1 ml de PEG, posteriores lavados, y 1 h de expresión fenotípica, la mezcla de protoplastos se inoculó en dos medios diferentes para la regeneración y selección de transconjugantes (apartado 12.2.1, de Material y Métodos).

1) Sobre medio THB conteniendo agar al 0,7 % , succinato sódico 0.5 M, y 11 UA/ml de AS-48.

2) Sobre una solución de alginato al 2 % , sacarosa 0.5 M; dicha solución una vez inoculada se vertió en placas conteniendo una capa base de THA, sacarosa 0.5 M, Cl_2Ca 50 mM, ya que el $CaCl_2$ provoca la solidificación del alginato, y de esta forma se consigue la formación de una matriz sólida para la regeneración de los protoplastos.

En ambos casos se incubó a 37 °C para permitir el crecimiento y regeneración de protoplastos.

En el primer caso, no se obtuvó ninguna colonia transformante ($<10^{-12}$) en este medio selectivo conteniendo el antibiótico AS-48. En el segundo tratamiento regenerador, después de incubar a 37 °C durante las primeras 16 h, se redisolvió la sobrecapa de alginato con citrato sódico, que al captar el Ca^{+2} disuelve el alginato. Las células incluídas en la sobrecapa, ya con la pared celular regenerada, se resuspendieron en medio de cultivo THB adicionado de AS-48 (11 UA/ml) y se incubaron a 37 °C durante 6 h (para permitir un enriquecimiento de los transformantes). Finalmente, se sembraron sobre placas de mdio BHA conteniendo AS-48 (11 UA/ml). En este caso, despues

de incubar a 37 °C durante 16 h, aparecieron colonias AS-48^R con una frecuencia >10^4 en total. Los resultados de estos experimentos aparecen expuestos en la tabla 13.

TABLA 13. Eficiencia de transformación de los protoplastos de *E. faecalis* OG1X con el plásmido pMB2.

REGENERACION CON	
Succinato sódico(0,5 M) y AS-48 (11 UA/ml)	Sacarosa (0,5 M) y alginato (2 %)
-	>10^4 UFC*

(*) Los datos de frecuencia corresponden a colonias AS-48^R que aparecían finalmente sobre medio selectivo con AS-48 (11 UA/ml).

El análisis plasmídico de los microorganismos que integraban las colonias transformantes, mostró que todas albergaban un único plásmido, que de acuerdo con su movilidad electroforética, se identificó como el plásmido pMB2 (Fig. 17). Estos clones, presentaban algunas de los siguientes caracteres fenotípicos:

-Crecimiento en medio líquido en forma de agregados.

-Inhibición sobre estirpes sensibles a AS-48 (S-47 ó S-29).

-Resistencia frente a AS-48 (>460 UA/ml).

Estos experimentos demostraron pues la relación existente entre pMB2 con laproducción e inmunidad frente a AS-48, y capacidad de agregarse en medio líquido BHI.

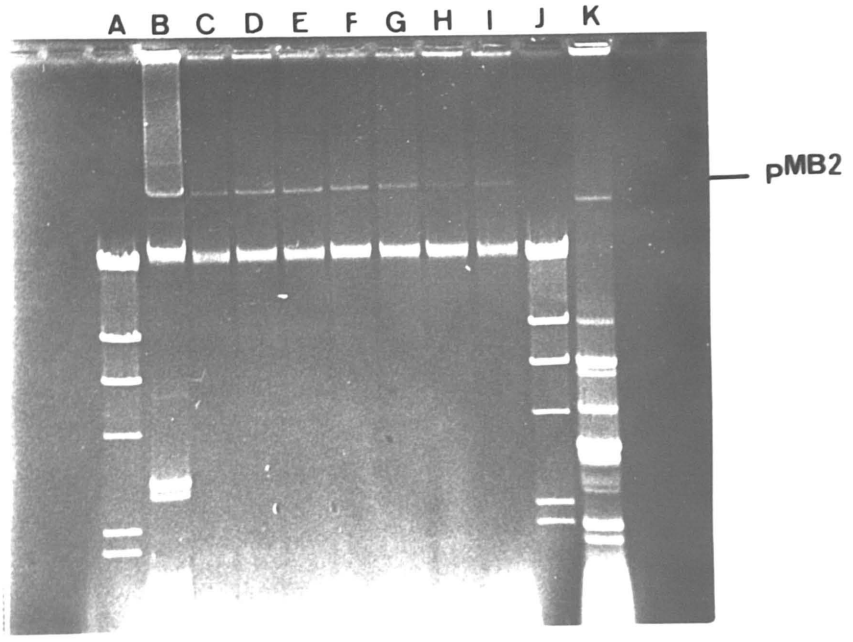


Figura 21. Perfil plasmídico de los transformantes de *E. faecalis* OG1X con el plásmido pMB2. 1: lambda *Hind* III; 2: *E. faecalis* S-48; 3-9: distintos transformantes elegidos aleatoriamente del medio selectivo AS-48^{R} (11 UA/ml); 10: lambda *Hind* III; 11: *Escherichia coli* 1730.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
COMISIÓN DE DOCTORADO

IV) ESTRATEGIA PARA LA LOCALIZACION DEL SEGMENTO QUE CODIFICA EL ANTIBIOTICO AS-48 EN EL PLASMIDO pMB2.

9. Determinación parcial de la estructura primaria de AS-48.

A fin de determinar la secuencia del antibiótico AS-48, una fracción purificada del mismo fue sometido al método de degradación Edman. Dicha secuencia no pudo ser obtenida, debido a la imposibilidad de detectar el correspondiente derivado de feniltiohydantoinoaminoácido necesario para la determinación de la misma, lo que sugería un posible bloqueo en el extremo amino terminal de AS-48. Por ello se realizó una digestión de AS-48 con distintas proteasas, para proceder posteriormente a la secuenciación de los oligopéptidos obtenidos.

El tratamiento de AS-48 con la endopeptidasa V_8 de *Staphylococcus aureus*, que cual hidroliza a nivel de los residuos de ácido glutámico, originó la inactivación del antibiótico. Después de la digestión y separación de los fragmentos resultantes por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), se aislaron cuatro picos mayoritarios, que se designaron como V8-4, V8-5, V8-6 y V8-7. Los resultados de esta purificación se exponen en la Figura 22.

De estos fragmentos, sólo V8-4, V8-5 y V8-7, con cantidades de 10, 38 y 8 µg respectivamente, se secuenciaron por el método Edman. Los resultados aparecen en la tabla 14. El fragmento V8-6 no se secuenció ya que este pico coincidía con la salida de la proteasa V_8 del eluyente en la columna.

Paralelamente, AS-48 se digirió con tripsina, de forma que se pudieron obtener cuatro picos mayorios, designados

como T1, T2, T3, T4, de los cuales T4 coincidía con la salida de AS-48 no digerido (Figura 23). De estos, sólo T3 (14 µg) se secuenció parcialmente por el mismo método, ya que T1 y T2 aparecían parcialmente solopados. Los resultados de esta secuenciación se muestran en la tabla 14.

Asimismo, la carboxipeptidasa A y B, no ejercían acción alguna sobre AS-48, de forma que los digeridos con estas enzimas, presentaban la misma actividad antagonista sobre *E. faecalis* S-47 que las muestras controles sin digerir, sugiriendo también un bloqueo del extremo C-terminal de la proteína y lo que le hace no ser accesible a estos enzimas.

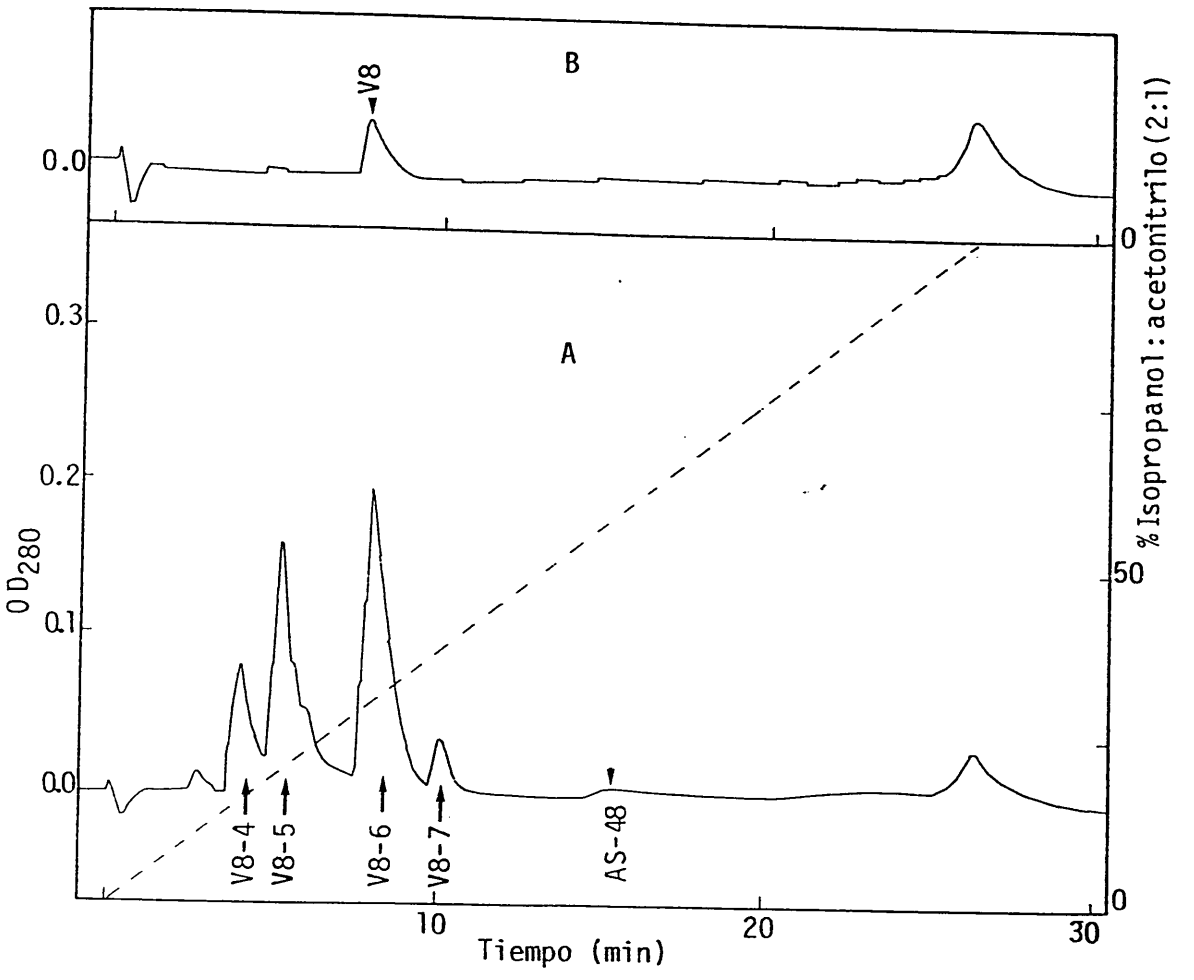


Figura 22. (A) Separación mediante cromatografía de fase reversa en HPLC de los péptidos obtenidos tras digestión de AS-48 con la proteasa V_8 de *Staphylococcus aureus*. (B) Elución de la proteasa V_8 en idénticas condiciones cromatográficas.

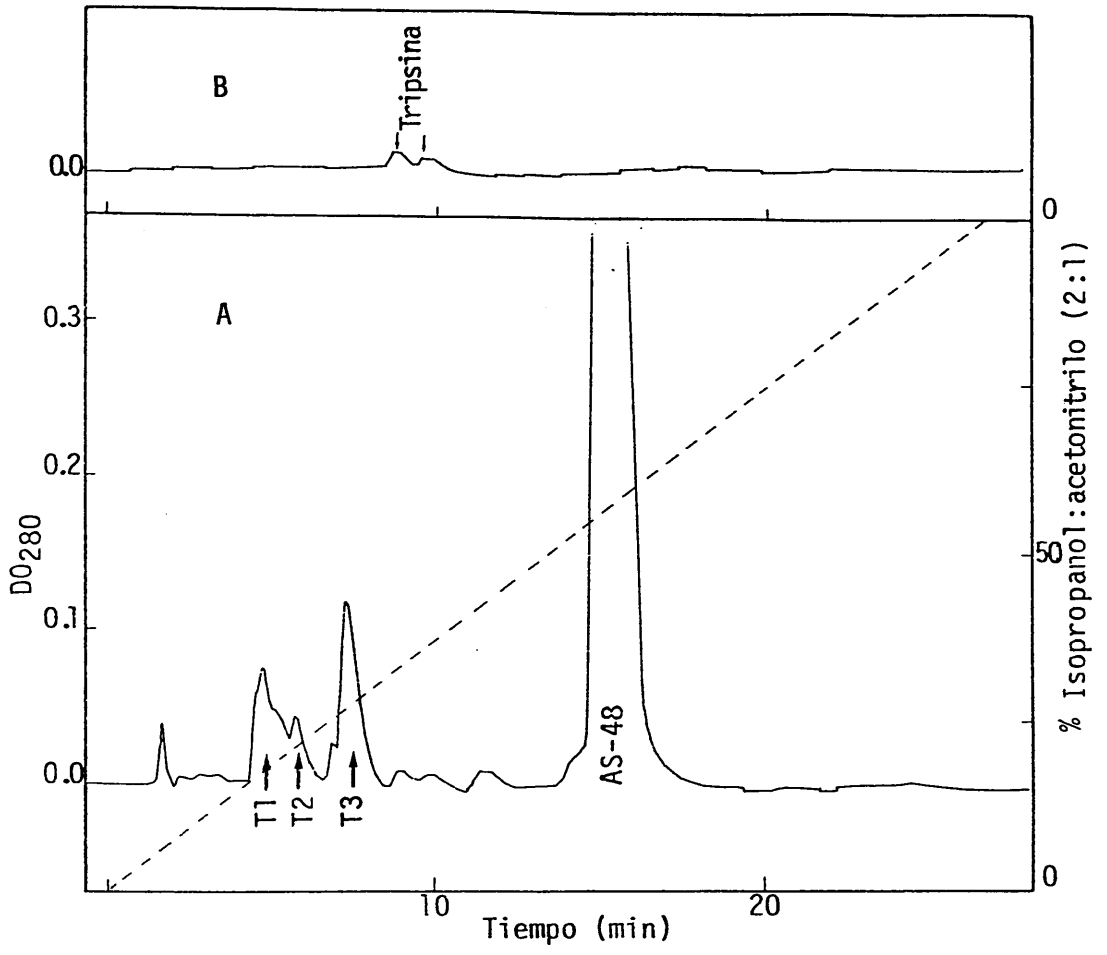


Figura 23. (A) Separación mediante cromatografía de fase reversa en HPLC de los péptidos tras la digestión de AS-48 con tripsina. (B) Elución de la proteasa en idéndicas condiciones cromatográficas.

TABLA 14. Secuencias amino-terminal de oligopéptidos internos del antibiótico AS-48 de *E. faecalis*.

	Cantidad de proteína a analizar			
Ciclo	T3 (14 µg)	V8-4 (10 µg)	V8-5 (38 µg)	V8-7 (8 µg)
1	Ala	Ser	Ile	Phe
2	Val	Ile	Lys	Gly
3	Ile	Lys	Lys	Ile
4	Ala	Ala	Lys	Pro
5	Trp	Tyr	Gly	Ala
6	Val	Leu	Lys	Ala
7	Ala	Lys	Arg	Val
8	Gly	Lys	Ala	Ala
9	Thr	Glu	Val	Gly
10	(*)		Ile	Thr
11			Ala	Val
12			Trp	Leu
13			Met	Asn
14			Ala	Val
15			Lys	Val
16			Glu	Glu

(*) Corresponde a la secuecia incompleta de este péptido.

De los datos de esta secuencia, podiamos apreciar como aspecto más notable, la presencia de ciertas zonas repetidas (la secuencia AVIAW en T3 y V8-5, y la secuencia VAGT en T3 y V8-7), pero que en ningún caso se solapaban, lo cual indicaba que eran oligopéptidos no solapados de AS-48.

T3: A-V-I-A-W-V-A-G-T-

V8-4: S-I-K-A-Y-L-K-K-E

V8-5: I-K-K-K-G-K-R-A-V-I-A-W-M-A-K-E

V8-7: F-G-I-P-A-A-V-A-G-T-V-L-N-V-V-E

10. Análisis de restricción del plásmido pMB2.

Un total de 11 endonucleasas de restricción han sido utilizadas para caracterizar al plásmido pMB2: *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III, *Pst* I, *Sal* I, *Sac* I, *Sma* I, *Xba* I y *Xho* I.

Como puede observarse en la figura 24, los perfiles de restricción son diferentes excepto para *Bam* HI y *Sac* I, en las cuales se obtuvieron patrones de corte muy similares, existiendo en estos casos dos bandas dobles de tamaño muy parecido. No se detectó corte para *Xho* I.

Para la construcción inicial del mapa físico de pMB2, se eligieron las enzimas *Bam* HI, *Bgl* II, *Sac* I, *Sma* I y *Xba* I, que presentaban como máximo 6 sitios de corte en el plásmido pMB2.

De todas estas endonucleasas, *Sma* I fue la única que linearizó a pMB2, y por esto se tomó como el punto de inicio y/o final del plásmido. El resto de enzimas se situaron a partir de *Sma* I, mediante digestiones dobles *Sma* I con éstas. Los resultados de estos experimentos aparecen en la figura 25.

Asimismo, la localización de los sitios de restricción para las endonucleasas empleadas, se realizó mediante digestiones dobles en las condiciones óptimas para cada enzima. Los resultados se muestran en la figura 26.

En la tabla 15, se detallan los pesos moleculares de los fragmentos de restricción obtenidos en las distintas digestiones. La suma total de los fragmentos da un tamaño molecular aproximado para el plásmido pMB2 de 68 Kb (45

Mdal).

Finalmente para establecer la orientación de los fragmentos en los plásmidos se realizaron experimentos de hibridación ADN-ADN, empleando como ADN prueba el fragmento C del corte con *Bam* HI que contenía el lugar de corte *Sma* I, el cual fue purificado mediante el método de GENCLEAN y marcado con dUTP-digoxigenina. Los resultados obtenidos de la hibridación realizada se muestran en la figura 27.

Con todos los datos disponibles de restricción simple y doble, asi como con los datos de hibridación entre los fragmentos, construimos un posible mapa físico del plásmido pMB2 para las enzimas *Bam* HI, *Bgl* II, *Sac* I, *Sal* I, *Sma* I y *Xba* I., el cual se muestra en la figura 28.

TABLA 15. Peso molecular de los diferentes fragmentos del plásmido pMB2 obtenido mediante digestión con varias endonucleasas de restricción. Los pesos moleculares de los distintos fragmentos, corresponden a la media aritmética de repetidas electroforesis en gel de agarosa (0,7 %) , y tomando como patrón de Pm los fragmentos originados en la digestión *Hind* III del fago lambda (23.1 Kb, 9.4 Kb, 6.5 Kb, 4.3 Kb, 2.3 Kb, 2 Kb, 0 .6 Kb).

Enzima	No. fragmentos	Peso molecular aproximado (Kb)
Sac I	3	28, 23, 17
Sma I	1	lineariza a pMB2
Bam HI	3	27, 24, 17
Eco RV	8	26.5, 11.5, 6.3, 6, 6.2, 4.8, 4.3, 2
Hind III	15	9, 8.3, 7.5, 5.4, 5, 4.9, 4.9, 4.8, 3.9, 2.8, 2.3, 1.8, 1.5, 1.3
Bgl II	4	51.6, 6.2, 6, 4.2
Eco RI	13	15, 14, 6.6, 6.4, 4.3, 41, 3.2, 2.7, 2, 2, 1.3 1.2, 1
Pst I	9	19, 17, 7, 5.8, 5.5, 5.4, 3.2, 2.2
Sal I	4	34, 22, 6, 5.8
Xba I	6	23.1, 18.5, 13, 6.8, 4.7, 1.9

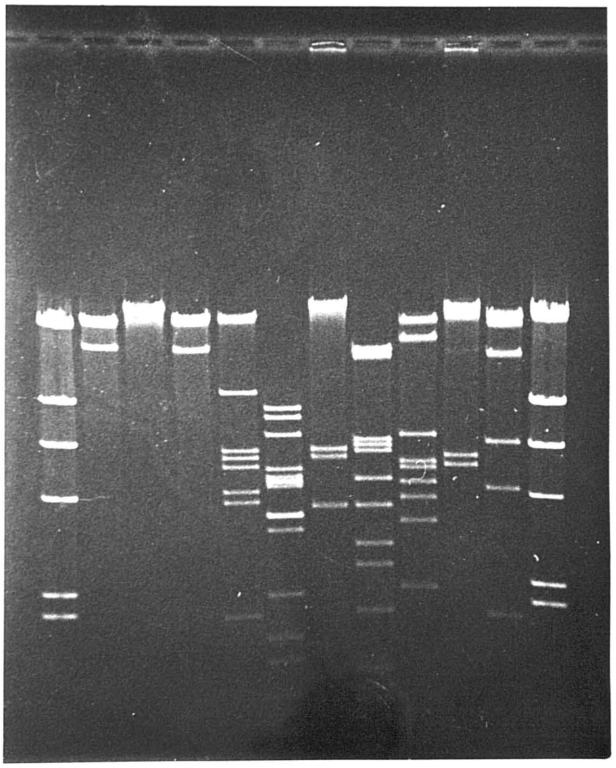


Figura 24. Restricción del plásmido pMB2 con las endonucleasas de restricción indicadas. A)lambda *Hind* III, marcador de pesos moleculares; B) *Sac* I; C) *Sma* I; D) *Bam* HI; E) *Eco* RV; F) *Hind* III; G) *Bgl* II; H) *Eco* RI; I) *Pst* I; J) *Sal* I; K) *Xba* I; L) lambda digerido con *Hind* III.

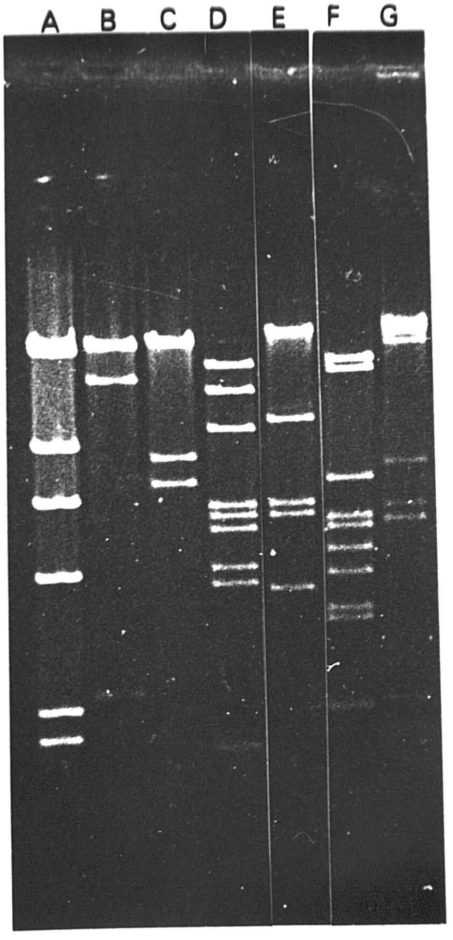


Figura 25. Restricción del plásmido pMB2 con distintas endonucleasas de restricción. A) lambda Hind III; B) Sma I/Sac I; C) Sma I/Bam HI; D)Sma I/Eco RV; E) Sma I/Bgl II; F) Sma I/Pst I.

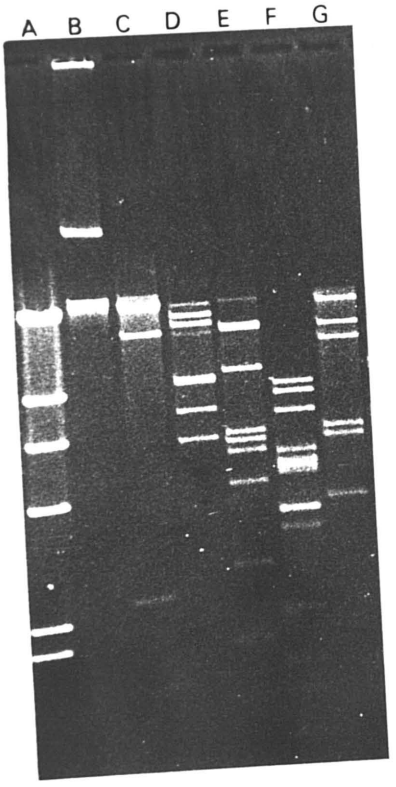


Figura 26. Digestiónes simples y dobles del plásmido pMB2 con distintas endonucleasas de restricción. A) lambda *Hind* III; B) *Xho* I; C) *Sma* I/*Sac* I; D) *Bam* HI/*Sac* I; E)*Eco* RV/*Sac* I; F) *Hind* III/*Sac* I; G) *Bgl* II/*Sac* I;

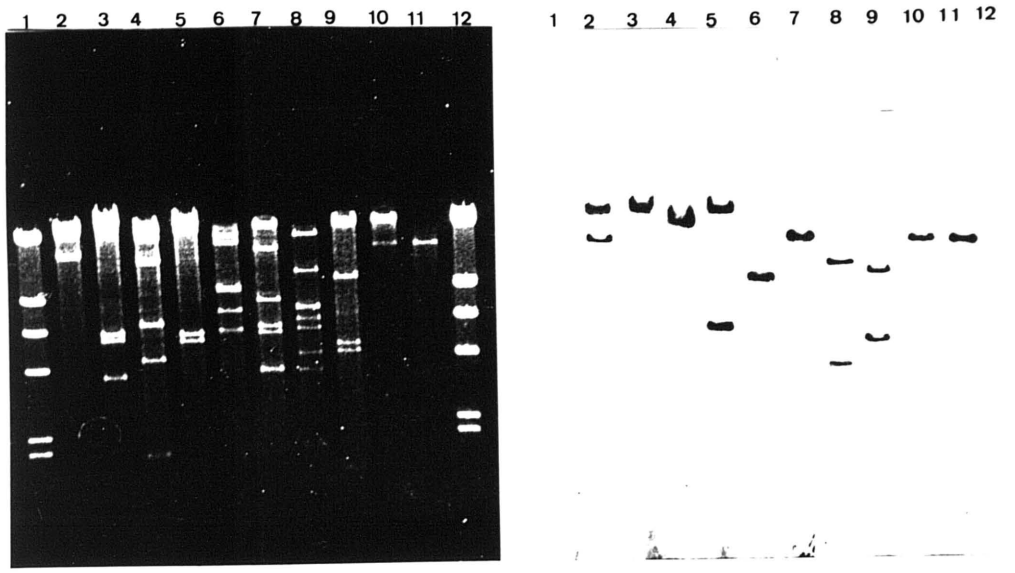


Figura 27. A) Digestiones simples y dobles del plásmido pMB2 con distintas endonucleasas de restricción. B) Hibridación de los mismos con el fragmento C (17 Kb) de la digestión *Bam* HI de pMB2, marcado con dUTP-Dig. 1) lambda *Hind* III; 2) *Sac* I; 3) *Bgl* II; 4) *Xba* I; 5) *Sal* I; 6) *Bam* HI; 7) *Bam* HI/*Bgl* II; 8) *Bam* HI/*Xba* I; 9) *Bam* HI/*Sal* I; 10) *Bam* HI; 11) fragmento C de la digestión *Bam* HI, purificado mediante GENCLEAN y utilizado como ADN prueba en este experimento de hibridación; 12) lamda *Hind* III.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
COMISIÓN DE DOCTORADO

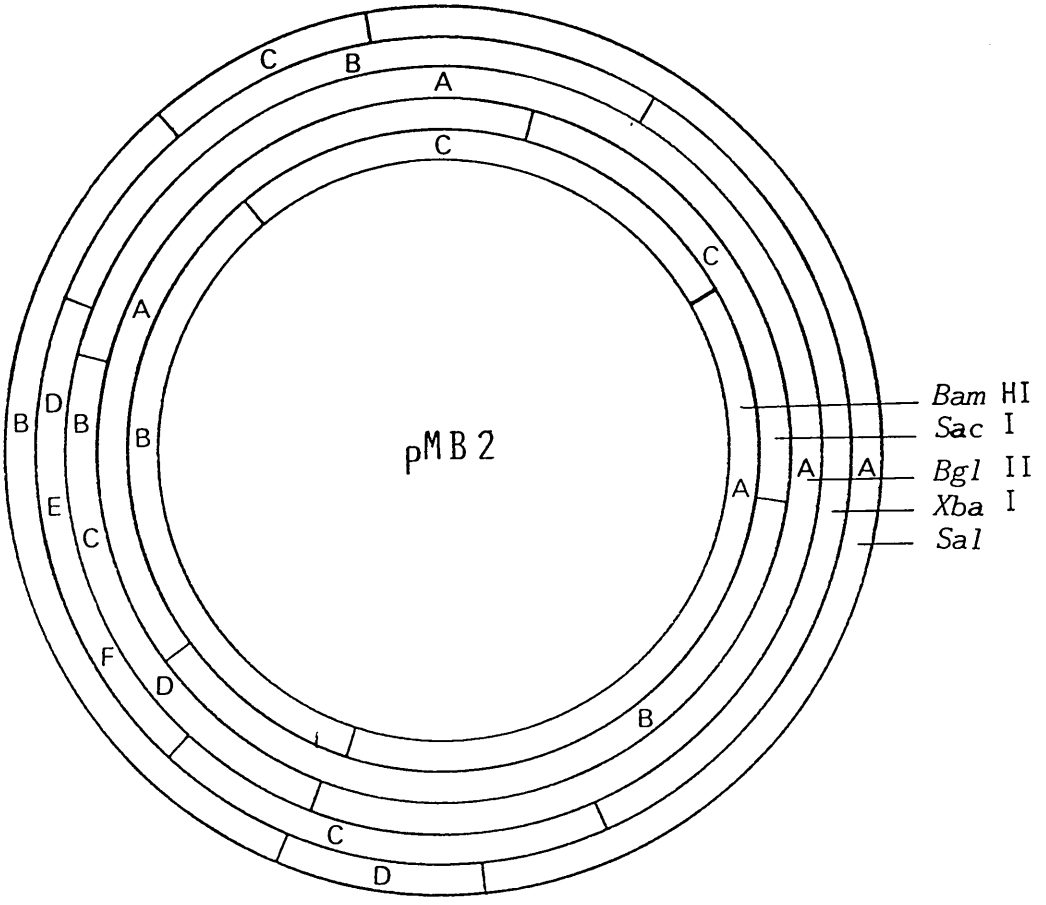


Figura 28. Mapa físico del plásmido pMB2 con varias endonucleasas de restricción. Los fragmentos originados de cada digestión se nombran por letras alfabéticas según su tamaño molecular. Los fragmentos D, E, F de la digestión con *Xba* I y B, C , D de la digestión con *Bgl* II no están ordenados.

11. Mapeo de la región que codifica para el péptido AS-48.

De acuerdo con la secuencia aminoacídica parcial del antibiótico AS-48, se eligió un péptido para la síntesis de un oligonucleótido sintético, el cual fue usado como ADN prueba para experimentos de hibridación. Concretamente V8-4 (Ser-Ile-Lis-Ala-Tyr-Leu-Lys-Lys-Glu).

```
V8-4: A G T A T T A A A G C T T A T C T T A A A A A A G A
          C     C     G     C     C     C     G     G
                A           A           A
                            G           G
```

El oligonucleótido sintético para V8-4 (26 mer) que estaba degenerado 21 veces, fue marcado radioactivamente con gamma [^{32}P]-ATP, según la técnica descrita en Material y Métodos (16.1), para ser usado como sonda en posteriores experimentos de hibridación con el plásmido pMB2.

La especificidad del oligo se determinó por hibridación de las pruebas con ADN plasmídico (pMB2). Para ello el ADN plasmídico total de los transconjugantes OG1X (pMB2), fue aislado y purificado mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad CsCl-EtBr, y cortado con distintas enzimas. Los fragmentos de restricción fueron separados en gel de agarosa y posteriormente transferidos a filtros de nitrocelulosa empleando la técnica "Southern blotting".

Los resultados de estas hibridaciones se pueden observar en las figuras 29 y 30. Hay que hacer constar, que

al tratarse de sondas muy degeneradas, se tuvieron que usar condiciones de hibridación relativamente flexibles, sobre todo las temperaturas de incubación, y de lavados de los filtros de nitrocelulosa. Concretamente, cuando este experimento se realizaba por encima de 50 °C, no se obtenía señal de hibridación. Los resultados óptimos, se obtuvieron cuando la temperatura de hibridación estaba comprendida entre 44-50 °C. Por debajo de ella (38 °C) se obtenían varias señales inespecíficas con los distintos fragmentos del plásmido pMB2 (figura 31).

Un esquema representativo de estas hibridaciones con el oligonucleótido V8-4, se muestra en la figura 32, en la cual aparecen marcados los fragmentos de pMB2 que hibridan específicamente con V8-4, y que hemos usado para la construcción del mapa físico de pMB2.

Estos datos fueron igualmente confirmados en las hibridaciones llevadas a cabo con V8-4 y las digestiones dobles *Sal* I/*Xba* I, *Sal* I/*Pst* I, *Xba* I/*Pst* I, y *Xba* I/*Sal* I/*Pst* I (Figura 33).

Además de la hibridación con pMB2, la prueba V8-4 mostraba también una hibridación bastante fuerte con el fragmento *Hind* III del fago lamba de 23 Kb y más débilmente con el fragmento de 6,6 Kb, debido posiblemente a la gran degeneración del ADN prueba usado.

La posición relativa del gen o genes implicados en la producción de AS-48, la hemos realizado mediante el solapamiento de los distintos fragmentos de hibridación con P4. Concretamente el fragmento A de *Sac* I, el fragmento C de *Bam* HI y el fragmento A de la digestión de pMB2 con *Sal* I. Por la hibridación con *Bam* HI situariamos el gen AS-48, que

estaría comprendido entre el fragmento A de la digestión con *Sac* I y entre el fragmento A de la digestión con *Sal* I, puesto que no existe señal de hibridación ni en el fragmento B de la digestión con *Sac* I, ni con el C de *Sal* I.

De acuerdo con este razonamiento, una posición relativa de AS-48, podría estar comprendida entre *Sal* I y *Sac* I, con una tamaño aproximado de 4,9 Kb, y que representamos en la figura 34.

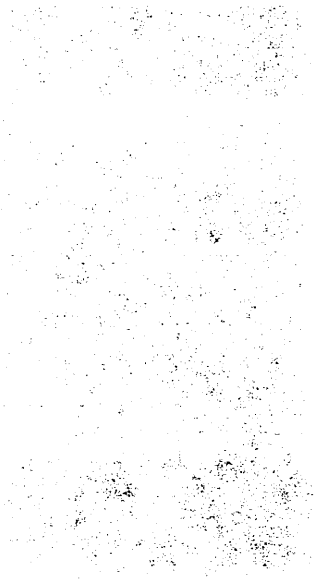
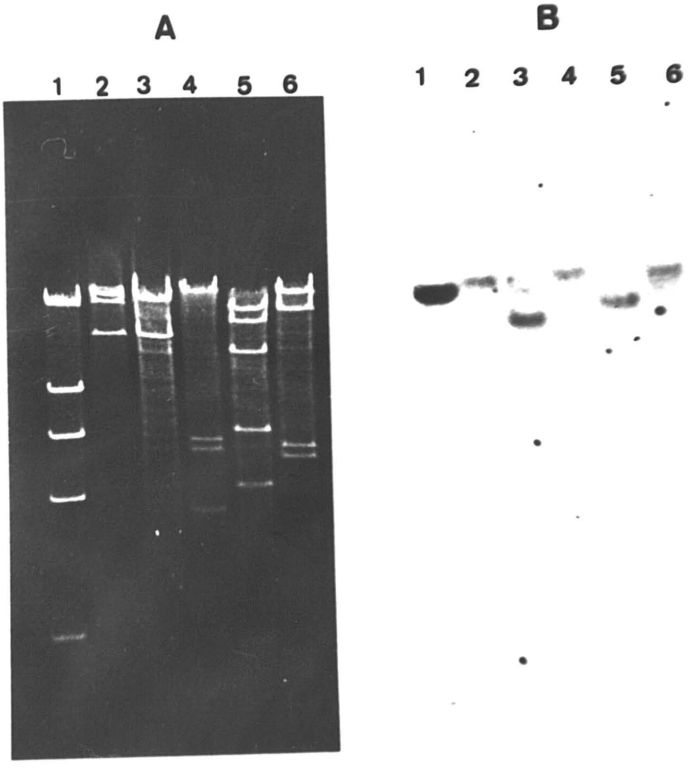


Figura 29. Hibridación de un digerido de pMB2 con distintas endonucleasas de restricción con el oligonucleótido V8-4 marcado con ^{32}P. Las condiciones de hibridación y lavados se realizaron a 50 °C. 1) lambda *Hind* III; 2) *Sac* I; 3) *Bam* HI; 4) *Bgl* II; 5) *Xba* I; 6) *Sal* I.



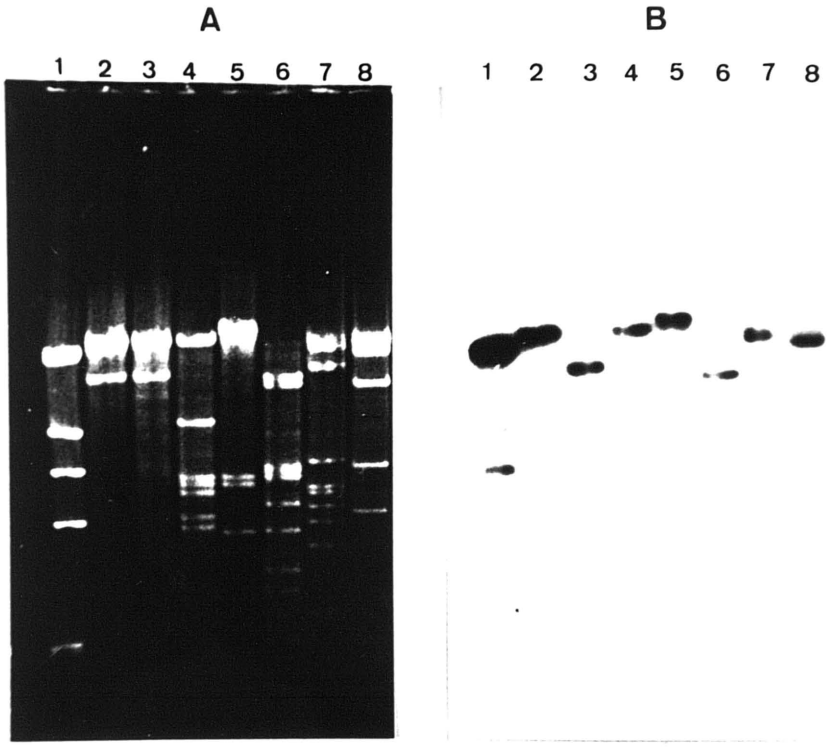


Figura 30. Hibridación de un digerido de pMB2 con distintas endonucleasas de restricción con el oligonucleótido V8-4, marcado con ^{32}P. Las condiciones de hibridación y lavados se realizaron a 46 °C. 1) lambda *Hind* III; 2) *Sac* I; 3) *Bam* HI; 4) *Eco* RV; 5) *Bgl* II; 6) *Eco* RI; 7) *Pst* I; 8) *Xba* I.

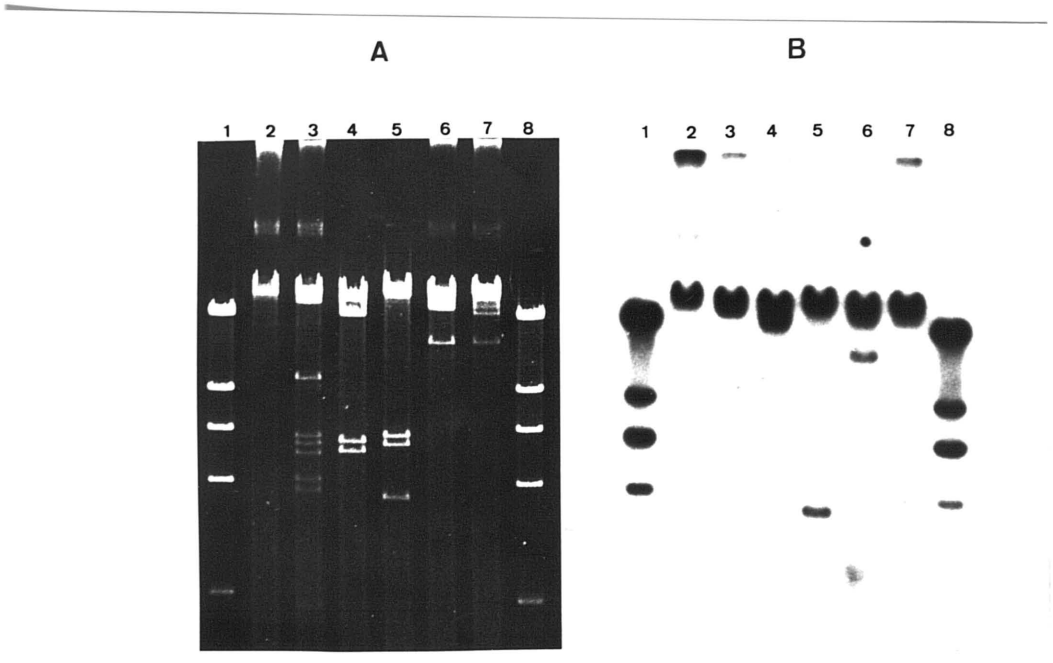


Figura 31. Hibridación de un digerido de pMB2 con distintas endonucleasas de restricción con el oligonucleótido V8-4, y marcado con ^{32}P. La temperatura de hibridación fue de 38 °C. En este caso empiezan a aparecer falsos positivos. 1)lambda *Hind* III; 2) *Sma* I; 3) *Eco* RV; 4) *Sal* I; 5) *Bgl* II; 6) *Bam* HI; 7) *Sac* I; 8) *lambda* Hind III.

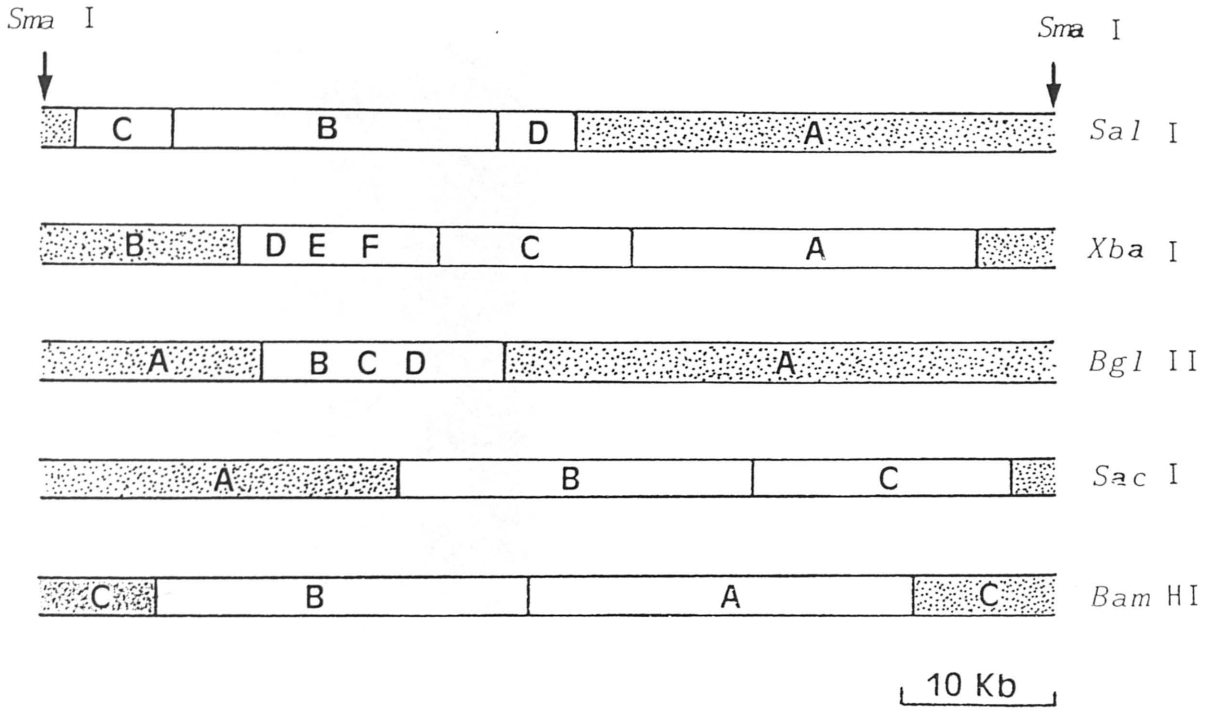


Figura 32. Esquema de los distintos fragmentos del plásmido pMB2 que hibridan con el oligonucleótico V8-4. La barra corresponde a un segmento de 10 Kb.

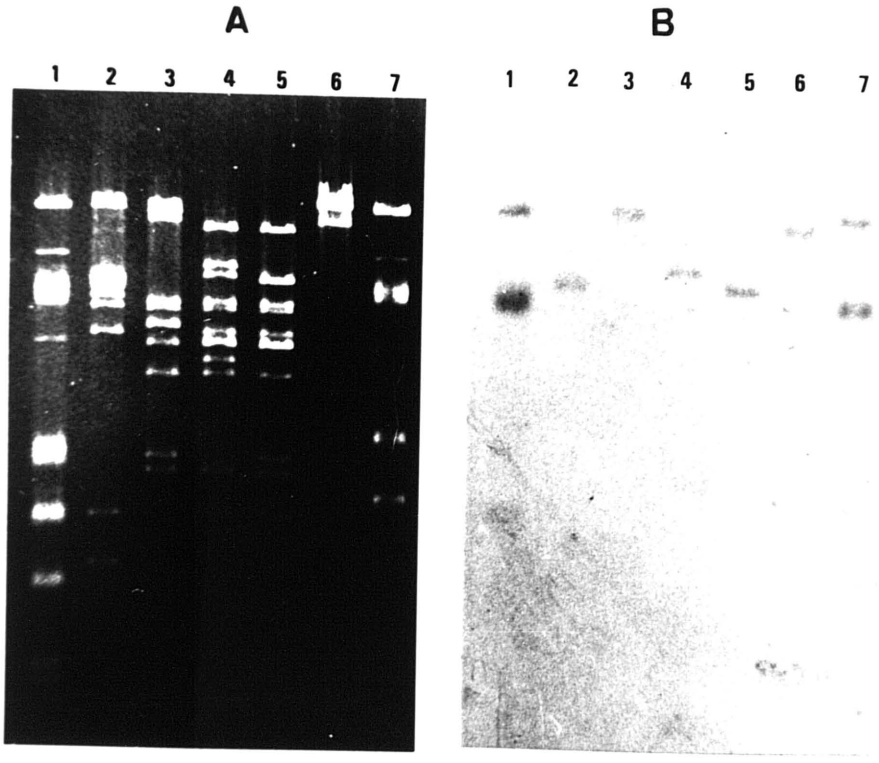


Figura 33. Digestiones dobles del plásmido pMB2 con distintas endonucleasas de restricción e hibridación con el oligonucleótico marcado con ^{32}P V8-4. 1) lambda *Hind* III; 2) *Sal*/*Xba*I; 3) *Sal* I/*Pst* I; 4) *Xba* I/*Pst* I; 5) *Sal* I/*Xba* I/*Pst*I; 6) *Bam* HI; 7) lambda *Hind* III.

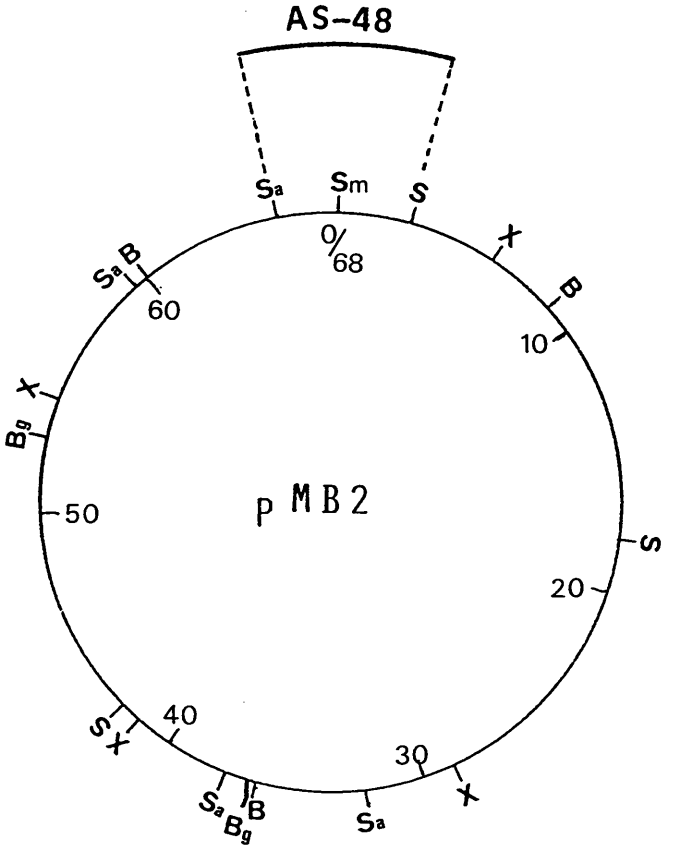


Figura 34. Mapa físico de pMB2. El fragmento Sac I/Sal I se indica con una línea gruesa y corresponde con la región que cofifica el péptido AS-48.

UNIVERSIDAD DE NAVARRA

DISCUSION

La estirpe *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48, procedente de un exudado de herida, constituye un interesante ejemplo de microorganismo poseedor de recursos que le permiten el predominio en su hábitat natural. En efecto, aparte de aquellas características de resistencia incrementada a los agentes ambientales propias de los enterococos, tales como crecimiento a temperaturas relativamente altas (45 °C), pH alcalino, alta concentración de NaCl (6,5 %), y sales biliares, y la capacidad propia del grupo para fermentar una amplia variedad de sustratos, con abundante producción de diversos ácidos orgánicos, que determinan la bajada del pH con el consiguiente efecto inhibidor del crecimiento bacteriano, habría que añadir que esta bacteria excreta al medio dos inhibidores específicos, que han sido caracterizados previamente: una bacteriocina designada como Bc-48 y el antibiótico peptídico AS-48 (López-Lara, 1988; Martínez-Bueno *et al.*, 1990; Gálvez *et al.*, 1989a,b,c). Ambas sustancias son de naturaleza proteica, siendo la primera de alto Pm y activa frente a estirpes relacionadas, y la segunda de amplio espectro de acción y bajo peso molecular. El estudio de los determinantes genéticos de dichas sustancias han sido abordados en esta Memoria.

Aparte de las peculiaridades características antagonistas de S-48 de *E. faecalis*, en general estos microorganismos poseen otras que los hacen particularmente interesantes, por lo que actualmente estan siendo objeto de amplios estudios. En primer lugar, habría que hacer mención al sistema tan particular de conjugación genética de algunos plásmidos de *E. faecalis*, que se transfieren eficientemente en medio líquido debido a que las células receptoras excretan feromonas sexuales: polipéptidos estables al calor que inducen a las células donadoras a adherirse. Este comportamiento "adhesido" se debe a que sintetizan una nueva proteína que recubre la superficie celular, causando la agregación de ambas, donadoras y receptoras (Ehrenfeld *et al.*, 1986). Como consecuencia de esta inducción, se transfieren los plásmidos con una elevada frecuencia.

En segundo lugar habría que hacer mención de la resistencia que los enterococos presentan en la actualidad a los distintos antibióticos, la cual cada día va en continuo incremento (Clewell, 1990; Moellering, 1990; Murray, 1990).

Esta circunstancia, y el hecho de que estas bacterias se aislen cada vez mas de procesos de enfermedad, hacen muy interesante el estudio de los mecanismos de transferencia de genes y el de aquellos elementos genéticos tales como plásmidos, que están implicados en la producción de sustancias antagonistas.

Plásmidos de E. faecalis S-48

Los estreptococos no escapan al hecho que se da en las bacterias de forma general que es la presencia de plásmidos, si bien, la gran mayoría permanecen crípticos, por no haberse encontrado correlación con un determinado carácter fenotípico. De todos ellos, los mas estudiados han sido los plásmidos de los estreptococos lácticos y de los enterococos.

Los primeros tienen importancia desde un punto de vista industrial, y normalmente se ha asociado a los plásmidos con propiedades metabólicas propias de estos microorganismos: utilización de citratos, actividad proteolítica, fermentación de azúcares (lactosa y sacarosa), así como producción de bacteriocinas y antibióticos (McKay & Baldwin, 1982). Los segundos tienen importancia desde un punto de vista clínico, y sus plásmidos han sido normalmente relacionada con la resistencia a antibióticos, producción de hemolisinas y capacidad para responder a feromonas sexuales de (Courvalin *et al.*, 1972; Clewell *et al.*, 1974; Jacob & Hobbs, 1974; Jacob *et al.*, 1975; Dunny *et al.*, 1975; van Embden *et al.*, 1977).

Para el caso particular de *E. faecalis* S-48, objeto de este estudio, hemos desarrollado un método rápido y eficiente para la obtención de ADN plasmídico a partir de pequeños cultivos (miniprep), consistente en la modificación de los metodos originales de Anderson & McKay, (1983) y Neve *et al.* (1984), tradicionalmente utilizados para estreptococos lácticos. El uso de otros métodos alternativos, como la lísis alcalina (Birmboin & Doly, 1979), lisis por calentamiento (Holmes & Quicgley, 1981), o

bien de procedimientos más complicados que necesitaban partir de mayores volúmenes de cultivo (Guerry *et al.*, 1973; LeBlanc & Lee, 1979), entre otros, no dieron resultados satisfactorios cuando se aplicaron a la cepa S-48 de *Enterococcus faecalis*, debido principalmente a que no se producía la lisis celular, o bien rendían preparaciones con abundante contaminación en ADN cromosómico.

Con el procedimiento de extracción plasmídico desarrollado en esta memoria, hemos puesto de manifiesto la presencia de al menos 4 moléculas de ADN extracromosómico con diferente movilidad electroforética, dos de ellas con un alto peso molecular (pMB1 y pMB2, de aproximadamente 68 y 80 Kb) y dos miniplásmidos (pMB3 y pMB4) de alto número de copias, de acuerdo con la intensidad de fluorescencia en geles de agarosa. Estos datos además se corroboraboraron con los obtenidos mediante preparacion de ADN plasmídico a gran escala y su posterior purificación en gradiente de densidad CsCl-EtBr.

No obstante, aunque el rendimiento en ADN plasmídico de las "miniprep" era bastante satisfactorio, sin embargo no estaban convenientemente limpias para su digestión con endonucleasas de restricción. Para llevar a cabo estos experimentos, siempre era necesario hacer una purificación del ADN plasmídico en gradiente de densidad CsCl-EtBr.

Esta abundancia de ADN extracromosómicos en *E. faecalis* no es en términos generales muy frecuente. Sin embargo, es posible encontrar referencias de plásmidos muy similares a pMB1 y pMB2 en cuanto al tamaño. Normalmente estos plásmidos suelen codificar proteínas citotóxicas, tales como hemolisinas y bacteriocinas (Jacob *et al.*, 1976; Tagg *et al*, 1976; Clewell, 1981), por ello nos centramos en

estos elementos genéticos como los posibles candidatos a codificar la producción e inmunidad de los antagonistas producidos por S-48 (AS-48 y Bc-48). En términos generales, la observación de un fenotipo inusual en aislados de especies bacterianas ya caracterizadas, es con frecuencia la primera indicación de que dicho carácter está determinado plasmídicamente (Hopwood, 1978; Stanisich, 1988). Esta hipótesis inicial, se demostró mediante experimentos de curación, transferencia genética por conjugación y transformación,y finalmente mediante hibridación. Estas evidencias y constituyen normalmente los argumentos más utilizados para demostrar el origen de un determinado carácter.

El primer criterio que se aplicó para demostrar el origen no cromosómico de AS-48 y Bc-48, fue la estabilidad genética y curación de ambos caracteres: curación espóntanea y mediante agentes químicos (anaranjado de acridina, bromuro de etidio). En estos estudios se puso de manifiesto que todos los mutantes Bc-48$^-$ y AS-48$^-$, tenían alterado alguno de los plásmidos presentes en S-48. La pérdida de un determinado fenotipo asociado con la pérdida o mutación de un plásmido, constituye la primera evidencia del origen extracromosómico de este carácter (Novick, 1969; Hopwood, 1978). De esta forma pudimos relacionar al plásmido pMB1 con el carácter Bc-48 y al plásmido pMB2 con el antibiótico AS-48, ya que todos los mutantes Bc-48$^-$ (B-48-2, B-48-47, A-48-32) sufrían una delección en pMB1, y todos los mutantes AS-48$^-$ estaban curados del plásmido pMB2. Además, el mutante B-48-28, que se caracterizó previamente como hiperproductor de Bc-48 (Martínez-Bueno 1986), estaba curado de pMB2 y también sufría una delección en pMB1. Esta delección sin embargo era diferente a la de los mutantes B-48-2, B-48-47 y A-48-32, y pensamos que podría afectar a los genes involucrados

en el control de número de copias. Efectivamente este nuevo plásmido deleccionado, aparecía con una intensa fluorescencia en los geles de agarosa; esta circunstancia podría ser la causa de que fuese hiperproductor de Bc-48. En cambio la delección sufrida por los mutantes no productores de Bc-48, podría estar relacionada con los genes de la producción e inmunidad frente a Bc-48.

Estos tipos de variación en el perfil plasmídico, coincidía con la subdivisión que habiamos establecido de los mutantes derivados de la cepa silvestre S-48 en tres grupos (Martínez-Bueno, 1986; Martínez-Bueno *et al.*, 1990). El grupo I que incluía aquellos mutantes carentes de la producción de Bc-48, tienen deleccionado el plásmido pMB1; el segundo grupo formado por los mutantes que carecen de la producción de AS-48, están curados del plásmido pMB2; y finalmente el grupo III, que se caracteriza por presentar delección en pMB1 (pMB1-del) y estar curados del pMB2, siendo evidentemente dobles mutantes AS-48$^-$, Bc-48$^-$. Tan sólo el mutante B-48-28, representa una subdivisión del grupo II, puesto que además de la curación del plásmido pMB2, transporta una delección en pMB1 que quizás afecte al control del número de copias del mismo.

No parece probable que los miniplásmidos (designados como pMB3 y pMB4) de *E. faecalis* S-48, estén implicados en el carácter antagonista de esta bacteria, ya que todos los mutantes obtenidos AS-48$^-$ Bc-48$^-$, no muestran modificación a nivel de estos plásmidos. Sin embargo, su presencia es de indudable interés puesto que nos provee de nuevas herramientas para realizar estudios genéticos en *Enterococcus*, ya que al ser plásmidos de pequeño tamaño, estar en alto número de copias y presentar una gran estabilidad, pueden ser unos buenos candidatos para la

construcción de vectores de clonación en estreptococos.

En ningún caso se obtuvieron mutantes curados totalmente del plásmido pMB1, a lo sumo se ha logrado, con una frecuencia del 0,2 % la delección del mismo mediante tratamiento continuado con bromuro de etidio. Este tipo de tratamiento se recomienda cuando la curación en condiciones normales resulta ineficaz, de esta forma la bacteria puede subcultivarse durante varias generaciones en presencia del mutágeno, incrementando de este modo las posibilidades de cambios y de pérdida del plásmido (Stanisich, 1988). Estos resultados nos llevan a plantearnos ¿ que función cumple una cantidad de ADN tan considerable ?; ¿por qué no se ha logrado una curación total del mismo ?

Aunque no tenemos una respuesta tajante para las cuestiones planteadas a este respecto, sin embargo, habría que tener en cuenta ciertos hechos: en primer lugar, que la presencia de ADN extracromosómico supone un consumo adicional de energía para la célula, por lo cual sería lógico pensar que se eliminarían antes o después bajo la presión de agentes de impiden su replicación, como es el bromuro de etidio (tal como ha sucedido con el plásmido pMB2). El hecho de que pMB1 permanezca en la célula, y a lo sumo sólo se produzcan curaciones parciales (delecciones), nos plantea la posibilidad de que pMB1 pudiera transportar funciones vitales para la célula. Esta última posibilidad se ha descrito en ocasiones para plásmidos grandes, cuya contribución a la función del hospedador puede ser considerable. Otra explicación sería que el plásmido simplemente fuese refractario al agente curante usado (Stanisich, 1988). En estos casos cuando la curación total no puede demostrarse, se deben tener en cuenta otros criterios para demostrar el origen extracromosómico de un

carácter, como comentaremos posteriormente.

En relación con los mutantes Bc-48$^-$, el mecanismo molecular de la pérdida de este carácter parece radicar en todos los casos en delecciones del plásmido pMB1, delecciones que no parecen aleatorias sino bastante concretas, al menos en cuanto al tamaño se refiere (aproximadamente comprendidas entre 20-25 Kb). Estos hechos nos han llevado a pensar que estos cambios se pueden relacionar con la presencia de zonas calientes ("hot spots") en dicho plásmido, que podrían ser tal vez secuencias de inserción, o repeticiones invertidas, elementos que se saben promueven delecciones a veces bastante amplias (Albertini *et al.*, 1982; Balbineter, 1988; Mollet & Delley, 1990).

Se podría analizar a la luz de estas hipótesis, otros hechos observados en la cepa S-48 y derivados, y que redundan en la inestabilidad de pMB1:

1) En estudios previos, se describieron unos mutantes Bc-48$^-$ (A-48-15 y A-48-9) que presentaban una gran variabilidad en el diámetro de los halos de inhibición producidos sobre cepas sensibles (Martínez-Bueno, 1986). Tal heterogeneidad la podríamos explicar si consideramos la existencia de estas "zonas o puntos calientes" en pMB1, que serían responsables de reorganizaciones del material genético, con la consiguiente variación del fenotipo Bc-48.

2) Las reorganizaciones del plásmido pMB1, se producen al azar en condiciones normales de crecimiento. Asi, en los análisis del perfil plasmídico de los mutantes A-48-9 y A-48-15 y de la estirpe salvaje S-48, es posible detectar ocasionalmente una banda en los geles de agarosa más ó menos definida, y con un Pm comprendida entre 50-60

Kb, que además hibrida especificamente con el plásmido pMB1. Esta bandas pudieran en realidad corresponder con derivados deleccionados de pMB1, originando de esta forma subpoblaciones del plásmido pMB1. En relación con estos hechos, se han descrito en *S. lactis*, dos plásmidos, pLP712 y pSK08, que sufren delecciones con alta frecuencia (Gasson, 1982 y 1983), y que se han encontrado en regiones del plásmido que contienen ciertas secuencias de inserción, de función desconocida. Además la frecuencia de estas mutaciones depende del fondo genético del hospedador (Clewents & Syvanen, 1981).

3) Finalmente, otro tipo de reorganización producida en pMB1, es la que muestra el mutante hiperproductor de Bc-48 (B-48-28). El perfil de plásmidos de esta cepa, muestra una nueva delección, que conduce en esta ocasión a un aumento en el número de copias del mismo, lo que justificaría la hiperproducción observada. En este caso la delección afecta al grupo de genes implicados en la regulación de este proceso, aunque ello no ha sido investigado.

Otro aspecto investigado en relación con los plásmidos de S-48 investidos, ha sido la respuesta de los mismos frente a los péptidos sexuales o feromonas sexuales producidos por la cepa OG1X de *E. faecalis* (Dunny *et al.*, 1978; Ike *et al*, 1983; Galli *et al.*, 1989; Wanner *et al*, 1989; Galli *et al.*, 1990). En este sentido, ha quedado puesto de manifiesto que los plásmidos pMB1 y pMB2 erán los únicos que respondían a las feromonas de OG1X, lo cual indicaba que además de codificar los genes responsables de la producción e inmunidad frente a Bc-48 y AS-48 respectivamente, también deben portar los genes responsables de la síntesis de proteínas de agregación. Esto

se deduce del hecho de que los mutantes Bc-48$^+$ (A-48-9 y A-48-15) se agregaban en medio líquido cuando se ponían en contacto con ellos sobrenadantes de OG1X y en cambio los dobles mutantes B-48-2 y B-48-47, no se agregaban; por lo que es lógico suponer que la delección que ha sufrido pMB1, además de afectar a los genes *Bc-48*, también ha involucrado a la expresión de genes que determinan la producción de las sustancias de agregacion. Por igual motivo, la agregación que sufría el mutante A-48-32, portador del plásmido pMB2 y deleccionado en pMB1, era debida a la presencia de genes de la agregación también en pMB2, como de hecho hemos comprobado y que comentaremos posteriormente.

Todos estos datos se ajustarían al modelo de respuesta recientemente propuesto por Clewell (1990) y Dunny (1990), en el que los plásmidos de *E. faecalis* de tamaño semejante a pMB1 y pMB2, albergan genes para proteínas antigénicas de superficie inducibles por la presencia de las feromonas sexuales de *E. faecalis*, y que en ausencia de las mismas no se expresarían. Estas proteínas facilitaría el contacto célula-célula, favoreciendo de esta forma la transmisión de los plásmidos.

Estudios sobre el plásmido pMB1

Nuestra hipótesis de trabajo inicial era que el plásmido pMB1 transportaba los genes responsables para la producción e inmunidad de la bacteriocina Bc-48 de *E. faecalis* S-48. Sin embargo, dada la imposibilidad de curación total del mismo, era necesario disponer de otras evidencias fisiológicas, como la transferencia genética, que confirmarían esta hipótesis.

A este respecto, hemos comprobado que la capacidad para producir la bacteriocina Bc-48 podía ser transferida con una frecuencia relativamente alta desde *E. faecalis* A-48-15 hasta *E. facalis* OG1X mediante el proceso de conjugación (8×10^{-3} transconjugantes por célula donadora). El papel activo de la raza OG1X en esta transferencia parecía claro, dada la alta frecuencia de conjugación observada, y podía ser atribuida a la síntesis de proteínas de agregación codificadas por pMB1, tal como hemos comentado anteriormente. No parece probable que hayan existido otros mecanismos de transferencia génica, como por ejemplo la transformación o la transducción, puesto que este proceso no se ve afectado por la presencia de ADNasas o bien no se llevaron a cabo con filtrados libres de las células donadoras; además se demostró que se necesita la viabilidad celular del donador para que la transferencia pueda ocurrir.

El perfil plasmídico de los transconjugantes aislados, mostraba en todos los casos, un nuevo plásmido con un peso molecular de aproximadamente 52 Kb, de acuerdo con su mobilidad electroforética.

El comportamiento de las nuevas estirpes

transconjugantes, no diferia del de los mutantes derivados de S-48 pertenecientes al grupo II (Martínez-Bueno, 1986; Martínez-Bueno *et al.*, 1990). Es más, tenían un espectro de acción idéntico, inhibiendo sólo a estirpes relacionadas (como *E. faecalis* S-47, S-72, o bien los mutantes del grupo I y II), si bien los halos de inhibición eran de menor tamaño que los producidos por la raza donadora A-48-15 o por el mutante hiperproductor de Bc-48 (B-48-28). Esto apuntaba hacia una diferente expresión de los genes de Bc-48 en las estirpes OG1X y e A-48-15 que podría ser atribuida fundamentalmente a dos causas: 1) por una parte es posible que el fondo genético en el que se encuentra el plásmido, no sea el óptimo (por ejemplo que no tengamos promotores fuertes, ó que no se exporte suficientemente al medio extracelular, ó incluso falten otros genes que permitan madurar la proteína). 2) Esposible también que al transferirse este plásmido desde el donador al receptor se hubiesen afectado genes relacionados con la expresión de Bc-48, ya que el nuevo plásmido de 52 Kb, es de menor tamaño que el posible plásmido pMB1 implicado inicialmente en este carácter.

Respecto a la producción en medio líquido de Bc-48 por los transconjugantes, apenas se obtenían títulos suficientes para inhibir el crecimiento de bacterias sensibles, cuando los sobrenadantes eran ensayados por la técnica de los pocillos, lo cual indica unas cantidades muy bajas de este inhibidor en los mismos.

Por lo que respecta a la resistencia frente a Bc-48, los transconjugantes, presentaban un comportamiento similar al de los mutantes del grupo II (productores de Bc-48), y todos eran resistentes al inhibidor. En este aspecto, no parece existir modificación en la expresión de esta

característica tal como sucede con los genes de la producción.

Puesto que estas nuevas cepas eran inmunes y producían Bc-48 en medio sólido, podemos relacionar estos caracteres, de acuerdo con los criterios de Hopwood (1978), con la adquisición de este plásmido de 52 Kb.

Nuestras investigaciones para establecer la relación de este ADN con el de la cepa original (A-48-15 ó S-48), mostraron, mediante experimentos de hibridación con sondas no radiactivas, que este nuevo plásmido de 52 Kb era un derivado de pMB1, al hibridar específicamente con éste, motivo por el cual lo designamos como pMB1-1.

Asi mismo pudimos confirmar con estos experimentos de hibridación, el origen de todos los plásmidos deleccionados que aparecían en todos los mutantes no productores de Bc-48, ya que hibridaban específicamente con pMB1-1. Todos estos datos, demuestran pues la homología de pMB1-1 con pMB1, y corroboran la hipótesis postulada al iniciar los experimentos de curación, sobre el origen extracromosómico de Bc-48.

En relación con estos resultados cabe comentar que, se han descrito algunos tipos de reorganizaciones en plásmidos de estreptococos, las cuales aparecen durante o después de la transferencia bien por transformación o por conjugación a nuevas especies hospedadoras (LeBlanc *et al.*, 1982; Clewell, 1981). Asi por ejemplo, entre los plásmidos MLS, durante la transferencia, aparecen delecciones que conducen a una pérdida en la transmisibilidad ó en la resistencia a algunos de los antibióticos MLS que transportan, o bien a alteraciones en el número de copias del plásmido (LeBlanc *et*

al., 1982; Behnke & Gilmore, 1981), o bien ocasionan procesos de cointegración entre plásmidos (Anderson & McKay, 1984).

La organización de este nuevo plásmido pMB1-1 que aparece en los transconjugantes ha sido una delección, y cuya consecuencia mas inmediata ha originado ua alteración del número de copias del mismo, sobre todo cuando lo comparamos con pMB1 en las cepas salvajes (esto último se comprueba por ejemplo cuando se visualizan ambas bandas de los geles de agarosa, de forma que aparece mucho más intenso el pMB1-1 que pMB1). Esto nos podría sugerir la existencia de un gen que actuara controlando negativamente el número de copias en la estirpe salvaje, y que en la delección que afecta a pMB1.1 se hubiese perdido dicho gen. La consecuencia inmediata de este proceso, evidentemente originaría un nuevo plásmido de alto número de copias. Este proceso, lo describieron Macrina *et al*, 1980, al introducir el plásmido pAMß1, que era de bajo número de copias en la cepa salvaje, en *S. sanguis*, apareció deleccionado y en alto número de copias.

Otras de las funciones que en ocasiones se alteran durante la transferencia es la capacidad de transmisibilidad (LeBlanc *et al.*, 1982), sin embargo en este caso, esta función no parece estar afectada, puesto que era posible realizar experimentos de complementación en mutantes Bc-48$^-$.

Concretamente realizamos la restauración del fenotipo Bc-48 a mutantes no productores del inhibidor (B-48-47E), a los que previamente habíamos introducido el plásmido pIL253 que codifica resistencia a eritromicina (pIL253). La frecuencia de transmisión de este carácter fue relativamente alta (5×10^{-2} por célula donadora) y bastante similar al

obtenido en los cruces iniciales A-48-15 con OG1X (8×10^{-3}). Esto demostraba que la capacidad de transferencia permanecía inalterable en los transconjugantes T1-4 (OG1X:pMB1).

Por otra parte, los nuevos retrotransconjugantes, además de adquirir la capacidad inhibidora (por lo cual fueron seleccionados), presentaban el mismo espectro de acción que los mutantes del grupo II: A-48-9, A-48-15 y B-48-28; eran resistentes a la misma (por ejemplo cuando se ensayaban en experimentos de sensibilidad cruzada con los mutantes del grupo II); y finalmente transportaban el plásmido pMB1-1, de forma que coexistía en la misma célula con pMB1-del. Para este último resultado, no tenemos una explicación, ya que la existencia de 2 plásmidcs similares en la célula, normalmente conduce a una segregación de alguno de ellos; sin embargo esto no parecía ocurrir ya que tras sucesivas generaciones ambos plásmidos permanecían inalterables. Tampoco se apreciaban procesos de recombinación como pudiera esperarse entre ambos plásmidos, ya que la homología entre ellos ha quedado demostrada por experimentos de hibridación, cuando el plásmido pMB1 se utilizaba como ADN prueba, de forma que como era de esperar hibridaba con pMB1-del, pMB1-1 y con el plásmido deleccionado existente en el mutante hiperproductor de Bc-48 (B-48-28), asi como con las bandas de ADN que anteriormente hemos descrito como derivadas de pMB1 (comprendidas ente 50-60 Kb), que aparecen en la estirpe salvaje S-48 y en el mutante A-48-9 ó A-48-15.

Sobre la coexistencia de pMB1-del y pMB1-1 en la misma célula, creemos que se explicaría si aceptamos que la delección que aparece en uno de los dos plásmidos hubiese afectado la región de incompatibilidad de alguno de ellos, y

de esta forma podrían originar unidades replicativas independientes.

Asímismo, los nuevos retrotransconjugantes, además de producir Bc-48 en medio sólido, también producían el inhibidor (Bc-48) en los sobrenadantes en cantidades lo suficientemente altas como para ser detectadas. Asi, en una curva de producción en medio líquido, se obtenían títulos de Bc-48 similares a los del mutante hiperproductor B-48-28, y superiores pues a los de la cepa donadora A-48-15 utilizada inicialmente en ls experimentos de transferencia genética.

Evidentemente el hecho de que el mismo plásmido pMB1-1 transportado por las diferentes cepas, y al que hemos relacionado con la producción e inmunidad a la bacteriocina Bc-48, se exprese en el transconjugante B-48-47E1 en niveles superiores (por lo que respecta a Bc-48) que el plásmido original, creemos que depende principalmente del fondo genético en el cual se encuentra, ya que el mismo plásmido en OG1X, los niveles de Bc-48 detectados son cuantitativamente mucho más inferiores.

Resumiendo, podemos cocluir que la delección que se ha producido en el plásmido pMB1 durante la transferencia de A-48-15 a OG1X, habría originado una nueva entidad replicativa, designado como pMB1-1, en el cual se encuentran los genes responsables de la producción e inmunidad a Bc-48 y además, una mutación que ha alterado el control del número de copias del mismo; por otra parte no parece probable que se encuentren alteradas otras funciones como por ejemplo la transmisibilidad: genes *tra*, descrito en otros plásmidos similares que codifican bacteriocinas, por ejemplo pAD1 (Clewell, 1990).

Finalmente hemos realizado una caracterización parcial de pMB1.1 mediante endonucleasas de restricción, lo que nos permitirá conocer la estructura del mismo para la clonación de los genes Bc-48. El estudio en ese sentido de este plásmido, ofrece muchas más ventajas que si lo realimos sobre el plásmido pMB1 silvestre, puesto que este último es de bajo número de copias y de mayor tamaño molecular, lo que plantea numerosos problemas a la hora de su purificación. De estos datos, el aspecto más notable es el hecho que de todas las endonucleasas usadas, sólo una de ella linearizaba a pMB1-1, lo que es de indudable interés para la realización del mapa físico de este plásmido.

Por otra parte, pMB1-1 reune unas características que lo hacen particularmente interesantes, como por ejemplo la alta frecuencia de transferencia, lo que permitiría su uso como vehículo de transporte de genes en estreptococos.

Características del plásmido pMB2 de *E. faecalis* S-48

El péptido AS-48 es un antibiótico de naturaleza básica de bajo peso molecular, y de amplio espectro de acción, inhibiendo a estirpes Gram-positivas y Gram-negativas (Gálvez *et al*, 1986; 1989a,b,c), que ejerce su acción antibacteriana a nivel de membrana celular, probablemente originando canales en la misma (Gálvez *et al.*, 1990, manuscrito en prensa).

Recientemente se han descrito diferentes antibióticos peptídicos, de bajo Pm y bastante semejantes a AS-48 en cuanto a caracteres físico-químicos y actividad biológica, entre los que caben mencionar la epidermina (Allgaier *et al.*, 1986; Scnell *et al.*, 1988), la gallidermina (Schnell *et al.*, 1988), nisina (Dodd *et al.*, 1990), etc. aunque estos últimos presentan una particularidad y es que llevan residuos de lantionina.

De estos antibióticos, a excepción de la gallidermina, que esta determinada cromosómicamente (Schnell *et al*, 1989), el resto tiene un origen plasmídico (Schnell *et al*, 1988; Kaletta & Entian, 1989; Dodd *et al.*, 1990).

En relación con los determinantes genéticos de AS-48, en esta memoria presentamos los datos suficientes para demostrar el origen extracromosómico del mismo. De acuerdo con los resultados iniciales de curación, hemos relacionado la producción e inmunidad frente a AS-48 con el plásmido pMB2, de 68 Kb de Pm, ya que la curación de ambos caracteres originaba cepas carentes de pMB2. Esta hipótesis la hemos corroborado con diferentes experimentos, tales como la transferencia por conjugación y finalmente mediante

hibridación.

La resistencia frente al antibiótico peptídico AS-48 (AS-48^R) junto con el plásmido pMB2, pueden ser transferidos a *E. faecalis* OG1X desde E. faecalis A-48-32, pero con una baja frecuencia comparada con el caracter Bc-48. Nuestros datos indican que la herencia de AS-48 ocurría con una frecuenca por célula donadora de aproximadamente $2,6 \times 10^{-7}$, y no se afectaba por la presencia de ADNasa I, lo cual descartaba que hubiese actuado un mecanismo de transformación; de igual forma se realizaron controles con sobrenadantes de células donadoras (para la transducción) y con células donadoras tratadas con cloroformo (para la viabilidad celular), que en ningún caso dieron lugar a colonias AS-48^R.

Los transconjugantes obtenidos de este cruce, eran resistentes frente a AS-48 a una concentración similar a la de las células donadoras (superior a 460 UA/ml), y carecían de la capacidad de hidrólisis de la gelatina, lo cual demostraba pues que eran estirpes bacterianas derivadas de OG1X que habían adquirido la resistencia frente al antibiótico AS-48, por un mecanismo conjugativo.

Además del carácter de resistencia frente a AS-48, los transconjugantes AS-48^R a los que se comúnmente se denominaron transconjugantes T4-31, también producían algún tipo de inhibidor en medio sólido, que era posible detectar cuando estas bacterias se ensayaban sobre *E. faecalis* S-47 y *E. faecium* S-29; en otros términos, tenían un espectro de acción antagonista similar al de A-48-32. No obstante el diámetro de halo producido era significativamente inferior que el producido por la cepa orinal A-48-32. A este respecto, podíamos relacionar esta disminución en el

diámetro de inhibición con la observada en los transconjugantes de la bacteriocina Bc-48 anteriormente comentada.

Sobre la posible producción de AS-48 en medio líquido por parte de los transconjugantes T4-31, no se obtuvieron títulos detectables por los procedimientos habituales de ensayo de este antibiótico (técnica de los pocillos). Sin embargo, hemos comprobado que el inhibidor producido por estas bacterias correspondende realmente con AS-48, mediante 2 técnicas:

-Por concentración de los sobrenadantes crudos por S-Sepharose.

-Mediante anticuerpos antiAS-48.

En el primer caso, cuando concentrabamos 25 veces los sobrenadantes de un cultivo crecido durante 7 horas de T4-31, obteníamos actividad inhibidora con un título de aproximadamente UA/ml, tanto sobre S-47 como sobre S-29; esta última es la bacteria indicadora utilizada para la detección del antibiótico AS-48.

En el segundo caso, la identidad de ambos inhibidores se corroboró mediante el empleo de anticuerpos policlonales dirigidos contra AS-48, y obtenidos mediante inmunización con AS-48 sobre conejos. Esto nos permite contar con nuevas herramientas de trabajo, sobre todo para desarrollar en el futuro técnicas inmunocitoquímicas en relación con AS-48, al mismo tiempo que demostrar el carácter antigénico de este péptido, lo cual evidentemente y como era de esperar, limita el posible uso terapeútico del mismo.

Nuestros datos mediante ELISA y Western blot indicaban que el transconjugante T4-31 produce AS-48, pero en niveles muy inferiores que los de la cepa donadora A-48-32 ó bien S-48, y por este motivo, no se detectaban en los sobrenadantes de extractos crudos de los mismos.

Curiosamente, *E. faecalis* OG1X es un mutante derivado de la raza OG1 de *E. faecalis*, y deficiente en proteasas extracelulares, a diferencia de S-48 ó A-48-32, en los que claramente se ha descrito una amplia actividad proteásica (Gelatinasa positivo); por todo esto y en contra de lo que pudiéramos esperar, se tendría que acumular más inhibidor bien AS-48 o bien Bc-48 en los sobrenadantes de OG1X, que en los sobrenadantes de S-48 (ya que evidentemente podrían sufrir una cierta hidrólisis). Sin embargo y como hemos comprobado en los dos casos, esto no ocurría. Esta disminución de la expresión de estos genes tanto de AS-48 como de Bc-48 en OG1X, creemos que se debería principalmente al fondo genético en el que se encuentran estas entidades, y que es muy diferente del encontrado en la cepa salvaje S-48.

En relación con los plásmidos existentes en los transconjugantes AS-48^R, observamos que todos albergaban un único plásmido que comigraba con pMB2. La identidad de este ADN con el plásmido pMB2 de la cepa salvaje S-48, la hemos comprobado mediante técnicas de hibridación ADN-ADN, tras marcarlo con dUTP-Dig, lo que demostraba su total homología. Además, se comprobó que en los mutantes curados de AS-48, no existía ningún tipo de ADN relacionado con pMB2.

Finalmente pMB2 presentaba el mismo perfil de restricción tanto en S-48 como en el transconjugante T4-31, que por este motivo se llamó OG1X(pMB2). Este hecho, nos permitía obtener grandes cantidades de ADN plasmídico puro,

sin tener que recurrir a purificarlo de la cepa salvaje S-48 ó A-48-32.

Todos los transconjugantes AS-48$^+$, presentaban además la característica de formar flóculos o agregados celulares durante su crecimiento en medio líquido, que incluso aumentaban cuando el cultivo se incubaba con agitación. Este carácter nos sugirió la hipótesis de que pMB2 transportaría "genes de la agregación", similares a los descritos por otros plásmidos que responden a feromonas sexuales de OG1X.

El sistema de feromonas sexuales de esta bacteria, se caracteriza por un mecanismo de intercambio plasmídico. Un modelo para su función fue dado inicialmente por Ike & Clewell (1984) y que hemos descrito ampliamente en la presente Memoria, en el aparado de Introducción. Según este modelo, y de acuerdo con los datos que presentaron Yagi *et al* (1983) e Ike & Clewell (1984), existe una sustancia de agregación que media en el contacto intimo entre las células donadoras y receptoras, que es de naturaleza proteica. Se postuló inicialmente que esta sustancia se distribuiría inicialmente por igual en las zonas de la pared bacteriana de células inducidas por feromonas. Sin embargo, nuestros datos indican que esta sustancia está distribuida zonalmente sólo sobre las partes más viejas de la pared celular y próximas al septo de división. Estos datos han sido similares a los obtenidos por otros autores (Wanner *et al*, 1989).

No obstante, y a diferencia de lo que ocurre con todos los plásmidos de feromonas sexuales descritos, la detección estructural y bioquímica de la sustancia de agregación, sólo se detecta de forma inducible en la fase logarítmica de crecimiento, y después de 15 a 20 min de la adición exógena

de la feromona sexual. En nuestro caso, esto es cierto, sólo cuando pMB2 se encuentra en las cepas salvajes utilizadas en este estudio (S-48, A-48-32), pero cuando pMB2 existe en OG1X la capacidad de agregación es constitutiva.

Estos resultados, en realidad son diferentes a los obtenidos en la cepa OG1X con otros plásmidos similares, pAD1 ó pPD1 (Ike *et al*, 1983; Dunny, 1990), de forma que sólo se lograban cepas constitutivas en cuanto a la agregación, mediante mutagénesis con el transposon Tn917 en determinadas regiones de los plásmidos pAD1 y pCF10 (Clewell & Weaver, 1989; Dunny, 1990), y que posteriormente se han identificado como genes reguladores de la respuesta a la agregación. El modelo que hasta el momento se aplica en la transferencia mediada por feromonas sexuales, es que cuando un plásmido entra en la célula que produce distintas feromonas, deja de sintetizarse una feromona concreta que es a la cual responde en plásmido, y en su lugar se produce otra molécula similar que compite por la acción de la primera (Ike et al, 1983), y que posteriormente se ha comprobado que es un inhibidor de la respuesta a la agregación y codificado por el propio plásmido. De esta forma las nuevas cepas que contienen ese ADN no se agregarían de forma constitutiva, sino inducible por la presencia en el medio de la feromona relacionada.

En nuestro caso, no sabemos exactamente el por qué de la agregación, en los transconjugantes T1-4 (OG1X:pMB2) de una forma constitutiva, a no ser que ocurrieran algunos fenómenos que a continuación describimos:

-que en las nuevas razas no decaiga la producción de la feromona relacionada con pMB2, de forma que continuamente se estarían induciendo la transcripción y expresión de los

genes de agregación.

-que el inhibidor que se produce cuando un plásmido entra en OG1X (descritos por ejemplo en los plásmidos pAD1 y pcF10), en realidad no exista, con lo cual niveles bajos de feromonas que pudieran producirse, activarían de igual forma la agregación.

Sin lugar a dudas, futuras investigaciones mediante mutaciones con transposones probablemente resuelvan estas incógnitas.

Hemos iniciado los estudios ultraestructurales de esta agregación, mediante microscopía electrónica de barrido, corroborando la existencia de estas proteínas de agregación en los transconjugantes OG1X (OG1X: pMB2). Concretamente, aparecían unas estructuras redondeadas recubriendo la zona más antigua de la pared bacteriana, pero no en el septo de división ni en el polo de la célula contrario a esta región. Ocasionalmente, se observaban unas estructuras alargadas, y que otros autores (Wanner *et al*, 1989) mediante técnicas inmunocitoquímicas y de microscopía electrónica, han visualizado como "hair-like" ó semejantes a pelos, aunque no sabemos exactamene por qué aparecen una u otra estructura, y su verdadero significado en el proceso de agregación; pero sin lugar a dudas son las responsables del crecimiento en forma de flóculos de estas bacterias en medio líquido, que se puede visualizar tanto a simple vista como a microscopía electrónica.

Por último, para demostrar que el plásmido pMB2 de *E. faecalis* S-48 es el responsable directo de la producción y resistencia frente al antibiótico peptídico AS-48, asi como de la síntesis de proteínas de superficie responsables de la

agregación, hemos desarrollado una técnica eficiente para la transformación de protoplastos de *E. faecalis* OG1X con el plásmido pMB2.

La capacidad del polietilenglicol (PEG) para promover la captación de ADN en protoplastos de bacterias ha sido aplicada inicialmente en *Streptomyces coelicolor* y *S. parvalus* (Bibb *et al.*, 1978; Hopwood, 1981). Estos protoplastos sólo son capaces de regenerar a células normales cuando se encuentran embebidos en una mátriz sólida. Posteriormente Smith (1985) describió un sistema similar para transformar células de *Streptococcus (Enterococcus) faecalis*. Desde entonces se han utilizado distintas metodologías para transformar enterococos, aunque todas basadas siempre en la captación de ADN por protoplastos. e inducida por PEG, y posterior regeneración de los transformantes en un medio selectivo isotónico.

Wirt *et al* (1986), propusieron un método para la transformación de protoplastos de *E. faecalis* y posterior regeneración en un medio isotónico a base de succinato sódico como estabilizador osmótico. Con esta técnica se obtenía una alta frecuencia de transformación: 10^3-10^6 transformantes por µg de ADN utilizado, dependiendo principalmente del tamaño del ADN. Nuestros datos utilizando esta técnica de regeneración de protoplastos con OG1X en un medio isotónico compuesto por succinato sódico como estabilizador osmótico y adicionado de AS-48 (12-50 UA/ml), dieron resultados negativos, y no se obtuvieron ninguna colonia transformante AS-48^R. Por ello nos centramos principalmente en las características propias del antibiótico AS-48 utilizado en el proceso de selección. A este respecto Gálvez *et al* (manuscrito en prensa, J. Bacteriology), han propuesto recientemente un mecanismo de

acción de AS-48 a nivel de membrana celular, originando canales con la consiguiente desorganización y pérdida posterior del contenido citoplasmático celular. Esta acción, no sólo afecta a células bacterianas sensibles, sino también a vesículas membranosas artificiales (liposomas) de fosfolípidos. Con estos datos, propusimos inicialmente que AS-48 inpediría la regeneración de los protoplastos por su acción a nivel de membrana, ya que los posibles transformantes no sobrevivirían a la accíon bactericida de AS-48, posiblemene por no expresar aún el gen de resitencia frente a al antibiótico. Esta hipótesis la hemos corroborado mediante un proceso previo de enriquecimiento con células ya regeneradas y posterior selección de colonias AS-48^R.

Basándonos en la inmobilización de células en alginato, hemos utilizado a este como el soporte sólido para la regeneración de protoplastos (previa transformación de los mismos con el plásmido pMB2), de forma que es posible realizar una regeneración incial de los mismos en un medio conteniendo alginato 2 % y sacarosa 0,5 M como estabilizador osmótico en lugar de succinato. Una vez que los protoplastos han regenerado parcial ó totalmente la pared celular (normalmente tras 12-18 h de incubación), se les aplicó una presión selectiva con AS-48. De esta forma se lograron obtener un total de aproximadamente 10^3-10^4 colonias AS-48^R, las cuales además de la resistencia frente al antibiótico, lo producían (a niveles iguales que los transconjugantes T4-31), y finalmente albergaban el plásmido pMB2 utilizado en el experimento de transformación. Así mismo, estas nuevas células se agregaban en medio líquido, con lo cual se demostraba que el plásmido pMB2 es el único responsable de la agregación constitutiva en OG1X y del caracter AS-48.

Esta nueva metodología, creemos que puede ser en el futuro de gran importancia, sobre todo para la clonación del gen de resistencia frente a AS-48, al mismo tiempo que confirma nuestra hipótesis sobre la acción del antibiótico sobre los protoplastos de OG1X.

Finalmente el último apartado que hemos estudiado ha sido la caracterización física del plásmido pMB2 en el transconjugante T4-31, mediante digestiones con endonucleasas de restricción. Hemos construido un posible mapa físico del mismo para las enzimas *Sma* I, *Bam* HI, *Sac* I, *Bgl* II, *Sal* I y *Xba* I. La orientación de los distintos fragmentos la realizamos mediante digestiones dobles, primero con *Sma* I (enzima que linearizó a pMB2) y posteriormente con el resto de las enzimas, con lo cual situamos todos los fragmentos del plásmido que contenían el corte *Sma* I. Este mapa se confirmó también con experiencias de hibridación que corroboraron la orientación de los distintos fragmetos.

Paralelamente, mediante el empleo de un oligonucleótido sintético, deducido de la secuencia aminoacídica de AS-48 hemos localizado un fragmento en el que hipotéticamente se encontraría el gen estructural que codifica el péptido AS-48.

La determinación de la secuencia parcial del péptido antibiótico AS-48, ha sido realizada mediante secuenciación automática por el método de Edman. Sin lugar a dudas, el aspecto a destacar respecto de esta secuencia es la conformación que debe tener AS-48, puesto que en primer lugar presentaba el extremo carboxilo terminal bloqueado, puesto que es resistente tanto a la carboxipeptidasa A y B, y en segundo lugar presentaba el extremo N-amino terminal bloqueado, de forma que resultaba imposible su secuenciación

por el método Edman. Esta estructura le permitiría al péptido AS-48 tener una gran estabilidad y resistencia al mismo tiempo, frente a las posibles proteasas y endopéptidas propias del enterococo.

Dada la imposibilidad de secuenciar al antibiótico como tal estructura, fue necesario realizar digestiones parciales mediante tratamiento con endopeptidasa V_8 y tripsina, y posterior purificación de los fragmentos obtenidos mediante cromatogrfía líquida de alta presión (HPLC). De todos los oligopéptidos originados, se eligió al V8-4 para la deducción del oligonucleótido correspondiente que codifica esta secuencia aminoacídica.

Conocida la secuencia amonacídica de una proteína, la estrategia de usar oligonucleótidos sintéticos fue propuesta localización del gen estructural que lo codifica, fue propuesta incialmente por Wallace *et al* (1979). Bajo apropiadas condiciones, sólo determinados híbridos se formarán en la cual todos los nucleótidos están apareados. De esta forma es posible designar un oligonucleótido prueba que sea una mezcla de todas las posibles secuencias codificadoras para una secuencia aminoacídica dada (Wallace & Miyada, 1987). Sólo uno de los oligonucleótidos de la mezcla será complementario a la región codificante de la proteína. El resto de las otras secuencias sólo formarán híbridos mal apareados ("mismatched") dentro de esta región. Basándonos en estos datos hemos diseñado un oligonucleótido correspondiente a la secuencia del oligopéptido V8-4, que hemos usado para el rastreo del fragmento que contiene *AS-48*.

Esta estrategia ha sido usada con acierto en el mapeo de ciertos antibiótico peptídicos similares a AS-48, como

por ejemplo la nisina (Dodd *et al.*, 1990), el Pep-5 (Kaletta *et al.*, 1989), la Gallidermina (Schnell *et al*, 1989), bajo condiciones de hibridación relativamente suaves.

En nuestro caso, la mayor limitación cuando usamos esta mezcla de oligonucleótidos es que obviamente no tenemos un control positivo para este uso. En este sentido, los oligonucleótidos, tienen tendencia a unirse específicamente a regiones o secuencias no complementarias de ADN (Wallace & Miyada, 1987), sobre todo cuando se usan pruebas inferiores a 14 bases de longitud, de ahí que eligiéramos un nucleótido relativamente largo en cuanto a tamaño (26 mer).

Con nuestros datos, hemos identificado diferentes fragmentos del plásmido pMB2 que hibridaban con la prueba que habíamos designado. Concretamente con el fragmento B de *Bam* HI, con el fragmento B de *Xba* I, con los fragmentos A de las digestiones de pMB2 con *Sac* I, *Sal* I y *Bgl* II, cuando la temperatura dehibridación empleada oscilaba entre 45°-50° C. Todos estos fragmentos contenían al corte *Sma* I de pMB2.

Sin lugar a dudas, uno de los factores críticos en las hibridaciones corresponde a la temperatura de hibridación, junto con el contenido de G + C del oligonucleótido. En este sentido Suggs *et al* (1981), determinaron una fórmura empírica referente a la estabilidad del híbrido formado (Td: es la temperatura en la cual la mitad del híbrido esta disociado), de forma que la temperatura de hibridación (Th) se realiza entre 2-5 °C por debajo de la Td calculada.

$$Td = 2 (A + T) + 4 (G + C)$$

Sin embargo esta fórmula tiene varias limitaciones,

concretamente sólo se emplea cuando la longitud del oligonucleótido está comprendido entre 11-23 bases, y en segundo lugar para oligonucleótidos no degenerados. Cuando se usan oligonucleótidos degenerados, la temperatura de hibridación no debe de exceder de los 50 °C, junto con la temperatura de lavado que suele ser de 30-40 °C por debajo de la temperatura de hibridación (Wallace & Miyada, 1987). En nuestro caso, las temperaturas más restrictivas que hemos encontrado correspondían entre 45-50 °C; por encima de esta no detectabamos señal de hibridación. Así mismo con temperaturas inferiores, por ejemplo 37 °C, además de las señales antes descritas, aparecía otra señal de hibridación correspondiente al fragmento D de la digestión de pMB2 con *Bgl* II, sin embargo no parece probable que en este fragmento se encuentre el gen que determina la síntesis de AS-48.

Empleando esta metodología, hemos localizado el fragmento codificante para AS-48 mediante el solapamiento de los distintos fragmentos de hibridación, concretamente al hibridar con el fragmento menor de *Bam* HI (fragmento C), y con los fragmentos A de las digestiones *Sal* I y *Sac* I, los cuales se encuentran solapados en una zona de 4.9 Kb y en dirección opuesta, es decir, AS-48 estaría mapeado por los cortes *Sal* I y *Sac* I.

La utilización de este oligonucleótido en el futuro, será de gran ayuda en la secuenciación del fragmento codificante para AS-48, como cebador del mismo.

CONCLUSIONES

1. El perfil plasmídico de la estirpe S-48 de *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*, muestra la existencia de 4 plásmidos pMB1, pMB2, pMB3 y pMB4 cuyos pesos moleculares estimados son 90, 68, 5,1 y 2,5 Kb respectivamente.

2. Mediante curación espontánea o bien con tratamientos mutagénicos con bromuro de etidio y anaranjado de acridina, se ha logrado la delección de plásmido pMB1 (pMB1-del), lo que ha conducido a la pérdida de la producción e inmunidad de la bacteriocina Bc-48. Asi mismo la curación del plásmido pMB2, se ha traducido en la pérdida de la producción y resistencia al antibiótico AS-48.

3. Los plásmidos pMB1 y pMB2 transportan, además, genes inducibles por las feromonas sexuales producidas por la estirpe OG1X de *E. faecalis*, responsables de la agregación celular.

4. El carácter Bc-48 (producción e inmunidad), puede transferirse con una elevada frecuencia desde la cepa A-48-15 (Bc-48$^+$) hasta la cepa OG1X de *E. faecalis*, mediante un proceso de conjugación. Esta transferencia lleva asociada la adquisición por parte de la cepa receptora OG1X de un nuevo plásmido de 52 Kb, derivado del pMB1 y designado como pMB1.1.

5. Este nuevo plásmido pMB1.1 es de alto número de copias y puede ser transferido mediante retroconjugación a mutantes curados de Bc-48, siendo posible su coexistencia en el mismo hospedador con el variante deleccionado de pMB1 (pMB1-del) del mutante, a pesar de estar estrechamente relacionado.

6. El carácter AS-48 (producción y resistencia) junto con el plásmido pMB2, pueden ser transferidos por conjugación con baja frecuencia a *E. faecalis* OG1X ó por transformación de protoplastos regenerados en alginato y posterior enriquecimiento de los transformantes mediante presión selectiva con AS-48.

7. Se ha demostrado el carácter débilmente antigénico del antibiótico AS-48. La presencia de este antibiótico en todas las estirpes OG1X (pMB2) escasamente productoras, puede ponerse de manifiesto mediante técnicas inmunológicas (Western-blot).

8. Además los transconjugantes OG1X (pMB2) muestran agregación en medio líquido, debido a la síntesis constitutiva de proteínas de superficie visibles a microscopía electrónica de barrido.

9. Las razas OG1X de *E. faecalis* que han adquirido los plásmidos pMB1.1 ó pMB2, producen bacteriocina Bc-48 ó antibiótico AS-48 respectivamente a niveles mas bajos que las cepas donadoras y silvestre, probablemente debido al nuevo fondo genético en el que se encuentran ambos plásmidos.

10. Se propone el mapa físico para el plásmido pMB2 establecido mediante el uso de distintas endonucleasas de restricción. El gen estructural de AS-48 se ha localizado sobre un fragmento de aproximadamente 4,9 Kb delimitado por los enzimas *Sal* I-*Sac* I.

BIBLIOGRAFIA

Allgaier, H., G. Jung, R. G. Werner, U. Schneider, & H. Zahner. 1986. Epidermin: sequencing of heterodet tetracyclic 21-peptide amide antibiotic. Eur. J. Biochem. 160: 9-22.

Albertini, A. M., M. Hofer, M. P. Calos, & J. H. Miller. 1982. On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions. Cell 29: 319-328.

Anderson, D. G., & L. L. McKay. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. Appl. Environ Microbiol. 46: 549-552.

Anderson, D. G., & L. L. McKay. 1984. Genetic and physical characterization of recombinant plasmids associated with cell aggregation and high frequency conjugal transfer in *S. lactis* ML3. J. Bacteriol. 158: 954-962.

Andrewes, F. W., & T. J. Horder. 1906. Study of the streptococci pathogenic for man. Lacet ii: 708-713

Balbineter, E. 1988. Use of predesigned plasmids to study deletions. En DNA replication and mutagenesis , pag. 378-391. R. E. Moses and W. C. Summers (ed), ASM.

Bassinger, S. F. & R. W. Jackson. 1968. Bacteriocin (hemolysin) of *Streptococcus zymogenes*. J. Bacteriol. 96: 1895-1902.

Beachey, E. H. & I. OjeK. 1976. Epithelial cell binding of group A streptococci by lipoteichoic acid on fimbriae denuded of M protein. J. Exp. Med. 143: 759-771.

Beachey, E. H., W. A. Simpson, I. Ofek, D. L. Hasty, & J. B. Dale. 1982. Role of surface polysaccharides in bacterial adhesion. pag. 327-330. *In* D. Schelessinger (ed), Microbiology 1982. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

Behnke, D., & M. S. Gilmore. 1981. Location of antibiotic resistance determinants, copy control, and replication functions in the double-selective cloning vector pGB301. Mol. Gen. Genet. 184: 115:120.

Bib, M. J., M. J. Ward, & D. P. Hopwood. 1978. Nature (London) 274: 398-400.

Birnboim, H. C., & J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acid Res. 7: 1513-1523.

Brandis, H., V. Brandis, & W. van de Loo. 1965. Bakteriocinahnlicke stoffe von enterokokken. Zentr. Bakt. Parasitenkd. Hyg. Abt. 1 Orig. Rihe A. 196: 331-340.

Brock, T. D., & J. M. Davie. 1963. Probable identity of a group D hemolysin with bacteriocin. J. Bacteriol. 86: 708-712.

Brunton, J. 1984. Antibiotic resistance in streptococci. pag. 530-565, *In* L. T. Bryan (ed), Antimicrobial drug resistance. Academic Press, Inc, New York.

Buchman, G. W., S. Bunerjee, & J. N. Hansen. 1988. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. J. Biol. Chem. 263: 16260-16266.

Chassy, B. M. 1976. A gentle method for the lysis of oral streptococci. Biochem. Biophys. Res. Comm. 62: 623-608.

Christie, P. J., & G. M. Dunny. 1986. Identification of regions of the *Streptococcus faecalis* plasmid pCF-10 that encode antibiotic resistance and pheromone response functions. Plasmid, 15: 230-241.

Christie, P. J., S-M. Kao, J. C. Adsit, & G. M. Dunny. 1988. Cloning and expression of genes encoding pheromone-inducible antigens of *Enterococcus(Streptococcus) faecalis*. J. Bacteriol. 170: 5161-5168.

Clewell, D. B., Y. Yagi, G. M. Dunny, & S. K. Schultz. 1974. Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromicin resistance. J. Bacteriol. 117: 283-289.

Clewell, D. B. 1981. Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. Microbiol. Rev. 45: 409-436.

Clewell, D. B., P. K. Tomich, C. Gawron-Burke, A. E. Franke, Y. Yagi, & F.Y. An. 1982. Mapping of *Streptococcus faecalis* plasmids pAD1 and pAD2 and studies relating to transposition os Tn 917. J. Bacteriol. 152: 1220-1230.

Clewell, D. B., G. F. Fitzgerald, L. Dempsey, L. E. Pearce, F. An, B. A. White, Y. Yagi, C. Gawron-Burke. 1985. Streptococcal conjugation: plasmids, sex pheromones and conjugative transposons, pag. 194-203 *In* Mergenhagen S. E. Rosan B.(ed): Molecular basis of oral microbial adhesion. ASM, Washington, D. C.

Clewell, D. B. 1986. Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. Ann. Rev. Microbiol. 40: 635-659.

Clewell, D. B., E. E. Ehrenfeld, R. E. Kessler, Y. Ike, A. E. Franke, M. Madion, J. H.Shaw, R. Wirth, F. An, M. Mori, C. Kitada, M. Fujino, & A. Suzuki. 1986. Sex-pheromone systems in *Streptococcus faecalis*. Banbury Report No. 24. Antibiotic Resistance Genes: Ecology, Transfer, and Expression. pag. 131-142. Cold Spring Harbor, New York.

Clewell, D. B., & C. Gawron-Burke. 1986. Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. Ann. Rev. Microbiol., 40: 635-659.

Clewell, D. B., F. Y. An, M. Mori, Y. Yagi, & A. Suzuki. 1987. *Streptococcus faecalis* sex pheromone (cAD1) response: evidence that the peptide inhibitor excreted by pAD1-containing cells may be plasmid determined. Plasmid, 17:65-68.

Clewell, D. B., E. E. Ehrenfeld, F. An, R. E. Kessler, R. Wirth, M. Mori, C. Kitada, M. Fujino, Y. Ike, & A. Suzuki. 1987. Sex pheromones and plasmid related

conjugation phenomena in *S. faecalis*, pag. 2-7. *In* J.J. Ferreti and R. Curtis III (ed), Streptococcal genetics. ASM, Washington, D.C.

Clewell, D. B., S. E. Flannagan, Y. Ike, J. M. Jones, & G. Gawron-Burke. 1988. Sequence analysis of termini of conjugative transposon Tn 916. J. Bacteriol. 170: 3046-3052.

Clewell, D. B., & K. E. Weaver. 1989. Sex-pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. Plasmid, 21: 175-184.

Clewell, D. B. 1990. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9: 90-102.

Clewents, M. B., & M. Syvanen. 1981. Isolation of a pol A mutation that affects transposition of insertion sequences and transposons. Cold Sping Harbor Symp. Quant. Biol. 45: 201-204.

Colmar, I., & T. Horaud. 1987. *Enterococcus faecalis* hemolysin-bacteriocin plasmids belong to the same incompatibility group. Appl. Env. Microbiol. 53: 67-570.

Courvalin, P. M., C. Carlier, & Y. A. Chabert. 1972. Plasmid linked tetracycline and erythromycin resistance in group D "*Streptococcus*". Ann. Inst. Pasteur Paris 123: 755-759.

Dajani, A. S., M. C. Tom, & D. J. Laro. 1976. Viridins, bacteriocins of α-hemolytic streptococci: isolation, characterization and partial purification. Antim. Agents

Chemother. 9: 81-84.

Davey, G. P., & L. E. Pearce. 1982. Production of diplococcin by *Streptococcus cremoris* and its transfer to nonproducing group N streptococci. pag 221-224, *In* D. Schlessinger (ed.), Microbiology-1982. ASM, Washington, D. C.

Davey, G. P., & B. C. Richardson. 1981. Purification and some properties of diplococcin from *S. cremoris* 346. Appl. Env. Microbiol. 41: 84-89.

Delisle, A. L. 1986. Properties of mutacin b, an antibacterial substance produced by *S. mutans* strain BHI. Microbios 46: 21-28.

Dobzansky, W., J. Bardowsky, W. Kozak, & J. Zadjet. 1982. Lactostrepsins: bacteriocins of lactic streptococci. Microbiology ASM, 1982. pag 225-229.

Dodd, H. M., N. Horn, & M. J. Gasson. 1990. Analysis of the genetic determinant for production of the peptid antibiotic nisin. J. Gen. Microbiol. 136: 555-566.

Dunny, G. M., & D. B. Clewell. 1975. Transmissible toxin (hemolysin) plasmid in *S. faecalis* and its mobilization of noninfectious drug resistance plasmid. J. Bacteriol. 124: 784-790.

Dunny, G. M., B. L. Brown, & D. B. Clewell. 1978. Induced cell agregation and mating in *S. faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 3479-3483

Dunny, G. M., R. A. Craig, R. L. Carron, D. B. Clewell. 1979. Plasmid transfer in *S. faecalis*: production of multiple sex pheromones by recipients. Plasmid, 2:454-465.

Dunny, G. M., C. Funkc, & J. Adisit. 1981. Direct stimulation of the transfer of antibiotic resistance by sex pheromones in *S. faecalis*. Plasmid, 6:270-278.

Dunny, G. M. 1990. Genetic functions and cell-cell interactions in the pheromone-inducible plasmid transfer system of *E. faecalis*. Mol. Microbiol. 4: 689-696.

Ehrenfeld, E. E., & D. B. Clewell. 1987. Transfer functions of the *Streptococcus faecalis* plasmid pAD1: organization of plasmid DNA encoding response to sex pheromone. J. Bacteriol. 169: 3473-3481.

Ehrenfeld, E. E., R. E. Kessler, & D. B. Clewell. 1986. Identification of pheromone-induced surface proteins in *Streptococcus faecalis* and evidence of a role for lipoteichoic acid in formation of mating aggregates. J. Bacteriol. 168: 6-12.

Evans, Jr. R. P., F. L. Macrina. 1983. Streptococcal R plasmid pIP501: endonuclease site map, resistance determinant location, and construction of novel derivatives. J. Bacteriol. 154: 1347-1355.

Farrow, J.A., D. Jones, B. A. Phillips, & M. D. Collins. 1983. Taxonomic studies on some group streptococci. J. Gen. Microbiol. 129: 1423-1432.

Feinberg, A. P., & B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132: 6-13.

Feinberg, A. P., & B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity (Addendum). Anal. Biochem. 137: 266-267.

Froseth, B.R., R. E. Herman, & L. L. McKay. 1988. Cloning of nisin resistance determinant and replication origin on 7.6 Kb *Eco* RI fragment of pNP40 from *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* DRC3. Appl. Env. Microbiol. 54: 2136-2139.

Fuchs, P. G., J. Zajdel, & W. T. Dobrzanski. 1975. Possible plasmid for production of the antibiotic nisin in some strains of *Streptococcus lactis*. J. Gen. Microbiol. 88: 189-192.

Fukushima, H. S., T. Fukushima, T. Umemonto, H. Fukuhara, & H. Sagawa. 1982. Purification and chemical analysis of a bacteriocin from the oral bacterium *S. mutans* Rm-10. Archs. Oral. Biol. 27: 721-727.

Galli, D., R. Wirth, G. Wanner. 1989. Identification of aggregation substances of *Enterococcus faecalis* cells after induction by sex pheromones. An immunological and ultrastructural investigation. Arch. Microbiol. 151: 486-490.

Gálvez, A., E. Valdivia, M. Maqueda, & E. Montoya. 1985. Production of bacteriocin-like substances by group D streptococci of human origin. Microbios 43: 223-232.

Gálvez, A., M. Maqueda, E. Valdivia, A. Quesada, & E. Montoya. 1986. Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. Can. J. Microbiol. 32: 765-771.

Gálvez, A. 1987. Purificación, caracterización y actividad biológica de una sustancia antibacteriana de amplio espectro producida por *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. Tesis Doctoral. U. Granada.

Gálvez, A., M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, & E. Valdivia. 1989a. Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against Gram-positive and Gram-negative bacteria and other organisms. Res. Microbiol. 140: 57-68.

Gálvez, A., E. Valdivia, M. Martínez, & M. Maqueda. 1989b. Bactericidal action of peptide antibiotic AS-48 against *Escherichia coli* K-12. Can. J. Microbiol. 35: 318-321.

Gálvez, A, E. Valdivia, M. Martínez, and M. Maqueda. 1989c. Effect of peptide AS-48 on *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-47. Antimicrob. Agents. Chemother. 33: 641-645.

Gálvez, A., A. Giménez-Gallego, M. Maqueda, & E. Valdivia. 1989d. Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 437-441.

Gálvez, A., E. Valdivia, M. Martínez-Bueno, & M. Maqueda. 1990. Induction of autolysis in *Enterococcus faecalis* S-

47 by peptide AS-48. J. Appl. Bacteriol. 69:

Gasson, M. J., & F. L. Davies. 1980. Conjugal transfer of the drug resistant plasmid pAMß1 in the lactic streptococci. FEMS Microbiol. Lett. 7: 51-53.

Gasson, M.J. 1982. Identification of the lactose plasmid in *S. lactis* 712. Microbiology-1982, pag. 217-220, D. Schlessinger (Ed.). ASM.

Gasson, M. J. 1983. Plasmid complements of *S. lactis* NCDO712 and other lactic streptococci after protoplast induced curing. J. Bacteriol. 154: 1-9.

Gasson, M. J. 1984. Transfer of sucrose fermenting ability, nisin resistance and nisin production into *Streptococcus lactis* 712. FEMS Microbiol. Lett. 21: 7-10.

Gibson, E. M., N. M. Chace, S. B. London. 1979. Transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance from streptococci to lactobacilli. J. Bacteriol., 137: 614-619.

Gilmore, M. S., D. Behnke, B. A. Roe, & D. B. Clewell. 1987. Molecular-level characterization of the *Streptococcus faecalis* plasmid pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant, pag. 153-158. *In* J. J. Ferreto y R. Curtis III (ed). Streptococcal genetics. ASM, Washington, D. C.

González, C. F., & B. S. Kunka. 1985. Transfer of sucrose-fermenting ability and nisin production phenotype among lactic streptococci. Appl. Environ. Microbiol. 49: 627-633.

Granato, P. A., & R. W. Jackson. 1969. Bicomponent nature of lysin from *S. zymogenes*. J. Bacteriol. 100: 865-868.

Granato, P. A., & R. W. Jackson. 1971. Characterization of the A component of *Streptococcus zymogenes* lysin. J. Bacteriol. 107:551-556.

Granato, P. A., & R. W. Jackson. 1971. Purification and characterization of the L component of *Streptococcus zymogenes* lysin. J. Bacteriol. 108: 804-808.

Gratia, J. & P. Fredericq. 1946. Sur un remarcable exemple d'antogonisme entre deux souches de colibacille. Compt. Rend. Soc. Biol. 93: 1040-1041.

Gross, E., & J. L. Morell. 1971. The structure of nisin. J. Am. Chem Soc. 93: 4634-4635.

Gross, E., & H. H. Kiltz. 1973. The number and nature of α,ß-unsaturated aminoacids in subtilisin. Biochem. Biophys. Res. Com. 50: 559-565.

Guerry, P., D. J. LeBlanc, & S. Falkow. 1973. General method for the isolation of plasmid deoxyrribonucleic acid. J. Bacteriol. 116: 1064-1066.

Hamada, S., & T. Ooshima. 1975. Inhibitory spectrum of a bacteriocin-like substance (mutacin) produced by some strains of *S. mutans*. J. Dent. Res. 54: 140-145.

Hamada, S., H. Imanishi, & T. Ooshima. 1986. Isolation and mode of action of a cell-free bacteriocin (mutacin) from serotype g *S. mutans* MT3791. Zbl. Bakt. Hy. A 261: 287-

298.

Harasawa, R., K. Suzuki, & T. Mitsuoka. 1980. Streptococcus faecium-derived antibacterial substance antagonistic to *Bifidobacteria*. Antim. Agents Chemother. 18:58-62.

Hardy, K. G. Colicinogeny and related phenomena. Bacteriol. Rev. 39: 464-515.

Hershfield, V. 1979. Plasmids mediating multiple drug resistance in group B *Streptococcus*: transferability and molecular properties. Plasmid, 2: 137-149.

Hodgson, C. P. & R. Z. Fisk. 1987. Hybridization probe size control: optimized oligolabeling. Nucl. Acid Res. 15: 6295.

Holmes, D. S., & Quigley, M. 1981. A rapid boiling for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114: 193-197.

Hopwood, D. A. 1978. Extrachromosomally determined antibiotic production. Ann. Rev. Microbiol. 32: 373-392.

Hopwood, D. A. 1981. Genetic studies with bacterial protoplasts. Annu. Rev. Microbiol. 35:237-272.

Horaud, T., C. LeBouguenec, K. Pepper. 1985. Molecular genetic of resistance to macrolides, lincosamides and streptogrtamin B (MLS) in streptococci. J. Antimicrob. Chemother. 16, supplement A: 111-135.

Hörner, T., V. Ungermann, H. Zähner, H.-P. Fiedler, R. Utz, R. Kellner, & G. Jung. 1990. Comparative studies on the

fermentative production of lantibiotics by staphylococci. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 511-517.

Horodniceau, T., D. Bouanchaud, G. Biet, & Y. Chabbert. 1976. R plasmid in *Streptococcus agalactiae* (group B). Antimicrob Agents Chemother. 10: 795-801.

Hurst, A. 1966. Biosynthesis of the antibiotic nisin by whole *Streptococcus lactis* organisms. J. Gen. Microbiol. 27: 85-123.

Hurst, A. 1981. Nisin. Adv. Appl. Microbiol. 27: 85-123.

Hurst, A. 1983. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. pag. 327-351. *In* Series in foof science, vol. 10. Antimicrobials in foods. A. L. Branen and P. M. Davidson (ed.). Marcel Dekker, New York.

Hynes, W. L., & J. R. Tagg. 1985. Production of broad-spectrum bacteriocin-like activity by group A streptococci of particular M-types. Zbl. Bakt. Hyg. A 259: 155-164.

Ike, Y., R. C. Craig, B. A. White, Y. Yagi, & D. B. Clewell. 1983. Modification of *Streptococcus faecalis* sex pheromones after acquisition of plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 5369-5373.

Ike, Y., & Clewell, D. B. 1984. Genetic analysis of the pheromone response in *Streptococcus faecalis*, using transposon Tn917 as an insertional mutagen. J. Bacteriol. 158: 777-783.

Ike, Y., Y. Hashimoto, , & D. B. Clewell. 1984. Hemolysin

of *Streptococcus faecalis* subs. *zymogenes* contributes to virulence in mice. Inf. Immun. 45: 528-520

Ike, Y., & D. B. Clewell. 1987. High incidence of hemolysin production by *Streptococcus faecalis* strains associated with human parenteral infections: structure of hemolysin plasmids., pag. 159-164. *In* J. J. Ferreti and R. Curtis III (ed), Streptococcal genetics. ASM, Washington, D. C.

Ike, Y., H. Hashimoto, D. B. Clewell. 1987. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. J. Clin. Microbiol. 25: 1524-1528.

Ikeda, T., T. Iwanami, M. Hirasawa, C. H. Watanabe, J. R. McGhee, & T. Shiota. 1982. Purification and certain properties of a bacteriocin from *S. mutans*. Infect. Immun. 35: 861-868.

Ingram, L. 1970. A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisin. Biochim. Biophys. Acta 224: 263-265.

Jacob, A. E., & S. J. Hobbs. 1974. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. J. Bacteriol. 117: 360-372.

Jacob, A. E., G. J. Douglas, & S. J. Jobbs. 1975. Self-transferable plasmids determining the hemolysin and bacteriocin production of *Streptococcus faecalis* var *zymogenes*. J. Bacteriol. 121:863-872.

Kaletta, C. & K.-D. Entian. 1989. Nisin, a peptide

antibiotic: cloning and sequencing of the *nis A* gene and posttranslational processing of its peptide product. J. Bacteriol. 171: 1597-1601.

Johstone A., & R. Thorpe. 1985. En Immunochemistry in Practice. Blackwell Scientific Publications Oxford. pag. 43-46.

Kellner, R., G. Jung, T. Horner, H. Zahner, N. Schnell, K. D. Entian, & F. Gotz. 1988. Gallidermin, a new lanthione containing polypeptide antibiotic. Eur. J. Biochem. 177: 53-59.

Klaenhammer, T., & R. B. Sanozky. 1985. Conjugal transfer from *Streptococcus lactis* ME2 of plasmids encoding phage resistance, nisin resistance and lactose-fermenting ability: evidence for a high frequency conjugative plasmid responsible for abortive infection of virulent bacteriophage. J. Gen. Microbiol. 131: 1531-1541.

Konisky, J. 1978. The bacteriocins. pag. 71-136. *En* The bacteria, vol. VI. L. N. Ornston, J. R. Sokatch. Academic Press Inc. New York.

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

Kozak, W., M. Rajcher-Trzpl, and W. T. Dobrzanski. 1974. The effect of proflavin, ethidium bromide, and elevated temperature on the appearance of nisin-negative clones in nisin-producing strains of *Streptococcus lactis*. J. Gen. Microbiol. 83: 295-302.

Kramer, J. & H. Brandis. 1972. Charakterisierung eines *Streptococcus agalactiae* bacteriocins. Zbl. Bak. Paras. Infekt. Hyg. Abt.1 Orig. Reihe A 219: 290-310.

Kramer, J., J. Kenness, & H. Brandis. 1983. Transfer of a miniplasmid determining bacteriocin production and bacteriocin immunity in *S. faecium*. FEMS Microbiol. Lett. 20: 385-389.

Kurita, T. & M. Hirasawa. 1988. Biological and biochemical characterization of novel lipid-like antibacterial substances (mutalipocins) produced by *S. mutans* 32 K. J. Gen. Microbiol. 134: 213-220.

Lara, I., M. Martínez-Bueno, A. Gálvez, M. Maqueda, & E. Valdivia. 1990. Induction of inhibitory agent produced by *Entorococcus faecalis*. Folia Microbiol. 35: 124-129.

LeBlanc, D. J., V. L. Crow, & L. N. Lee. 1980. Plasmid mediated carbohidrate catabolic enzymes among strains of *Streptococcus lactis*, pag. 31-41. *En* C. Stuttard and K. R. Rozee (ed.), Plasmids and transposons: environmental effects and maintenance mechanisms. Academic Press, Inc. New York.

LeBlanc, D. J., R. J. Hawley, L. N. Lee, & E. J. Martin. 1978. Conjugal transfer of plasmid DNA among oral streptococci. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 3484-3487.

LeBlanc, D. J., & L. N. Lee. 1979. Rapid screening procedure for detection of plasmids in *Streptococci*. J. Bacteriol. 140: 1112-1115.

LeBlanc. D. J., & L. N. Lee. 1984. Physical and genetic analysis of streptococcal plasmid pAMß1 and clonig of its replication region. J. Bacteriol. 445-453.

LeBlanc, D. J., L. N. Lee, D. B. Clewell, & D. Behnke. 1983. Broad geographical distribution of a cytotoxin gene mediating beta-hemolysis and bacteriocin activity among *Streptococcus faecalis* strains. Infec. Immun. 40: 1015-1022.

LeBlanc, D. J., L. N. Lee, J. A. Donkersloot, & R. J. Harr. 1982. Plasmid transfer in *Streptococci* (an Overview). En Microbiology 1982. (D. Schlessinger, ed.) ASM.

Lereclus, D., G. Menon, & M. M. Lecadet. 1983. Isolation of a DNA sequence related to several plasmids from *Bacillus thuringiensis* after a mating involving the *Streptococcus faecalis* plasmid pAMß1. Mol. Gen. Genet. 191: 307-313.

Macrina, F. L., R. P. Evans, J. A. Tobian, D. L. Hartley, D. B. Clewell, & K. R. Jones. 1983. Novel shuttle plasmid vectors for *Escherichia-Streptococcus* transgenem cloning. Gene, 25: 145-150.

Miller, J. T., E. F. Fritsch, & J. Sambrook. 1982. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Lab., New York.

López Lara, I. 1988. Estudios sobre una bacteriocina producida por *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. Memoria de Licenciatura. U. Granada.

Macrina, F. L., D. J. Kopecko, K. R. Jones, D. J. Ayers, & S. M. MacCowen. 1978. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. Plasmid, 1: 417-420.

Macrina, F. L., Jr. Cl. Keeler., K. R. Jones, & P. H. Wood. 1980a. Molecular characterization of unique deletion mutants of the streptococcal plasmid, pAMB1. Plasmid, 4: 8-16.

Macrina, F. L., K. R. Jones, & P. H. Wood. 1980b Chimeric streptococcal plasmid and their use as molecular cloning vehicles in *S. sanguis* (Challis). J. Bacteriol. 143: 1425-1435.

Macrina, F.L., J. A. Tobian, K. R. Jones, R. P. Evans, & D. B. Clewell. 1982. A cloning vector able to replicate in *E. coli* and S. sangris. Gene, 19: 345-353.

Macrina, F. L., R. P. Evans, J. A. Tobian, D. L. Hartley, D. B. Clewell, & K. R. Jones. 1983. Novel shuttle plasmid vehicles for *Escherichia-Streptococcus* transgeneric clonig. Gene, 25: 145-150.

Maniatis, T., E. F. Fritsch, & J. Sambrook. 1982. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Lab., New YorK.

Martin, B., G. Alloing, V. Mejean, J. D. Claverys. 1987.

Constitutive expression of erythromycin resistance mediated by the erm determinant of plasmid pAMß1 results from deletion on of 5'leader peptide sequences. Plasmid 18: 250-253.

Martínez Bueno, M. 1986. Inducción y curación de la producción de sustancias antimicrobianas por *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada.

Martínez-Bueno, M., A. Gálvez, M. Maqueda, & E. Valdivia. 1990. Genetic stability of the antagonistic character of *Enterococcus faecalis* ssp *liquefaciens* and the detection of a new inhibitory bacteriocin-like substance. Folia Microbiol. 35: 113-123.

Mattick, A.T.R., & A. Hirsch. 1944. A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. Nature (London). 154: 551.

Maxan, A. M., & Gilbert, W. 1980. Sequencing end-labeled DNA with specific chemical cleavages. Methods Enzymol. 65: 499-560.

McKay, L. L., & K. A. Baldwin. 1984. Conjugative 40 megadaltons plasmid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* DRC3 is associated with resistance to nisin and bacteriophage. Appl. Environ Microbiol. 47: 68-74.

Miller, J. H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Lab., New YorK.

Mollet, B., & M. Delley. Spontaneous deletion formation within the ß-Galactosidase gene of *Lactobacillus*

bulgaricus. J. Bacteriol. 172: 5670-5676.

Mori, M., Y. Sakagami, Y., M. Narita, A. Isogai, M. Fujiro, C. Kitada, R. Craig, D. B. Clewell, & A. Suzuki. 1984. Isolation and structure of the bacterial sex pheromone, CAD1, that induces plasmid tranfer in *S. faecalis*. FEBS Letters, 178: 97-100.

Mori, M, M. Tanaka, Y. Sakagami, A. Isogari, M. Fujiro, L. Kitada, B. A. White, F. Y. An, D. B. Clewell, A. & Suzuki. 1986. Isolation and structure of the *S. faecalis* sex pheromone, CAM373. FEBS Letters, 206: 69-72.

Mori, M., A. Isogai, Y. Sakagami, M. Fujiro, C. Kitada, D. B. Clewell, & A. Suzuki. 1986. Isolation and structure of *S. faecalis* sex pheromone inhibitor, iAD1, that is excreted by donor strains harboring plasmid pAD1. Agricultural Biol. Chem., 50: 539-541.

Mori, M., H. Tanaka, Y. Sakagami, A. Isogai, M. Fujiro, C. Kitada, D. B. Clewell, & A. Suzuki. 1987. Isolation and structure of the sex pheromone inhibitor, iPD1, excreted by *S. faecalis* donor strains harboring plasmid pPD1. J. Bacteriol. 169: 1747-1749.

Mori, M., Y. Sakagami, Ishii, A. Isogai, C. Kitada, M. Fujiro, J. C. Adsit, G. M. Dunny, & A. Suzuki. 1988. Structure of cCF10, a peptide sex pheromone which induces conjugative transfer of the *S. faecalis* tetracycline-resistance plasmid, pCF10. J. Biol. Chem., 263: 14574-578.

Moellering, R. C. Jr. 1990. The Enterococci: an enigme and a continuing therapeutic challenge. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9 (2): 73-74.

Murray, B. E., F. An, & D. B. Clewell. 1988. Plasmid and pheromone response of the ß-lactamase producer *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* HM22. Antimicrob. Agents. Chemother., 32: 547-551.

Murray, B. E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev. 3 (1): 46-65.

Neve, H., A. Geiss, & M. Teuber. 1984. Conjugal tranfer and characterization of bacteriocin plasmids in Group N (lactic acid) streptococci. J. Bacteriol. 157: 833-838.

Novick, R. P. 1969. Extrachromosomal inheritance in bacteria. Bacteriol. Rev. 33: 210-257.

Oliver, D.R., B. L. Brown, & D. B. Clewell. 1977. Characterization of plasmids detrmining hemolysin and bacteriocin production in *Streptococcus lactis* S5952. J. Bacteriol. 130: 948-950.

Orzech, K. A., & W. F. Burke. 1984. Conjugal transfer pAMß1 in *Bacillus sphaericus* 1593. FEMS Microbiol. Lett. 25: 91-95.

Oultram, J. D., & M. Young. 1985. Conjugal transfer plasmid pAMß1 from *Streptococcus lactis* and *Bacillus subtilis* to *Clostridium acetobutylicum*. FEMS Microbiol. Lett. 27: 129-134.

Perkins, J. B., & P. J. Youngman. 1986. Construction and properties of Tn 917-*lac*, a transposon derivative that mediates transcriptional gene fusions in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 140-144.

Pugsley, A. P. 1984a. The *ins* and *outs* of colicins. Part. I: production, and translocation across membranes. Microbiol. Sci. 1: 168-175.

Pugsley, A. P. 1984b. The *ins* and *outs* of colicins. Part II: lethal action, immunity and ecological implications. Microbiol. Sci. 1: 203-205.

Reichelt, T., J. Kennes, & J. Krämer. 1984. Co-transfer of two plasmids determining bacteriocin production and sucrose utilization in *Streptococcus faecium*. FEMS Microbiol. Lett. 23: 147:150.

Sanders, C. C., & W. E. Sanders. 1978. Abstr. No. 178. Interscience Conference on Antim. Agents Chemother.

Schaberg, D. R., & M. J. Zervos. 1986. Intergeneric and interspecies gene exchange in gram-positive cocci. Antimicrob. Agents Chemother. 30: 817-822.

Schlegel, R., & H. D. Slade. 1972. Bacteriocin production by transformable group H streptococci. J. Bacteriol. 112: 824-829.

Scheleifer, K. H., & R. Kilpper-Bälz. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* com. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 31-34.

Scherwitz, K., K. A. Baldwin, & L. McKay. 1983. Plasmid linkage of a bacteriocin-like substance in *S. lactis* subsp. *diacetylactis* strain WM4: transferability to *S.*

lactis. Appl. Env. Microbiol. 45: 1506-1512.

Schleifer, K. H. 1984. Gram-positive cocci, pag. 999-1103. *In* P. H. A. Sneath, N. S. Mair, , M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Schnell, N., K.-D. Entian, U. Schneider, F. Götz, H. Zähner, R. Kellner, and G. Jung. 1988. Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. Nature 333: 276-278.

Schnell, N., K-D. Entian, F. Götz, T. Hörner, R. Kellner, & G. Jung. 1989. Structural gene isolation and prepeptide sequence of gallidermin, a new lanthionine containing antibiotic. FEMS Microbiol. Lett. 58: 263-268.

Sherman, J. M. 1937. The streptococci. Bacteriol. Rev. 1: 3-97.

Sherwood, N. P., B. E. Russel, A. R. Jay, & K. Bowman. 1949. Studies of streptococci III. New antibiotic substances produced by ß-hemolytic streptococci. J. Infect. Dis. 84: 88-91.

Shrago, A. W., B. M. Chassy, & W. J. Dobrogosz. 1986. Conjugal transfer (pAMß1) in *Lactobacillus plantarum*. Appl. Env. Microbiol. 52: 574-576.

Siegrist, H. H., B. R. Birch, & A. E. Jacob. 1987. Detection of a large haemolysin plasmid carrying multiple antibiotic resistance markers in *Streptococcus faecalis*. Microbiol. Pathogenesis 2: 155-158.

Simpson, W. J., & J. R. Tagg. 1983. Plasmid-mediated bacteriocin production by M-type 57 group A streptococci. Can. J. Microbiol. 29: 1445-1451.

Smith, M. D. 1985. Transformation and fusion of *Streptococcus faecalis* protoplasts. J. Bacteriol. 162: 92-97.

Southerm, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.

Stanisich, V. A. 1988. Identification and analysis of plasmids at the genetic level. En Plasmid technology (Ed. Grinsted & P. M. Bennett) Academic Press. U.K.

Steele, J. L., & L. L. McKay. 1986. Partial characterization of the genetic basis for sucrose metabolism and nisin production in *Streptococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 51: 57-64.

Suggs, S., R. B. Wallace,, T. Hirose, E. Kawashima, & K. Itakura. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6613-6617.

Suzuki, A., M. Mori, Y. Sakagami, A. Isogai, M. Fujino, C. Kitada, R. A. Craig, & D. B. Clewell. 1984. Isolation and structure of bacterial sex pheromone cPD1. Science, 226: 849-850.

Tagg, J. R., & A. R. MacGiven. 1971. Assay system for bacteriocins. Appl. Microbiol. 21: 943.

Tagg, J. R., A. S. Dajani, L. W. Wannamaker, & E. D. Gray.

1973. Group A streptococcal bacteriocin production, purification, and mode of action. J. Exp. Med. 138: 1168-1183.

Tagg, J. R., A. S. Dajani, & W. L. Wannamaker. 1975. Bacteriocin of group B *Streptococcus*: partial purification and characterization. Antim. Agents Chemother. 7: 764-772

Tagg, J. R., A. S. Dajani & L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40: 722-756.

Tagg, J. R., & C. Russell. 1981. Bacteriocin production by *S. salivarius* strain P. Can. J. Microbiol. 27: 918-923.

Thiercelin, M. E. 1899. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. C. R. Soc. Biol. 5: 269-271.

Tomich, P. K., F. Y. An, S. P. Damle, & D. B. Clewell. 1979. Plasmid-related transmissability in *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes* strain DS16. Antimicrob. Agents Chemother. 15: 828-830.

Tortorello, M. L., & G. M. Dunny. 1985. Identification of multiple surface antigens associated with the sex pheromone response of *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. 162: 131-137.

Trieu-Cuot, P., C. Carlier, P. Martin, P. Courvalin. 1987. Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 48: 289-294.

Trieu-Cuot P., C. Carlier, P. Courvalin. 1988. Conjugative plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170: 4388-4391.

Tsai, H.-J., & W. E. Sandine. 1987. Conjugal transfer of nisin plasmid genes from *Streptococcus lactis* 7962 to *Leuconostoc dextranicum* 181. Appl. Environ. Microbiol. 53: 352-357.

Van der Lelie, D., & G. Venema. 1987. *Bacillus subtilis* generates a major deletion in pAMß1. Appl. Env. Microbiol. 53: 2458-2463.

Van Embden, J. D. A., H. W. B. Engel, & B. Van Klingeren. 1977. Drug resistance in group D streptococci of clinical and nonclinical origin: prevalance, transferability, and plasmid properties. Antimicrob. Agents Chemother. 11: 925-932.

Vescovo, M., L. Morelli, V. Botazzi, & M. J. Gasson. 1983. Conjugal transfer of broad-host range plasmid pAMß1 into enteric species of lactic acid bacteria. Appl. Env. Microbiol. 46: 753-755.

Vogelstein, B., & D. Gillespie. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 615-619.

Von Wright, A., S. Wessels, S. Tynkkynen, & M. Saarela. 1990. Isolation of a replication region of a large lactococcal plasmid and use in cloning of a nisin resistance determinant. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2029-2035.

Wallace, R. B., J. Shaffer, R. F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose, & K. Itakura. 1979. Nucl. Acids Res. 6: 3543-3557.

Wallace, R. B., & C. G. Miyada. 1987. Oligonucleotide probes for the screening recombinant DNA libraries. En Guide to Molecular Cloning Techniques, pag. 432-442. Ed. Berger, A. R. Limmel (Methods Enzymol. vol. 152)

Wanner, G., H. Formanek, D. Galli, R. Wirth. 1989. Localization of aggregation substances of *Enterococcus faecalis* after induction by sex pheromones. An ultrastructural comparison using immunolabelling, transmission and high resolution scanning electron microscopic techniques. Arch. Microbiol. 151: 491-497.

Weaver, K. E., & D. B. Clewell. 1988. Regulation of the pAD1 sex pheromone response in *Enterococcus faecalis*: construction and characterization of *lac Z* transcriptional fusions in a key control region of the plasmid. J. Bacteriol. 170: 4343-4352.

Weaver, K. E., & D. B. Clewell. 1989. Construction of *Enterococcus faecalis* pAD1 miniplasmids: identification of a minimal pheromone response regulatory region and evaluation of a novel pheromone-dependent growth inhibition. Plasmid, 22: 106-119.

Weisblum, B. 1983. Inducible resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin type B antibiotics: the resistance phenotype, its biological diversity and structural elements that regulate expresion, pag. 91-121. *In* Gene function in prokaryotes. Cold Spring Harbor Lab. New YorK.

Wicken, A. J., & K. W. Knox. 1974. Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen. Science, 187: 1161-1167.

Wirth, R., F. Y. An, & D. B. Clewell. 1986. Highly efficient protoplast system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli-Streptococcus faecalis* shuttle vector. J. Bacteriol. 165: 831-836.

Wolf, L. F., & L. Duncan. 1974. Studies on a bactericidal substance produced by group A streptococci. J. Gen. Microbiol. 81: 413-424.

Yagi, Y., R. E. Kessler, J. H. Shaw, D. E. Lopatin, F. Y. Ann, D. B. Clewell. 1983. Plasmid content of *Streptococcus faecalis* strain 39-5 and identification of a pheromone (cPD1)-induced surface antigen. J. Gen. Microbiol. 129: 1207-1215.

Youngman, P. 1987. Plasmid vectors for recovering and exploiting Tn 917 transpositions in *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria, pag. 79-104. *In* K. G. Hardy (ed.) Plasmids, a practical approach. IRL Press Ltd. Oxford.

6. El carácter AS-48 (producción y resistencia) junto con el plásmido pMB2, pueden ser transferidos por conjugación con baja frecuencia a *E. faecalis* OG1X ó por transformación de protoplastos regenerados en alginato y posterior enriquecimiento de los transformantes mediante presión selectiva con AS-48.

7. Se ha demostrado el carácter débilmente antigénico del antibiótico AS-48. La presencia de este antibiótico en todas las estirpes OG1X (pMB2) escasamente productoras, puede ponerse de manifiesto mediante técnicas inmunológicas (Western-blot).

8. Además los transconjugantes OG1X (pMB2) muestran agregación en medio líquido, debido a la síntesis constitutiva de proteínas de superficie visibles a microscopía electrónica de barrido.

9. Las razas OG1X de *E. faecalis* que han adquirido los plásmidos pMB1.1 ó pMB2, producen bacteriocina Bc-48 ó antibiótico AS-48 respectivamente a niveles mas bajos que las cepas donadoras y silvestre, probablemente debido al nuevo fondo genético en el que se encuentran ambos plásmidos.

10. Se propone el mapa físico para el plásmido pMB2 establecido mediante el uso de distintas endonucleasas de restricción. El gen estructural de AS-48 se ha localizado sobre un fragmento de aproximadamente 4,9 Kb delimitado por los enzimas *Sal* I-*Sac* I.