



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**Departamento de Microbiología**  
**Facultad de Ciencias**

**OBTENCIÓN DE MOLÉCULAS LINEALES DE AS-48 QUE  
CONSERVEN LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL Y LA  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA MOLÉCULA NATIVA**

**TESIS DOCTORAL**

**MANUEL MONTALBÁN LÓPEZ**

**Granada, 2008**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Manuel Montalbán López  
D.L.: GR. 186-2009  
ISBN: 978-84-691-8588-9





**Universidad de Granada**  
**Departamento de Microbiología**  
**Facultad de Ciencias**

**OBTENCIÓN DE MOLÉCULAS LINEALES DE AS-48 QUE CONSERVEN  
LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL Y LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE  
LA MOLÉCULA NATIVA**

Memoria presentada por Manuel Montalbán López, Licenciado  
en Farmacia, para optar al Grado de Doctor

El Doctorando

**Manuel Montalbán López**

Vº Bº de los Directores del Trabajo

**Mercedes Maqueda Abreu**  
Catedrática de Microbiología  
Universidad de Granada

**Eva Valdivia Martínez**  
Catedrática de Microbiología  
Universidad de Granada

**Manuel Martínez Bueno**  
Profesor Titular de Microbiología  
Universidad de Granada



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada durante los años 2003-2008, en el Grupo de Investigación “Estudio de sustancias antagonistas producidas por microorganismos” (CVI 160).

La investigación ha sido financiada a través de los proyectos “Obtención de variantes de la bacteriocina AS-48 mediante mutagénesis dirigida, con propiedades fisico-químicas y actividad biológicas mejoradas (BIO2001-3237) y “Expresión y caracterización de mutantes del péptido cíclico AS-48” (BIO2005-01544).

El doctorando ha disfrutado de una beca del Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia durante los años 2004 a 2008. Ha sido igualmente beneficiario de ayudas y becas para las estancias breves que ha realizado en el CRIBI Biotechnology Centre de Padua (Italia) del 21 Enero al 7 de Abril de 2005 financiado por el Plan Propio de la Universidad de Granada y del 1 de Octubre al 31 de Diciembre de 2005, así como en el Institute of Food Research de Norwich (Reino Unido) del 1 de Septiembre al 31 de Diciembre de 2007, ambas financiadas por el Ministerio de Educación y Ciencia.



Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados a congresos y publicados en revistas internacionales o están en preparación:

### **Publicaciones**

**Montalbán-Lopez, M., B. Spolaore, O. Pinato, M. Martínez-Bueno, E. Valdivia, M. Maqueda and A. Fontana.** 2008. Characterization of Linear Forms of the Circular Enterocin AS-48 Obtained by Limited Proteolysis FEBS Letters. **582**:3237-3242.

**Montalbán-López, M., M. Martínez-Bueno, E. Valdivia and M. Maqueda.** Design and construction of linear variants from circular enterocin AS-48. Journal of Bacteriology. MS in review.

**Montalbán-López, M., M. Martínez-Bueno, J.M. Rodríguez, E. Valdivia, N. Horn and M. Maqueda.** Expression of linear permutants AS<sub>10/11</sub> and AS<sub>43-27</sub> from circular Enterocin AS-48 in different expression systems. MS in preparation.

### **Revisiones relacionadas con la Memoria**

**Sánchez-Hidalgo, M., M. Montalbán-López, M. Martínez-Bueno, E. Valdivia and M. Maqueda.** 2007. Natural Ribosomally Synthesized Circular Proteins. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. pp. 283-294.

**Mercedes Maqueda, Marina Sánchez-Hidalgo, Matilde Fernández, Manuel Montalbán-López, Eva Valdivia and Manuel Martínez-Bueno.** 2008. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. FEMS Microbiology Reviews. **32**:2-22.



## **Comunicaciones a Congresos**

Montalbán-López, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M. Ensayos de expresión heteróloga del gen *as-48A* cíclicamente permutado que contiene la secuencia lineal del péptido AS-48. XX Congreso Nacional de Microbiología. SEM. Cáceres. 19-22 de Septiembre de 2005

Montalbán-López, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M. Obtención y expresión del permutante lineal AS-48L<sup>23,24</sup> de la Enterocina cíclica AS-48. I Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana (CMIBM-SEM 2006). La Coruña. 9-10 Noviembre 2006

Montalbán-Lopez, M., Spolaore, B., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M. and Fontana, A. Characterization of a linear form of the cyclic Enterocin AS-48 produced by limited proteolysis. 2nd workshop on biophysics of membrane-active peptides. Lisboa (Portugal). 1-3 Abril de 2007.

Manuel Montalbán-López, Manuel Martínez-Bueno, Eva Valdivia y Mercedes Maqueda. Diseño y expresión de variantes lineales de la Enterocina circular AS-48. 3ª Reunión de la red temática "Participación de las bacterias lácticas en la salud humana y la calidad alimentaria". Valencia, 12-13 Julio 2007.

## Summary

AS-48 is a 70-residue circular peptide from *Enterococcus faecalis* belonging to a heterogeneous group of bacterial antimicrobial polypeptides, called bacteriocins. The complete NMR assignment indicated that the AS-48 fold is characterised by five helices arranged to form a globular structure with a hydrophobic surface located in helices  $\alpha_1$ - $\alpha_3$  and a highly positive charged region concentrated in helices  $\alpha_4$  and  $\alpha_5$ .

The circular backbone of AS-48 has prompted us to explore the possibility of its linearization. In a first attempt, we decided to open it between Met<sup>1</sup> and Trp<sup>70</sup> and between the two wider loops situated between the  $\alpha_1/\alpha_2$  and  $\alpha_3/\alpha_4$  helices by applying genetic circular permutation. In this way, the *as-48A* structural gene derivatives obtained (*as-48L<sup>1/70</sup>*, *as-48L<sup>23/24</sup>* and *as-48L<sup>48/49</sup>*) were cloned into different vector to be expressed in *E. coli* strains, including those with protease-deficient activities. Unfortunately, no linear proteins with the expected size could be observed in the cell extracts, under any of the induction conditions assayed, in spite of transcription from the recombinant genes was detected. A plausible justification for this behaviour could be that the disruption of the circular AS-48 backbone at such sites might be involved in topological and entropic changes that disturb the potential conformation of the linear derivatives, rendering them incapable of folding into native-like structures or at least into stable structures and being consequently degraded by the host proteases. To amplify the *E. coli* gene expression capacity, *as-48L<sup>23/24</sup>* and *as-48L<sup>48/49</sup>* acyclic permutants were separately cloned in frame with the C-Lytag protein, which is controlled by linked regulatory circuits in the pALEXa vector. This approach provided fused proteins with the expected size (approx. 29000 Da) in each induced cell extract, which were recognized by specific antisera. Interestingly, unspecific enterokinase cleavage release two hybrid proteins, corresponding to fusions of *tag* fragments with partial sequences of AS<sub>23/24</sub> and AS<sub>48/49</sub> derivatives respectively, with antibacterial activity.

In addition, we have conducted limited proteolysis experiments on AS-48 to produce linear forms, considering that this technique allows obtain linear derivatives able to maintain a native-like conformation. In fact, we

report here the production, with thermolysin under denaturing conditions, of a protein species carrying a single nicking (AS<sub>10/11</sub>) and fragments of 55- and 38-residues (AS<sub>43-27</sub> and AS<sub>42,43-10</sub>) that retain partly  $\alpha$ -helical secondary structure and the biological activity of the intact protein. The most important conclusion of these results has been to confirm that circularization is not essential for the bactericidal activity but to stabilise the three dimensional structure of the protein. It has been also demonstrated that is important to maintain a certain distribution of electrostatic and hydrophobic surfaces for an efficient AS-48 insertion into the membranes. This observation suggests that nicking is compatible with the insertion into the bilayer lipid membrane that is required for the activity.





*"No hay ningún camino que no se  
acabe, como no se le oponga la pereza  
y la ociosidad"*

*Miguel de Cervantes Saavedra  
(1547-1616)*



## AGRADECIMIENTOS

Siempre me han dicho que es de bien nacidos ser agradecidos, y cuando se está a punto de defender una Tesis Doctoral, hay mucho que agradecer. No quisiera extenderme demasiado, pero es inevitable acordarse de mucha gente en estos momentos y de justicia mencionarlos.

En primer lugar es necesario agradecer a todos los docentes que se han hecho cargo de mi formación, desde que comencara años ha hasta llegar a los responsables de mi formación universitaria. Todos ellos, en mayor o menor medida, han hecho posible que apareciera la inquietud necesaria para hacer esta investigación y han proporcionado las bases y las herramientas para su desarrollo.

No puedo dejar de lado en estos momentos a todos los amigos que han pasado por mi vida y que han tomado distintos caminos. Todos los amigos que siguen en Jaén, Paco, Dani, Manuel Jesús, Esther, y otros muchos, especialmente Elena. Gracias por todos los buenos ratos.

Quiero mencionar también, en estas líneas, a una persona que tuvo mucha influencia en mí por ser guía espiritual, fuente de sentido común y, sobre todo, amigo además de sacerdote dedicado. Gracias por todo, Elías.

Cómo olvidar a los amigos de mi pueblo, que me han sufrido estos últimos meses y siempre han estado presentes cuando he necesitado desahogarme y tomar un tiempo de descanso para la mente. Salva, Paca, Manuel Emilio, Eloy, Tano, Mari Carmen, Mayte, Jose, Pepe, Antonio Jesús y Vanesa, y el resto de amigos de Piñar que no menciono para no llenar más líneas. Me ha sido muy grato contar con vosotros y saber que puedo seguir haciéndolo.

También tengo que dar las gracias al personal del Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada, especialmente a las doctoras Béjar, Quesada y del Moral, quienes dirigieron mis primeros pasos en un laboratorio, gracias también a los que habéis contribuido a los trabajos presentados en esta Memoria dándome a conocer nuevas técnicas y dejándome compartir vuestros laboratorios: Dr. Angelo Fontana y Dra. Barbara Spolaore y demás miembros en su grupo, del CRIBI de Padua; Nikki Horn, Dr. Juan Miguel Rodríguez y compañeros del grupo del Dr. Mike Gasson del IFR de Norwich y al resto de personas que allí conocí y que me permitieron disfrutar de cuatro meses inolvidables (Juan y Elena y Juan Jr., Carmen, Julia, Boon-Seang, Laura, Arantza, Toni, Fede y Mollie).



Gracias también a los directores de este trabajo, los Dres. Maqueda, Martínez-Bueno, y Valdivia, por empujarme a conocer un mundo desconocido para mí, el de la Biología Molecular, confiarme una tarea que se presentaba complicada, como en efecto ha sido, y facilitarme el aprendizaje de nuevas técnicas y experiencias en mis estancias. Habéis dado un gran aporte personal y científico a mi vida. Gracias, Pirri, Eva y Mercedes,

Huelga decir que no son sólo los directores los que contribuyen a que se pueda desarrollar un trabajo. Son necesarios también unos compañeros, y si estos compañeros se convierten en amigos, todo es más fácil. Gracias a vosotros, que me habéis acompañado en comidas, cafés, risas y penas, y que habéis resuelto tantas dudas, Teresa, Plátero, Jessy, Juanma, Samir, Rubén P., Rubén C., Magda, Alberto, Fadwa, Carmen, Fernando, Estefanía, María del Mar, Mati, Arantxa y Marina, que es la que más me ha sufrido, y otros que han estado menor tiempo en el laboratorio.

He dejado para el final a mi familia, mis tíos, primos, y sobre todo, padres y hermanos. No siempre sé agradecer suficientemente a mis padres, Paco y Matilde, todo lo que nos han enseñado, permitido, dado, y oportunamente negado. Han sido pilar de mi educación, apoyo incondicional y referente moral. Muchas más páginas que las que contiene esta Memoria hacen falta para terminar de agradeceros vuestro aporte. También quiero plasmar mi agradecimiento especial a mi tía Mari por todo su cariño, y a su esposo, mi tío Nicolás.

Y no puedo terminar sin acordarme de quien vio empezar este trabajo y no puede ver su final, quien me ha querido siempre como una madre y a quien he querido de igual manera, quien ha estado siempre a mi lado y no dudo que siempre seguirá, quien siempre tuvo las mejores palabras, las mejores acciones, los mejores consejos. Siempre fuiste una mujer con coraje, decidida, sabia, que supo levantarse frente a las adversidades de la vida y, por ello, especialmente a ti, te dedico todo el esfuerzo de este trabajo. Quiero dar muchas gracias por todo, casi con lágrimas y una sonrisa como siempre quiso, a mi abuela Matilde, la talabartera.





## Abreviaturas

- ABC: del inglés *ATP Binding Casette*.
- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- ADP: adenosín dinucleótido fosfato.
- ATC: ácido tricloroacético.
- Ap: ampicilina.
- ARN: ácido ribonucleico. -m: mensajero. -t: transferente. -r: ribosómico.
- ATP: adenosín trinucleótido fosfato.
- ATCC: del inglés *American Type Culture Collection*.
- BAL: bacterias del ácido láctico.
- BrCN: bromuro de cianógeno.
- BSA: seroalbúmina bovina.
- CAMP: del inglés *cationic antimicrobial peptides*.
- CECT: colección española de cultivos tipo.
- Cm: cloramfenicol.
- CMI: concentración mínima inhibidora.
- CCK: del inglés *cyclic cystin knot*.
- CPP: del inglés *cell-penetrating peptides*.
- CSPD: 3-(4-metoxiespiro {1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro) triciclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-il) fenil fosfato disódico.
- D.O.: densidad óptica.
- Da: dalton.
- DC: dicroísmo circular.
- DEPC: dietil pirocarbonato.
- dNTP: desoxinucleótido trifosfato.
- DTT: ditioneitol.
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.
- EK: enteroquinasa.
- Em: eritromicina.
- EtBr: bromuro de etidio.
- G+C: índice porcentual de contenido en citosina y guanina.
- GRAS: del inglés *Generally Recognised As Safe*.
- HPLC: del inglés *High Performance Liquid Chromatography*. RP-: del inglés *Reverse Phase*.
- Kb: kilobase.
- *L. lactis*: *Lactococcus lactis*.
- *Lb.*: *Lactobacillus*.
- *L. monocytogenes*: *Listeria monocytogenes*.
- LPS: lipopolisacárido.
- MOPS: ácido 3-(N-morfolino)propano sulfónico.
- nm: nanometro.
- NOEs: del inglés *Nuclear Overhauser Enhancement*.
- O/N: del inglés *Overnight*.
- ORF: del inglés *open reading frame*.
- pb: pares de bases.

- PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
- pI: punto isoeléctrico.
- Pm: peso molecular.
- QPS: del inglés *Qualified Presumption of Safety*.
- RMN: resonancia magnética nuclear.
- RT: del inglés *room temperature*.
- RT-PCR: reversotranscripción.
- SD: secuencia Shine-Dalgarno.
- SDS: dodecilsulfato sódico.
- SP: del inglés *signal peptide*.
- SSC: solución de sal y citrato sódico.
- TAE: tampón Tris, ácido acético y EDTA.
- TBE: tampón Tris, ácido bórico y EDTA.
- TBS: tampón de Tris y sal.
- TCA: del inglés *trichloroacetic acid*.
- TE: tampón Tris y EDTA.
- TEMED: N, N, N', N'-tetrametil etilendiamina.
- TFA: ácido trifluoroacético.
- TFE: trifluoroetanol.
- Tris: tris(hidroximetil)aminometano.
- VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.
- X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido.





## ***Índice***





# Índice

---

## INTRODUCCIÓN

<b>1. Péptidos antimicrobianos catiónicos.</b>	1
1.1. Clasificación de los CAMPs.	1
1.2. Mecanismo de acción de los CAMPs.	5
1.2.1. Mecanismo general antimicrobiano.	5
1.2.2. Modelos de permeabilización.	6
1.2.3. Otras acciones de los CAMPs: utilidades en terapéutica.	9
1.3. Péptidos antimicrobianos producidos por bacterias:	12
bacteriocinas	
1.4. Bacteriocinas <i>vs.</i> antibióticos.	17
<b>2. Proteínas circulares.</b>	19
2.1. Proteínas circulares naturales.	20
2.1.1. Proteínas circulares producidas por microorganismos.	21
2.1.2. Proteínas circulares producidas por plantas: ciclótidos.	30
2.1.3. Proteínas circulares de mamíferos: $\theta$ -defensinas.	35
2.2. Síntesis de péptidos circulares.	36
2.2.1. Vías de síntesis de péptidos circulares <i>in vitro</i> .	37
2.2.2. Obtención de péptidos circulares de síntesis ribosómica y no ribosómica <i>in vivo</i> .	40
<b>3. Proteólisis limitada.</b>	45
<b>4. Expresión heteróloga de bacteriocinas.</b>	49
4.1. Sistema de expresión mediante inducción con IPTG.	52
4.2. Sistema de expresión mediante inducción con nisina.	54
4.3. Sistema de expresión mediante inducción con salicilato.	55
<b>5. Enterocina AS-48.</b>	56
5.1. Actividad biológica y modo de acción.	57
5.2. Características bioquímicas.	60
5.3. Características estructurales.	61
5.4. Relación estructura-función.	66
5.5. Estabilidad de AS-48.	60
5.6. Determinantes genéticos de AS-48.	60
5.7. Biosíntesis de AS-48.	73
<b>OBJETIVOS</b>	79
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	83
<b>1. Microorganismos empleados.</b>	85
<b>2. Plásmidos empleados.</b>	86
<b>3. Medios de cultivo.</b>	87

3.1. Medios de crecimiento generales.	88
3.2. Medio empleado para la producción de AS-48.	89
3.3. Medios empleados para el ensayo de la actividad antibacteriana	90
3.4. Medio empleado en los experimentos de transformación genética de <i>E. coli</i> .	91
3.5. Medios empleados en la conservación de organismos.	91
3.6. Antibióticos.	91
3.7. Enzimas y reactivos.	92
<b>4. Tampón fosfato sódico pH 5,8-8,0.</b>	<b>92</b>
<b>5. Técnicas de manipulación de ADN.</b>	<b>93</b>
5.1. Técnicas de aislamiento de ADN plasmídico.	93
5.1.1. Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala (minipreparaciones).	94
5.1.2. Extracción rápida de ADN.	96
5.1.3. Extracción mediante preparado comercial.	97
5.2. Técnicas de análisis de ADN.	97
5.2.1. Electroforesis en gel de agarosa.	97
5.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	98
5.2.3. Purificación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa.	99
5.2.4. Determinación de la concentración de ADN.	99
5.2.5. Eliminación del ARN en soluciones de ADN.	100
5.2.6. Precipitación del ADN.	100
5.2.7. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.	101
5.3. Técnicas para la ligación de fragmentos de ADN.	101
5.3.1. Desfosforilación del vector de ligación.	101
5.3.2. Ligación del ADN.	102
5.3.3. Diálisis de la mezcla de ligación.	102
5.4. Amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	102
5.4.1. Purificación de los productos de PCR.	104
5.5. Mutagénesis dirigida mediante el uso de oligonucleótidos.	104
5.5.1. Permutación circular del gen <i>as-48A</i> .	104
5.5.2. Método de extensión por fragmentos solapados.	105
5.5.3. Adición de la región intergénica entre <i>as-48A</i> y <i>as-48B</i> a los genes permutados.	107
5.5.4. Construcción de los genes cíclicamente permutados y fusionados a C-Lytag.	107
5.6. Oligonucleótidos de síntesis empleados.	108
5.6.1. Diseño de oligonucleótidos para la mutagénesis.	108
5.7. Secuenciación del ADN.	110
<b>6. Técnicas de manipulación de ARN.</b>	<b>111</b>
6.1. Extracción del ARN total en <i>Escherichia coli</i> .	111
6.1.1. Extracción mediante Fastprep.	111
6.1.2. Extracción rápida de ARN de <i>E. coli</i> .	111
6.2. Determinación de la concentración de ARN.	112

6.3. Transferencia e hibridación de ARN ( <i>Northern Blotting</i> ).	113
6.3.1. Preparación de sondas no radioactivas marcadas con digoxigenina-11 dUTP mediante PCR.	113
6.3.2. Sondas empleadas.	113
6.3.3. Electroforesis desnaturizante en gel de agarosa con formaldehído.	114
6.3.4. Transferencia del ARN a membranas de nylon.	115
6.3.5. Prehibridación e hibridación ADN-ARN.	116
6.3.6. Revelado inmunológico.	116
6.3.7. Estimación del tamaño de los ARNs.	117
6.4. Detección de ARN mensajero por RT-PCR.	117
<b>7. Transformación genética de microorganismos.</b>	<b>118</b>
7.1. Transformación de <i>E. coli</i> mediante el método del cloruro de calcio.	118
7.1.1. Preparación de células competentes.	118
7.1.2. Transformación.	119
7.2. Electroporación de <i>Escherichia coli</i> .	120
7.2.1. Preparación de células electrocompetentes.	120
7.2.2. Electroporación de <i>E. coli</i> .	121
7.3. Electroporación de <i>Lactococcus lactis</i> .	121
7.3.1. Preparación de células electrocompetentes.	121
7.3.2. Electroporación de <i>L. lactis</i> .	122
<b>8. Detección y valoración de la producción y resistencia frente a AS-48 y sus variantes.</b>	<b>122</b>
8.1. Técnica de la doble capa.	122
8.2. Técnica de las gotas.	123
8.3. Técnica de los pocillos.	124
<b>9. Purificación de la enterocina AS-48.</b>	<b>124</b>
9.1. Producción en medio líquido.	124
9.2. Cromatografía de intercambio catiónico.	124
9.3. Cromatografía de fase reversa sobre soporte sólido (C18).	125
9.4. Cromatografía líquida de fase reversa de alta resolución (RP-HPLC).	126
9.4.1. Purificación a escala semipreparativa.	127
9.4.2. Purificación a escala analítica.	127
9.5. Liofilización de las muestras.	127
9.6. Diálisis de las muestras.	128
<b>10. Técnicas de análisis de las proteínas.</b>	<b>128</b>
10.1. Determinación de la concentración de proteínas.	128
10.1.1. Método de Bradford.	128
10.1.2. Determinación de la concentración de AS-48 y las variantes a partir del coeficiente de extinción molar.	129
10.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizante ( <i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> , SDS-PAGE).	129
10.2.1. Preparación de los geles de poliacrilamida.	130

10.2.2. Condiciones de desarrollo de la electroforesis.	130
10.2.3. Tinción de los geles con azul de Coomassie.	131
10.3. Detección de AS-48 y los mutantes mediante transferencia a membranas de nitrocelulosa y revelado con anticuerpos específicos ( <i>Western Blotting</i> ).	132
10.3.1. Transferencia a membranas de nitrocelulosa (NC).	132
10.3.2. Revelado inmunológico.	133
10.4. Detección de la actividad antimicrobiana de proteínas separadas por SDS-PAGE.	133
10.5. Estudios de dicroísmo circular (DC).	134
10.5.1. Estudios de dicroísmo circular a temperatura constante.	135
10.5.2. Preparación de las muestras.	136
<b>11. Reacción de proteólisis controlada y separación de los fragmentos e identificación de los mismos.</b>	137
<b>RESULTADOS</b>	141
<b>I. Design and construction of linear permutants from circular enterocin AS-48. Appendix I.</b>	143
<b>II. Characterization of linear forms of the circular enterocin AS-48 obtained by limited proteolysis. Appendix II.</b>	181
<b>III. Expression of linear permutants AS<sub>10/11</sub> and AS<sub>43-27</sub> from circular enterocin AS-48 in different expression systems.</b>	211
<b>DISCUSIÓN</b>	243
<b>CONCLUSIONES</b>	281
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	287
<b>Índice de figuras</b>	341
<b>Índice de tablas</b>	347





# ***Introducción***





## **1. Péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMPs).**

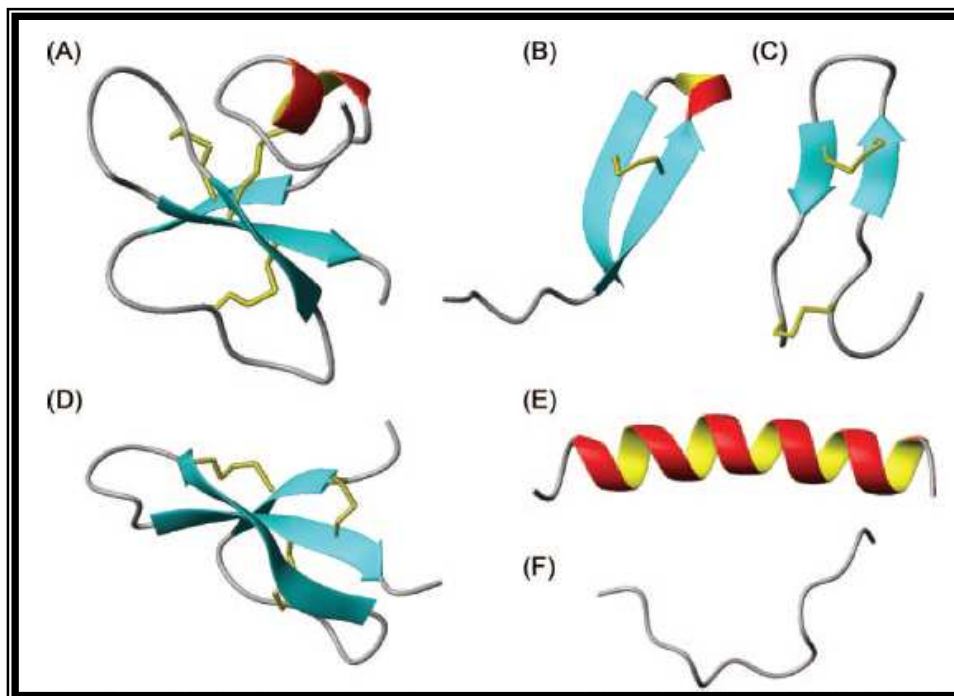
Es un hecho ampliamente contrastado en la literatura científica que organismos de distintos taxones han desarrollado a lo largo de la evolución la capacidad de producir sustancias antagonistas que les otorgan ventajas frente a los microorganismos presentes en su nicho ecológico (Nissen-Meyer y Ness, 1997). Entre ellas se encuentran los antibióticos y un grupo más amplio de moléculas de naturaleza proteica, denominado péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMPs, del inglés *cationic antimicrobial peptides*), que suponen una estrategia común de defensa frente a los microorganismos (revisado por Jenssen *et al.*, 2006). Los CAMPs, que son muy diversos en su secuencia, longitud y estructura, pueden ser definidos como pequeñas moléculas anfipáticas, con hasta un 50% de aminoácidos hidrófobos y una carga neta de +2 a +9 (Hale y Hancock, 2007; Mookherjee y Hancock, 2007; Allaker, 2008). Se ha descrito que este tipo de péptidos puede expresarse tanto de forma constitutiva como en respuesta a algún agente inductor (*quorum sensing*), inflamación, daño tisular, o componentes bacterianos (Gallo *et al.*, 2002; Dennison *et al.*, 2005a). Probablemente, uno de los mayores atractivos de estos péptidos es que representan un mecanismo de defensa ancestral no del todo explorado (Maxwell *et al.*, 2003), que forma parte del sistema inmune innato de un amplio número de organismos, incluido el hombre (Boman, 1995). Además, pueden constituir una alternativa a la difícil situación planteada hoy por la aparición de resistencias a los antibióticos clásicos (Bachere, 2003; Thomma *et al.*, 2003; Dennison *et al.*, 2005a), lo que ha motivado un creciente interés por la caracterización, síntesis y descubrimiento de nuevas moléculas, y de su mecanismo de acción (Koczulla y Bals, 2003; Finlay y Hancock, 2004; Hamilton-Miller, 2004; Levy y Marshall, 2004). Además, los CAMPs constituyen un modelo para estudiar pasos críticos en la inserción, formación de estructura secundaria e interacción con los componentes hidrófobos de la membrana.

### 1.1. Clasificación de los CAMPs.

Hasta el momento se han descrito una gran cantidad de CAMPs (más de mil según Hale y Hancock, 2007), tanto naturales como sintéticos,

## Introducción

con amplio rango de actividades antimicrobianas (ver <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.html>). En general se trata de pequeños péptidos lineales o circulares (15 a 50 aminoácidos, con excepción de las bacteriocinas que pueden ser de mayor tamaño) con organización estructural diversa, que incluye hélices alfa, láminas beta o estructura extendida (Figura 1-I), pero que presentan en general una carga neta positiva y una alta anfipatía, pre-requisitos para la interacción con las membranas bacterianas, cargadas negativamente.



**Figura 1-I. Estructura de algunos CAMPs.** (A) Estructura mixta de la  $\beta$ -defensina-2 humana. (B) Tanatina. (C) Lámina beta de polifemusina. (D) Defensina-1 de riñón de conejo. (E) Magainina. (F) Indolicidina (tomado de Jenssen *et al.*, 2006).

Entre los CAMPs cabe destacar las defensinas de mamíferos (Ganz *et al.*, 1990, Lehrer *et al.*, 1993), la melitina y cecropina de insectos (Hultmark *et al.*, 1980; Steiner, 1982; Rivas y Andreu, 2000;), la magainina (Zasloff, 1987; Matsuzaki, 1998; <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.html>) la dermaseptina de anfibios (Mor *et al.*, 1991), las thioninas de plantas (Broekaert *et al.*, 1997), las naegleriaporinas (Herbst *et al.*, 2002) y entamebaporinas de protozoos (Hecht *et al.*, 2004), la NK-lisina de mamíferos (Andersson *et al.*, 1995) y las bacteriocinas producidas por bacterias (Gratia 1925; Rogers, 1928; Mattick

y Hurst, 1944; Gálvez *et al.*, 1986). Este hecho ha propiciado la aparición de diversas bases de datos a disposición de la comunidad científica, que contienen las secuencias aminoacídicas y las estructuras de buena parte de ellas (Brahmachary *et al.*, 2004; Fjell *et al.*, 2007), lo que es de enorme valor pues facilita el acceso a las mismas junto al uso de algoritmos y programas para el alineamiento de sus secuencias (<http://www.bbcm.units.it/~antimic/researchAMPs.html>).

Los péptidos antimicrobianos naturales se han clasificado en varios grupos de acuerdo con su estructura secundaria (Erand y Vogel, 1999; Leher y Ganz, 1999; Hancock y Diamond, 2000; Kamysz *et al.*, 2003; Bulet *et al.*, 2004; Toke, 2005; Figura 1-I):

1. *Péptidos lineales que forman hélices anfipáticas o hidrófobas.* Son péptidos desestructurados que, al entrar en contacto con las membranas, forman hélices  $\alpha$  anfipáticas. Presentan variaciones importantes en la longitud de su cadena, hidrofobicidad y distribución de carga. Un ejemplo son las magaininas de *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987) o las cecropinas y la melitina de insectos (Steiner, 1982).

2. *Péptidos cíclicos y pequeñas proteínas que forman estructuras en lámina beta.* Se trata de péptidos que presentan una estructura en lámina  $\beta$  antiparalela, favorecida en muchos casos porque los péptidos son cíclicos y se encuentran estabilizados con uno o más puentes de azufre. La circularización puede ocurrir por la formación de un puente disulfuro (protegrinas, Kokryakov *et al.*, 1993), de tres o cuatro puentes disulfuro ( $\alpha$ - y  $\beta$ -defensinas y la NK lisina) o por la circularización de la cadena peptídica vía enzimática (gramicidina S, Saito *et al.*, 1970; polimixina B, Kagan *et al.*, 1951; tirocidinas, Okuda *et al.*, 1963), taquiplesina (Nakamura *et al.*, 1988), y bactenecina (Wu y Hancock, 1999).

3. *Péptidos con composición aminoacídica única o irregular.* Son péptidos que poseen una secuencia rica en algún aminoácido. Como ejemplos se encuentran las histatinas, ricas en His (Brewer *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1998; Helmerhorst *et al.*, 1999), las profeninas, ricas en prolina (Harwig *et al.*, 1995) y las indolicidinas, ricas en Trp (Selsted *et al.*, 1992;

Falla *et al.*, 1996). El triptófano no suele ser muy abundante en las proteínas, pero es importante para la inserción de los péptidos antimicrobianos en la membrana porque tiende a situarse en la interfase hidrófila/hidrófoba de la bicapa lipídica y favorece el anclaje de la cadena peptídica a las cabezas fosfolípicas (Ladokhin *et al.*, 1997; Persson *et al.*, 1998; Yau *et al.*, 1998; Schibli *et al.*, 2002).

4. *Lipopéptidos con un grupo amino-alcohol terminal ("Peptaibols")*. Poseen una gran proporción de ácido  $\alpha$ -amino-isobutírico (Aib) que favorece la formación de hélices  $3_{10}$  (Monaco *et al.*, 1998), hélice dextrógira con tres residuos por vuelta en la que los puentes de hidrógeno se establecen entre el carbonilo  $i$  y el amino  $i + 3$ , con lo que no están exactamente alineados. Poseen además un 1,2-aminoalcohol en el extremo C-terminal y están acilados en el extremo N-terminal. Un ejemplo es la alameticina (Hancock y Lehrer, 1998).

5. *Péptidos macrocíclicos "anudados": Ciclótidos*. Son péptidos circulares de unos 30 aminoácidos producidos por la Familia *Rubiaceae* que presentan un motivo característico llamado "nudo de cistina", el cual consiste en un puente disulfuro que se abre paso a través de otros dos puentes disulfuro formados en la molécula. Este motivo aparece también en inhibidores de proteasas y en toxinas, y confiere una gran estabilidad a la molécula.

6. *Péptidos originados por digestión proteolítica de grandes proteínas catiónicas*. El ejemplo más significativo es la lactoferrina (Ellison y Giehl, 1991) o fragmentos de la hemoglobina (Sforça *et al.*, 2005).

7. *Péptidos helicoidales*. Son péptidos de síntesis ribosómica que presentan una estructura típica en hélice  $\alpha$ . Algunos de ellos, además, pueden presentar sus extremos amino y carboxilo unidos por enlace peptídico (serán tratados con más detenimiento en el capítulo 2.1).

Los CAMPs, independientemente de su estructura secundaria, comparten organización en su estructura terciaria, al ser moléculas anfífilas con los aminoácidos polares o cargados y los residuos hidrófobos situados en la interacción con las membranas (Straus y Hancock, 2006).

También se han clasificado, atendiendo a la estructura anfipática que presentan, en los siguientes grupos (Dennison *et al.*, 2005a):

1. *Anfipatía primaria.* Poseen un segmento central hidrófobo flanqueado por residuos catiónicos. Ej: indolicidina (Rozek *et al.*, 2000).

2. *Anfipatía secundaria.* La presentan algunos péptidos antimicrobianos con estructura secundaria en hélice  $\alpha$ . Consiste en la segregación de los residuos hidrófilos e hidrófobos a lo largo del eje de la hélice. Ej: magainina 1 (Li y Salditt, 2006).

3. *Anfipatía terciaria.* Los residuos que quedan lejanos en la estructura primaria del péptido, se agrupan en la estructura terciaria para formar superficies polares y apolares. Ej: defensinas (Pazgier *et al.*, 2007).

## 1.2. Mecanismo de acción de los CAMPs.

### 1.2.1. Mecanismo general antimicrobiano.

El mecanismo de acción de los CAMPs es algo controvertido ya que pueden actuar sobre distintas dianas, lo que ha hecho que se les tilde de “drogas sucias” (Peschel y Sahl, 2006). Durante muchos años sólo se ha contemplado como mecanismo de acción válido la interacción y destrucción de la membrana de la célula diana, pero cada vez está más clara la existencia de otras dianas, incluso en el interior celular. Esto ha hecho que se hable de CAMPs con mecanismo disruptivo y no disruptivo, si bien en ambos casos es obligada la interacción con las membranas. Numerosos estudios han demostrado que los CAMPs requieren una estructura secundaria específica cuando entran en contacto con la membrana y un carácter anfipático para ser activos. Se puede hablar, no obstante, de una serie de etapas comunes en el mecanismo microbicida de estos péptidos, con independencia del tiempo requerido o la especificidad del mecanismo antimicrobiano (Brogden, 2005; Hale y Hancock, 2007):

1. *Atracción:* el péptido catiónico se une mediante interacciones electrostáticas a la superficie de la membrana cargada negativamente (LPS en Gram-negativas y ácidos teicoicos en Gram-positivas).

2. *Adhesión:* a baja relación péptido/lípido, los péptidos en hélice  $\alpha$ , en lámina  $\beta$  y las  $\theta$ -defensinas se adhieren y penetran entre las cabezas fosfolipídicas en un estado inactivo que compacta la membrana.

3. *Inserción y permeabilización del péptido en la membrana, y/o paso de la membrana y efecto intracelular:* a bajas proporciones péptido/lípido, los péptidos se disponen paralelos a la membrana. Según aumenta la proporción, las moléculas se orientan perpendicularmente y se insertan en la membrana, formando poros o bien desorganizándola y formando micelas. El resultado es que la membrana queda dañada y se liberan los componentes celulares. De forma alternativa, los péptidos no disruptivos como la penetratina (Palm *et al.*, 2006) cruzan la membrana sin romperla y ejercen su acción a nivel intracelular.

No existe una correlación entre la actividad de los CAMPs y su punto isoeléctrico (pI), peso molecular o longitud. Sin embargo, se ha observado que la presencia de residuos básicos (lisina y arginina) ayuda a alcanzar las membranas bacterianas, aunque estos aminoácidos también participan en el mecanismo de permeabilización. La anfipatía y la hidrofobicidad sí son factores determinantes para la actividad permeabilizadora de los CAMPs (Dennison *et al.*, 2005a). Se ha visto que algunos insertan sus hélices de manera oblicua para favorecer la permeabilización de la membrana (Dennison *et al.*, 2005b).

### 1.2.2. Modelos de permeabilización.

La formación de los poros por parte de los CAMPS se ha explicado mediante 4 posibles mecanismos (Figura 2-I) que dependen de las características químico-físicas del péptido antimicrobiano, de la composición de la membrana (Ganz y Lehrer, 1999; Chmiel, 2001; Brogden, 2005; Toke, 2005; Kamysz *et al.*, 2003, Hale y Hancock, 2007, Jenssen *et al.*, 2007) y de la relación péptido/lípido existente:

1. *Modelo en barril o de haces helicoidales:* Cuando dominan las interacciones hidrófobas, cada una de las moléculas del péptido se inserta perpendicularmente a través de la membrana formando un conjunto de haces a modo de barril con un lumen central, en el que la parte hidrófoba

interacciona con las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos y la parte hidrófila delimita el interior del poro (Ehrenstein y Lecar, 1977; Yang *et al.*, 2001). Este modelo no explica, sin embargo, por qué los poros que se forman, son a veces irregulares en cuanto a tamaño y duración y la selectividad que presenta el lumen del poro por iones de naturaleza catiónica, cuando debiera ser selectivo de aniones (Wu *et al.*, 1999).

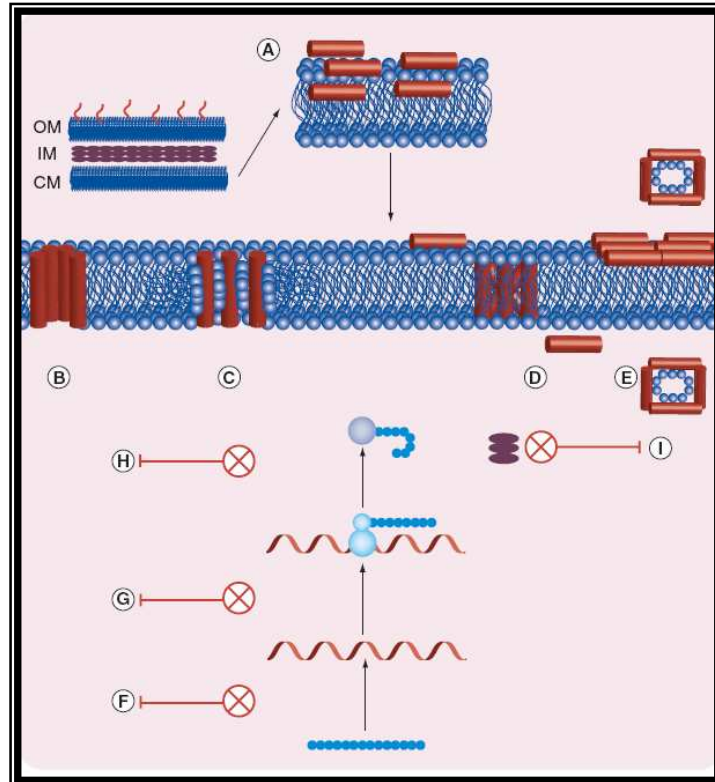
2. *Modelo en alfombra:* Cuando la relación péptido/lípido es baja, péptidos como magaininas y cecropina A se asocian con las cabezas polares de los lípidos y se orientan de forma paralela a la membrana, cubriéndola a modo de alfombra (Bechinger *et al.*, 1993; Oren y Shai, 1998; Marassi *et al.*, 1999). Entonces se establecen fuertes interacciones electrostáticas de los aminoácidos cargados positivamente con las cabezas aniónicas de los fosfolípidos, lo que crea una tensión en la bicapa lipídica por eliminación de fuerzas electrostáticas que lleva a su disgregación o ruptura, formándose micelas (Shai, 1999; Ladokhin y White, 2001).

3. *Modelo toroidal o en "agujero de gusano":* Algunos péptidos parecen penetrar en la membrana y orientarse de forma perpendicular a ella, originando un poro toroidal en el que el péptido se encuentra aún localizado a nivel de las cabezas polares de los lípidos, lo cuales están alineados con los péptidos en el interior del poro. Las hélices del péptido antimicrobiano se insertan en la membrana y para disminuir la curvatura causada por la unión, los fosfolípidos se mueven continuamente desde una mitad de la membrana hacia la otra. Las cadenas peptídicas situadas en la membrana fuerzan el plegamiento de los lípidos, de modo que se forma un poro en cuya luz aparecen las cabezas de los fosfolípidos y las cadenas peptídicas asociadas.

4. *Modelo de conjunto:* tras la unión a la membrana, cuando se logra una concentración suficiente, los péptidos se reorganizan formándose micelas de complejos péptido-lípido. Se puede formar un canal que conduzca a la liberación del contenido intracelular y por tanto a la muerte de la célula diana, o bien el conjunto puede disgregarse espontáneamente liberando los péptidos en el citoplasma, lo que permitiría la acción sobre dianas intracelulares.



Como se indicaba anteriormente, se ha demostrado que los CAMPs no ejercen sólo su efecto microbicida por interrupción de la membrana citoplasmática de la célula bacteriana, sino que pueden tener dianas intracelulares, actuando a nivel de la replicación de ADN, síntesis y traducción de ARNm, síntesis y plegamiento de proteínas, formación de la pared celular o sobre enzimas en general (Gennaro *et al.*, 2002; Bera *et al.*, 2003; Kavanagh y Dowd, 2004). En este caso, se habla de pequeños péptidos catiónicos que cruzan la membrana (CPP, del inglés *cell-penetrating peptides*) con efecto antimicrobiano, en muchos casos sintéticos o derivados de péptidos mayores, que no necesariamente rompen la membrana citoplasmática sino que se unen a ella, la atraviesan y ejercen su acción en el interior celular (Lindgren *et al.*, 2000), aunque el mecanismo de entrada no está demasiado claro (revisada por Henriques *et al.*, 2006). Se ha descrito que puede realizarse por endocitosis seguida de la salida del endosoma por gradiente de pH o de potencial como en el caso de la penetratina (Wadia *et al.*, 2004), por unión a receptores específicos (Castle *et al.*, 1999) o incluso por mecanismos físicos derivados de la interacción péptido-membrana como la formación de poros transitorios (Henriques *et al.*, 2004; Deshayes *et al.*, 2004, 2006a, 2006b), la desestabilización de la membrana (lo que conlleva a una translocación sin formación de poros) (Mano *et al.*, 2006), o la unión de tipo electrostática y el avance debido a la diferencia de potencial (Kobayashi *et al.*, 2004). Por ejemplo, la pleurocidina a concentración mínima inhibidora, es capaz de inhibir la síntesis de ARN y proteínas sin afectar a la integridad de la membrana, pero si se aumenta diez veces su concentración, la membrana se despolariza rápidamente. Esto indica claramente que sus dianas primarias son intracelulares y el efecto sobre la membrana no es más que un resultado de su traslocación a través de ella (Patrzykat *et al.*, 2002).

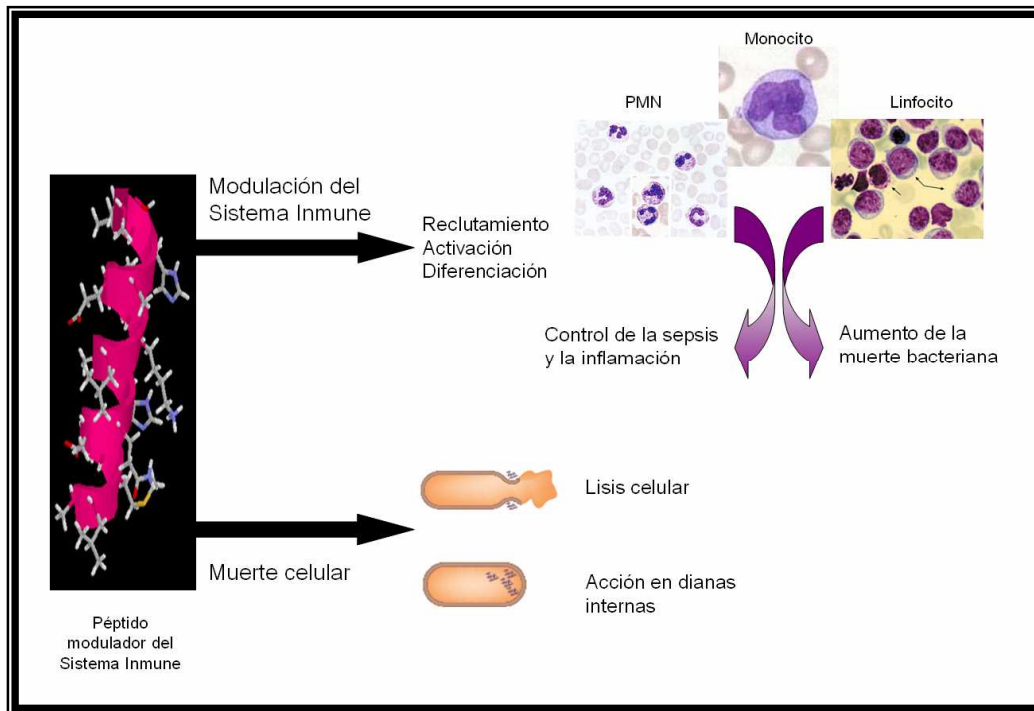


**Figura 2-I. Esquema del mecanismo de acción de los CAMPs.** (A) interacción electrostática con la membrana citoplasmática en la que se insertará de acuerdo con el modelo de barril (B), el poro toroidal (C), mediante agregación molecular (D), o el modelo de alfombra (E). El modelo de agregación molecular puede explicar la translocación a través de la membrana de los CAMPs para interferir con la síntesis de ADN o ARN (F), la síntesis proteica (G), o la formación y mantenimiento de la integridad de la pared celular (H) (tomado de Hale y Hancock, 2007).

### 1.2.3. Otras acciones de los CAMPs: utilidades en terapéutica.

Además de los efectos de los CAMPs en la célula procariota, se ha demostrado que algunos pueden ejercer un efecto antiviral (BMAP-28, Benincasa *et al.*, 2003), antifúngico (magaininas, Islam y Hawser, 1998; ranaciclinas T y E, Mangoni *et al.*, 2003; SMAP-29, Skerlavaj *et al.*, 1999), antiparasitario (indolicidina, Bera *et al.*, 2003) e inmunomodulador (revisado por Jenssen *et al.*, 2006). Tanto es así, que algunos autores apuntan como incompleta la denominación de péptidos antimicrobianos catiónicos y prefieren llamarlos péptidos defensivos del huésped (“*host defence peptides*”) incidiendo especialmente en su importancia como moléculas del sistema inmune innato y puente entre éste y el adquirido (Figura 3-I), restando importancia a su capacidad antimicrobiana. Esto se debe a que algunos de estos péptidos, en condiciones de concentración de

sales y pH fisiológicos y a la concentración en que aparecen habitualmente, carecen de actividad microbicida (Bowdish *et al.*, 2005).



**Figura 3-I. Esquema de las posibles acciones de los CAMPs a nivel sistémico.**

Su inclusión dentro del sistema inmune innato en animales se justifica por su capacidad de conferir resistencia frente a diversos patógenos, limitar la sepsis y poseer actividad frente a algunos tipos de cáncer (Mader y Hoskin, 2006). Por ejemplo, su ausencia en modelos murinos *in vivo* incrementa la susceptibilidad a las infecciones (Nizet *et al.*, 2001), mientras que en humanos la deficiencia de catelicidina LL-37 genera el síndrome de Kostmann, asociado a inflamación periodontal e infecciones más frecuentes (Pütsep *et al.*, 2002). No obstante, no ejercen efecto exclusivamente pro- o anti-inflamatorio y su relación con la inflamación depende de la propia naturaleza del péptido, lo cual queda de manifiesto por la capacidad de algunos CAMPs de reducir la respuesta inflamatoria inducida por endotoxinas, protegiendo así de la endotoxemia (Scott *et al.*, 2002; Giacometti *et al.*, 2003), no sólo uniéndose al propio LPS sino actuando sobre distintas cascadas de señalización (Scott *et al.*, 2000; Nagaoka *et al.*, 2001; Mookherjee *et al.*, 2006). Son capaces, también, de

inducir la producción de citoquinas y quimoquinas quimiotácticas para células como monocitos, neutrófilos y eosinófilos, e influyen en la diferenciación de células dendríticas, sirviendo como puente entre la respuesta inmune innata y la adquirida (Lillard *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Brogden *et al.*, 2003 Bowdish *et al.*, 2005). En conjunto, la actuación de los CAMPs parece reducir selectivamente la respuesta pro-inflamatoria global del organismo mientras que recluta células del sistema inmune, favorece su diferenciación e incrementa la respuesta inflamatoria en el foco de la infección, evitando una respuesta global perjudicial.

Teniendo en cuenta todos los posibles efectos mencionados en este apartado, parece que la clasificación actual de todas estas moléculas dentro de los CAMPs, basada únicamente en la naturaleza peptídica y la presencia de cargas positivas, resulta demasiado amplia. De hecho, dentro de esta denominación nos encontramos con péptidos que no tienen como mecanismo de acción primario el antagonismo microbiano, sino que sólo lo ejercen a altas concentraciones. Incluye también péptidos que tienen como mecanismo de acción la lisis mediante la rotura de la membrana celular y otros que carecen de actividad en la membrana, y únicamente actúan a nivel intracelular. Por todo ello, quizás sea necesario a medio plazo, cuando se conozcan mejor los mecanismos, aminoácidos o motivos estructurales implicados en su acción, realizar una clasificación más esclarecedora.

En vista de las funciones atribuibles a los CAMPs, se ha abierto un campo de investigación con grandes perspectivas en terapéutica, como:

1. Agentes antimicrobianos: dado que su diana terapéutica es principalmente la membrana de la célula sensible, poco susceptible de crear resistencias. Además, una misma molécula puede actuar sobre distintas dianas terapéuticas, a diferencia de los antibióticos convencionales.

2. Agentes reguladores de la inflamación en enfermedades inflamatorias crónicas.

3. Coadyuvantes de la respuesta inmune secundaria.

4. Mecanismos de liberación controlada de moléculas usando los CPP: se plantea el posible uso de los CPP en el transporte, por ejemplo, de ARN antisentido o interferente ligado (Palm *et al.*, 2006).

### 1.3. Péptidos antimicrobianos producidos por bacterias: bacteriocinas.

Los péptidos antimicrobianos producidos por bacterias, denominados bacteriocinas, constituyen una familia de inhibidores muy potentes, de síntesis ribosómica y con gran variabilidad en lo relativo al espectro de acción, modo de acción, tamaño, origen genético y propiedades bioquímicas. Su importancia reside en el hecho de que este tipo de sustancias han sido descritas prácticamente en todos los linajes del Dominio *Bacteria*, siendo frecuente la producción de diversos tipos de bacteriocinas entre cepas de una misma especie (Gálvez *et al.*, 1986; Riley y Gordon, 1992; Tagg, 1992; Maqueda *et al.*, 1998). Sin embargo este tipo de compuestos son producidos por miembros de los tres *Dominios* de la vida actualmente reconocidos, *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya* (O'Connor y Shand, 2002; Zasloff, 2002), pero sólo los producidos por miembros del *Dominio Bacteria* son realmente referidos como bacteriocinas (Riley y Wertz, 2002). Las bacteriocinas difieren de los péptidos antimicrobianos eucariotas por la alta auto-toxicidad que muestran los segundos, tal es el caso de las defensinas producidas por los neutrófilos humanos que son citotóxicas a altas concentraciones para la propia célula productora (Higazi *et al.*, 1996). Las bacteriocinas se diferencian de los antibióticos clásicos en su estructura molecular, su naturaleza exclusivamente peptídica, el modo y espectro de acción, así como en la ausencia de toxicidad y los mecanismos de resistencia inducidos (Cleveland *et al.*, 2001).

Las bacteriocinas se caracterizaron en primer lugar en bacterias Gram-negativas, en las que se describieron las colicinas, producidas por *Escherichia coli* (Gratia, 1925; Asensio *et al.*, 1976; Konisky, 1982), y posteriormente las microcinas producidas por distintos miembros del grupo de las *Enterobacteriaceae* (Baquero y Moreno, 1984; Fath *et al.*, 1994). En bacterias Gram-positivas la síntesis de este tipo de antagonistas

está muy extendida (Jack *et al.*, 1995), si bien en los últimos años las investigaciones se han centrado de forma prioritaria en el estudio de las generadas por bacterias del ácido láctico (BAL) por la posibilidad de emplearlas como conservantes naturales de alimentos, con el fin de aumentar la vida útil y la calidad higiénica de los mismos. Efectivamente, este tipo de inhibidores presentan una serie de características biotecnológicas que las convierten en candidatos óptimos para su empleo como conservantes de alimentos, debido a que i) son, en general, reconocidas como sustancias seguras, ii) no son activas ni tóxicas frente a células eucariotas, iii) son inactivadas por enzimas proteolíticos del tracto gastrointestinal, iv) son, en general, estables en amplios intervalos de pH y temperatura, v) presentan un modo de acción bactericida frente a muchas bacterias patógenas y/o alterantes de alimentos, vi) no poseen resistencia cruzada con los antibióticos y, vi) sus determinantes genéticos están mayoritariamente localizados en plásmidos, lo que facilita su manipulación genética (Gálvez *et al.*, 2007).

Junto al empleo como conservantes naturales de alimentos, las bacteriocinas son prometedoras en la prevención y/o tratamiento de ciertas infecciones humanas, incluyendo la tuberculosis (Sosunov *et al.*, 2007). En un estudio reciente se ha descrito la capacidad que tienen algunas bacteriocinas para modular la microbiota intestinal y reducir la colonización de ratones infectados con enterococos resistentes a vancomicina (Millette *et al.*, 2008). La erradicación de *Helicobacter pylori* del ecosistema gastroduodenal es otro campo de investigación muy activo, que se ha traducido en numerosas patentes en los últimos años. Por otra parte, se ha observado que algunas bacteriocinas poseen actividad frente a diversos virus, entre los que se encuentran los causantes del herpes, la parotiditis, la poliomielitis o la gripe (Wachsman *et al.*, 1999; Serkedjieva *et al.*, 2000; Todorov *et al.*, 2005). Las bacteriocinas también podrían ser muy útiles en el ámbito veterinario, tal y como se ha observado reiteradamente (Aguirre y Collins, 1993; Chen y Hoover, 2003; Cole *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005a,b; Gordon *et al.*, 2005; Toke, 2005; Lawton *et al.*, 2007). Resulta particularmente atractiva su posible aplicación para combatir las mastitis infecciosas que tiene gran impacto sanitario y

económico. Los agentes causales de estas infecciones (fundamentalmente, estafilococos y estreptococos) suelen ser multirresistentes a los antibióticos, por lo que el tratamiento mediante antibioterapia es, en la mayoría de los casos, insatisfactorio. En este sentido, la nisina y otras bacteriocinas, como la lactacina 3147 o la uberolisina, parecen ser una alternativa eficaz ya que son activas frente a la mayoría de las especies productoras de mastitis, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* o *S. uberis* (Taylor *et al.*, 1949; Broadbent *et al.*, 1989; Sears *et al.*, 1992; Ryan *et al.*, 1998; Wirawan *et al.*, 2007). Curiosamente, se ha observado que la presencia de cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina es relativamente común en la leche de mujeres sanas. De hecho, la aplicación de esta bacteriocina ha resultado muy eficaz en casos de mastitis estafilocócicas humanas refractarias a la antibioterapia (Fernández *et al.*, 2008a). Es posible que, en un futuro no muy lejano, dado que el modo de acción de antibióticos y bacteriocinas es muy diferente, puedan complementar a los antibióticos y desde luego sustituir el empleo de conservantes químicos, ampliamente cuestionados en la actualidad (Grande *et al.*, 2006a; Gálvez *et al.*, 2007).

De acuerdo con las características estructurales y biológicas de las bacteriocinas producidas por las BAL, Klaenhammer (1993) estableció cuatro clases de bacteriocinas, de las cuales las tres primeras siguen siendo reconocidas hoy en día:

1. Clase I: Lantibióticos. Son bacteriocinas termoestables, formadas por uno o dos péptidos de pequeño tamaño molecular (<5 kDa) modificados postraduccionamente y que presentan aminoácidos poco frecuentes como la deshidroalanina (DHA) y la deshidrobutirina (DHB), originados por la deshidratación postraducciona de la serina y la treonina, respectivamente. La condensación de estos residuos de DHA y DHB con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas de la molécula, origina, respectivamente, lantionina y  $\beta$ -metil-lantionina.

2. Clase II: Pequeños péptidos termoestables. No sufren modificaciones post-traduccionales, sólo la escisión del péptido líder del prepeptido durante el proceso de exporte. Dentro de esta clase, se

diferencian tres subclases: péptidos tipo pediocina, bacteriocinas formadas por dos componentes, y péptidos activados por grupos tiol.

3. Clase III: Grandes proteínas termolábiles (>30 kDa) carentes de aminoácidos modificados en su estructura. Se desconoce el modo de acción exacto de este grupo, aunque difiere del de las dos clases anteriores, ya que no interfiere con la actividad de la membrana. Estas bacteriocinas han sido poco estudiadas y son las que en la actualidad despiertan menos interés en la industria.

4. Clase IV: Bacteriocinas complejas que contienen motivos lipídicos o carbohidratos. En realidad, esta clase ha sido eliminada en la actualidad porque los miembros que inicialmente se caracterizaron con estos motivos resultaron ser artefactos producidos durante el proceso de purificación de los mismos. Se ha propuesto, sin embargo, su sustitución por bacteriocinas carentes de residuos modificados pero que presentan estructura circular (revisado por Maqueda *et al.*, 2008), gracias a una modificación postraduccional que resulta en la unión peptídica cabeza-cola del <sup>pro</sup>péptido para originar la molécula madura con actividad. Los ejemplos más representativos son la enterocina AS-48 (Maqueda *et al.*, 2004; 2008), la gassericina A y reutericina 6, dos bacteriocinas hidrófobas producidas por especies de *Lactobacillus* que muestran un 98% de similitud con la acidocina B producida por *Lb. acidophilus* (Kawai *et al.*, 2004) y la recientemente descrita Carnociclina A (Martin-Visscher *et al.*, 2008). También en este caso, se han descrito bacteriocinas circulares en géneros bacterianos no pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas, como es el caso de la subtilosina A, el único lantibiótico circular descrito hasta ahora, producido por *Bacillus subtilis* (Marx *et al.*, 2001; Kawulka *et al.*, 2004), la circularina A de *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752 (Kemperman *et al.*, 2003b; Kawai *et al.*, 2004b), butirivibriocina AR10 producida por *Butyrivibrium fibrisolvens* AR10 (Kalmokoff *et al.*, 2003) que presenta interesantes similitudes con la gassericina A (Leer *et al.*, 1995; Kalmokoff *et al.*, 2003) y, más recientemente, la uberolisina producida por la bacteria del rumen *Streptococcus uberis* (Wirawan *et al.*, 2007) y la carnociclina A producida por *Carnobacterium maltaromaticum* (Martin-Visscher *et al.*, 2008).



El descubrimiento y caracterización de nuevas bacteriocinas ha hecho necesario modificar esta clasificación, especialmente en lo referente a la clase II (Nes *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1999, 2007; Van Belkum y Stiles, 2000; Oscáriz y Pisabarro, 2001; Cleveland *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 2002; Cotter *et al.*, 2005). La Tabla 1-I muestra la clasificación de bacteriocinas basada en las propuesta de Cotter *et al.* (2005), Franz *et al.* (2007), Heng y Tagg (2007), Heng *et al.* (2007), Willey y van der Donk (2007) y Nes *et al.* (2007).

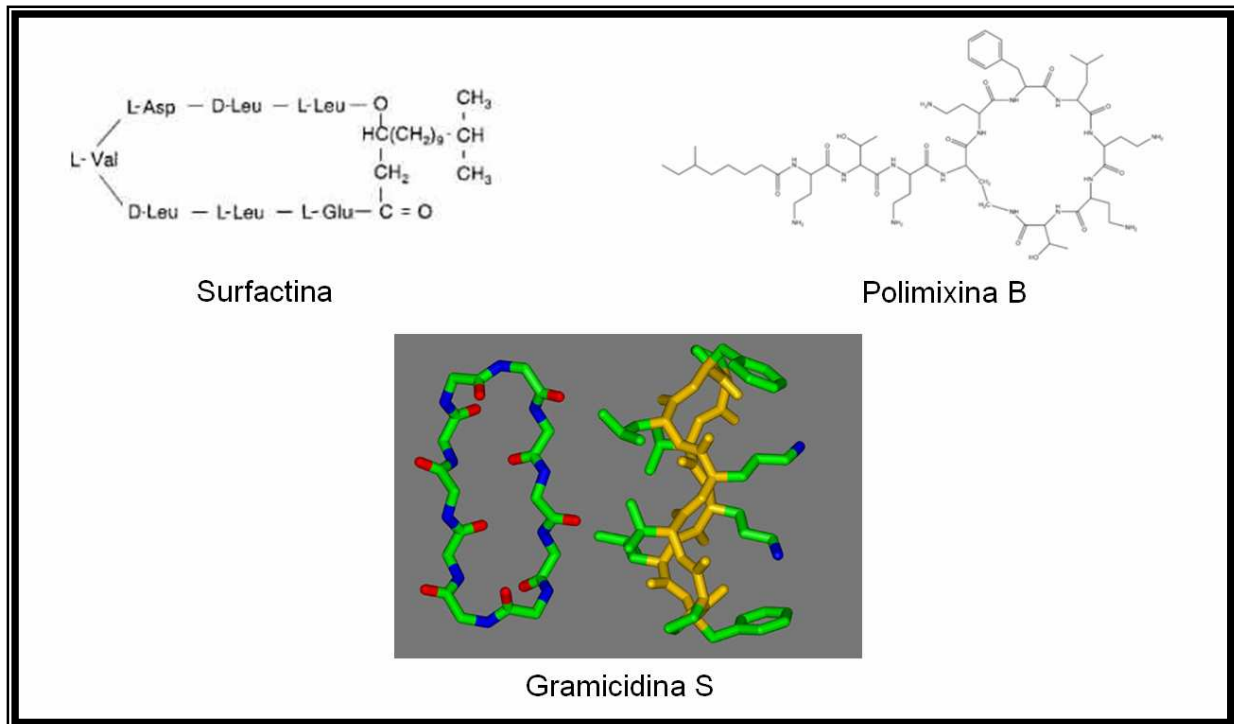
<b>Clase</b>	<b>Subclase</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Clase I: Lantibióticos</b>	<b>Ia:</b> proteínas lineales flexibles modificadas por LanB y LanC, cortadas por LanP (serín proteasa) y exportadas por LanT.	Nisina (Rogers, 1928; Mattick y Hurst, 1944)  Subtilina (Gross <i>et al.</i> , 1973)
	<b>Ib:</b> lantibióticos con estructura globular modificados por enzimas tipo LanM y cortadas y exportadas por LanT (cisteín proteasa). Incluye lantibióticos formados por dos péptidos.	Mersacidina (Sahl <i>et al.</i> , 1995)  Plantaricina W (Holo <i>et al.</i> , 2001)
	<b>Ic:</b> lantibióticos multicomponentes, maduran por una vía distinta a los anteriores. Menor actividad antimicrobiana.	SapB (Capstick <i>et al.</i> , 2007)
<b>Clase II: No lantibióticos. Pequeñas proteínas termoestables.</b>	<b>IIa:</b> tipo pediocina.	Pediocina PA-1 (Henderson <i>et al.</i> , 1992)
	<b>IIb:</b> de dos o más componentes.	Lactococcina G (Nissen-Meyer <i>et al.</i> , 1992)
	<b>IIc:</b> miscelánea de bacteriocinas no modificadas sin péptido líder.	EJ97 (Sánchez-Hidalgo <i>et al.</i> , 2003) Enterocina L50A (Cintas

<b>Clase III: proteínas grandes termolábiles</b>	<b>IIIa:</b> bacteriolíticas.	<i>et al.</i> , 1998; Floriano <i>et al.</i> , 1998) Enterolisina A (Nilsen <i>et al.</i> , 2003) Helveticina J (Joerger y Klaen- hammer, 1986) Enterocina MMT05 (Ghraiiri <i>et al.</i> , 2004)
	<b>IIIb:</b> no bacteriolíticas	Bc-48 (López-Lara <i>et al.</i> , 1991)
<b>Clase IV: bacteriocinas circulares</b>	Por unión carboxilo-amino terminal mediante enlace peptídico postraduccionaI.	Enterocina AS-48 (Gálvez <i>et al.</i> , 1986) Gassericina A (Kawai <i>et al.</i> 2004) Carnociclina A (Martin- Visscher <i>et al.</i> , 2008)

**Tabla 1-I. Clasificación de las bacteriocinas de las BAL.**

#### 1.4. Bacteriocinas *vs.* antibióticos.

Es frecuente encontrar en la literatura científica que las bacteriocinas son consideradas como antibióticos (Hurst, 1981; Hansen, 1993) lo que, desde el punto de vista legal podría limitar la aplicación biotecnológica de las primeras en los alimentos. Entre ambos tipos de moléculas hay una serie de diferencias importantes en lo relativo a la naturaleza, vía de síntesis, modo de acción, espectro de actividad, toxicidad y mecanismo de resistencia (Tabla 2-I). Quizás la característica más importante de las bacteriocinas sea su seguridad, que les permite ser usadas en alimentos para inhibir el crecimiento de bacterias alterantes y, sobre todo, patógenas.



**Figura 4-I. Estructura de algunos péptidos cíclicos de síntesis no ribosómica.**

Los antibióticos, por su parte, son metabolitos secundarios de naturaleza muy variada y cuando son de naturaleza proteica no se sintetizan vía ribosómica, sino vía enzimática (Hancock y Chapple, 1999). En hongos y bacterias se ha descrito la producción de péptidos cíclicos (de menos de 12 aminoácidos de síntesis no ribosómica), sintetizados gracias a la existencia de enzimas con actividad péptido-sintasa (Kohli y Walsh, 2003). Estos péptidos resultan menos sensibles a las proteasas ya que presentan aminoácidos modificados mediante metilaciones, cambios en la quiralidad (formas D en lugar de L) y enlaces no peptídicos. Además, algunos de ellos han desarrollado estrategias que aumentan su estabilidad, como el establecimiento de conexiones intramoleculares mediante puentes disulfuro, que hacen que, al menos parte de la molécula, adopte una estructura cíclica (Figura 4-I). Tal es el caso de la micosubtilina (Duitman *et al.*, 1999), la tirocidina A (Mootz y Marahiel, 1997), la polimixina B1 (Suzuki *et al.*, 1963), la gramicidina S (Danders *et al.*, 1982), y algunos biosurfactantes (Cooper, 1986).

Es además interesante poner de manifiesto que no hay resistencia cruzada entre bacteriocinas y antibióticos y, a diferencia de la resistencia a los antibióticos, la de las bacteriocinas, cuando se produce, no está

determinada genéticamente y, por tanto, no puede ser transferida entre células, cepas o especies. Normalmente la resistencia a bacteriocinas está determinada por cambios fisiológicos en las dianas sobre las que actúan (Ming y Daeschel, 1993; Mazzotta *et al.*, 1997; Crandall y Montville, 1998).

	<b>Bacteriocina</b>	<b>Antibiótico</b>
Aplicación	Fundamentalmente en alimentación	Clínica
Síntesis	Ribosómica	Metabolito secundario
Actividad	Espectro reducido	Espectro variable
Inmunidad del productor	Sí	No
Mecanismo de resistencia/tolerancia	Adaptación relacionada con la composición de membrana	Modificación genética transferible de la diana
Modo de acción	Principalmente, formación de poros	Dianas intra o extracelulares
Toxicidad o efectos secundarios	No descritos	Sí

**Tabla 2-I. Principales diferencias entre bacteriocinas y antibióticos** (Cleveland *et al.*, 2001).

## **2. Proteínas circulares.**

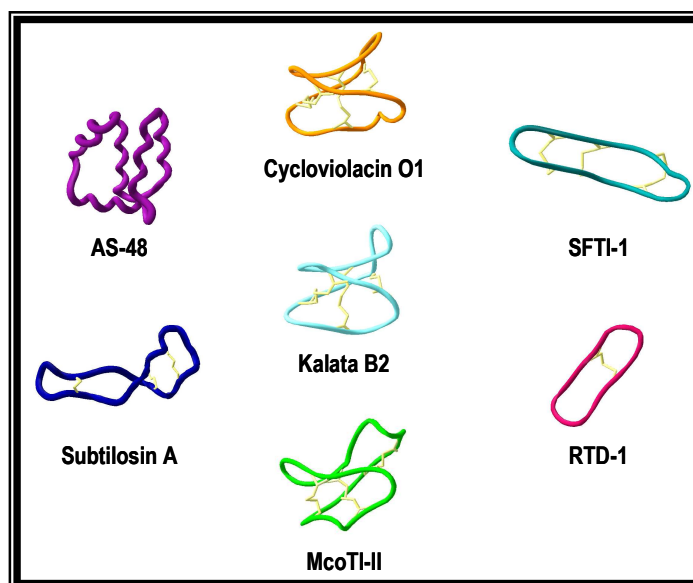
Las proteínas se definen como moléculas formadas por una cadena lineal de aminoácidos que se pliega en el espacio, adoptando una configuración tridimensional establecida que determina su función biológica. Sin embargo, el carácter lineal de las proteínas “convencionales” resta estabilidad a la molécula, ya que sus extremos frecuentemente flexibles, sirven de dianas para numerosos enzimas proteolíticos. Para contrarrestar esta situación, algunas proteínas presentan modificaciones postraduccionales tales como acetilaciones, hidroxilaciones y/o glicosilaciones, que las hacen más resistentes a las exoproteasas.

No hay razones que justifiquen que los extremos de las proteínas no puedan estar unidos por enlace peptídico al igual que el resto de la cadena. Tal vez por ello ha sido fácil admitir la existencia de proteínas circulares de síntesis ribosómica en un amplio rango de seres vivos, incluidos

microorganismos (procariotas y eucariotas), plantas y animales (vertebrados e invertebrados). Se trata de moléculas constituidas por ciclos continuos de uniones peptídicas, y por tanto, carentes de extremos amino o carboxilo, moléculas sin principio ni fin aunque con una estructura tridimensional bien definida y claramente diferentes de los péptidos cíclicos de síntesis no ribosómica antes comentados. La circularización de la cadena polipeptídica es una modificación que estabiliza la conformación nativa de una proteína e incrementa la resistencia a la proteólisis. La comprobación de las ventajas y el interés biotecnológico que estas moléculas presentan han sido determinante para que la síntesis de proteínas circulares haya adquirido en la actualidad gran importancia y se haya convertido en un área de investigación de primera línea (Trabi y Craik, 2002; Craik *et al.*, 2003; Rivas y Andreu, 2003).

### 2.1. Proteínas circulares naturales.

En la actualidad se han descrito cinco clases de proteínas circulares naturales de muy diverso origen. Éstas incluyen dos clases de pilinas, nueve bacteriocinas de la Clase IV antes descritas, los inhibidores de tripsina de las semillas de girasoles (SFTI-1) y de *Momordica cochinchinensis* (MCoTI-II), la  $\theta$ -defensina de primates y los ciclótidos de plantas de las familias *Violaceae* y *Rubiaceae*, (Tabla 3-I), la mayoría de las cuales se encuentran registradas en base de datos CyBase que recoge moléculas naturales y sintéticas con esqueleto circular (Mulvenna *et al.*, 2006a <http://research.imb.uq.edu.au/cybase>). En general se trata de moléculas con una estructura tridimensional bien definida y un tamaño comprendido entre 14 y 78 aminoácidos que, en la mayoría de los casos, presentan actividad antibacteriana, antivírica y/o farmacológica, y están implicadas en mecanismos de defensa (Trabi y Craik, 2002, revisado por Jenssen *et al.*, 2006).



**Figura 5-I. Estructura de alguna proteínas circulares** (adaptado de Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2007).

Tanto en el caso de las proteínas circulares de bacterias como en el de las del resto de los organismos, los datos estructurales disponibles derivan casi exclusivamente de los estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y en algunos casos de los cristalográficos, que muestran que se trata de moléculas con una estructura 3D bien definida y con motivos que se repiten regularmente en su estructura secundaria, sin diferencias notables con los que aparecen en las proteínas lineales.

Denominación	Organismo productor	Nº de aa	Función	Referencias
RTD-1	<i>Macaca mulatta</i>	18	Defensina (leucocitos de primates)	Tang <i>et al.</i> , 1999
SFTI-1	<i>Helianthus annuus</i>	14	Inhibidor de tripsina	Luckett <i>et al.</i> , 1999
Ciclótidos	Fam. <i>Rubiaceae</i> y <i>Violaceae</i>	28-37	Bioactividad	Craik <i>et al.</i> , 1999; 2001;2006

MCoTI-I y II	<i>Momordica cochinchinensis</i>	34	Inhibidor de tripsina	Hernández <i>et al.</i> , 2000
Gassericina A	<i>Lactobacillus gasseri</i> LA39	58	Bacteriocina	Kawai <i>et al.</i> , 1994
Reutericina 6	<i>Lb. reuteri</i> LA6	58	Bacteriocina	Toba <i>et al.</i> , 1991
Circularina A	<i>Clostridium beijerinckii</i> ATCC 25752	68	Bacteriocina	Kemperman <i>et al.</i> , 2003b
Acidocina B	<i>Lb. acidophilus</i> M46	58	Bacteriocina	Leer, 1995
Butirivibriocina AR10	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> AR10	58	Bacteriocina	Kalmokoff y Teather, 1997
Uberolisina	<i>Streptococcus uberis</i> 42	78	Bacteriocina	Wirawan <i>et al.</i> , 2007
Subtilosina A	<i>Bacillus subtilis</i>	35	Bacteriocina	Kawulka <i>et al.</i> , 2003
Carnociclina A	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	60	Bacteriocina	Martin-Visscher <i>et al.</i> , 2008
AS-48	<i>Enterococcus faecalis</i> S-48	70	Bacteriocina	Maqueda <i>et al.</i> , 2004
Pilina T	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	73	Conjugación	Kalkum <i>et al.</i> , 2002
TrbC	<i>E. coli</i>	78	Conjugación	Kalkum <i>et al.</i> , 2002

**Tabla 3-I. Proteínas circulares descritas en la actualidad**

2.1.1.1. Proteínas circulares producidas por microorganismos.

La mayor parte de las proteínas circulares producidas por microorganismos son moléculas con actividad bactericida, caracterizadas

por la gran abundancia de aminoácidos hidrófobos y sin carga (revisado por Maqueda *et al.*, 2008). Es interesante comprobar que estas bacteriocinas circulares presentan similitudes respecto al tamaño molecular (entre 3 y 7 kDa) y el punto isoeléctrico (cercano a 10), lo que sugiere que la producción de este tipo de péptidos catiónicos pueda representar un nuevo mecanismo de antibiosis por moléculas altamente estables que se ha conservado durante la evolución, porque confiere a las bacterias productoras indudables ventajas desde el punto de vista ecológico. De este grupo se ha excluido la microcina MccJ25 producida por *Escherichia coli* (constituida por 21 aminoácidos) (Salomon y Farias, 1992; Blond *et al.*, 1999), inicialmente descrita como un péptido circular, pero en la que hoy se sabe que no existe unión entre los residuos terminales, sino que a través del enlace lactámico existente entre el grupo amino de la Gly<sup>1</sup> y el grupo carboxilo del Glu<sup>8</sup> se organiza el resto de la molécula (Rosengren *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003; Bayro *et al.*, 2003). Esta estructura conocida como *lasso-peptide* o lazo peptídico, ha sido previamente descrita en inhibidores producidos por organismos del género *Streptomyces* (Frechet *et al.*, 1994; Katahira *et al.*, 1995; 1996) y se encuentra estabilizada por los residuos Phe<sup>19</sup> y Tyr<sup>20</sup> que se localizan flanqueando el anillo (Bayro *et al.*, 2003; Rosengren *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003; Rebuffat *et al.*, 2004).

### **Enterocina AS-48**

Fue la primera proteína circular caracterizada (resuelta en 1994 por Samyn *et al.*) y una de las mejor conocidas. Las características bioquímicas, estructurales y genéticas de AS-48 serán expuestas extensamente en el apartado 5 por tratarse de la molécula central de esta Memoria.

### **Gassericina A, reutericina 6 y acidocina B**

Tanto la gassericina A como la reutericina 6 son proteínas de 58 aminoácidos ricas en restos hidrófobos, producidas por especies de *Lactobacillus* que no pueden ser distinguidos entre sí por su secuencia primaria ni por su masa molecular (Kawai *et al.*, 2001). En realidad la



única diferencia entre ambas es la presencia de una o dos D-alaninas, respectivamente, que podría ser la causa de su distinto espectro de acción, más reducido en la reutericina 6, y también por la estructura secundaria que presentan (Kawai *et al.*, 2004a, 2004b). Ambas bacteriocinas son activas únicamente frente a bacterias Gram-positivas y comparten como mecanismo de acción la unión a la membrana citoplasmática de la bacteria sensible, lo cual ocasiona un flujo de potasio que finalmente causa la muerte. Por su parte, la acidocina B difiere de la gassericina A sólo en un residuo (Met<sup>24</sup>Val, 98% de homología), por lo que se puede considerar una variante natural de la misma, a pesar de que aún no se ha confirmado si posee la estructura circular propuesta en los análisis *in silico* (Leer *et al.*, 1995; Kawai *et al.*, 2004a).

El gen estructural de la gassericina A (*gaaA*) se ha localizado en el cromosoma de *Lb. gasseri* LA39 y codifica un prepéptido de 91 aminoácidos (Kawai *et al.*, 1998, número de acceso a GenBank AB007043) situado corriente abajo de una posible ORF que codifica una proteína de 60 aminoácidos aún no identificada (Fig. 6-I). Los 33 primeros aminoácidos corresponden con un péptido señal sin el motivo Gly-Gly (sitio de procesamiento típico) pero con un sitio de ataque proteolítico bien establecido (NH<sub>2</sub>...TTAN\**IYWIADQF*...) (Kawai *et al.*, 1998). Corriente abajo de *gaaA* se localiza un gen que codifica para una proteína con un dominio de unión a ATP, probablemente relacionado con la secreción de la bacteriocina (Kawai *et al.*, 2004a). Ambas ORF poseen una posible secuencia SD aunque no se ha identificado ningún promotor. El gen estructural de la reutericina 6 también se encuentra localizado en el cromosoma de *Lb. reuteri* LA6 (Kawai *et al.*, 2004b).

Los genes responsables de la producción de la acidocina B se localizaron en el plásmido pCV461 de *Lb. acidophilus* M46 (número de acceso GeneBank Z39920). Se trata de tres ORFs consecutivas y en la misma dirección de lectura, que codificarían proteínas de 60, 91 y 114 aminoácidos respectivamente, y una cuarta ORF en dirección opuesta que codificaría una proteína de 59 aminoácidos (Leer *et al.*, 1995) (Fig. 6-I). De acuerdo con la secuencia aminoacídica de la acidocina B, la ORF-2 se corresponde con el gen estructural (*acdB*), mientras que la ORF-3

probablemente codifica una proteína con un dominio de unión al ATP relacionado con la secreción (Kawai *et al.*, 2004b).

### **Butirivibriocina AR10**

La butirivibriocina AR10 es una bacteriocina con un reducido espectro de acción (Teather *et al.*, 1999) que comparte cierto grado de homología con la acidocina B (Leer *et al.*, 1995) y la gassericina A (Kawai *et al.*, 1998). Se trata de una proteína rica en aminoácidos apolares, muy hidrófoba, con un Pm de 5981,5 Da, que se corresponde con el fragmento que queda tras la escisión del péptido señal y la pérdida de una molécula de agua resultante de la circularización (Kalmokoff y Teather, 1997).

El gen estructural de la butirivibriocina AR10 (*bviA*) ha sido identificado en el genoma de *Butyrivibrium fibrisolvens* AR10 mediante una sonda deducida de la secuencia de una variante lineal producida por rotura con BrCN (Kalmokoff *et al.*, 2003) (Fig. 6-I). El pre-propéptido codificado por *bviA*, al igual que sucede en el caso de la acidocina B y la gassericina A, carece del sitio de procesamiento típico formado por dos glicinas consecutivas, pero posee un posible sitio de ataque en el extremo amino (NH<sub>2</sub>-...LIPNI/YIFIADKM...) similar al de la gassericina A (Kawai *et al.*, 1998). Otras cinco ORF no solapadas, *bviBCDE* y la ORF6, se han identificado en la región colindante con el gen estructural (Kalmokoff *et al.*, 2003; número de acceso a GeneBank AF076529). Los genes *bviBCDAE* constituyen una unidad transcripcional cuyo promotor se localiza 500 pb corriente arriba del comienzo de *bviB*, si bien se han encontrado fragmentos de ARNm de distintos tamaños, lo que sugiere un posible procesamiento del mensajero (Kalmokoff *et al.*, 2003), similar al descrito para el operón *as-48ABC* (Fernández *et al.*, 2008). Los análisis de homología de las proteínas codificadas por estos genes muestran que BviB podría corresponderse con una proteína de unión a ATP, mientras que BviC y BviD corresponderían a proteínas transmembrana, de forma que BviBCD podría actuar como un transportador tipo ABC relacionado con la producción e inmunidad frente a la butirivibriocina AR10, mientras que

BviE se perfila como una proteína de inmunidad (Teather *et al.*, 1999; Kalmokoff *et al.*, 2003).

La producción de butirivibriocina AR10 podría estar regulada vía *quorum sensing*, puesto que los niveles del transcrito *bviA* aumentan en presencia de glucosa, que a su vez incrementa la densidad del cultivo. Esta teoría se ve reforzada por la presencia de dos ORFs corriente arriba del operón mencionado, que podrían corresponder a un sistema regulador de dos componentes, similar al descrito para otras bacteriocinas (O’Keeffe *et al.*, 1999; Fontaine *et al.*, 2007).

### **Uberolisina**

La uberolisina es otra bacteriocina circular recientemente descrita por Wirawan *et al.* (2007, número de acceso a GeneBank DQ650653) que es producida por *Streptococcus uberis* 42 junto a la nisina U (Wirawan *et al.*, 2006). Presenta como principal diferencia con el resto de bacteriocinas circulares su menor estabilidad térmica.

El gen estructural de la uberolisina (*ubIA*) situado en el cromosoma bacteriano, codifica un <sup>pre</sup>péptido de 76 aminoácidos, constituyendo los seis primeros un péptido líder (Fig. 6-I). Adyacentes a él, se han identificado diversas ORF: la ORF1 localizada corriente arriba del gen estructural y con homología con reguladores de respuesta de los sistemas de transducción de señales de dos componentes, y *ublBCDE* situados corriente abajo de *ubIA*. El estudio de homologías muestra que el producto de *ublCD* probablemente codifica un transportador mientras que el producto de *ublB* parece ser el equivalente de la proteína CirB de la circularina A. UblE ha sido propuesto como una proteína de inmunidad (Wirawan *et al.*, 2007).

### **Circularina A**

La circularina A es un péptido de 69 aminoácidos producido por *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752 (Kemperman *et al.*, 2003a) con un espectro de actividad bastante reducido. Su estructura circular fue

determinada tras la rotura con BrCN de la molécula purificada a homogeneidad y posterior secuenciación. El análisis de homología realizado demostró que presentaba similitud (60%) con la secuencia de la enterocina AS-48 (Martínez-Bueno *et al.*, 1994; Kemperman *et al.*, 2003b), si bien el líder de la circularina A sólo contiene tres residuos, frente a los 35 de AS-48.

Los determinantes genéticos de esta bacteriocina se encuentran localizados en el cromosoma de la bacteria (número de acceso a GeneBank AJ566621). Consta de un gen estructural *cirA* y dos grupos de genes (Fig. 6-I): *cirBCDEGHI* relacionados con la biosíntesis, maduración, secreción e inmunidad, y los genes *cfgR*, *cfgK*, *cfg01*, y *cfg02*, dos de los cuales (*cfgR* y *cfgK*) codifican un sistema regulador de dos componentes. Muchas de las proteínas codificadas por estos genes muestran homología con secuencias descritas en la región genética de la enterocina AS-48 aunque no se ha podido encontrar un homólogo de As-48C<sub>1</sub>. Los genes *cirABCDE* y *cirGHI* se transcriben presumiblemente como dos ARNm policistrónicos. El primero de ellos basta para que se produzca proteína madura, estando *cirE* involucrado en la inmunidad. Según los análisis de homologías realizados, CirD y CirH contienen dominios de unión a ATP, mientras que CirG muestra similitud con proteínas accesorias de transportadores tipo ABC y CirI con proteínas transmembrana, pudiendo ser parte de un segundo transportador. El solapamiento entre el final de unos genes y el comienzo de otros sugiere una regulación de la expresión mediante acoplamiento traduccional.

### **Carnociclina A**

La carnociclina A es el último miembro descrito del grupo de bacteriocinas circulares producidas por bacterias Gram-positivas (Martin-Visscher *et al.*, 2008). Se trata de una proteína circular de naturaleza catiónica (5862 Da), producida por *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307, que produce también piscicolina 126, carnobacteriocina B1 y carnobacteriocina BM1 pertenecientes a la Clase IIa. La carnociclina es resistente al tratamiento térmico durante periodos no demasiado

prolongados y en ausencia de agentes desnaturalizantes como el SDS, si bien, la adición de éstos suprime la actividad. Presenta un amplio espectro de acción frente a diversas bacterias Gram-positivas pero no se ha encontrado sensibilidad en ninguna de las Gram-negativas usadas. El estudio estructural mediante dicroísmo circular muestra que la molécula presenta una estructura definida, con un 36% de contenido en  $\alpha$ -hélices, el cual se incrementa hasta un 52% tras la adición de TFE, que simula un ambiente similar al de las membranas biológicas. Aún no se dispone de la estructura tridimensional de esta molécula.

La carnociclina A es codificada por el gen *cclA* (número de acceso a GeneBank EU624394), el cual se traduce en una proteína de 64 aminoácidos, correspondiendo los cuatro primeros al péptido señal (Fig. 6-I). La circularización de la molécula ocurre entre las dos Leu de los extremos (Leu<sup>1</sup> y Leu<sup>60</sup>). No se han descrito hasta ahora más genes implicados en la producción e inmunidad de esta bacteriocina.

### **Subtilosina A**

La subtilosina A de 35 aminoácidos producida por *Bacillus subtilis*, es el único péptido circular con actividad antagonista descrito hasta la fecha que posee carácter aniónico y el único con modificaciones postraduccionales similares a las de los lantibióticos. Tras la escisión del péptido señal de ocho aminoácidos, la proteína madura se circulariza (Zheng *et al.*, 1999). Al igual que AS-48, y a diferencia del resto de bacteriocinas circulares, presenta actividad frente a bacterias Gram-positivas así como frente a algunas Gram-negativas (Shelburne *et al.*, 2007). Debido a su tamaño y a la circularización del esqueleto peptídico, su estructura tridimensional determinada por RMN muestra una molécula muy compacta y poco flexible (Kawulka *et al.*, 2003, 2004). Otro rasgo estructural bastante llamativo es la presencia de tres entrecruzamientos que tienen lugar entre los grupos SH- de tres cisteínas y el carbono alfa de otros tantos aminoácidos, para producir un enlace tioéter (Kleerebezem, 2004; Kawulka *et al.*, 2004). Todo ello, junto con la circularización, le

confiere una gran estabilidad a altas temperaturas y resistencia a la degradación de Edman (Babasaki *et al.*, 1985; Marx *et al.*, 2001).

El grupo de genes responsable de la producción de la subtilosina A (número de acceso a GeneBank AJ430547) consta de *sboA*, *albABC*, y *albDEFG*, que se transcriben desde un promotor situado corriente arriba del gen estructural *sboA* (Zheng *et al.*, 1999, 2000) (Fig. 6-I). *AlbBCDEF* están involucrados en el transporte e inmunidad, mientras que *AlbA* y *AlbF* resultan imprescindibles para la producción de subtilosina A, el primero relacionado con las modificaciones postraduccionales (Menendez *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 2000). *AlbC* es miembro de un transportador tipo ABC, *AlbE* una proteasa que procesaría el pre-propéptido, y *AlbF* una endoproteasa que también participaría en el procesamiento. A su vez *albBCD* son requeridos para la total inmunidad. Estos genes están bastante conservados entre distintas subespecies de *B. subtilis*. Entre el gen *sboA* y *albA* existe una secuencia invertida que parece tener una función reguladora de la traducción, de forma que el producto de *sboA* se traduzca de forma mucho más eficaz que el resto del ARNm, al igual que ocurre en otros operones de bacteriocinas (revisado por Maqueda *et al.*, 2008).

### **Pilinas**

Las pilinas TrbC y T (7,2 KDa) son subunidades de los pelos sexuales (*pili*) responsables del contacto celular durante el proceso de conjugación (Kalkum *et al.*, 2002). Se encuentran codificadas por los plásmidos IncP (RP4) de *E. coli* y Ti de *A. tumefaciens*, respectivamente. Ambas proteínas tienen una función y tamaño muy similares, 78 y 74 aminoácidos, pero no comparten homología en la secuencia.

La pilina T es sintetizada como un propéptido, VirB2 (12,3 KDa), que forma parte del regulón *vir*, compuesto por un total de 24 ORFs agrupadas en seis operones: *virA*, *virB*, *virG*, *virC*, *virD*, y *virE* (Rogowsky *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1996) (Fig. 6-I). El producto de *virA* y *virG* es parte de un sistema de transducción de señales de dos componentes que regula positivamente la expresión de los restantes operones, esenciales en el procesamiento y la transferencia del ADN-T (Winans, 1992). VirB2

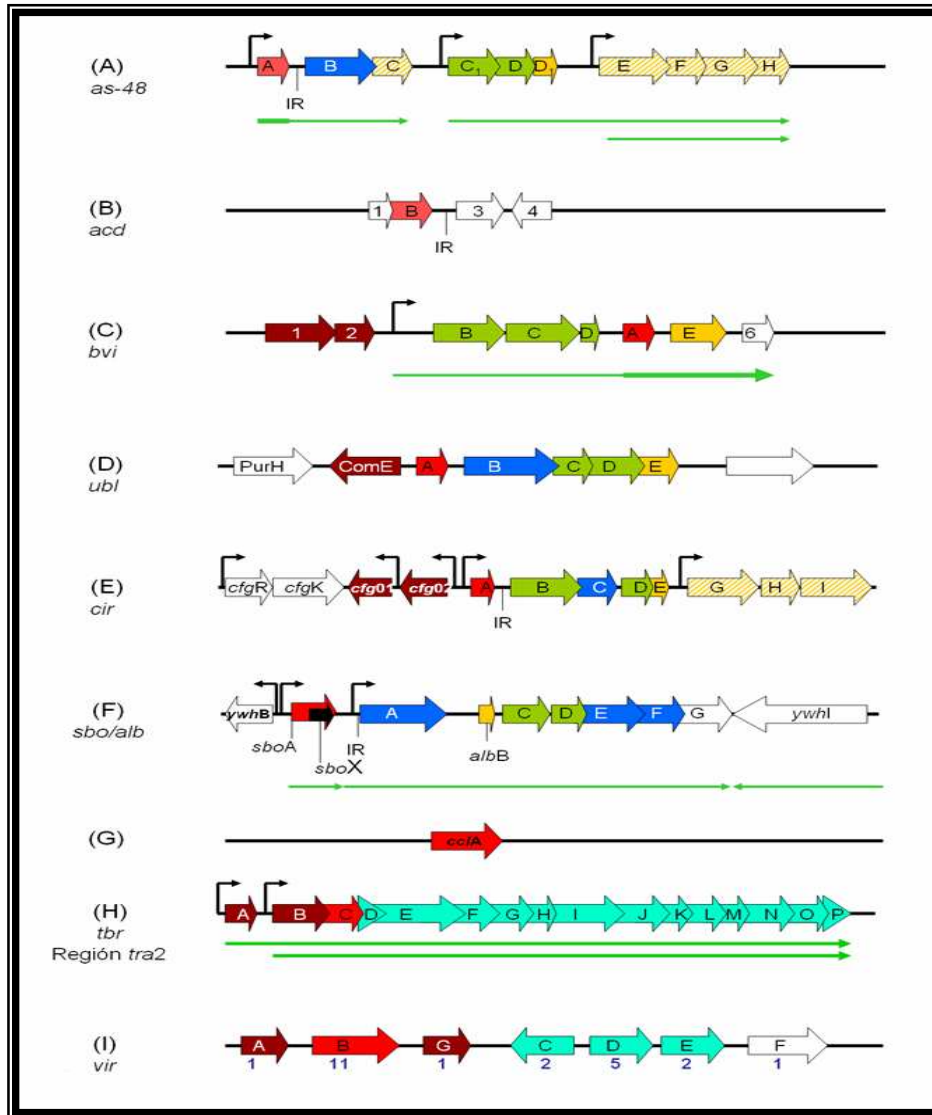
comparte un 48% de homología con la <sup>pre</sup>propilina TraA, que es el principal componente del pilus F, lo que sugiere que ésta, junto con el resto de proteínas del operón *vir*, es necesaria para la producción de pilina T por eliminación de 47 aminoácidos y ensamblaje del resto de componentes del pilus de forma similar a como ocurre en la región *tra* (Kado, 1994).

El plásmido RP4 es un elemento conjugativo promiscuo de 60 Kb en el que se han identificado 74 genes, de los cuales diecinueve, la denominada región *Tra* (15,7 kb), son necesarios para la conjugación. Porta, además, resistencia a múltiples antibióticos (ampicilina, kanamicina y tetraciclina) así como al telurito potásico. La región *Tra* se subdivide en *tra1*, compuesta por tres operones (primasa, relaxasa y el operón líder encargado de la unión a oriT) y *tra2*, que contiene el gen *trbA* (regulador de la expresión de la región *tra1*), el gen *trbB* que muestra homología con una ATP-asa, el gen *trbC* identificado como el responsable de la formación de la <sup>pre</sup>propilina, una proteína que sufre una serie de modificaciones postraduccionales que incluyen la circularización y la escisión de 36 aminoácidos tal y como se comentará en el apartado 2.3.2, y los genes *trbDEFGHIJKLMNOP* que se relacionan con la formación de las parejas sexuales (Pasengrau *et al.*, 1994; Haase *et al.*, 1995).

### 2.1.2. Proteínas circulares producidas por plantas: ciclótidos.

El descubrimiento de estas proteínas macrocíclicas bioactivas se produjo en la década de los años setenta (Gran, 1970; Gran, 1973; Sletten y Gran, 1973) gracias a programas de rastreo para la búsqueda de nuevos compuestos para su aplicación en medicina natural, pero las publicaciones a que dieron lugar su conocimiento no se produjeron hasta 20 años más tarde (Gustafson *et al.*, 1994; Witherup *et al.*, 1994; Saether *et al.*, 1995). Hoy día constituyen el grupo de proteínas circulares más abundante (Craik *et al.*, 2006) y con gran variedad de actividades biológicas: las circulinas tienen actividad anti-VIH (Gustafson *et al.*, 1994); el ciclopsicótrido A inhibe la unión de la neurotensina (Witherup *et al.*, 1994); y el prototipo, kalata B1 presenta actividad uterotónica (Gran, 1970; Gran, 1973; Sletten y Gran, 1973; Saether *et al.*, 1995) e inhibidora del crecimiento de insectos del género *Helicoverpa* (Jennings *et al.*, 2001). Se ha especulado que la

función natural de estas sustancias, en la mayoría de los casos relacionada con mecanismos de protección para el organismo productor, bien frente a infecciones por microorganismos u hongos o frente al ataque de insectos (Trabi y Craik, 2002).



**Figura 6-I. Esquema de la organización genética de las proteínas circulares producidas por microorganismos.** En rojo, el gen estructural, en marrón, los genes reguladores, en verde, transportadores tipo ABC implicados en la secreción, en azul oscuro, genes supuestamente implicados en el procesamiento de la proteína, en amarillo, los genes implicados en la inmunidad, en blanco, genes con función desconocida, en azul claro, genes relacionados con la conjugación, en rayas blancas y amarillas, genes transportadores relacionados con la inmunidad. Los promotores se encuentran marcados con flechas verticales y los ARNm con flechas verdes. Los números azules bajo los operones *vir* indican el número de genes de cada uno. (A) AS-48 (B) Acidocina B (C) Butirivibriocina AR10 (D) Uberolisina (E) Circularina (F) Subtilosina A (G) Carnociclina (H) Pilina TrbC (I) Pilina T (adaptado de Maqueda *et al.*, 2008).

Los ciclótidos se han aislado en plantas de las familias *Rubiaceae*, *Violaceae* y *Cucurbitaceae* (Göransson *et al.*, 2004; Craik *et al.*, 2006) y,



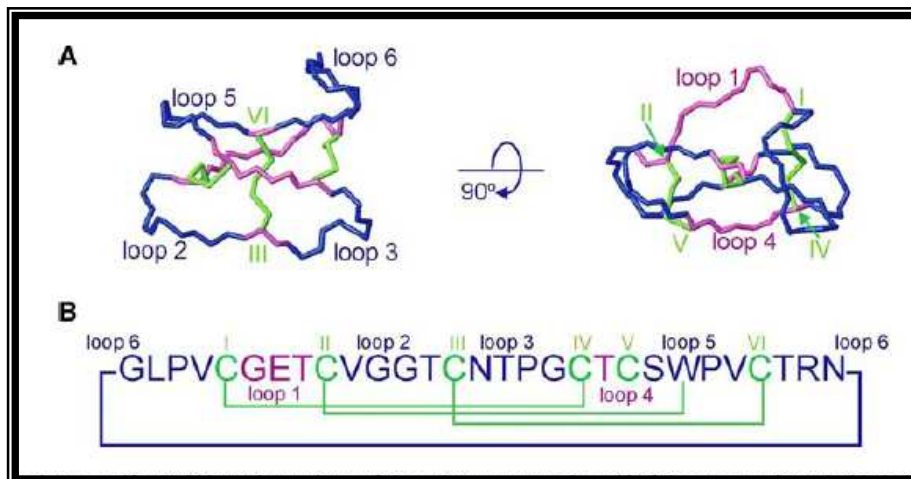
más recientemente, en gramíneas de la familia *Poaceae* también se han encontrado moléculas lineales con gran similitud (Mulvenna *et al.*, 2006b). El anillo proteico de los ciclótidos está compuesto por aproximadamente treinta aminoácidos, de los cuales seis residuos son cisteínas que les permiten formar tres puentes disulfuro. Presentan una estructura muy característica conocida como CCK (*cyclic cystine knot*, que podría traducirse como nudo cíclico de cisteínas) caracterizada por primera vez en Kalata B1 (Saether *et al.*, 1995). En ella, dos de los puentes, junto a los segmentos peptídicos que los conectan (asas 1 y 4) forman un anillo que es atravesado por el tercer puente disulfuro (Figura 7-I). Además del motivo CCK, también es común a los ciclótidos una pequeña lámina  $\beta$  formada por tres cadenas que contiene una horquilla  $\beta$  (en la que se encuentran las cisteínas IV, V y VI) y una cadena  $\beta$  distorsionada. Sorprendentemente, aunque pudieran darse hasta quince tipos distintos de puentes disulfuro, el motivo CCK se encuentra altamente conservado (Rosengren *et al.*, 2003), por lo que probablemente éste sea responsable de la mayor estabilidad a los ciclótidos frente a la degradación térmica, enzimática o química (Daly y Craik, 2000; Colgrave y Craik, 2004).

La existencia de residuos altamente conservados tiene un doble papel estructural y funcional (Craik *et al.*, 2006). La presencia de un glutámico en el asa 1 confiere una mayor estabilidad por la formación de puentes de hidrógeno con dos amidas protonadas en la cadena peptídica del asa 3. La presencia de residuos con grupos hidroxilo contribuye también, con la formación de puentes de hidrógeno, a la estabilización. Los impedimentos estéricos en estas moléculas tan compactas mantienen las cadenas laterales de los residuos hidrófobos orientadas hacia el exterior, creando zonas hidrófobas expuestas, que están implicadas en la interacción con membranas biológicas. Los restos de glicina también están muy conservados, principalmente la adyacente a la cisteína IV del asa 3 y la del asa 6. Por último, existe un residuo de asparragina o aspártico en el asa 6 seguido por una glicina relacionada con el procesamiento de los ciclótidos desde el <sup>pro</sup>peptido (ver el apartado 2.3.2).

A pesar de su pequeño tamaño y las restricciones estéricas derivadas de la presencia del motivo CCK y los abundantes aminoácidos conservados,

los ciclótidos muestran una gran diversidad. Se clasifican en tres subfamilias, Möbius, brazaletes o inhibidores de tripsina, atendiendo a la similitud de secuencias, tamaño de las asas, estructura y mecanismo de acción (Craik *et al.*, 2004) (Figura 8-I).

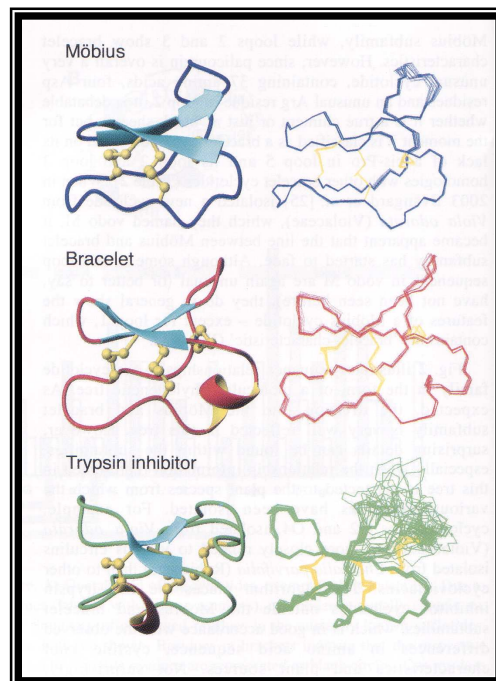
La subfamilia Möbius se caracteriza por un enlace peptídico en *cis* previo a un resto conservado de prolina en el asa 5, provocando un giro en la cadena similar al de la cinta de Möbius. Son moléculas de 29 ó 30 aminoácidos, la mayoría hidrófobos, y muy conservados. Sirven como ejemplos Kalata B1 (Rosengren *et al.*, 2003) y Kalata B2 (Jennings *et al.*, 2005).



**Figura 7-I. Estructura de los ciclótidos.** (A) Representación tridimensional de Kalata B1 con los puentes disulfuro marcados en verde y las cisteínas implicadas en números romanos. (B) Secuencia primaria de Kalata B1 (tomado de Czemazar y Craik, 2006).

En la subfamilia tipo brazaletes no se encuentra el enlace peptídico en *cis* propio de la prolina de la familia Möbius. Contiene entre 28 y 31 residuos y las asas de las moléculas no están conservadas, siendo tan sólo diez aminoácidos comunes a todos ellos: las cisteínas del motivo CCK, la glicina en la tercera asa, y una prolina y dos residuos hidrófobos en la primera asa. Son ejemplos de esta subfamilia la Circulina A (Daly *et al.*, 1999a) y la Cicloviolacina O1 (Rosengren *et al.*, 2003). La organización genética y la circularización de estas moléculas se tratarán en el apartado 2.3.2 de esta Memoria.

La subfamilia de inhibidores de tripsina consta de menos miembros que las anteriores, ya que sólo McoTI-I y McoTI-II son circulares, aunque la forma lineal McoTI-III coexiste con ellos en la planta productora *Momordica cochinchinensis* (Hernández *et al.*, 2000). La primera asa suele contener una secuencia Pro(Lys/Arg)Ile seguida por un residuo hidrófobo, mientras que la segunda contiene dos o tres residuos de Asp combinados con dos aminoácidos básicos. El asa 4 sólo contiene un aminoácido hidrófobo (Ile).



**Figura 8-I. Estructuras de Kalata B1, Cicloviolacina O1 y MCoTI-II, representantes de las familias Möbius, brazaletes e inhibidores de tripsina, respectivamente.** Los puentes disulfuro se indican en amarillo. Derecha, superposición de las 20 mejores estructuras determinadas por RMN (tomado de Craik *et al.*, 2004).

Existe un inhibidor de tripsina circular de 14 residuos, SFTI-1, distinto a los ciclótidos, que ha sido aislado de semillas de girasoles, y comparte grandes homologías con la familia de pequeños inhibidores de serín-proteasas de semillas de legumbres y conocidos como inhibidores Bowman-Birk (Luckett *et al.*, 1999). A diferencia de los ciclótidos, SFTI-1 posee dos cadenas  $\beta$  antiparalelas estabilizadas por un único puente disulfuro. La circularización parece estar relacionada más con la

estabilización y el incremento de la vida media de la molécula que con la determinación de su estructura tridimensional (Felizmenio-Quimio *et al.*, 2001; Heitz *et al.*, 2001).

### 2.1.3. Proteínas circulares de mamíferos: $\theta$ -defensinas.

Las defensinas son péptidos antimicrobianos producidos por plantas, insectos, aves y mamíferos, incluido el hombre (Hoffmann *et al.*, 1999; Lehrer y Ganz, 2002; Brogden *et al.*, 2003; Ganz, 2003). El origen tan amplio de estas sustancias puede tener su explicación en su función mediadora de la inmunidad natural, protegiendo al huésped frente a los microorganismos a los que está expuesto. Incluso ha sido demostrado que, en los vertebrados, las defensinas pueden tener un papel importante en la regulación de las respuestas de la inmunidad adquirida (Yang *et al.*, 2002).

Las primeras dos familias de defensinas, las  $\alpha$ - y  $\beta$ -defensinas, se encuentran ampliamente distribuidas en neutrófilos, macrófagos, células NK, células Paneth intestinales, tejidos epiteliales, piel, superficies mucosas del tracto respiratorio y urogenital, así como en fluidos de muchas especies de vertebrados. Se trata de péptidos catiónicos lineales de bajo peso molecular (29-42 aminoácidos) en los que se encuentran seis residuos conservados de cisteína que, mediante la formación de puentes disulfuro, estabilizan las moléculas, y en general todas ellas muestran un plegamiento muy similar. Más recientemente, ha sido descrita una nueva familia, las  $\theta$ -defensinas (Tang *et al.*, 1999) que presentan la particularidad de ser, además, moléculas circulares sintetizadas en una nueva ruta a partir de precursores similares a las  $\alpha$ -defensinas (Selsted, 2004).

La familia de las  $\theta$ -defensinas está representada por la defensina RTD-1 y sus homólogas RTD-2 y RTD-3 (Tang *et al.*, 1999), de las que difiere por el porcentaje de carga positiva neta. RTD-1 es un péptido de 18 aminoácidos (Pm 2082,7 Da), entre los que se incluyen 6 Cys y 5 Arg y cuyos extremos se encuentran unidos mediante enlace peptídico (Gly<sup>1</sup>-Arg<sup>18</sup>). A diferencia de las otras dos familias, las  $\theta$ -defensinas sólo han sido descritas en neutrófilos y monocitos de primates (Tang *et al.*, 1999).

La estructura de RTD-1 consiste en dos cadenas  $\beta$  conectadas mediante estrechas regiones de giro (Trabi *et al.*, 2001). Al igual que en los ciclótidos, la molécula se encuentra estabilizada por la existencia de tres puentes disulfuro pero, a diferencia de éstos, aquí aparecen organizados a modo de escalera. Sin embargo, a pesar de la presencia de puentes disulfuro y de la estructura circular, la molécula es relativamente flexible. La forma circular nativa de RTD-1 tiene una actividad antimicrobiana tres veces superior a la de los análogos lineales sintéticos (Tang *et al.*, 1999). RTD-1 presenta actividad microbicida frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos, y no se ve afectada por la presencia de NaCl a concentraciones fisiológicas, como ocurre con las  $\alpha$ - y  $\beta$ -defensinas o con las formas circulares linearizadas. La diferencia de actividad entre los diferentes tipos de defensinas no puede ser, por tanto, atribuida a los cambios estructurales producidos durante la circularización, sino más bien está relacionada con la estabilidad de la molécula *in vivo* (Trabi *et al.*, 2001). La resistencia a las exoproteasas podría ser particularmente ventajosa durante el proceso de inflamación en el que estos péptidos actúan. RTD-1 también posee actividad anti-retroviral (Cole *et al.*, 2002). Ha sido descrito que la médula ósea humana expresa un pseudogen que aparentemente codifica una proteína similar a la defensina RTD-1 con actividad antimicrobiana denominado retrociclina (Cole *et al.*, 2002).

### 2.2. Síntesis de péptidos circulares.

La circularización de proteínas ha adquirido importancia debido a que confiere características biotecnológicas deseables a péptidos con posibles aplicaciones industriales o sanitarias, principalmente la mayor resistencia a exoproteasas (Zhou, 2003). Se han desarrollado distintas estrategias para conseguir, *in vitro*, la circularización de proteínas y actualmente se continúan buscando las ciclasas responsables de la producción de proteínas circulares naturales. Es importante destacar que, en las diferentes familias de proteínas circulares investigadas, no se han encontrado homologías entre los aminoácidos implicados en la formación del enlace peptídico cabeza-cola, ni tampoco entre los residuos adyacentes.

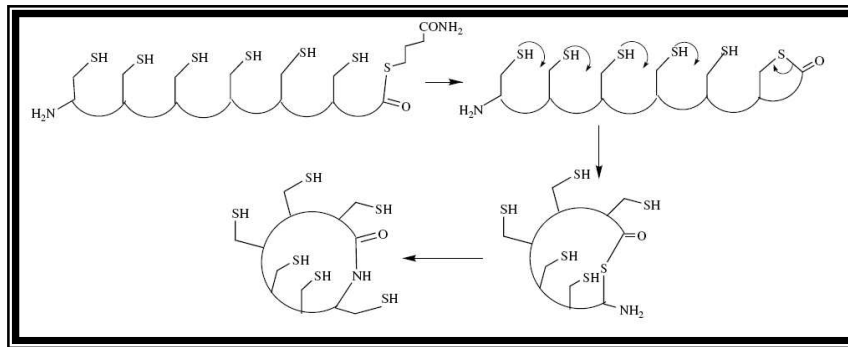
La disparidad de estructuras e incluso de funciones de estas proteínas, hace poco probable la existencia de un mecanismo de circularización universal (Craik *et al.*, 2003). Hasta ahora, tampoco se han encontrado formas peptídicas en el estadio intermedio de maduración, lo que sugiere que el proceso de circularización sucede de una manera muy rápida y eficiente tras la eliminación del péptido señal (Trabi y Craik, 2002).

### 2.2.1. Vías de síntesis de péptidos circulares *in vitro*.

De forma paralela al descubrimiento de la proteínas circulares naturales, se ha producido un importante avance en el campo de la síntesis química de proteínas circulares, debido a que los ingenieros químicos, aunando esfuerzos con los biólogos moleculares, han diseñado métodos de circularización de proteínas lineales cuyos extremos se encuentran razonablemente próximos en su estructura nativa (Scott *et al.*, 2001; Karlea y Ranganathan, 2003). Además, también se ha logrado conferir una mayor estabilidad a los péptidos sintetizados con el uso de D-aminoácidos, N-alquilaciones o la inclusión de sustituciones en las cadenas laterales (Davies, 2003).

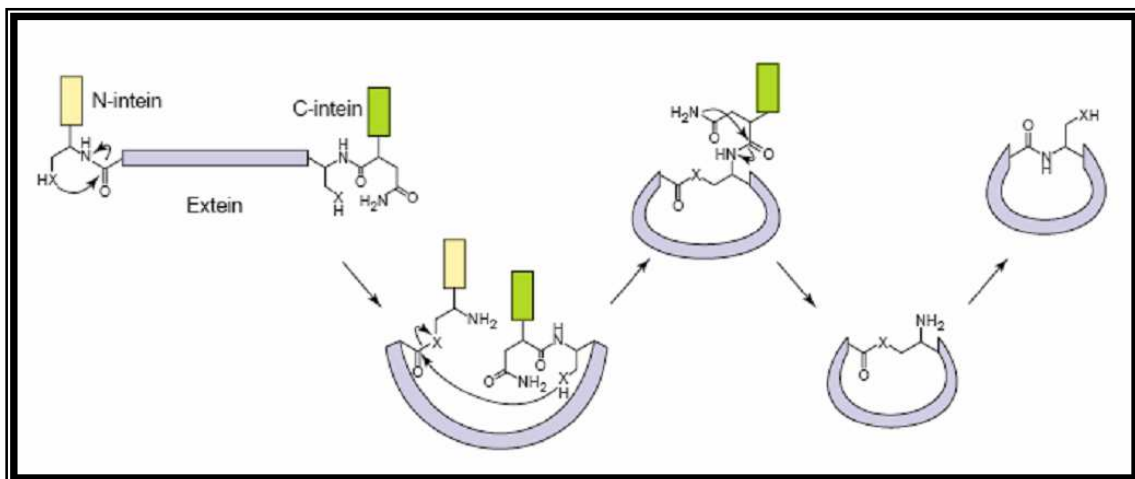
A continuación se describen los principales métodos de circularización por formación de enlace peptídico cabeza-cola, sin tener en cuenta la formación de puentes disulfuro adicionales:

- o La ligación química nativa mediante síntesis en fase sólida (Dawson *et al.*, 1994; Tam y Lu, 1998) en la cual hay que diseñar el péptido precursor con un residuo de Cys en el extremo amino, y con un motivo  $\alpha$ -tioéster en el extremo carboxilo y una Cys intermedia. Los grupos reaccionan para formar una tiolactona intermedia que es seguida por un intercambio tiol-tiolactona que más tarde sufre una isomerización y, de forma espontánea, se origina un enlace peptídico entre ambos extremos sin que se detecte racemización. Otros métodos en fase sólida se fundamentan en el uso de otros motivos en el extremo carboxilo, como aril hidrazidas (Rosenbaum y Waldmann, 2001), sulfonamidas (Yang y Morriello, 1999) o, más recientemente, catecoles (Bourne *et al.*, 2001).



**Figura 9-I. Reacción de circularización mediante síntesis en fase sólida por formación de tiolactona** (tomado de Davies, 2003).

o Métodos basados en las inteínas (Perler y Adan, 2000; Williams *et al.*, 2002; David *et al.*, 2004; Saleh y Perler 2006). En ellos se incluye una secuencia peptídica entre unos dominios proteicos reactivos llamados inteínas, y la circularización ocurre mediante la unión autocatalítica de ambos dominios Chen *et al.*, 2007. La producción de la proteína circular madura implica la eliminación de los dominios auxiliares que flanquean el precursor lineal de la proteína (Chong *et al.*, 1997).



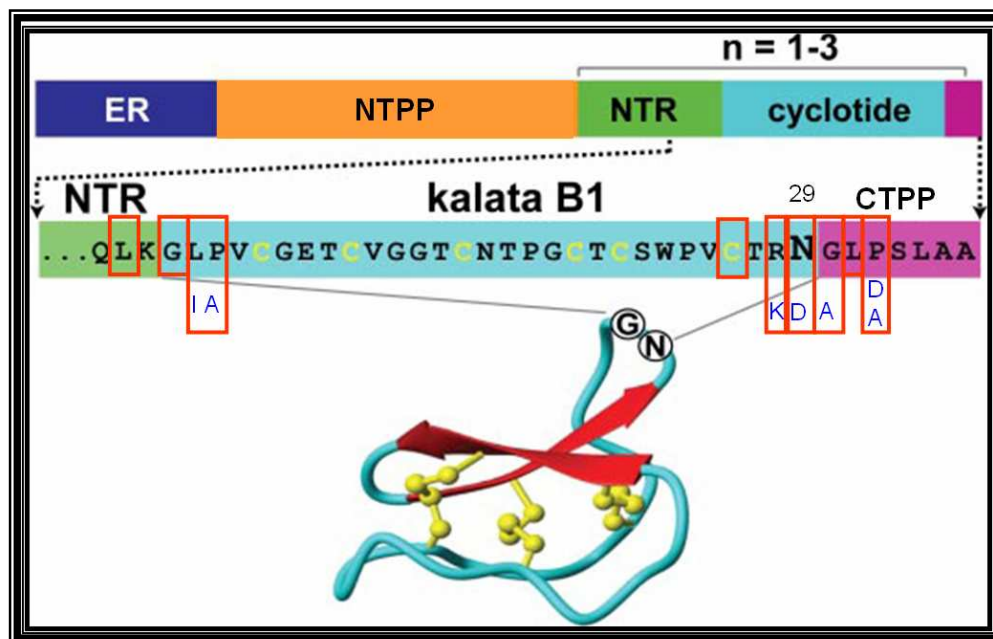
**Figura 10-I. Reacción de circularización mediada por inteínas** (adaptado de Trabi y Craik, 2002).

o En los métodos en solución (Albericio *et al.*, 2001) la circularización se convierte en algo más complejo puesto que requiere la protección de grupos reactivos de las cadenas de los aminoácidos y la reacción tiene lugar de forma lenta a muy baja concentración de péptido. Normalmente, suele ser ventajosa la activación del grupo carboxilo.

Presenta la desventaja de que puede producirse la racemización en el extremo carboxilo, lo que limita la presencia en él de ciertos aminoácidos.

o También se han aplicado con éxito otros métodos de circularización, que incluyen el uso de condiciones oxidativas para la formación de puentes disulfuro en precursores lineales, de forma que se asegure la proximidad entre los extremos y se permita así su circularización (Daly *et al.*, 1999b).

Otros estudios se han centrado en aumentar la estabilidad de la proteína lineal utilizando un esqueleto circular, por ejemplo, para mejorar la estabilidad termodinámica de los enzimas o la estabilidad *in vivo* de proteínas de uso terapéutico. Este campo está todavía en sus comienzos. Sin embargo, gracias a las nuevas tecnologías para la síntesis de proteínas, probablemente en breve se puedan obtener análogos de proteínas circulares naturales del tipo de los ciclótidos, con interesantes aplicaciones en el diseño de nuevos medicamentos (Craik, 2001; Trabi y Craik, 2002).



**Figura 11-I. Esquema de la organización de un ciclótido.** ER: secuencia señal para el retículo endoplasmático, NTPP: propéptido N-terminal, NTR: región N-terminal, secuencia del ciclótido referida en este caso a kalata B1, CTPP: propéptido C-terminal. Los recuadros rojos marcan los residuos más conservados en la molécula que son necesarios para la circularización. En azul se muestran otros aminoácidos encontrados en los ciclótidos con menos frecuencia en esa posición (adaptado de Saska *et al.*, 2007).



### 2.2.2. Obtención de péptidos circulares de síntesis ribosómica y no ribosómica *in vivo*.

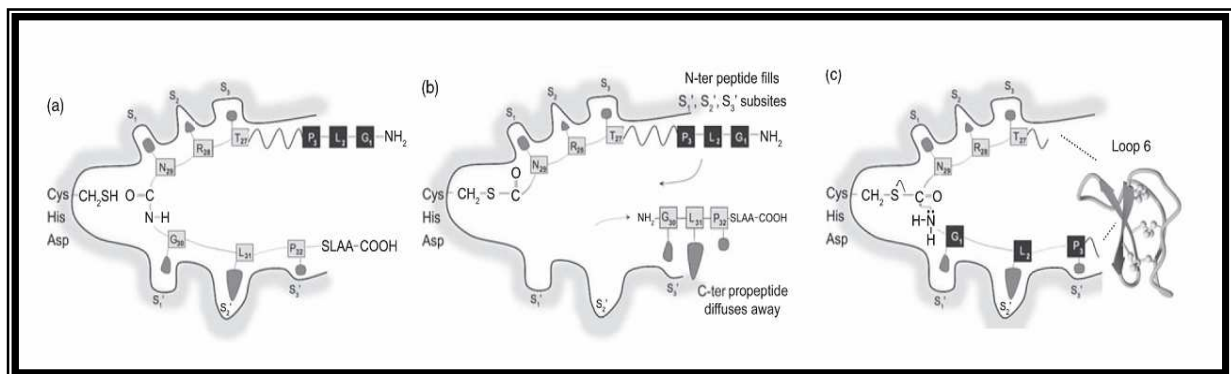
Los ciclótidos se encuentran codificados por agrupaciones multigénicas que producen precursores con uno a tres dominios de ciclótidos (Dutton *et al.*, 2004; Jennings *et al.*, 2001; Mulvenna *et al.*, 2005). La estructura mínima del precursor (Figura 11-I) consta de un péptido señal que dirige la proteína formada hacia el retículo endoplasmático (ER), un <sup>pro</sup>péptido N-terminal (NTPP) y un <sup>pro</sup>péptido C-terminal (CTPP) de naturaleza hidrófoba de tres a siete residuos. Cada dominio de ciclótido está precedido por una repetición en el extremo N (Ntr) de aproximadamente 22 aminoácidos que está conservada en la misma especie pero varía entre especies distintas (Fig. 11-I).

La escisión de los <sup>pro</sup>péptidos de los dominios de ciclótidos y la circularización ocurren, probablemente, tras el plegamiento y la oxidación de las cisteínas en puentes disulfuro (Gruber *et al.*, 2007). Para la circularización resulta esencial la presencia del dominio C-terminal y de un resto conservado principalmente de asparragina o aspártico en un menor número de casos en el sitio de procesamiento del péptido C-terminal que parece señalar como enzima responsable de la circularización una asparragil endopeptidasa (Saska *et al.*, 2007; Gillon *et al.*, 2008). Como se muestra en la Figura 11-I, resultan de gran importancia en el procesamiento otros residuos altamente conservados en la mayoría de ciclótidos estudiados (Jennings *et al.*, 2001) como son una cisteína y leucina en la posición 26 y 31 respectivamente (tomando como ejemplo la numeración de kalata B1), los tres primeros residuos del extremo C-terminal (primero un aminoácido de pequeño tamaño como glicina, serina o alanina, seguido por una leucina o isoleucina muy conservadas, y una prolina en la tercera posición). Gillon *et al.*, (2008) realizaron mutagénesis dirigida en kalata B1 y ensayaron la producción de los mutantes y la molécula nativa en distintas especies de plantas no productoras naturales de ciclótidos. Pudieron observar que en la planta productora de kalata B1, *Oldenlandia affinis*, no se detectaba ningún intermediario lineal del ciclótido debido a una gran eficacia de la maquinaria biosintética, mientras que la proteína madura estaba en baja proporción en las plantas que no

producían ciclótidos de forma natural (*A. thaliana* y *N. tabacum*). Esto indicaba, que el enzima responsable de la circularización de ciclótidos no es exclusivo del organismo productor. Además, todas las proteínas lineales tienen la glicina en la posición 1 o carecen de ella pero no carecen de ningún otro resto del extremo amino, mientras que en el extremo carboxilo el péptido lineal termina en asparragina o puede contener residuos adicionales del CTPP, lo que indica que se procesa antes el extremo N que el C. Por tanto, la maduración del ciclótido requiere la escisión de la región ER, NTPP y todo o parte de la región Ntr, liberando la región del ciclótido y el CTPP (Figura 12-I). Posteriormente, una proteasa con especificidad por la asparragina 29 cortaría la región CTPP y uniría los extremos amino y carboxilo sin necesidad de pasar por un intermediario lineal. En el caso de plantas transgénicas infectadas con el gen de kalata B1, las regiones ER y NTPP se eliminan igualmente en un primer paso y en una segunda etapa se elimina de forma escalonada los aminoácidos del extremo C por una exoproteasa. Todo ello conlleva la acumulación de formas lineales con el dominio ciclótido y una cadena de longitud variable del CTPP, sin llegar a degradar más allá de la asparragina 29, probablemente debido a impedimentos estéricos derivados de la presencia del motivo CCK. El ciclótido lineal en este caso ya no puede ser circularizado y se acumula constituyendo el producto mayoritario. Para ver la implicación del residuo Asn<sup>29</sup> en la circularización este estudio realizó dos mutantes puntuales, uno conservativo (Asn<sup>29</sup>Asp) y otro no conservativo (Asn<sup>29</sup>Ala). En ambos casos, la producción de kalata B1 maduro no fue posible, demostrando la importancia de este residuo en la circularización. De forma análoga a como sucede en la maduración de la concaavalina A (Bowles *et al.*, 1986; Takeda *et al.*, 1994; Sheldon *et al.*, 1996), la rotura del enlace peptídico tras el residuo Asp y la formación del nuevo enlace peptídico se produciría gracias a la proximidad en el centro activo de la proteasa de los extremos amino y carboxilo. El enzima reconoce de forma específica la Asn, y con menor eficiencia Asp, y el tripéptido posterior Gly-Leu-Pro, cortaría la región CTPP y la dejaría libre para, en una segunda etapa, unir el tripéptido N-terminal Gly-Leu-Pro y favorecer el ataque nucleofílico de la Gly hacia la Asn para la formación del enlace peptídico cabeza-cola. Este

modelo justifica por qué la ausencia de Gly1 o del tripéptido C-terminal conlleva que no pueda madurar el ciclótido y permanezca como una proteína lineal (Ireland *et al.*, 2006; Saska *et al.*, 2007; Gillon *et al.*, 2008).

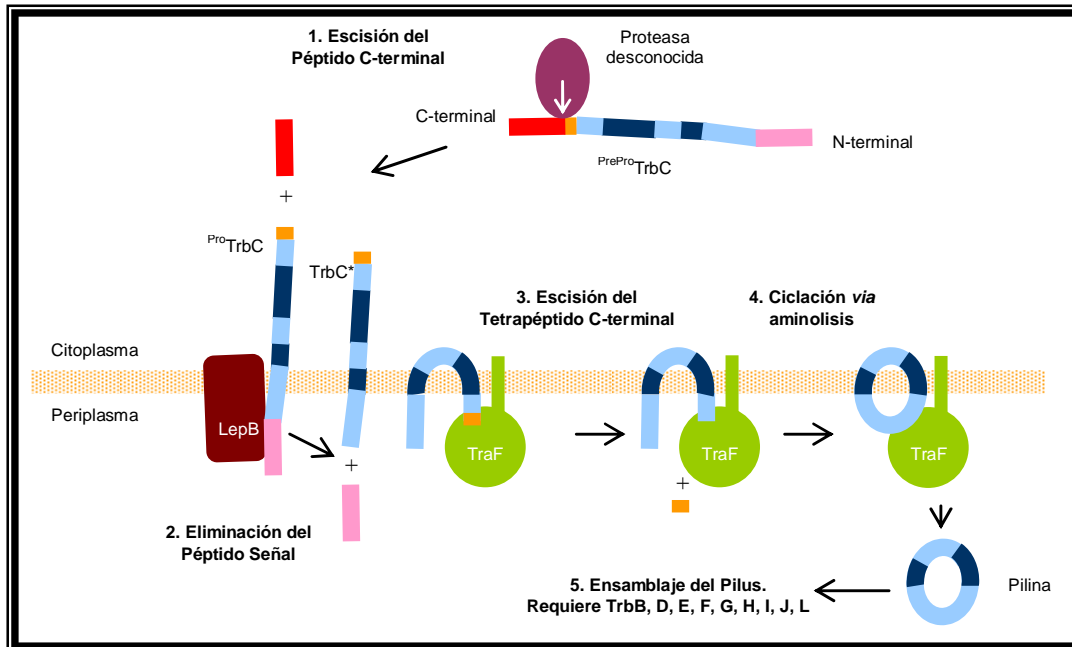
En procariontes el sistema de síntesis ribosómica mejor conocido es el de pilina TrbC. El precursor de la pilina, el producto del gen *trbC* (*pre-proTrbC*), presenta dos secuencias con potencialidad para atravesar la membrana (TM), las cuales podrían favorecer una estrecha proximidad entre los extremos carboxilo y amino de la *pro*proteína dentro de la bicapa lipídica durante el proceso de secreción (Kalkum *et al.*, 2004). Se ha propuesto que los precursores *pre-proTrbC* han de sufrir un complejo proceso de maduración que implica un primer ataque mediado por una proteasa de origen desconocido, la cual retiraría 27 aminoácidos no esenciales del extremo C y después la peptidasa LepB, durante su paso a través de la membrana, eliminaría la secuencia señal (36 residuos del extremo N-terminal), permitiendo así su inserción en la bicapa lipídica (Figura 13-I). Allí, TraF, una maturasa con actividad serín-proteasa, eliminaría un tetrapéptido (AIEA) de la molécula (*TrbC\**) y dirigiría el proceso de circularización, via aminólisis, gracias a la proximidad física existente entre los extremos de la molécula (Figura 13-I).



**Figura 12-I. Mecanismo de circularización propuesto para los ciclótidos.** (a) El péptido con el dominio ciclótido y el CTPP es reconocido por la enzima (zona sombreada) encajando cada residuo en un sitio de unión específico. (b) La enzima rompe el grupo carboxilo de la asparagina liberando el CTPP y creando un complejo intermedio acil-enzima con el dominio ciclótido. (c) El tripéptido N-terminal (GLP) ocupa el sitio que deja libre el CTPP permitiendo un ataque nucleofílico y la formación del enlace peptídico (adaptado de Gillon *et al.*, 2008).

Pese a las similitudes descritas entre las pilinas TrbC (*trbC*) y T (*virB2*) en relación a su función y tamaño (78 y 73 aminoácidos), los

precursores de ambos tipos de pilina no muestran grandes homologías en secuencia, aunque sí mantienen ciertas regiones conservadas en cuanto al alto porcentaje de residuos hidrófobos (68% en TrbC y 70% en pilina T), responsable de su fuerte tendencia a formar agregados.



**Figura 13-I. Maduración de los precursores de la pilina para producir la molécula cíclica.** Las hélices transmembrana predichas se muestran en azul oscuro. Las secuencias parciales se indican por colores: en rojo la secuencia C-terminal no esencial; en rosa, el péptido señal N-terminal; en naranja el tetrapéptido C-terminal, en azul claro la secuencia central (adaptado de Kalkum *et al.*, 2004).

En el caso de la síntesis de pilina T, el extremo C no sólo no es eliminado durante la maduración, sino que tales residuos están implicados en la unión peptídica con el residuo Q<sup>48</sup> durante el cierre del anillo, una vez eliminado el largo péptido señal (47 aminoácidos). También en este caso las predicciones de estructura secundaria indican la existencia de dos posibles hélices transmembrana necesarias para aproximar los extremos y permitir la unión peptídica entre ellos, aunque, sin embargo, los estudios estructurales llevados a cabo sugieren que hay grandes diferencias en la estructura terciaria de las proteínas maduras (Kalkum *et al.*, 2004). Se ha comprobado que el proceso de maduración sólo se produce en las células de *Agrobacterium*, ya que cuando los genes son clonados en *E. coli*, la bacteria no es capaz de dirigir la circularización de la molécula, lo que sugiere la necesidad de enzimas propias de la especie y, por tanto, de origen cromosómico (Lai *et al.*, 2002).

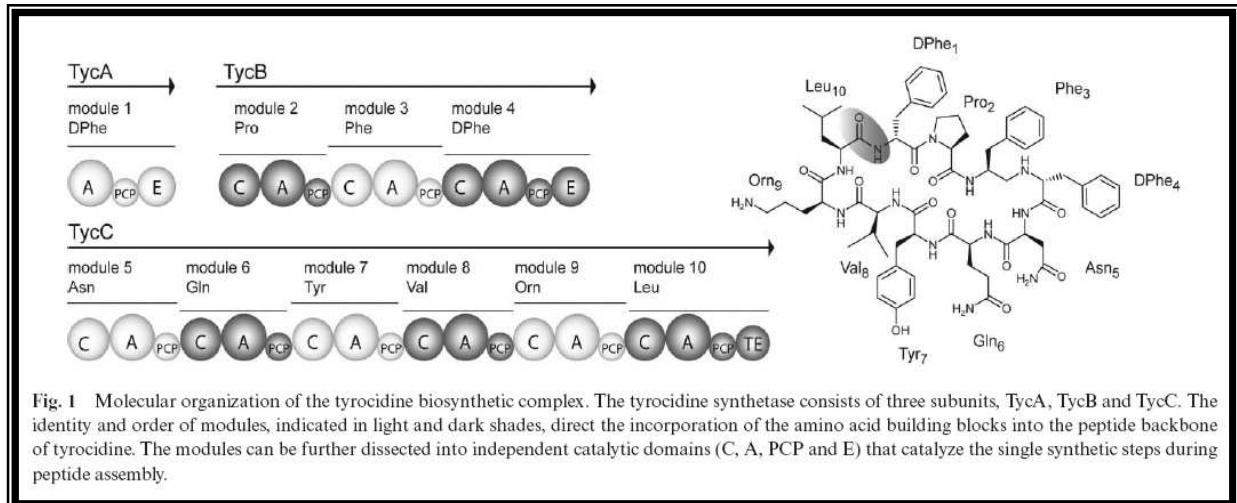


Fig. 1 Molecular organization of the tyrocidine biosynthetic complex. The tyrocidine synthetase consists of three subunits, TycA, TycB and TycC. The identity and order of modules, indicated in light and dark shades, direct the incorporation of the amino acid building blocks into the peptide backbone of tyrocidine. The modules can be further dissected into independent catalytic domains (C, A, PCP and E) that catalyze the single synthetic steps during peptide assembly.

**Figura 14-I. Organización del complejo enzimático responsable de la síntesis de la tirocidina** (adaptado de Kopp y Marahiel, 2007a).

Por último, cabe destacar la importancia de la síntesis no ribosómica de péptidos circulares llevada a cabo por complejos multienzimáticos denominados NRPS (*non-ribosomal peptide synthetase*) los cuales se ordenan de forma determinada para dirigir la incorporación específica de un aminoácido y la formación del enlace peptídico (Kopp y Marahiel 2007a, 2007b). El primer paso en la síntesis es la selección de un aminoácido específico por el dominio de adenilación del complejo NRPS, seguido por la formación de un aminoacil-AMP que será transferido al dominio tiol de una 4'-fosfopanteteína ligada a la proteína peptidil-transportadora. Esta unión tiene como resultado la formación de un enlace tioéster rico en energía que será aprovechado por los dominios de condensación para dirigir el ataque nucleofílico sobre el grupo amino alfa libre para elongar la cadena naciente. Asociado a estas enzimas pueden encontrarse dominios responsables de la epimerización y otras modificaciones posteriores como la unión de distintos radicales. Cuando la cadena peptídica ha alcanzado la longitud necesaria debe romperse la última unión covalente tipo tioéster con la proteína peptidil-transportadora que es realizada por un dominio tioesterasa y se favorece un ataque nucleofílico que finalmente une los extremos amino y carboxilo.

### **3. Proteolisis limitada.**

Existen en la actualidad múltiples técnicas para seguir los cambios estructurales de las proteínas en disolución. Los más típicos son los métodos espectroscópicos, como el dicroísmo circular (DC) que permite aproximarse al tipo de estructura secundaria predominante, si bien las herramientas más potentes para determinar la estructura de proteínas en disolución son las de RMN, cuyo principal inconveniente es el complejo instrumental necesario, y la cristalografía de Rayos-X que, sin embargo, sólo permite realizar ensayos de estructura en proteínas que puedan cristalizar y no en sistemas dinámicos. Ninguna de las técnicas hasta ahora citada está libre de serios inconvenientes, por lo que una técnica bioquímica tan simple como la proteolisis controlada o proteolisis limitada se ha convertido en una herramienta bastante sencilla para obtener información de la estructura y función de las proteínas, y, además, se puede complementar con el resto de las técnicas mencionadas.

Como cualquier reacción enzimática, la proteolisis solo tiene lugar cuando el sustrato proteico puede unirse y adaptarse al centro activo de la proteasa (Schechter y Berger, 1967). Sin embargo, las proteasas no se unen a una secuencia rígida y fija sino que se produce una adaptación inducida para formar el estado de transición de la reacción hidrolítica (Herschlag, 1988), ya que la forma rígida de la proteína no puede actuar como un sustrato apropiado para un enzima. Por tanto, la forma globular nativa de una proteína es mucho más resistente a la proteolisis que su forma desplegada. Sin embargo, como se muestra en la Figura 15-I, en solución existe un equilibrio entre formas nativas globulares y formas desplegadas o parcialmente desplegadas.

Las formas estructuradas son atacadas por los enzimas proteolíticos pero únicamente se produce la ruptura del enlace peptídico a nivel de unos pocos puntos de su secuencia, aquéllos que presentan una desorganización local. Esta correspondencia entre sitios de menor organización estructural y puntos de corte de las proteasas fue demostrada por Fontana *et al.* en 1986 en un estudio sobre la termolisina. Posteriormente, en otros estudios se sometieron a ensayos de proteolisis controlada diversas proteínas de estructura tridimensional conocida (Fontana *et al.*, 1993, 1997a), y quedó de

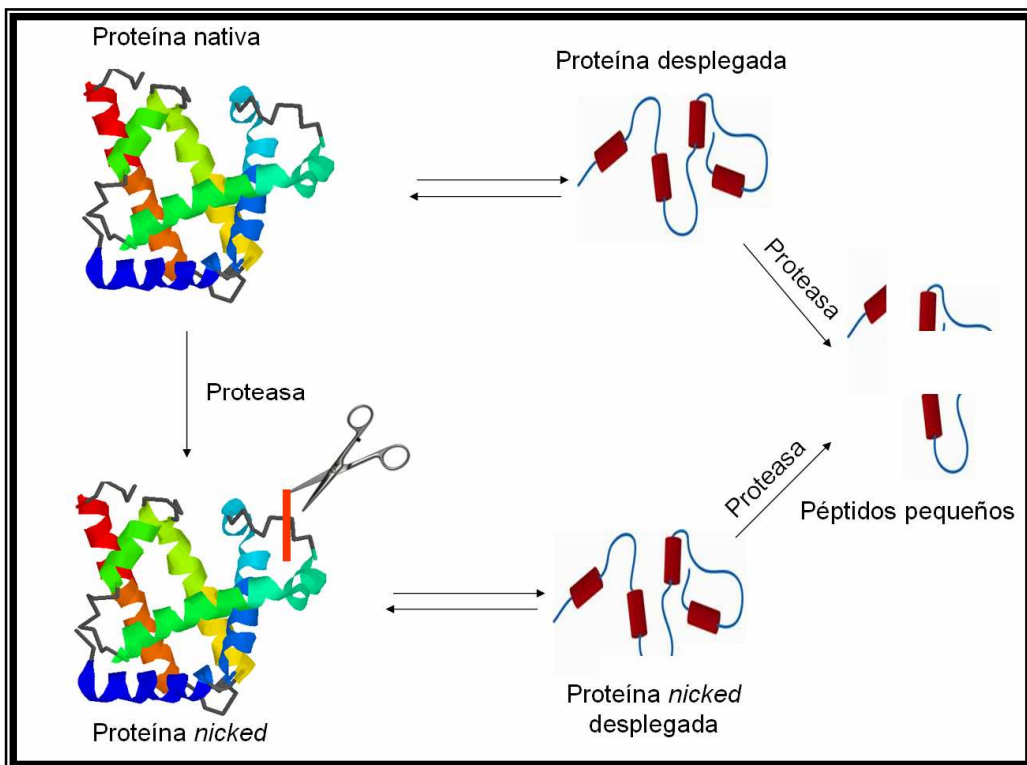
manifiesto que la proteólisis de una proteína globular se produce en los fragmentos entre dos estructuras secundarias regulares y ordenadas, mientras que los elementos estructurados no son sitios primarios de corte. Una posible teoría que explicaría este fenómeno puede estar fundamentada en términos energéticos, ya que la ruptura en un segmento ordenado conduciría a la pérdida de dicho orden y todos los puentes de hidrógeno que estabilizan de forma cooperativa la molécula se perderían, suponiendo un aumento de energía, mientras que la ruptura en un fragmento desorganizado puede ser rápidamente compensada con la formación de puentes de hidrógeno con el agua circundante (Krokoszynska y Otlewski, 1996). Dado que la reacción de proteólisis es determinada principalmente por motivos estéricos y de flexibilidad de la proteína, más que por la especificidad de secuencia de la proteasa (Mihalyi, 1978; Fontana *et al.*, 1986, 1993, 1997a, 1997b, 1999; Price y Jonson, 1990; Hubbard *et al.*, 1994; Hubbard, 1998), resultan de enorme interés las proteasas de baja especificidad de sustrato, como la subtilisina, termolisina, proteinasa K o pepsina, que presentan preferencia por aminoácidos hidrófobos o neutros aunque pueden cortar inespecíficamente en otros residuos (Bond, 1990).

Para poder usar esta técnica con el fin de obtener una molécula cortada en un solo enlace peptídico (forma abierta o *nicked*), en cada caso se debe ajustarse en función de la secuencia, la estructura secundaria y terciaria y la distribución de aminoácidos cargados, hidrófobos o neutros, una serie de parámetros como la proteasa, la relación enzima/sustrato, la temperatura y el tiempo de incubación (Fontana *et al.*, 1999). Puesto que con frecuencia las formas *nicked* son mucho más flexibles que las nativas y representan un estado intermedio y transitorio en la digestión enzimática, para conseguir aislarlas antes de su total degradación pueden emplearse otros agentes que afecten a la estructura tridimensional tales como SDS o TFE.

Las aplicaciones de la proteólisis controlada son variadas:

1. Identificación de sitios flexibles de una proteína: se ha comprobado en proteínas de estructura conocida que las  $\alpha$ -hélices son mucho más resistentes a la digestión enzimática que los fragmentos que las conectan (Fontana *et al.*, 1993, 1997a, 1997b, 1999; Polverino de

Laureto *et al.*, 1995; Hubbard, 1998). Un ejemplo claro de este fenómeno es la proteólisis de la mioglobina, en la que la forma apo es hidrolizada por distintas proteasas en una misma región correspondiente a la hélice F mientras que la forma holo es resistente (Fontana *et al.*, 1997a; Picotti *et al.*, 2004). Esto está en consonancia con los resultados de RMN (Eliezer y Wright, 1996; Eliezer *et al.*, 1998) que muestran a la hélice F como un elemento muy flexible en la apomioglobina.



**Figura 15-I. Esquema de la reacción de proteólisis** (adaptado de Fontana *et al.*, 2004).

2. Investigación de estados de plegamiento parcial en las proteínas: se conoce la existencia de estadios intermedios entre la forma nativa y la completamente desplegada de una proteína (Dunker y Obradovic, 2001; Dunker *et al.*, 2002), que presentan parte de la estructura secundaria pero sin la estructura terciaria nativa (Ptitsyn, 1987). Estas formas intermedias pueden generarse en el laboratorio en condiciones ácidas débiles, en presencia de agentes desnaturizantes, por eliminación de ligandos unidos a la propia proteína (iones metálicos o grupos prostéticos), o por producción de mutantes (Ptitsyn, 1995; Arai y Kuwajima, 2000). Dada su flexibilidad y heterogeneidad, son estados estructuralmente difíciles de



elucidar por RMN o rayos-X, por lo que la proteólisis controlada, dada su selectividad, puede ser una herramienta útil (Fontana *et al.*, 1997a).

3. Monitorización de la agregación proteica: la formación de fibras amiloides está centrando recientemente la atención de muchos investigadores por su relación con ciertas enfermedades como el Alzheimer, la diabetes tipo 2, Parkinson, Huntington, o enfermedades priónicas (Sacchettini y Kelly, 2002; Dobson, 2003; Selkoe, 2003; Stefani y Dobson, 2003). Se trata de fibras formadas por la autoagregación de proteínas (en ocasiones fragmentos de proteínas mayores) que oligomerizan formando estructuras de gran estabilidad muy resistentes a la digestión enzimática. Resulta crítico en la formación de fibrillas los estados parcialmente desplegados de las proteínas, que dejan expuestas regiones altamente hidrófobas (Fink, 1998; Dobson, 2003). Un buen ejemplo es el de los dominios SH3, implicados en la transducción de señales, que rápidamente forman fibrillas en medio ácido. En este caso, las primeras etapas son más susceptibles a la proteólisis, indicando una estructura menos compacta, mientras que al aumentar el tiempo llegan a hacerse resistentes (Polverino de Laureto *et al.*, 2003).

4. Identificación y preparación de dominios proteicos: existen proteínas globulares compuestas de subestructuras, denominadas dominios, con estructura tridimensional propia (Campbell y Downing, 1994). Aunque no existe una definición de dominio en la literatura, puede decirse que es una unidad compacta, independiente y relativamente bien separada del resto de la molécula (Fontana, 2004). En este caso, la proteólisis limitada se presenta como la técnica más apropiada para aislar estos dominios puesto que el enzima preferentemente hidroliza a nivel de las regiones entre ellos (Peng y Wu, 2000). Existen en la literatura numerosos ejemplos de enzimas en las que se han separado dominios, dando lugar a fragmentos con una de las diversas actividades que desempeñaba la proteína inicial, como la digestión de la ADN polimerasa que produce un fragmento que cataliza la acción exonucleasa 3'-5', y otro de menor tamaño con actividad 5'-3' (Klenow y Hennigsen, 1970).

5. Preparación de fragmentos proteicos complementarios: la proteólisis de una proteína lineal cortada en un sólo punto genera dos

fragmentos que pueden fácilmente separarse para luego estudiar el plegamiento de los dos fragmentos cuando vuelven a estar en contacto y generan una estructura similar a la nativa, pero con la secuencia interrumpida en un punto y unidos por enlaces no covalentes (Taniuchi *et al.*, 1986). Se pueden citar como ejemplos los experimentos realizados con la hormona del crecimiento humana (Spolaore *et al.*, 2004) y el citocromo c de caballo (Spolaore *et al.*, 2001).

#### **4. Expresión heteróloga de bacteriocinas.**

La expresión heteróloga de bacteriocinas, y en general de proteínas, es una estrategia seguida en investigación desde hace años, encaminada a cumplir distintos objetivos (Makrides, 1996), como la investigación básica de las funciones de las proteínas recombinantes, o facilitar el control transcripcional y/o traduccional de la expresión de los genes recombinantes, lograr niveles de producción mayores a los existentes en las estirpes salvajes e incluso construir cepas multibacteriocinogénicas con propiedades antimicrobianas y cepas de interés biotecnológico. Para lograr tales objetivos, se suele buscar como sistema de expresión un organismo simple, de fácil manipulación y que alcance una elevada densidad de cultivo, que sea barato, con un metabolismo y genética conocidos y en el que se disponga de herramientas biotecnológicas. Es deseable, además, que no sea patógeno y que posea los mecanismos precisos para las modificaciones postraduccionales de la proteína recombinante (glicosilaciones, oxidación de grupos tiólicos, modificación de aminoácidos,...) si ello fuera necesario. Tradicionalmente, ha sido *E. coli* el organismo procariota de elección para la clonación y expresión heteróloga de genes, gracias a la exhaustiva caracterización genética que hay en la literatura científica. Su metabolismo se conoce con bastante profundidad y hay disponibles un gran rango de herramientas genéticas para su manipulación (Billman-Jacobe, 1996). A pesar de todas las ventajas que puede ofrecer *E. coli* para la manipulación genética y la expresión, resulta claro que un único organismo no es apto para todas las aplicaciones. Así ha quedado de manifiesto con diversos genes que no son suficientemente o en absoluto expresados en ella, bien sea por las diferencias en el uso de

codones (*E. coli* tiene un G+C de aproximadamente el 50%), por la toxicidad que pueda suponer la expresión (usualmente sobreexpresión) deseada de una proteína con actividad biológica, la inestabilidad o falta de eficiencia en la traducción del ARNm. Además, al tratarse de un organismo Gram-negativo, la membrana externa dificulta la secreción de proteínas salvo que se coloquen las secuencias aminoácidas necesarias para facilitar el transporte, quedando en caso contrario las proteínas en el espacio periplásmico y en el caso de que no sean secretadas, quedarían en el interior celular, donde o bien son degradadas por proteasas intracelulares o bien precipitan en forma de cuerpos de inclusión. La formación de cuerpos de inclusión, según algunos autores, puede ser una ventaja en la obtención de proteínas recombinantes puesto que, si se pueden solubilizar y replegar adecuadamente, permiten la purificación en pocos pasos y con un alto grado de homogeneidad.

La consideración de *E. coli* como potencial patógeno ha fomentado la búsqueda de alternativas para la expresión heteróloga (Tabla 4-I). Algunas especies de BAL se han mostrado como herramientas eficaces para este fin ya que se han desarrollado las técnicas necesarias para su manipulación genética (Venema *et al.*, 1999; Konings *et al.*, 2000), su metabolismo también se conoce con bastante profundidad y presentan como ventaja el que muchas disfrutan del estatus QPS (**qualified presumption of safety**) o GRAS (**generally recognised as safe**) (Aguirre y Collins, 1993; Gasser, 1994; Holzapfel *et al.*, 1995).

Hoy se dispone de un mayor número de técnicas que han permitido el uso de cepas eucariotas para la expresión de proteínas recombinantes. Destaca el uso de hongos y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris* o *Hansenula polymorpha* con este propósito. Se dispone, además, de otros sistemas eucariotas para la expresión heteróloga de proteínas, como cultivos celulares de mamífero (líneas CHO, BHK, NSO, etc) y animales transgénicos, células de insecto infectadas con baculovirus, y plantas (principalmente la planta del tabaco *Nicotiana tabacum*, el maíz *Zea mays*, el arroz *Oryza sativa*, la soja *Glycine max*, el tomate *Lycopersicon esculentum*, la patata *Solanum tuberosum*, o la banana *Musa paradisiaca*)

transformadas con el plásmido T<sub>i</sub> de *Agrobacterium tumefaciens* empleado como vector binario o por bombardeo con el material genético adherido a partículas de oro.

Por último, una de las técnicas más costosas es la producción de proteínas en sistemas libres de células, que constan de extractos celulares libres de ADN y ARN. Existen sistemas comerciales de este tipo a partir de extractos de *E. coli*, de reticulocito de conejo, y de germen de trigo. Para solventar el problema del agotamiento de componentes esenciales para la síntesis de proteínas en el extracto, se dispone también de sistemas de producción continua en la que se aportan los elementos que con más rapidez se gastan mediante difusión pasiva o intercambio forzado. Este sistema simplifica, además, la incorporación de aminoácidos no naturales.

<b>Sistema</b>	<b>Coste medio</b>	<b>Tiempo de desarrollo</b>	<b>Capacidad de escalado</b>	<b>Calidad de producto</b>	<b>Glicosilación</b>	<b>Riesgo de contaminación</b>	<b>Coste de mantenimiento</b>
Bacteria	Bajo	Corto	Alta	Baja	No	Endotoxina	Moderado
Levadura	Moderado	Medio	Alta	Media	Incorrecta	Bajo	Moderado
Células de insecto	Moderado	Medio	Alta	Alta	Diferencias	Bajo	Moderado
Células de mamífero	Alto	Largo	Muy baja	Muy alta	Correcta	Virus, priones ADN oncogénico	Alto
Animal transgénico	Alto	Muy largo	Baja	Muy alta	Correcta	Virus, priones y ADN oncogénico	Alto
Células de planta	Moderado	Medio	Media	Alta	Diferencias menores	Bajo	Moderado
Planta transgénica	Muy bajo	Largo	Muy alta	Alta	Diferencias menores	Bajo	Muy bajo
Extractos libres de células	Alto	Corto	Baja	Baja	No	Bajo	Alto

**Tabla 4-I. Características de los sistemas más comunes de expresión heteróloga de proteínas** (adaptada de Ma *et al.*, 2003).

En el caso de la producción heteróloga de bacteriocinas, las estrategias de producción descritas hasta el momento se pueden dividir en dos modalidades:

1. Las que utilizan la maquinaria biosintética original, lo que exige la clonación de toda la región genética original responsable de la bacteriocina en un vector de expresión apropiado. Es el más utilizado y el único potencialmente efectivo en el caso de proteínas que necesiten modificaciones postraduccionales complejas, como por ejemplo los lantibióticos o las proteínas circulares.

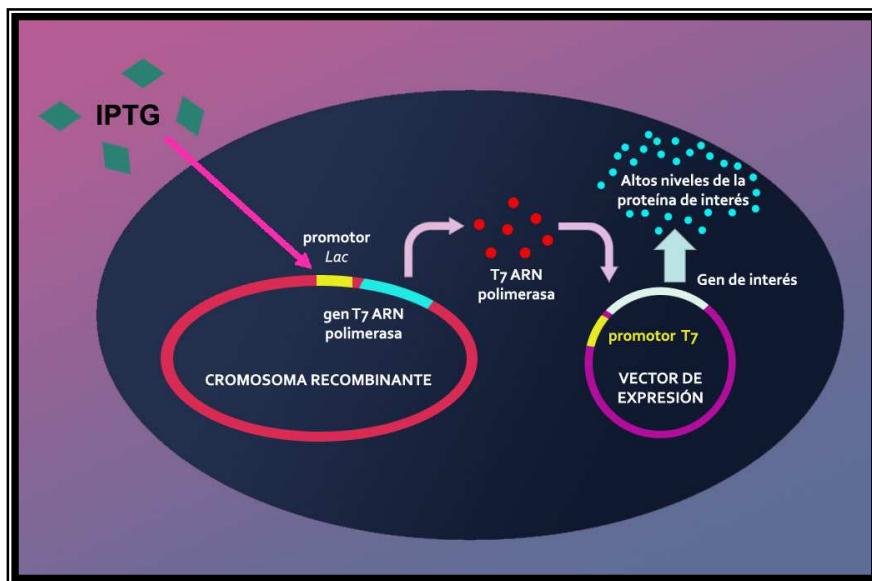
2. Las que aprovechan los sistemas de secreción existentes en la cepa hospedadora. En este caso sólo es necesario clonar el gen estructural en fase con un péptido líder para permitir la secreción, si es lo que se desea. En el caso de proteínas con actividad biológica que pueda perjudicar al organismo productor, también sería necesario clonar los determinantes de inmunidad.

Sin embargo, en la actualidad se han desarrollado diferentes sistemas de inducción para la expresión heteróloga de proteínas.

### 4.1 Sistema de expresión mediante inducción con IPTG.

El sistema de expresión del fago T7 es uno de los más empleados. En él, el gen de interés es clonado bajo el control del promotor T7, que es fuerte y no reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*, lo que permite que no haya expresión basal hasta que esté presente la ARN polimerasa del fago T7 (Moffatt y Studier, 1986; Rosenberg *et al.*, 1987; Studier *et al.*, 1990) y aumenta la estabilidad del plásmido en el que está clonado. La ARN polimerasa del fago T7 posee además gran especificidad por su promotor, es muy activa y basta la cantidad producida desde una sola copia del gen que la codifica para dirigir la expresión de altos niveles de proteína y reducir significativamente la actividad de la ARN polimerasa de *E. coli* (Chamberlin *et al.*, 1970). La cepa responsable de la expresión contiene una copia de la T7 ARN polimerasa (usualmente el lisógeno DE3 en el que la polimerasa está clonada en el bacteriófago  $\lambda$ ) bajo el control del promotor *lacUV5*, el gen *lacI* y una pequeña porción del gen *lacZ*. En las células que crecen en un medio libre de lactosa, el represor LacI se une al operón de la lactosa y evita la transcripción a partir del promotor *lac*. La adición de glucosa al medio de cultivo contribuye a la represión de la T7

ARN polimerasa por represión catabólica. Para lograr la expresión, el cultivo de células es crecido hasta la mitad de la fase logarítmica y entonces se induce la expresión por adición de IPTG, el cual se une al represor *lac* y evita que sea capaz de inhibir la transcripción de la T7 ARN polimerasa (Figura 16-I). El terminador T7 $\Phi$  clonado tras el gen de interés detiene prácticamente toda la transcripción en ese punto y sólo una pequeña cantidad parece continuar tras él.



**Figura 16-I. Esquema del sistema de expresión basado en la ARN polimerasa del fago T7.**

En las cepas DE3 suele darse una expresión basal de la T7 ARN polimerasa que dificulta la expresión de genes tóxicos por un aumento de la inestabilidad del plásmido. Como alternativa para evitarlo se han desarrollado células con lisozima, capaz de unirse a la ARN polimerasa de T7 e inhibir la transcripción. La inducción con IPTG es capaz de alcanzar un nivel de polimerasa mayor a la capacidad de bloqueo de la lisozima, con lo que el sistema puede lograr igualmente altos niveles de expresión. La producción de lisozima de T7 tiene como ventaja añadida el hecho de que facilita la lisis celular por debilitar el peptidoglicano. Suele estar codificada en pLysS o pLysE, la primera de las cuales logra un nivel más bajo de inhibición de la ARN polimerasa de T7 pero permite una mayor expresión de la proteína recombinante (Studier *et al.*, 1990; Tabor, 1990).

### 4.2. Sistema de expresión mediante inducción con nisina.

El sistema de expresión por inducción con nisina (NICE del inglés *nisin-controlled expression system*) se basa en la regulación de la producción de esta bacteriocina en *L. lactis* (Kuipers *et al.*, 1995; de Ruyter, 1996). La nisina es una bacteriocina de 34 aminoácidos del grupo de los lantibióticos que se sintetiza en forma de <sup>pro</sup>peptido, el cual es cortado y modificado enzimáticamente hasta la forma madura. Su producción depende de la expresión de un grupo de 11 genes: *nisB*, *nisC*, *nisP* y *nisT*, responsables de la modificación, traslocación y procesamiento de la nisina; *nisA* que codifica el precursor; *nisI*, *nisF*, *nisE* y *nisG* responsables de la inmunidad; y *nisR* y *nisK* que codifican un sistema de transducción de señales de dos componentes encargado de la regulación (Kuipers *et al.*, 1995; Kleerebezem *et al.*, 1997a). NisK es una histidín-kinasa de la membrana citoplasmática que actúa como receptor de la molécula de nisina madura, se autofosforila y transfiere el fosfato a NisR, un regulador de respuesta, que, una vez fosforilado, promueve la activación de la transcripción de los promotores P<sub>nisA</sub> y P<sub>nisF</sub> (Kuipers *et al.*, 1993). Para conseguir la inducción, los genes *nisRK* se han clonado en distintas especies de lactococos integrados en el cromosoma o bien se han usado lactococos productores naturales de nisina, modificados o no (Dodd *et al.*, 1996a, 1996b), y el gen de la proteína recombinante de interés ha sido clonado en un vector o en el cromosoma bajo el promotor P<sub>nisA</sub>.

En respuesta a la adición de nisina al medio en concentración menor a la inhibidora, se puede lograr una expresión que crece de forma proporcional a la concentración añadida de inductor. En función de la señal que se emplee fusionada a la proteína recombinante se puede lograr su producción en el citoplasma o bien su transporte (Kuipers *et al.*, 1995; de Ruyter *et al.*, 1996a; Kleerebezem *et al.*, 1999). Este sistema se ha usado en microorganismos muy diversos, además de lactococos, como por ejemplo en *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, o *Bacillus* (Kleerebezem *et al.*, 1997b; Eichenbaum *et al.*, 1998; Pavan *et al.*, 2000; Åvall-Jääskeläinen *et al.*, 2002; Chong y Nielsen, 2003).

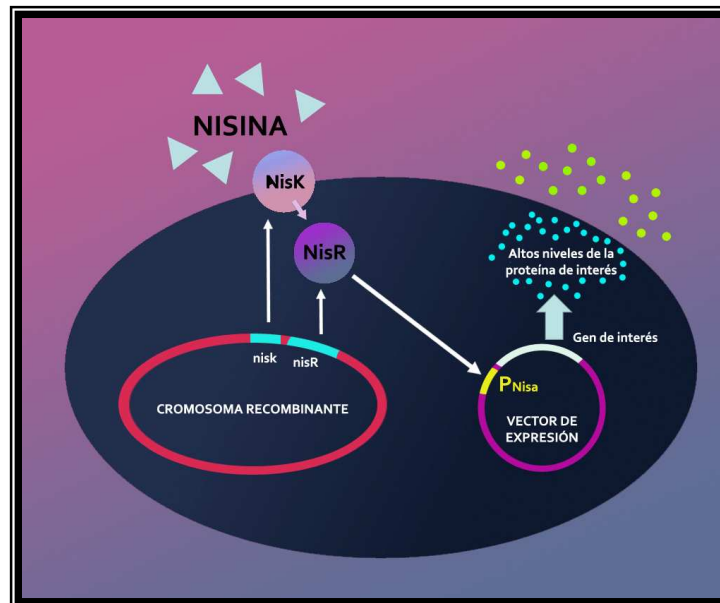
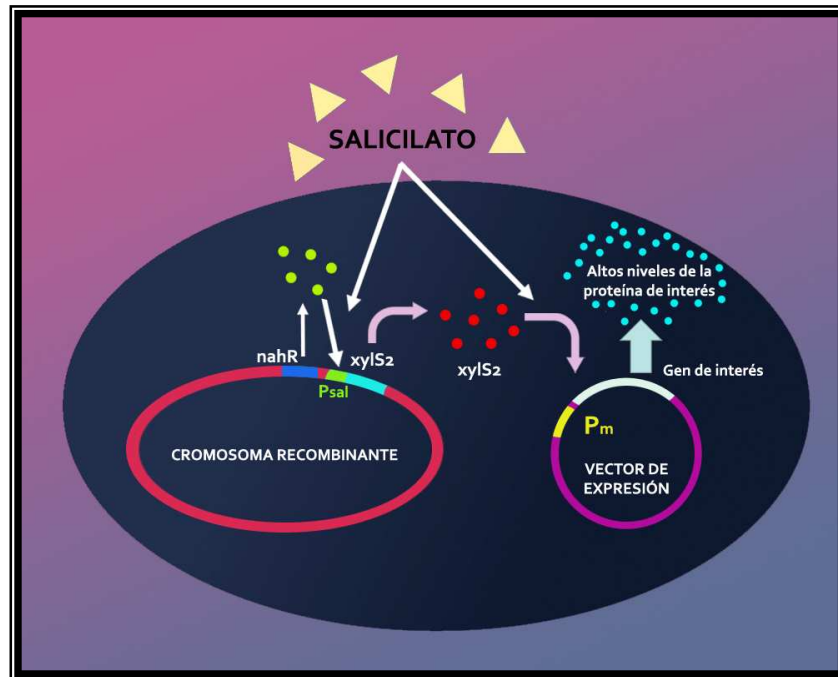


Figura 17-I. Sistema NICE

#### 4.3. Sistema de expresión mediante inducción con salicilato.

El sistema de inducción con salicilato está basado en el sistema patentado Cascade (Active Motif, Carlsbad). Presenta como ventaja frente a la inducción con IPTG en el sistema de la ARN polimerasa del fago T7, que está más regulado, resulta más económico dado que el inductor es de bajo coste, y la expresión basal es más baja. puesto que consta de dos sistemas que se inducen con el mismo agente: NahR y XylS. En presencia de salicilato, la proteína NahR induce la expresión de XylS desde el promotor  $P_{sal}$ . El salicilato, así mismo, activa XylS, el cual induce una alta expresión del gen de interés desde el promotor  $P_m$ . Este efecto sinérgico usando dos reguladores transcripcionales en cascada, permite un aumento considerable respecto al uso de un único promotor inducible. Los genes *nahR* y *xylS2* se encuentran integrados en el cromosoma, mientras que el gen que se desea sobreexpresar puede estar en un plásmido, con lo que se logra un alto número de copias, o integrado en el cromosoma, lo que resulta de mayor interés cuando el producto puede ser tóxico para la célula (Cebolla *et al.*, 2002; Royo *et al.*, 2005a, 2005b).





**Figura 18-I. Esquema del sistema Cascade.**

### **5. Enterocina AS-48.**

Los primeros datos sobre la bacteriocina AS-48 producida por *Enterococcus faecalis* subsp *liquefaciens* S-48, primer miembro descrito de la clase IV de las bacteriocinas de las BAL y caracterizada por su esqueleto circular, fueron publicados por Gálvez *et al.* (1986) como resultado de un estudio realizado sobre la producción de sustancias de tipo bacteriocina por diferentes especies del género *Enterococcus*. Sin embargo, no ha sido ésta la única referencia de enterococos pertenecientes a la especie *E. faecalis* productores de enterocina AS-48, aunque publicada bajo diferentes denominaciones: enterococina EFS2 (Maisnier-Patin *et al.*, 1996), enterocina 4 (Joosten *et al.*, 1996) y bacteriocina 21 (Tomita *et al.*, 1997). Más recientemente, ha sido incluso referida su producción en dos cepas de *E. faecium*, 7C5 (Folli *et al.*, 2003) y RJ16 (Abriouel *et al.*, 2005). Sin embargo, no ha sido ésta una situación excepcional, pues haciendo una revisión de la literatura científica se encuentra que una misma bacteriocina puede ser producida por distintas cepas o incluso por diferentes especies bacterianas. Se trata, a veces, de variantes naturales que muestran pequeñas diferencias en cuanto a la composición aminoacídica, niveles de producción o incluso el espectro de inhibición (De

Vuyst y Vandamme, 1994; Bhunia *et al.*, 1994; Joosten *et al.*, 1996; Maqueda *et al.*, 1998).

En los sobrenadantes de la bacteria productora se pudo, además, identificar una segunda bacteriocina denominada Bc-48, incluida dentro de la Clase III por ser una molécula peptídica termosensible con alto peso molecular (80 KDa) y estrecho espectro de acción (López-Lara *et al.*, 1991).

Los análisis genéticos preliminares realizados en la cepa S-48, pusieron de manifiesto la presencia de cuatro plásmidos con diferentes movilidades electroforéticas: dos de alto peso molecular, pMB1 y pMB2 (de 90 y 68 kb respectivamente) y dos miniplásmidos, pMB3 y pMB4 (de 5,1 y 2,5 kb). En todo caso se trataba de moléculas extracromosómicas con alto número de copias, según se podía deducir de la intensidad de la fluorescencia emitida cuando se analizaban los extractos plasmídicos en geles de agarosa. Este dato fue confirmado con los resultados obtenidos con preparaciones plasmídicas a gran escala, analizadas mediante gradiente de densidad en CsCl-EtBr (Martínez-Bueno *et al.*, 1990a, b).

El origen plasmídico de las bacteriocinas AS-48 y Bc-48 fue determinado mediante estudios de curación de plásmidos, que permitieron establecer una relación inequívoca entre la presencia del plásmido pMB1 y la producción de Bc-48, así como de pMB2 con la capacidad productora de AS-48 (Martínez-Bueno *et al.*, 1990a, b; López-Lara *et al.*, 1991).

### 5.1. Actividad biológica y modo de acción.

La enterocina AS-48 presenta actividad bactericida sobre la mayoría de las bacterias Gram-positivas ensayadas, siendo especialmente sensibles las especies de *Enterococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Alicyclobacillus*, *Planococcus*, *Brochotrix*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Nocardia*. Los tres últimos géneros, que tienen en común la presencia de ácidos micólicos en la pared celular, presentan gran sensibilidad, tal vez por la incrementada naturaleza hidrófoba de esta estructura que facilitaría la unión y el acceso de la molécula AS-48 a su diana celular, la membrana citoplasmática (Gálvez *et al.*, 1989b). Es obligado resaltar la gran sensibilidad que muestran las especies de *Listeria*, bacteria patógena

transmitida por alimentos, que presenta una concentración mínima bactericida 50 veces inferior a la de otras bacterias sensibles como *Enterococcus* o *Bacillus*.

Se ha confirmado que las cepas productoras de AS-48 liberan bacteriocina en los cocultivos realizados con *L. monocytogenes* (Mendoza *et al.*, 1999), *S. aureus* (Ananou *et al.*, 2004), *B. cereus* (Abriouel *et al.*, 2002; Grande *et al.*, 2005a), *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Grande *et al.*, 2005b), *Brochotrix thermosphacta* (Muñoz, 2006) y *Paenibacillus*, y se han establecido las condiciones óptimas para el control de los mismos tanto en los cocultivos de laboratorio como en diversos sistemas alimentarios en los que la enterocina AS-48 ha sido ensayada (Ananou *et al.*, 2005a, b, c; Muñoz *et al.*, 2004, 2006; Cobo *et al.*, 2005; Grande *et al.*, 2005a, b; Grande *et al.*, 2006a, b). Estos resultados ofrecen perspectivas prometedoras a muy corto plazo para el desarrollo de cultivos iniciadores que posibiliten el control de este tipo de patógenos y/o alterantes de alimentos y también para el empleo directo de la bacteriocina como bioconservante, sola o en combinación con diversos tratamientos físicos y químicos con los que se ha demostrado que muestra una clara sinergia, potenciando su efecto bactericida (Ananou *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2007).

AS-48 afecta también a diversas especies de bacterias Gram-negativas, aunque éstas son mucho menos sensibles debido al efecto protector que les proporciona la membrana externa (Gálvez *et al.*, 1989b; Abriouel *et al.*, 1998). En este sentido puede ser interesante considerar los resultados obtenidos con péptidos antimicrobianos catiónicos lineales cuya actividad está dirigida exclusivamente a bacterias Gram-positivas que, sin embargo, cuando son ciclados, sufren una modificación en la selectividad antibacteriana siendo entonces también activos frente a bacterias Gram-negativas. Este resultado ha sido explicado por la diferente propensión que poseen las formas cíclicas a oligomerizar tanto en solución como en membranas y a su estabilización en las hélices  $\alpha$  (Oren y Shai, 2000). Por otra parte, se ha podido constatar que muchas cepas que *a priori* son resistentes, se vuelven sensibles cuando se emplean tratamientos combinados que modifican en parte la permeabilidad de la membrana externa, como ha sido demostrado con *E. coli* O157:H7 (Ananou *et al.*,

2005c) o *S. choleraesuis* (Abriouel *et al.*, 1998). En general, AS-48 no muestra actividad frente a la mayoría de los organismos eucariotas ensayados, tales como las levaduras *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, las amebas de vida libre, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba*, eritrocitos y las líneas celulares Hela y MCDK.

El modo de acción bactericida de AS-48 se estableció investigando su efecto sobre bacterias intactas, tanto Gram-positivas como Gram-negativas y también sobre protoplastos y vesículas de membrana derivadas de células sensibles (Gálvez *et al.*, 1989c, 1989d, 1991). La diana celular primaria de AS-48 es la membrana citoplasmática, y su adición a células sensibles determina el cese inmediato de la captación de precursores a rutas biosintéticas y la pérdida de la capacidad para mantener los niveles citoplasmáticos de sodio y potasio. Como consecuencia de la permeabilización de la membrana celular, se produce un rápido colapso del potencial de membrana, de forma similar a como lo hace el inhibidor de ATPasa, dicitlo-hexil-carbodiimida, siendo su acción independiente del potencial de membrana. AS-48 actúa también sobre liposomas de fosfatidilcolina, en los que determina la libre y rápida difusión de pequeñas moléculas (uridina o rubidio), pero no la de solutos de mayor tamaño (dextrano) y en los que tratamientos algo más prolongados producen la fusión de las bicapas, dando lugar a agregados multilamelares (Gálvez *et al.*, 1991).

Para profundizar en el mecanismo de acción de AS-48, se analizó su efecto sobre la conductividad de bicapas lipídicas planas donde se puso de manifiesto que la adición a bajas concentraciones desencadenaba una serie de señales eléctricas atribuibles a la apertura de canales cuyo diámetro pudo ser estimado de forma muy aproximada en 0,7 nm (Gálvez *et al.*, 1991). Este mecanismo de acción permitiría la despolarización celular y la difusión de solutos de bajo peso molecular, disipando el potencial de la membrana y volviendo a la célula inviable. Posteriormente, empleando la balanza de Langmuir se han obtenido monocapas de AS-48, tanto puras como mixtas, de gran utilidad para conocer el tipo de interacción que establece con los componentes de la membrana citoplasmática. De esta forma se ha podido comprobar que la interacción principal que se produce

entre AS-48 y el ácido graso mayoritario en la membrana de los enterococos (ácido dipalmitoil fosfatídico) es de tipo electrostático, ya que ocurre a pH 10,5, situación en la que el lípido está más cargado y el péptido más desplegado (Abriouel *et al.*, 2001a). Este resultado tal vez explique el notable incremento de actividad encontrado a pH 9 frente a *Salmonella* (Abriouel *et al.*, 1998).

### 5.2. Características bioquímicas.

*E. faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32, que contiene únicamente el plásmido pMB2, así como diversos transformantes obtenidos en nuestro laboratorio, producen la enterocina AS-48 desde el comienzo de la fase exponencial de crecimiento, lo que indica que se trata de un metabolito primario, al igual que la mayoría de las bacteriocinas descritas (Gálvez *et al.*, 1986). La producción de AS-48 se lleva a cabo en diferentes tipos de medios, tanto líquidos como sólidos, incluyendo el medio mínimo DCB (*defined complete broth* o medio completo definido), aunque con menor rendimiento. Los mayores títulos de AS-48 se obtienen cuando la cepa productora se cultiva a 37 °C en medios suplementados con infusión de cerebro-corazón, glucosa y sulfato magnésico (Gálvez *et al.*, 1986).

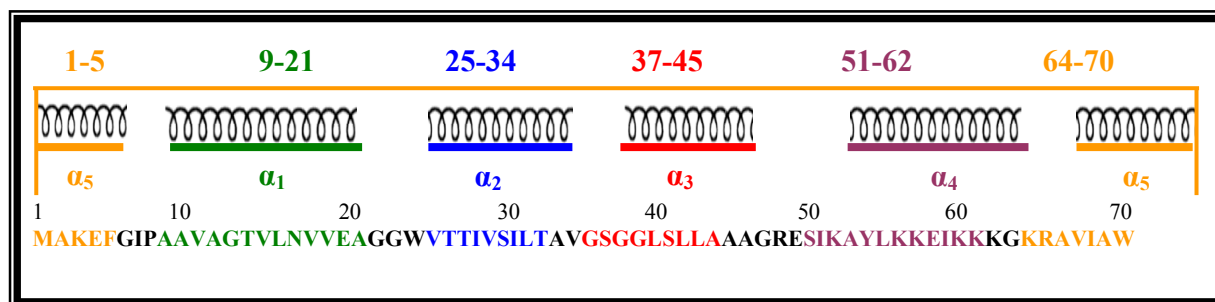
AS-48 es de naturaleza exclusivamente peptídica, por lo que es inactivado por endopeptidasas (tripsina, proteinasa K o proteasa V-8), aunque no por exopeptidasas. Es una molécula muy estable a pH ácido y neutro, y sólo a pH muy alcalino (10-11) sufre una ligera pérdida de actividad (Gálvez *et al.*, 1986; Gálvez, 1987). En su composición aminoacídica destaca la ausencia de cisteína y de aminoácidos modificados como la lantionina, la  $\beta$ -metil-lantionina y de otros residuos deshidratados, lo que la diferencia claramente de los lantibióticos (bacteriocinas de Clase I). De acuerdo con las características bioquímicas de AS-48 (ausencia de aminoácidos modificados) y su actividad anti-listeria, esta molécula estuvo considerada, en algunas de las clasificaciones propuestas, como uno de los péptidos catiónicos antibacterianos producidos por las BAL pertenecientes a la Clase II. Sin embargo, la estructura circular de AS-48, responsable de su gran estabilidad, unido a su amplio espectro de acción, la diferenciaban claramente de los

restantes péptidos descritos en esta Clase (Nes *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1999; Van Belkum y Stiles, 2000; Cleveland *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002; Ross *et al.*, 2002). Ello ha motivado que desde diferentes instancias se abogara por la creación de la Clase IV en donde en la actualidad se encuadra, siendo hoy considerada como prototipo de las bacteriocinas circulares producidas por bacterias Gram-positivas (Kemperman *et al.*, 2003b; Maqueda *et al.*, 2004; Heng *et al.*, 2007).

### 5.3. Características estructurales.

Los intentos realizados para determinar la estructura primaria de AS-48 empleando la degradación de la molécula por el método de Edman fueron en todos los casos infructuosos, lo que sugería que podía tratarse de una molécula con el extremo N-terminal bloqueado. Esta hipótesis fue apoyada por la resistencia a exopeptidasas tales como las carboxipeptidasas A y B, lo que indicaba asimismo el bloqueo del grupo carboxilo terminal. Por ello la estructura primaria completa de AS-48 fue establecida analizando los digeridos obtenidos tras su tratamiento con las endoproteasas Lys-C, Glu-C y quimotripsina (Samyn *et al.*, 1994).

La masa molecular de AS-48 (7149,5 Da) se estableció mediante espectrometría de masas con electrospray (Samyn *et al.*, 1994). El valor asignado se correspondía exactamente con el calculado al sumar la masa de los diferentes residuos de AS-48 una vez restada la masa de la molécula de agua que se libera durante la formación de la unión peptídica cabeza-cola (Samyn *et al.*, 1994). Este dato fue posteriormente confirmado al conocer la secuencia del gen estructural de AS-48 (Martínez-Bueno *et al.*, 1994). Éste fue el primer caso descrito de modificación postraducciona l de un péptido que da lugar a una molécula con estructura circular, surgida de la unión de los residuos situados en ambos extremos, Met<sup>1</sup> y Trp<sup>70</sup> (pre-péptido), tras la eliminación del péptido señal.

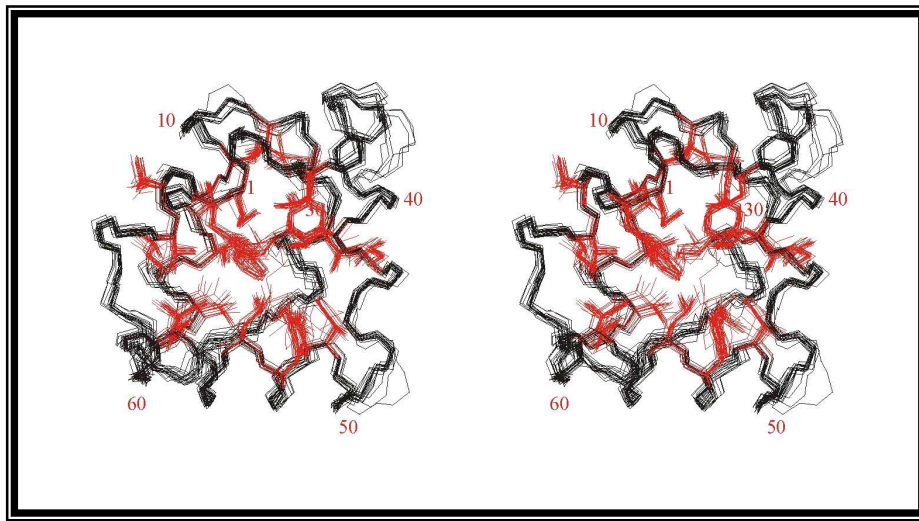


**Figura 19-I. Estructura primaria (abajo) y secundaria (arriba) de la enterocina AS-48.** Se representa la unión cabeza-cola.

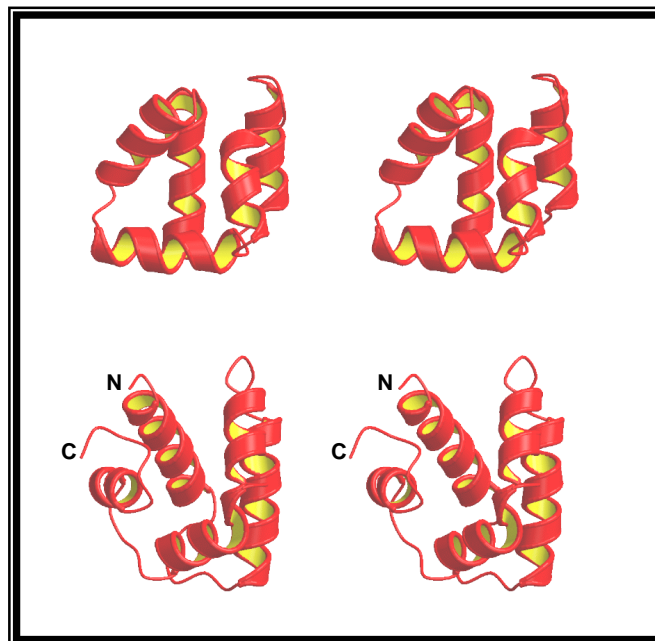
El estudio de resonancia de protones ( $^1\text{H}$  RMN) de AS-48 en solución acuosa realizado permitió establecer la estructura secundaria del péptido (Langdon *et al.*, 1998), a partir de la cual se resolvió su estructura tridimensional mediante RMN (González *et al.*, 2000). Así, se comprobó que AS-48 se encuentra plegado en cinco hélices  $\alpha$  (de acuerdo con la topología indicada en la Figura 19-I), correspondientes con los residuos Ala<sup>9</sup>-Ala<sup>21</sup> ( $\alpha_1$ ), Val<sup>25</sup>-Ala<sup>34</sup> ( $\alpha_2$ ), Ser<sup>37</sup>-Ala<sup>45</sup> ( $\alpha_3$ ), Ile<sup>51</sup>-Lys<sup>62</sup> ( $\alpha_4$ ) y Lys<sup>64</sup>-Phe<sup>5</sup> ( $\alpha_5$ ), que están conectadas por cortas regiones de giro. Las hélices  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  son antiparalelas entre sí y la  $\alpha_4$  se sitúa perpendicularmente a las hélices  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , mientras la hélice  $\alpha_3$  es perpendicular a  $\alpha_4$  e intercepta el plano definido por  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  con un ángulo de  $40^\circ$ . Finalmente, la hélice  $\alpha_5$  es perpendicular a la  $\alpha_3$  y forma un ángulo de  $50^\circ$  con  $\alpha_4$  y  $\alpha_1$ . Aunque la estructura global de AS-48 parecía muy compacta, con las cadenas hidrófobas laterales de las hélices configurando el corazón de la proteína e interactuando entre sí, para estabilizar la estructura (Figura 20-I), no todos los residuos hidrófobos se disponen hacia el centro de la molécula, ya que muchos de los situados en las hélices  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  están expuestos al solvente (Figura 21-IB) (González *et al.*, 2000).

Es un hecho demostrado que AS-48 es una molécula muy estable debido a que la circularización reduce la entropía en términos conformacionales (Cobos *et al.*, 2001). Además, la unión cabeza-cola de AS-48 se produce en la mitad de la hélice  $\alpha_5$  (residuos 64-5), lo que también tiene un marcado efecto en la estabilidad de la estructura tridimensional. En la hélice  $\alpha_5$  hay una serie de residuos hidrófobos (Val<sup>67</sup>, Met<sup>1</sup> y Phe<sup>5</sup>) que interactúan con el corazón hidrófobo de la molécula contribuyendo a

la estabilización de la estructura. Todos estos efectos estabilizadores están reforzados por las eficientes interdigitaciones de las cadenas laterales hidrófobas en el corazón de la estructura, que permiten el gran número de contactos existentes entre ellas. Desde el punto de vista estructural, AS-48 se podría asemejar a la NK-lisina (Figura 21-I), un polipéptido de 78 residuos aislado del intestino del cerdo (Andersson *et al.*, 1995), que presenta un plegamiento de tipo “saposina” y posee actividad antibacteriana y tumorolítica (Liepinsh *et al.*, 1997).



**Figura 20-I.** Visión estereoscópica de la superposición de las mejores 20 estructuras de AS-48 obtenidas mediante RMN. En negro se muestra la superposición de los átomos y en rojo la de las cadenas laterales hacia el corazón de la molécula.

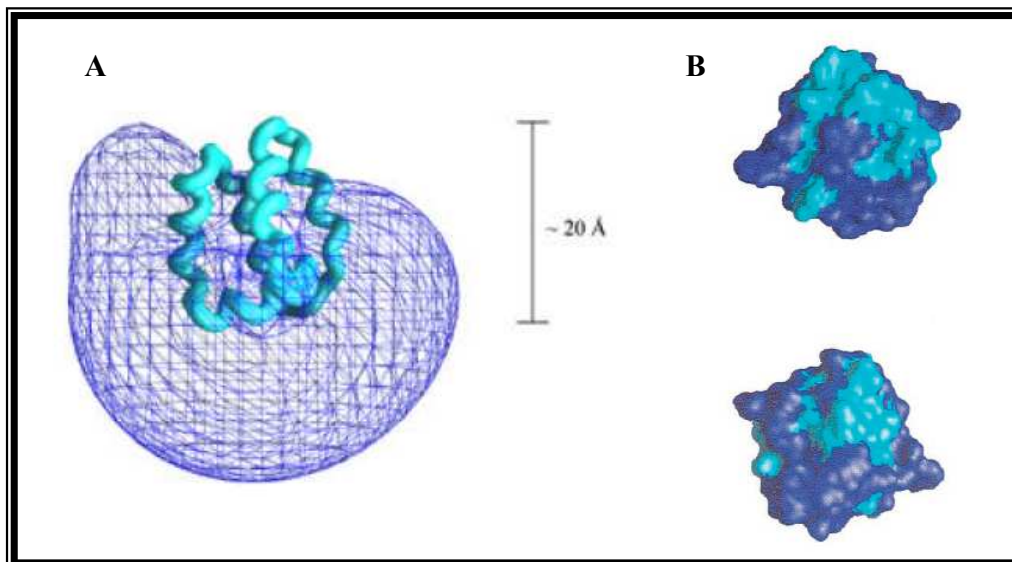


**Figura 21-I.** Comparación de las estructuras tridimensionales de la bacteriocina AS-48 (arriba) y de la NK-lisina (abajo).



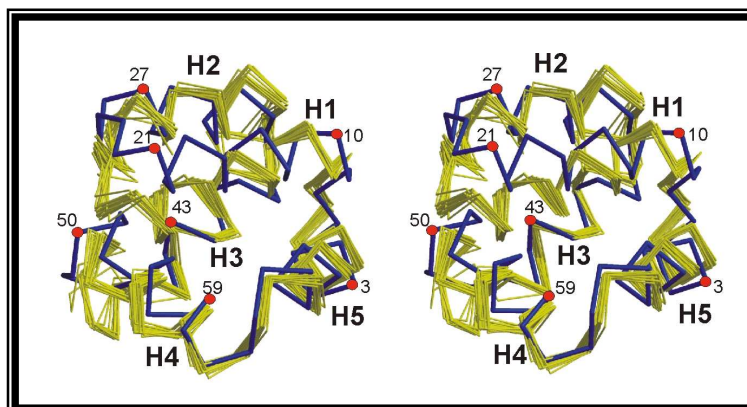
## Introducción

Desde el punto de vista electrostático, AS-48 está formada por 14 residuos cargados (8 Lys, 2 Arg y 4 Glu) que le confieren un alto pI (10,5). La alta carga positiva se incrementa cuando la proteína se encuentra a pH 3, ya que en esas condiciones los 4 Glu existentes en la molécula se encuentran protonados. De las cinco hélices de AS-48, sólo las  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_4$  muestran un modesto grado de anfipatía, pero lo más interesante es la distribución asimétrica de cargas en la molécula, ya que los 10 residuos básicos se encuentran agrupados en un segmento de 26 residuos de los 70 totales. Por ello, cuando AS-48 se encuentra a pH fisiológico (alrededor de 7) los residuos de Arg y Lys se encuentran protonados, lo que determina un alto potencial electrostático positivo, en particular en la región que comprende la hélice  $\alpha_4$  y el asa entre las hélices  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$  (Figura 22-IA). Esta organización origina a una fuerte acumulación de cargas positivas en una zona superficial de la proteína (hélices  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$ ), lo que se considera determinante de su actividad formadora de poros en la membrana bacteriana, particularmente rica en fosfolípidos ácidos (González *et al.*, 2000).



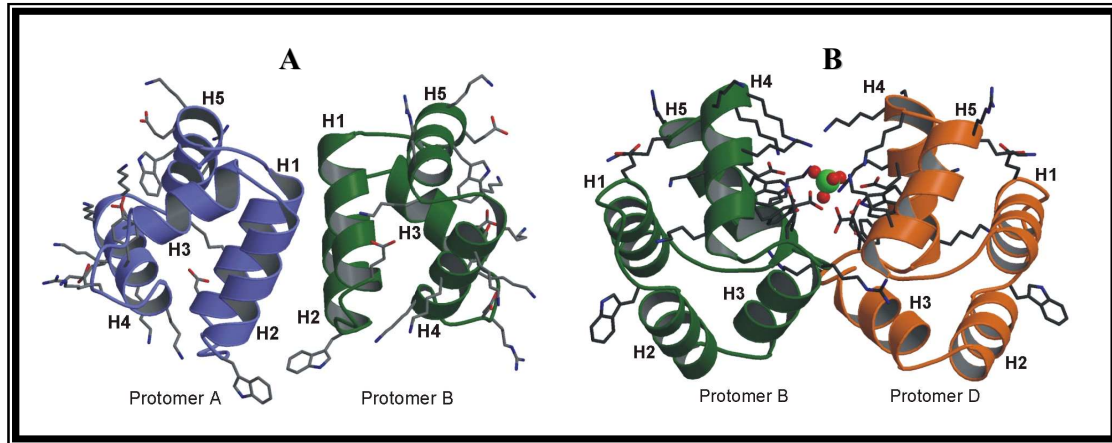
**Figura 22-I. (A) Potencial electrostático positivo de AS-48 al nivel de  $2kT/q$ , calculado con el programa GRASP.** La dirección del cambio máximo del potencial es aproximadamente vertical. Se indica la longitud del polipéptido en esa orientación, 20 Å. **(B) Vista frontal (arriba, misma orientación que en A) y posterior (abajo) de AS-48, indicando las regiones hidrófobas en la superficie (color azul ciano)** (tomado de González *et al.*, 2000)

El análisis cristalográfico llevado a cabo sobre AS-48 en solución a pH 4,5 y 7,5 (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003) confirmó, en prácticamente todos los extremos, la estructura propuesta mediante RMN, solo difería en lo relativo a la composición del corazón hidrófobo y en la superficie de la molécula (Figura 23-I).



**Figura 23-I. Estereovisión de la superposición de los 20 mejores modelos de AS-48 obtenidos mediante RMN (amarillo) y cristalografía de rayos X (azul)** (tomado de Sánchez-Barrena *et al.*, 2003).

Estos estudios han permitido comprobar, de acuerdo con los estados de agregación encontrados a diferentes pHs, que AS-48 es una molécula mucho más flexible de lo esperado, capaz de adaptar su estructura molecular a las condiciones ambientales. Se confirmó, además, que las moléculas de AS-48 en el cristal adoptan dos formas diméricas, abreviadas como DF-I y DF-II, según las condiciones ambientales en las que se encuentren. Así, las moléculas en DF-I interactúan a través de las hélices  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  (Figura 24-IA), lo que supone que el dímero expone una mayor proporción de área cargada accesible al solvente, por lo que es más soluble que el monómero. Por tal motivo se ha propuesto que es la forma en que se encuentra AS-48 en soluciones acuosas. Sin embargo, en ambientes hidrófobos, las moléculas de AS-48 se encuentran formando dímeros DF-II (Figura 24-IB) gracias a la interacción entre las hélices hidrófilas  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$ . Esta organización permite que la cara hidrófoba se oriente hacia la membrana y la hidrófila al solvente, por lo que se ha propuesto que las moléculas de AS-48 al insertarse en la membrana adoptan tal configuración.



**Figura 24-I. Representación de las formas dimericas encontradas en cristales de AS-48 en solución.** Estructura de la DF-I (A) y la DF-II (B) (tomado de Sánchez-Barrena *et al.*, 2003).

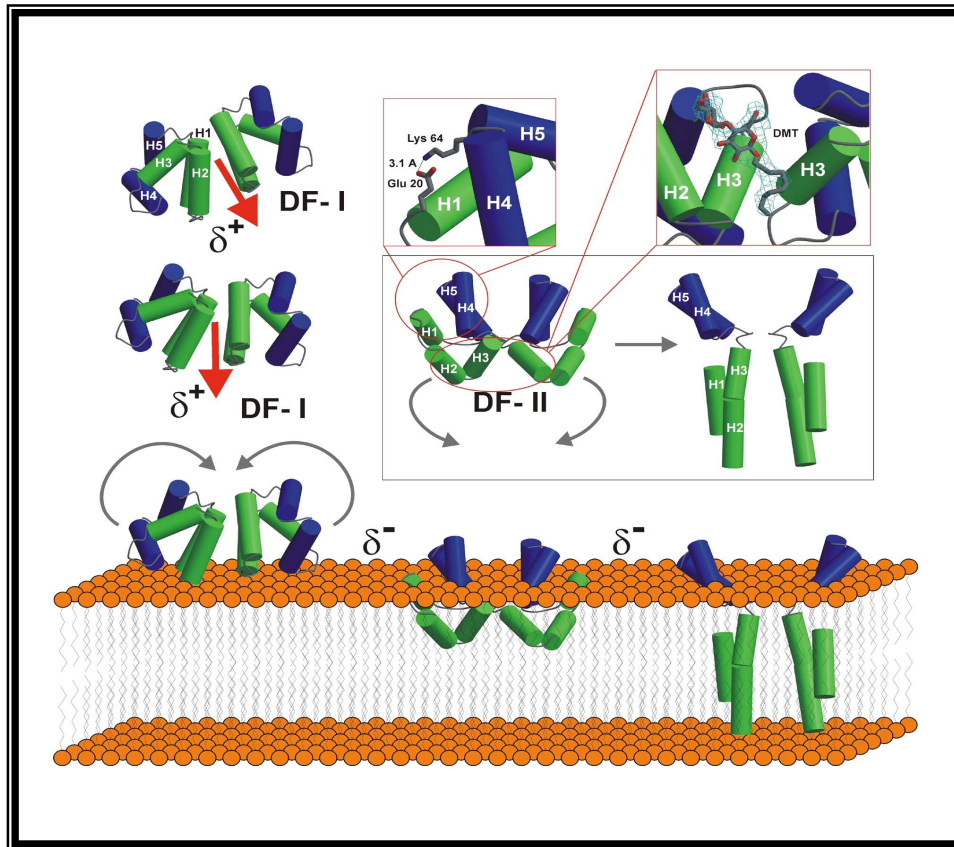
#### 5.4. Relación estructura-función.

En relación al mecanismo de acción de AS-48, se ha propuesto, de acuerdo con el modelo de RMN y las características electrostáticas de la molécula, que podría actuar sobre las membranas siguiendo el mecanismo de electroporación molecular (González *et al.*, 2000). Según este modelo, AS-48 se uniría inicialmente a la superficie de la membrana a través de su cara hidrófila y se acumularía en ella incrementando su concentración local y favoreciendo la electroporación y permeabilización de la membrana (González *et al.*, 2000). De hecho, en estudios previos (Gálvez *et al.*, 1991) se había demostrado que AS-48 interacciona con la membrana citoplasmática de las bacterias sensibles induciendo la permeabilización iónica y el colapso del potencial de membrana. Sin embargo, la existencia de los dos tipos de dímeros encontrados en los cristales de AS-48, han llevado a proponer un mecanismo molecular alternativo para explicar la actividad formadora de poros. Este modelo implica una transición de la forma soluble (DF-I) a la forma unida a la membrana (DF-II) permitiéndole así su inserción (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003). No cabe duda de que el fuerte momento dipolar de DF-I podría dirigir el acercamiento de AS-48 a la membrana y, entonces, el bajo pH existente en superficie desestabilizaría el dímero DF-I debido a la protonación de las cadenas laterales de los residuos de Glu. Esta situación, que no depende del potencial de membrana, permitiría una interacción efectiva entre las cadenas laterales

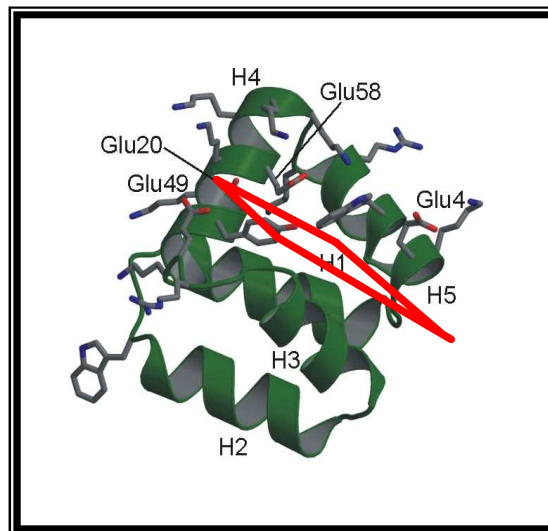
carboxiladas de AS-48 y las cabezas polares del fosfolípido, así como la estabilización de la mitad hidrófoba de AS-48 por la interacción con las cadenas alifáticas del fosfolípido, lo cual favorecería la inserción en membrana y la reorganización de la molécula, de forma similar a como lo hacen algunas toxinas (Gouaux, 1997). La inserción de numerosas moléculas de AS-48 en la membrana supondría una acumulación de cargas positivas en la misma, lo que podría desestabilizar el potencial de membrana y conducir a la electroporación molecular (Figura 25-I).

Por otra parte, los datos cristalográficos sobre AS-48 sugerían que los átomos C<sup>α</sup> de Glu<sup>4</sup>, Glu<sup>20</sup>, Glu<sup>49</sup> y Glu<sup>58</sup> de la molécula formaban un plano que segregaba los residuos cargados positivamente (hélice  $\alpha_4$ , el extremo N-terminal de  $\alpha_5$  y el asa que conecta  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$ ) del resto de los residuos no cargados o hidrófobos (hélices  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ) (Figura 26-I). Sin embargo, resultados de mutagénesis muy recientes han puesto de manifiesto que la importancia de estos residuos depende realmente de su posición en la molécula y de las interacciones que establecen sus cadenas laterales con los residuos vecinos (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2008).

Se ha realizado además, mutagénesis dirigida en otros residuos del gen estructural considerados de interés, y los resultados han demostrado que el efecto producido en la actividad biológica, en tres de los cuatro cambios puntuales introducidos (Gly<sup>13</sup>Lys, Leu<sup>40</sup>Lys, Ala<sup>53</sup>Ser y Trp<sup>24</sup>Ala), era prácticamente nulo, salvo en el caso del mutante Trp<sup>24</sup>Ala, un residuo fuertemente implicado en la interacción con las membranas, cuya sustitución supone una reducción drástica en la actividad (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2009).

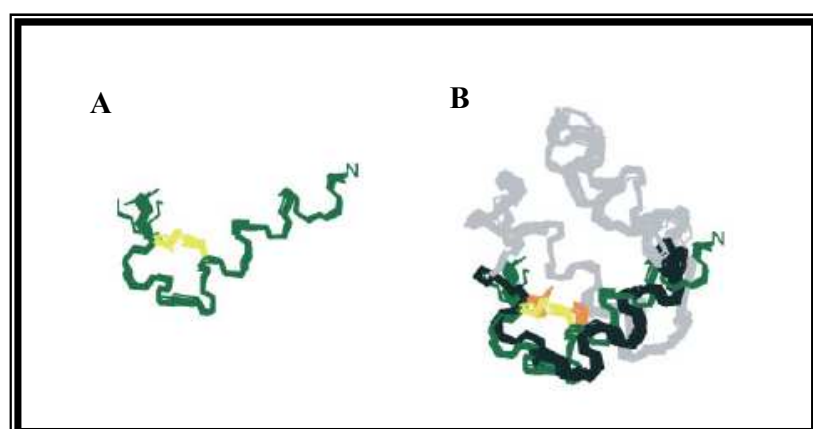


**Figura 25-I. Representación del mecanismo molecular de la inserción en membrana de AS-48.** El modelo incluye la aproximación de la forma DF-I a la membrana y la transición de DF-I a DF-II a nivel de la superficie de la membrana (tomado de Sánchez-Barrena *et al.*, 2003).



**Figura 26-I. Representación del plano hipotético, formado por los 4 residuos de Glu presentes en AS-48.**

Finalmente, para tratar de identificar el dominio implicado en la actividad de la bacteriocina AS-48 se diseñó un fragmento de 21 aminoácidos (B-49-69) obtenido por síntesis química, el cual contenía la región cargada positivamente (hélices  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$ ) implicada en la interacción con las membranas bacterianas (Jiménez *et al.*, 2005). La estructura 3D de B-49-69 era prácticamente la misma que la de la región homóloga en AS-48 (Figura 27-I), pero las modificaciones introducidas para estabilizarla fueron determinantes para que no fuese reconocida por anticuerpos específicos anti-AS-48. Ha sido concluyente comprobar que la minibacteriocina B-49-69 no mostraba actividad frente a *L. monocytogenes*, seleccionada por su gran sensibilidad frente a la molécula nativa, ni en medios sólidos ni líquidos, aunque sí neutralizaba la actividad de AS-48 cuando era añadida a los cultivos en fase exponencial antes que la bacteriocina. Según estos resultados, B-49-69 podría unirse y cubrir la superficie celular cargada negativamente, dificultando la aproximación de AS-48 y la consiguiente permeabilización de la membrana. De hecho, la adición de B-49-69 con posterioridad a la de AS-48 no tenía efecto alguno. Estos datos sugería que B-49-69 podría unirse a la superficie bacteriana cargada negativamente a través de interacciones electrostáticas, pero no era capaz de permeabilizar las membranas, probablemente debido a que no posee la necesaria distribución de dominios hidrófilos e hidrófobos presentes en AS-48 (Jiménez *et al.*, 2005).



**Figura 27-I.** (A) Superposición de las 20 mejores estructuras calculadas para B-49-69 en TFE al 30%. El puente disulfuro aparece en amarillo. (B) Superposición de las estructuras de B-49-69 y la bacteriocina AS-48. En verde, B-49-69, en negro, el segmento 49-69 de AS-48. Las cadenas laterales de I59 y V67 en AS-48 aparecen en naranja, y el puente disulfuro entre C59-C67 de B-49-69 en amarillo (tomado de Jiménez *et al.*, 2005).

### 5.5. Estabilidad de AS-48.

Es un hecho indiscutible que la circularización confiere a las moléculas una gran estabilidad y, en el caso de AS-48, la extrema estabilidad que presenta se confirmó en estudios de calorimetría diferencial de barrido realizados a pH 2,5 y a baja fuerza iónica. En ellos se pudo establecer que la desnaturalización térmica se producía a temperaturas superiores a los 102 °C (Cobos *et al.*, 2001). También los estudios de desplegamiento-replegamiento de AS-48 confirmaron que se trataba de una de las proteínas globulares más estables, ya que la desnaturalización reversible sólo se producía a altas concentraciones de cloruro de guanidinio (6,5 M) y ni siquiera a concentración saturante de urea (Cobos *et al.*, 2002). Resultados muy recientes sobre la cinética de desplegamiento de AS-48 y de mutantes puntuales obtenidos, muestra un doble salto que se corresponde con un modelo de tres estados, en el que el intermediario, que requiere altas concentraciones del agente desnaturalizante (aprox. 5 M GdnHCl), se ha postulado que podría corresponder con un estado que retiene parcialmente la estructura secundaria (*molten globule*) (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2009)

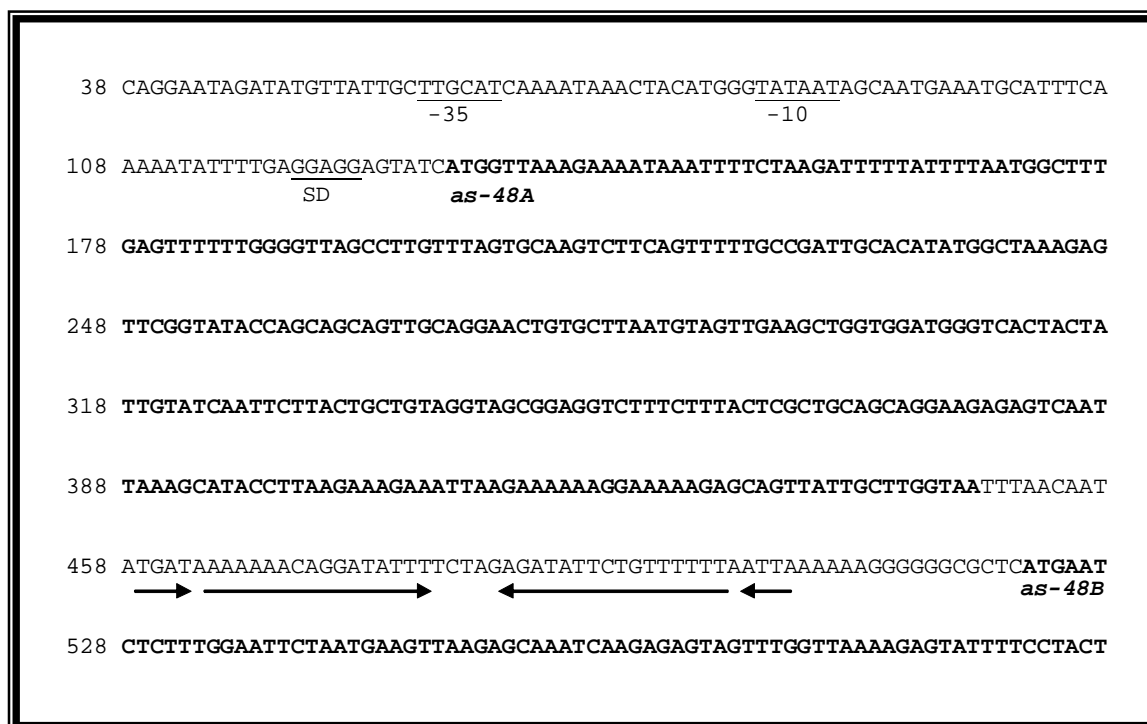
### 5.6. Determinantes genéticos de AS-48.

Las primeras investigaciones sobre los determinantes genéticos de AS-48 permitieron localizarlos en el plásmido conjugativo pMB2 (68 kb) que responde a feromonas (Martínez-Bueno *et al.*, 1990a). En dicho plásmido se encuentran también los determinantes responsables de la producción y resistencia a la bacteriocina, así como los implicados en la transferencia conjugativa a otras cepas de la misma especie (Martínez Bueno *et al.*, 1990a; Quirantes *et al.*, 1995).

Cuando el gen estructural *as-48A* fue secuenciado, se comprobó que aunque el péptido activo posee 70 residuos, el producto primario del gen codificaba 105 aminoácidos, de los que los 35 primeros, de naturaleza hidrófoba, actuaban como péptido señal (Martínez-Bueno *et al.*, 1994). El análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos deducida del gen *as-*

48A y la obtenida para el péptido V8-5 (un fragmento de 16 residuos obtenido por digestión parcial de AS-48 con endoproteinasa Glu-C) demostró de forma concluyente que AS-48 tenía estructura circular. Efectivamente, el péptido V8-5 comienza con una secuencia de 12 aminoácidos (IKKKKGKRAVIAW) que se corresponde con el extremo carboxilo del producto génico traducido y acababa con cuatro residuos (MAKE) correspondientes al extremo amino del pro-péptido AS-48.

La región genética donde se localizó el gen estructural *as-48A* está muy bien definida. Este gen se encuentra precedido por un promotor fuerte capaz de expresarse en *E. coli* (Fujimoto e Ike, 2001) y que dirige la expresión de los genes *as-48BC* situados a continuación (Figura 28-I). Se identificó, además, un sitio típico de unión a ribosomas (GGAGGA) y una repetición invertida (RI) a continuación del codon stop (TAA) que representa un sitio específico de procesamiento del ARNm ( $T_{ABC}$ ) regulando la estequiometría necesaria en la célula de los tres productos génicos (Fernández *et al.*, 2008).



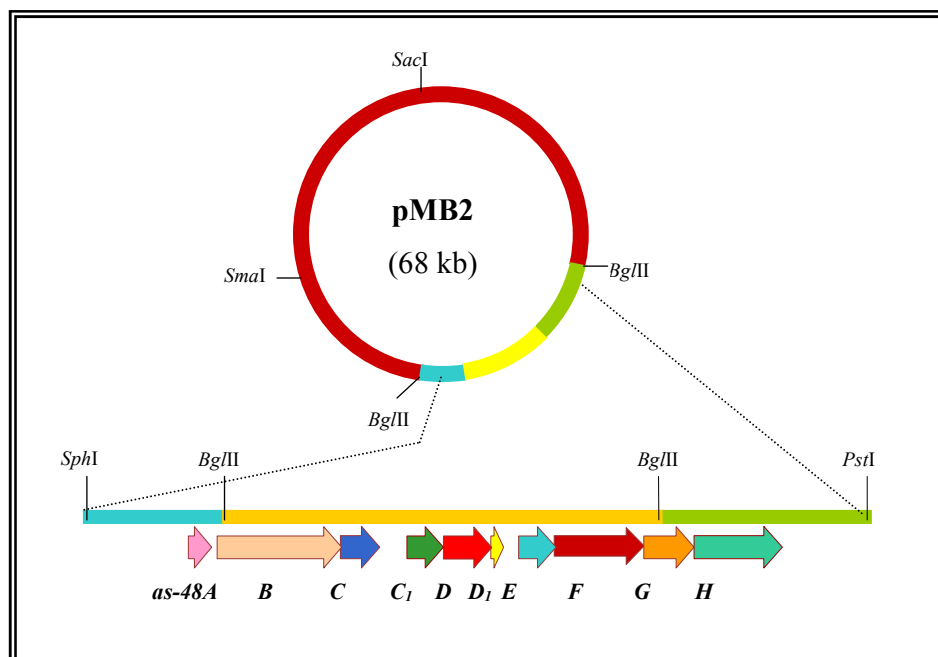
**Figura 28-I. Secuencia del gen *as-48A* y elementos genéticos relevantes relacionados.** Las flechas indican la repetición invertida (RI). Se toma como posición inicial el sitio *SphI* de la región *as-48* clonada en pAM401 (tomado de Fernández *et al.*, 2008).



## Introducción

El cluster *as-48* contiene, además del operón *as-48ABC*, un conjunto de genes situados corriente abajo de éste (Figura 29-I): *as-48C<sub>1</sub>*, *as-48D*, *as-48D<sub>1</sub>*, *as-48E*, *as-48F*, *as-48G* y *as-48H*, que en su conjunto son responsables de la expresión del carácter AS-48 (producción e inmunidad) (Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2003).

En trabajos previos quedó establecido que el producto del gen *as-48D<sub>1</sub>* era el determinante de la inmunidad, ya que era capaz de conferir por sí mismo cierto grado de resistencia (Martínez-Bueno *et al.*, 1998). Sin embargo, se ha confirmado, además, la existencia de mecanismos complementarios de inmunidad, resultado de la influencia de diversas proteínas codificadas por el grupo de genes *as-48*, como es el caso de la bomba de tipo ABC constituida por *As-48EFGH* (Díaz *et al.*, 2003), y el producto del gen *as-48C* (Fernández *et al.*, 2008), que en todo caso aumentan la resistencia frente a AS-48, bien administrado de manera exógena o durante su biosíntesis, de forma similar a lo descrito para la microcina B17, nisina, subtilina y Pep5 (Garrido *et al.*, 1988; Saris *et al.*, 1996). Una segunda bomba de tipo ABC, formada por los productos de los genes *as-48C<sub>1</sub>D*, que en ningún caso puede ser sustituida por la anteriormente comentada, se encargaría del transporte/secréción de las moléculas maduras al exterior celular.



**Figura 29-I. Mapa físico y genético del plásmido pMB2.** Se muestran los sitios de corte de diversas enzimas de restricción y los genes identificados en la región *as-48*.

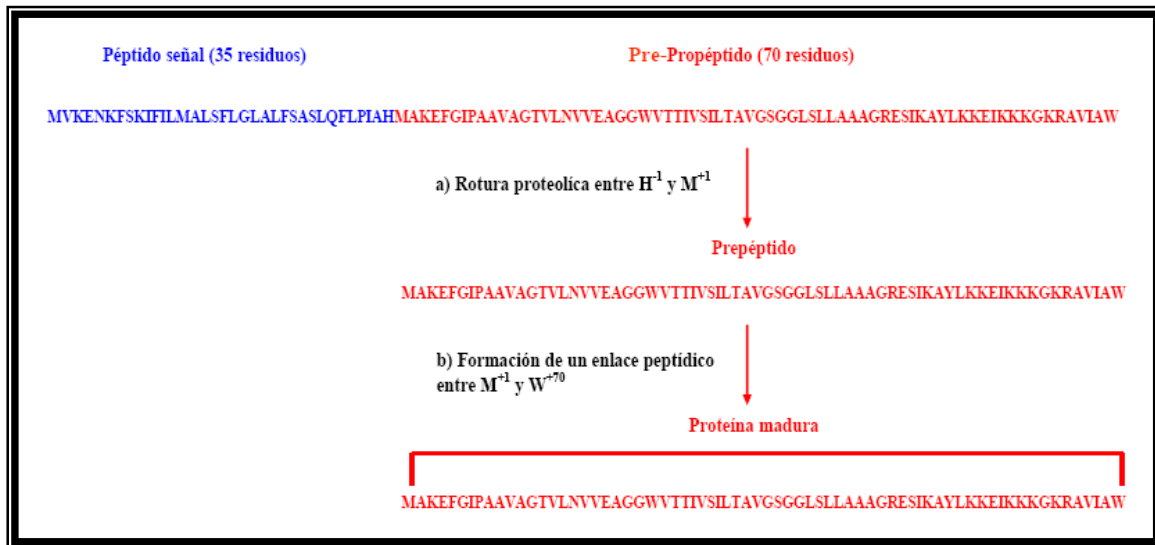
### 5.7. Biosíntesis de AS-48.

A pesar de los progresos realizados en la caracterización bioquímica y genética de las bacteriocinas circulares, el mecanismo molecular implicado en el proceso de maduración/circularización de las mismas está todavía falto de evidencias experimentales. Como primera tentativa, Hegde y Bernstein (2006) propusieron que del análisis de los péptidos líderes presentes en todas las bacteriocinas circulares descritas, se podría obtener información sobre la vía de translocación seguida por estos inhibidores, ya que incluso se les supone un papel modulador en la biogénesis de las proteínas. Sin embargo, en una revisión reciente realizada sobre bacteriocinas circulares Maqueda *et al.* (2008), refieren la ausencia de similitudes en la longitud de los péptidos líderes y en los residuos implicados en la formación del enlace peptídico. Además, aún se desconoce si la eliminación del péptido líder y la unión de los extremos se producen gracias a la intervención de diferentes enzimas o es consecuencia de diferentes reacciones catalizadas por el mismo enzima. Quedan, aún, muchas cuestiones sin respuesta: ¿existe alguna relación entre los residuos implicados en el proceso?, ¿se encuentran acoplados los procesos de eliminación del péptido líder y la secreción?, ¿cuál es la naturaleza del intermediario, si existe? En qué momento se produce y si necesita ATP, son otras de las cuestiones aún no aclaradas.

En el caso de AS-48. en el que los primeros 35 residuos de la molécula conforman un péptido señal de naturaleza hidrófoba, se ha propuesto que el producto primario de *as-48A* debería seguir las siguientes etapas en su procesamiento (Figura 30-I): (i) ruptura del péptido señal del <sup>pre</sup>-péptido y (ii) unión entre los residuos Met<sup>+1</sup> y Trp<sup>+70</sup> terminales del <sup>pre</sup>-péptido. Este proceso requeriría la intervención de una peptidasa señal y/o una ciclasa necesaria para la formación del enlace peptídico. Como hipótesis de partida se había propuesto que ambas actividades pudieran residir en un complejo multienzimático que estaría constituido por As-48B/As-48C<sub>1</sub>D. Sin embargo, este extremo no ha sido posible demostrarlo de forma fehaciente, a pesar de la importancia del gen *as-48B*, cuya interrupción impide la producción de AS-48 (Díaz *et al.*, 2003). De hecho, resultados

## Introducción

recientes sobre los intentos de producción heteróloga de AS-48 en diversas especies de bacterias lácticas, han puesto de manifiesto que alguna de las actividades responsables de la maduración de AS-48, si no todas, puedan ser específicas de las especies del género *Enterococcus*, el único capaz de producir esta enterocina (Fernández *et al.*, 2007). Ello ha llevado a proponer que la maduración de AS-48 requiere actividades de origen cromosómico específicas de este género, de forma similar a lo descrito para la circularización de la pilina en *Agrobacterium tumefaciens* (Eisenbrandt *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2002).



**Figura 30-I. Modelo propuesto para el procesamiento de la enterocina AS-48:** eliminación del péptido señal (35 aminoácidos) mediante ruptura entre His<sup>1</sup> y Met<sup>1</sup> seguida de la formación del enlace peptídico entre la Met<sup>1</sup> y el Trp<sup>70</sup> para originar la molécula circular madura (tomado de Maqueda *et al.*, 2008).





## ***Objetivos***



El objetivo de este trabajo ha sido el diseño de moléculas de AS-48 lineales que conserven las características estructurales y funcionales de la molécula nativa circular. La última finalidad era permitir su producción en sistemas heterólogos en los que fuera suficiente clonar, en vectores de expresión o de fusión adecuados, el gen estructural junto a los determinantes genéticos responsables de la inmunidad. Estos estudios, de los que este trabajo constituye una primera aproximación, arrojarían luz sobre las consecuencias de la formación de un enlace peptídico entre los extremos de esta proteína, en particular en lo referente a su estabilidad y funcionalidad, así como sobre la importancia de la circularización en la estructura tridimensional y en las propiedades fisico-químicas de las moléculas circulares, tanto naturales como de síntesis.

Para ello se propusieron, en principio, diferentes alternativas: i) la expresión del gen estructural nativo sin el péptido señal y ii) el diseño de genes circularmente permutados que permitieran la expresión de moléculas abiertas por los sitios más flexibles que, en principio, deberían de ser las zonas de giro entre las cinco hélices alfa en las que AS-48 está estructurada. Las opciones propuestas fueron la apertura entre las hélices  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  así como entre  $\alpha_3$  y  $\alpha_4$ , por entender que la apertura entre las otras zonas de giro existentes podría alterar gravemente la estabilidad de las moléculas resultantes.

De forma paralela se propuso abordar un estudio de proteólisis controlada sobre AS-48 empleando diferentes enzimas y en diferentes condiciones de reacción, con el fin de disponer de nuevos diseños sobre sitios más racionales de apertura de la molécula.

Finalmente habría que ensayar la expresión de todos los genes diseñados en sistemas diferentes de *E. coli*, fusionadas o no a otra proteína. Sin embargo, dadas las características biotecnológicas que AS-48 presenta como bioconservante de alimentos y la imposibilidad de expresarla en BAL diferentes a los enterococos, se propuso la expresión de los genes diseñados en sistemas previamente validados de *Lactococcus lactis*, empleando fusiones con péptidos señal de moléculas bien caracterizadas, con la última finalidad de disponer de bacterias GRAS productoras de AS-48, que serían de gran interés biotecnológico.



Estos objetivos han sido abordados en esta Memoria desde las siguientes perspectivas:

1. Construcción de diferentes genes (*as-48<sup>L</sup>*) que codifiquen moléculas lineales de AS-48, en las que el orden de las hélices se encuentran permutadas.

2. Clonación de los genes circularmente permutados en vectores de expresión de *E. coli* bajo el control de la ARN polimerasa del fago T7 y optimización de las condiciones de expresión tras la inducción con IPTG.

3. Determinación de los sitios más flexibles para la apertura del péptido circular AS-48 mediante ensayos de proteólisis controlada de AS-48.

4. Expresión heteróloga de los diferentes genes *as-48<sup>L</sup>* diseñados en *E. coli* como proteínas de fusión.

5. Ensayos de expresión de los diferentes genes *as-48<sup>L</sup>* diseñados en *Lactococcus lactis*, empleando el péptido líder de la lactococcina A y/o el sistema de secreción de la proteína Usp.





## ***Material y Métodos***



**1. Microorganismos empleados.**

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo, junto a su procedencia y características más relevantes se muestran en la tabla 1-MM.

<b>Microorganismo</b>	<b>Características</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2</b>	Libre de plásmidos, Rif <sup>r</sup> , Fus <sup>r</sup> , AS-48 <sup>s</sup>	Yagi y Clewell, 1980
<b><i>E. faecalis</i> S-47</b>	AS-48 <sup>s</sup>	Gálvez <i>et al.</i> , 1989c
<b><i>E. faecalis</i> A-48-32</b>	pMB2 AS-48 <sup>r</sup> AS-48 <sup>r</sup>	Martínez-Bueno <i>et al.</i> , 1990
<b><i>Escherichia coli</i> DH5α</b>	<i>supE44 Δlac U169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Bethesda Research Lab.
<b><i>E. coli</i> JM109</b>	<i>e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F<sup>-</sup> traD36 proAB lac<sup>R</sup>ΔM15]</i>	Stratagene
<b><i>E. coli</i> BL21 (DE3)</b>	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
<b><i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS codonplus</b>	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) Cm <sup>R</sup>	Stratagene
<b><i>E. coli</i> MC1022</b>	<i>araD139, Δ(ara, leu)7697, Δ(ZacZ)MIS, galU, galK, strA hsdR lacZΔM15 endA1 recA1</i>	Casadaban y Cohen, 1980
<b><i>E. coli</i> TOP10</b>	Mini-Tn5(kan <sup>R</sup> -nahR/P <sub>sal</sub> ::xylS2)	Invitrogen
<b><i>E. coli</i> REG-1</b>	<i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Biomedal
<b><i>E. coli</i> K-12 MG1655</b>	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	Xiao <i>et al.</i> , 1991
<b>Mutantes de <i>E. coli</i> K-12 MG1655</b>	<i>Δlon, ΔclpP, ΔclpA, ΔclpX, ΔclpQ</i>	Xiao <i>et al.</i> , 1991
<b><i>Lactococcus lactis</i> UKLc10</b>	IM16, <i>pepN::nisRK</i>	Wegmann <i>et al.</i> , 1999
<b><i>L. lactis</i> FI7847</b>	Derivado <i>ΔnisA</i> de FI5876	Dodd <i>et al.</i> , 1996
<b><i>Listeria innocua</i></b>	AS-48 <sup>s</sup>	CECT 4030
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	AS-48 <sup>s</sup>	CECT 4032

**Tabla 1-MM.** Microorganismos utilizados en este trabajo con las características más relevantes. AS-48<sup>r</sup>: productor de AS-48, AS-48<sup>s</sup>: sensible a AS-48, AS-48<sup>r</sup>: resistente a AS-48, CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

La cepa libre de plásmidos *E. faecalis* JH2-2 o S-47 (Yagi y Clewell, 1980), *Listeria innocua* y *L. monocytogenes* fueron empleadas como bacterias indicadoras en los ensayos de actividad de AS-48 y de sus variantes.

*E. coli* JM109, MC1022 y DH5α fueron empleadas como intermediarios en los experimentos de clonación y transformación genética, mientras que las cepas BL21, MG1655 y REG-1 de *E. coli* fueron usadas para la expresión de proteínas. Todas fueron cultivadas en agitación a 37 °C salvo en los ensayos de expresión. El resto de bacterias usadas en este trabajo fueron

cultivadas a 37 °C en reposo, con excepción de los lactococos que se incubaron a 30 °C.

## 2. Plásmidos empleados.

En la tabla 2-MM se describen los plásmidos empleados y construidos durante la realización de este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pGEM-T easy	Ap <sup>r</sup> , vector de clonación para productos de PCR (3,0 kb)	Promega
pGEM-L <sup>23/24</sup>	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy con gen <i>as48L</i> <sup>23/24</sup> (3,2 kb)	Este trabajo
pGEM-L <sup>48/49</sup>	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy con <i>as-48L</i> <sup>48/49</sup> (3,2 kb)	Este trabajo
pGEM-L <sup>43-27</sup>	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy con <i>as-48L</i> <sup>43-27</sup> (3,2 kb)	Este trabajo
pGEM-L <sup>10/11</sup>	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy con <i>as-48L</i> <sup>10/11</sup> (3,2 kb)	Este trabajo
pGEM-L <sup>23/24</sup> BHI	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy con <i>as48L</i> <sup>23/24</sup> y sitio <i>Bam</i> HI (3,2 kb)	Este trabajo
pGEM-L <sup>48/49</sup> BHI	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy con <i>as48L</i> <sup>48/49</sup> y sitio <i>Bam</i> HI (3,2 kb)	Este trabajo
pGEM-RIB	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy con RI (3,5 kb)	Este trabajo
pCR2.1	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , vector de clonación para productos de PCR (3,9 kb)	Invitrogen
pET22b	Ap <sup>r</sup> , vector de expresión (5,5 kb)	Novagen
pET22-L <sup>1/70</sup>	Ap <sup>r</sup> , pET22b con parte de <i>as-48A</i> clonado (5,7 kb)	Este trabajo
pFI2623	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , pCR2.1 con <i>as48L</i> <sup>10/11</sup> fusionado al líder de Usp45 (4,5 kb)	Este trabajo
pFI2624	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , pCR2.1 con <i>as-48L</i> <sup>23/24</sup> fusionado al líder de Usp45 (4,5 kb)	Este trabajo
pFI2625	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , pCR2.1 con <i>as-48L</i> <sup>48/49</sup> fusionado al líder de Usp45 (4,5 kb)	Este trabajo
pFI2626	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , pCR2.1 con <i>as-48L</i> <sup>43-27</sup> fusionado al líder de Usp45 (4,5 kb)	Este trabajo
pFI2617	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , pCR2.1 con <i>as-48L</i> <sup>10/11</sup> fusionado al líder de Usp45 (4,5 kb)	Este trabajo
pBgD12S	Ap <sup>r</sup> , gen <i>as-48A</i> clonado en pSL1180 (5,4 kb)	Sánchez-Hidalgo <i>et al.</i> , 2008
pAM401-81	Cm <sup>r</sup> , región <i>as-48</i> clonada en pAM401 (25,0 kb)	Díaz <i>et al.</i> , 2003
pBAT-4m	Ap <sup>r</sup> , vector de expresión (4,4 kb)	Peränen <i>et al.</i> , 1996
pBAT-L <sup>23/24</sup>	Ap <sup>r</sup> , pBAT-4m con <i>as-48L</i> <sup>23/24</sup> clonado (4,6 kb)	Este trabajo
pBAT-L <sup>48/49</sup>	Ap <sup>r</sup> , pBAT-4m con <i>as-48L</i> <sup>48/49</sup> clonado	Este trabajo

<b>pBAT-L<sup>10/11</sup></b>	(4,6 kb) Ap <sup>r</sup> , pBAT-4m con <i>as-48L<sup>10/11</sup></i> clonado	Este trabajo
<b>pBAT-L<sup>10/11-RI</sup></b>	(4,6 kb) pBAT-L <sup>10/11</sup> con la RI y parte del gen	Este trabajo
<b>pBAT-L<sup>43-27</sup></b>	<i>as-48B</i> (4,9 kb) Ap <sup>r</sup> , pBAT-4m con <i>as48L<sup>43-27</sup></i> clonado	Este trabajo
<b>pALEXa</b>	(4,6 kb) Ap <sup>r</sup> , vector de expresión de proteínas de fusión (4,0 kb)	Biomedal
<b>pALEX-L<sup>23/24</sup></b>	Ap <sup>r</sup> , pALEXa con <i>as-48L<sup>23/24</sup></i> clonado	Este trabajo
<b>pALEX-L<sup>48/49</sup></b>	(4,2 kb) Ap <sup>r</sup> , pALEXa con <i>as-48L<sup>48/49</sup></i> clonado	Este trabajo
<b>pIL253-64</b>	Em <sup>r</sup> ; derivado de pIL253 con <i>as48CC<sub>1</sub>DD<sub>1</sub></i>	Martínez-Bueno <i>et al.</i> , 1998
<b>pTG262</b>	Cm <sup>r</sup> , vector bifuncional <i>E. coli- L. lactis</i>	de Vos y Simons, 1994
<b>pFI2623</b>	(5,0 kb) Cm <sup>r</sup> , pTG262 con <i>as-48L<sup>10/11</sup></i> fusionado al líder <i>usp45</i> (6,1 kb)	Este trabajo
<b>pTGusp23/24</b>	Cm <sup>r</sup> , pTG262 con <i>as-48L<sup>23/24</sup></i> fusionado al líder de <i>Usp45</i> (6,1 kb)	Este trabajo
<b>pTGusp43-27</b>	Cm <sup>r</sup> , pTG262 con <i>as-48L<sup>43-27</sup></i> fusionado al líder de <i>Usp45</i> (6,1 kb)	Este trabajo
<b>pTGusp48/49</b>	Cm <sup>r</sup> , pTG262 con <i>as-48L<sup>48/49</sup></i> fusionado al líder de <i>Usp45</i> (6,1 kb)	Este trabajo
<b>pFI2620</b>	Cm <sup>r</sup> , pTG262 con <i>as-48L<sup>10/11</sup></i> fusionado al líder de la lactococina A (6,1 kb)	Este trabajo
<b>pFI2148</b>	Em <sup>r</sup> , pIL277 con los genes <i>lcnCD</i> (8,4 kb)	Horn <i>et al.</i> , 1999
<b>pFI2622</b>	Cm <sup>r</sup> , pTG2620 con los genes <i>as48L<sup>10/11</sup></i> y <i>lcnCD</i> (9,9 kb)	Este trabajo

**Tabla 2-MM. Plásmidos utilizados en este trabajo.** Ap<sup>r</sup>: resistencia a ampicilina. Cm<sup>r</sup> resistencia a cloramfenicol. Em<sup>r</sup>: resistencia a eritromicina. Km<sup>r</sup>: resistencia a kanamicina.

### 3. Medios de cultivo.

La composición de los medios de cultivo utilizados se expresa en gramos por litro de agua destilada o tampón. Cuando fue preciso el uso de medios sólidos o semisólidos, se añadió agar (Merck) al 1,5 % (medios sólidos) ó 0,75 % (medios semisólidos) a los correspondientes medios líquidos. Los medios, salvo que se especifiquen otras condiciones, se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 min.



### 3.1. Medios de crecimiento generales.

- **Medio de Luria-Bertani (LB)**

El caldo LB se utilizó para el crecimiento de *Escherichia coli*. El preparado comercial (Gibco BRL) se reconstituyó a razón de 25,0 g/l de agua destilada.

#### **LB**

Tripticasa Peptona	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
NaCl	10,0 g
El pH se ajustó a 7,2	

- **Medio de Infusión de Cerebro-Corazón (Brain-Heart Infusion, BHI)**

El BHI fue utilizado para el crecimiento y la producción de AS-48 por los enterococos, ya que es un medio complejo que cubre los requerimientos nutricionales de estas bacterias. El mismo medio fue utilizado para *L. monocytogenes* y *L. innocua*. El preparado comercial deshidratado (Scharlau) se disolvió a razón de 37,0 g/l de agua destilada.

#### **BHI**

Infusión de cerebro de ternera	200,0 g
Infusión de corazón vacuno	250,0 g
Peptona de gelatina	10,0 g
NaCl	5,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
Glucosa	2,0 g

- **Medio Trypticaseína-Soja (TSB)**

El medio TSB fue empleado alternativamente al BHI para el crecimiento de las bacterias. El preparado comercial deshidratado (Scharlau), se disolvió a razón de 30,0 g/l de agua destilada.

Triptona	17,0 g
Peptona de soja	3,0 g
NaCl	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
Glucosa	2,5 g

• **GM17**

Para el crecimiento de las especies del género *Lactococcus* se empleó medio M17 (Biokar Diagnostics) suplementado con un 1% de glucosa (GM17) ya que la mayoría de cepas carece de la capacidad de usar la lactosa. El medio se esterilizó en autoclave a 115°C durante 20 min.

Triptona	2,5 g
Digerido péptico de carne	2,5 g
Digerido papaínico de soja	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Extracto de carne	5,0 g
Lactosa	5,0 g
Glicerol fosfato sódico	9,0 g
Sulfato de magnesio	0,2 g
Ácido ascórbico	0,5 g

3.2. Medio empleado para la producción de AS-48.

El medio complejo MC se utilizó para facilitar la purificación de AS-48 y sus variantes, ya que el bajo contenido en macromoléculas facilita las etapas posteriores de purificación de proteínas (Gálvez *et al.*, 1986).

Casaminoácidos (Difco)	2,00 g
BHI	2,80 g
Base nitrogenada para levaduras (Difco)	1,00 g
Glucosa	8,00 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,04 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,77 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	6,56 g

Para su preparación, las sales y el BHI fueron disueltos en agua destilada y se esterizaron en autoclave; los casaminoácidos y la base nitrogenada para levaduras fueron disueltos en agua destilada (1/10 del

volumen final) calentando suavemente en baño, y se esterilizaron por filtración a vacío (0,45 µm de diámetro, Millipore) La glucosa se disolvió igualmente en agua destilada y se esterilizó en autoclave (110 °C, 15 min). Todas estas soluciones se mezclaron y se utilizaron inmediatamente.

### 3.3. Medios empleados para el ensayo de la actividad antibacteriana.

Todos los medios utilizados con este propósito se disolvieron en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,2, con objeto de neutralizar el posible efecto inhibitor de los ácidos orgánicos producidos por las bacterias productoras, lo que se denota con una T (tamponado).

- **Agar Mueller-Hinton tamponado (MHA-T)**

MHA-T se utilizó como capa base de las placas en los ensayos de actividad antibacteriana, por ser un medio apropiado para la difusión de sustancias inhibitoras.

Extracto de carne de ternera	300,0 g
Peptona de caseína hidrolizada	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	17,0 g

El preparado comercial (Scharlau) se disolvió a razón de 38,0 g/l en tampón.

- **Medio BHA blando tamponado**

Se empleó como sobrecapa (7 ml) para cubrir la capa base de MHA-T. Se preparó en tampón fosfato a razón de 15,0 g/l de BHI, y se suplementó de agar al 0,75 % para poder inocularlo con la bacteria indicadora mantenido en sobrefusión.

3.4. Medio empleado en los experimentos de transformación genética de *E. coli*.

• **Medio SOC**

Triptona	20,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
NaCl	10,0 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10,0 mM
MgSO <sub>4</sub>	10,0 mM
Glucosa	20,0 mM

El pH se ajustó a 7,2.

3.5. Medios empleados en la conservación de organismos.

Para la conservación de las cepas durante períodos de tiempo prolongados, se adicionó un volumen de glicerol al 80 % (v/v) a cultivos líquidos en fase logarítmica, manteniéndolos después a -20 ó -70 °C. De esta forma se evita la pérdida de los caracteres genéticos que puede ocurrir durante las sucesivas resiembras. Para el uso rutinario, las cepas se inocularon y crecieron en tubos de agar inclinado o en placas de Petri con los respectivos medios sólidos y se mantuvieron a 4 °C. Estos cultivos fueron resembrados periódicamente a partir de las cepas conservadas en glicerol.

3.6. Antibióticos.

Los antibióticos se añadieron a los medios de cultivo a partir de soluciones concentradas (x 1000). La ampicilina (Ap) (Sigma-Aldrich) se disolvió en agua a razón de 50 mg/ml, esterilizando la solución mediante filtración a través de membranas de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore). El cloramfenicol (Cm) (Sigma-Aldrich) se disolvió en etanol (50 % v/v) a razón de 20 mg/ml y la eritromicina (Em) (Sigma-Aldrich) se disolvió en etanol a razón de 6 mg/ml.

### 3.7. Enzimas y reactivos.

En la realización de este trabajo se han usado distintas enzimas con actividad endoproteasa, obtenidas en forma liofilizada, y que fueron conservadas a -20 °C. Para su uso, cada una de ellas fue pesada en una balanza de precisión regularmente equilibrada, tras alcanzar temperatura ambiente, y disuelta en un tampón específico, dividida en alícuotas y congelada hasta su uso. La concentración de cada una de ellas se calculó en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda-20 (Perkin-Elmer, Foster City, CA) realizando el espectro de absorción en el intervalo entre 240 y 320 nm, empleando el coeficiente de extinción molar a 280 nm suministrado por el fabricante. Como blanco se empleó el tampón usado en cada caso para disolver el enzima.

La pepsina (Sigma, St. Louis, MO) fue empleada a una concentración de 0,40 mg/ml en NaCl 0,1 M, pH 3,0. La termolisina (Sigma, St. Louis, MO) se usó a una concentración de 0,48 mg/ml en tampón Tris-HCl (Fluka, Buchs, Suiza) 50 mM CaCl<sub>2</sub> (Fluka) 5 mM, pH 7,5. Una variante modificada para secuenciación de la tripsina suministrada por Promega (Madison, WI), se empleó a una concentración de 0,50 mg/ml y se disolvió, siguiendo las instrucciones del fabricante, en el tampón suministrado por el mismo. La proteinasa K (Sigma St. Louis, MO) se usó a una concentración de 0,50 mg/ml en 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5. La endoproteinasa Glu-C (V8, Sigma, St. Louis, MO) se usó a una concentración de 0,50 mg/ml en ácido acético 50 mM. Para preparar todas estas disoluciones se empleó agua MilliQ purificada en un sistema MilliQ Plus (Millipore S.p.A., Milano, Italia).

## **4. Tampones.**

### 4.1 Tampón fosfato sódico pH 5,8-8,0.

El tampón fosfato se utilizó tanto para amortiguar los cambios de pH en los medios de cultivo como para preparar disoluciones de proteínas. Se preparó según lo descrito por Gomori y Sorensen (1955), mezclando

distintas proporciones de la solución X (fosfato ácido disódico 0,2 M) con la solución Y (fosfato diácido monosódico 0,2 M), según el pH deseado, y completando con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml (ver Tabla 3-MM).

Solución X:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M

Solución Y:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,2 M

<b>pH, 25 °C</b>	<b>Solución X (ml)</b>	<b>Solución Y (ml)</b>
<b>5,8</b>	4,00	46,00
<b>6,0</b>	6,15	43,85
<b>6,2</b>	9,25	40,75
<b>6,4</b>	13,25	36,75
<b>6,6</b>	18,75	31,25
<b>6,8</b>	24,50	25,50
<b>7,0</b>	30,50	19,50
<b>7,2</b>	36,00	14,00
<b>7,4</b>	40,50	9,50
<b>7,6</b>	43,50	6,50
<b>7,8</b>	45,75	4,25
<b>8,0</b>	47,35	2,65

**Tabla 3-MM. Proporción de las soluciones X e Y necesaria para la preparación del tampón fosfato fosfato sódico a diferentes pHs.**

## **5. Técnicas de manipulación de ADN.**

### **5.1. Técnicas de aislamiento de ADN plasmídico.**

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizaron diversos métodos que se describen a continuación, dependiendo de la especie bacteriana de la que se quisiera obtener el ADN, del grado de pureza requerido, de la cantidad de ADN precisada y del tamaño del plásmido a aislar.

5.1.1. Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala (minipreparaciones).

- Minipreparaciones en *Escherichia coli*.

Para el aislamiento y análisis de plásmidos a pequeña escala, tras una clonación se empleó el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Dolly (1979), con algunas modificaciones:

-Se obtuvieron cultivos de una noche en medio LB, adicionados de los antibióticos correspondientes e incubados en agitación a 37 °C. De cada cultivo se tomaron 1,5 ml y se centrifugaron (14.000 rpm, 2 min) para recoger las células.

-A continuación, las células se resuspendieron en 200 µl de solución I.

-La lisis se efectuó añadiendo 200 µl de solución II y agitando suavemente por inversión. Se dejó incubar la mezcla 5 min a temperatura ambiente.

-Después se añadieron 200 µl de solución III para neutralizar el lisado y se mezcló por agitación suave.

-El ADN cromosómico y los restos celulares se eliminaron centrifugando a 14.000 rpm durante 10 min.

-El sobrenadante, que contenía mayoritariamente ADN plasmídico, se transfirió a un nuevo tubo y se precipitó con 0,8 volúmenes de isopropanol durante 10 min en hielo.

-El ADN plasmídico se recogió por centrifugación durante 10 min a 14.000 rpm y se lavó con etanol al 70 %. Una vez seco, el ADN se resuspendió en 40 µl de agua bidestilada o tampón TE estériles.

### **Solución I**

Glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl	25 mM
pH 8,0	

### **Solución II**

NaOH	0,2 M
SDS	1,0 % (p/v)

**Solución III**

Acetato sódico 3,0 M  
pH 4,8

**Tampón TE**

Tris-HCl 10 mM  
EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM  
pH 7,4

•Minipreparaciones en *Lactococcus*.

La técnica empleada se basó en el método de Anderson y McKay (1983), con algunas modificaciones:

- La cepa a analizar se inoculó en 5 ml de medio BHI, adicionado del antibiótico correspondiente, incubándose durante una noche a 37 °C.
- A partir de este cultivo, se inocularon (4 % v/v) 10 ml de medio y se incubaron durante 4 ó 5 h a la misma temperatura.
- Tras centrifugar los cultivos (14.000 rpm, 2 min) las células se lavaron con 1 ml de tampón TE.
- El sedimento se resuspendió en 458 µl de solución A, y tras añadir 115 µl de una solución extemporánea de lisozima (10 mg/ml en Tris-HCl 25 mM, pH 8,0), se incubó a 37 °C durante 30 min.
- La lisis se desencadenó mediante la adición de 58 µl de EDTA 250 mM, pH 8,0 y de 35 µl de solución de lisis, agitando suavemente por inversión e incubando a 37 °C durante 5-10 min.
- El ADN cromosómico se desnaturalizó añadiendo 35 µl de una solución de NaOH 3 M recién preparada.
- Tras realizar suaves inversiones durante 10 min, el lisado se neutralizó añadiendo 60 µl de Tris-HCl 2M, pH 7,0, preenfriado en hielo, y agitando suavemente durante 3 min.
- El ADN cromosómico, ya parcialmente desnaturalizado, se precipitó adicionando 86 µl de NaCl 5 M.
- A continuación se añadieron 700 µl de fenol equilibrado y saturado con NaCl (3% p/v-Tris-HCl 100 mM, pH 8,0) y se centrifugó durante 10 min a 14.000 rpm.



- La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo donde se retiraron los residuos de fenol mezclando con igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).
- A la fase superior (acuosa) se le añadió un volumen igual de isopropanol (preenfriado a -20 °C), manteniéndose a -20 °C durante 2 h (como mínimo) o a -70 °C durante 30 min, para precipitar el ADN plasmídico.
- A continuación se centrifugó durante 10 min a 14.000 rpm para recoger el precipitado, que se lavó con 1 ml de etanol al 70 % frío. Una vez seco, el ADN se resuspendió en 20-25 µl de agua bidestilada o tampón TE estériles.

### **Tampón TE**

Tris-HCl	10 mM
EDTA-Na <sub>2</sub>	1 mM
pH 7,4	

### **Solución A**

Sacarosa	6,7 % (p/v)
Tris-HCl	50 mM
EDTA-Na <sub>2</sub>	1 mM
pH 8,0	

### **Solución de lisis**

SDS	20 % (p/v)
Tris-HCl	50 mM
EDTA-Na <sub>2</sub>	20 mM

#### 5.1.2. Extracción rápida de ADN.

En ocasiones se empleó una técnica de extracción rápida de ADN total para su amplificación por PCR:

- Las células procedentes de 0,5 ml de cultivo, o bien una colonia, se resuspendieron en 20 µl de una solución de SDS al 0,25 % y NaOH 50 mM.
- Se incubó 5 min a 95 °C y se dio un pulso de centrifuga tras ese tiempo.
- Se añadieron 180 µl de H<sub>2</sub>O y se agitó bien.

- La mezcla se centrifugó durante 5 min a 13.000 rpm.
- El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo y se congeló a -20 °C. Para realizar una PCR se tomó una alícuota de 0,7-1 µl.

### 5.1.3. Extracción mediante preparado comercial.

Cuando fue necesario disponer de ADN plasmídico de gran pureza, se utilizó el sistema QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN, siguiendo las indicaciones del fabricante. Este ADN se empleó para reacciones posteriores de secuenciación y/o clonación.

## 5.2. Técnicas de análisis de ADN.

### 5.2.1. Electroforesis en gel de agarosa.

La separación y visualización de plásmidos, fragmentos de restricción o productos de PCR, se realizó mediante electroforesis sumergida horizontal en gel de agarosa de baja electroendósmosis (tipo 1A, Sigma) a la concentración apropiada (0,7-1,5 %), según el tamaño de los ADNs a resolver. El tampón de la electroforesis fue TAE (1x). Los geles se desarrollaron utilizando los sistemas Mini-Sub Cell GT y Wide Mini-Sub Cell GT (BioRad).

Las muestras fueron mezcladas con solución de carga (1/10 de su volumen) y se depositaron en los pocillos del gel, aplicando a continuación un voltaje constante de 5-10 V/cm, hasta que el indicador de frente llegó al borde del gel. Una vez terminada la electroforesis, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) (1 µg/ml en agua destilada) durante 10-15 min. Tras lavar en agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio, el ADN se visualizó por exposición a la luz ultravioleta (302 nm) en un transiluminador Spectroline (modelo TS-302).

Para conocer el tamaño aproximado de los ADNs presentes en las muestras sometidas a electroforesis, se utilizaron como patrones los fragmentos de restricción *Hind*III del fago λ (BioRad) o los del marcador 100 pb DNA ladder (Biotools). Los geles fueron fotografiados con una videocámara UVP ImageStore 5000.

### Tampón TAE (50x)

Tris base	242,0 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA-Na <sub>2</sub> 0,5 M, pH 8,0	100,0 ml
Agua destilada hasta 1 litro	

### Solución de carga (10x)

Glicerol	50 %
TE	49,75 %
Azul de bromofenol	0,25 %

### 5.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

La electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 5% se utilizó para resolver fragmentos de ADN de tamaño muy pequeño (100-200 pb). Como patrón de pesos moleculares se usó el marcador 100 pb DNA Ladder (Biotools). La electroforesis se desarrolló utilizando el sistema Mini-PROTEAN II (BioRad). Las muestras se mezclaron con solución de carga (1/10 de su volumen) y se depositaron en los pocillos del gel, aplicando a continuación un voltaje constante de 100 V, hasta que el indicador de frente llegó al borde del gel. Se empleó TBE (1x) como tampón de la electroforesis.

### Composición de los geles

Acrilamida:Bisacrilamida (29:1)	1,7 ml
Persulfato amónico (10% p/v)	80,0 µl
TEMED	4,0 µl
TBE (10x)	1,0 ml
Agua destilada	7,2 ml
Volumen total	10,0 ml

Los geles fueron coloreados sumergiéndolos durante aprox. 2 min en una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml en agua destilada) y visualizados y fotografiados según se indica en el apartado anterior.

### Tampón TBE (10x)

Tris base	108 g
Ácido bórico	55 g

EDTA-Na <sub>2</sub> 0,5 M, pH 8,0	40 ml
Agua destilada hasta 1 litro	

5.2.3. Purificación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa.

La purificación de fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa se realizó mediante el kit “Perfectprep Gel cleanup kit” siguiendo las instrucciones del fabricante (Eppendorf). Para ello, la banda a purificar a partir de un gel de agarosa, se cortó con un bisturí y posteriormente se solubilizó el trozo de agarosa con una solución concentrada de NaI y a partir de aquí se purificó mediante una resina de sílice del propio kit.

5.2.4. Determinación de la concentración de ADN.

La determinación de la concentración de ADN de una solución se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico descrito por Sambrook *et al.* (1989). Las medidas de absorbancia se efectuaron en un espectrofotómetro Pharmacia LKB Ultraespec III. Se determinó la absorbancia de la solución de ADN a 260 y 280 nm utilizando como blanco agua destilada o TE, dependiendo del disolvente utilizado en la disolución del ácido nucleico. La concentración de la muestra se calculó respecto al valor estándar de  $A_{260}=1$  para soluciones que contienen 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ADN de cadena doble. La relación  $A_{260}/A_{280}$  sirvió para comprobar la pureza de la preparación, considerándose que valores por debajo de 1,8 son indicadores de contaminación por proteínas y/o fenol.

En el caso de oligonucleótidos sintéticos, la concentración molar de ADN de la muestra se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C = (A / 0,01 \times N) \times f, \quad \text{siendo}$$

C: concentración de ADN ( $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )  
A: absorbancia de la muestra a 260 nm  
N: número de bases del oligonucleótido  
f: factor de dilución.

Para estimaciones menos precisas o con muestras de baja concentración, se empleó el método de la comparación de la fluorescencia emitida bajo luz ultravioleta de la muestra desarrollada en un gel de agarosa y teñida con bromuro de etidio con la del ADN del fago lambda digerido con *Hind*III, empleado como marcador de tamaño y concentración conocidos.

### 5.2.5. Eliminación del ARN en soluciones de ADN.

El ARN contaminante que pudiera interferir con la detección de fragmentos de ADN en los geles de agarosa se eliminó añadiendo ribonucleasa A libre de ADNasa (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 40 µg/ml, dejando actuar 10-15 min a 37 °C. La ARNasa se eliminó de la solución de ADN añadiendo a la mezcla un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), centrifugando 1 min a 14.000 rpm y precipitando la fase acuosa como se describe en el apartado siguiente.

La ARNasa se preparó a una concentración de 10 mg/ml en tampón TE y se hirvió durante 15 min para eliminar la posible ADNasa presente en la solución. Una vez que la solución se enfrió a temperatura ambiente, se hicieron alícuotas que se guardaron a -20 °C.

### 5.2.6. Precipitación del ADN.

Cuando fue necesario concentrar muestras de ADN, se añadió a la solución acetato sódico 3 M, pH 5,2 (1/10 del volumen de partida) y 2 volúmenes de etanol absoluto (preenfriado a -20 °C). Tras mantener la mezcla >60 min a -20°C, el ADN precipitado se recogió por centrifugación durante 10 minutos a 14.000 rpm, lavándose posteriormente con 1 ml de etanol al 70 %. Una vez seco, se disolvió en un volumen adecuado de agua o tampón TE.

### 5.2.7. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.

La digestión del ADN con enzimas de restricción se realizó con los tampones y las condiciones óptimas de incubación indicadas por los proveedores para cada enzima. Las reacciones contenían por lo general 0,1-5 µg de ADN, 0,1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente (10 veces concentrado), y 0,5-10 unidades del enzima, en volúmenes finales de 10-30 µl completados con agua bidestilada estéril. Las mezclas de las digestiones se incubaron entre 1 y 5 h a la temperatura indicada por el fabricante.

Cuando el fabricante desaconsejaba la digestión con múltiples enzimas de restricción en un solo paso, las digestiones dobles o triples se realizaron en distintas fases. En primer lugar, se digirió con el enzima activo a una concentración de NaCl más baja, y después se añadió la cantidad apropiada para el siguiente enzima. Alternativamente, se purificaron los fragmentos de restricción a partir de geles de agarosa para ser digeridos a continuación por el siguiente enzima. Las enzimas de restricción utilizadas y sus tampones correspondientes fueron suministrados por Roche Applied Science, Fermentas o Amersham Biosciences.

## 5.3. Técnicas para la ligación de fragmentos de ADN.

### 5.3.1. Desfosforilación del vector de ligación.

El objetivo de la desfosforilación es eliminar el extremo 5'-fosfato del vector digerido, evitando así su recircularización, con el fin de aumentar la eficiencia de clonación. Para ello, 1 µg de ADN del vector digerido se mezcló con 1 unidad del enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Roche Applied Science) hasta un volumen de 100 µl, y se incubó durante 30 min a 37 °C. Tras dos fenolizaciones sucesivas, el ADN se extrajo con cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 5,2. El precipitado, lavado con etanol al 70 %, se secó al vacío y se resuspendió en el volumen de agua bidestilada o de tampón TE apropiado para lograr una concentración final de 20-30 ng/µl.

### 5.3.2. Ligación del ADN.

Para la ligación de moléculas de ADN se generaron fragmentos de ADN mediante digestión con los enzimas de restricción apropiados, que originaron extremos compatibles con los sitios de clonación del vector empleado. Se mezclaron el vector linearizado y desfosforilado y el fragmento de ADN purificado procedente de la digestión con una o varias enzimas de restricción, en proporción 1:2 ó 1:3. Se añadieron 0,1 volúmenes de tampón de ligación (suministrado por el fabricante) y una unidad de ADN-ligasa del fago T4 (Roche Applied Science), en un volumen final de 10-20  $\mu$ l, y se incubó a 14 °C durante 8-14 h.

Para subclonar fragmentos obtenidos mediante amplificación por PCR en el vector pGEM-T, se empleó el kit pGEM-T Vector System (Promega), siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante o alternativamente el plásmido pCR2.1 (Invitrogen) de acuerdo con el manual.

### 5.3.3. Diálisis de la mezcla de ligación.

En aquellos casos en los que se utilizaron células electrocompetentes, antes de realizar la transformación, la mezcla de ligación se dializó previamente en agua ultrapura y con filtros de nitrocelulosa con 0,025  $\mu$ m de tamaño de poro (Millipore), con el fin de eliminar el exceso de sales que pueden interferir en el proceso de forma negativa.

### 5.4. Amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta técnica se utilizó tanto para verificar la presencia de un gen determinado en los transformantes obtenidos, como para llevar a cabo las mutaciones controladas del gen *as48A* (apartado 5.5.), así como para obtener sondas no radiactivas (apartado 6.3.1.) Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador iCycler 170-8720 (BioRad). La *Taq* ADN-polimerasa fue suministrada por Biotools y los dNTPs por Eppendorf.

La composición general de la mezcla de amplificación fue la siguiente:

ADN molde	10-50 ng
Oligonucleótido 1	2 $\mu$ M
Oligonucleótido 2	2 $\mu$ M
dNTPs (10 mM)	400 $\mu$ M
<i>Taq</i> polimerasa	1 U
Tampón de la <i>Taq</i> polimerasa (10x)	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O ultrapura hasta	50 $\mu$ l

Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes:

1. Desnaturalización inicial: 94 °C, 1 min.
2. 25-30 ciclos en las siguientes condiciones:
  - a) Desnaturalización: 94 °C, 1 min.
  - b) Alineamiento: 1 min a la temperatura adecuada para los oligonucleótidos que actúan como cebadores. La temperatura de esta etapa se calculó restando 2 °C a la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de cada oligonucleótido de acuerdo con la siguiente fórmula (Sambrook *et al.*, 1999):
$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$
También se utilizó el método del Nearest Neighbor (Breslauer *et al.*, 1986; Sugimoto *et al.*, 1996) (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).
  - c) Extensión: 72 °C durante un tiempo que depende de la longitud del fragmento a amplificar (1 min por cada 1 kb).
3. Terminación: 72 °C durante 10 min, para favorecer la extensión de las cadenas parcialmente sintetizadas.

Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria, se varió la concentración de MgCl<sub>2</sub> en el tampón de la *Taq* ADN-polimerasa o se añadió glicerol al 10% (v/v).



### 5.4.1. Purificación de los productos de PCR.

Los productos resultantes de la amplificación mediante PCR fueron purificados utilizando el Accuprep PCR Purification kit (Bioneer), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

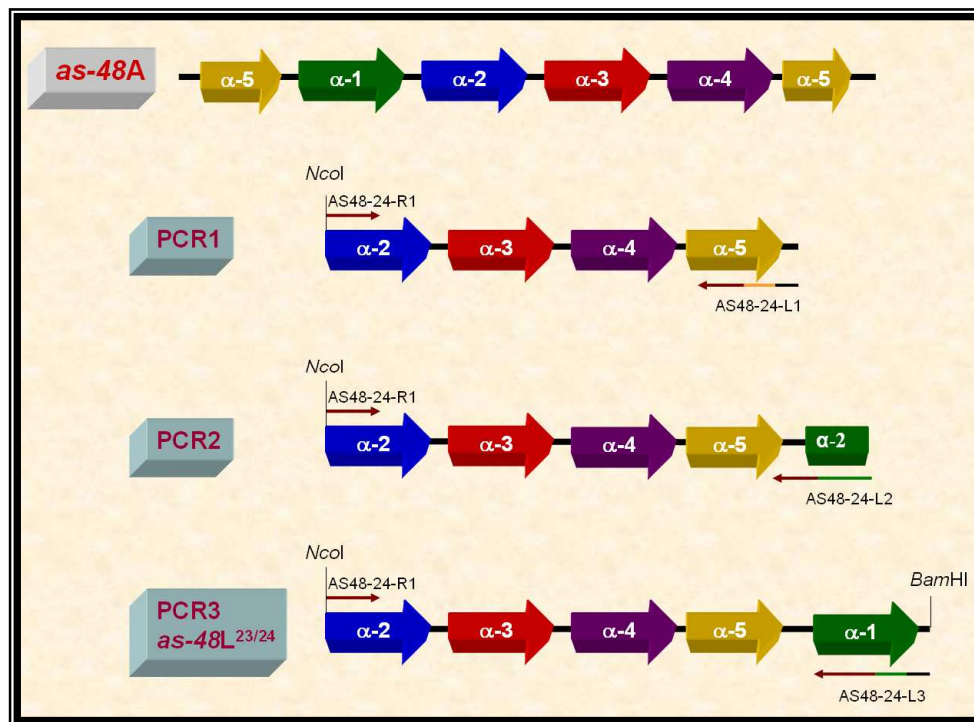
### 5.5. Mutagénesis dirigida mediante el uso de oligonucleótidos.

#### 5.5.1. Permutación circular del gen *as-48A*.

Los distintos genes que codifican variantes lineales de AS-48 fueron construidos mediante permutación circular en la secuencia del gen estructural *as-48A* sin considerar el péptido líder. Esta técnica permite adicionar la secuencia codificante que se quiere permutar en cualquiera de los extremos de un ADN molde empleando oligonucleótidos diseñados con una cola que adiciona las nuevas bases que se quieren permutar y que, por tanto, hibridan parcialmente con el molde. De esta forma, y mediante sucesivas PCRs se puede obtener una nueva secuencia del gen estructural con los sitios de restricción apropiados para su clonación y que codifique una proteína con los aminoácidos cambiados de posición.

Como se muestra en la figura 1-MM, tras las sucesivas PCRs realizadas en las condiciones descritas en el apartado 5.4, la secuencia del gen *as-48A* resulta permutada. Simultáneamente se introduce un sitio de corte *Nco*I y el codon ATG en el extremo 5' y un sitio *Bam*HI y el codon stop TAA en el extremo 3'.

Para las construcciones *as-48L*<sup>23/24</sup> y *as-48L*<sup>48/49</sup> se emplearon como molde de la primera PCR el vector pBGD12S y, por orden, las parejas de cebadores AS48-24-R1xAS48-24-L1, AS48-24-R1xAS48-24-L2, y AS48-24-R1xAS48-24-L3 para *as-48L*<sup>23/24</sup> y AS48-49-R1xAS48-49-L1, AS48-49-R2xAS48-49-L1, AS48-49-R3xAS48-49-L1, y AS48-49-R4xAS48-49-L1 para *as48L*<sup>48/49</sup>. En el caso de *as48L*<sup>10/11</sup> y *as48L*<sup>43-27</sup> se empleó pBAT-L<sup>23/24</sup> y pBAT-L<sup>48/49</sup> respectivamente y las parejas de oligonucleótidos AS48-11-R1xAS48-11-L1, AS48-11-R1xAS48-11-L2, y AS48-11-R1xAS48-11-L3, para *as48L*<sup>10/11</sup> y AS48-43-R1xAS48-43-L1 y AS48-43-R1xAS48-43-L2 para *as48L*<sup>43-27</sup>.

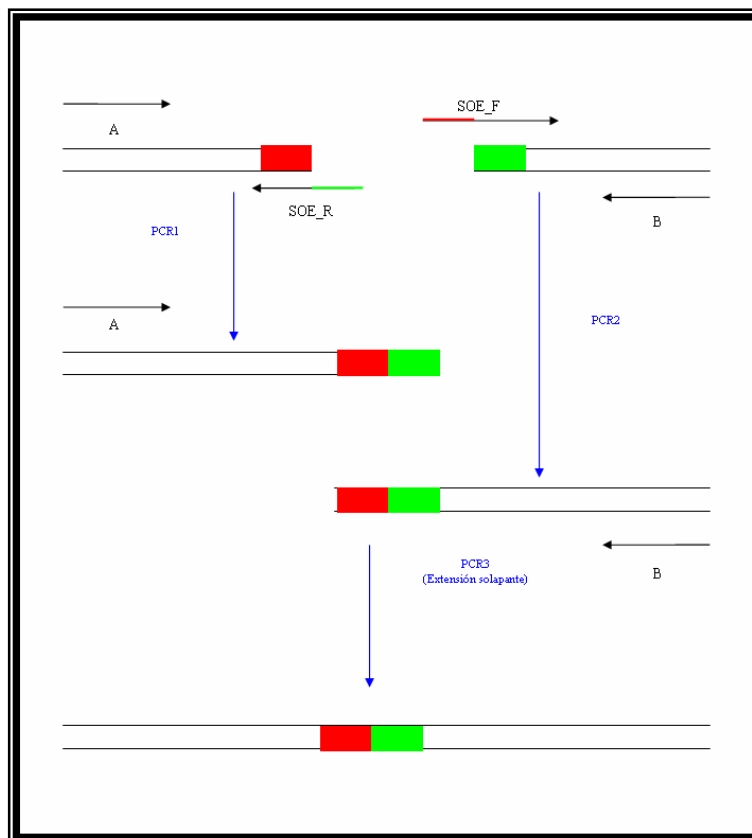


**Figura 1-MM. Construcción del gen *as-48L<sup>23/24</sup>* mediante permutación circular.**  
En cada PCR se indica el par de cebadores empleados.

### 5.5.2. Método de extensión por fragmentos solapados.

Para la fusión del promotor  $P_{nisA}$  -inducible por nisina- y el péptido líder de la Usp45/Lactoccina A con las variantes permutadas del gen *as-48A* se empleó el método de extensión por fragmentos que se solapan (Higuchi *et al.*, 1988; Ho *et al.*, 1989). Este método se basa en la utilización de cuatro cebadores, dos de los cuales contienen secuencias parcialmente complementarias.

En primer lugar se realizaron dos reacciones de PCR paralelas, una utilizando los cebadores pAD1 y SOE\_R (este último complementario a SOE\_F), y otra utilizando los cebadores SOE\_F y pL\_R (donde SOE\_F es complementario a SOE\_R). De esta forma se generaron dos fragmentos de ADN que tenían una secuencia común en un extremo. Estos dos fragmentos sirvieron simultáneamente de molde y de cebador en una mezcla equimolar de ambos en los ciclos iniciales de una tercera reacción de PCR, de modo que se obtuvo un fragmento suma de los dos productos y que se amplificó con los cebadores pAD1 y pL\_R (Figura 2-MM).



**Figura 2-MM. Esquema del método de mutagénesis dirigida por PCR mediante extensión de fragmentos solapados.** Cada reacción de PCR se nombra como PCR1, PCR2 y PCR3, para indicar que son reacciones separadas

Las condiciones que se emplearon para realizar las dos primeras reacciones de PCR fueron: un ciclo a 98 °C durante 30 s, seguido de 5 ciclos a 98 °C, 10 s, 40 °C, 30 s y 72 °C, 15 s; 20 ciclos con una primera etapa a 98 °C, 10 s; 50 °C, 30 s; 70 °C 15 s; y una etapa de terminación a 72 °C durante 10 min. Para la tercera reacción de amplificación, se realizó un ciclo de desnaturalización de 5 s a 98 °C seguido de 25 ciclos de desnaturalización y amplificación (98 °C, 10 s; 50 °C, 30 s y 72 °C, 15 s) utilizando los dos productos de PCR anteriores y los cebadores pAD1 y pL\_R. La polimerasa utilizada en esta amplificación fue 1 U de Phusion ADN polimerasa (Finnyzimes) de alta afinidad.

5.5.3. Adición de la región intergénica entre *as-48A* y *as-48B* a genes permutados.

Para añadir la región intergénica existente entre *as-48A* y *as-48B* a los genes permutados, se diseñó el oligonucleótido RIBamHI (Tabla 4-MM), que contiene un sitio *Bam*HI y parte de la RI justo a partir del codon stop TAA del gen estructural de AS-48. Se realizó una PCR usando RIBamHI y As48-B4 como cebadores y pAM401-81 como molde para generar un producto de aproximadamente 0,5 kb. Las condiciones empleadas fueron de un ciclo de 1 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 s a 50 °C, 45 s a 72 °C, y un ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C. El producto de PCR fue clonado en pGEM-T easy y se seleccionaron distintos clones de *E. coli* MC1022 transformados con la mezcla de ligación para su secuenciación. Una vez verificada la secuencia, se digirió el plásmido recombinante con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, purificándose el fragmento de interés y, por último, se clonó en el vector pBAT-L<sup>10/11</sup> previamente digerido con las mismas enzimas. El producto de esta ligación fue transferido nuevamente a *E. coli* MC1022. El clon de pBAT-L<sup>10/11</sup>Rib apropiado fue transformado en las cepas de expresión citadas en la tabla 1-MM.

5.5.4. Construcción de los genes cíclicamente permutados y fusionados a C-Lytag.

Para la fusión de los genes permutados con el dominio de unión a la colina de la N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa (*lytA*), fue necesario introducir un sitio de corte *Bam*HI en el extremo 5' de cada uno de los genes. En el caso de las construcciones *as-48L*<sup>23/24</sup> y *as-48L*<sup>48/49</sup> se tomaron como molde pBAT-L<sup>23/24</sup> y pBAT-L<sup>48/49</sup> respectivamente, y se introdujo el sitio de restricción por amplificación con un cebador que lo portaba (AS48-24-BamHI x AS48-24-L3 y AS48-49-BamHI x AS48-49-R4) (tabla 4-MM).

El producto de PCR fue clonado en pGEM-T easy y transferido a *E. coli* JM109. Finalmente, el fragmento de interés se subclonó en pALEXa previamente digerido con *Bam*HI. Una vez confirmada la orientación y

validez de la construcción, el plásmido recombinante se introdujo por transformación en *E. coli* REG-1 para los estudios de expresión.

### 5.6. Oligonucleótidos de síntesis empleados.

#### 5.6.1. Diseño de oligonucleótidos para la mutagénesis.

Uno de los aspectos más importantes e influyentes para el éxito de la mutagénesis dirigida es el diseño de los oligonucleótidos empleados, para lo cual se deben seguir una serie de pautas:

- Que los oligonucleótidos tengan entre 30-40 bases.
- Que el porcentaje de G+C esté entre 40-60 % (siendo lo ideal 50%).
- Que se dejen unas 15 bases entre la mutación y el extremo 5', y unas 15-20 hasta el extremo 3'.
- Que se intente dejar siempre una G en el extremo 3', y evitar poner G/A en 5' y T en 3'.
- Que se eviten secuencias de tres o más GC en el final del extremo 3'.
- Que la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del extremo 3' del cebador sea lo suficientemente alta como para que permita buena hibridación con el ADN molde (se consideró suficiente una  $T_m$  de 50 °C).
- Que se procure no introducir secuencias de tres o más repeticiones de un mismo nucleótido.
- Que se evite la formación de estructuras secundarias.

#### ▪ **Oligonucleótidos empleados.**

Los oligonucleótidos empleados en esta Memoria aparecen en la Tabla 4-MM. Los nucleótidos subrayados indican las mutaciones introducidas en la secuencia. Estos oligonucleótidos fueron suministrados por Genotek, Thermo, o Sigma.

Nombre	Secuencia	Utilidad
AS48-24-R1	<u>CCATGGTCACTACTATTGTATCAATTCTTACTGCTGTAGGTAGC</u>	Construcción <i>as-48L</i> <sup>23/24</sup>
AS48-24-L1	<u>TATACCGAACTCTTTAGCCATCCAAGCAATAACTGCTCTT</u> <u>TTTCCTTTTTCTT</u>	
AS48-24-L2	<u>AGTTCCTGCAACTGCTGCTGGTATACCGAACTCTTTAGCC</u> <u>ATCCAAGCAATAAC</u>	
AS48-24-L3	<u>GGATCCTTATCCACCAGCTTCAACTACATTAAGCACAGTT</u> <u>CCTGCAACTGCTGC</u>	
AS48-24-BamHI	<u>GGATCCATGGTCACTACTATTGTATCAATTCTT</u>	
AS48-49-L1	<u>GGATCCTTATCTGTTTGCTGCAGCGAGTAAAGAAAAG</u>	Construcción <i>as-48L</i> <sup>48/49</sup>
AS48-49-R1	<u>GCAGTTATTGCTTGGATGGCTAAAGAGTTCGGTATACCA</u>	
AS48-49-R2	<u>GAAAAAAGGAAAAAGAGCAGTTATTGCTTGGATGGCTAAAG</u>	
AS48-49-R3	<u>TACCTTAAGAAAAGAAATTAAGAAAAAAGGAAAAAGAGCAG</u>	
AS48-49-R4	<u>CCATGGAGTCAATTAAGCATACCTTAAGAAAAGAAA</u>	
AS48-49-BamHI	<u>GGATCCATGGAGTCAATTAAGCATACCTTAAGAA</u>	
AS48-11-R1	<u>AAGCTTGGATCCTTATGCTGCTGGTATACCGAACTCTTA</u>	Construcción <i>as-48L</i> <sup>10/11</sup>
AS48-11-L1	<u>GTTGAAGCTGGTGGATGGGTCCTACTATTGTATCAATTCTTA</u>	
AS48-11-L2	<u>GGAACTGTGCTTAATGTAGTTGAAGCTGGTGGATGGGTCCTA</u>	
AS48-11-L3	<u>GGATCCATGGCAGTTGCAGGAACTGTGCTTAATGTAGTTGAAG</u>	
AS48-43-L1	<u>GCTGCAGCAGGAAGAGAGTCAATTAAGCATACTTAAGA</u>	Construcción <i>as48L</i> <sup>43-27</sup>
AS48-43-L2	<u>GGATCCATGGCTCTCGCTGCAGCAGGAAGAGAGTCAATTA</u>	
AS48-43-R1	<u>AAGCTTGGATCCTTAAGTAGTGACCCATCCACCAGCTTCA</u>	
usp_pSOE_ L23,24_F	<u>TCAGGGGTCTACGCTTGGGTCACTACTATTG</u>	Fusión <i>usp45</i> con <i>as-48L</i> <sup>23/24</sup>
usp_pSOE_ L23,24_R	<u>CAATAGTAGTGACCCAAGCGTAGACCCCTGA</u>	
pL23,24_SmaI_R	<u>CCCGGGTTATCCACCAGCTTC</u>	
usp_pSOE_ L48,49_F	<u>TCAGGGGTCTACGCTGAGTCAATTAAGCATA</u>	Fusión <i>usp<sub>SP</sub></i> con <i>as-48L</i> <sup>48/49</sup>
usp_pSOE_ L48,49_R	<u>TATGCTTTAATTGACTCAGCGTAGACCCCTGA</u>	
pL48,49_SmaI_R	<u>CCCGGGTTATCTGTTGCTGC</u>	
usp_pSOE_L43- 27_F	<u>TCAGGGGTCTACGCTGCTCTCGCTGCAGC</u>	Fusión <i>usp<sub>SP</sub></i> con <i>as-48L</i> <sup>43-</sup>
usp_pSOE_L43-	<u>GCTGCAGCGAGAGCAGCGTAGACCCCTGA</u>	

<b>27_R</b>		27
<b>pL43-27_SmaI_R</b>	<u>CCCGGGT</u> TAAGTAGTGACCCATC	
<b>pSOE_L10,11_F</b>	<u>GAAGCTAACGGAGGAG</u> CAGTTGCAGGAAC	Fusión P <sub>nis</sub> <sup>+</sup>
<b>pSOE_L10,11_R</b>	<u>G TTCCTGCAACTGC</u> T CCTCCGTTAGCTTC	LcnA <sub>SP</sub> <sup>+</sup>
<b>pL10,11_R</b>	TTATGCTGCTGGTATACCG	as48L <sup>10/11</sup>
<b>usp_pSOE_L10,11_R</b>	<u>G TTCCTGCAACTGC</u> AGCGTAGACCCCTGA	Fusión P <sub>nis</sub> <sup>+</sup>
<b>usp_pSOE_L10,11_F</b>	<u>TCAGGGGTCTACGCTG</u> CAGTTGCAGGAAC	usp <sub>SP</sub> <sup>+</sup> as48L <sup>10/11</sup>
<b>pAD1</b>	CCTGAATAATATAGAGATAGGTT	SOE
<b>Reverso Universal</b>	AGCGGATAACAATTTACACAGGA GTTTTCCAGTCACGACGTTGT	Secuenciación
<b>Reverso M13-20</b>	AACAGCTATGACCATG GTAAAACGACGGCCAGT	Secuenciación
<b>Bat-1</b>	AATACGACTCACTATAGGGA	Secuenciación
<b>Bat-2</b>	TGGGATTTAGGTGACACT	
<b>pALEX</b>	GACAGGCCAGAATTCACAGT	Secuenciación
<b>RIBamHI</b>	<u>GGATCC</u> TTTAAACAATATGATAAAAAACAGGAT	Clonación de IR
<b>As48-B4</b>	AATCCTATTACTACAATAA	

**Tabla 4-MM. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.** Aparece subrayada la secuencia que no hibrida en cada caso.

### 5.7. Secuenciación del ADN.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un analizador genético ABI PRISM (ABI 3100, Applied Biosystems, Madrid) perteneciente al Servicio de Secuenciación del Departamento de Genética de la Universidad de Granada.

## **6. Técnicas de manipulación de ARN.**

La manipulación de ARN se realizó extremando las condiciones de limpieza del material, con el fin de evitar la contaminación fortuita con ARNasas. El agua y los tampones empleados fueron tratados con dietil-pirocarbonato al 0,1 % (DEPC, Sigma-Aldrich) durante 4 h y después se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 min. El material de vidrio se esterilizó en un horno Pasteur a 180 °C durante un tiempo mínimo de 4 h.

### 6.1. Extracción del ARN total en *Escherichia coli*.

#### 6.1.1. Extracción mediante Fastprep.

Cuando fue necesario obtener ARN de gran pureza de los diferentes transformantes, se utilizó el Fastprep RNA Pro Blue Kit (Q-BIOgene). Para ello se inocularon al 4%, con un cultivo de una noche, 30 ml de medio precalentado a la temperatura de inducción deseada, con el antibiótico necesario para mantener la presión selectiva y se mantuvo en agitación a 200 rpm hasta una D.O. a 600 nm de 0,5-0,6. En ese momento se adicionó la cantidad deseada de agente inductor y se tomaron alícuotas de 10 ml a intervalos regulares de tiempo. Tras recoger las células mediante centrifugación a 4.000 rpm y 4 °C, se procedió a la extracción de ARN siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

#### 6.1.2. Extracción rápida de ARN de *E. coli*.

Cuando no fue necesaria una gran pureza de la muestra de ARN, se usó un método general de extracción de ARN de bacterias Gram-negativas tomado de Ausubel *et al.* (2002). Se inoculó un matraz de medio fresco precalentado al 4 % con un cultivo de una noche y se mantuvo creciendo a la temperatura deseada hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,5-0,6. En ese momento se añadió el agente inductor y se tomaron muestras de 10 ml a intervalos regulares de tiempo. El cultivo fue centrifugado a 4 °C durante 10 min a 4.000 rpm y el pellet fue resuspendido en 10 ml de tampón I adicionado de 80 µl de lisozima (50 mg/ml) y se incubó en hielo 15 min, centrifugándose posteriormente en las mismas condiciones. El pellet fue



resuspendido en 0,5 ml de tampón de lisis y 15  $\mu$ l de DEPC e incubado a 37 °C durante 5 min. Tras ese tiempo fue enfriado rápidamente en hielo y se añadieron 250  $\mu$ l NaCl 40% (p/v). Pasados 10 min de incubación en hielo se centrifugó a 14.000 rpm 4 °C durante 10 min. El sobrenadante se recogió en tubos de microcentrifuga y finalmente el ARN se precipitó con 1 ml de etanol, incubándose durante 30 min a -70 °C. El ARN se recogió mediante centrifugación en las condiciones anteriores y fue lavado con 500  $\mu$ l de etanol al 70% preenfriado, y una vez seco se resuspendió en agua tratada con DEPC.

### **Tampón I**

Tris HCl pH 8,0	15 mM
EDTA	8 mM
Sacarosa	0,45 M

### **Tampón de lisis**

Tris HCl pH 8,0	10 mM
NaCl	10 mM
Citrato sódico	1 mM
SDS	1,5% (p/v)

#### 6.2. Determinación de la concentración de ARN.

La determinación de la concentración de ARN de una solución se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico descrito por Sambrook *et al.*, (1989). Para ello se determinó la absorbancia de la solución de ARN a 260 nm y 280 nm utilizando como blanco agua tratada con DEPC. Las medidas de absorbancia se efectuaron en un espectrofotómetro Pharmacia LKB Ultraespec III. La concentración de la muestra se calculó respecto al valor estándar de  $A_{260}=1$  para soluciones que contienen 40  $\mu$ g /ml de ARN. La relación  $A_{260} / A_{280}$  sirvió para comprobar la pureza de la preparación, considerándose en el caso del ARN que valores inferiores a 1,8 son indicadores de contaminación por proteínas y/o fenol.

6.3. Transferencia e hibridación de ARN (*Northern Blotting*).

6.3.1. Preparación de sondas no radioactivas marcadas con digoxigenina-11 dUTP mediante PCR.

Las sondas se prepararon mediante amplificación por PCR (apartado 5.4.) y los componentes de la mezcla de amplificación fueron los siguientes:

ADN molde	50 ng
Oligonucleótido 1	2 $\mu$ M
Oligonucleótido 2	2 $\mu$ M
dNTPs-Dig (2 mM)	800 $\mu$ M
Tampón para la <i>Taq</i> polimerasa (10x)	5 $\mu$ l
<i>Taq</i> polimerasa	1 U
Volumen final	50 $\mu$ l

Los dNTPs-Dig fueron suministrados por Roche Applied Science. Finalizada la reacción de marcaje, las sondas fueron purificadas mediante el Accuprep PCR Purification kit (Bioneer).

6.3.2. Sondas empleadas.

Las sondas utilizadas en este trabajo son las recogidas en la Tabla 5-MM. Antes de su utilización, las sondas fueron desnaturalizadas calentando a 100 °C durante 10 min, y a continuación se diluyeron en solución de hibridación (2 ml de solución de hibridación + 20  $\mu$ l de sonda a 8-10 ng/ $\mu$ l).

<b>Sondas as-48</b>	<b>Oligonucleótido 1</b>	<b>Oligonucleótido 2</b>	<b>Tamaño</b>
<b>L23/24</b>	AS48-24-R1	AS48-24-L3	230 pb
<b>L48/49</b>	AS48-49-L1	AS48-49-R4	233 pb
<b>L10/11</b>	AS48-11-R1	AS48-11-L3	230 pb
<b>L43-27</b>	AS48-43-L2	AS48-43-R1	185 pb

**Tabla 5-MM. Sondas utilizadas en las hibridaciones ADN-ARN.**

6.3.3. Electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa con formaldehído.

Los ARNs presentes en cada muestra se separaron mediante electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa adicionado de formaldehído. Antes de cargar la muestra en el gel, el ARN se desnaturalizó calentando a 55 °C durante 15 min en presencia de formamida y formaldehído en la siguiente proporción:

ARN (10µg)	6,00 µl
Tampón MOPS (10x)	2,50 µl
Formaldehído 37%	4,35 µl
Formamida desionizada	12,50 µl
Volumen final	25,00 µl

Una vez desnaturalizadas las muestras, se le añadieron 2,5 µl de solución de carga.

**Solución de carga (10x)**

Glicerol	50 %
TE	49,75 %
Azul de bromofenol	0,25 %

La electroforesis fue realizada en una cubeta Hoeffler con 30 ml de capacidad, con la composición del gel que se detalla a continuación:

<b>Composición gel</b>	Para 100 ml	Para 30 ml
10xMOPS	10 ml	3 ml
H <sub>2</sub> O	87 ml	26 ml
Agarosa	1,2 g	0,36 g

Una vez fundida la agarosa se añadió:

Formaldehído 37%	3 ml	0,9 ml
------------------	------	--------

El tampón utilizado en la electroforesis fue 1 x MOPS, adicionado de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio.

**MOPS (10X)**

MOPS pH 7,0	41 g
NaAc 3 M	16,6 ml
EDTA 0,5 M pH 8	20,0 ml
Agua	800,0 ml

La electroforesis se desarrolló a un voltaje de 70-80 V durante 90 min a 4 °C. Finalizada la electroforesis, las bandas de ARN-r se visualizaron en un transiluminador disponiendo previamente un plástico protector debajo del gel y otro para marcar el frente, los pocillos y las bandas de referencia correspondientes a los tres ARNr de 23S, 16S y 5S, respectivamente.

#### 6.3.4. Transferencia del ARN a membranas de nylon.

Una vez realizada la electroforesis y visualizadas las bandas de ARN, el gel se lavó con H<sub>2</sub>O-DEPC durante 30 min para eliminar el formaldehído presente, y a continuación se equilibró lavando dos veces con solución 10 x SSC (tratada con DEPC), durante 15 min cada vez. Se cortó una membrana de nylon (HyBond N+, Amersham Biosciences) del tamaño del gel, teniendo la precaución de usar guantes sin talco y pinzas.

Para la transferencia del ARN se colocó un cristal estéril encima de una bandeja con tampón de transferencia 20xSSC. Sobre el cristal se colocó una tira de papel Whatman 3MM lo suficientemente larga como para sumergirse en el reservorio de tampón de transferencia. A continuación se depositaron una serie de capas en este orden: tres piezas de papel Whatman 3MM, el gel, la membrana de nylon, cuatro piezas de papel Whatman 3MM y un bloque de papel de filtro de aproximadamente 5 cm de grosor. Para mantener ligeramente comprimido el sistema se colocó sobre él un peso adecuado (aprox. 0,5 kg). El sistema se dejó transfiriendo durante una noche. Finalizada la transferencia, se marcó la membrana haciendo un corte en el extremo superior izquierdo, y el ARN se fijó a la misma por exposición a la luz UV (320 nm) durante 5 min.

#### **20 x SSC**

NaCl	3,0 M
Citrato sódico	0,3 M
pH 7,0	

### 6.3.5. Prehibridación e hibridación ADN-ARN.

La membrana de nylon se incubó a 55 °C en un horno de hibridación (Shel Lab, mod. 1004) con 10 ml de solución de hibridación (2ml/10cm<sup>2</sup>) en una bolsa sellada, durante al menos 2 h. Posteriormente, esta solución fue sustituida por 2 ml de una nueva solución de hibridación conteniendo la sonda marcada y desnaturalizada (100-200 ng), incubándose a 55 °C durante toda la noche. Esta solución puede ser congelada a -20 °C y reutilizarse posteriormente (para ello, hay que calentarla a 68 °C durante 10 min).

Finalizada la hibridación, y para eliminar la sonda no unida, la membrana se lavó dos veces durante 5 min a temperatura ambiente con 2 x SSC-SDS 0,1 %, y otras dos veces a 68 °C con solución de lavado (0,1 x SSC-SDS 0,1 %) durante 15 min.

#### **Solución de hibridación (250 ml)**

Formamida	25,0 ml
30 x SSC	41,5 ml
Fosfato sódico 1M	12,5 ml
N-lauril sarcosina 10%	2,5 ml
Reactivo Bloqueo al 1%	50,0 ml
SDS	17,5 g

### 6.3.6. Revelado inmunológico.

Todo el proceso de revelado inmunológico se realizó siguiendo las instrucciones del sistema de revelado DIG Luminiscent detection (Roche Applied Science). La membrana se saturó previamente con 50 ml de tampón I durante 5 min en agitación. Posteriormente fue incubada con 20 ml de tampón II (tampón I + agente de bloqueo) durante 30 min. Transcurrido este tiempo se adicionaron 3,3 ml del tampón II con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche Applied Science) (dilución 1:10.000) en una bolsa sellada y se incubó durante 30 min a 37 °C. El exceso de anticuerpos no incorporados fue eliminado mediante 2 lavados con 100 ml de tampón I durante 15 min en agitación. Finalmente, la membrana se equilibró con 20 ml de tampón III

durante 2 min, y después se adicionó 1 ml de tampón III con 10 µl de CSPD (Roche Applied Science), manteniéndolos durante 5 min a 37 °C en la oscuridad. Una vez seca la membrana con papel de filtro, se situó entre dos láminas de plástico y se dejó 5-10 min a 37 °C en oscuridad. Tras ese tiempo, se impresionó por contacto una película autorradiográfica Kodak X-OMAT entre 30 min-4 h, revelándose posteriormente. Para el revelado la película se dejó 1 min en una solución de revelador, 4 min en la solución de fijador y se lavó con agua abundante.

**Tampón I (5x)**

Ácido maleico	0,50 M
NaCl	0,75 M
pH 7,5	
Tween-20*	1,5 %

\* Se añadió precalentado una vez diluido el tampón

**Tampón II**

Reactivo de bloqueo al 1% en Tampón I diluido

**Tampón III (pH 9,5)**

Tris-HCl	0,10 M
NaCl	0,10 M

**Reactivo de bloqueo (10 x)**

10 g de reactivo de bloqueo (Roche Applied Science) diluidos en 100 ml de tampón I

6.3.7. Estimación del tamaño de los ARNs.

El tamaño de los diferentes tipos de ARNm detectados en los experimentos de Northern blotting, se determinó mediante la comparación de su migración en los geles de agarosa con la de los correspondientes ARN-r: 5S (120 b), 16S (1.540 b) y 23S (2.900 b).

6.4. Detección de ARN mensajero por RT-PCR.

El análisis de expresión fue analizada también mediante RT-PCR. Para ello, el ARN se purificó mediante el Fast RNA Pro Blue kit (Q-Biogen,

MP Biomedicals) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez purificado se trató con ADNasa I libre de ARNasa (Roche Diagnostics) durante 60 min a 37 °C, con el fin de eliminar de la muestra el ADN contaminante, y que fue confirmado mediante amplificación por PCR con los oligonucleótidos Bat-1 y Bat-2 (tabla 4-MM).

El análisis mediante RT-PCR se realizó en dos etapas. En la primera, se sintetizó el ADNc, y posteriormente se amplificó por PCR con los cebadores adecuados. En ambos casos se tomaron los pares de cebadores empleados en la última PCR para la construcción de cada gen permutado. El ARN (500 ng) y los cebadores (10 pmol) fueron mezclados y desnaturalizados durante 5 min a 70 °C y luego se les añadió la mezcla de reacción que consta de: 4 µl de tampón de la reversotranscriptasa (Gibco), 0,1 mg/ml de BSA, 1 µM de DTT, 500 µM de cada dNTP, 40 U de retrotranscriptasa y se completó con agua hasta un volumen final de 20 µl. La reacción se mantuvo a 37 °C durante 60 min para permitir la síntesis de ADNc. 1 µl del producto fue usado posteriormente como molde para una PCR en las condiciones descritas en el apartado 5.5.1. para la construcción de los genes permutados. El producto final fue analizado mediante electroforesis.

## **7. Transformación genética de microorganismos.**

7.1. Transformación de *E. coli* mediante el método del cloruro de calcio.

Se empleó el método descrito por Sambrook *et al.* (1989).

### 7.1.1. Preparación de células competentes.

Se partió de un cultivo de *E. coli* crecido en medio LB a 37 °C en agitación durante una noche. Este cultivo se diluyó 50 veces en medio fresco y se incubó a 37 °C en agitación, hasta alcanzar la fase exponencial temprana del crecimiento ( $A_{590} = 0,5$ ). A partir de ese momento se trabajó en frío (4 °C) para aumentar la eficiencia de la transformación.

- Las células se mantuvieron en un baño de hielo durante 10 min y se recogieron por centrifugación (4.000 rpm, 10 min, 4 °C).
- A continuación se resuspendieron en un volumen de una solución preenfriada de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se centrifugaron en las mismas condiciones.
- El sedimento se resuspendió suavemente en un volumen de una solución preenfriada de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 y 50 mM de CaCl<sub>2</sub>, manteniéndose en hielo durante 15 min.
- Tras una nueva centrifugación, en las mismas condiciones, las células fueron resuspendidas en 0,04 volúmenes de una solución de Tris-HCl 10 mM, 50 mM de CaCl<sub>2</sub> y glicerol al 20 %.
- Esta suspensión se repartió rápidamente a razón de 100 µl/tubo en tubos eppendorf preenfriados, se congelaron sumergiendo en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70 °C hasta su uso.

#### 7.1.2. Transformación.

- Se mezclaron 100 µl de células competentes, previamente descongeladas en hielo, con 20-50 ng de ADN plasmídico libre de sales o bien de una mezcla de ligación, y se incubaron en hielo durante 20 min.
- A continuación, las células se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 2 min.
- Para conseguir la expresión fenotípica de los genes de resistencia a antibióticos codificada por el plásmido introducido, se añadieron inmediatamente 900 µl de medio LB a las células, que se mantuvieron durante 5 min en hielo, y posteriormente 1 h a 37 °C en agitación.
- La selección de los transformantes se realizó sembrando la suspensión celular en placas de LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado. Las placas se incubaron a 37 °C hasta la aparición de colonias. Paralelamente se llevaron a cabo experimentos control sin la adición de ADN.



Cuando se transformó con productos de PCR clonados en el vector pGEM-T, se añadieron al medio 40  $\mu$ l (20 mg/ml) de X-Gal disuelto en N,N'-dimetilformamida. Los transformantes se seleccionaron en función del color de la colonia: las transformadas con vector conteniendo el ADN foráneo mostraron un color blanco, ya que llevaban el gen *lacZ* del vector interrumpido y no pudieron degradar el X-Gal para formar un compuesto de color azul, que apareció en las colonias en las que el ADN foráneo no se clonó en el vector.

### 7.2. Electroporación de *Escherichia coli*.

#### 7.2.1. Preparación de células electrocompetentes.

Se partió de un cultivo en fase estacionaria de *E. coli* con el que se inoculó (2 %) medio LB, que se dejó crecer a 37 °C en agitación hasta alcanzar una  $A_{590} = 0,6-0,8$ . Entonces las células fueron recogidas por centrifugación a 4.000 rpm durante 10 min a 4 °C y se lavaron 3 veces a esta misma temperatura con volúmenes decrecientes de agua destilada preenfriada (1, 0,5, y 0,01 volúmenes, respectivamente). En la última centrifugación, las células se resuspendieron en 0,002 volúmenes de glicerol estéril al 10 % y se alicuotaron a razón de 50  $\mu$ l en tubos eppendorf, siendo seguidamente congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -70 °C hasta el momento de su uso.

Alternativamente, para la cepa MC1022, el medio precalentado fue inoculado al 6% con un cultivo de una noche y se mantuvo hasta alcanzar una  $A_{600} = 0,6-0,8$ . Las células fueron recogidas por centrifugación a 4.000 rpm a 4 °C durante 10 min. Posteriormente, el sedimento fue lavado dos veces con un volumen de una solución estéril y fría de glicerol al 10% centrifugando en las condiciones descritas y se resuspendió finalmente en glicerol al 10% en una centésima parte del volumen inicial. La mezcla de células electrocompetentes se repartió en alícuotas de 40  $\mu$ l que fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -70 °C hasta su uso.

### 7.2.2. Electroporación de *E. coli*.

La electroporación se realizó según las condiciones descritas en el protocolo del electroporador Electro Cell Manipulator 600 (BTX Electroporation System) para *E. coli*, utilizando cubetas BTX con 2 mm de distancia entre los electrodos. En la cubeta se mezclaron 1-5  $\mu\text{l}$  de ADN y 40  $\mu\text{l}$  de células electrocompetentes, previamente descongeladas en hielo. La mezcla se dispuso inmediatamente en el electroporador y se aplicó un voltaje de 2,5 kV a una resistencia de 128  $\Omega$  y una capacitancia de 25  $\mu\text{F}$ . A continuación, las células se diluyeron rápidamente en 950  $\mu\text{l}$  de medio SOC frío y se incubaron a 37 °C durante 1 h en agitación para permitir la expresión fenotípica del ADN incorporado. Tras ese período, se sembraron 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana en placas de LB adicionado del antibiótico empleado para la selección, incubando a 37 °C hasta que se observó la aparición de colonias.

En el caso de la cepa MC1022, la resistencia del electroporador se aumentó hasta 200  $\Omega$  y tras adicionar medio SOC frío, se mantuvo en hielo 10 min antes de ponerlo en agitación a 37 °C durante 1 h.

En todos los experimentos se utilizaron como control células electrocompetentes sin transformar incubadas en las mismas condiciones que las electroporadas.

### 7.3. Electroporación de *Lactococcus lactis*.

#### 7.3.1. Preparación de células electrocompetentes.

Para la obtención de células competentes se inocularon al 6% matraces precalentados a 30 °C con 50 ml de GM17 suplementado con un 2,5 % de glicina hasta alcanzar una  $A_{590} = 0,4-0,6$ . A continuación las células se recogieron por centrifugación a 4.000 rpm durante 10 min a 4 °C, y se lavaron con un 1/10 volúmenes de una solución estéril y fría de sacarosa 0,5 M-glicerol 10 % (v/v), recogiendo en las mismas condiciones. Se repitió el lavado y finalmente se resuspendió en 1/100 volúmenes de la misma solución. Se alicuotaron las células a razón de 40  $\mu\text{l}$  en tubos

preenfriados y se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C hasta su uso.

### 7.3.2. Electroporación de *L. lactis*.

La transformación mediante electroporación se realizó utilizando cubetas BTX con 2 mm de distancia entre los electrodos. En la cubeta se mezclaron 1-5 µl de ADN con 40 µl de células electrocompetentes, previamente descongeladas en hielo y se dejó un minuto en hielo. La mezcla se dispuso en el electroporador y se aplicó un voltaje de 2,5 kV, una resistencia de 200 Ω y una capacitancia de 25 µF. Inmediatamente, las células se diluyeron en 960 µl de GM17 suplementado con sacarosa 0,5 M, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM y se mantuvieron 10 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, se incubaron a 30 °C durante 2 h, y después se sembraron en placas de GM17 1,5% de agar adicionado del antibiótico de selección apropiado.

## **8. Detección y valoración de la producción y resistencia frente a**

### **AS-48.**

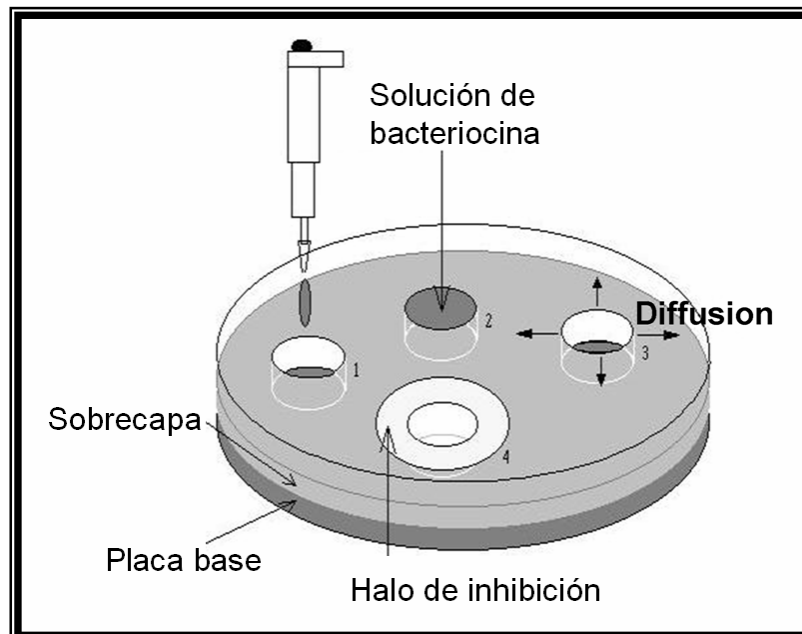
#### 8.1. Técnica de la doble capa.

La técnica de la doble capa (Gratia y Fredericq, 1946) se empleó para detectar la producción de AS-48 y sus variantes en medio sólido (cultivando las cepas productoras en la capa base), así como para detectar la resistencia de distintas bacterias en medio sólido frente a las cepas productoras (inoculando la bacteria a ensayar en la sobrecapa). En una placa de Petri se dispuso una capa base de medio BHI tamponado, sobre la cual se inoculó la bacteria productora, empleando diferentes técnicas de inoculación: 0,1 ml repartidos con la espátula de Digrafsky, para permitir el crecimiento en colonias o bien gotas de 1 µl de cultivo en fase estacionaria de la estirpe productora a ensayar, incubándose a 37 °C durante toda la noche. Una vez crecida la capa base, se cubrió con una sobrecapa de BHA blando (7 ml) mantenida en sobrefusión a 45 °C e inoculada con 0,1 ml de un cultivo de una noche de una bacteria indicadora (sensible a AS-48) o de otra bacteria

cuya sensibilidad frente a AS-48 o frente a las variantes, se quisieran ensayar. Una vez solidificada, se volvió a incubar a la temperatura adecuada durante 18-24 h para permitir el crecimiento de la bacteria inoculada en la sobrecapa, observando entonces la posible aparición de zonas de inhibición del crecimiento en torno a las bacterias crecidas en la capa base y midiendo el diámetro del halo aparecido (mm).

### 8.2. Técnica de las gotas.

Se utilizó para determinar la resistencia frente a AS-48 y frente a las variantes en medio sólido. Sobre una placa que contenía una capa base de MHA-T se vertió una sobrecapa de BHA, o GM17 en el caso de lactococos, blando (7 ml) mantenida en sobrefusión (45 °C), e inoculada con 0,1 ml de la bacteria cuya resistencia se quería ensayar. Una vez solidificada la sobrecapa, se depositaron sobre ella gotas de 5  $\mu$ l con diferentes concentraciones del inhibidor purificado, incubándose posteriormente las placas durante 18-24 h a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria indicadora. La aparición de halos de inhibición del crecimiento en las zonas donde se depositaron las gotas era indicativa de la sensibilidad de la bacteria.



**Figura 3-MM. Técnica de los pocillos.** Se forma un pocillo en una placa cubierta con una sobrecapa de organismo indicador (1) y se rellena con solución de bacteriocina (2), la cual se deja difundir por el agar (3). La incubación del microorganismo sensible dará halos de inhibición visibles (4).

### 8.3. Técnica de los pocillos.

La producción de AS-48 en medio líquido se determinó midiendo la actividad presente en sobrenadantes -mayoritariamente libres de células tras centrifugación de los cultivos a 14.000 rpm durante 10 min- siguiendo la técnica de los pocillos (Tagg y McGiven, 1971; Shillinger y Lucke, 1989). Esta misma técnica se empleó para seguir la actividad de las fracciones purificadas de bacteriocina en las distintas etapas cromatográficas (ver apartado 9). Para ello, sobre una placa de Petri con una capa base de MHA-T con la superficie bien seca, se colocaron cilindros de acero inoxidable estériles (8 mm de diámetro x 1 cm de altura) y se vertió una sobrecapa de BHA blando (7 ml) en sobrefusión a 45 °C inoculada con 0,1 ml de un cultivo en fase estacionaria de la estirpe indicadora. Una vez solidificada la sobrecapa se retiraron los cilindros y, en los huecos (pocillos), se depositaron 100 µl de la muestra líquida a ensayar. A continuación las placas se incubaron durante 18-24 h. a la temperatura adecuada para el crecimiento de la estirpe indicadora y se midió el diámetro del halo de inhibición producido alrededor de cada muestra.

## **9. Purificación de la enterocina AS-48.**

### 9.1. Producción en medio líquido.

La producción de AS-48 en medio líquido se llevó a cabo en matraces con 10 litros de medio complejo (MC) precalentados a 37 °C, antes de ser inoculados (4 %, v/v) con un cultivo en fase estacionaria de la bacteria productora. Tras 7-8 h de incubación a 37 °C, se procedió a la purificación de la enterocina a partir de los cultivos.

### 9.2. Cromatografía de intercambio catiónico.

Se siguió el protocolo descrito por Abriouel *et al.* (2003) y Gálvez *et al.* (1989a), con algunas modificaciones. La bacteriocina presente en los caldos de cultivo se recuperó mediante cromatografía, empleando el intercambiador catiónico débil Carboximetil-Sephadex CM25 (Amersham Biosciences).

La resina de intercambio iónico se reconstituyó en tampón fosfato sódico 0,02 M pH 6,5 durante 24 h a 4 °C y la suspensión fue entonces lavada en un embudo Buchner con dos volúmenes de NaCl 1,5 M y tres volúmenes de tampón fosfato. En estas condiciones, 1 g del producto en polvo originó un volumen final de 9 a 10 ml de gel. Antes de proceder al intercambio iónico, el pH de los cultivos se ajustó a 6,5 con NaOH 0,5 M. Gel y cultivo (sin retirar las células) se mezclaron en proporción 1:40 (v/v) para la adsorción de la molécula nativa AS-48. Después el gel se dejó decantar durante 60 min y, tras retirar el sobrenadante, se lavó y decantó dos veces con agua destilada para eliminar el mayor número de células posible. Seguidamente, el gel fue empaquetado en una columna de vidrio (6 x 50 cm) y lavado con agua destilada hasta retirar todo el material no adsorbido al gel. La elución se realizó con un volumen de gel de NaCl 0,5 M, seguido de dos volúmenes de NaCl 1,5 M (ambos en agua destilada), recogiendo de forma manual fracciones de 40 ml cuya actividad antibacteriana fue ensayada mediante la técnica de los pocillos.

Las fracciones con actividad fueron almacenadas a -20 °C. Los preparados crudos de bacteriocina obtenidos fueron purificados mediante diferentes pasos de cromatografía de fase reversa, según se describe más adelante.

### 9.3. Cromatografía de fase reversa sobre soporte sólido (C18).

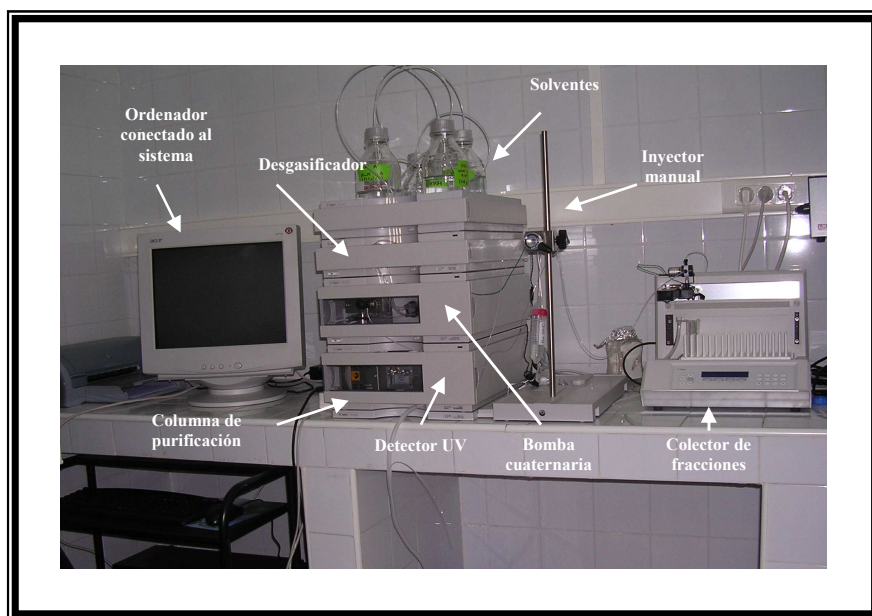
Las fracciones con actividad antibacteriana recogidas mediante intercambio iónico fueron repurificadas mediante cromatografía de fase reversa utilizando para ello cartuchos rellenos de C18, que fueron lavados con acetonitrilo y equilibrados en solvente A. Las muestras se pasaron por el relleno de C18 (5 g) a un flujo moderado de unos 2 ml/min, lavando el material no adsorbido con agua. El material retenido se recuperó eluyendo con 20 ml de solvente B, a diferentes concentraciones (30%, 60%, 90%, 100%) en solvente A. La actividad de las muestras recogidas (fracciones de 5 ml) se ensayó frente a *E. faecalis* JH2-2, y las muestras con actividad fueron congeladas a -70 °C.

**Solvente A:** ácido trifluoroacético (TFA) 10 mM en agua Milli-Q.

**Solvente B:** TFA 4 mM en isopropanol:acetonitrilo (2:1).

#### 9.4. Cromatografía líquida de fase reversa de alta resolución (RP-HPLC).

Para los ensayos que requerían una total pureza de AS-48, las muestras procedentes de cromatografía de fase reversa sobre soporte sólido fueron purificadas a homogeneidad mediante RP-HPLC. Se utilizó un equipo cromatográfico Agilent 1100 Series, provisto de los siguientes módulos (Figura 4-MM): un desgasificador G12379A, un inyector manual G1328B, una bomba cuaternaria de alta presión G1311A y un detector de longitud de onda variable G1314A, controlados desde un sistema informático. Para la recogida de fracciones se utilizó un colector de fracciones Gilson FC203B.



**Figura 4-MM. Esquema del cromatógrafo empleado en la purificación de AS-48.**

Los solventes utilizados en el proceso de purificación fueron los mismos empleados en el apartado anterior, pero esta vez se desgasificaron y filtraron a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore).

**Solvente A:** ácido trifluoroacético (TFA) 10 mM en agua Milli-Q.

**Solvente B:** TFA 4 mM en isopropanol:acetonitrilo (2:1).

#### 9.4.1. Purificación a escala semipreparativa.

Cuando fue necesario purificar gran cantidad de bacteriocina se empleó una columna Vydac 218TP510 (10 x 250 mm; The Separation Group, Hesperia, Calif.) con un relleno tipo C18, de tamaño medio de partícula de 10 micras, y un tamaño de poro de 300 Å. La muestra se aplicó a un flujo de 3 ml/min sobre la columna equilibrada previamente en solvente A. El material no adsorbido sobre la columna se eliminó mediante lavado con solvente A, hasta que la absorbancia a 210 nm del efluente ( $A_{210}$ ) descendió a línea base. El material retenido en la columna fue eluido posteriormente mediante un gradiente lineal compuesto (0-40 % B en 5 min; 40-80 % B en 20 min; 80-100 % B en 5 min), a un flujo constante de 3 ml/min. El efluente de la columna fue recogido en distintas fracciones de acuerdo con los picos de absorbancia (a 280 ó 222 nm) detectados.

#### 9.4.2. Purificación a escala analítica.

Para determinar el grado de pureza de las muestras se utilizó una columna analítica Vydac 218TP54 (4,6 x 250 mm) de igual relleno que la anterior. En este caso, el flujo de trabajo fue siempre de 1,5 ml/min. La elución se llevó a cabo empleando los mismos solventes descritos en el apartado anterior, con un gradiente compuesto de 0 a 30 % de B en 3 min y 30 a 100 % de B en 20 min.

#### 9.5. Liofilización de las muestras.

La concentración de soluciones acuosas de AS-48 y de las variantes, y la eliminación de solventes orgánicos de las muestras procedentes de cromatografía en fase reversa, se llevó a cabo mediante liofilización. Para ello, las muestras, congeladas a -70 °C, se depositaron en una centrífuga SpeedVac (Savant) conectada a un equipo de liofilización (Telstar) compuesto por una trampa de frío y una bomba de vacío. Una vez eliminada el agua y los componentes volátiles de la disolución, los componentes no volátiles quedan como un sólido de baja densidad que



puede ser transportado a temperatura ambiente. La adición de agua o tampón permite recuperar la muestra proteica, en la que además de toda la proteína liofilizada, están presentes las sales del tampón en el que la proteína estaba disuelta.

### 9.6. Diálisis de las muestras.

La diálisis de las disoluciones de bacteriocina se realizó con el fin de eliminar las sales y otros componentes de bajo peso molecular que contuvieran, así como para cambiar las condiciones de la disolución de enterocina purificada para adecuarla al ensayo. Las muestras se sometieron a diálisis a través de una membrana con un límite de exclusión de 2.000 Da (Sigma), durante una noche a 4 °C y en agitación, frente a agua desionizada o tampón (un volumen 10 a 1000 veces mayor al de la disolución de proteína). Tras ese tiempo, se realizó un segundo cambio de la disolución externa que se mantuvo al menos 6 h más a 4 °C.

## **10. Técnicas de análisis de las proteínas.**

### 10.1. Determinación de la concentración de proteínas.

#### 10.1.1. Método de Bradford.

La determinación cuantitativa de proteínas se llevó a cabo por el método descrito por Bradford (1976). Este método implica la unión del colorante azul Coomassie brillante G-250 a las proteínas, lo que provoca un desplazamiento en el máximo de absorbancia del colorante desde 465 nm a 595 nm. Este incremento en la absorbancia a 595 nm sirve para determinar la concentración de proteínas. Se depositaron 100 µl (entre 2 y 20 µg de proteína) de la muestra problema en un tubo de vidrio de 12 x 100 mm y se adicionó 1 ml de la solución de reactivo de Bradford. Una vez agitados vigorosamente los tubos, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente al menos durante 5 min y no más de 1 h. Seguidamente se midió la densidad óptica de la muestra a 595 nm frente a un blanco que consiste en 100 µl de agua destilada y 1 ml de reactivo de Bradford. La cantidad de proteína presente en las muestras ensayadas se dedujo a partir de una

curva estándar obtenida titulando cantidades crecientes (2-20 µg) de albúmina bovina cristalizada (Sigma).

Para la preparación del reactivo de Bradford se disolvieron 100 mg de azul Coomassie brillante G-250 en 50 ml de etanol al 95 %. Se adicionaron 100 ml de ácido fosfórico (85 % peso/volumen), completándose hasta un volumen final de 1 litro con agua destilada. La solución se filtró al menos tres veces a través de un papel de filtro, hasta que perdió la coloración azul.

10.1.2. Determinación de la concentración de AS-48 y de las variantes a partir del coeficiente de extinción molar.

Para determinar la concentración de bacteriocina en las muestras purificadas se aplicó la ley de Lambert-Beer:

$$A = c \cdot \epsilon \cdot d \quad \text{siendo}$$

A= absorbancia, c= concentración,  $\epsilon$ = coeficiente de extinción molar y d= distancia recorrida por la luz a través de la muestra. Los coeficientes de extinción molar de las distintas proteínas fueron determinados según Gill y von Hippel (1989).

10.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE).

Se empleó el procedimiento descrito por Laemmli (1970) en presencia del detergente aniónico dodecil sulfato sódico (SDS). Este agente permite la disociación de agregados supramoleculares de las proteínas durante el proceso de electroforesis. Tal disociación se favorece también por la presencia de agentes reductores, como el 2-mercaptoetanol o DTT, que rompen los puentes disulfuros de las proteínas y permiten la separación de sus subunidades (cuando existen). La disgregación o la solubilización es muy necesaria antes de proceder a la electroforesis para la separación de proteínas multiméricas o asociadas y de gran tamaño que encuentran

muchas dificultades para entrar en el gel, y cuando lo hacen, no pueden separarse satisfactoriamente.

### 10.2.1. Preparación de los geles de poliacrilamida.

Los geles se prepararon con el sistema Mini-PROTEAN II (BioRad). En primer lugar se preparó el gel de desarrollo, sobre el que se depositó el gel de concentración. En ambos casos, se añadió en último lugar persulfato amónico recién preparado y TEMED. Una vez gelificados, los geles se cubrieron con SDS al 0,01 % y se guardaron a 4 °C cuando no fueron utilizados en el momento.

#### **Gel de desarrollo al 15 % de poliacrilamida (10 ml)**

Acrilamida : bisacrilamida (30:0,8)	5,00 ml
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	2,50 ml
SDS al 10%	0,10 ml
Persulfato amónico al 10%	0,10 ml
TEMED	4,0 µl
Agua destilada	2,30 ml

#### **Gel de concentración al 5% de poliacrilamida (10 ml)**

Acrilamida : bisacrilamida (30:0,8)	1,70 ml
Tris-HCl 1 M, pH 6,8	1,25 ml
SDS al 10%	0,10 ml
Persulfato amónico al 10%	0,10 ml
TEMED	10,0 µl
Agua destilada	6,80 ml

### 10.2.2. Condiciones de desarrollo de la electroforesis.

La electroforesis se desarrolló utilizando el sistema Mini-PROTEAN II (BioRad). Las muestras fueron resuspendidas en diversos tampones y se mezclaron con solución desnaturizante (2x) calentando a continuación a 100 °C durante 3 min en tubos eppendorf. Se depositaron 20 µl de

muestra en cada pocillo del gel, y se aplicó un voltaje de 100 V hasta que el indicador del frente alcanzó el cuarto final de la longitud del gel.

Como patrón de peso molecular se empleó una preparación comercial que contiene proteínas estándar de bajo tamaño (Sigma Markers, Low Range; Sigma): aprotinina (6.500),  $\alpha$ -lactalbúmina (14.200), inhibidor de tripsina (20.000), tripsinógeno (24.000), anhidrasa carbónica (29.000), gliceraldehido-3-P-deshidrogenasa (36.000), albúmina de huevo (45.000) y albúmina sérica bovina (66.000).

**Tampón de electroforesis** (mantener a 4°C)

Tris	3,02 g
Glicina	14,41 g
SDS	1,00 g
Agua destilada hasta	1000 ml
Ajustar pH 8,3	

**Solución desnaturizante (2x, 10 ml)**

Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	2,50 ml
SDS al 10 %	4,00 ml
Glicerol	2,00 ml
DTT	0,310 g
Azul de bromofenol	0,002 g
Agua destilada	1,50 ml

10.2.3. Tinción de los geles con azul de Coomassie.

Después de la electroforesis, los geles se sumergieron en la solución colorante durante 30 min en agitación. Transcurrido el tiempo de tinción se eliminó el exceso del colorante, lavando los geles en solución decolorante. Para la conservación de los geles, fueron transferidos a una solución de glicerol al 2 % y desecados mediante un secador de geles (modelo 583, BioRad).

**Solución colorante**

Azul de Coomassie brillante R	0,50 %
Metanol	800 ml
Ácido acético	140 ml
Agua destilada hasta 2 litros	

**Solución decolorante**

Ácido acético	70 ml
Metanol	50 ml
Agua destilada hasta 1 litro	

10.3. Detección de AS-48 y los mutantes mediante transferencia a membranas de nitrocelulosa y revelado con anticuerpos específicos (*Western Blotting*).

10.3.1. Transferencia a membranas de nitrocelulosa (NC).

La transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa se realizó según el método de Towbin *et al.*, (1979) empleando un equipo semiseco de NovaBlot (modelo 2117, Pharmacia-LKB) y un sistema de transferencia continuo. El gel desarrollado mediante SDS-PAGE (ver apartado 10.2.), la membrana de nitrocelulosa (NC BA85, de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro; Schleicher y Schuell) y los papeles Whatman 3MM se sumergieron en solución de transferencia durante 15 min a temperatura ambiente. La unidad de transferencia (sandwich) compuesta de la membrana nitrocelulosa, el gel y una serie de 6 papeles de filtro en ambos lados, se dispuso sobre la placa de grafito previamente impregnada con el tampón de transferencia, y se aplicó una corriente constante de 1 mA/cm<sup>2</sup>, durante 2 h. Para comprobar que la transferencia se realizó correctamente, la membrana de NC se tiñó con una solución al 0,5 % de Rojo Ponceau, 1 % ácido acético (1 min). Las bandas se visualizaron destiñendo con agua Milli-Q, hasta alcanzar el contraste deseado. La tinción fue totalmente eliminada con NaOH 0,1N.

**Solución de transferencia**

Tris	0,30 g
Glicina	1,44 g
SDS	0,10 g
Metanol	20 ml
Agua destilada hasta 100 ml.	

10.3.2. Revelado inmunológico.

La membrana de nitrocelulosa se lavó con TBS (*Tris Buffer Saline*) durante 10 min en agitación. A continuación se lavó con 10 ml de TBS-seroalbúmina bovina (BSA) al 1 % como reactivo de bloqueo, durante 30 min en agitación, con el fin de bloquear los sitios inespecíficos de unión a anticuerpos. Posteriormente la membrana se incubó con anticuerpos primarios anti-AS-48 obtenidos de conejos inmunes (Maqueda *et al.*, 1993), diluidos 1:100 en TBS-1 % BSA (10 ml) durante una noche en agitación (4 °C). El exceso de anticuerpos fue eliminado lavando con TBS (2 x 15 min). Seguidamente, la membrana fue incubada durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpos anti-IgG de conejo, obtenidos en cabra y marcados con peroxidasa de rábano picante, diluidos 1:1000 en TBS-BSA 1 % (Sigma-Aldrich). Tras lavar la membrana con TBS (2 x 15 min) se añadió la solución de revelado. Una vez visualizadas las bandas, la membrana de nitrocelulosa se lavó con agua destilada y se secó entre papeles de filtro para su posterior fotografiado.

**TBS**

Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
pH 7,5	

**Solución de revelado (preparación extemporánea)**

Tris-HCl 50 mM, pH 7,7	12,5 ml
Metanol	2,5 ml
Agua oxigenada (33 %)	12,5 µl
4-Cloro-naftol (3 mg/ml en metanol)	7,5 ml

10.4. Detección de la actividad antimicrobiana de proteínas separadas mediante SDS-PAGE.

Para poner de manifiesto la actividad antimicrobiana de las muestras separadas mediante electroforesis desnaturizante se utilizó el procedimiento descrito por Bhunia *et al.* (1987). Una vez finalizada la electroforesis, el gel se lavó dos veces con una solución de isopropanol

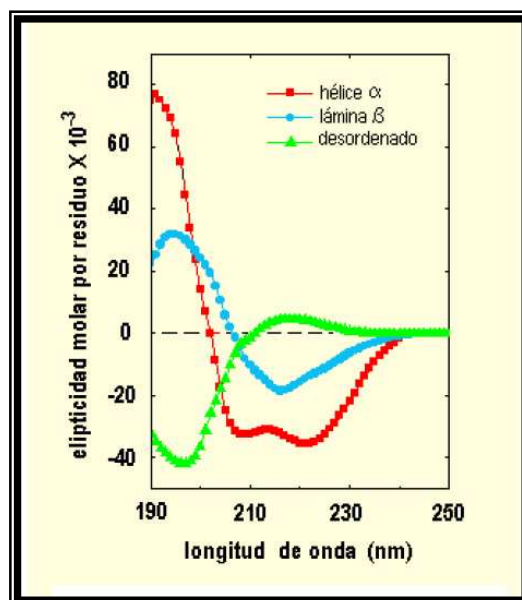
(20%)-ácido acético (10%) durante 2h a temperatura ambiente, con el fin de fijar las proteínas y eliminar el SDS (Blank *et al.*, 1982). Seguidamente el gel se lavó con agua destilada estéril durante 6 h en agitación y se dispuso en una placa de petri que contenía una capa base de MHA-T. El gel fue cubierto con una sobrecapa de BHA blando inoculada con la bacteria indicadora *Listeria monocytogenes* o *E. faecalis* S-47 e incubado durante 18-24 h a 37 °C para observar las zonas de inhibición del crecimiento producidas.

### 10.5. Estudios de dicroísmo circular (DC).

Cuando la luz linealmente polarizada pasa a través de una sustancia ópticamente activa, sus dos componentes circularmente polarizados viajan a diferentes velocidades, y son absorbidos en diferentes grados por la sustancia. Así pues, la luz que pasa a través de ella está elípticamente polarizada, y se dice que la sustancia tiene Dicroísmo Circular (DC). Esta magnitud se suele expresar en unidades de elipticidad molecular ( $q$ ). Ambas componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de moléculas orgánicas como las proteínas, en las que los enlaces peptídicos y los aminoácidos aromáticos en entornos asimétricos presentan quiralidad y dan lugar a señal de dicroísmo circular.

Es una técnica muy útil en el estudio de las propiedades conformacionales de proteínas en solución [contenido en estructura secundaria (UV-lejano) y terciaria (UV-cercano)]. Además permite realizar un seguimiento de los cambios conformacionales provocados en las moléculas por variaciones de temperatura, pH, agentes desnaturizantes, unión a ligandos y cambios en el estado de asociación. En la zona del ultravioleta lejano (190-250 nm) presentan señal los enlaces peptídicos, mientras que en la zona del ultravioleta cercano (250-310 nm) absorben los aminoácidos aromáticos. En la zona del visible (por encima de los 350 nm) pueden aparecer cofactores que dan lugar a señal de DC. Se utiliza el espectropolarímetro o dicrógrafo en el que a partir de un haz de luz monocromática y polarizada linealmente se genera luz circularmente

polarizada a izquierda y derecha gracias a un modulador fotoeléctrico de alta frecuencia. La luz circularmente polarizada se hace incidir sobre la muestra contenida en una célula de cuarzo y la luz resultante se detecta mediante un fotomultiplicador. El espectropolarímetro está conectado a un ordenador para la adquisición de los datos por medio de un programa que suministra la misma casa comercial. Los parámetros a programar fueron: tipo de barrido, anchura de banda espectral (nm), sensibilidad (mgrad), tiempo de respuesta (s), intervalo de longitud de onda (190-260 nm para el UV-lejano y 260-360 nm para el UV-cercano), resolución (nm), velocidad de barrido (nm/min) y acumulaciones o repeticiones del espectro, con el objeto de disminuir el ruido procedente tanto del aparato como de la muestra que distorsiona dicho espectro.



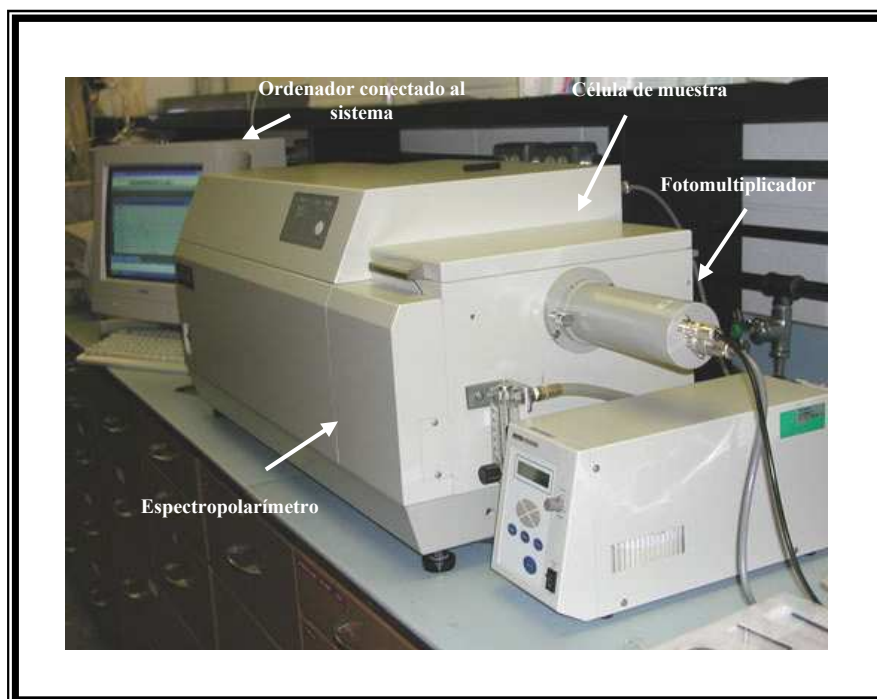
**Figura 5-MM. Espectros de DC en el UV lejano característicos de varios tipos de estructura secundaria en proteínas.**

10.5.1. Estudios de dicroísmo circular a temperatura constante.

Los espectros de dicroísmo circular (DC) de las muestras purificadas mediante HPLC, se realizaron en la región del ultravioleta lejano (190-260 nm) a 25 °C. En primer lugar se realizó un barrido con el tampón de disolución de las proteínas que sirvió de blanco, después se hizo lo mismo con cada una de las variantes, dejando la cubeta con la muestra dentro del



soporte de célula un mínimo de 5 min antes de realizar el barrido, para su termostatación. El blanco se restó al espectro de cada muestra.



**Figura 6-MM. Espectropolarímetro.**

### 10.5.2. Preparación de las muestras.

Se partió de muestras purificadas por RP-HPLC liofilizadas, que se reuspendieron en tampón fosfato 10 mM pH 2,5. Entonces se centrifugaron durante 3 min a 14.000 rpm, con el fin de evitar que quedasen partículas o agregados en suspensión que pudieran interferir en las medidas de DC. La concentración de proteína de la muestra se determinó espectrofotométricamente, utilizando como blanco el tampón. Esta disolución sirvió como disolución madre para preparar las muestras diluidas. Como norma general, siempre se centrifugó la muestra y se midió su concentración antes de realizar el experimento de DC. En las medidas se utilizaron los parámetros previamente empleados por Cobos *et al.*, 2001; 2002.

## **11. Reacción de proteolisis controlada y separación de los fragmentos e identificación de los mismos.**

La proteolisis se realizó dosificando enzima y sustrato por peso, en condiciones de pH y temperatura en las que la proteasa era activa. Una vez realizada la mezcla de reacción se tomaron alícuotas a distintos tiempos de incubación y sus hidrolizados fueron separados mediante RP-HPLC en un modelo Pharmacia LKB HPLC Pump 2248 con una columna analítica Jupiter C4, 5u 300A, New column 150x4.6 mm (Phenomenex, California) acoplado a un detector LKB 2158 Uvicord SD a 226nm, recogiendo cada uno de los picos de forma manual en tubos eppendorff.

La separación se llevó a cabo a un flujo constante de 0,8 ml/min usando como solvente A agua miliQ con un 0,05% TFA (Fluka) y como solvente B acetonitrilo (Sigma) con 0,05% TFA. El gradiente comenzó a aplicarse sobre la columna previamente equilibrada en solvente A con un 5% de B y constaba de: i) una fase inicial con un 5% de solvente B durante 3 min para permitir la adhesión de los fragmentos proteicos y eliminar las sales ii) una elevación rápida hasta el 65% de solvente B en 5 minutos, iii) una etapa de 15 min de incremento del 65% al 75% de solvente B, para permitir la separación de los fragmentos iv) un ascenso final hasta el 95% de solvente B en 1 min, manteniéndose así otros 5 min. Finalmente la columna fue reequilibrada bajando desde 95% al 5% de solvente B en un minuto y lavando al 5% de solvente B durante 10 min.

Los fragmentos proteicos recogidos fueron llevados a sequedad mediante liofilización en un sistema Speed-Vac (Savant) para su posterior análisis mediante espectrometría de masas. Las muestras liofilizadas fueron redisueltas en 50% de agua MilliQ, 50% acetonitrilo y 1% ácido fórmico, agitadas en vórtex y centrifugadas para eliminar la espuma y enviar al fondo del tubo eppendorff la solución. De cada muestra se usaron 3 µl para analizar.

Los espectros de masas fueron realizados en un espectrómetro en tándem Q-TOF Micro (Micromass, Reino Unido) equipado con un sistema de ionización por electrospray Z-spray de nanoflujo. El voltaje del capilar, el cono y el extractor fueron de 3500, 45, y 1 V respectivamente. La

## ***Material y Métodos***

---

temperatura de la fuente fue de 80 °C y la del gas de desolvatación de 250 °C. La deconvolución y el análisis de datos se realizaron con el software Mass Lynx 4.0 de Micromass.

Las masas de los fragmentos obtenidos fueron comparadas con la secuencia de AS-48 usando para la búsqueda el software MassXpert 1.0 con el fin de obtener la secuencia peptídica de cada fragmento.





## ***Resultados***



## **I. Design and construction of linear variants from circular enterocin AS-48**

Manuel Montalbán-López, Manuel Martínez-Bueno, Eva Valdivia y Mercedes Maqueda.

La existencia de un esqueleto circular en la bacteriocina AS-48 nos ha permitido plantear la posibilidad de obtener moléculas lineales derivadas de ella, ya sea mediante expresión del gen nativo carente del péptido señal (*as-48L*<sup>1/70</sup>), como mediante el diseño de genes circularmente permutados (*as-48L*<sup>23/24</sup> y *as-48L*<sup>48/49</sup>). Los nuevos genes una vez clonados en vectores de expresión apropiados (pET22b/pBAT-4m) fueron transferidos a diferentes cepas de *E. coli*, incluyendo algunas carentes de proteasas. La ausencia de proteínas en cualquiera de las condiciones de inducción ensayadas, sugiere que la apertura de la molécula por los residuos seleccionados confiere una gran inestabilidad a las moléculas, probablemente debido a su incapacidad para adoptar un plegamiento correcto. Sin embargo su expresión en *E. coli* REG-1 como proteínas de fusión con el extremo carboxilo de la proteína LytA de *S. pneumoniae*, controlada por la adición de salicilato, se traduce en importantes niveles de proteína, tanto en forma soluble como en cuerpos de inclusión. Ello ha permitido su purificación como proteínas híbridas (29.000 Da), las cuales, tras proteólisis inespecífica con enterokinasa, han dado lugar a fragmentos de 17861,75 Da que mantienen su actividad antibacteriana.





**I. Design and construction of linear variants from circular enterocin**

**AS-48**

Manuel Montalbán-López, Manuel Martínez-Bueno, Eva Valdivia and Mercedes Maqueda.

Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Fuentenueva s/n, 18071-Granada, Spain.

Running Title: Linear derivatives from AS-48

Author for correspondence:  
Mercedes Maqueda,  
Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias,  
Universidad de Granada,  
Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain.  
Tel and Fax: +34 958 242857  
E-mail: [mmaqueda@ugr.es](mailto:mmaqueda@ugr.es)



## SUMMARY

AS-48 is a circular 70-amino-acid bacteriocin with a broad antimicrobial spectrum produced by *Enterococcus faecalis*. Its circular backbone has prompted us to explore the possibility of its linearization by opening it between Met<sup>1</sup> and Trp<sup>70</sup> and between the two wider loops situated between the  $\alpha 1/\alpha 2$  and  $\alpha 3/\alpha 4$  helices by applying genetic circular permutation. Different *as-48A* structural gene derivatives (*as-48L*<sup>1/70</sup>, *as-48L*<sup>23/24</sup> and *as-48L*<sup>48/49</sup>) have been cloned into pET22b/pBAT-4m to be expressed in different *E. coli* strains, including those with protease-deficient activities. No linear proteins with the expected size could be observed in the cell extracts under any of the induction conditions assayed. Nevertheless, transcription from two of the recombinant genes was detected in RT-PCR assays. The absence of pET22-L<sup>1/70</sup> expression clearly suggests that opening the chain in the middle of the  $\alpha 5$ -helix determines considerable instability to the three-dimensional structure. Analysis of the behaviour observed in the other two cases poses the question as to whether the creation of such termini in the coding linear proteins might be involved in topological and entropic changes that disrupt the potential conformation of the linear derivatives. All in all, our results suggest that it is not a wise policy to disrupt the circular AS-48 backbone at such sites because the instability of the translated proteins seems to render them incapable of folding into native-like structures. To overcome these troubles, we have tried the production of AS-48-linearized derivatives in a system for cloning and expression of an enzymatic-cleaving fusion form, using the C-Lytag proteins in the pALEXa vector. For this, *as-48L*<sup>23/24</sup> and *as-48L*<sup>48/49</sup> genes were cloned in frame with this inducible tag and, after salicylate induction, bands with the expected size (aprox. 29000 Da) clearly recognized by specific antisera were identified in SDS-PAGE. Interestingly, chimeric and larger proteins obtained after non-specific enterokinase cleavage in *E. coli* REG-1 strain preserve their inhibitory activity.

## INTRODUCTION

Since the discovery of bacteriocin AS-48, a 70-residue circular peptide produced by *Enterococcus faecalis* S-48, several naturally occurring circular proteins from bacteria have been reported (29, 30). AS-48 is encoded by the 68-kb pheromone-responsive plasmid pMB2, and the gene cluster involved in production and immunity has been identified and sequenced (11, 31, 32). This peptide exerts a bactericidal action on the cytoplasmic membrane of susceptible cells belonging to most Gram-positive and some Gram-negative bacteria by opening pores leading to the dissipation of the proton motive force and consequent cell death (28). The major structural feature of AS-48, however, is its circular peptide backbone formed by its head-to-tail junction between Met<sup>1</sup> and Trp<sup>70</sup> (39). The three-dimensional structure of monomeric AS-48 molecules in aqueous solution has been determined by <sup>1</sup>H NMR at pH 3.0 and consists of a globular arrangement of five  $\alpha$ -helices that span residues 9 to 21 ( $\alpha$ 1), 25 to 34 ( $\alpha$ 2), 37 to 45 ( $\alpha$ 3), 51 to 62 ( $\alpha$ 4), and 64 to 5 ( $\alpha$ 5), enclosing a compact hydrophobic core with an efficient interdigitation of the hydrophobic side chains at the core of the globular structure (13). End-to-end cyclization of a protein is expected to enhance its stability by reducing the conformational entropy of the unfolded state. In fact, the AS-48 molecule is remarkably stable, being extremely resistant to heat- and denaturant-induced unfolding, and part of this high stability might be put down to entropic constraints induced by the circular organization of its polypeptide chain (7, 8). It is clear that the circular backbone of AS-48 and other macrocircular peptides limits sites susceptible to exoprotease activity and constrains the conformation of the termini, leading to an entropic advantage in binding interactions. Despite the efforts expended on this subject during the last ten years, the role of cyclization in proteins still remains unclear, although there is evidence to show that it contributes positively to their stability and has a range of other potential advantages over its linear counterparts (37). Nevertheless, some authors have reported that circularity does not always increase the Gibbs energy of unfolding because an increase in the energy of the unfolded state could be offset by another increase in the energy of the

folded state due to steric tensions introduced by cross-linking (14, 15). One way of circumventing this problem would be to compare wild-type circular proteins with their linear counterparts, and AS-48 is a suitable model for this task because it has a known genetic/amino-acid sequence and secondary and tertiary structures (13, 22, 31, 32, 39, 40).

Genetic circular permutation is a conceptually intriguing tool that has been applied by structural biologists to determining the importance of polypeptide sequences in protein folding, although its effect on proteins is still scarcely understood (10). In some cases the sequence has been shown to cause large changes (24, 25), whereas in others only minor alterations to the transition-state structure have been reported (35). Studies into the effects of breaking the backbone of some non-bacterial circular proteins have suggested that the circular backbone may not be essential to maintaining the overall folding pattern. Such is the case of the synthetic linear derivatives of RTD-1 defensin from rhesus macaque leukocytes (22, 46), the cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower (20), the macrocyclic trypsin inhibitor MCoTI-II, the linear homologues of which, with similar structures, exist in nature (17), and also some circular plant cyclotides in which it has been possible to permute the termini of certain proteins and still allow folding into the native conformation (4, 49), thus providing valuable information on protein folding. Nevertheless, the additional restraints of the several disulfide bonds in these circular proteins are also likely to play a major role in maintaining the overall structure. It is, however, noteworthy that in those cases where the circular backbone may not be essential to the overall folding, a decrease in their biological activities was observed, signifying that while the role of the circular backbone is by no means fully understood it does appear to be involved in improving the stability and biological activity and in some cases even in maintaining the bacteriocin's structural integrity (9, 34).

We are currently working on discovering the optimum conditions for opening the AS-48 chain properly whilst maintaining its globular conformation. Although we have previously investigated the effect of some point mutations on the solubility and stability of this constrained circular AS-48 polypeptide (41, 42), the consequence of linearization is still

unpredicted and could be imperative for the rational development of engineering strategies for this protein. To investigate the role of circularity in the stability and biological properties of enterocin AS-48, three genes codifying linear variants AS<sub>1/70</sub>, AS<sub>23/24</sub> and AS<sub>48/49</sub> were obtained from the open and permuted *as-48A* structural gene. They were then cloned in appropriate expression vectors to be transformed into different backgrounds of *E. coli* strains, in which the expression of target genes is often the method of choice because of our extensive knowledge of its genetics, the availability of versatile vector systems and host strains, ease of use, and the short time required to produce proteins with low cost and high expression level (reviewed by 26). In addition, we have used fusion of proteins to an inducible tag to try to simplify the purification steps and to increase the stability of the whole linear proteins.

## MATERIALS AND METHODS

**Vectors and growth conditions.** Recombinant *E. coli* BL21(DE3) and MG1655 wild-type and several protease-deficient derivatives transformed with pBAT-L<sup>1/70</sup>, pBAT-L<sup>23/24</sup>, pBAT-L<sup>48/49</sup> and *E. coli* REG-1 for pALEX-L<sup>23/24</sup> and pALEX-L<sup>48/49</sup> constructions, are listed in Table 1-R. The different strains were grown at 20°, 28° or 37°C in Luria-Bertani (LB) or 2xYT medium (Gibco, Invitrogen, UK). When required, 50 µg/ml ampicillin (Ap), 20 µg/ml chloramphenicol (Cm), 10 µg/ml tetracycline (Tc) y 50 µg/ml kanamycin (Km) from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) were added to the media as selective agents.

**Molecular techniques.** Total DNA plasmid, cloning and *E. coli* transformations were done according to the standard protocols (38). Plasmid DNA was extracted as described by Birnboim and Doly (3) and used as template for PCR amplifications carried out with Biotools DNA Polymerase (B&M Labs, Madrid, Spain). Competent *E. coli* strains were obtained by CaCl<sub>2</sub> or sterile water washes to be used in thermal shock transformation and electroporation respectively (38). Restriction enzymes, T4 DNA ligase, calf intestine phosphatase and other DNA modifying enzymes from Fermentas (Quimigen, Madrid, Spain) and Roche Applied Science (Roche Diagnostics, Sant Cugat del Vallés, Spain) were used as recommended by the suppliers. Synthetic oligonucleotides designed were synthesized by Genotek (Sabadell, Spain) or Thermo (Pacisa-Giralt, Barcelona, Spain).

**Generation of recombinant plasmids.** Three different recombinant plasmids, pET22-L<sup>1/70</sup>, pBAT-L<sup>23/24</sup> and pBAT-L<sup>48/49</sup>, encoding linear derivatives of AS-48 were constructed (Table 1-R). Plasmid pET22-L<sup>1/70</sup> encodes a linear peptide starting at the first residue of pro-AS-48. To this end a fragment *NdeI-EcoRI* from plasmid pBgD12S was subcloned into the pET22b vector (Novagen, AMS Biothecnology UK, Ltd.) previously digested with the same restriction enzymes. pBAT-L<sup>23/24</sup> was constructed by genetic circular permutation with a C-terminal Gly (Gly<sup>23</sup> from *as-48A* gene) and an



N-terminal Met replacing the Trp residue (Trp<sup>24</sup>Met) from the *as-48A* gene, while pBAT-L<sup>48/49</sup> with a C-terminal Asn<sup>47</sup> (in substitution of Gly<sup>47</sup>) starts with the necessary Met introduced before the Glu<sup>49</sup> into the *as-48A* structural gene. To get the AS-48-permuted molecules, different pairs of extended oligonucleotides (approx 40 nt, one of which bore at its end the short sequence to permute) (Table 2-R) were used as primers in the successive PCR amplifications, using as templates the recombinant plasmid pBgD12S in the first PCR and the amplified PCR products obtained in the following amplifications. PCR reaction mixtures contained 50-100 ng of template, 1 unit of *Taq* polymerase, 200 μM of each dNTP (Eppendorf, Hamburg, Germany) and 2 μM of each primer, to a total volume of 50 μl. PCR amplifications were carried out in an iCycler thermocycler (BioRad, Madrid, Spain) with a denaturing step at 94°C for 1 min followed by 30 cycles of amplification, each cycle consisting of a denaturing step at 94 °C for 60 sec, a primer annealing step at 55 °C for 60 sec, and an extension step at 72 °C for 30 sec. Finally, we added a last elongation step at 72 °C for 5 min.

The two permuted PCR-generated fragments encoding the AS<sub>23/24</sub> and AS<sub>48/49</sub> open variants were cloned separately into pGEM-T easy (Promega, Alcobendas, Spain). After sequencing pGEM-T intermediates using the M13-20 primer (Table 2-R), they were digested by *Nco*I and *Bam*HI and directionally cloned into the pBAT-4m expression vector (4.4 kb, Ap<sup>R</sup>) (36) at its *Nco*I and *Bam*HI sites to be transferred by thermal shock to the competent cells of *E. coli* DH5α. The fidelity of both constructs was confirmed by PCR amplification and DNA sequencing. The verified vectors were then transformed into the different chemically competent *E. coli* strains selected to be expressed.

Strains	Characteristics	Reference
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lac</i> U169 ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Bethesda Research Lab.
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3), <i>lon</i> and <i>ompT</i> protease deficient	Novagen
BL21 (DE3) Codonplus-RIL	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) Cm <sup>R</sup>	Stratagene
JM109	e14-(McrA-) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub></i> <sup>-</sup> <i>m<sub>K</sub></i> <sup>+</sup> ) <i>supE44</i> <i>relA1</i> $\Delta$ ( <i>lac-pro</i> AB) [F <sup>-</sup> <i>traD36</i> <i>proAB</i> <i>lac<sup>f</sup>Z</i> $\Delta$ M15]	Stratagene
REG-1	Mini-Tn5( <i>kan</i> <sup>R</sup> - <i>nahR</i> /P <sub>sal</sub> :: <i>xyIS2</i> ) <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Biomedal
MG1655	Wild-type <i>E. coli</i> K-12 F <sup>-</sup> $\lambda$ <i>ilvG</i> - <i>rfb-50</i> <i>rph-1</i>	(51)
MG1655 protease deficiente strains	$\Delta$ <i>lon</i> , $\Delta$ <i>clpP</i> , $\Delta$ <i>clpA</i> , $\Delta$ <i>clpX</i> , $\Delta$ <i>clpQ</i>	(51)
CECT 101	AS-48 <sup>S</sup>	CECT 101
<b>Listeria monocytogenes</b>	AS-48 <sup>S</sup>	CECT 4032
<b>E. faecalis S-47</b>	AS-48 <sup>S</sup>	Our collection
Plasmids	Characteristics	Reference
pGEM-T	3 kb, Ap <sup>R</sup> , cloning vector	Promega
pBgD12S	5.4 kb, Ap <sup>R</sup> , D ( <i>SphI</i> - <i>BglII</i> ) 1.9 kb fragment from pMB2 cloned into pSL1180	(40)
pET22b	5,5 kb, Ap <sup>r</sup> , expression vector	Novagen
pET22-L <sup>1/70</sup>	Ap <sup>r</sup> , pET22b with <i>as-48L</i> <sup>1/70</sup> (native structural gene without the SP) (4,6 kb)	This work
pBAT-4m	4,4 kb, Ap <sup>R</sup> <i>E. coli</i> expression vector	(37)
pBAT-L <sup>23/24</sup>	Ap <sup>r</sup> , pBAT-4m with <i>as-48L</i> <sup>23/24</sup> cloned (4,6 kb)	This work
pBAT-L <sup>48/49</sup>	Ap <sup>r</sup> , pBAT-4m with <i>as-48L</i> <sup>48/49</sup> cloned (4,6 kb)	This work
pALEXa	Ap <sup>r</sup> , fusion protein expression vector (4 kb)	Biomedal
pALEXL <sup>23/24</sup>	Ap <sup>r</sup> , pALEXa with <i>as-48L</i> <sup>23/24</sup> cloned (4,2 kb)	This work
pALEXL <sup>48/49</sup>	Ap <sup>r</sup> , pALEXa with <i>as-48L</i> <sup>48/49</sup> cloned (4,2 kb)	This work

**Table 1-R. Microorganisms and plasmids used in this work.** Ap<sup>R</sup>: Ampicillin resistance; Cm<sup>R</sup>: chloramphenicol resistance; AS-48<sup>S</sup>: AS-48 sensitive.

Oligonucleotides	Sequence (5'-3')
	<b>as-48L<sup>23/24</sup> construction</b>
AS48-24-R1	CCATGGTCACTACTATTGTATCAATTCTTACTGCTGTAGGTAGC
AS48-24-L1	TATACCGAACTCTTTAGCCATCCAAGCAATAACTGCTCTTTTTCCTT TTTCTT
AS48-24-L2	AGTTCCTGCAACTGCTGCTGGTATACCGAACTCTTTAGCCATCCAAG CAATAAC
AS48-24-L3	GGATCCTTATCCACCAGCTTCAACTACATTAAGCACAGTTCCTGCAA CTGCTGC
AS48-24-BamHI	GGATCCATGGTCACTACTATTGTATCAATTCTT
	<b>as-48L<sup>48/49</sup> construction</b>
AS48-49-L1	GGATCCTTATCTGTTTGCTGCAGCGAGTAAAGAAAG
AS48-49-R1	GCAGTTATTGCTTGGATGGCTAAAGAGTTCGGTATACCA
AS48-49-R2	GAAAAAAGGAAAAAGAGCAGTTATTGCTTGGATGGCTAAAG
AS48-49-R3	TACCTTAAGAAAGAAATTAAGAAAAAAGGAAAAAGAGCAG
AS48-49-R4	CCATGGAGTCAATTAAGCATACCTTAAGAAAGAAA
AS48-49-BamHI	GGATCCATGGAGTCAATTAAGCATACCTTAAGAA
	<b>Sequencing</b>
M13-20	GTAAAACGACGGCCAGT
Bat-1	AATACGACTCACTATAGGGA
Bat-2	TGGGATTTAGGTGACACT
pALEX	GACAGGCCAGAATTCACAGT

**Table 2-R. Primers used for PCR amplifications, RT-PCR and sequencing.** In the primers used for circular permutation, the region that hybridized with the template is underlined.

**Heterologous expression.** Competent *E. coli* host strains BL21 (DE3) (Novagen), BL21 (DE3) pLysS Codonplus-RIL (Stratagene), MG1655 wild-type and several derivative strains listed in Table 1-R were transformed by thermal shock with 100 ng plasmid and grown overnight on agar plates with appropriate antibiotics. Fresh colonies were inoculated at 37 °C into LB or 2-YT medium plus Ap to an OD<sub>600</sub> of 0.4-0.6. To find the optimum conditions to express recombinant proteins we initially screened parameters such as inductor concentration, growth temperature, culture volume and induction time.

**Electrophoretic and immunoblotting techniques.** Induced bacterial cells (1ml) were harvested by centrifugation at 4000×g, resuspended in 100 µl of

20 mM phosphate buffer (pH 7.2) or MilliQ water and lysed by addition of 100  $\mu$ l of Laemli solution (x 2) after heating to 100°C for 5 min. Aliquots (15 $\mu$ l) of the samples were separated by SDS-PAGE electrophoresis on 15% slab gels as described by Laemmli (21) in a Miniprotean dual-slab cell apparatus (BioRad), using a low-molecular-weight range marker (SigmaMarkers) as standard. When suitable, gels were transferred to a nitrocellulose membrane (NC, pore size 0.45- $\mu$ m; Schleicher & Schuell, code BA85, Whatman. ACEFE S.A. Castelldefels, Spain) using a BioRad mini trans-blot system according to Towbin *et al.* (48). Membranes were developed with specific anti-AS-48 antibodies as described by Maqueda *et al.* (27).

**RNA isolation and reverse transcription PCR (RT-PCR).** Cells grown (OD<sub>600nm</sub> 0.4) and induced as above were harvested and their total RNA was isolated using the Fast RNA Pro Blue kit (Q-Biogen, MP Biomedicals, European Headquarters, France) following the manufacturer's instructions. For reverse transcription total RNA was treated with RNase-free DNase I (Roche Diagnostics, San Cugat del Vallés, Spain) for 60 min at 37 °C. Absence of residual DNA was verified by PCR amplification using the primers Bat-1 and Bat-2 (Table 2-R). The transcript was analysed by two-step RT-PCR assays using AS48-24-R1/L3 and AS48-49-L1/R4 as primers for *as-48L*<sup>23/24</sup> and *as-48L*<sup>48/49</sup> respectively. The RNA and oligonucleotide mix was denatured for 5 min at 70 °C prior to adding the other components. RNAs (1  $\mu$ l) were added to 20- $\mu$ l reverse transcription reaction mixes containing 4  $\mu$ l of cDNA synthesis buffer, 1 mM DTT, 40 U retrotranscriptase (Gibco), 0.1 mg/ml BSA and 500  $\mu$ M of each dNTP. Reaction took place for 1 h at 37 °C, after which 1 $\mu$ l was used as the template for PCR under the same conditions as those used to construct the permutated genes.

**Construction of AS-48-linearized-recombinants as fusion proteins in *E. coli*, using the C-LYTAG protein expression system.** This method is based on the selective interaction of the choline binding domain of

*Streptococcus pneumoniae* L-acetylmuramoyl L-alanine amidase (C-Lytag), but devoid of cell wall-degrading activity (43).

In order to introduce the *Bam*HI site at the 5' end of the gene upstream the *Nco*I site previously created, we used the AS48-24-BamHI/AS48-24-L3 and AS48-49-BamHI/AS48-49-R1 pairs of primers (Table 2-R) for PCR in the same conditions described above. The amplified fragments containing the coding sequences for the AS-48-linearized permutants were cloned in the expression vector pALEXa (Biomedal) previously linearized. The insertion of such fragments in pALEXa created a fusion in the correct translational reading frame between the C-Lytag protein gene located in this vector and the *as-48L*<sup>23/24</sup> and *as-48L*<sup>48/49</sup> permuted genes (although a small sequence coding for DRWG was introduced), and the resulting plasmids, called pALEX-L<sup>23/24</sup> and pALEX-L<sup>48/49</sup>, were transferred to *E. coli* REG-1 (Biomedal) selected as expression host.

**Cascade protein expression and cytotoxicity determination.** The expression of this system is controlled by two salicylate-responsive transcriptional activator proteins located in the chromosome of the specialized REG-1 strain of *E. coli*. For screening and production of fusion proteins, REG-1 transformants were grown overnight and used to inoculate (1%) a LB shaking media added of ampicillin until the optical density ( $A_{600}$ ) reach 0.8 to 1.0. Expression of fusion proteins was induced by the addition of salicylate to a final concentration of 2 mM. After induction the cultures were incubated at different temperatures before the cells were harvested by centrifugation sampling every 2 h. The absorbance at 600 nm was measured almost every hour. The presence of recombinant proteins in *E. coli* extracts was screened by SDS-PAGE.

**Purification of recombinant peptides.** After optimizing expression in REG-1 strain of *E. coli*, the recombinant proteins were purified from cell pellets by centrifugation at 4000 rpm for 15 min at 4°C and resuspended in 1/20 vol of 20 mM phosphate buffer pH 7 with or without 1% Triton X-100. Cell lysis was performed by sonication (4 times for 30 sec and once for 60

min) in a Branson 450 sonifier (Branson Ultrasonics corp., Danbury, USA). Detected inclusion bodies were solubilised in 10 ml 6 M guanidine hydrochloride and centrifuged at 7000 rpm for 20 min at 4 °C and dissolved in 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 to a final volume of 50 ml.

The C-Lytag fusion proteins present in supernatants after sonication were applied onto C-LYTRAP resin -previously equilibrated with 20 mM phosphate buffer pH 7.0- at a flow rate of 1 ml/min in order to allow a thorough contact between extract and resin. Then, the resin was washed with washing buffer (20 mM phosphate buffer pH 7.0, 1,5 M NaCl) and re-equilibrated with 2 volumes of re-equilibration buffer (20 mM phosphate buffer pH 7.0 0.15 M NaCl). Then protein was eluted with 3-4 volumes of elution buffer (20 mM phosphate buffer pH 7.0, 0.15 M choline chloride).

The C-Lytag fusion proteins from inclusion bodies were applied twice onto a C-LYTRAP resin (Biomedal) and then washed with washing buffer (20 mM potassium phosphate buffer pH7.0, 0.1% Triton X-100, 300 mM NaCl and 5 mM choline chloride). Proteins attached to the column were eluted by washing with elution buffer (20 mM potassium phosphate buffer pH7.0, 0.1% Triton X-100, 300 mM NaCl and 250 mM choline chloride).

**Cleavage of fusion proteins and bacteriocin purification.** The cleavage of the fusion proteins with enterokinase was done as recommended by the supplier (Biomedal) after changing elution buffer for the proteolysis buffer by two steps dialysis, the first one with 50 mM choline chloride and the second one in EK buffer. Different final buffers were tested: i) EK buffer (25 mM Tris pH 7.6, 10 mM choline chloride, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>), ii) 5% glycerol in EK buffer, iii) 200 mM NaCl in EK buffer, iv) 200 mM NaCl 5% glycerol EK buffer and finally v) a modified EK buffer (50mM Tris, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween 20, 150mM NaCl and 10mM choline). Different cleavage conditions were assayed varying incubation times (1, 2, 3 and 4 days) with 1 unit of enzyme for each 50 µg of protein at 25 °C. The recovered peptides were then separated by RP-HPLC chromatography, using a Jupiter C<sub>4</sub> column (4.6 mm × 250 mm; Phenomenex, CA, USA) according to the method described by (34) and the identification of the different bands

obtained was carried out by Peptide Mass Fingerprinting according to Henzel and Watanabe (18). Mass determinations were obtained by MALDI TOF mass spectrometry using a spectrometer model Boyager-DE PRO from Applied Biosystems and compared with the sequence of AS-48 using MassXpert 1.0 software.

**Antimicrobial activity assays.** The antimicrobial activity of the AS-48-acyclic permutants as fusion proteins or after enterokinase separation, were developed by SDS-PAGE and evaluated against *L. monocytogenes* according to the method reported by Bhunia *et al.* (5). Activity of the samples was also determined by spotting 5 µl onto plates of Mueller Hinton Agar (MHA-T, Scharlab) -buffered with 0.1 M phosphate buffer pH 7.2- previously overlaid with 6 ml of BHA soft-agar inoculated with the indicator strain. Peptide activity was assessed by observing an inhibition zone after incubation overnight at 37°C

**Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide *as-48A* sequence submitted to EMBL has the accession number X79542 (31).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Construction of linearized AS-48 derivatives.** We attempted the expression of a linear non-modified version of AS-48 (AS<sub>1/70</sub>) by cloning the native structural gene without the signal peptide (*as-48L<sup>1/70</sup>*) into the pET22b vector (pET22-L<sup>1/70</sup>) (45) (Fig. 1-R) after transference to *E. coli* BL21(DE3) and BL21 (DE3) pLysS codonplus strains and induction with IPTG. The lack of any positive result suggests that this linear molecule, opened in the middle of the  $\alpha_5$  helix, was unable to fold properly. In fact, the circular backbone of the wild-type AS-48 precursor occurs specifically in an element of its secondary structure (in the middle of helix  $\alpha_5$ ) and not in a loop region, and seems to be crucial for maintaining the three-dimensional organization and endows this circular arrangement with a significant structural role. A behaviour that may be better understood if we compare it with that of the opened AS-48 molecule obtained chemically by cleaving the W<sup>70</sup>/M<sup>1</sup> bond with cyanogen bromide (BrCN), in which the resulting linear chain was unable to maintain its wild-type structure and thus unfolds (7).

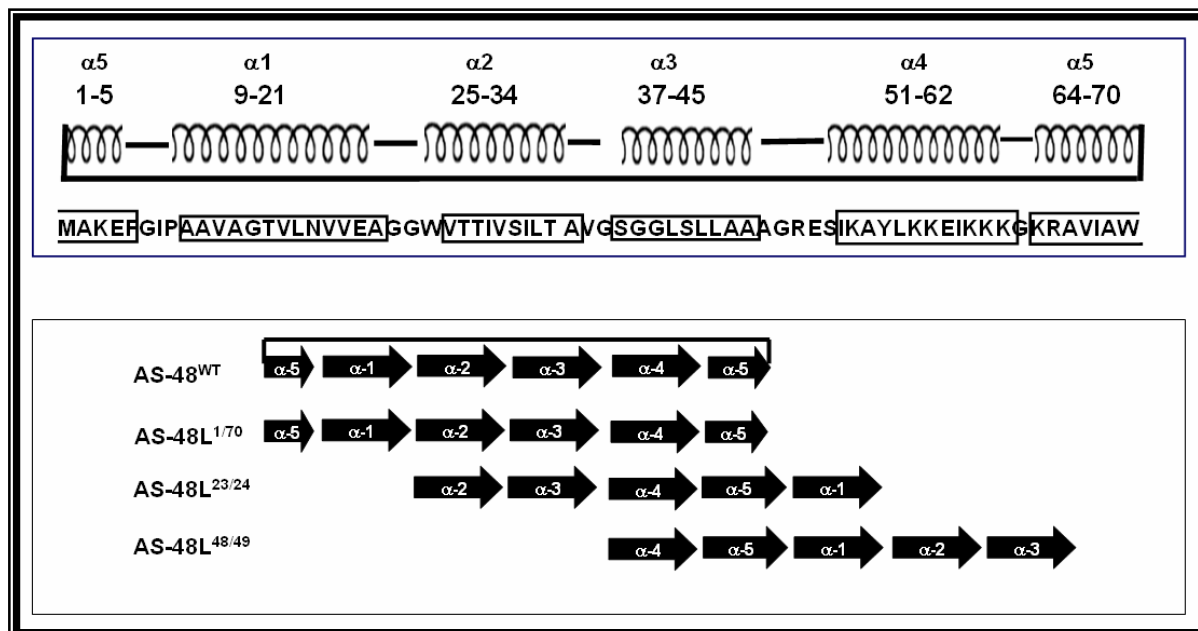
Consequently, we turned to the innovative method of engineering the structural gene by circular permutation, which involves opening the AS-48 polypeptide chain by altering the *as-48A* gene sequence in such a way as to encourage the linear molecules to preserve their overall structure. Since wild-type AS-48 has a circular backbone and the final step of its biosynthesis/maturation is still not understood, many potential linear permutants might exist for this molecule, only some of which will be topologically related to the putative linear peptide. In this study, before deciding which residues to choose as the termini of the linear permutants we made a thorough analysis of their AS-48 3D-structure so as not to destroy any critical structural features that might be directly involved in binding. The two wider loops (G<sup>22</sup> G<sup>23</sup> W<sup>24</sup>) and (A<sup>46</sup> G<sup>47</sup> R<sup>48</sup> E<sup>49</sup> S<sup>50</sup>) connecting the  $\alpha_1/\alpha_2$  and  $\alpha_3/\alpha_4$  helices respectively in the wild-type AS-48 were chosen for the two versions of linear proteins designed. The coding linear pro-peptide was circularly permuted to be opened between residues 23/24 and 48/49 (AS<sub>23/24</sub> and AS<sub>48/49</sub>) of the primary amino-acid sequence



(Fig. 1). To design both permutations the two following changes were introduced: initially, the AS<sub>23/24</sub> protein began with a M<sup>24</sup> residue instead of W<sup>24</sup> (W<sup>24</sup>M, a conservative change in terms of hydrophobicity) followed by V<sup>25</sup>, which introduces the necessary sequence to obtain the *Nco*I flanking restriction site for cloning into the pBAT-4m vector (37). The circular permutation AS<sub>23/24</sub> was thus achieved through a recursive PCR strategy (three successive PCRs using three pairs of long chemically synthesized oligonucleotides, bearing the small sequences to permute at the end) (Table 2-R) and the pBgD12S plasmid (41) as template. The amplified product (162 bp) from the first PCR contained the  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4 helices and part of  $\alpha$ 5 and was used as template to amplify the designed circularly permuted gene in the two subsequent PCR runs. For successive amplifications two long pairs of oligonucleotides, AS48-24-R1xAS48-24-L2 and AS48-24-R1xAS48-24-L3, were used as primers. The final amplified product of 221 bp containing the *as-48L*<sup>23/24</sup> permuted gene included a TAA stop codon and a *Bam*HI restriction site. The AS<sub>48/49</sub> variant was obtained by opening between the R<sup>48</sup> E<sup>49</sup> residues of the wild-type AS-48, although, being aware of the possible importance of Glu residues in AS-48 activity (40), we decided to keep E<sup>49</sup> and introduce a M before it, while the penultimate residue G<sup>47</sup> was replaced by N<sup>47</sup> and used to cap the end. The permuted *as-48L*<sup>48/49</sup> gene was obtained after four successive PCR runs, using the respective pairs of specific oligonucleotides as primers in each step (Table 2-R) and following the same strategy described above we obtained a 224-nt amplified fragment with the required DNA sequence. In both cases the absence of any undesirable mutations in the two amplified fragments was verified by DNA sequencing.

**Expression of linear and circularly permuted genes in *E. coli*.** The high-copy-number pBAT-4m vector containing the IPTG inducible *T7lac* promoter was selected for cloning and the BL21(DE3) *E. coli* strain as host. This strain provides an inducible source of T7 RNA polymerase with a basal level sufficiently low that most genes to be maintained under control of a T7 promoter in a multicopy plasmid (46) and has a reduced protease activity. Nevertheless, to avoid the causes preventing efficient heterologous

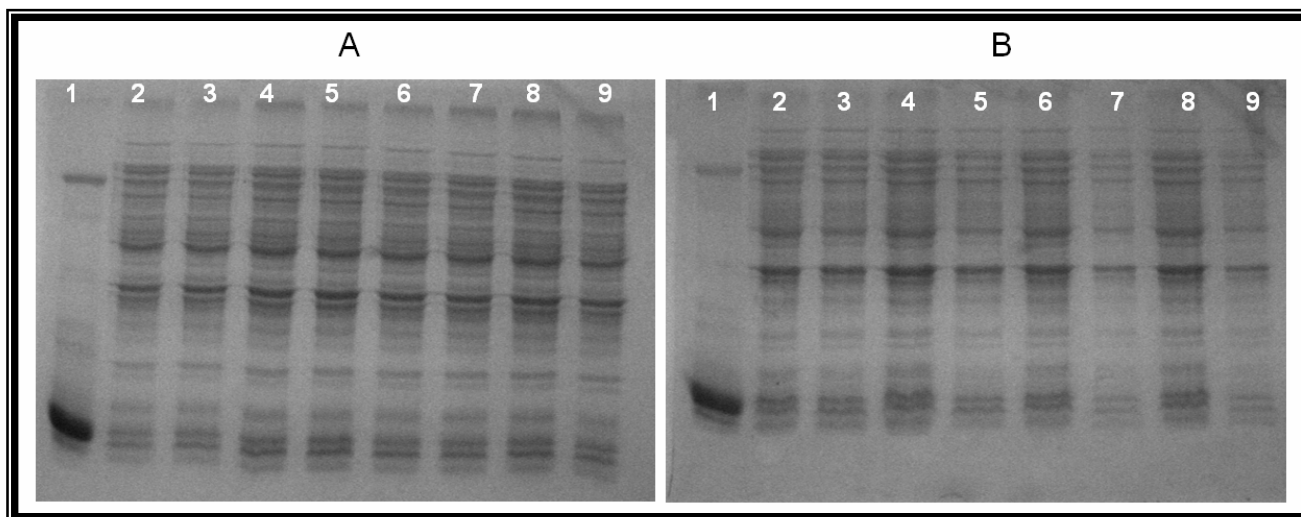
protein production caused by the two rare-codon usage bias- 2 Arg (AGA) and 5 Gly (GGA)- present in the *as-48A* structural gene, the BL21 (DE3) pLysS codonplus strain was also tested (1, 33, 50).



**Figure 1-R. Secondary structures of wild-type AS-48 and linear derivatives.** The schematic outline of the sequence connectivity of the  $\alpha$ -helices in the new molecules obtained by the unmodified version of AS-48 (AS<sub>1/70</sub>) or by circular permutation (AS<sub>23/24</sub> and AS<sub>48/49</sub>) in the structural *as-48A* gene is indicated at the bottom. The AS<sub>23/24</sub> protein starts with a M<sup>24</sup> residue instead of W<sup>24</sup>, followed by V<sup>25</sup>, whilst in the AS<sub>48/49</sub> variant, an M residue has been introduced before E<sup>49</sup> and the penultimate G<sup>47</sup> has been replaced by N<sup>47</sup>.

In order to investigate whether, after IPTG induction, these proteins have a toxic effect on the host *E. coli*, bacterial growth was measured but not differences were found in the rate of growth in relation to the controls (result non shown). In an attempt to find the best conditions under which linear variants could be expressed, we conducted the assays varying several parameters, such as induction time (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 24 h), inducer concentration (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mM of IPTG) and growth temperature (20, 28 and 37 °C). Surprisingly none of the AS<sub>23/24</sub> or AS<sub>48/49</sub> linear derivatives could be seen in the cell extracts after being developed in SDS-PAGE, either as soluble proteins or inclusion bodies (Fig. 2-R), in spite of the numerous attempts carried out and the variable induction conditions applied. The absence of specific protein bands of the expected size (about 7200 Da), even in *E. coli* enriched with rare tRNA, suggests that they were not critical for the expression of these AS-48 linear-variants. These

negative results were also confirmed by Western blotting, using specific antibodies against AS-48 (26), in which no specific hybridization could be observed in any case (results not shown).

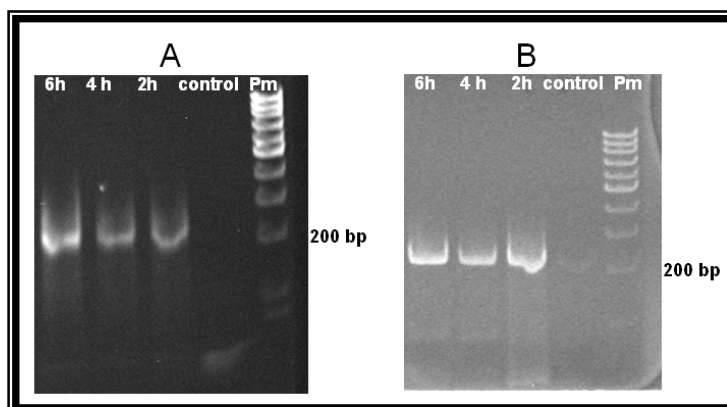


**Figure 2-R.** Cell extracts of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pBAT-L<sup>23/24</sup> (A) or pBAT-L<sup>48/49</sup> (B) after 2 hours' induction at 28 °C monitored by SDS-PAGE. IPTG concentrations used were: 0.5 mM (lanes 2 and 3); 1 mM (lanes 4 and 5); 1.5 mM (lanes 6 and 7); 2 mM (lanes 8 and 9). Lanes 2, 4, 6 and 8 correspond to pBAT-4m used as control.

To avoid interferences in the isolation of intact linear proteins in engineered bacteria because of their sensitivity to intracellular proteases (6) we used *E. coli* strains deficient in ATP-dependent proteases -the  $\Delta$ Clp derivatives from MG1655 strain- (Table 1-R). Unfortunately, neither in this condition it was possible to detect specific protein bands by SDS-PAGE after induction with IPTG, neither as soluble forms nor as inclusion bodies (result not shown). It is possible that the presence of a relatively high content of Lys and Arg makes them more susceptible to proteases as actually it has been observed with other different antibacterial peptides (6). Another plausible explanation to the reiterative negatives results obtained could be the existence of mutants retaining the plasmid but losing the ability to induce the target gene during the growth of the non-induced cultures as has been referred in the expression of highly toxic genes (46). However, the recounts in LB plates in presence or absence of Ap as selective agent, which has been performed showed a difference of one logarithmic unit which did not justify the observed behaviour (result not shown).

**RT-PCR analysis of the *as-48L*<sup>23/24</sup> and *as-48L*<sup>48/49</sup> derivative genes.** To investigate the reasons of the negative results obtained, we have analyzed total RNA from BL21(D3) strains transformed with pBAT-L<sup>23/24</sup> and pBAT-L<sup>48/49</sup> constructions, using RT-PCR with the specific primers designed (Table 2-R). Interestingly, amplified fragments of the expected size (221 and 224 nt respectively) were obtained in the RT-PCR assays (Fig. 3-R), confirming that no transcriptional block could have been responsible for the lack of protein expressed.

**Screening for proteins production as fusion partners.** Expression of the two acyclic AS-48-permutants had been assayed by a fusion gene approach using a suitable cascade protein expression system, in which expression of the linear derivatives fused with the C-Lytag protein is controlled by linked regulatory circuits to amplify the gene expression capacity. For this, the full encoding sequence for *as-48L*<sup>23/24</sup> and *as-48L*<sup>48/49</sup> permuted genes were separately cloned in the pALEXa vector (where a DRWG sequence is introduced just before M<sup>24</sup>, Biomedal), to be finally expressed as C-Lytag fusion protein into *E. coli* REG-1 strain.



**Figure 3-R. RT-PCR analysis of the transcription of the *as-48A* permuted genes.** RNA was isolated from *E. coli* BL21 carrying the pBAT-L<sup>23/24</sup> (A) and pBAT-L<sup>48/49</sup> (B) plasmids after 2, 4 and 6 hours' induction with 1 mM IPTG at 28° C. RNA from *E. coli* BL21(pBAT-4m) was used as control. The specific primers used and amplification conditions are described in Methods.

The OD (A<sub>600 nm</sub>) of transformants harbouring either pALEX-L<sup>23/24</sup> or pALEX-L<sup>48/49</sup>, showed that growth of the bacterial transfectant producing strains was delayed upon addition of salicylate in relation to the pALEXa transformants, used as control (Table 3-R). Nevertheless, soluble C-

Lytag/AS-48-fusion variants, pALEX-L<sup>23/24</sup> and pALEX-L<sup>48/49</sup> were achieved even though the induction level was not very high, especially for the pALEX-L<sup>48/49</sup> construction. Effectively, we could observed a band corresponding to the expected protein size (approx. 29000 Da) in each induced cell extract after developing into SDS-PAGE more intense in the pALEX-L<sup>23/24</sup> fusion variant (Fig. 4-R, A and B). The reason for the low expression of C-Lytag/AS<sub>48/49</sub> is not clear.

Anti C-Lytag antibodies used to detect the fusion partners by Western Blotting recognized the recombinant proteins, indicating that correct fusion were made. More importantly, the results with antisera-AS-48 indicated that some, if not all, of the immunogenic epitopes must be conserved in the recombinant proteins, being accessible in the surface of the parent peptide (results not shown). Interestingly, the AS-48-linear derivatives expressed as fusion proteins exhibited not inhibitory activity, which is not surprising because the Lytag-binding protein part imposes a huge size and different polarity relative to the attached hydrophobic bacteriocin.

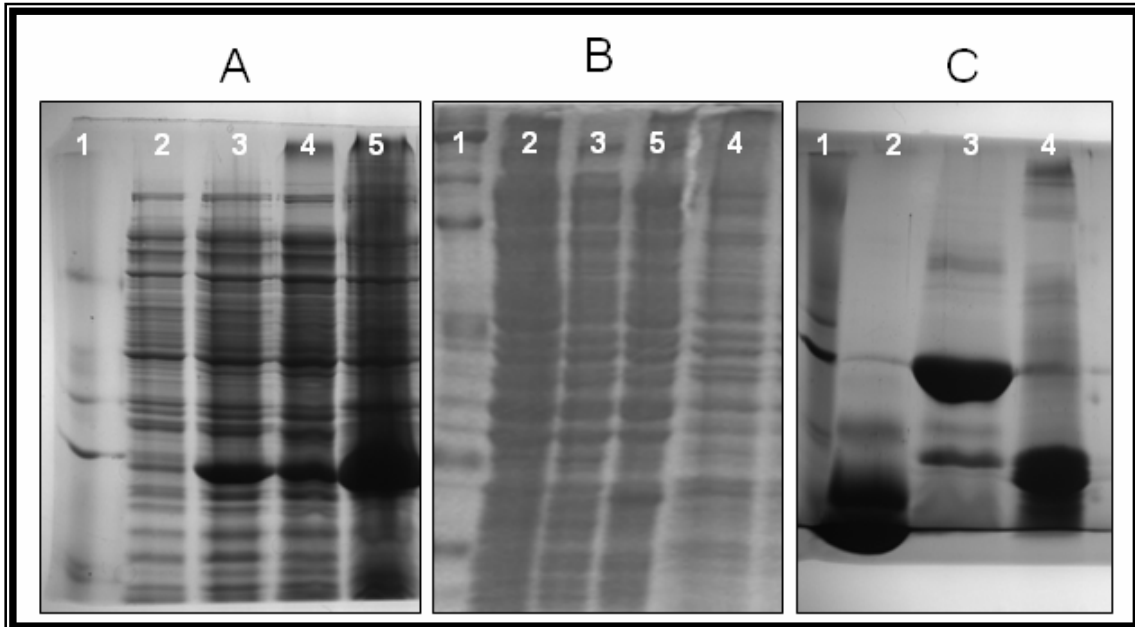
Induction time (h)	REG-1		REG-1 (pALEXa)		REG-1 (pALEX <sup>23/24</sup> )		REG-1 (pALEX <sup>48/49</sup> )	
	-	+	-	+	-	+	-	+
0	0.88	0.73	0.77	0.76	0.66	0.63	0.61	0.61
1	1.24	1.02	1.19	1.13	0.98	0.82	0.97	0.71
2	1.53	1.30	1.55	1.37	1.31	0.86	1.30	0.75
3	1.72	1.53	1.77	1.50	1.57	0.85	1.53	0.76
4	1.85	1.72	1.93	1.71	1.75	0.84	1.73	0.77
5	1.96	1.83	2.03	1.82	1.85	0.82	1.83	0.79
6	2.02	1.90	2.11	1.89	1.92	0.79	1.91	0.80
7	2.07	2.00	2.16	1.99	2.01	0.78	1.99	0.82
24	1.97	1.97	2.00	2.07	1.99	1.74	1.97	1.88

**Table 3-R.** OD (A<sub>600</sub> nm) of *E. coli* REG-1 transformants harbouring pALEX-L<sup>23/24</sup> or pALEX-L<sup>48/49</sup> plasmids after induction with 2mM salicylate at 28 °C during different induction times.

The cellular location of the fusion proteins in *E. coli* was also investigated. The results showed that in both cases, the proteins remained mainly in the insoluble fractions.

**Cleavage of fusion proteins.** Different enterokinase (EK) buffers were assayed to cleavage the acyclic-AS-48 derivatives from the fusion proteins, either as soluble forms or as inclusion bodies. In fact, absence of choline

chloride caused undesirable protein aggregation and glycerol has negative effect on solubility, either alone or combined with NaCl. Finally, we used a modified EK buffer (50mM Tris plus 1mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween 20, 150mM NaCl and 10mM choline) which gave the best result.

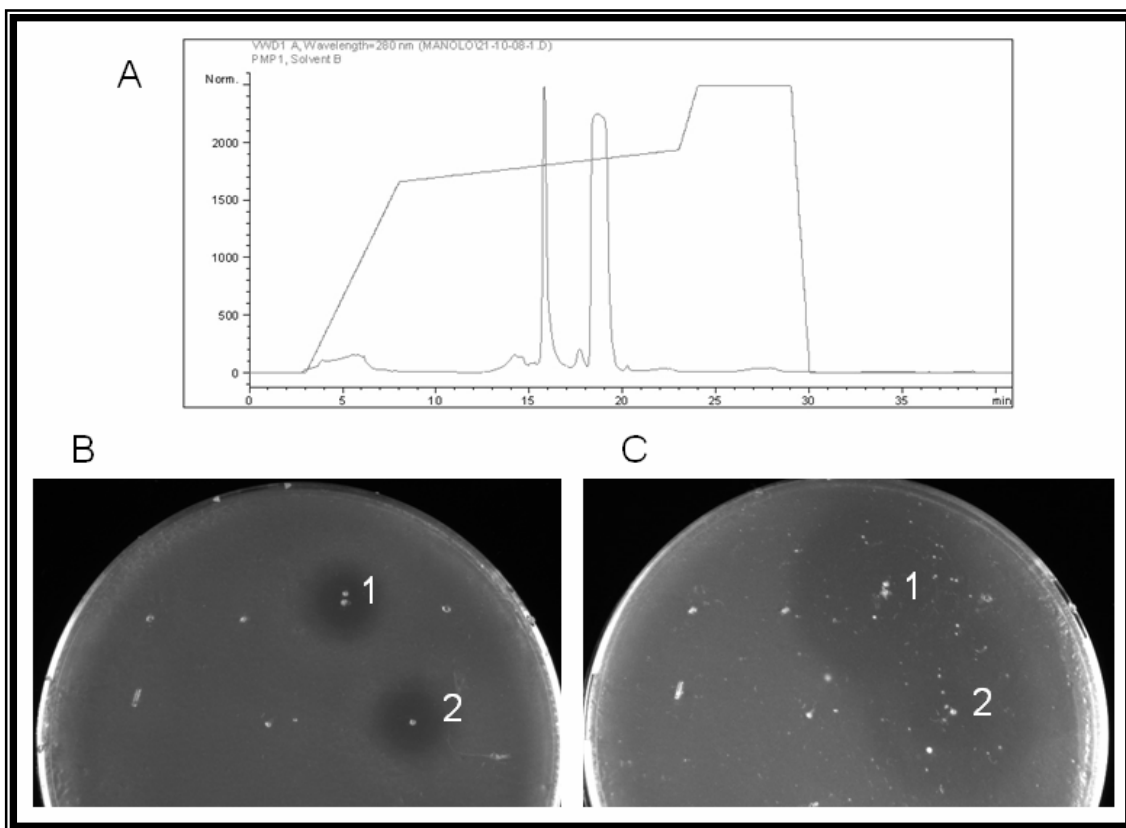


**Figure 4-R. Expression of fusion products with C-Lytag protein in *E. coli* REG-1.** Cell extracts from pALEX-L<sup>23/24</sup> (A) and pALEX-L<sup>48/49</sup> (B) monitored by SDS-PAGE. (Lane 1) ladder, (lane 2) 0 h, (lane 3) after 5 h induction, (lane 4) supernatant after sonication, (lane 5) pellet after sonication. (C) Enterokinase treatment of the C-Lytag/AS<sub>23/24</sub> fusion protein developed by SDS-PAGE: (lane 1) Ladder, (lane 2) purified AS-48 use as control, (3) fusion protein, (lane 4) after EK treatment for 72 h.

Once the reaction buffer was optimized, different cleavage times, ranging from 1 to 4 days, were assayed being 48 to 72 hours the most appropriate. In these conditions all the fractions obtained from REG-1(pALEX-L<sup>23/24</sup> or pALEX-L<sup>48/49</sup>) after proteolysis and column elution were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 5-R, C and results not shown) and assayed for inhibitory activity against *L. monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* S-47, and *E. coli* CECT 101. Likewise, the recovered peptides were separated by RP-HPLC obtaining four peaks with different retention times (Fig. 5-R, A). The activity assays in plate allowed us to identify that the only fraction with activity corresponded in both cases to the third peak obtained (Fig. 5-R, B) and interestingly, the size of the inhibition halos were increasing after prolonged incubation (Fig. 5-R, C), suggesting that autolysin induction could be happening. This, in spite of the tag used was devoid of cell wall-

degrading activity (43) as we also confirmed in the controls with the pALEXa carried out (result not shown).

This unexpected result could be explained only after a careful investigation on the active fraction, which was performed in the AS<sub>23/24</sub> case by SDS-PAGE followed by identification of the peptide mass fingerprinting and mass spectrometry. The results obtained shown the existence of a major peak of 17861,75 Da corresponding to a functional chimeric protein having a hybrid composition (106 residues from *tag* and the first 55 ones from AS<sub>23/24</sub>).



**Figure 5-R. Activity of the different fractions from C-Lytag/AS-48-fusion proteins against *L. monocytogenes* after EK digestion and separation by RP-HPLC (A).Activity assays of the recovered fractions from pALEX-L<sup>23/24</sup> (1) and pALEX-L<sup>48/49</sup> (2) after 18 h of incubation (B) and the same plate after 72 h of incubation (C).**

**General conclusions.** In spite of the extensive knowledge on the genetics and molecular biology of *E. coli*, not every gene can be expressed efficiently in this host. This may be due to the unique and subtle structural features of the gene sequence, the stability and translational efficiency of mRNA, the accuracy of amino acid incorporation, the use of a strong promoter, the difficult of protein folding, the potential toxicity of the protein to the host

and/or degradation of the protein by host cell proteases. However, all these criteria have been carefully considered in this work, trying to optimize the conditions for the production of the two acyclic-AS-48 derivative proteins into different BL21 and MG1655 strains. Two possible reasons of heterologous protein failure must be considered, i) partial or complete deposition into inclusion bodies (not detected in the *E. coli* extracts) or ii) degradation of misfolded proteins by host proteases, other than those energy-dependent proteases here assayed. A plausible justification for this behaviour could be that the opening sites selected were inappropriate, which is a critical point because new sequences lacking chain connectivity could experience difficulty in folding into the same wild-type state as the original sequence (23). This would very likely disrupt the integrity of the core and have not only local structural effects but also major implications for the overall folding. These results show that we could be facing a situation in which the linear polypeptide chains designed are unable to fold into the native conformation or at least into stable structures, perhaps because their nuclei have shifted greatly from the wild-type position and the polypeptide chain undergoes proteolysis after their expression. However, the approach taken in this study to generate fusion proteins to the C-Lytag partner seems sufficient to prevent proteolysis, providing interesting clues on interesting and more complex proteins with new activities. Effectively, we have obtained two fused proteins with the expected size in each induced cell extract that, after enterokinase cleavage, released hybrid proteins corresponding to fusions of *tag* fragments with partial sequences of AS<sub>23/24</sub> and AS<sub>48/49</sub> derivatives respectively, with a surprisingly high anililisteria activity. Further experiments are required to improve the amounts of these active proteins and to perform their physical-chemical characterization.

**Acknowledgements.** We are grateful to the various individuals who kindly provided some strains and plasmids used in this study. We thank also the Genetic Sequencing Service (Department of Genetics, University of Granada). This work was supported by the Spanish Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Projects BIO2001-3237 and BIO2005-



01544) and by the Research Plan Group (CVI 0160). M. Montalbán-López had a grant from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports. We thank Dr. Rico and Dr. Serrano for their help in designing the linear permutants.

## REFERENCES

1. **Baca, A.M., and W.G.J. Hol.** 2000. Overcoming codon bias: a method for high-level overexpression of *Plasmodium* and other AT-rich parasite genes in *Escherichia coli*. *Int. J. Parasitol.* **30**:113–118.
2. **Baneyx, F. and M. Mujacic.** 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**:1399–1408.
3. **Birnboim, H.C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513–1523.
4. **Boissinot, M., S. Karnas, J.R. Lepock, D.E. Cabelli, J.A. Tainer, E.D. Getzoff, and R.A. Hallewell.** 1997. Function of the Greek key connection analysed using circular permutants of superoxide dismutase. *EMBO J.* **16**:2171–2178.
5. **Bhunja, A.K., M.C. Johnson, and B. Ray.** 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Ind. Microbiol.* **2**:319–322.
6. **Chen, Y.Q., S. Q. Zhang, B. C. Li, W. Qiu, B. Jiao, J. Zhang, and Z. Y. Diao.** 2008 Expression of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in *Escherichia coli* using two fusion partners. *Prot. Express. Purif.* **57**:303–311
7. **Cobos, E.S., V.V. Filimonov, A. Gálvez, M. Maqueda, E. Valdivia, J.C. Martínez and P.L. Mateo.** 2001. AS-48: a circular protein with an extremely stable globular structure. *FEBS Lett.* **505**:379–382.
8. **Cobos, E.S., V.V. Filimonov, A. Gálvez, E. Valdivia, M. Maqueda. J.C. Martínez, and P.L. Mateo.** 2002. The denaturation of circular enterocin AS-48 by urea and guanidinium hydrochloride. *Biochim. Biophys. Acta.* **1598**:98–107.
9. **Craik, D.J., N.L. Daly, I. Saska, M. Trabi, K.J. Rosengren.** 2003. Structures of Naturally Occurring Circular Proteins from Bacteria. *J. Bacteriol.* **185**:4011–4021.
10. **Daly, N., and D.J. Craik.** 2000. Acyclic Permutants of Naturally Occurring Cyclic Proteins. Characterization of cystine knot and B-sheet

formation in the macrocyclic polypeptide Kalata B1. *J. Biol. Chemist.* **275**:19068–19075.

11. **Díaz, M., E. Valdivia, M. Martínez-Bueno, M., Fernández, A.S. Soler-González, H. Ramírez-Rodrigo, and M. Maqueda.** 2003 Characterization of a new operon, *as-48EFGH*, from the *as-48* gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1229–1236.

12. **Fernández, M., M. Sánchez-Hidalgo, M. Martínez-Bueno, E. Valdivia, N. García-Quintáns, P. López, and M. Maqueda.** 2008. Processing of *as-48ABC* RNA in AS-48 enterocin production by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **190**:240–250.

13. **González, C., G.M. Langdon, M., Bruix, A. Gálvez. E., Valdivia, M. Maqueda, and M. Rico.** 2000. Bacteriocin AS-48, a cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:11221–11226.

14. **Goldenberg, D.P., and T.E. Creighton.** 1983. Circular and circularly permuted forms of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **165**:407–413.

15. **Goldenberg, D.P., and T.E. Creighton.** 1984. Folding pathway of a circular form of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **179**:527–545.

16. **Hannig, G., and S.C. Makrides.** 1998. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* **16**:54–60.

17. **Hernández, J.F., J. Gagnon, L. Chiche, T.M. Nguyen, J.P. Andrieu, A. Heitz, T. Trinh Hong, T.T. Pham, and D. Le Nguyen.** 2000. Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. *Biochem.* **39**:5722–5730.

18. **Henzel, W.J. and C. Watanabe.** 2003. Protein Identification: The Origins of Peptide Mass Fingerprinting". *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**: 931–942.

19. **Hoffman, B.J., J.A. Broadwater, P. Johnson, J. Harper, B.G. Fox, W.R. Kenealy.** 1995. Lactose fed-batch overexpression of recombinant metalloproteins in *Escherichia coli* BL21 (DE3): process control yielding

high levels of metal-incorporated, soluble protein, *Protein Expr. Purif.* **6**: 646–654.

20. **Korsinczky, M.L., H.J. Schirra, K.J. Rosengren, J., West, B.A. Condie, L., Otvos, M.A. Anderson, and D.J. Craik.** 2001. Solution structures by  $^1\text{H}$ -NMR of the novel cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds and an acyclic permutant. *J. Mol. Biol.* **311**:579–591.

21. **Laemmli. U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680–685.

22. **Langdon, G.M., M. Bruix, A. Gálvez, E. Valdivia, M. Maqueda, and M. Rico.** 1998. Sequence-specific  $^1\text{H}$  assignment and secondary structure of the bacteriocin AS-48 cyclic peptide. *J. Biomol. NMR* **1**:173–175.

23. **Li, L., and E.I. Shakhnovich.** 2001. Different circular permutations produced different folding nuclei in proteins: a computational study. *J. Mol. Biol.* **306**:121–132.

24. **Lindberg, M.O., J. Tangrot, D.E. Otzen, D.A., Dolgikh, A.V., Finkelstein, and M. Oliveberg.** 2001. Folding of circular permutants with decreased contact order: general trend balanced by protein stability. *J. Mol. Biol.* **314**:891–900.

25. **Lindberg, M., J. Tangrot, and M. Oliveberg.** 2002. Complete change of the protein folding transition state upon circular permutation. *Nature Struct. Biol.* **9**:818–822.

26. **Makrides, S.C.** 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**:512–538.

27. **Maqueda, M., A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, I. Guerra, and E. Valdivia.** 1993. Neutralizing antibodies against the peptide antibiotic AS-48: immunocytological studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:148–151.

28. **Maqueda, M., A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, M.J., Sánchez-Barrena, C., González, A. Albert, M. Rico, and E. Valdivia.** 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **5**:399–416.

29. **Maqueda, M., M. Sánchez-Hidalgo, M., Fernández, M., Montalbán-López, E. Valdivia, and M. Martínez-Bueno.** 2008. Genetic Features of Circular Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:2–22.
30. **Martin-Visscher, L.A., van Belkum, M.J., Garneau-Tsodikova, S., Whittall, R.M., Zheng, J., McMullen, L.M., Vederas, J.C.** 2008. Isolation and characterization of carnocyclin A, a novel circular bacteriocin, produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:4756–4763.
31. **Martínez-Bueno, M., M. Maqueda, A. Gálvez, B. Samyn, J. van Beeumen, J. Coyette, and E. Valdivia.** 1994. Determination of the gene sequence and molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **176**:6334–6339.
32. **Martínez-Bueno, M., E. Valdivia, A. Gálvez, J. Coyette, and M. Maqueda.** 1998. Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **27**:347–358.
33. **McNulty, D.E., B.A. Claffee, M.J. Huddleston, M.L. Porter, K.M. Cavnar, and J.F. Kane.** 2003. Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **27**:365–374.
34. **Montalbán-López, M., B. Spolaore, O. Pinato, M. Martínez-Bueno, E. Valdivia, M. Maqueda and A. Fontana.** 2008. Characterization of Linear Forms of the Circular Enterocin AS-48 Obtained by Limited Proteolysis. *FEBS Lett.* **582**: 3237–3242.
35. **Otzen, D.E., and A.R. Fersht.** 1998. Folding of circular and permuted chymotrypsin inhibitor 2: retention of the folding nucleus. *Biochem.* **37**:8139–8146
36. **Peränen, J., M. Rikkonen, M. Hyvönen, and L. Kääriäinen.** 1996. T7 Vectors with a Modified T7lac Promoter for Expression of Proteins in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **236**:371–373.

37. **Piervincenzi, R.T., and A. Chilkoti.** 2004. Effect of genetic circular permutation near the active site on the activity and stability of an enzyme inhibitor. *Biomol. Eng.* **21**:33–42.
38. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor, NY Laboratory Press.
39. **Samyn, B., M. Martínez-Bueno, B. Devreese, M. Maqueda, A. Gálvez, E. Valdivia, J. Coyette, and J. van Beeumen.** 1994. The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Lett.* **352**:87–90.
40. **Sánchez-Barrena, M., G. Martínez-Ripoll, A. Gálvez, E. Valdivia, M. Maqueda, V. Cruz, and A. Albert.** 2003. Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state. *J. Mol. Biol.* **334**:541–549.
41. **Sánchez-Hidalgo, M., M. Martínez-Bueno, A.M. Fernández-Escamilla, E. Valdivia, and M. Maqueda.** 2008. Effect of glutamic substitutions upon the biological activity and stability of circular enterocin AS-48. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**: 1256–1265.
42. **Sánchez-Hidalgo, M., A.M. Fernández-Escamilla, M. Martínez-Bueno, E. Valdivia, L. Serrano, and M. Maqueda.** Conformational stability and activity of circular enterocin AS-48 derivatives. *Appl. Environ. Microbiol.* MS in Review.
43. **Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L., García, E.** 1990. Cloning and expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases. *Gene.* **89**: 69-75.
44. **Sawers, G., and M. Jarsch.** 1996. Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**:1–9.
45. **Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and J. W. Dubendorff.** 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**:60–89.
46. **Studier, F.W. and B.A. Moffatt.** 1986. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *J. Mol. Biol.* **189**:113–130

47. **Tang, Y.Q., J. Yuan, G. Osapay, K. Osapay, D. Tran, C.J. Miller, A.J. Ouellette, and M.E. Selsted.** 1999. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*. **286**:498–502.
48. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**:4350–4354.
49. **Viguera, A.R., L. Serrano, and M. Wilmanns.** 1996. Different folding transition states may result in the same native structure. *Nat. Struct. Biol.* **3**:874–880.
50. **Wu, X., H. Jörnvall, K.D. Berndt, and U. Oppermann.** 2004. Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**:89–96.
51. **Xiao, H., M. Kalman, K. Ikehara, S. Zemel, G. Glaser, and M. Cashel.** 1991. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations. *J. Biol. Chem.* **266**:5980–5990.







## APPENDIX I

### 1. Cloning of *as-48L*<sup>23/24</sup> and *as-48L*<sup>48/49</sup> genes into lactococcal expression systems.

Genes *as-48L*<sup>23/24</sup> and *as-48L*<sup>48/49</sup> were fused with *usp45* and lactococcin A signal peptide by spliced overlap extension method as described in Material and Methods chapter using the primers listed in table 4-R. After fusion, they were ligated into pCR2.1 or pGEM-T easy vector, transformed into *E. coli* TOP10 and sequenced. Eventually, correct clones were cut with *EcoRI* and cloned into pTG262 linearized with the same enzyme, transformed in *E. coli* MC1022 and sequenced. pTG262 derivatives with the right sequence were transformed into *Lactococcus lactis* FI10661 and FI10662. All the bacteria and plasmids generated in this work are summarized in table 5-R.

### 2. Expression assays of *as-48L*<sup>23/24</sup> and *as-48L*<sup>48/49</sup> fused to *usp45* leader peptide.

Plasmids pTGusp23/24 and pTGusp48/49 were transformed into FI10661 and FI10662. Expression assays were performed as described in (Montalbán-López *et al.*, in preparation) in with the same negative results. Intracellular protein as well as TCA precipitated supernatant were electrophoresed but no protein with the expected size could be detected in SDS-PAGE nor by Coomassie blue staining neither by western blot.

Activity tests were done by well diffusion assay and spot assay using FI10684 as indicator strain but no activity was detected.

## Resultados

Primer	Sequence
pL23,24_SmaI_R	CCC GGG TTA TCC ACC AGC TTC
usp_pSOE_L23,24_F	TCA GGG GTC TAC GCT TGG GTC ACT ACT ATT G
usp_pSOE_L23,24_R	CAA TAG TAG TGA CCC AAG CGT AGA CCC CTG A
pL48,49_SmaI_R	CCC GGG TTA TCT GTT TGC TGC
usp_pSOE_L48,49_F	TCA GGG GTC TAC GCT GAG TCA ATT AAA GCA TA
usp_pSOE_L48,49_R	TAT GCT TTA ATT GAC TCA GCG TAG ACC CCT GA
pAD1	CCT GAA TAA TAT AGA GAT AGG TT
Reverse	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA
Universal	GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG T

**Table 4-R. Primer used in spliced overlap extension and sequencing.**

Stain no.	Host	Plasmid	Relevant features				
			Resistance	<i>as-48CC<sub>1</sub>DD<sub>1</sub></i> (AS-48 <sup>r</sup> )	<i>as-48L</i> var. usp leader	<i>as-48L</i> var. lactococcin leader	
	FI10661	pTGusp23/24	Cm <sup>R</sup> Nis <sup>R</sup>	Ery <sup>R</sup>	√	L <sup>23/24</sup>	
	FI10662	pTGusp23/24	Cm <sup>R</sup> Nis <sup>r</sup>	Ery <sup>R</sup>	√	L <sup>23/24</sup>	
	FI10661	pTGusp48/49	Cm <sup>R</sup> Nis <sup>R</sup>	Ery <sup>R</sup>	√	L <sup>48/49</sup>	
	FI10662	pTGusp48/49	Cm <sup>R</sup> Nis <sup>r</sup>	Ery <sup>R</sup>	√	L <sup>48/49</sup>	
FI10680	TOP10	pFI2624	Ap <sup>R</sup>			L <sup>23/24</sup>	
FI10681	TOP10	pFI2625	Ap <sup>R</sup>			L <sup>48/49</sup>	
	MC1022	pFI2627	Ap <sup>R</sup>				L <sup>48/49</sup>
	MC1022	pGEMlcn23/24	Ap <sup>R</sup>				L <sup>23/24</sup>
	MC1022	pTGusp23/24	Cm <sup>R</sup>			L <sup>23/24</sup>	
	MC1022	pTGusp48/49	Cm <sup>R</sup>			L <sup>48/49</sup>	

**Table 5-R. Strains generated during intermediate cloning steps and to construct expression vectors for *Lactococcus lactis*.** Ap<sup>R</sup>: ampicillin resistant plasmid derived from either pCR2.1 or pGEM-T. Cm<sup>R</sup>: chloramphenicol resistant plasmid derived from pTG262. Ery<sup>R</sup>: erythromycin resistance. Nis<sup>R/r</sup>: nisin resistance.





## II. Characterization of Linear Forms of the Circular Enterocin AS-48 Obtained by Limited Proteolysis

Manuel Montalbán-López, Barbara Spolaore, Odra Pinato, Manuel Martínez-Bueno, Eva Valdivia, Mercedes Maqueda y Angelo Fontana.

AS-48 es una proteína circular producida por *E. faecalis* que posee amplio espectro de actividad antibacteriana. La estructura tridimensional de esta proteína consiste en cinco hélices  $\alpha$  de las cuales las hélices  $\alpha_1$ - $\alpha_3$  constituyen una superficie hidrófoba mientras que en las hélices  $\alpha_4$ - $\alpha_5$  se encuentra una región cargada positivamente. Mediante proteólisis limitada de esta molécula hemos obtenido y caracterizado una forma abierta de AS-48 (AS<sub>10/11</sub>) y dos fragmentos de 55 y 38 residuos (AS<sub>43-27</sub> y AS<sub>42,43-10</sub>). Mediante DC en el UV lejano pudimos comprobar que forma abierta poseía menor helicidad y estabilidad a la desnaturalización térmica, pero era activa frente a las bacterias indicadoras utilizadas. Los fragmentos también retenían parcialmente la actividad biológica de la molécula nativa, lo que confirma que es posible reducir la secuencia de esta bacteriocina sin causar la inactivación de la misma. Todo ello muestra que la circularización no es esencial para la actividad bactericida pero si importante para la estabilización de la estructura.









## II. Characterization of Linear Forms of the Circular Enterocin AS-48 Obtained by Limited Proteolysis

Manuel Montalbán-López<sup>1,2,†</sup>, Barbara Spolaore<sup>2,†</sup>, Odra Pinato<sup>2</sup>, Manuel Martínez-Bueno<sup>1</sup>, Eva Valdivia<sup>1</sup>, Mercedes Maqueda<sup>1</sup> and Angelo Fontana<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University of Granada, Av. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>2</sup> CRIBI Biotechnology Centre, University of Padua, Viale G. Colombo 3, 35121 Padua, Italy.

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work

*Abbreviations:* CD, circular dichroism; E/S, enzyme to substrate ratio; ESI-MS, electrospray ionization-mass spectrometry; m/z, mass to charge ratio; RP, reverse-phase; HPLC, high-performance liquid chromatography; RT, retention time;  $[\theta]$ , mean residue ellipticity; TFA, trifluoroacetic acid; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; SDS, sodium dodecyl sulfate; UV, ultraviolet; TFE, trifluoroethanol; Gdn-HCl, guanidine hydrochloride.

*Key words:* Enterocin AS-48; Limited proteolysis; Circular proteins; Nicked AS-48; Protein fragments; Antimicrobial activity

*Running Title:* Linear forms of AS-48 obtained by limited proteolysis

*\*Corresponding author.* CRIBI Biotechnology Centre, University of Padua, Viale G. Colombo 3, 35121 Padua, Italy; Tel.: 39-049-827 6156; Fax: 39-049-827 6159; E-mail: [angelo.fontana@unipd.it](mailto:angelo.fontana@unipd.it).

**Abstract**

AS-48 is a 70-residue circular peptide from *Enterococcus faecalis* with a broad antibacterial activity. The three-dimensional structure of this protein consists in five  $\alpha$ -helices with a hydrophobic surface located in helices  $\alpha_1$ - $\alpha_3$  and a highly positive charged region concentrated in helices  $\alpha_4$  and  $\alpha_5$ . Here, we produced by limited proteolysis a protein species carrying a single nicking and fragments characterised by the stepwise deletion of helices  $\alpha_1$ - $\alpha_3$ . Nicked AS-48 showed a lower helicity by far-UV CD and a reduced stability to thermal denaturation but it was active against the sensitive bacteria assayed. The fragments also retained some biological activity. These results indicate that it is possible to produce linear forms of AS-48 that still retain activity.

## 1. Introduction.

Circularization of polypeptide chains is a modification that stabilizes the native conformation of a protein and increases the resistance to proteolysis. There are many examples of natural circular proteins in different organisms. AS-48 is a 70-residue circular peptide from *Enterococcus faecalis* that belongs to an heterogeneous group of bacterial antimicrobial polypeptides, also called bacteriocins [1-5]. This protein shows a broad antimicrobial spectrum against both Gram-positive and Gram-negative bacteria [6,7]. The target of AS-48 is the bacterial cytoplasmic membrane in which it inserts in a voltage-independent manner forming pores and leading to the dissipation of the proton motive force [2]. The complete NMR assignment indicated that the AS-48 fold is characterised by five helices ( $\alpha_{1-5}$ ) arranged to form a globular structure (Fig. 6-R) [8]. AS-48 is a strongly basic molecule (pI ~ 10.5) that contains a high proportion (49%) of hydrophobic amino acids and uncharged hydrophilic residues [1,9]. Basic residues are asymmetrically distributed at the level of the helices, being clustered at the level of helices  $\alpha_4$  and  $\alpha_5$ , whereas a hydrophobic surface is located in helices  $\alpha_{1-3}$ . The backbone circularization of the pro-AS-48 occurs in the middle of  $\alpha_5$ -helix between Met1 and Trp70 and it confers an extremely high stability to the protein [10,11]. Because of its stability and broad antimicrobial spectrum, AS-48 is a good candidate as a natural food preservative [12-14].

Previous attempts to obtain a nicked AS-48 by chemical hydrolysis with BrCN were not successful [10]. The synthesis of a fragment encompassing the positive charged region also did not produce an active species [15]. Here, we have used limited proteolysis to produce linear forms of AS-48, considering that this technique often allows to obtain nicked forms and fragments of a protein able to maintain a native-like conformation [16-18]. We report the production of a nicked AS-48 form and fragments species of 55- and 38-residues that retain an  $\alpha$ -helical secondary structure and partly the biological activity of the intact protein.

## 2. Material and methods.

### 2.1. Materials.

Thermolysin was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All chemicals of analytical reagent grade were purchased from Sigma or Fluka (Basel, Switzerland). AS-48 was purified to homogeneity from supernatant of the producer *Enterococcus faecalis* JH2-2(pAM401-81) strain in high cell density batch using the purification protocol developed by [19].

### 2.2. Limited proteolysis experiments.

Purified samples of AS-48 were prepared upon dissolution of the lyophilised protein in 6M Gdn-HCl followed by desalting using a Sephadex G-25 column equilibrated in 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Proteolysis reactions were conducted in 50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS pH 7.5 upon addition of a stock solution of 10% SDS in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 to the protein sample collected from gel filtration. Proteolysis in 15% TFE were carried out upon dilution of the same sample with TFE. Experiments were performed at a protein concentration of 1.0 mg/ml using thermolysin at an E/S ratio of 1/50 (by weight) at room temperature for the proteolysis in 0.1% SDS, and at an E/S ratio of 1/20 at 37°C for the hydrolysis in 15% TFE. The reactions were stopped by acidification with TFA in water. Stock solutions of thermolysin were prepared in 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.5 for the reaction in 0.1% SDS and in 50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.5 for the reaction in 15% TFE, and stored at -20°C. For the limited proteolysis reaction in 15% TFE a lower concentration of CaCl<sub>2</sub> was preferred since it resulted in an increase of the yield of fragment AS<sub>43-27</sub>. The proteolysis mixtures were analyzed by RP-HPLC using a Jupiter C<sub>4</sub> column (4.6 mm × 250 mm; Phenomenex, CA, USA) connected to an anion exchange guard column and eluted with a gradient of acetonitrile/0.085% TFA vs water/0.1% TFA from 5% to 65% in 10 min, from 65% to 68% in 15 min and from 68 to 95% in 1 min. The effluent was monitored by recording the absorbance at 226 nm. The collected fractions were freeze-dried using a Speed-Vac system (Savant). AS<sub>10/11</sub> still eluted from the RP-HPLC

separation with some SDS molecules that were eliminated upon precipitation with 6 M Gdn-HCl.

The sites of proteolytic cleavage of AS-48 were identified upon analysis by mass spectrometry of the protein fragments purified by RP-HPLC. Mass determinations were obtained with an electrospray ionization (ESI) mass spectrometer Q-ToF Micro from Micromass (Manchester, UK). The measurements were conducted at a capillary voltage 3 kV and a cone voltage 30-40 V. The molecular masses of protein samples were estimated using the MassLynx software 4.0 (Micromass) and compared with the sequence of AS-48 using MassXpert 1.0 software. In order to determine the sites of nicking of AS-48, N-terminal sequencing was performed using an Applied Biosystem protein sequencer (model Procise HT491).

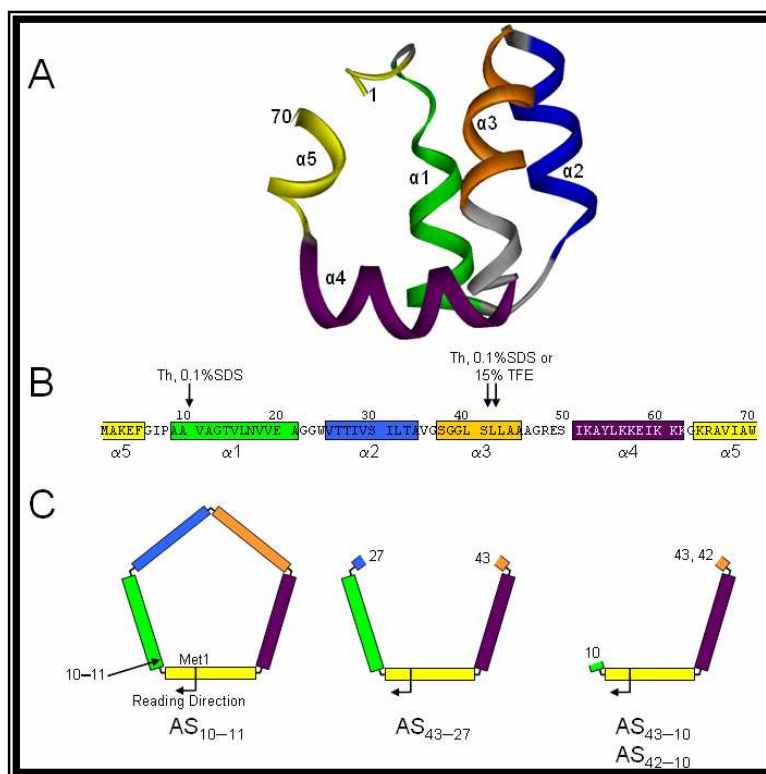
### 2.3. Circular dichroism.

Protein concentration was determined by UV spectroscopy using extinction coefficient values calculated according to [20]. Circular dichroism spectra were recorded at room temperature on a Jasco J-710 spectropolarimeter (Tokyo, Japan) equipped with a thermostatically controlled cell holder [18]. Thermal denaturation of AS<sub>10/11</sub> was performed by measuring the temperature dependence of the dichroic signal at 222 nm of the protein dissolved in 10 mM phosphate buffer at pH 2.5 at a concentration of 0.015 mg/ml and using a cuvette with a 1.0 cm path length. The CD signal was continuously recorded while heating the cuvette at a constant rate (60°C/60 min).

### 2.5. Activity assays.

Purified AS-48, AS<sub>10/11</sub> and fragments AS<sub>43-27</sub> and AS<sub>42,43-10</sub> dissolved in water:acetonitrile (1:1) plus 0,05% TFA were tested for their inhibitory activity against the indicator *E. faecalis* JH2-2 and *Listeria monocytogenes* CECT 4032 strains using the spot-assay method [21]. Spots with known protein concentration were deposited onto plates of buffered Mueller Hinton Agar (MHA-T, Scharlab), previously overlaid with 6 ml of BHA soft-agar inoculated with the indicator strain. Peptide activity was assessed by observing an inhibition zone after incubation overnight at 37°C. To

determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the nicked form and fragments of AS-48, samples were diluted and tested against the indicator strains under identical conditions.



**Figure 6-R. 3D structure of AS-48.** A. Three-dimensional structure of AS-48 derived from the NMR structure of the protein (file 1E68 taken from the Brookhaven Protein Data Bank) using the program WebLab Viewer Pro 4.0 (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA, USA). Amino acids M<sup>1</sup> and W<sup>70</sup> appear separated but in the protein they are connected by a peptide bond. The five major helical regions of the protein spanning residues 9–21 ( $\alpha 1$ ), 25–34 ( $\alpha 2$ ), 37–45 ( $\alpha 3$ ), 51–62 ( $\alpha 4$ ) and 64–5 ( $\alpha 5$ ) are indicated and showed with different colours (see B). B. Amino acid sequence of AS-48. The regions of  $\alpha$ -helical structure are indicated with coloured boxes and arrows indicate the sites of initial proteolytic cleavage by thermolysin (Th) in 0.1% SDS and 15% TFE. C. Schematic representation of AS<sub>10/11</sub> and of fragments AS<sub>43-27</sub> and AS<sub>43/42-10</sub> produced by limited proteolysis of AS-48.

### 3. Results

#### 3.1. Limited proteolysis of AS-48.

Proteolysis experiments carried out at neutral pH and in the presence of TFE or SDS were analysed by RP-HPLC (Fig. 7-R) and the sites of hydrolysis were determined upon analysis of the proteolytic products eluted in the chromatographic fractions by mass spectrometry (Table 6-R) and N-terminal sequencing. When limited proteolysis was conducted in

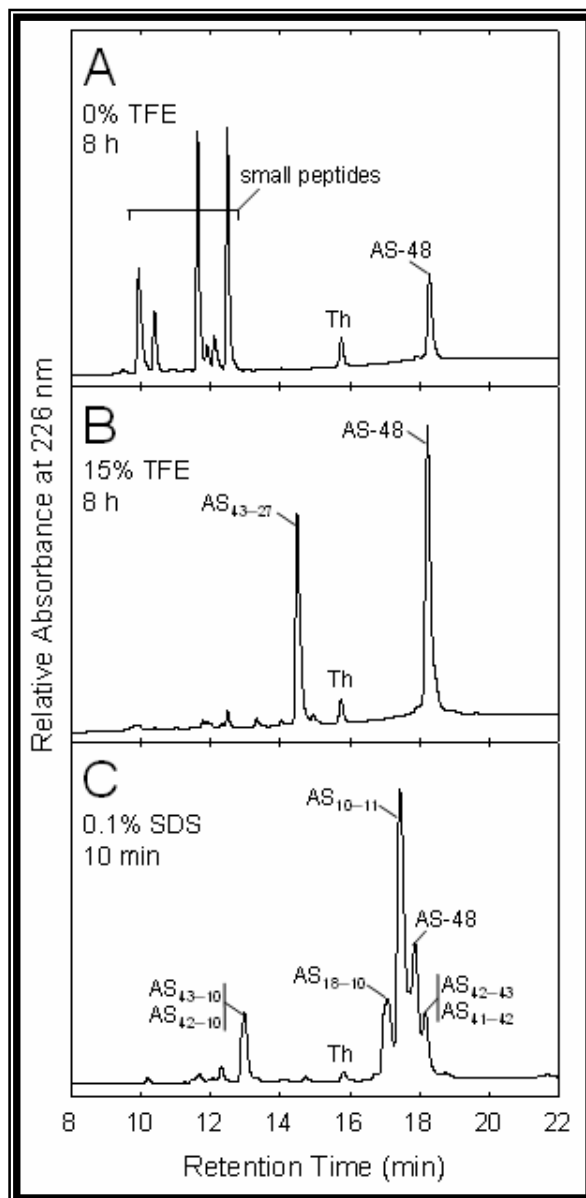
50mM Tris, pH 7.5, we observed the production only of small fragments (Fig. 7-R, A) which were not of interest for the purposes of this study. Addition of 15 % TFE instead determined a slower degradation of AS-48 and it allowed the isolation of fragment 43-27 (AS<sub>43-27</sub>) with a good yield (Fig. 7-R, B and Fig. 6-R, C). Upon increasing the amount of TFE (30% and 40%), the reaction became much slower and even if we isolated a nicked form of AS-48 opened between residues Leu42 and Leu43, the yield of this species was too low to perform additional studies (data not shown).

protein species <sup>a</sup>	molecular mass (Da)	
	calculated <sup>b</sup>	measured <sup>c</sup>
<b>AS-48</b>	7149.50	7149.42
<b>AS<sub>43-27</sub></b>	5798.93	5798.83
<b>AS<sub>10/11</sub></b>	7167.57	7167.25
<b>AS<sub>43-10</sub></b>	4141.41	4140.44
<b>AS<sub>42-10</sub></b>	4254.49	4253.52
<b>AS<sub>18-10</sub></b>	6512.80	6512.88

**Table 6-R. Molecular masses of fragments of AS-48 obtained by proteolysis with thermolysin in 0.1% SDS or 15% TFE.** (a) Fragments obtained by proteolysis of AS-48 with thermolysin in 0.1% SDS or 15% TFE (Figure 7-R). (b) Molecular masses calculated from the amino acid sequence of AS-48. Mass values above 4500 Da are given as average molecular masses. (c) Experimental molecular masses determined by ESI-MS.

Limited proteolysis was also conducted at neutral pH in the presence of 0.1% SDS. Using these conditions, we obtained three forms nicked at the level of residues Ala10 and Val11 (AS<sub>10/11</sub>), Leu42 and Leu43 (AS<sub>42/43</sub>) and Ser41 and Leu42 (AS<sub>41/42</sub>) and fragments 18–10, 43–10 and 42–10 (Fig. 7-R, C and Fig. 6-R, C). The molecular masses of these species were determined by ESI-MS and they are shown in Table 6-R. We isolated AS<sub>10/11</sub>, fragments 43–10 and 42–10 in sufficient amount and homogeneity to perform further structural analyses and activity tests. Since the two fragments elute at the same retention time in the RP-HPLC analysis, they were studied in mixture and we will refer to them as AS<sub>42,43-10</sub>.





**Figure 7-R. Limited proteolysis of AS-48 by thermolysin.** RP-HPLC analyses of the proteolytic mixtures of AS-48 reacted with thermolysin in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (A), with the addition of 15% TFE (B) or in the presence of 0.1% SDS (C). Aliquots of the reaction mixtures after 8 hours (A and B) and 10 minutes (C) of incubation.

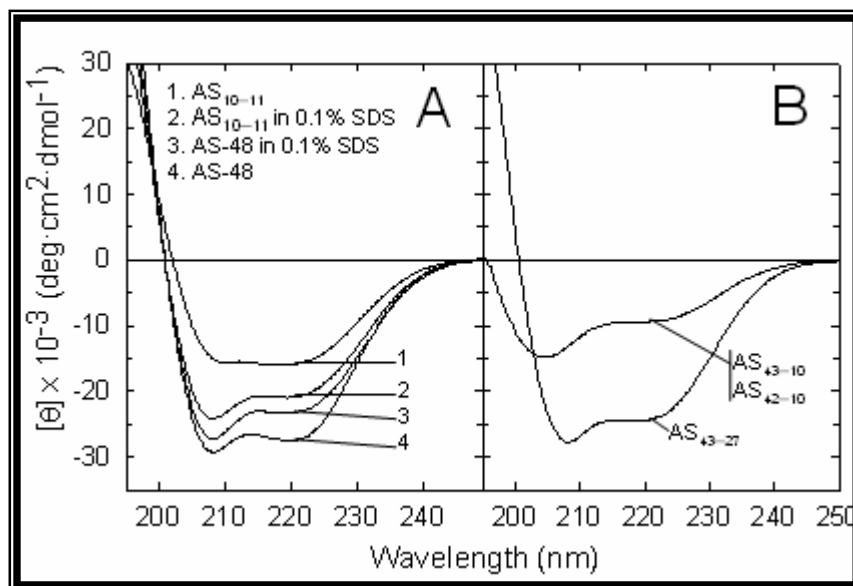
### 3.2. CD spectroscopy.

Far-UV CD spectra were acquired on solutions of AS<sub>10/11</sub> and of fragments AS<sub>43-27</sub> and AS<sub>42,43-10</sub> in 50 mM Tris pH 7.5 (Fig. 8-R). AS<sub>10/11</sub> and AS-48 have CD spectra typical of an  $\alpha$ -helical conformation but the intensity of the CD signal of the nicked species is reduced. We estimated a loss of ~35% of  $\alpha$ -helical content in respect to the intact protein, being the percentage of  $\alpha$ -helix calculated according to [22] 45% and 80% for AS<sub>10/11</sub>

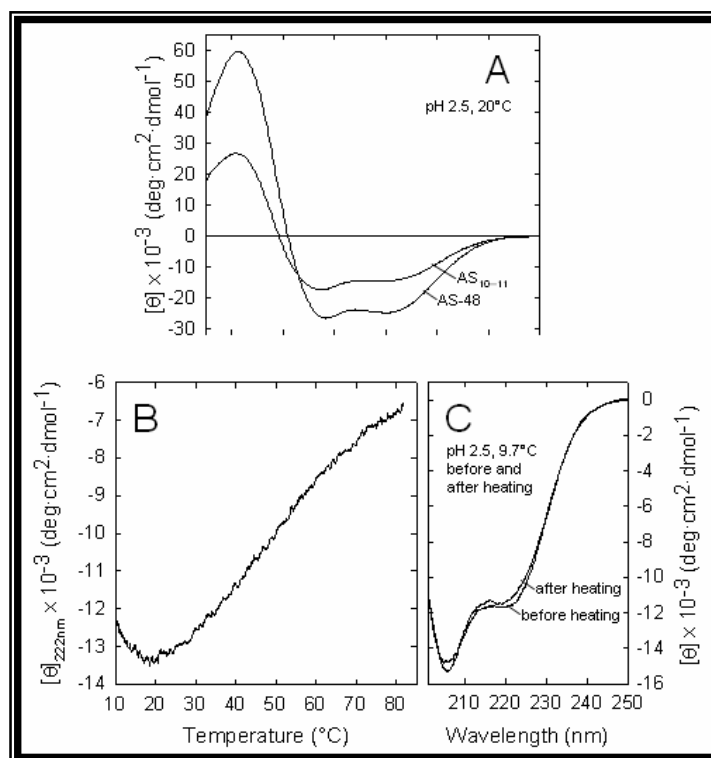
and AS-48, respectively (Fig. 8-R, A). Conversely, far-UV CD spectra of AS<sub>10/11</sub> and AS-48 acquired in the presence of 0.1% SDS evidenced a much lower difference in helicity between the nicked and intact forms, being ~ 7% less for AS<sub>10/11</sub> in respect to AS-48. The surfactant appears to stabilise the helical conformation of AS<sub>10/11</sub> whereas it slightly denatures intact AS-48.

The far-UV CD spectra of fragments AS<sub>43-27</sub> and AS<sub>42,43-10</sub> are instead quite different (Fig. 8-R, B). Indeed, the spectrum of fragment AS<sub>43-27</sub> displays the features of  $\alpha$ -helical polypeptides since minima of negative ellipticity occur near 208 and 222 nm. Interestingly, the helical content of fragment AS<sub>43-27</sub> is substantial since it shows a helicity of 71%, ~9% less than native AS-48 thus suggesting that this fragment retains a native-like conformation. Fragments AS<sub>42,43-10</sub> instead show a much lower helical content and an increase in the intensity of the minimum at 205 nm, which is indicative of a more unfolded conformation.

In order to determine the effect of nicking on the thermal stability of AS-48, we subjected AS<sub>10/11</sub> to thermal denaturation at pH 2.5 (Fig. 9-R). Indeed, it has been reported that if the thermal unfolding is performed at neutral or alkaline pH it leads to irreversible aggregation of AS-48, as it can be expected since at acidic pH the protein is monomeric whereas it forms a dimer at neutral pH [8, 23]. At pH 2.5, AS<sub>10/11</sub> has a far-UV CD spectrum that has the features of an  $\alpha$ -helical polypeptide but as for the CD spectrum acquired at neutral pH, it shows a much lower ellipticity than AS-48 (data not shown). On the basis of the thermal denaturation profile monitored by the temperature-dependence of the CD signal at 222 nm (Fig. 9-R, A), AS<sub>10/11</sub> shows a low cooperativity of unfolding and a reduced stability if compared to native AS-48 which unfolds at 102°C [10,11]. However even in the case of nicked AS-48, thermal unfolding is reversible at pH 2.5 as indicated from the nearly coincidence of the far-UV CD spectra recorded at 9.7°C before and after heating (Fig. 9-R, B). Interestingly, the CD melting curve of nicked AS-48 shows also some initial cold-induced unfolding below 20 °C, a phenomenon already described for other proteins [24]. A cold denaturation effect has been observed also for intact AS-48 but only under denaturing conditions, thus confirming that nicking of the protein reduces its stability [10].



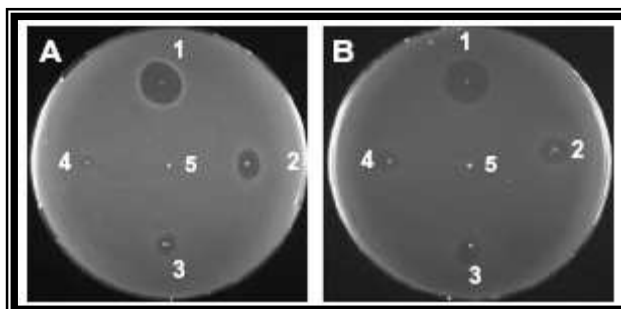
**Figure 8-R. Spectroscopic characterization by circular dichroism of AS<sub>10/11</sub> nicked form and AS<sub>43-27</sub> and AS<sub>43,42-10</sub> fragments.** (A) Far-UV CD spectra of AS-48 and AS<sub>10/11</sub>, in the presence and in the absence of 0.1% SDS. (B) Far-UV CD spectra of fragments AS<sub>43-27</sub> and AS<sub>42,43-10</sub>. Spectra were recorded at room temperature in 50 mM Tris-HCl, pH 7.



**Figure 9-R. Thermal denaturation of AS<sub>10/11</sub>.** (A) Melting profile of AS<sub>10/11</sub> in 10 mM phosphate buffer at pH 2.5. The temperature dependence of the dichroic signal at 222 nm was recorded. (B). Far-UV CD spectra of AS<sub>10/11</sub> at 9.7°C recorded before and after the thermal denaturation.

### 3.3. Activity tests.

The biological activity of the nicked form and fragments of AS-48 were evaluated by inhibition growth of *L. monocytogenes* CECT 4032 and *E. faecalis* JH2-2, both of them sensitive bacteria against AS-48 wild type (Fig. 10-R). AS<sub>42,43-10</sub>, AS<sub>43-27</sub> and AS<sub>10/11</sub> samples (5  $\mu$ l) were active against both the indicator strains when assayed at 0.3 mg/ml, demonstrating that all these linear AS-48 forms retain the inhibitory activity, *L. monocytogenes* being more sensitive. However, the stability of the samples in solution was in all cases less than that of the native AS-48, since the activity was lost during the freezing and thawing processes. Finally, comparing the minimum inhibitory concentration (MIC) for AS-48 against *L. monocytogenes*, the nicked form was at least 300 times less effective than the native form and fragments AS<sub>43-27</sub> and AS<sub>42,43-10</sub> were 500 and 1000 times less active, respectively.



**Figure 10-R. Inhibition halos of AS-48 and its derivatives against *E. faecalis* (A) and *L. monocytogenes* (B) after 18 h of incubation at 37°C.** 1. Native AS-48 (control), 2. AS<sub>10/11</sub>, 3. AS<sub>43-27</sub>, 4. AS<sub>43,42-10</sub>, 5. 50% acetonitrile 0.05%TFA (solvent control). Samples (5  $\mu$ l) contained approximately a concentration of 0.3 mg/ml of each species.

#### 4. Discussion.

Proteolysis experiments were conducted in the presence of SDS and TFE since at neutral pH the protein is hydrolysed into small peptides, as often observed for folded and stable species [25]. Several studies have demonstrated that SDS and TFE have a denaturation effect toward the native conformation of proteins leading to the acquisition of partly folded conformations that mimic those formed at the level of membranes [25,26]. The limited proteolysis experiments conducted on AS-48 indicated that TFE and SDS partly denaturate this protein. Indeed, in both conditions AS-48 is hydrolysed at few peptide bonds localised at the level of the hydrophobic helices  $\alpha_1$ - $\alpha_3$  (residues 9–45), suggesting that this region becomes more flexible and thus susceptible to attack by the protease (Fig. 6-R) [18].

Nicking of the peptide bond Ala10–Val11 at the N-terminus of helix  $\alpha_1$  of AS-48 leads to a consistent destabilization of the structure of the protein. Analysis by circular dichroism of the nicked AS<sub>10/11</sub> form shows a reduction in ellipticity in respect to the native protein which can be interpreted as an alteration in the secondary structure caused by the hydrolysis. It is probable that the open form is less compact and rigid in respect to the intact protein, in agreement with the observation that structural fluctuations and reduction in helix length can lower the measured helicity [27]. The secondary structure of AS<sub>10/11</sub> is also less stable to thermal denaturation in respect to native AS-48, as expected for the favourable entropic contribution introduced by circularization [10,11]. In spite of the differences in helical content and stability, biological assays confirmed that the nicked form retains its functional properties even if it shows a 300 times lower inhibitory activity. These results suggest that circularization is not essential for the bactericidal activity but to stabilise the three dimensional structure of the protein. Interestingly, upon addition of 0.1% SDS the helical contents of the native and the nicked AS-48 became almost identical, demonstrating that AS<sub>10/11</sub> can acquire a conformation similar to that of intact AS-48 in the presence of a membrane-like environment. This observation suggests that nicking is

compatible with the insertion into the bilayer lipid membrane that is required for the activity [2].

Fragment AS<sub>43-27</sub> shows a high  $\alpha$ -helix content close to that calculated from the NMR structure of AS-48 (71 and 78%, respectively), whereas AS<sub>42,43-10</sub> display a far-UV CD spectrum characteristic of a more random conformation. Activity tests conducted on AS<sub>43-27</sub> and AS<sub>42,43-10</sub> indicated that the first species is more active but not as AS<sub>10/11</sub>. All these fragments conserve the positive charged region that is important for the interaction with bacterial membranes. The higher activity of AS<sub>43-27</sub> could be explained by the presence in this last species of the hydrophobic  $\alpha_1$  helix and by the acquisition of a more structured conformation that can maintain the cluster of positive charges in a native-like arrangement. Indeed, the helical content has been demonstrated to be important for the activity of anti-bacterial peptides [28]. Interestingly, the previously described B-49-69, a synthetic 21-residue minibacteriocin comprising residues 49–69 did not show biological activity [15]. B-49-69 differs from AS<sub>42,43-10</sub> by the absence of the last eleven residues 70–10 (WMAKEFGIPAA) of  $\alpha_5$  helix, and the substitution of residues Ile59 and Val67 with cysteines linked by a disulfide bond to maintain the relative orientation of the helices (Fig. 6-R). We suggest that the presence of the Trp70 residue in AS<sub>42,43-10</sub> can be important for the activity. Indeed, tryptophan residues are known to display a high affinity for the polar-apolar interface of the lipid bilayer and they are involved in the interaction with membranes, as it has been demonstrated by mutational analysis in pediocin-like bacteriocins [29]. AS<sub>42,43-10</sub> thus appears to be the minimal sequence of AS-48 that still shows activity, analogous to the anti-mycobacterial domain identified in NK-lysin and granulysin [30].

Summing up, the results here obtained confirm that it is possible to produce linear forms of AS-48 that still retain activity. However, it is important to maintain a certain distribution of electrostatic and hydrophobic surfaces for an efficient insertion into the membranes since the positive charged region is not enough for the activity but part of the hydrophobic region is also needed for a full antibiotic activity.

**Acknowledgments:** This work was supported by the Spanish Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Project BIO2005-01544) and Grupo de Investigación de la Junta de Andalucía (CIV 016). M. Montalbán-López is beneficiary of a grant from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports. We thank Prof. Manuel Rico for scientific support. We acknowledge Marcello Zambonin for technical assistance to the experiments, Prof. Vincenzo De Filippis and Patrizia Polverino de Laureto for useful discussions.

## 5. References

- [1] Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A. and Montoya, E. 1986. Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. Can. J. Microbiol. 32, 765–771.
- [2] Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. (1989b) Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against Gram-positive and Gram-negative bacteria and other organisms. Res. Microbiol. 140, 57–68.
- [3] Gálvez, A., Valdivia, E., Martínez, M. and Maqueda, M. (1989c) Effect of peptide AS-48 on *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-47. Antimicrob. Agents Chemother. 33, 641–645.
- [4] Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez Bueno, M., Sánchez-Barrena, M.J., González, C., Albert, A., Rico, M. and Valdivia, E. (2004) Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. Curr. Prot. Pept. Sci. 5, 399–416.
- [5] Maqueda, M., Sánchez-Hidalgo, M., Fernández, M., Montalbán-López, M., Valdivia, E. and Martínez-Bueno, M. (2008) Genetic Features of Circular Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 32, 2–22.
- [6] Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A. and Maqueda, M. (1998) Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48. 1998. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4623–4626.
- [7] Abriouel, H., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. (2002) Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1473–1477.
- [8] González, C., Langdon, G.M., Bruix, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M. and Rico, M. (2000) Bacteriocin AS-48, a cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 11221–11226.
- [9] Gálvez, A., Giménez-Gallego, G., Maqueda, M. and Valdivia, E. (1989a) 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.

[10] Cobos, E., Filimonov, V.V., Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Martínez, J.C. and Mateo, P.L. (2001) AS-48: a circular protein with an extremely stable globular structure. FEBS Lett. 505, 379–382.

[11] Cobos, E., Filimonov, V.V., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez, J.C. and Mateo, P.L. (2002) The denaturation of circular enterocin AS-48 by urea and guanidinium hydrochloride. Biochim. Biophys. Acta 1598, 98–107.

[12] Cobo-Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Valdivia, E., Lucas-López, R., Maqueda, M., Martínez.Cañamero, M. and Gálvez, A. (2005). Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. Appl. Environ. Microbiol. 71, 7781–7787.

[13] Grande, M. J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M. and Gálvez, A. (2006). Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. Internat. J. Food Microbiol. 106, 185–194.

[14] Muñoz, A., Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, M., Maqueda, M. and Valdivia, E. (2007) Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. Internat. Dairy J. 17, 760–769.

[15] Jiménez, M.A, Barrachi-Saccilotto, A.C., Valdivia, E., Maqueda, M. and Rico, M. (2005) Design, NMR characterization and activity of a 21-residue peptide fragment of bacteriocin AS-48 containing its putative membrane interacting region. J. Pept. Sci. 11, 29–36.

[16] Spolaore, B., Bermejo, R., Zambonin, M. and Fontana, A. (2001). Protein interaction leading to conformational changes monitored by limited proteolysis: apo form and fragments of horse cytochrome c. Biochemistry 40, 9460–9468.

[17] Spolaore, B., Polverino de Laureto, P., Zambonin, M. and Fontana, A. (2004) Limited proteolysis of human growth hormone at low

pH: isolation, characterization, and complementation of the two biologically relevant fragments 1-44 and 45-191. *Biochemistry* 43, 6576–6586.

[18] Fontana, A., Polverino de Laureto, P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P. and Zambonin, M. (2004) Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim. Polon.* 51, 299–321.

[19] Abriouel, H., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. and Gálvez, A. (2003) A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *J. Microbiol. Meth.* 55, 599–605.

[20] Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319–326.

[21] Tagg, J.R. and McGiven, A.R. (1971) Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* 21, 934.

[22] Scholtz, J.M., Quian, H., York, E.J., Stewart, J.M. and Baldwin, R.L. (1991) Parameters of helix-coil transition theory for alanine-based peptides of varying chain lengths in water. *Biopolymers* 31, 1463–1470.

[23] Sánchez-Barrena, M., Martínez-Ripoll, G., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., Cruz, V. and Albert, A. (2003) Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state. *J. Mol. Biol.* 334, 541–549.

[24] Privalov, P.L. (1990) Cold denaturation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, 281–305.

[25] Fontana, A., Polverino de Laureto, P., De Filippis, V., Scaramella, E. and Zambonin, M. (1997) Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. *Fold Des.* 2, 17–26.

[26] Halskau, O., Underhaug, J., Frøystein, N.A. and Martínez, A. (2005) Conformational flexibility of alpha-lactalbumin related to its membrane binding capacity. *J Mol Biol.* 349, 1072–1086.

[27] Hirst, J.D. and Brooks, C.L. (1994) Helicity, circular dichroism and molecular dynamics of proteins. *J. Mol. Biol.* 243, 173–178.

[28] Johansson, J., Gudmundsson, G.H., Rottenberg, M.E., Berndt, K.D. and Agerberth, B. (1998) Conformation-dependent antibacterial

activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J. Biol. Chem.* 273, 3718–3724.

[29] Fimland, G., Eijsink, V.G.H. and Nissen-Meyer, J. (2002) Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. *Biochem.* 41, 9508–9515.

[30] Andreu, D., Carreño, C., Linde, C., Boman, H.G., Andersson, M. (1999) Identification of an anti-mycobacterial domain in NK-lysin and granulysin. *Biochem. J.* 3, 845–849.





## APPENDIX II

### 1. Limited proteolysis assays carried on AS-48 in aqueous solutions.

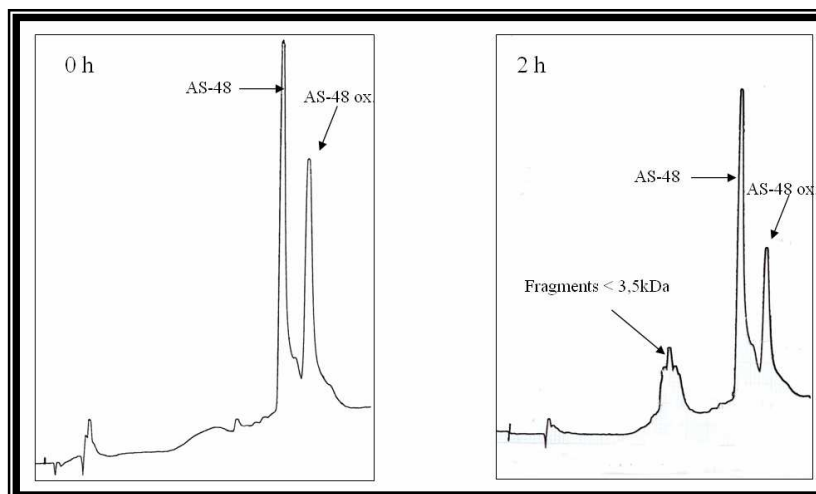
Proteolysis experiments performed with AS-48 rendered more results than those exposed by Montalbán-López *et al.* (2008) when working with thermolysin. Other enzymes were tested as well as different reaction conditions. Firstly, in order to unravel the kinetics of the reaction of such a physicochemically stable molecule, digestion with no denaturant agents and in aqueous solution was assayed. As marked in the published work, the reaction mixture was separated using an analytical C4 RP-HPLC column using a gradient of acetonitrile added with 0.05 % of TFA (5-95%). Eluted fractions were separately collected and analysed by ESI-MS to identify the masses and compare them using software MassXpert 1.0 with native AS-48 so that a peptide sequence and a mass could be matched.

#### 1.1. Proteolysis with pepsin.

Pepsin is an endoprotease with low substrate specificity used with an enzyme to substrate (E/S) ratio of 1/100. It can work at very low pH values thus allowed us to solubilise AS-48 at pH 3.0 with a low ionic strength, which are the conditions in which it is mostly monomeric in solution. Samples were taken after different incubation time (0, 5, 30, 60 min and after 2, 4, 8 and 24 hours), separated by RP-HPLC and peptides were analysed to unravel the process in order to isolate if possible those fragments long enough to retain structure and activity.

In figure 11-R are represented the chromatograms at two different reaction times. We could observe in the time 0 min two peaks corresponding to native AS-48, which is the highest, and a second one corresponding to AS-48 with oxidized methionine (AS-48 ox.), identified after fingerprinting with trypsin. After two hours of reaction we could isolate just low molecular weight peptides which are not useful for the purpose of this research. However and despite the aggressive conditions of proteolysis, part of native AS-48 remained uncut even after 8 h of reaction

thus indicating the compact structure of AS-48 and its resistance to enzymatic digestion (data not shown).



**Figure 11-R. Kinetics of the proteolysis reaction of AS-48 (0.7 mg/ml) in 0.1 M NaCl pH 3.0 with pepsin (1/100) at R/T.** Chromatogram on the left shows initial time in which in can be noted the presence of native AS-48 and AS-48 ox. On the right is represented the reaction after two hours.

### 1.2. Proteolysis with trypsin.

Trypsin is an enzyme with a high specificity which cuts peptide bonds in which one of the aminoacids is an arginine or a lysine. When reaction is too long it can reduce the specificity,

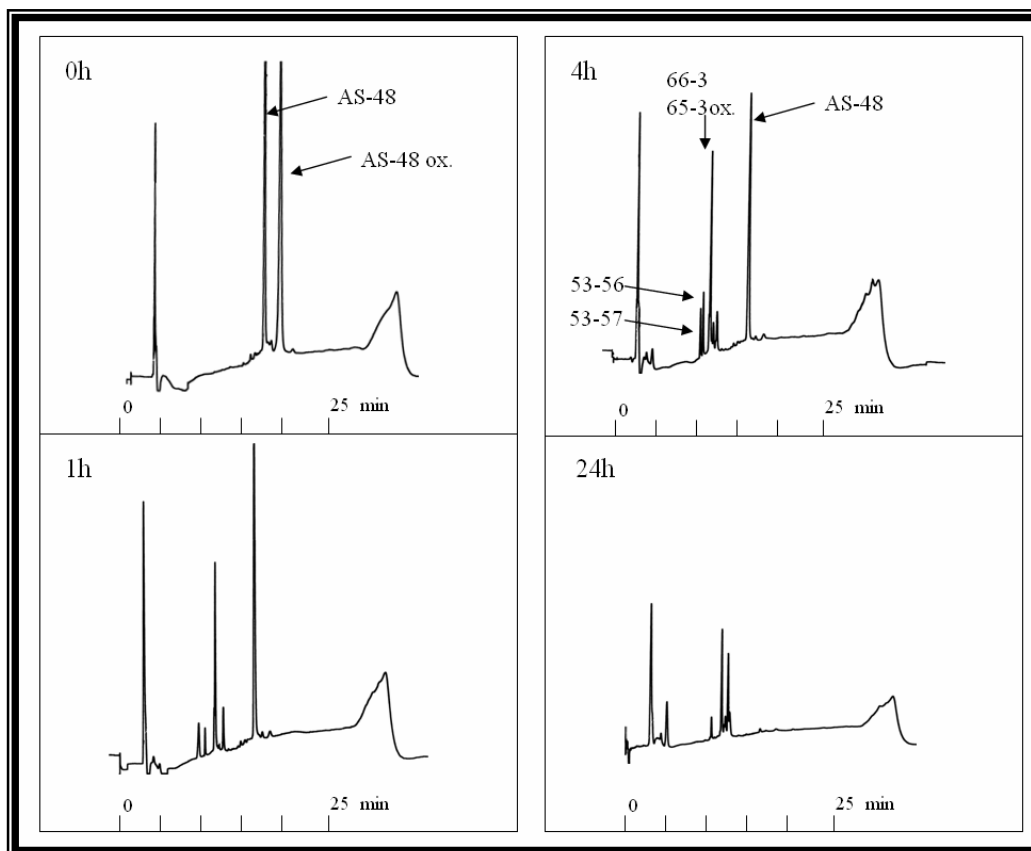
Proteolysis of AS-48 with trypsin was performed in 50 mM Tris, 5 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.5 at 37 °C, with an E/S ratio of 1/50 (data not shown) and 1/20. Samples were taken after 0, 1, 4, 8, 24 and 48h (Figure 12-R). Only small peptide fragments could be isolated.

### 1.3. Proteolysis with endoprotease Glu-C.

Limited proteolysis with endoprotease Glu-C (V8) was performed with an E/S ratio of 1/20 and different pH conditions: pH 4.0 in 50 mM ammonium acetate and pH 7.8 in 50mM ammonium bicarbonate. Both reactions were conducted at 37 °C. In these conditions, the enzyme preferentially cuts peptide bonds containing glutamic acid residues.

RP-HPLC analysis after reaction showed that the enzyme had the same behaviour in acid or basic environment (Figure 13-R). After 24 hours

of reaction, four fragments corresponding to proteolysis in the four glutamates of native AS-48 (5-20, 21-49, 50-58, 59-4) could be identified.

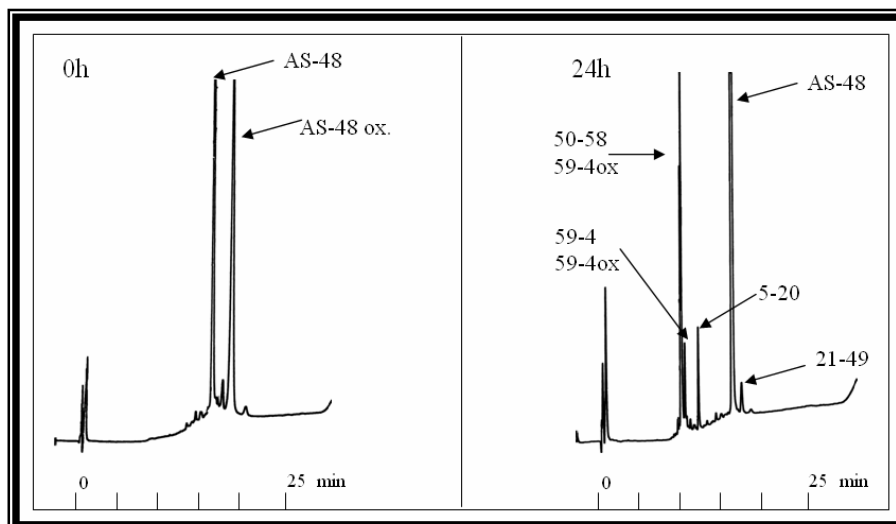


**Figure 12-R. Limited proteolysis with trypsin (E/S 1/50) of AS-48 (1.1 mg/ml) in 50 mM Tris, 5 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.5 at 37 °C. Times 0, 1, 4, and 24 hours are shown.**

## 2. Limited proteolysis assays using denaturant agents.

Limited proteolysis in aqueous solutions rendered useless fragments. These results forced us to change reaction conditions adding chemical compounds able to stabilise fragments produced. First of all, we used TFE, a reactive which induces and stabilises  $\alpha$ -helices. It has the disadvantage of its low fusion temperature, that causes sample precipitation after long incubation times because it evaporates. We did also use SDS, a detergent that can denaturate proteins and also can mimic the membrane environment.





**Figure 13-R. Limited proteolysis with V8 of AS-48 (0.9 mg/ml) in 50 mM ammonium acetate pH 7.8.**

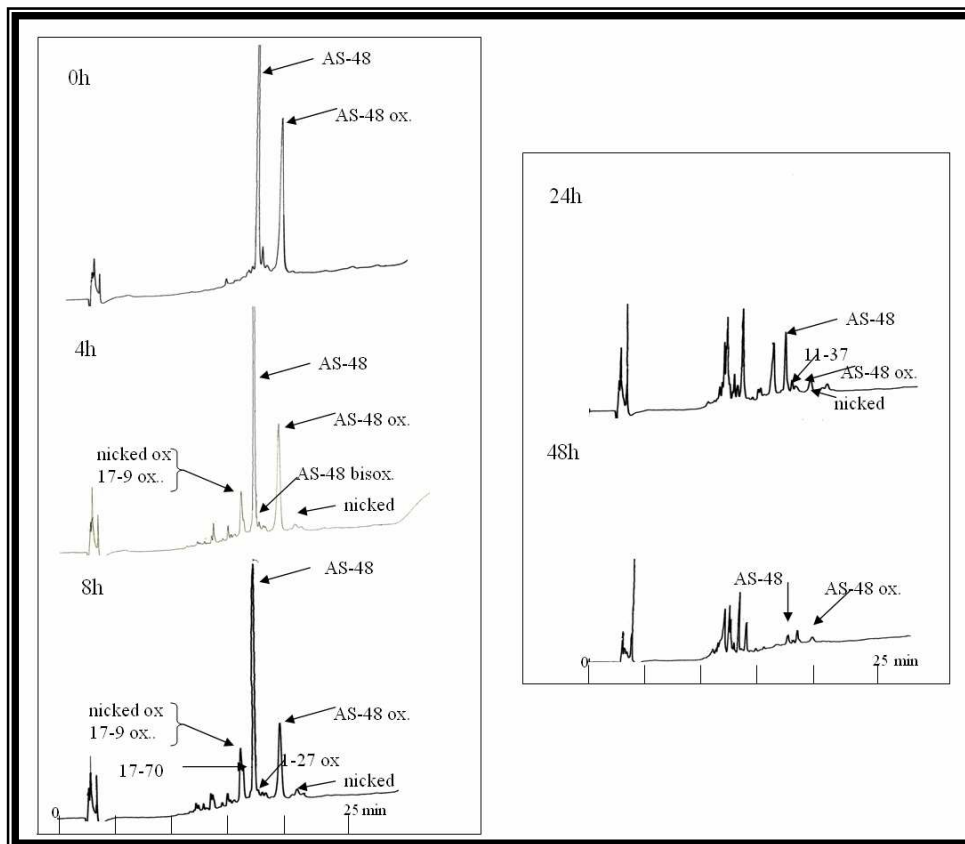
### 2.1. Proteolysis with proteinase K in 30% TFE.

In previous attempts with thermolysin, 30% TFE rendered a good fragmentation profile, so this was the percentage selected for other enzymes. Proteinase K cuts preferentially when hydrophobic aminoacids are present and with high efficiency. Reaction happened at pH 3.0 at R/T with an E/S ratio of 1/50 (Figure 14-R). This reaction rendered a nicked form in a low quantity of both native and oxidized AS-48. Nicking points, according to the fragments identified could be similar to those described for thermolysin in Montalbán-López *et al.* (2008). Interestingly, after 4h of incubation, a fragment corresponding to aminoacids 17-9 could be isolated as well as the nicked form. The nicking point was determined by tryptic digestion between residues Asp<sup>16</sup> and Leu<sup>17</sup>. It is noteworthy the resistance of AS-48 in these conditions to proteolysis even with such an efficient enzyme. Even after 8 h of reaction there are two major peaks corresponding to native and oxidized AS-48.

### 2.2. Proteolysis with trypsin and TFE.

When trypsin was assayed in presence of 30% TFE, the enzyme drastically lost its activity. These conditions did not render any interesting

fragment and most of the initial quantity of AS-48 remained uncut even after 72h of incubation (data not shown), so we gave up this strategy.



**Figure 14-R. Limited proteolysis of AS-48 (0.6 mg/ml) with proteinase K in 30% TFE.**

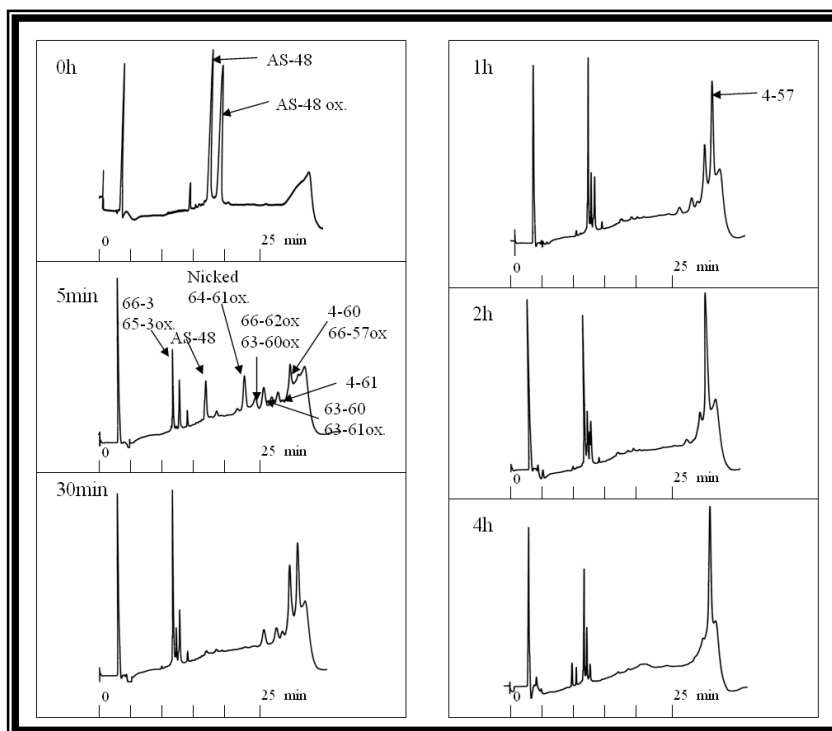
### 3. Limited proteolysis with SDS.

SDS is an amphiphilic molecule that denaturates proteins. In previous works, SDS was tested for its capacity to give monomeric solutions of AS-48 when its concentration is higher than 0.8% (Abriouel *et al.*, 2001). These results encouraged us to use SDS in proteolysis as the probable nicking points would be more accessible to the enzyme. SDS concentration should be adjusted for each enzyme individually because proteolytic activity decreased with different sensitivity. For example, thermolysin is active even with 1% SDS, whilst trypsin is inactivated with 0.3%. There is another problem derived from the use of SDS in RP-HPLC as this detergent causes widening of peaks. This fact forced us to use an ionic exchange precolumn attached to the analytical C4 column which retained

SDS until the end of the separation when it eluted with the 95% of acetonitrile.

### 3.1. Limited proteolysis with trypsin in presence of SDS.

Reaction with trypsin was performed in the buffer mentioned above added with 0.1% SDS and an E/S ratio of 1/20 at R/T. In figure 15-R can be observed the extraordinary velocity of the reaction and the large fragments originated, including a nicked protein. In the longest incubation times assayed, the majority product is peptide 4-57, which comprises the hydrophobic region of AS-48.

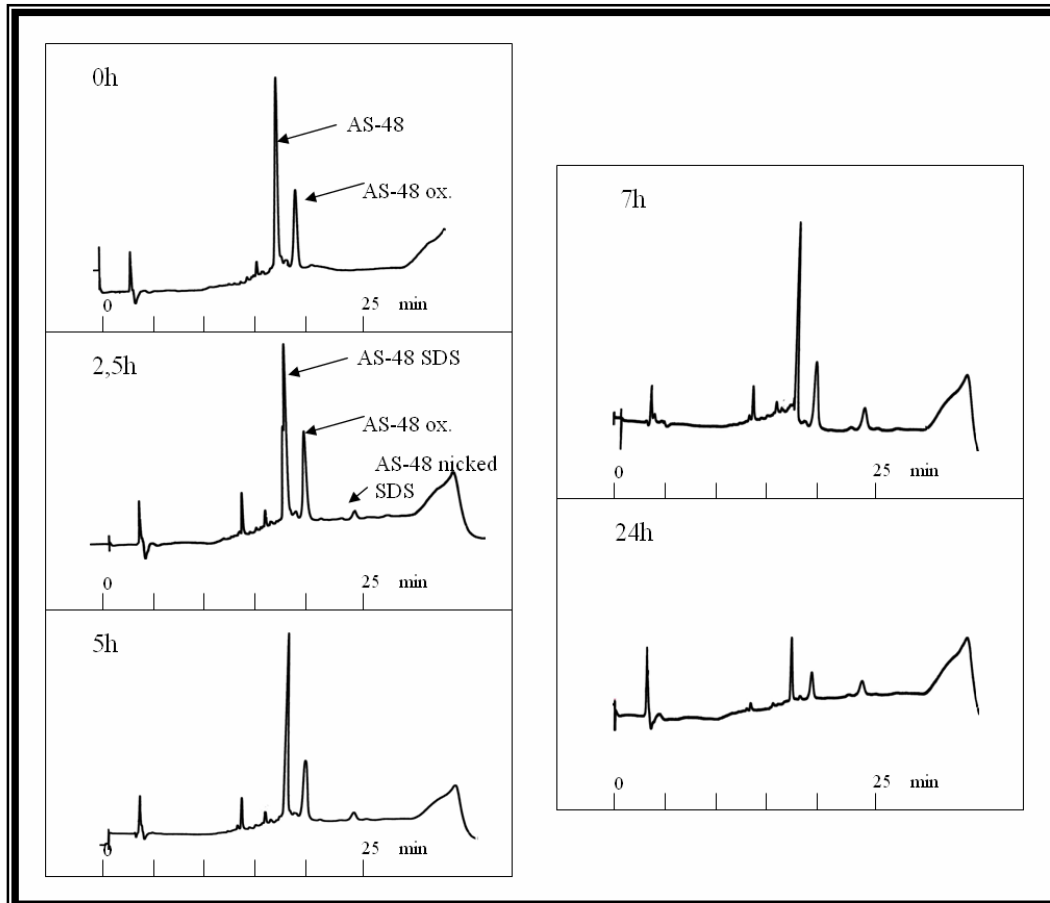


**Figure 15-R. Limited proteolysis of AS-48 (0.4 mg/ml) in 0.1% SDS with trypsin.**

### 3.2. Limited proteolysis with endoproteinase Glu-C in SDS.

Limited proteolysis with endoproteinase V8 was performed with 0.1% SDS at pH 7.8 with an E/S ratio of 1/20 at R/T. There are not data in scientific literature about resistance of this enzyme to SDS, so we used the best conditions tested with thermolysin. We could see the production of a nicked form but, surprisingly, no other fragment was detected even though

the quantity of native AS-48 is reduced (Figure 16-R). This behaviour is difficult to understand and we can just conclude that the fragments are attached to the precolumn and lost or alternatively that there is precipitation of the sample that has not been observed before with the other enzymes.



**Figure 16-R. Limited proteolysis of AS-48 (0.8 mg/ml) with endoprotease V8 in presence of 0.1% SDS.**



### III. Expression of linear permutants AS<sub>10/11</sub> and AS<sub>43-27</sub> from circular enterocin AS-48 in different expression systems

Manuel Montalbán-López, Manuel Martínez-Bueno, Juan Miguel Rodríguez, Eva Valdivia, Nikki Horn y M. Maqueda.

Hasta la fecha no había sido posible expresar el carácter AS-48 en especies de BAL diferentes de los enterococos, probablemente debido a la ausencia de la maquinaria específica para la maduración/circularización de la molécula nativa. Ello unido a la posibilidad de obtener variantes lineales circularmente permutadas de AS-48, cuyas secuencias fueron deducidas de los resultados de proteólisis controlada sobre AS-48, representaba una oportunidad única de obtener cepas GRAS de *L. lactis*, capaces de producir un inhibidor como AS-48, cuya estabilidad y amplio espectro de acción, son características biotecnológicas muy interesantes para su aplicación como bioconservante de alimentos. En este trabajo se han construido diversos genes correspondientes a la forma abierta AS<sub>10/11</sub> - con y sin la región intergénica existente entre los genes *as-48A* y *as-48B*- y también a un fragmento de 55 aminoácidos, AS<sub>43-27</sub>, los cuales han sido clonados en diferentes cepas de *E. coli* para intentar su expresión controlada por IPTG, así como fusionados con los péptidos señal de la proteína Usp45 y/o de la lactococcina A de *L. lactis*, en ambos casos bajo el control del promotor P<sub>nisA</sub>. No ha sido posible, sin embargo, la detección de ninguna de las proteínas lineales de AS-48 construidas, en ninguna de las condiciones de inducción ensayadas, ni en *E. coli* ni en *L. lactis*, a pesar de que se ha confirmado que los genes de resistencia son eficientemente expresados en *Lactococcus*.



**III. Expression of linear permutants AS<sub>10/11</sub> and AS<sub>43-27</sub> from circular enterocin AS-48 in different expression systems**

Montalbán-López<sup>1,3</sup>, M., M. Martínez-Bueno<sup>1</sup>, J.M. Rodríguez<sup>2</sup>, E. Valdivia<sup>1</sup>, N. Horn<sup>3</sup>, and M. Maqueda<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Fuentenueva s/n, 18071-Granada, Spain.

<sup>2</sup> Departamento de Nutrición y Bromatología III, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain

<sup>3</sup>Institute of Food Research, Norwich Research Park, NR4 7UA, Colney, Norwich, United Kindom.

Running Title: Expression of linear permutants from AS-48

Author for correspondence:

Mercedes Maqueda,

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias,

Universidad de Granada,

Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain.

Tel and Fax: +34 958 242857

E-mail: [mmaqueda@ugr.es](mailto:mmaqueda@ugr.es)



**ABSTRACT**

Several attempts for heterologous expression of enterocin AS-48, a circular protein produced by *Enterococcus faecalis* with a broad inhibitory spectrum, have been always unsuccessful, probably due to the complex postranslational modifications necessary for the maturation of the native molecule. We report here a novel approach to produce two acyclic permutants of AS-48, whose sequences were deduced from previous results obtained *in vitro* by limited proteolysis experiments on AS-48, in which two linear and active molecules were obtained (AS<sub>10/11</sub> and AS<sub>43-27</sub>). In this work different *as-48A* structural gene derivatives (*as-48L*<sup>10/11</sup>, *as-48L*<sup>10/11-RI</sup> and *as-48L*<sup>43-27</sup>) have been cloned into pBAT-4m to be expressed in different *E. coli* strains, including those with protease-deficient activities. In addition, two nisin inducible expression systems have been assayed in *Lactococcus lactis* by fusing sequences encoding the P<sub>nisA</sub> with Usp45 or lactococcin A signal peptide (SP) with the linear *as-48L* derivatives genes *as-48L*<sup>10/11</sup> and *as-48L*<sup>43-27</sup> constructed, using the splice overlap extension. Expression of the chimeric genes was unsuccessful in the different conditions of induction assayed, in spite of the resistance determinants were efficiently expressed in this bacterium.

## INTRODUCTION

Lactic Acid Bacteria (LAB) constitute a natural group of Gram-positive bacteria belonging to *Clostridium* Subdivision that have long been known to be involved in the production of fermented foods, either used as starter, adjunct or protective cultures in the manufacture of dairy, meat, vegetable or bakery products. Several representative organisms of this bacterial group significantly contribute to human health promotion, disease prevention, and performance improvement, in particular those having a QPS (*qualified presumption of safety*) or a GRAS (*generally recognised as safe*) status (Aguirre and Collins, 1993; Gasser, 1994; Holzapfel *et al.*, 1995). They can act as a live delivery vehicle of interesting proteins in foodstuff or in the digestive tract (Nouaille *et al.*, 2003). In the last years there has been considerable interest in bacteriocins produced by LAB, many of which are active against organisms involved in foodborne disease and food spoilage. For this reason, many bacteriocins well characterized biochemically and genetically, have been expressed as heterologous proteins in different BAL. AS-48, is a postrationally modified peptide belonging to the family of circular bacteriocins (Class IV) (Maqueda *et al.*, 2008), which is exclusively produced by certain strains of *Enterococcus* species (Fernández *et al.*, 2007a). AS-48 application is of great interest to the food industry because of its efficient antimicrobial activity against a wide range of Gram-positive organisms, including many spoilage bacteria and food pathogens such as *Listeria*, *Clostridium*, *Alycyclobacillus*, *Staphylococcus* and *Bacillus* species (Muñoz *et al.*, 2007; Ananou *et al.*, 2005; Grande *et al.*, 2006). The major structural feature of AS-48 is its circular peptide backbone formed by its head-to-tail junction between Met<sup>1</sup> and Trp<sup>70</sup> (Samyn *et al.*, 1994). To investigate the role of circularity in the stability and biological properties of enterocin AS-48, two permuted genes *as-48L<sup>23/24</sup>* and *as-48L<sup>48/49</sup>* codifying linear variants were previously obtained by circular permutation of the *as-48A* structural gene. They were cloned in inducible expression vectors and transferred into several backgrounds of *E. coli* strains, a valuable organism for the high-level production of recombinant proteins (Montalbán-López *et al.* MS in review).

However, the absence of recombinant proteins in the cellular extracts suggests that the creation of the selected termini residues in the coding linear proteins might be involved in topological and entropic changes that disrupt the potential conformation of such linear derivatives, undergoing proteolysis after their expression. Afterwards, we produced by limited proteolysis a protein species carrying a single nicking and two fragments characterized by the stepwise deletion of helices  $\alpha_1$ - $\alpha_3$  (Montalban-López *et al.*, 2008). Although the nicked-AS-48 and fragments showed a lower helicity by far-UV CD, they were active against sensitive bacteria, indicating that it is possible to produce linear forms of AS-48 that still retain activity.

Nevertheless, the development of systems for heterologous production of LAB bacteriocins, either using ABC transporters or Sec-dependent secretion systems, may contribute to overcome problems that bacteriocin producing LABs often face in food processes. Probably, the greatest progress has been made with *Lactococcus lactis*, considered as a LAB model, where a large number of expression systems have been developed and used in the production of heterologous proteins with different success (reviewed by Nouaille *et al.*, 2003). In fact, lactococci could be useful microorganisms as cellular factories for the production and secretion of recombinant proteins. A few controllable gene expression systems for lactococci have been developed so far (De Ruyter *et al.*, 1996; Kuipers *et al.*, 1997; Simoes-Barbosa *et al.*, 2004). One of the most reliable and controllable gene expression systems in lactococci is the one using the food-grade bacteriocin nisin as inducer, which dynamically responds to subinhibitory doses of this peptide, inducing up to 1000-fold its basal level of expression (De Ruyter *et al.*, 1996; Kuipers *et al.*, 1997). However, it has been described that when heterologous proteins in *L. lactis* have been obtained using a nisin-inducible promoter, continuous high-level production of protein could lead to intracellular accumulation, aggregation, or degradation of the protein in cytoplasm. To resolve this problem, signal peptides for lactococci have been used for the secretion of the expressed proteins (Jeong *et al.*, 2004; Perez-Martinez *et al.*, 1992; Ravn *et al.*, 2000). The aim of this study was to assay the production levels of the two new

engineered chimeric *as-48L*<sup>10/11</sup> and *as-48L*<sup>43-27</sup> genes in different systems: under T7 promoter control in *E. coli* and also under  $P_{nisA}$  control, employing the lactococcal secretory apparatus (Horn *et al.*, 1998) and/or the signal peptide of Usp45, the major extracellular protein of lactococci (van Asseldonk *et al.* 1993; Le Loir *et al.*, 2001).

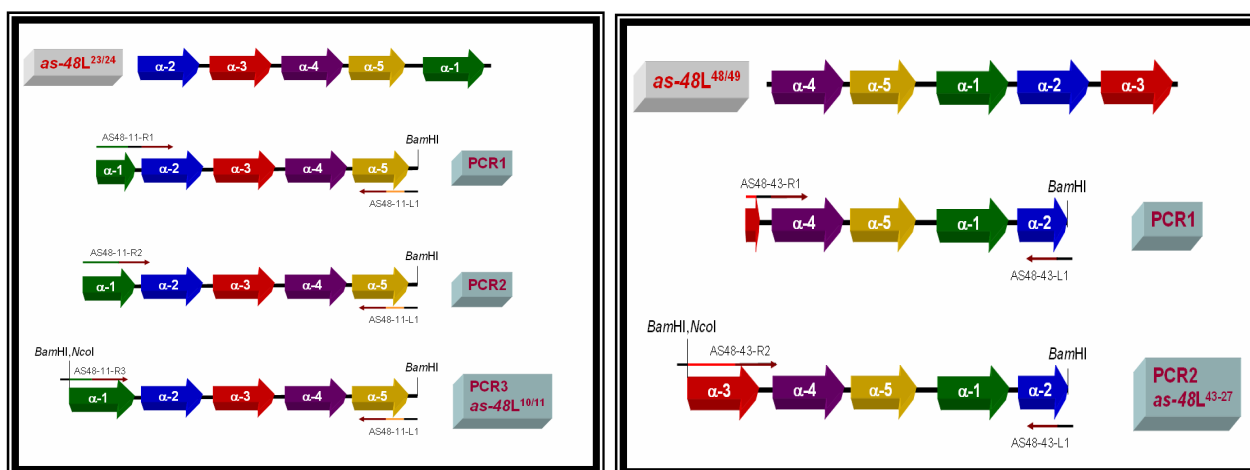
## **MATERIAL AND METHODS**

**Plasmid, Bacterial strains and growth conditions.** Bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 7-R. Lactococcal strains were grown in M17 broth supplemented with 0.5% (wt/vol) glucose (GM17) at 30 °C without agitation as described by (Terzaghi & Sandine, 1975). *E. coli* cells were grown in Luria Broth (LB, Scharlab) (Lennox, 1955) at 37° on an orbital shaker. When solid media were required, 1.5% (wt/vol) agar was added. Antibiotics (Sigma) were added as selective agents when appropriate: chloramphenicol, 5 mg/ml for lactococci and 15 mg/ml for *E. coli*; ampicillin, 200 mg/ml; and erythromycin, 5 mg/ml. For induction purposes, different concentrations of nisin A (Aplin & Barret Ltd., Beaminster, UK) were added to the lactococcal media. Finally, antimicrobial assays were performed by the plate diffusion bioassays (Dodd *et al.*, 1992) using *L. lactis* FI10684 as indicator strain.

**Molecular techniques.** Plasmid extraction was performed using commercial kits (Plasmid Mini or Midi kit) supplied by Qiagen (Qiagen, Crawley, UK) following manufacturer instructions. Restriction enzymes (New England Biolabs, Herst, UK) and DNA modifying enzymes were used according to suppliers' recommendations. *E. coli* and *L. lactis* cells were electroporated as described by Dodd *et al.*, 1992 and Holo & Nes (1989), respectively. The primers listed in Table 8-R were synthesized by Sigma (Dorset, UK). When high fidelity copies of DNA was required, Phusion DNA polymerase (Finnzymes, New England Biolabs, Herst, UK) was used and the PCR amplification was cloned into pCR2.1 (Invitrogen Ltd, Paisley, UK). For routine recombinant DNA screening, GoTaq Green Master Mix polymerase (Promega, Southampton, UK) was used. DNA sequencing was

carried out in a (sequencer name) using BigDye terminator 3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Warrington, UK).

**Generation of recombinant plasmids for expression assays in *E. coli* by circular permutation of *as-48A* gene.** Genes *as-48L*<sup>10/11</sup> and *as-48L*<sup>43-27</sup> were constructed by circular permutation. For this, PCRs were performed using pBAT-L<sup>23/24</sup> and pBAT-L<sup>48/49</sup> as template respectively, according to Montalbán-López *et al.* (MS in review). For this task, we used AS48-11-R1xAS48-11-L1, AS48-11-R2xAS48-11-L1 and finally AS48-11-R3xAS48-11-L1 in the construction of *as-48L*<sup>10/11</sup> (Figure 17-R). However, for *as-48L*<sup>43-27</sup> construction, two PCR reactions were necessary to create the permuted gene using the primers AS48-43-R1xAS48-43-L1 and AS48-43-R2xAS48-43-L1 (Figure 17-R).



**Figure 17-R. Circular permutation pathway for *as-48L*<sup>10/11</sup> and *as-48L*<sup>43-27</sup> construction.**

Both genes were cloned into pGEM-T easy vector (Promega) rendering plasmids pGEM-L<sup>10/11</sup> and pGEM-L<sup>43-27</sup>. Genes were released from these vectors by cutting with *Nco*I and *Bam*HI and cloned in pBAT-4m, selected as expression vector in the same restriction sites, generating plasmids pBAT-L<sup>10/11</sup> and pBAT-L<sup>43-27</sup> respectively (Fig. 17-R and Fig. 18-R). They were transferred to different expression strains of *E. coli* (Table 7-R).

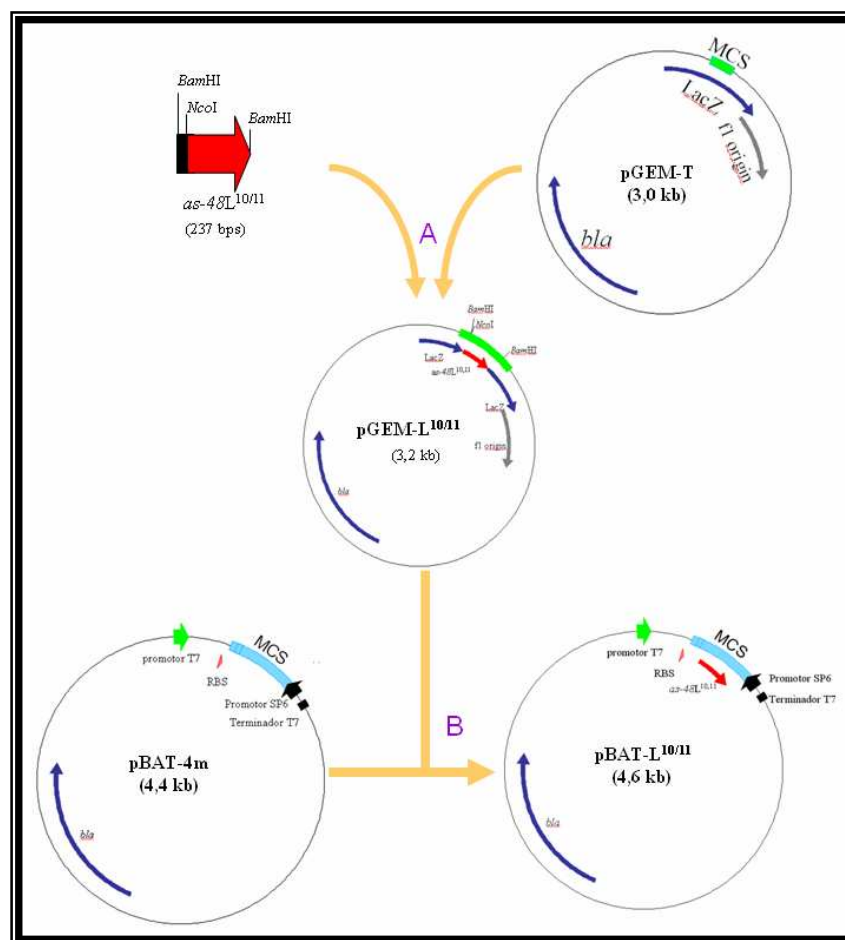
**Addition of the intergenic region between *as-48A* and *as-48B* into pBAT-L<sup>10/11</sup>.** The intergenic region (IR) and the first part of gene *as-*

48B were amplified using the primers As48B-4 and RIBamHI and pAM401-81 as template. In this reaction a *Bam*HI site after TAA stop codon of *as-48A* was generated. The PCR product, with 466 bp contained the whole IR as well as 396 bp from the 5' end of *as-48B*. It was cloned into pGEM-T easy generating pGEM-Rib, transferred to *E. coli* and sequenced. Eventually, it was released by cutting with *Bam*HI and *Hind*III and cloning in pBAT-L<sup>10/11</sup> cut with the same enzymes, generating pBAT-L<sup>10/11-RI</sup>. It was transferred to different expression strains of *E. coli* (Table 7-R).

<i>Escherichia coli</i>	Characteristics	Reference
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	<i>supE44 lac U169 (<math>\phi</math>80lacZAM15) hsdR17</i>	Bethesda Research Lab.
<b>BL21 (DE3)</b>	F <sup>-</sup> <i>hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3), lon</i> and <i>ompT</i> protease deficient	Novagen
<b>BL21 (DE3) Codonplus-RIL MG1655</b>	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) Cm<sup>R</sup></i>	Stratagene
<b>MG1655 protease deficiente strains</b>	Wild-type <i>E. coli</i> K-12 F <sup>-</sup> $\lambda$ <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i> $\Delta lon, \Delta clpP, \Delta clpA, \Delta clpX, \Delta clpQ$	Xiao <i>et al.</i> , 1991 Xiao <i>et al.</i> , 1991
Plasmids	Characteristics	Reference
<b>pGEM-T</b>	3 kb, Ap <sup>R</sup> , cloning vector	Promega
<b>pBAT-4m</b>	4,4 kb, Ap <sup>R</sup> <i>E. coli</i> expression vector	Peränen <i>et al.</i> , 1996
<b>pBAT-L<sup>10/11</sup></b>	Ap <sup>r</sup> , pBAT-4m with <i>as-48L<sup>10/11</sup></i> gene cloned (4,6 kb)	This work
<b>pBAT-L<sup>10/11-RI</sup></b>	Ap <sup>r</sup> , pBAT-4m with <i>as-48L<sup>11/11-RI</sup></i> gene cloned (5,1 kb)	This work
<b>pBAT-L<sup>43-27</sup></b>	Ap <sup>r</sup> , pBAT-4m with <i>as-48L<sup>43-27</sup></i> fragment cloned (4,2 kb)	This work

**Table 7-R. Bacterial strains used and plasmids generated in this work.** Nis<sup>R</sup>, nisin resistant; Nis<sup>-</sup>, unable to produce nisin; usp, presence of the *usp45* gene; Em<sup>R</sup>, erythromycin resistant; Cm<sup>R</sup>, chloramphenicol resistant.

**Heterologous expression.** Competent *E. coli* host strains BL21 (DE3) (Novagen), BL21 (DE3) pLysS Codonplus-RIL (Stratagene), MG1655 wild-type and several derivative strains listed in Table 7-R were transformed by thermal shock with 100 ng plasmid and grown overnight on agar plates with appropriate antibiotics. Fresh colonies were inoculated at 37 °C into LB or 2-YT medium plus Ap to an OD<sub>600</sub> of 0.4-0.6. To find the optimum conditions to express recombinant proteins we initially screened parameters such as inducer concentration, growth temperature, culture volume and induction time.



**Figure 18-R. Construction of pBAT-L<sup>10/11</sup> expression vector.** After circular permutation, *as-48L<sup>10/11</sup>* gene was ligated into pGEM-T (A). Subsequently, the new plasmid pGEM-L<sup>10/11</sup> and pBAT-4m were digested with *NcoI* and *BamHI* and ligated to generate pBAT-L<sup>10/11</sup> (B).

**Generation of recombinant plasmids by cloning the *as-48A* linear variants fused to different lactococcal signal peptides.** The technique of Splice Overlap Extension (SOE) was used in the construction of the different  $P_{nisA}$ -controlled hybrid genes. This consists of a fusion of sequences encoding the  $P_{nisA}$  with *Usp45* or lactococcin A signal peptide (SP) with the linear *as-48L* derivatives genes (*as-48L<sup>10/11</sup>* and *as-48L<sup>43-27</sup>*) at the 5' end. For this purpose, pAD1 and *usp\_pSOE\_L\_R* primers were used to amplify the region comprising  $P_{nisA}$ , the *usp45* signal peptide and the 5' end of linear genes using pFI2593 as template (Fernández *et al.*, 2007b), and *usp\_pSOE\_L\_F* and pL\_SmaI\_R primers (Table 9-R) were used to amplify the different linear *as-48L* variant genes using pGEM-L<sup>10/11</sup> and pGEM-L<sup>43-27</sup> as templates. These primers added the 3' end of *usp45* and a *SmaI* site in the 3' end (approx. 350 and 210 bp, respectively). Both PCR

products were mixed and used as the template to amplify a 550-bp fragment with primers pAD1 and pL\_SmaI\_R in which *usp45* is fused with the mutated bacteriocin. In the same way, primers pAD1 and pSOE\_L10,11\_R were used to amplify the fragment containing P<sub>nisA</sub>, lactococcin A leader and 5' end of *as-48L<sup>10/11</sup>* gene from pFI2398 (Fernández *et al.* 2007b), and primers pSOE\_L10,11\_F and pL10,11\_R to amplify *as-48L<sup>10/11</sup>* with the 3' end of lactococcin A leader taking pGEM-L<sup>10/11</sup> as template.

The PCR products obtained with the desired information were cloned into pCR2.1 (Invitrogen, Leek, The Netherlands), and used to transform *E. coli* TOP10 competent cells (Invitrogen, Leek, The Netherlands). When sequencing was verified, they were isolated as *EcoRI* fragments and cloned into pTG262, a hybrid expression vector for *E. coli/L. lactis*, which was used to transform *E. coli* MC1022 and to confirm the sequence identity. When the lactococcin A leader was employed, the secretion genes *lcnCD* (3.8 kb) were also introduced by cutting pFI2527 with *XbaI/SacI* restriction enzymes and cloning the fragment into pFI2620 (a pTG262 derivative containing *as-48L<sup>10/11</sup>* fused to lactococcin A SP) linearized with the same enzymes (this new plasmid has been called pFI2622). In all cases, colonies were screened by PCR with Universal and Reverse primers and sequenced as described above.

#### **Induction of linear derivatives expression and detection assays.**

Different cultures of lactococci cotransformed with pIL253-64 and pTG262 derivatives containing the permutated AS-48-chimeric genes, were grown at 30 °C until an optical density at 600 nm of 0.5 was reached. Then, the cells were induced with different nisin A concentrations (0.1, 1, 10, and 100 ng/ml) and harvested by centrifugation after 2, 4, and 24 hours of induction. Proteins were concentrated from the culture supernatant by trichloroacetic acid precipitation or cationic exchange chromatography according to the protocol developed by Gálvez *et al.* (1989a). In addition, the cell pellets were resuspended in buffer containing 10 mg/ml lysozyme and incubated for 30 min at 37 °C. After treatment, loading buffer was added, mixed and boiled for 3 min. Proteins were separated by SDS-PAGE



(Laemmli, 1970) on 15% slab gels in a Miniprotean dual-slab cell apparatus (BioRad), using purified AS-48 (as control) and a low-molecular-weight range marker (SigmaMarkers) as standard. When suitable, gels were transferred to a nitrocellulose membrane (NC, pore size 0.45- $\mu$ m; Schleicher & Schuell, code BA85, Whatman. ACEFE S.A. Castelldefels, Spain) using a BioRad mini trans-blot system according to Towbin *et al.*, (1979). Membranes were developed with specific anti-AS-48 antibodies as described by Maqueda *et al.* (1993).

Stain	Host	Plasmid	Relevant features				Source	
			Resistance	pIL253 -64	P <sub>nis</sub> + usp <sub>SP</sub> + as-48L	P <sub>nis</sub> + LcPS + as-48L		lcnCD
<b>FI7847</b>	<i>L. lactis</i>		Nis <sup>R</sup>				Dodd <i>et al.</i> , 1996	
<b>UKLc10</b>	<i>L. lactis</i>		Nis <sup>r</sup>				Wegmann <i>et al.</i> , 1999	
<b>FI10661</b>	FI7847	pIL253-64	Em <sup>R</sup> Nis <sup>R</sup> AS-48 <sup>R</sup>	+			This work	
<b>FI10662</b>	UKLc10	pIL253-64	Em <sup>R</sup> Nis <sup>r</sup> AS-48 <sup>R</sup>	+			This work	
<b>FI10667</b>	FI1066 1	pTG262	Cm <sup>R</sup> Em <sup>R</sup> Nis <sup>R</sup>	+			This work	
<b>FI10668</b>	FI1066 2	pTG262	Cm <sup>R</sup> Em <sup>R</sup> Nis <sup>R</sup>	+			This work	
<b>FI10669</b>	FI1066 1	pFI2620	Cm <sup>R</sup> Em <sup>R</sup> Nis <sup>R</sup>	+		L <sup>10/11</sup>	This work	
<b>FI10670</b>	FI1066 2	pFI2620	Cm <sup>R</sup> Em <sup>R</sup> Nis <sup>r</sup>	+		L <sup>10/11</sup>	This work	
<b>FI10673</b>	FI1066 1	pFI2622	Cm <sup>R</sup> Em <sup>R</sup> Nis <sup>R</sup>	+		L <sup>10/11</sup>	+	This work
<b>FI10674</b>	FI1066 2	pFI2622	Cm <sup>R</sup> Em <sup>R</sup> Nis <sup>r</sup>	+		L <sup>10/11</sup>	+	This work
<b>FI10678</b>	FI1066 1	pFI2658	Cm <sup>R</sup> Em <sup>R</sup> Nis <sup>R</sup>	+	L <sup>10/11</sup>			This work
<b>FI10679</b>	FI1066 2	pFI2658	Cm <sup>R</sup> Em <sup>R</sup> Nis <sup>r</sup>	+	L <sup>10/11</sup>			This work

FI10684	FI7847	pIL252	Em <sup>R</sup> , Nis <sup>R</sup>			This work
	FI1066	pTGusp43	Cm <sup>R</sup> Em <sup>R</sup>	+	L <sup>43-27</sup>	This work
	1	-27	Nis <sup>R</sup>			
	FI1066	pTGusp43	Cm <sup>R</sup> Em <sup>R</sup>	+	L <sup>43-27</sup>	This work
	2	-27	Nis <sup>r</sup>			

**Table 8-R. Bacterial lactococcal strains used and plasmids generated in this work.** Nis<sup>R</sup>, nisin resistant; Nis<sup>-</sup>, unable to produce nisin; Usp<sub>SP</sub>, *usp45* signal peptide; L<sub>CPS</sub>, lactococcin signal peptide; pIL253-64 (*as-48CC<sub>1</sub>DD<sub>1</sub>*) that confers a partial AS-48 resistance; Em<sup>R</sup>, erythromycin resistant; Cm<sup>R</sup>, chloramphenicol resistant.

Primer	Sequence
pL43-27_SmaI_R	<u>CCCGGGTTAAGTAGTGACCCATC</u>
usp_pSOE_L43-27_F	<u>TCAGGGGTCTACGCTGCTCTCGCTGCAGC</u>
usp_pSOE_L43-27_R	<u>GCTGCAGCGAGAGCAGCGTAGACCCCTGA</u>
pAD1	CCTGAATAATATAGAGATAGGTT
Reverse	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
Universal	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGT
pSOE_L10,11_F	<u>GAAGCTAACGGAGGAGCAGTTGCAGGAAC</u>
pSOE_L10,11_R	<u>G TTCCTGCAACTGCTCCTCCGTTAGCTTC</u>
usp_pSOE_L10,11_F	<u>TCAGGGGTCTACGCTGCAGTTGCAGGAAC</u>
usp_pSOE_L10,11_R	<u>G TTCCTGCAACTGCAGCGTAGACCCCTGA</u>
pL10,11_R	TTATGCTGCTGGTATAACCG
AS48-11-R1	<u>AAGCTTGGATCCTTATGCTGCTGGTATAACCGAACTCTTTA</u>
AS48-11-L1	<u>GTTGAAGCTGGTGGATGGGTCACTACTATTGTATCAATTCTTA</u>
AS48-11-L2	<u>GGAAGCTGTGCTTAATGTAGTTGAAGCTGGTGGATGGGTCACTA</u>
AS48-11-L3	<u>GGATCCATGGCAGTTGCAGGAAGCTGTGCTTAATGTAGTTGAAG</u>
AS48-43-L1	<u>GCTGCAGCAGGAAGAGAGTCAATTAAGCATAACCTTAAGA</u>
AS48-43-L2	<u>GGATCCATGGCTCTCGCTGCAGCAGGAAGAGAGTCAATTA</u>
AS48-43-R1	<u>AAGCTTGGATCCTTAAAGTAGTGACCCATCCACCAGCTTCA</u>

**Table 9-R. Synthetic oligonucleotides used in this work.** Underlined sequences are those which do not hybridize with the template.

For activity tests sensitive *L. lactis* strain against low levels of AS-48, but resistant to nisin (used as inducer agent), and to erythromycin (added to the media as selective pressure) was obtained by transference of pIL252 plasmid into FI7847 strain (rendering the FI10684 strain) (Table 8-R). In the other way, the pIL253-64 (*as-48CC<sub>1</sub>DD<sub>1</sub>*) plasmid (Martinez-Bueno *et al.*, 1998) was used to transform the UKLc10 and FI7847 strains (culture

collection numbers FI10662 and FI10661, respectively), to be more resistant to AS-48 (up to 0.3 mg/ml).

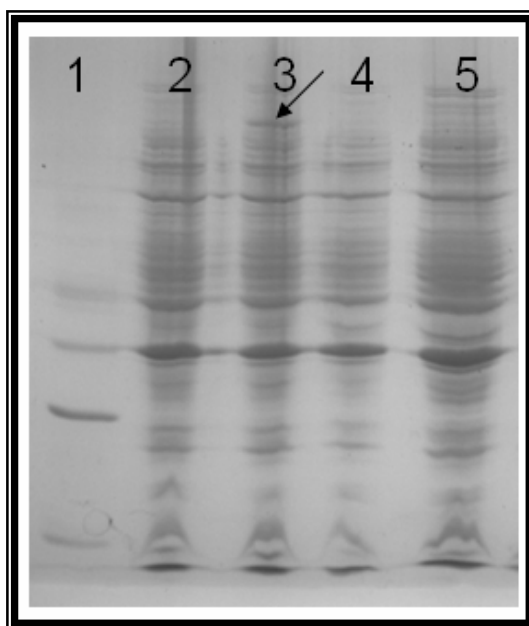
**Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide *as-48A* sequence submitted to EMBL has the accession number X79542 (Martínez-Bueno *et al.*, 1994).

## RESULTS

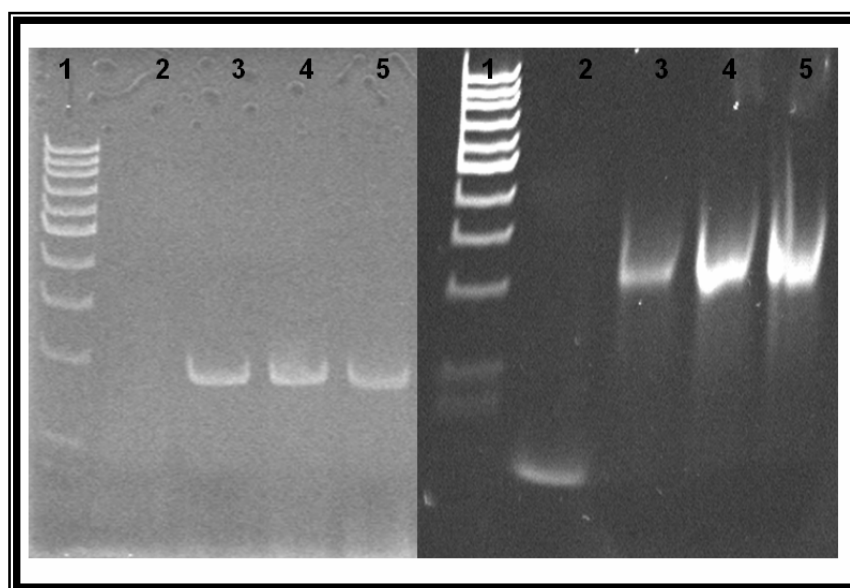
**Construction of *as-48L*<sup>43-27</sup>, *as-48L*<sup>10/11</sup> and *as-48L*<sup>10/11-RI</sup> genes and cloning into different expression vectors.** Derivative genes, the nicked AS-48-form AS<sub>10/11</sub> obtained by opening between the Ala<sup>10</sup> and Val<sup>11</sup> residues (*as-48L*<sup>10/11</sup>), and the fragment AS<sub>43-27</sub>, containing the sequence comprising between Ala<sup>43</sup> and Leu<sup>27</sup> residues of the AS-48 wild-type (*as-48L*<sup>43-27</sup>) were generated by circular permutation in *as-48A* structural gene. In both cases it was necessary the introduction of a methionine in first position, which was followed by an Ala residue to favour the N-terminal methionine excision (Giglione *et al.*, 2004). We also used the last forward primer to insert a *Bam*HI and *Nco*I sites to simplify subsequent cloning in the selected expression vector pBAT-4m (Peränen *et al.*, 1996). According to the significance of the intergenic region (IR) existing between *as-48A* and *as-48B* genes in the *as-48* cluster in the processing and stabilization of mRNA of wild-type AS-48 (Fernández *et al.*, 2008), we designed the new *as-48L*<sup>10/11-RI</sup> construction by adding the IR sequence downstream *as-48L*<sup>10/11</sup> gene in pBAT-L<sup>10/11</sup>.

**Expression assays of *as-48L*<sup>43-27</sup>, *as-48L*<sup>10/11</sup> and *as-48L*<sup>10/11-RI</sup> in *E. coli*.** Different BL21(DE3) *E. coli* strains with reduced Lon protease activity (Table 7-R), in which protein expression can be induced by the addition of IPTG, were selected for production of the new AS-48<sup>L</sup> designed. We also used BL21(DE3) pLysS codonplus to avoid the possible codon bias effect on the expression. Unfortunately, no positive results were obtained in any of the conditions tested -different culture temperature, inducer concentration and induction time- (data not shown) in a similar way to those described with *as-48L*<sup>23/24</sup> and *as-48L*<sup>48/49</sup> genes (Montalbán-López *et al.*, MS in review). Finally, we assayed different protease deficient strains derived from MG1655, paying special attention to those with reduced Clp-protease activities. However, once again, no expression of specific proteins could be detected (Figure 19-R) for none of the pBAT-4m derivatives constructed (pBAT-L<sup>10/11</sup>, pBAT-L<sup>43-27</sup> or pBAT-L<sup>10/11-RI</sup>).

**Transcriptional analysis of BL21(DE3) containing pBAT-4L derivatives.** Transcription analysis from cultures containing the recombinant *as-48A* derivative genes was carried out by RT- as described Montalbán-López *et al.* (MS in review). Even though no protein was produced, mRNA codifying AS-48<sup>L</sup> proteins could be detected, thus indicating that there is no transcriptional blocking (Figure 20-R).



**Figure 19-R. Expression assays in *E. coli* MG1655  $\Delta$ CipQ.** Cells were grown at 28 °C with or without 2 mM IPTG. (1) Ladder; (2) pBAT-4m; (3) pBAT-4m with IPTG; (4) pBAT-L<sup>10/11-RI</sup>; (5) pBAT-L<sup>10/11-RI</sup> with IPTG.



**Figure 20-R. RT-PCR analysis of BL21(DE3) transformed with pBAT-L<sup>10/11</sup> (left) and pBAT-L<sup>43-27</sup> (right) induced with 1 mM IPTG at 28 °C after different induction times.** (1) 100 bp ladder; (2) negative control; (3) 2h induction; (4) 4h induction; (5) 6h induction.

**Construction of the recombinant *L. lactis* strains for production of chimeric AS-48<sup>L</sup> derivatives.** In order to progress in the linear-AS-48 production by *L. lactis* different strategies have been assayed. As producer strains, the modified *L. lactis* derivative FI7847 strain, carrying a deletion in the structural *nisA* gene and the UKLc10 containing the regulatory *nisRK* genes integrated in the chromosome (Dodd *et al.*, 1992, 1996; Wegmann *et al.*, 1999) were selected. In both strains, the P<sub>nisA</sub> activation was linearly dependent on the amount of nisin added to the medium. AS-48-resistant producer strains, FI7847 and UKLc10, were generated by transformation with the compatible pIL253-64 plasmid (containing the *as48CC<sub>1</sub>DD<sub>1</sub>* genes involved in a partial resistance in the wild strain), obtaining the FI10661 and FI10662 strains respectively and allowing the plasmids to be stably maintained in the hosts (Table 8-R). Thus, when different concentrations of AS-48, varying from 0.1 to 3.2 mg/ml, were used, the parental FI7847 and UKLc10 strains were sensitive to all AS-48 concentrations tested, while the FI10661 and FI10662 transformants resisted up to 0.3 mg/ml of bacteriocin, which is the highest concentration normally existing in the culture supernatant of the wild type AS-48-producer *E. faecalis* S-48 (Abriouel *et al.*, 2003).

Then, we attempted the constructions of *as-48L*<sup>10/11</sup> and *as-48L*<sup>43-27</sup> derivatives genes used to the lactococcin A (*lcnA<sub>SP</sub>*) or Usp (*Usp<sub>SP</sub>*) signal peptides (van Asseldonk *et al.*, 1990) under the P<sub>nisA</sub> inducible promoter. For the *lcnA<sub>SP</sub>* chimeric construction, the *lcnC* and *lcnD* functional genes encoding translocatory functions were introduced in the same reading direction (rendering pFI2622) and the effect of the dedicated transport machinery on AS<sub>10/11</sub> production was assessed. In this way, the 550-nt amplified fragments with the required DNA sequence contained in plasmids pFI2620(P<sub>nisA</sub>+*lcnA<sub>SP</sub>*+*as-48L*<sup>10/11</sup>), pFI2622(P<sub>nisA</sub>+*lcnA<sub>SP</sub>*+*as-48L*<sup>10/11</sup> and *lcnCD* genes), pF12623 (P<sub>nisA</sub>+*usp<sub>sp</sub>*+*as-48L*<sup>10/11</sup>) and pTGusp43-27(P<sub>nisA</sub>+SPUsp+*as-48L*<sup>43-27</sup>) constructions were obtained after successive overlap PCR runs, using the respective pairs of specific oligonucleotides (Table 9-R). The absence of any undesirable mutations in the two amplified fragments was verified by DNA sequencing. These constructions were

subsequently used to transform the *L. lactis*, FI10661 and FI10662 strains (Dodd *et al* 1992, Wegmann *et al.*, 1999).

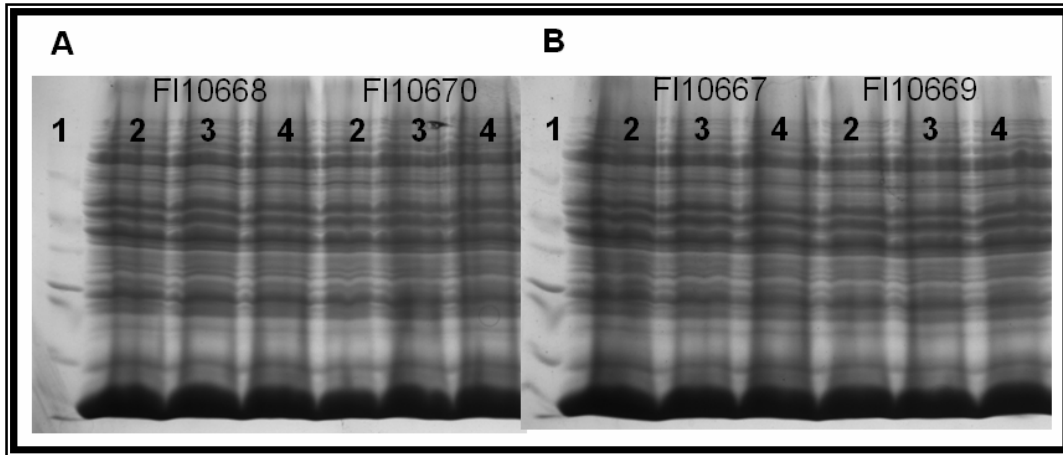
Finally, the selected F17847 indicator strain was transformed with pIL252 to get erythromycin and nisin resistance (FI10684).

**Optimization of conditions for AS-48<sup>L</sup> expression in *L. lactis*.** To study the nisin response of the transformants harbouring the new constructions we assessed the production of the AS-48-linear derivatives in GM17 medium under different nisin induction (0, 1, 10 and 100 ng/ml) for several inducing times (2, 4 and 24 h). Production of AS-48-linear variants in solid media was evaluated after three successive liquid subcultures in presence of nisin, by spotting 5 µl on plates containing the desired amount of nisin and grown overnight. Then, plates were overlaid with soft agar inoculated with the FI10684 indicator strain and incubated overnight. In these conditions non inhibitory activity could be detected (data not shown).

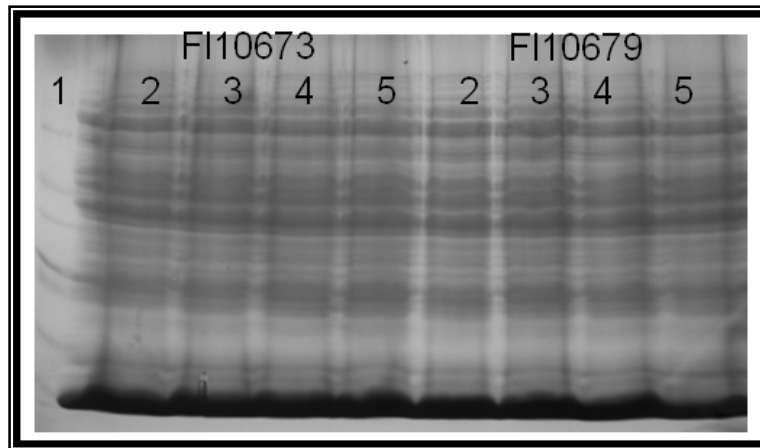
To check production in liquid media, several fresh GM17 broths from FI10670 and FI10668 (Fig. 21A-R), FI10679 and FI10667 (Fig. 21A-R) and FI10673 and FI10679 (Fig. 22-R) strains, were inoculated with an overnight culture of the new constructed strains. When the cultures reached an optical density (OD<sub>600</sub>) of 0.5, food-grade nisin A was added to different final concentrations (0.1, 1, 10 or 100 ng/ml). Then, samples were taken at different times (2, 4 and 24 h) and crude supernatants or those precipitated with trichloroacetic acid and also the pelleted cells, were separately developed into SDS-PAGE, using the FI10667 and FI10668 as plasmid controls (Table 8-R). It is noteworthy that no difference could be seen neither by Coomassie blue staining (Fig. 21-R and 22-R) nor by western blotting assays performed (results no shown), demonstrating that the any of the AS-48<sup>L</sup> derivatives was successful expressed. Moreover, crude and CM25 concentrated supernatant were tested against FI10684 but neither in this assay, could the activity be detected. We observed no relevant differences in the growth of the cultures at the different induction conditions assayed. These negative results shown that neither the level of *nisRK* expression generated by UKLc10 nor the *nisin* cluster present in

*MS in Preparation*

FI7847, allowed nisin-inducible overexpression of the two genes cloned under control of the *nisA* promoter in *L. lactis*.



**Figure 21-R. Expression analysis of FI10670 and FI10668 (A) and FI10667 and FI10669 strains (B) using different concentrations of nisin.** (1) Ladder. (2) Uninduced control. (3) 10 ng/ml nisin. (4) 100 ng/ml nisin.



**Figure 22-R. Expression assays of FI10673 and FI10679 strains with different nisin concentration.** (1) Ladder. (2) Uninduced. (3) 1 ng/ml nisin (4) 10 ng/ml nisin (5) 100 ng/ml nisin .



## DISCUSSION

Enterocin AS-48 is a circular peptide produced by *Enterococcus faecalis* S-48 that exhibits bactericidal activity against most of the Gram-positive bacteria and some Gram-negative bacteria (reviewed by Maqueda *et al.*, 2004). The features of AS-48 (broad spectrum of antimicrobial activity, stability over a wide range of temperature and pH, and breakdown by digestive proteases) (Gálvez *et al.* 1989b,c Samyn *et al.* 1994) suggest that AS-48 is a promising alternative to chemical preservatives for future use as a biopreservative in foods. However, this enterocin is exclusively produced by *Enterococcus* species (Gálvez *et al.*, 1989b; Fernández *et al.*, 2007a), which are widely questioned due to its ability to survive to adverse extreme challenges, the presence of virulence factors and the highly ability to transfer genetic material (Giraffa, 2003). Unfortunately, heterologous production of AS-48 in non-enterococcal strains was repeatedly unsuccessful, probably due to the lack of the specific machinery for the maturation/ circularization of the native molecule (Fernández *et al.*, 2007a). For this reason, the design of linear AS-48 molecules represents an interestingly chance for their production by the GRAS *L. lactis* strains. However, to our experience, the expression in *E. coli* of the two linear AS-48 molecules opened between the two wider loops (between residues 23/24 and 48/49) of the secondary amino acid sequence has been very hard. In fact, our results suggested that disruption of the circular AS-48 backbone at such sites could be determinant of the instability of the translated AS<sub>23/24</sub> and AS<sub>48/49</sub> linear derivatives, rendering proteins unable of folding into native-like structures (Montalbán-López *et al.* MS in review). For this reason, we decide here a more rational design of new genes, whose sequences were deduced from previous results obtained by limited proteolysis on AS-48 (Montalbán-López *et al.* 2008), to be assayed under controlled genes expression. Limited proteolysis with thermolisin on AS-48 rendered active proteins species carrying a single nicking between residues 10,11 (AS<sub>10/11</sub>) and a fragment of 55 residues (AS<sub>43-27</sub>), which is characterised by the stepwise deletion of helices  $\alpha_1$ - $\alpha_3$ . Indeed, our results confirmed that circularization was not essential for the bactericidal activity

but to stabilise the three dimensional structure of the proteins (Montalbán-López *et al.* 2008).

In this work, we tried expression after different conditions of IPTG induction in different *E. coli* background without successful. For this reason we also assayed two delivery systems for *L. lactis* with the food-grade inducer nisin. The nisin-inducible gene expression system based on the use of the *L. lactis* P<sub>nisA</sub> promoter controlling the transcription initiation is a versatile system that can deal with high homologous and heterologous protein production in a linear dependency between the amount of nisin added to the culture and the promoter activity (Kuipers *et al.*, 1997). It is also known that the production and secretion of class II bacteriocins share a number of features that allow the interchange of genetic determinants between certain members of this group of antimicrobial peptides (Horn *et al.*, 1999). For all these reasons, the two modified *L. lactis* strains, FI7847 and UKLc10, were selected to express new chimeric AS<sup>L</sup> genes under control of the inducible P<sub>nis</sub> promoter. In this, the secretory apparatus of lactococcin A (including *lcnC* and *lcnD* genes) was selected for the *as-48*<sub>10/11</sub> expression using the pFI2620 vector (Horn *et al.*, 1999) and the highly efficient signal peptide SPUsp45 (Le Loir *et al.*, 2001) was also used for *as-48L*<sub>10/11</sub> and *as-48L*<sub>43-27</sub> expression in the pTG262 vector. In both constructions, the required initiator Met for translation was introduced before the respective residues Val<sup>11</sup> and Ala<sup>43</sup>. However, it could be expected that this residue will be removed from mature protein by the specific methionine aminopeptidase (Gigliione *et al.*, 2004). Obviously, to allow expression of the lineal cationic peptides with intrinsic antibacterial activity, the producer strains were previously transformed with a compatible pIL253-64 plasmid (containing the *as-48CC<sub>1</sub>DD<sub>1</sub>* genes) to confer a certain degree of immunity (up 0,3 mg/ml) against AS-48.

In spite of the recognized ability of the lactococcal bacteria to secrete functional recombinant pediocin PA-1 (Horn *et al.*, 1999), nattokinase (Liang *et al.*, 2007) or murine interleukin-2 (Steidler *et al.*, 1995), our results indicate that *L. lactis* failed to produce none of the fusion proteins examined. They were achieved by fusion of the *as-48L*<sub>10/11</sub> or *as-48L*<sub>43-27</sub> sequences to the both secretion signal leaders, under different induction

conditions (varying the nisin concentration and the inducing time), neither in solid media nor in liquid cultures. However, the immunity genes from *Enterococcus* are efficiently translated in *L. lactis* and this species was shown to be capable of exporting and processing several bacteriocins from other LAB species (Worobo *et al.*, 1995; van Belkum y Stiles, 1995; van Belkum *et al.*, 1997; Horn *et al.*, 1998). These result could be compared with those obtained with two linear derivatives from Microcin J25, the thermolysin-linearized MccJ25-L<sub>1,21</sub> and a synthetic analogue, sMccJ25-L<sub>1,21</sub> (Blond *et al.*, 2002). Interestingly, MccJ25-L<sub>1,21</sub> behaved as the native MccJ25, maintaining the organized structure and the antibacterial activity, while the synthetic peptide is not folded and is devoid of antibacterial activity, suggesting that the structure conservation between MccJ25 and MccJ25-L<sub>1,21</sub> does not result from the sequence of the linear MccJ25 itself, and consequently that the active conformation of MccJ25 cannot be acquired spontaneously by the native peptide (Blond *et al.*, 2002). Thus, we suspect that difficulties encountered in producing AS<sub>10/11</sub> and AS<sub>43-27</sub> linear derivatives in *Lactococcus* may be associated with either proteins degradation or trapping species by the bacteriocin sequence itself. Indeed, lactococcal strains are known to produce many peptidases (Kunji *et al.*, 1996) and the binding properties of bacteriocins have been previously reported (Coventry *et al.*, 1996).

**Acknowledgements.** This work was supported by the Spanish Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Projects BIO2001-3237 and BIO2005-01544) and Junta de Andalucía (Plan Andaluz de Investigación CIV 016). M. Montalbán-López holds a fellowship from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports. We thank to the Genetic Sequencing Service (Department of Genetics, University of Granada).

## REFERENCES

- Abriouel, H., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., and Gálvez, A.** 2003. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. J. Microbiol Methods. **55**: 599-603.
- Aguirre, M., and Collins, M.D.** 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. J. Appl. Bacteriol. **75**: 95-107.
- Ananou, S., Garriga, M., Hugas, M., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., and Valdivia, E.** 2005. Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. Int. J. Food Microbiol. **103**: 179-190.
- Blond, A., Cheminant, M., Destoumieux-Garzón, D., Ségalas-Milazzo, I., Peduzzi, J., Goulard, C., and Rebuffat, S.** 2002. Thermolysin-linearized microcin J25 retains the structured core of the native macrocyclic peptide and displays antimicrobial activity. Eur J Biochem. **269**: 6212-6222.
- Coventry., M.J., Gordon, J.B., Alexander, M., Hickey, M.W., Wan, J.** 1996 A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate. Appl Environ Microbiol. **62**:1764-9.
- De Ruyter, P.G., Kuipers, O.P., and de Vos, W.M.** 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 3662-3667.
- Dodd, H.D., Horn, N., Hao, Z., and Gasson, M.J.** 1992. A lactococcal expression system for engineered nisins. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 3683-3693.
- Dodd, H.M., Horn, N., Giffard, C.J., Gasson, M.J.** 1996. A gene replacement strategy for engineering nisin. Microbiology **142**: 47-55.
- Fernández, M., Martínez-Bueno, M., Martín, M.C., Valdivia E., and Maqueda, M.** 2007a. Heterologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. J. Appl. Microbiol. **102**: 1350-1361.

**Fernández, A., Rodríguez, J.M., Bongaerts, R.J., Gasson, M.J., and Horn, N.** 2007b. Nisin-controlled extracellular production of interleukin-2 in *Lactococcus lactis* strains, without the requirement for a signal peptide sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7781–7784.

**Falnes, P.Ø., and Olsnes, S.** 1998. Modulation of the intracellular stability and toxicity of diphtheria toxin through degradation by the N-end rule pathway. *EMBO J.* **17**: 615–625.

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

**Gálvez, A., Giménez-Gallego, M., Maqueda, M. and E. Valdivia.** 1989a. Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis* ssp. *Antim. Agent Chemother.* **33**: 437–441.

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

**Gasser, F.** 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur.* **92**: 45-67.

**Giraffa, G.** 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **88**: 215–222.

**Giglione, C., Boularot, A., Meinel, T.** 2004. Protein N-terminal methionine excision. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**: 1455-1474.

**Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., and Gálvez, A.** 2006. Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 185–194.

**Holo, H., and Nes, I.F.** 1989. High-frequency transformation, by

electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. Appl. Environ. Microbiol. **55**: 3119–3123.

**Holzappel, W.H., Geisen, R., and Schillinger, U.** 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. Int. J. Food Microbiol. **24**: 343–362.

**Horn, N., Martínez, M.I., Martínez, J.M., Hernández, P.E., Gasson, M.J., Rodríguez, J.M., and Dodd, H.M.** 1998. Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcal A secretory apparatus. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 818–823.

**Horn, N., Martínez, M.I., Martínez, J.M., Hernández, P.E., Gasson, M.J., Rodríguez, J.M., and Dodd, H.M.** 1999. Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 4443–4450.

**Jeong, D.-W., Choi, Y.C., Lee, J.M., Seo, J.M., Kim, J.H., Lee, J.-H., Kim, K.H., Lee, H.J.** 2004. Screening and characterization of secretion signals from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* LM0230. J. Microbiol. Biotechnol. **14**: 1052–1056.

**Kunji, E.R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., and Konings, W.N.** 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek **70**: 187–221.

**Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G., Kleerebezem, M., and W. M. de Vos.** 1997. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. Trends Biotechnol. **15**: 135–140.

**Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680–685.

**Le Loir, Y., Noaille, S., Commissaire, J., Bretigny, L. Gruss, A., and Langella, P.** 2001. Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 4119–4127.

**Lennox, E.S.** 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology **1**: 190–206.

**Liang, X., Zhang, L., Zhong, J., and Huan, L.** 2007. Secretory expression of a heterologous nattokinase in *Lactococcus lactis*. Appl Microbiol Biotechnol. **75**: 95–101.

**Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Guerra, I., and Valdivia, E.** 1993. Neutralizing antibodies against the peptide antibiotic AS-48: immunocytological studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 148–151.

**Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Sánchez-Barrena, M.J., González, C., Albert, A., Rico, M., and Valdivia, E.** 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **5**: 399–416.

**Maqueda, M., Sánchez-Hidalgo, M., Fernández, M., Montalbán-López, M., Valdivia, E., and Martínez-Bueno, M.** 2008. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 2–22.

**Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Samyn, B., van Beeumen, J., Coyette, J., and Valdivia, E.** 1994. Determination of the gene sequence and molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **176**: 6334–6339.

**Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Gálvez, A., Coyette, J., and Maqueda, M.** 1998. Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **27**: 347–358.

**Montalbán-López, M., Spolaore, B., Pinato, O., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M., and Fontana, A.** 2008. Characterization of linear forms of the circular Enterocin AS-48 obtained by limited proteolysis. *FEBS Letter.* **582**: 3237–3242.

**Montalbán-López, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., and Maqueda, M.** 2009. Design and construction of linear permutants from circular enterocin AS-48. *J. Bacteriol.* MS in Review.

**Muñoz, A., Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, M., Maqueda, M., and Valdivia, E.** 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. *Int. Dairy J.* **17**: 760–769.

**Nouaille, S., Ribeiro, L.A., Miyoshi, A., Pontes, D., Le Loir, Y. Costa Oliveira, S., Langella, P., and Azevedo, V.** 2003 Heterologous

protein production and delivery system for *Lactococcus lactis*. Gen Mol. Res. **2**: 102-111.

**Peränen, J., M. Rikkonen, M. Hyvönen, and L. Kääriäinen.** 1996. T7 Vectors with a Modified T7lac Promoter for Expression of Proteins in *Escherichia coli*. Anal. Biochem. **236**:371–373.

**Perez-Martinez, G., Kok, J., Venema, G., and Van Dijk, J.M.** 1992. Protein export elements from *Lactococcus lactis*. Mol. Gen. Genet. **234**: 401–411.

**Ravn, P., Arnau, J., Madsen, S.M., Vrang, A., and Israelsen, H.** 2000. The development of TnNuc and its use for the isolation of novel secretion signals in *Lactococcus lactis*. Gene **242**: 347–356.

**Samyn, B., Martínez-Bueno, M., Devreese, B., Maqueda, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Coyette, J., and van Beeumen, J.** 1994. The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. FEBS Lett. **352**: 87–90.

**Simoës-Barbosa, A. Abreu, H., Silva Neto, A., Gruss, A., and Langella, P.** 2004. A food-grade delivery system for *Lactococcus lactis* and evaluation of inducible gene expression. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 61–67.

**Steidler, L., Wells, J.M., Raeymaekers, A., Vandekerckhove, J., Fiers, W., and Remaut, E.** 1995. Secretion of biologically active murine Interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 1627–1629.

**Terzaghi, B.E., and Sandine, W.E.** 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl. Microbiol. **29**: 807–813.

**Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76**: 4350–4354.

**van Belkum, M.J., and Stiles, M.E.** 1995. Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 3573–3579.

**van Belkum, M.J., Worobo, R.W., Stiles, M.E.** 1997. Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC



transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. Mol. Microbiol. **23**: 1293–1301.

**van Asseldonk, M., Rutten, G., Oteman, M., Siezen, R.J., de Vos, W.M., and Simons, G.** 1990. Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of *usp45*, a gene encoding a highly secreted protein from *Lactococcus lactis* MG1363. Gene **95**: 155–160.

**Wegmann, U., Klein, J.R., Drumm, I., Kuipers, O.P., and Henrich, B.** 1999. Introduction of peptidase genes from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* into *Lactococcus lactis* and controlled expression. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 4729–4733.

**Worobo, R.W., van Belkum, M.J., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., and Stiles, M.E.** 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. J. Bacteriol. **177**: 3143–3149.

**Xiao, H., M. Kalman, K. Ikehara, S. Zemel, G. Glaser, and M. Cashel.** 1991. Residual guanosine 3'-5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. J. Biol. Chem. **266**:5980–5990.





## ***Discusión***



## **1. Características estructurales de AS-48 y diseño de variantes lineales circularmente permutadas.**

(Montalbán-López *et al.* Design and construction of linear variants from circular enterocin AS-48. J. Bacteriol. MS in review)

(Montalbán-López *et al.* Expression of linear permutants AS<sub>10/11</sub> and AS<sub>43-27</sub> from circular enterocin AS-48 in different expression systems. MS in preparation)

Las técnicas moleculares hoy disponibles para el diseño de proteínas permiten generar moléculas con características nuevas y/o mejoradas con aplicaciones biotecnológicas en la industria química, farmacéutica y veterinaria, o bien nuevas estructuras para profundizar en la función de las moléculas, o incluso son consideradas de utilidad para crear nuevas funcionalidades. Este diseño puede realizarse desde diversas aproximaciones: i) síntesis *de novo* de proteínas por métodos químicos, ii) búsqueda de clones responsables de proteínas con las propiedades deseadas basadas en la evolución dirigida a través de librerías genéticas, iii) diseño racional de modificaciones sobre la base de un conocimiento predecible de las consecuencias mecánicas y/o estructurales que el cambio produciría. Esta última opción exige un profundo conocimiento de la relación estructura-función de las proteínas objeto de estudio, que no siempre es suficiente para llevarlo a cabo aunque podría ser una de las más interesantes, ya que permite beneficiarse de las características de proteínas que, por su estabilidad, funcionalidad o aplicación, han sido seleccionadas durante la evolución. Desde un punto de vista biológico, modificar una proteína de síntesis ribosómica implica disponer de técnicas de ingeniería genética que permitan manipular el ADN en el cual se encuentra la información precisa para dar lugar a la síntesis de la molécula modificada. En todo caso, y como punto de partida, se requiere disponer del gen estructural que codifica la proteína de interés.

Entre las diversas metodologías desarrolladas para llevar a cabo la manipulación de genes, sobresalen la mutagénesis dirigida y la permutación circular, ambas técnicas realizadas *in vitro*, las cuales, aplicadas junto a los innovadores sistemas de expresión y purificación de proteínas recombinantes desarrollados, constituyen una herramienta poderosa para llevar a cabo estos análisis. El objetivo de la mutagénesis dirigida es modificar una proteína cambiando un residuo por otro, eliminando una parte de la proteína (delección) o añadiendo otra (adición), mientras la permutación circular ofrece la posibilidad de alterar la secuencia de una proteína mediante la unión de sus extremos y la consiguiente apertura en otro sitio seleccionado de la cadena (Heinemann y Hahn 1995; Baird *et al.*, 1999; McWherter *et al.*, 1999; Nakamura y Iwakura 1999; Iwakura *et al.*, 2000). Muchas proteínas con actividades enzimáticas o biológicas entre las que cabe destacar la fosforribosil antranilato isomerasa (Luger *et al.*, 1989), la dihidrofolato reductasa (Smith y Matthews, 2001; Iwakura *et al.*, 2000), algunas interleucinas (Kreitman *et al.*, 1994), la ribonucleasa T1 (Garret *et al.*, 1996) o la aspartato transcarbamilasa (Ni y Schachman, 2001; Beernink *et al.*, 2001) han sido circularmente permutadas con la finalidad de investigar el plegamiento de las mismas y su estabilidad y, en el caso de proteínas circulares, se puede abundar más ya que permiten incluso el diseño de proteínas lineales, circularmente permutadas.

Las aplicaciones y consecuencias derivadas de la permutación circular son muy diversas y, en nuestro caso que se trata de linearizar una proteína circular, los riesgos son aún mayores ya que los posibles reordenamientos estructurales introducidos pueden alterar dominios de la proteína necesarios para una correcta orientación de sus sitios funcionales, comprometiendo el proceso de plegamiento y desestabilizando la estructura, o bien, originando moléculas sin funcionalidad. Sin embargo, hay numerosos estudios en proteínas en los que se ha podido constatar que no es esencial la existencia de un esqueleto circular para mantener su estructura 3D, como es el caso de los derivados lineales obtenidos de la RTD-1 defensina (Tang *et al.*, 1999; Trabi *et al.*, 2001), de los inhibidores SFTI-1 y MCoTI-II de la tripsina (Hernández *et al.*, 2000; Korsinczky *et al.*,

2005) y de algunos ciclótidos (Viguera *et al.*, 1996; Boissinot *et al.*, 1997). También ha sido posible romper el esqueleto de proteínas con el fin de aislar dominios funcionales activos como ya se ha realizado con la quimiotripsina (Otzen y Fersht, 1998) o el fragmento klenow de la polimerasa (Klenow y Henningsen, 1970), e incluso reducir secuencias aminoacídicas hasta obtener fragmentos que retengan actividad y estructura (Dalzoppo *et al.*, 1985; Rico *et al.*, 1994; Darby *et al.*, 1996).

Como ha quedado expuesto en el apartado de Introducción, AS-48 es una proteína circular de síntesis ribosómica que se expresa a partir del gen estructural *as-48A* como un <sup>pre-pro</sup>péptido de 105 aminoácidos, de los cuales los primeros 35 residuos conforman un péptido señal que debe ser escindido para permitir la circularización/maduración del <sup>pro</sup>péptido (70 residuos). Posee además características estructurales, biológicas y genéticas únicas, y su interés se acrecienta por las interesantes perspectivas de aplicación biotecnológica que AS-48 presenta (Gálvez *et al.*, 1986; Martínez-Bueno *et al.*, 1994; Samyn *et al.*, 1994; Maqueda *et al.*, 2004; Muñoz *et al.*, 2004; Ananou *et al.*, 2005a,b,c). Quizás una de las características más interesantes de AS-48, tanto desde un punto de vista básico como aplicado, es la gran estabilidad que presenta en amplios intervalos de pH y temperatura. De hecho, y como puede verse en los resultados obtenidos utilizando proteólisis controlada -una herramienta ampliamente utilizada para sondear la estructura y estabilidad de una proteína (Fontana *et al.*, 2004)- esta molécula muestra una gran resistencia a la digestión enzimática, derivada probablemente de su compacta estructura globular (Langdon *et al.*, 1998).

El trabajo realizado en esta Memoria ha sido posible gracias a la amplia información disponible sobre la estructura tridimensional de AS-48 resuelta mediante RMN (González *et al.*, 2000) y completada mediante cristalografía de rayos X (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003). En trabajos previos se confirmó que AS-48 era una molécula globular con un esqueleto de uniones peptídicas continuas debido a la unión entre los residuos Met<sup>1</sup> y Trp<sup>70</sup> situados en los extremos del <sup>pro</sup>péptido (Samyn *et al.*, 1994), lo que se produce en mitad de una de las cinco hélices  $\alpha$  en las que AS-48 se encuentra organizada [Ala<sup>9</sup>-Ala<sup>21</sup> ( $\alpha_1$ ), Val<sup>25</sup>-Ala<sup>34</sup> ( $\alpha_2$ ), Ser<sup>37</sup>-Ala<sup>45</sup> ( $\alpha_3$ ), Ile<sup>51</sup>-



Lys<sup>62</sup> ( $\alpha_4$ ) y Lys<sup>64</sup>-Phe<sup>5</sup> ( $\alpha_5$ )]. Se ha descrito, además, la existencia de un patrón regular de puentes de hidrógeno internos, muchos de ellos responsables de la estabilización de las cortas secuencias de giro, como ocurre con los existentes entre Ala<sup>2</sup> e Ile<sup>7</sup>, Val<sup>18</sup> y Gly<sup>23</sup>, y el de la Thr<sup>33</sup> con Gly<sup>36</sup>, además del descrito entre la Phe<sup>5</sup> y la cadena lateral de la Ser<sup>50</sup>. Por otra parte, hay 29 residuos situados en el corazón hidrófobo de la molécula con una configuración bien definida. La estructura fue inicialmente descrita como muy compacta, con las cadenas laterales de las hélices formando el corazón de la proteína (González *et al.*, 2000). Sin embargo, a partir de la información derivada de los cristales de AS-48 en solución, se comprobó que había algunas diferencias a nivel estructural con lo descrito mediante RMN, en particular en lo referente a las zonas de giro que conectan las hélices  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$  y también en la posición relativa entre las hélices  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_4$  en relación con la de las hélices  $\alpha_3$  y  $\alpha_5$ . Todo ello se traduce en pequeñas modificaciones en la superficie de AS-48 en donde se encuentran los residuos Val<sup>18</sup> e Ile<sup>59</sup> (antes descritos en el corazón hidrófobo) o en el caso de la Leu<sup>16</sup> y la Ile<sup>28</sup> donde ocurre al revés, ya que en realidad se encuentran expuestos al solvente. Igualmente se ha comprobado que esta bacteriocina adopta diferentes estructuras oligoméricas según el ambiente físico-químico en el que se encuentra, y sufre una transición de la forma soluble a la forma insertada en membrana mediante el reordenamiento de la forma dimérica I a la II (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003).

El diseño de moléculas lineales de AS-48 tenía como objetivo fundamental investigar la importancia funcional de la circularización en esta molécula, pero podría indirectamente informar sobre la función de algunos genes del *cluster as-48*. Tal es el caso del determinante *as-48B* que resulta esencial para la producción de moléculas maduras de AS-48, pero cuya función específica está aún por determinar y podría deducirse de estos ensayos. La última finalidad era permitir la producción de moléculas derivadas de AS-48 en sistemas heterólogos, en los que fuera suficiente clonar, en vectores de expresión o de fusión adecuados, el gen estructural junto a los determinantes genéticos responsables de la inmunidad. Este diseño requería tener en cuenta todas las características estructurales

descritas para la forma nativa AS-48, de forma que se conservaran aquellos residuos y hélices consideradas esenciales para la estabilidad de la molécula, intentando la apertura por sitios que no alteraran la organización estructural del <sup>pro</sup>péptido lineal. Inicialmente se realizó una primera construcción en la que, por disponibilidad de los sitios de corte, se subclonó parte del gen estructural (*as-48L<sup>1/70</sup>*) sin el péptido señal (la región codificante del <sup>pro</sup>péptido) con la finalidad de confirmar datos obtenidos tras el ataque de AS-48 con bromuro de cianógeno que rompe la unión Trp<sup>70</sup>/Met<sup>1</sup>, y en el que la cadena lineal resultante parecía incapaz de mantener la estructura 3D de la molécula nativa (Cobos *et al.*, 2001). Este resultado no era, en principio, sorprendente porque se está interrumpiendo un elemento de la estructura secundaria, la hélice  $\alpha_5$ , en donde se encuentra situada la Met<sup>1</sup>, lo que hace suponer que las interacciones de residuos hidrófobos internos (Val<sup>67</sup>, Met<sup>1</sup> y Pro<sup>5</sup>) con el corazón de la molécula podrían quedar impedidas, teniendo como consecuencia la incapacidad de los residuos situados en el corazón para iniciar con éxito el plegamiento de la cadena.

Las restantes posibilidades que se barajaron al comienzo de este trabajo estuvieron basadas en el diseño de genes abiertos por las zonas de giro existentes entre las hélices  $\alpha$  que son los sitios de mayor flexibilidad conformacional de la molécula, con la exigencia de que empezaran por Met (inicio de la traducción) y de que el codon del 2º residuo comenzara por Gly, con el fin de disponer de un sitio de corte *NcoI* para su clonación. Una vez obtenidos debían ser subclonados en vectores de expresión apropiados, en ausencia del péptido señal y de la maquinaria específica que pudiera estar implicada en la circularización. En este sentido la apertura entre las hélices  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  (entre los residuos Val y Gly) fue rápidamente desestimada debido a que afectaba al residuo Val<sup>35</sup> que forma parte del núcleo de la molécula, lo que podría desestabilizar la estructura. También se consideró arriesgada la apertura entre las hélices  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$  (separadas por un único residuo, Gly) ya que afectaba al dominio de residuos cargados positivamente, implicado en la unión de AS-48 a las membranas biológicas (González *et al.*, 2000, Sánchez-Barrena *et al.*, 2003), lo que claramente podía tener consecuencias en la actividad, mientras que el intento de abrir

entre las hélices  $\alpha 5$  y  $\alpha 1$  (donde sólo se encuentran los aminoácidos Gly-Ileu-Pro) afectaría a la Ile<sup>7</sup> que forma parte del corazón hidrófobo de la molécula y presenta muchos contactos con residuos lejanos, lo que se supuso, podría afectar al empaquetamiento de las cadenas laterales y, por tanto, a la estabilidad de la molécula resultante. En consideración a lo expuesto, se escogió la apertura entre las hélices  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  (variante AS<sub>23/24</sub>) así como entre  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$  (variante AS<sub>48/49</sub>) por tratarse de las secuencias que en la molécula nativa poseen mayor movilidad. Fue necesario, además, tener en cuenta la “norma del extremo NH<sub>2</sub>” (Tobias *et al.*, 1991) según la cual la presencia de residuos cargados positivamente (Lys, Arg, His), o aquéllos altamente hidrófobos (Phe, Tyr, Trp, Leu) e incluso de algunos pequeños y sin carga (Thr), se comportan como residuos desestabilizantes y deberían ser evitados en tal posición (Rogers *et al.*, 1986). De hecho, se ha descrito que la existencia de determinados residuos en el extremo amino de las proteínas puede ser determinante en su estabilidad metabólica y mediar en la regulación de su estabilidad (Bachmair *et al.*, 1986).

Para construir la variante AS<sub>23/24</sub> (estrategia 1, gen lineal circularmente permutado *as-48L*<sup>23/24</sup>) abierta entre los aminoácidos Gly<sup>23</sup> y Trp<sup>24</sup>, se cambió el primer aminoácido (Trp<sup>24</sup>) de la secuencia por Met, una sustitución conservadora en términos de hidrofobicidad. Esta construcción se seleccionó por ser una de las zonas de giro más larga de la molécula y, por ende, donde la apertura y posible movilidad adicional de los extremos debería afectar menos a la conservación de las hélices  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . Además, se trata de una zona expuesta al solvente tanto en la DF-I como en la DF-II descritas por Sánchez-Barrena *et al.*, (2003). Por otra parte, el Trp<sup>24</sup> está completamente expuesto ya que en los espectros de RMN no presenta NOEs ni contactos con otros residuos. No obstante y a la luz de nuevos resultados obtenidos mediante mutagénesis dirigida en el gen estructural, se sabía que el Trp<sup>24</sup> sustituido está directamente implicado en la interacción con la membrana y el cambio podría determinar una drástica disminución en la actividad (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2009). Sin embargo la existencia de una corta secuencia (Asp-Arg-Trp-Gly) que el vector pALEXa introduce justo antes de la Met<sup>24</sup>, podría contrarrestar el efecto comentado.

Para su construcción se requirieron tres amplificaciones consecutivas mediante PCR, usando oligonucleótidos que contenían parte de la secuencia del ADN molde y una cola que introducía parte de la secuencia que se quería permutar. El producto final amplificado de 221 pb, contenía el gen *as-48L*<sup>23/24</sup> incluyendo el codon stop TAA y el sitio de restricción *Bam*HI.

La apertura entre los aminoácidos Arg<sup>48</sup> y Glu<sup>49</sup> (variante AS<sub>48/49</sub>, estrategia 2) requirió, sin embargo, cuatro PCRs consecutivas. El sitio de apertura de la molécula fue elegido por pertenecer a la zona de giro más extensa de la molécula, y dada la importancia demostrada para el Glu<sup>49</sup> en la actividad biológica (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2008) se mantuvo el residuo pero se incorporó una Met como primer aminoácido. También se sustituyó Glu<sup>47</sup>Asp que así quedaba bloqueando el extremo carboxilo. De esta forma se obtenía un fragmento de 224 nt con la secuencia de ADN requerida. En ambos casos la ausencia de mutaciones en los productos génicos amplificados fue confirmada mediante la correspondiente secuenciación.

Se abordaron más tarde dos nuevas opciones basadas en datos experimentales de proteólisis controlada sobre AS-48 que serán después comentados. Los resultados de este trabajo ofrecían, a nuestro entender, un diseño más racional de los genes, ya que las estructuras por ellos codificadas, la forma lineal AS<sub>10/11</sub> y el fragmento AS<sub>43-27</sub> (secuencia comprendida entre la Ala<sup>43</sup> y la Leu<sup>27</sup> de la molécula AS-48 nativa), se había demostrado que, aunque con menor estructuración y estabilidad térmica de acuerdo con los ensayos realizados “*in vitro*”, conservaban en parte su funcionalidad (Montalbán-López *et al.*, 2008). La construcción de estos dos nuevos genes (*as-48L*<sup>10/11</sup> y *as-48L*<sup>43-27</sup>), fue realizada nuevamente mediante permutación circular. En ambos casos se introdujo una Met que no debería interferir en los resultados, ya que sería después eliminada debido a la presencia de una Ala en segunda posición (Figura 1-D) (Giglione *et al.*, 2004). Efectivamente, se ha descrito que aminoácidos de pequeño tamaño como Gly, Ala, Ser, Thr, Pro, Val o Cys deben ser evitados en segunda posición -a pesar de que se consideran estabilizantes de acuerdo con la regla del extremo NH<sub>2</sub>- porque dirigen la especificidad de la metionina aminopeptidasa, la cual podría eliminar la metionina inicial de

la proteína resultante (Falnes y Olsnes, 1998). Si bien para la construcción de *as-48L*<sup>10/11</sup> fueron necesarias tres PCR consecutivas, usando pBAT-L<sup>23/24</sup> como molde para la primera la construcción, en el caso de *as-48L*<sup>43-27</sup> bastó con dos PCR tomando como molde pBAT-L<sup>48/49</sup>.

En un trabajo reciente había quedado demostrada la importancia de una repetición invertida (RI) existente en la corta región intergénica (73nt) entre los genes *as-48A* y *as-48BC* -que constituyen un operón dentro del cluster *as-48*- en relación con la estabilidad de los respectivos mensajeros (Fernández *et al.*, 2008). Dicha RI ha sido identificada como diana para enzimas con actividad endorribonucleasa y, por ende, implicada en el procesamiento del ARN policistrónico T<sub>ABC</sub>, permitiendo el desacoplamiento de la traducción del operón *as-48ABC* y facilitando la transcripción independiente del gen *as-48A* así como una lectura limitada y regulada de los otros dos genes (*as-48BC*) (Fernández *et al.*, 2008). Este mecanismo de regulación postranscripcional, además de proteger a los mensajeros del ataque de las RNasas, asegura la estequiometría necesaria para el adecuado funcionamiento de los productos que codifica en la célula. Por ello, era previsible que, en ausencia de la RI, la estructura secundaria de los ARNm de los nuevos genes construidos tuvieran mayor susceptibilidad a la degradación exo-ribonucleotídica al carecer de estructura secundaria en el extremo 3'. Por ello, se planteó la posibilidad de añadir dicha región intergénica al gen *as-48L*<sup>10/11</sup> (*as-48L*<sup>10/11-RI</sup>) -por considerar esta construcción como la de mayores posibilidades de éxito- para investigar si ello se traducía en la estabilización del mensajero y facilitaba la expresión de la correspondiente proteína lineal AS<sub>10/11</sub>. Su construcción solo requirió una nueva PCR con los oligonucleótidos RIBamHI y AS-48-B4 (sección 5.5.3. de Material y Métodos) empleando como molde pAM401-81, seguido de la subclonación en pGEM-T y la clonación final en pBAT-L<sup>10/11</sup>.

Tras el diseño de todos los genes -la versión lineal de la molécula nativa (AS<sub>1/70</sub>), las formas abiertas circularmente permutadas (AS<sub>23/24</sub>, AS<sub>48/49</sub>, AS<sub>10/11</sub>, éste último con y sin la RI, y el fragmento AS<sub>43-27</sub>), se procedió a su clonación en vectores de alto número de copias. El primero de ellos en pET22-b (Studier *et al.*, 1990), seleccionado por los sitios de cortes disponibles, y los restantes en pBAT-4m (Peränen, 1996). Ambos

fueron elegidos por contener el sistema de expresión del promotor *T7lac* que responden a la inducción con IPTG, lo que, a través de la ARN polimerasa del fago T7 permite una eficiente expresión de los genes clonados (Studier y Moffatt, 1986). En el caso de pBAT-4m hay además de un marcador de resistencia a ampicilina y la clonación en fase con el promotor está favorecida gracias al sitio *NcoI* existente dentro del sitio de clonación múltiple, mientras que pET22-b posee el sitio *NdeI* justo antes del codon iniciador y el sitio *EcoRI* detrás del terminador del gen *as-48A*.

AS <sub>1/70</sub>	M <sup>1</sup> AKEFGIPAAVAGTVLNVVEAGGWVTTIVSILTAVGSGGLSLLAAAGRESIKAYLKKEIKKKGKRAVIAW <sup>70</sup>
AS <sub>23/24</sub>	MV <sup>25</sup> TTIVSILTAVGSGGLSLLAAAGRESIKAYLKKEIKKKGKRAVIAWMAKEFGIPAAVAGTVLNVVEAG <sup>G23</sup>
AS <sub>48/49</sub>	ME <sup>49</sup> SIKAYLKKEIKKKGKRAVIAWMAKEFGIPAAVAGTVLNVVEAGGWVTTIVSILTAVGSGGLSLLAAANG <sup>48</sup>
AS <sub>10/11</sub>	MAV <sup>11</sup> AGTVLNVVEAGGWVTTIVSILTAVGSGGLSLLAAAGRESIKAYLKKEIKKKGKRAVIAWMAKEFGIPAA <sup>A10</sup>
AS <sub>43-27</sub>	MAL <sup>43</sup> AAAGRESIKAYLKKEIKKKGKRAVIAWMAKEFGIPAAVAGTVLNVVEAGGWVT <sup>T27</sup>

**Figura 1-D. Secuencia de las nuevas moléculas lineales de AS-48 diseñadas.**

## **2. Ensayos de proteolisis limitada con muestras de AS-48 purificadas.**

(Montalban-López *et al.* 2008. Characterization of Linear Forms of the Circular Enterocin AS-48 Obtained by Limited Proteolysis. FEBS Letters **582**: 3237-3242.)

La dificultad de expresar las formas lineales, la nativa incompleta (AS<sub>1/70</sub>) y las linealmente permutadas (AS<sub>23/24</sub> y AS<sub>48/49</sub>), que más adelante se discutirá, nos llevó a considerar la posibilidad de que la expresión de estas moléculas pudiera estar impedida por su propia inestabilidad estructural. Por ello se inició una nueva vía, aunque indirecta, que podría informar sobre la viabilidad de los objetivos planteados en esta Memoria.

El planteamiento de esta parte del trabajo, que ha sido realizado en colaboración con el Grupo del Dr. Fontana [CRIBI Biotechnology Center de Padua (Italia)], era llevar a cabo una digestión controlada de muestras de AS-48 purificadas a homogeneidad, empleando diversas enzimas (tripsina, proteasa K, endoproteinasa Glu-C, termolisina y pepsina) y en diferentes condiciones de incubación, con el fin de establecer los parámetros que permitieran la obtención de proteínas lineales o fragmentos derivados de AS-48 que mantuvieran, al menos en parte, las características estructurales y/o funcionales de la molécula nativa. Para ello se requería disponer de una cantidad importante de AS-48 purificado a homogeneidad (100 mg), que tuvo que ser obtenido a partir de grandes volúmenes de sobrenadantes de la cepa productora A-48-32 de *E. faecalis*, aplicando la metodología puesta a punto por Abriouel *et al.* (2003) y controlando la pureza de las fracciones eluidas de RP-HPLC, mediante espectrometría de masas.

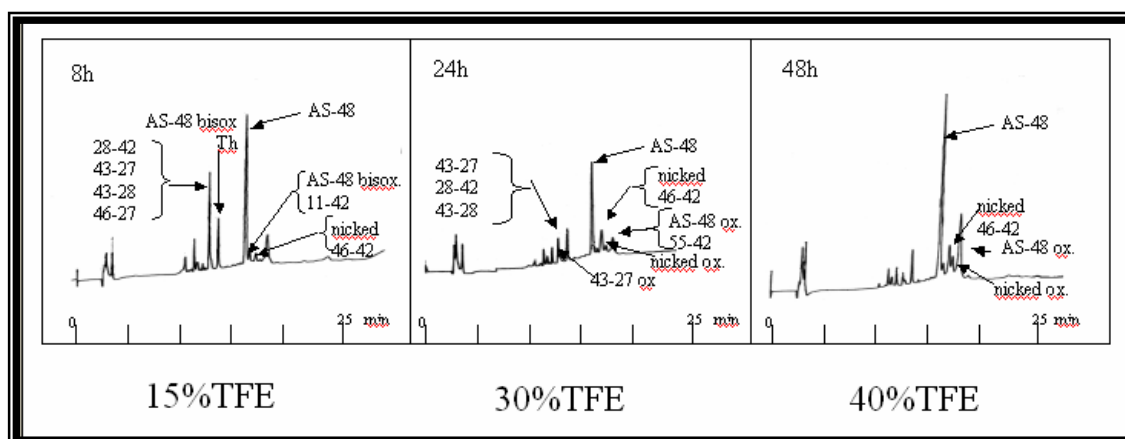
En una primera aproximación se llevaron a cabo los ensayos pertinentes para seguir el comportamiento de AS-48 y las condiciones óptimas de apertura de la molécula, controlando el tiempo y temperatura de actuación, así como el pH de la reacción y la concentración de reactantes. También se ensayó la presencia de agentes que estabilizaran

los productos de reacción e incluso condiciones desnaturalizantes -siempre que fueran reversibles-, con el fin de obtener derivados abiertos o fragmentos que, conservando la estructura, retuvieran su actividad antibacteriana. Cuando las condiciones del ensayo lo permitieron, se emplearon enzimas en las que la proteína se encontraba preferentemente en estado monomérico (pH ácido y baja concentración iónica), como era el caso de la pepsina, con alta capacidad proteolítica por la inespecificidad de su diana. Pero el resultado fue una proteólisis incontrolada que rendía pequeños péptidos que eran inadecuados para nuestros propósitos. Un resultado que ya había sido descrito cuando se emplean proteínas estables y bien plegadas (Fontana *et al.*, 1997b). Lo mismo sucedió cuando se ensayaron las restantes enzimas en solventes acuosos como medio de reacción. Ello llevó a pensar que la ruptura de un enlace peptídico podía provocar una alteración estructural en la molécula que condujera a la formación de una cadena mucho menos estructurada, la cual sería rápidamente degradada. Dado que los sitios de corte de las enzimas son aquéllos más accesibles, es decir los que presentan menor grado de ordenación tridimensional, el enzima es mucho más eficaz frente a las moléculas abiertas, degradándolas e impidiendo su recuperación. A pesar de ello hay que decir que tras 8 h de reacción con pepsina aún quedaba una pequeña parte de AS-48 sin digerir, confirmando la gran resistencia de esta molécula a la digestión enzimática (Figura 11-R).

Se ensayó entonces la proteólisis en presencia de agentes que tienen efecto desnaturalizante sobre la conformación nativa de las proteínas y que conducen a la adquisición de conformaciones parcialmente plegadas, lo que serviría además para mimetizar las adoptadas a nivel de membrana (Fontana *et al.*, 1997, Halskau *et al.*, 2005). Efectivamente, el resultado inmediato de la proteólisis en presencia de diferentes concentraciones de TFE –un agente que favorece la formación de  $\alpha$ -hélices que son abundantes en esta molécula- en particular cuando fue empleada al 15%, fue la obtención de mayores cantidades de fragmentos que, de acuerdo con las secuencias correspondientes que después de su purificación se identificaron, conservaban la estructura secundaria. Sin embargo, en estas condiciones, la reacción transcurría de una forma más lenta,



probablemente debido a que la proteína en presencia de TFE tiene mayor grado de empaquetamiento helicoidal y también a que este agente puede afectar la estructura de la propia enzima. Además, el TFE favorece la formación de micelas entre el disolvente orgánico y el agua, por lo que la disponibilidad de moléculas de agua para la hidrólisis estaría más limitada. Esta ralentización de la reacción proteolítica quedó especialmente reflejada cuando analizamos la reacción de AS-48 con termolisina en presencia de distintos porcentajes de TFE (Figura 2D). Además se pudo observar que mayores porcentajes de TFE favorecen la estabilización de formas abiertas, lo que permite obtenerlas en mayor cantidad.



**Figura 2-D. Cromatogramas correspondientes a la proteólisis con termolisina en presencia de porcentajes crecientes de TFE.** Se observa un perfil similar de fragmentación que requiere más tiempo a medida que aumenta el porcentaje de TFE en la mezcla.

Con fines similares se empleó dodecil sulfato sódico (SDS), un detergente empleado como agente desnaturante para proteínas. En desarrollos electroforéticos previos se había comprobado que AS-48, en presencia de SDS se encuentra principalmente en estado monomérico (Abriouel *et al.*, 1998), lo que sin duda iba a facilitar el acceso del centro activo de las proteasas a sus dianas. El dato más relevante del ensayo realizado en presencia de este detergente fue la obtención de mayor cantidad de formas abiertas en los primeros tiempos de reacción y con mayor velocidad, quedando la proteólisis terminada en menos de 8 horas frente a los varios días necesarios en presencia de TFE o en medio acuoso. La explicación más lógica para este comportamiento podría ser que el SDS además de permitir la desagregación de las moléculas, produzca la

deformación de los propios monómeros facilitando el ataque enzimático. Al lograr que la forma nativa esté desplegada, se establece una competencia por el enzima con las formas abiertas de tal forma que éste no ataca de forma casi exclusiva las formas *nicked*, sino también las nativas, de forma similar a como se esquematiza en la Figura 3-D.

Los ensayos realizados sobre AS-48 en presencia de diversos enzimas proteolíticos y en condiciones de reacción variables, rindieron una gran diversidad de péptidos. Dado que las enzimas eran diferentes y algunas de ellas específicas de determinados residuos, era presumible que en cada caso los péptidos obtenidos fueran diferentes, pero dada la complejidad de los estudios necesarios para su identificación y la escasa cantidad disponible de los productos, no siempre fue posible su aislamiento y caracterización. Cuando sí lo ha sido, los sitios de la digestión proteolítica fueron determinados mediante la separación de los fragmentos originados usando técnicas cromatográficas de alta resolución y comparación de las secuencias de sus extremos aminos, composición de aminoácidos tras la hidrólisis y determinación de la masa molecular mediante espectrometría de masas (Polverino de Laureto *et al.*, 1995).

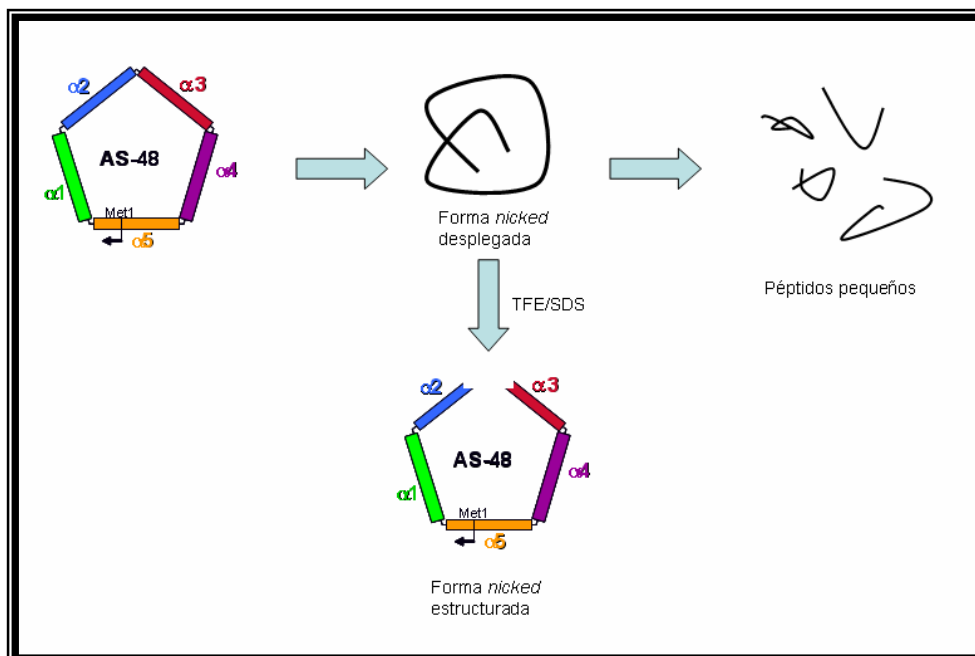


Figura 3-D. Esquema propuesto para la cinética de proteólisis de AS-48

En la reacción con proteinasa K en presencia de TFE resultó imposible deducir de forma lógica el primer sitio de corte, sobre la base de los fragmentos obtenidos. Por ello se recurrió a la digestión con tripsina y comparación del patrón obtenido con un digerido teórico, comprobándose que el fragmento tríptico 4-48 se encontraba en realidad constituido por dos péptidos (4-16 y 17-48) por lo que debería ser el enlace entre los aminoácidos 16 y 17 el atacado en la forma lineal. Este resultado es válido para la forma lineal oxidada en la Met<sup>1</sup> situada en el centro de la quinta hélice en AS-48 que puede ser observada en todos los cromatogramas de las distintas reacciones de proteólisis llevadas a cabo al inicio (T<sub>0</sub>) de la reacción. Curiosamente, y aunque una oxidación debe conferir mayor hidrofilia, en el cromatograma se identifica como un pico de mayor tiempo de retención lo que significa que la molécula ha sufrido algún tipo de alteración estructural en la que los restos hidrófobos quedan más expuestos y aumentan la hidrofobicidad neta de la molécula. En la extensa bibliografía encontrada, que se afirma que la oxidación de este residuo induce de forma drástica la desestabilización de las proteínas -incluso reteniendo una conformación idéntica a la del péptido nativo-, haciéndolas más sensibles a las proteólisis (Nomura *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008) e incluso disminuyendo su actividad biológica (Labrenz *et al.*, 2008), como ya ha sido propuesto para explicar la menor actividad de algunas variantes descritas de AS-48 (Joosten *et al.*, 1996). En nuestro caso, esta alteración estructural queda demostrada igualmente por la preferencia que muestran las enzimas por la forma oxidada frente a la reducida. En todos los cromatogramas se observa la digestión a mayor velocidad de la forma oxidada, quedando de manifiesto que la molécula tiene más regiones en las que no está bien organizada y, por ende, son más susceptibles del ataque enzimático.

Sin duda, los resultados más interesantes se obtuvieron en la digestión de AS-48 con termolisina a pH 7,5 tanto en presencia de TFE (15%) como de SDS (0,1%). En el primer caso los resultados demuestran que el enzima tiene como primer sitio de corte el enlace entre los aminoácidos 42 y 43, a nivel de la hélices hidrófobas  $\alpha_1$ - $\alpha_3$  (residuos 9-45), lo que sugiere que, en estas condiciones, esta región es más flexible y por

tanto más susceptible al ataque de la proteasa (Fontana *et al.*, 2004). En efecto, los primeros fragmentos que se aislaron contenían las secuencias 43-27 y 42-28 -ambos identificados en el mismo pico del cromatograma- (Figura 7-R, Montalbán-López *et al.*, 2008), además de una pequeña cantidad de una forma lineal abierta entre los residuos Ala<sup>10</sup> y Val<sup>11</sup> (AS<sub>10/11</sub>). Por otra parte, el patrón de fragmentación obtenido con esta misma enzima pero en presencia de SDS (0,1%), demuestra que el sitio de apertura que proporciona la molécula más estable se encuentra entre los aminoácidos 10 y 11, ya que se obtuvo la misma especie lineal, si bien los situados en las posiciones 41, 42 y 43 se encuentran en una zona más flexible de las otras dos formas abiertas [las obtenidas entre los residuos Leu<sup>42</sup> y Leu<sup>43</sup> (AS<sub>42/43</sub>) y Ser<sup>41</sup> y Leu<sup>42</sup> (AS<sub>41/42</sub>)] y los fragmentos 18-10 y 42,43-10 (AS<sub>18-10</sub> y AS<sub>42,43-10</sub>) cuyas masas moleculares fueron determinadas mediante ESI-MS.

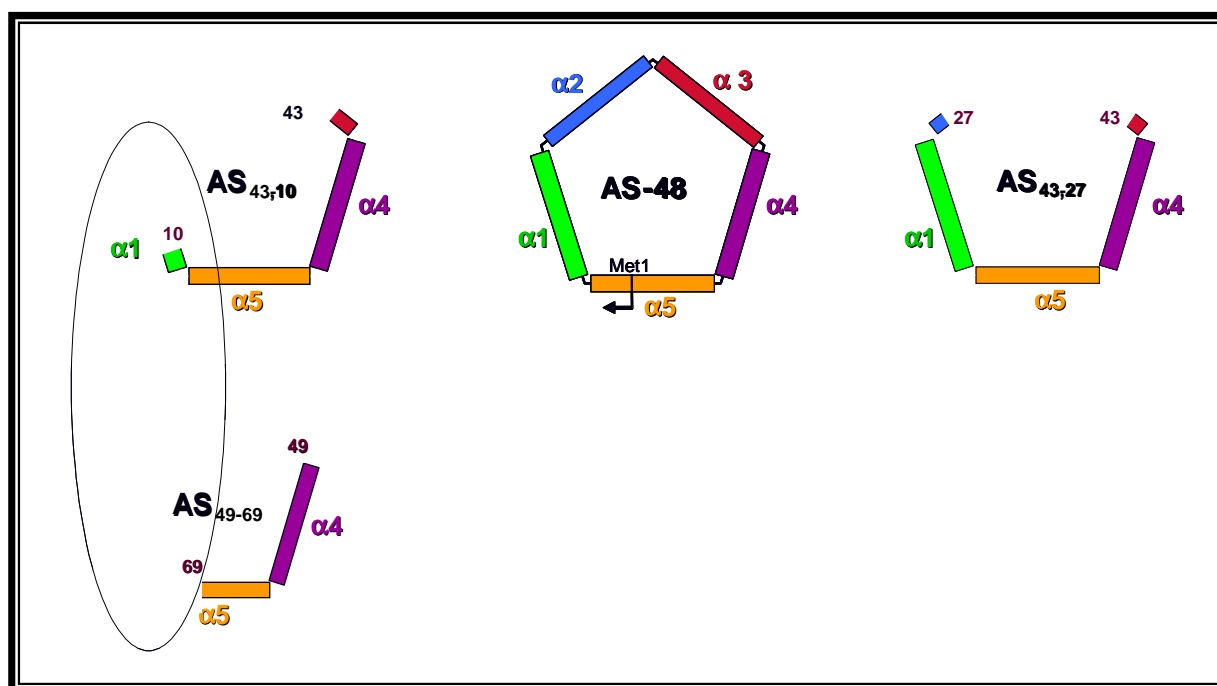
Partiendo de mayores cantidades de AS-48 purificada a homogeneidad, el rendimiento de las especies AS<sub>10/11</sub>, AS<sub>43-10</sub> y AS<sub>42-10</sub> fue lo suficientemente alto como para permitir el análisis estructural mediante dicroísmo circular, así como funcional mediante los correspondientes ensayos de actividad. En efecto, el análisis mediante DC de la forma abierta AS<sub>10/11</sub>, demostró, como era de esperar, que la apertura del esqueleto circular se traducía en una consistente desestabilización de la estructura de la proteína, con una reducción en la helicidad de aproximadamente el 35% respecto a la forma circular nativa, lo que indicaba que la hidrólisis altera la estructura secundaria de AS-48. De hecho AS<sub>10/11</sub> era también menos resistente que la forma nativa a la desnaturalización térmica debido al aumento de entropía que supone la circularización de la molécula (Cobos *et al.*, 2001; 2002). A pesar de las diferencias observadas en estabilidad y helicidad, la forma abierta conservaba actividad frente a las bacterias empleadas como indicadoras (*E. faecalis* y *L. monocytogenes*), poniendo de manifiesto que el sitio de hidrólisis podría ser compatible con su capacidad de inserción en membrana. A pesar de ello, la CMI calculada para esta molécula lineal era del orden 300 veces menor que la de la forma nativa. Estos resultados son similares a los obtenidos con la forma lineal de la microcina MccJ25 tras

tratamiento enzimático en condiciones similares a las aquí descritas (Blond *et al.*, 2002). En relación a ello, es importante destacar que AS<sub>10/11</sub> prácticamente recuperaba su estructura secundaria en presencia de SDS (0,1%), lo que sugiere que esta forma abierta podría adquirir una conformación similar a la de la nativa en presencia de ambientes similares al de la membrana, permitiendo así su necesaria inserción en la bicapa lipídica para llevar a cabo su actividad formadora de poros (revisado por Maqueda *et al.*, 2004). De hecho, se ha demostrado que el contenido hélico es determinante en la actividad de este tipo de péptidos antibacterianos (Johansson *et al.*, 1998).

Cuando se analizaron los fragmentos AS<sub>43-27</sub> y AS<sub>42/43-10</sub> mediante DC en el UV-lejano, los espectros fueron bastante diferentes según se tratara del fragmento AS<sub>43-27</sub> con una helicidad del 71% (reteniendo gran parte de la conformación de la proteína nativa calculado en el 78%), o de AS<sub>42,23-10</sub> en los que el porcentaje de estructura secundaria era muy inferior. En general, se pudo confirmar en los ensayos biológicos realizados a una concentración de 0,3 mg/ml frente a las dos bacterias indicadoras antes mencionadas, que ambos fragmentos retenían actividad bactericida. Sin embargo, la actividad de las muestras era mucho menor que en el caso de la molécula original y siempre inferior a la de AS<sub>10/11</sub>. De hecho, cuando se compararon las CMI en idénticas condiciones, se calculó que los fragmentos AS<sub>43-27</sub> y AS<sub>42,43-10</sub> requerían concentraciones 500 a 1000 veces superiores, respectivamente, a la de la molécula nativa.

Finalmente, para profundizar en los mecanismos moleculares de la actividad biológica de AS-48, ha sido muy ilustrativo referir la actividad residual de estos fragmentos con la de la minibacteriocina sintética AS<sub>49-69</sub> diseñada por Jiménez *et al.* (2005) que, a pesar de conservar la región de cargas positivas implicada en la interacción con las membranas, sólo mostraba antagonismo competitivo con AS-48, pero carecía en sí misma de actividad. El análisis comparativo de los fragmentos con la minibacteriocina AS<sub>49-69</sub> (Figura 4-D) permite establecer las diferencias más sobresalientes con los dos nuevos tipos de moléculas generadas. Desde un punto de vista estructural, las sustituciones de Ile<sup>59</sup>Cys y Val<sup>67</sup>Cys introducidas en AS<sub>49-69</sub> para mantener la orientación relativa de las

hélices, fueron determinantes de una menor flexibilidad y la acetilación/amidación de los extremos de AS<sub>49-69</sub> realizada durante la síntesis química para evitar la influencia de los grupos polares, es otra diferencia significativa que habría que considerar. Por otra parte, AS<sub>49-69</sub> carece de los residuos WMAKEFGIPAA (hélice  $\alpha$ 5) de los cuales, Trp<sup>70</sup>, se sabe que es esencial en la interacción con las membranas (Fimland *et al.*, 2001; Sánchez-Barrena *et al.*, 2003) y tampoco contiene la hélice  $\alpha$ 1 presente en AS<sub>43-27</sub>, una hélice fuertemente hidrófoba y probablemente importante para una eficiente inserción en membrana. Ello se traduce en la ausencia de los residuos Trp<sup>24</sup> y Trp<sup>70</sup> ambos presentes en el fragmento AS<sub>43-27</sub>, por otra parte mejor estructurado que AS<sub>42,43-10</sub>, lo que sin duda le permitirá mantener el ordenamiento de cargas positivas en una conformación mas próxima a la de la molécula nativa, explicando la mayor actividad que este fragmento presenta.



**Figura 4-D. Comparación de las moléculas de AS-48 obtenidas mediante proteólisis controlada con el péptido de síntesis química Bc-49-69.**

En general, estos resultados confirman que la circularización de la molécula no es imprescindible para conservar la actividad, al menos en parte, aunque sí es importante para mantener la estabilidad de su estructura 3D. Es además evidente que, para que los fragmentos estructurados derivados de AS-48 mantengan la actividad, no sólo

requieren la región cargada positivamente responsable de la primera interacción con la membrana (existente en AS<sub>49-69</sub>) sino que han de conservar además un dominio hidrófobo, más o menos complejo, así como la presencia de los residuos aromáticos antes mencionados, para permitir su inserción en la bicapa lipídica y la consiguiente formación de poros (Jiménez *et al.*, 2005, Sánchez-Hidalgo *et al.*, MS in review).

### 3. Expresión heteróloga de los genes *as-48<sup>L</sup>* construidos

(Montalbán-López *et al.* Design and construction of linear variants from circular enterocin AS-48. J. Bacteriol. MS in review)

(Montalbán *et al.* Design and construction of linear variants from circular enterocin AS-48. MS in preparation)

En una revisión sobre producción heteróloga de bacteriocinas por BAL, Rodríguez *et al.* (2003) exponen los principales objetivos de los diferentes sistemas de expresión desarrollados, recogidos en los siguientes *ítems*: i) elucidación funcional de las proteínas recombinantes, ii) mejorar el control transcripcional/traducciona l de la expresión de los genes recombinantes iii) optimizar los niveles de producción y iv) desarrollar cepas multibacteriocinogénicas con interesantes aplicaciones biotecnológicas. Pero se resalta asimismo otro aspecto muy interesante, la posibilidad de optimizar la producción de las bacteriocinas en condiciones alternativas a las que se produce la proteína nativa. Este sería el caso de AS-48, cuya expresión en bacterias reconocidas como GRAS o QPS, diferentes de las cepas de enterococos productoras de forma natural de AS-48, no ha sido posible hasta la fecha (Fernández *et al.*, 2007). En aquel trabajo, el *cluster as-48* se clonó en vectores tan diferentes como i) pAM401 empleado en un amplio rango de bacterias Gram-positivas e incluso en *E. coli* (Fujimoto e Ike 2001); ii) pIL253, un vector de lactococos seleccionado por su pequeño tamaño y el alto número de copias que presenta (Gasson y Anderson, 1985); y iii) pEM76, un vector de grado alimentario desarrollado por Martín *et al.* (2000) que cataliza la integración del ADN clonado en el sitio *attB* del genoma de *Lactobacillus*. Se estimó que la ausencia de expresión, tanto en las cepas de *Lactococcus* o *Lactobacillus* ensayadas, pudiera deberse a la necesidad de una maquinaria específica para la maduración/secreción de AS-48 exclusiva de las especies de *Enterococcus*. Por eso, en este trabajo se planteó la posibilidad de expresar en cepas heterólogas, tanto de *E. coli* como de *Lactococcus lactis*, las moléculas lineales construidas que ya no requieren del complejo proceso de maduración/circularización de la molécula nativa.



### 3.1. Ensayos de expresión heteróloga en *Escherichia coli*.

Esta bacteria es, sin duda, el hospedador más utilizado para la clonación y expresión heteróloga de genes, debido a su amplia caracterización genética y que la mayoría de sus procesos biológicos son bien conocidos, y a la disponibilidad de numerosas herramientas genéticas para su manipulación (Makrides, 1996; Billman-Jacobe, 1996). En consecuencia, *E. coli* ha sido utilizada como huésped para clonación y expresión de una gran variedad de genes, tanto de organismos procariontes como de eucariotes y en particular de los genes de bacteriocinas de las BAL (Biet *et al.*, 1995; Ingham *et al.*, 2005). Por ello, en esta Memoria, se intentó la expresión en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*, tanto del gen lineal *as-48L<sup>1/70</sup>* clonado en pET22b como de los otros genes circularmente permutados, clonados en pBAT-4m (*as-48L<sup>23/24</sup>*, *as-48L<sup>48/49</sup>*, *as-48L<sup>43-27</sup>*, *as-48L<sup>10/11</sup>* y *as-48L<sup>10/11-R1</sup>*).

En un intento de optimizar las condiciones de expresión, se modificaron las concentraciones de IPTG utilizadas (0-2mM) así como el tiempo de inducción (0-24h) y la temperatura de incubación de los cultivos (20°, 28° y 37° C). Los extractos de las muestras así inducidas fueron analizados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), pero a pesar del elevado número de ensayos realizados y las diferentes condiciones de inducción aplicadas, no fue posible, en ningún caso, poner de manifiesto la presencia de bandas con el tamaño esperado (aprox. 7.150 Da), ni en la fase soluble ni como cuerpos de inclusión. Sólo en ensayos realizados con cepas deficientes en proteasas se observó una nueva banda con un tamaño aproximado de unos 70 kDa en algunos de los extractos de los cultivos inducidos a partir de las dos horas, la cual, tras su extracción del gel y análisis mediante huella peptídica, pudo ser identificada de forma inequívoca con una beta-galactosidasa ( $p < 0,05$ ). Se planteó entonces si el problema sería la difícil observación en los geles debido al pequeño tamaño de las moléculas a expresar. Por ello, y considerando la mayor sensibilidad de la técnica de Western Blotting en la identificación de proteínas, se intentó la detección de las variantes lineales investigadas en membranas de nitrocelulosa a las que previamente habían sido transferidas las proteínas, empleando anticuerpos policlonales purificados anti-AS-48 (Maqueda *et*

*al.*, 1993). Era de suponer que, a pesar de las modificaciones estructurales introducidas en las nuevas proteínas, los Ac serían capaces de unirse a ellas, si bien no mediante el reconocimiento de todos los determinantes antigénicos lineales presentes en la forma nativa, sí de los conformacionales que estuvieran conservados, en caso de que las nuevas moléculas adoptaran la esperada estructura 3D. Sin embargo, tampoco en este caso fue posible observar diferencias entre los extractos problemas y los controles en las membranas de transferencia tras el revelado con los anticuerpos.

Se plantearon entonces toda una serie de posibilidades para explicar las dificultades encontradas en la expresión de las diferentes construcciones. Se valoró si los resultados negativos podían ser debidos a problemas en la transcripción, a inestabilidad de los ARNm (Gross, 1989), a la baja eficiencia en la traducción de los mensajeros debido al diferente uso de codon entre ambos hospedadores (Gold y Stormo, 1990), o a la falta de precisión en la incorporación de aminoácidos (Santos y Tuite, 1993; Makrides, 1996; Sawers y Jarsch, 1996). Si bien también podía deberse a la posible toxicidad para el huésped lo que previsiblemente conduciría a la formación de agregados como cuerpos de inclusión (Hockney, 1994). Era también posible que las nuevas cadenas polipeptídicas fueran incapaces de plegarse y adoptar una estructura tridimensional apropiada, siendo así mas susceptibles a los enzimas proteolíticas citoplasmáticas (Gottesman 1990; Nygren *et al.* 1994). En resumen, se valoraron los posibles niveles de regulación de la expresión génica: transcripción, traducción, estabilidad de las proteínas y expresión de la actividad (revisado por Gottesman, 2003).

Para confirmar cada uno de estos extremos, se abordó inicialmente el análisis transcripcional de la mayoría de los transformantes mediante RT-PCR a partir del ARN total extraído de las cepas BL21(D3), en diferentes condiciones de inducción empleando 1,5 mM de IPTG. La amplificación de bandas de ADNc con el tamaño esperado (221 y 224 nt) corroboró que la ausencia de proteínas en los extractos no era debido a bloqueo transcripcional de los nuevos genes. No obstante y dada la alta sensibilidad de la PCR, la existencia de estas bandas no aseguraba que todas las células mantuvieran la información genética transferida ya que, al tratarse

de proteínas catiónicas tóxicas que se intentan sobreexpresar, se estaría favoreciendo la selección de microorganismos carentes del vector de expresión, de los que han perdido parte de la información genética e incluso de aquéllos que, manteniéndola, son incapaces de expresarla (Studier y Moffatt, 1986). Para confirmar este extremo se realizaron recuentos en placa de los transformantes tras la inducción en presencia y ausencia de Ap como agente selectivo, encontrándose diferencias de una unidad logarítmica ( $10^{10}$  y  $10^{11}$  UFC/ml, respectivamente) que no justificaban los resultados negativos obtenidos.

Por otra parte y dado que se ha descrito que la labilidad de los mensajeros puede ser uno de los principales problemas en la expresión de proteínas, incluso de aquéllas que son estables, se analizaron con todo detalle los extractos correspondientes a la nueva construcción *as-48L<sup>10/11-RI</sup>*, en la que la presencia de la RI que se había introducido, pensamos, podría estabilizar el correspondiente mensajero. Desafortunadamente, ni en ésta ni en las anteriores construcciones realizadas con este gen, fue posible la detección de bandas con el tamaño esperado en ninguno de los extractos celulares analizados en SDS-PAGE, lo que descartaba, en parte, la posibilidad de que la ausencia de proteínas se debiera a la falta de estabilidad de los ARNm. Como siguiente alternativa y con el fin de soslayar también una baja eficacia o incapacidad de traducción debido a diferencias en el uso de codon entre *Enterococcus* y *E. coli*, en particular en lo referente a las 2 Arg y 5 Gly existentes en AS-48, se utilizó la cepa BL21 (DE3) pLysS Codonplus-RIL, referida por numerosos autores como un hospedador apropiado para esta finalidad (Baca y Hol. 2000; McNulty *et al.*, 2003, Wu *et al.*, 2004), sin obtener, tampoco en este caso, mejores ni diferentes resultados.

Quedaba por ver si los reiterados fracasos en la expresión de las proteínas lineales pudieran ser debidos a su toxicidad para la célula huésped, ya que, en este sistema de expresión, las proteínas con actividad se acumularían en el citoplasma de la bacteria con consecuencias fatales. En tal caso, sería predecible que se produjera una parcial o total deposición de las mismas en cuerpos de inclusión. Sin embargo, en ningún momento pudieron ser detectados en los extractos, a pesar de que sería

una forma de contrarrestar la toxicidad de las proteínas expresadas. Resultados similares han sido referidos por Chem *et al.* (2007) que sólo pudieron expresar ciertas proteínas citotóxicas cuando la toxicidad de las mismas fue disminuida.

Restaba justificar estos resultados como consecuencia de la degradación proteolítica de las cadenas mal empaquetadas, lo que, en último término evitaría que polipéptidos no funcionales se acumularan en el citoplasma (Baneyx y Mujacic, 2004). En realidad, la proteólisis podría ser una consecuencia más que una causa de posibles problemas en el plegamiento de las proteínas diseñadas. En cualquier caso, nos encontramos ante un proceso fuertemente regulado en *E. coli* que juega un importante papel en la fisiología celular, ya que esta bacteria contiene numerosas enzimas proteolíticas, tanto citoplasmáticas como periplásmicas (Baneyx y Georgiou, 1992, Goldberg, 1992; Goldberg y Goff, 1986). Una estrategia lógica para minimizar la posible proteólisis de proteínas recombinantes era el uso de cepas hospedadoras deficientes en proteasas (Makrides, 1996). Por ello se había seleccionado inicialmente la cepa BL21(DE3), que carece de las proteasas Lon y OmpT -que reduce pero no evita la proteólisis dependiente de energía- además de poseer una excelente maquinaria para la expresión de proteínas heterólogas (Ingham *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007). Para valorar este extremo, se emplearon diversos mutantes deficientes en proteasas dependientes de energía de la familia Clp, las cuales junto a la proteasa Lon -naturalmente ausente en la cepa BL21(DE3)- y FtsH (esencial en *E. coli* y por ello no ensayada, Gottesman, 1990; 2003), juegan un papel crítico en muchos circuitos celulares, permitiendo niveles basales de proteínas reguladoras pero eliminando las que fueran innecesarias para la célula (Hwang *et al.*, 1987; Katayama-Fujimura *et al.*, 1987). Desafortunadamente, tampoco en estas circunstancias hubo éxito en la expresión de los genes construidos en ninguno de los mutantes deficientes en proteasas dependientes de energía ensayados.

Ante los reiterados resultados negativos obtenidos, se podría pensar si la carencia del péptido señal en los genes diseñados y/o las mutaciones introducidas por la propia permutación, se podría traducir en el

desplazamiento en la ruta de plegamiento (Li y Shakhnovich, 2001) o incluso conducir a intermediarios parcialmente estructurados –sea teniendo en cuenta un modelo jerárquico o secuencial de plegamiento o el modelo de embudo– con baja energía y, por tanto, con cierta inestabilidad (Karplus y Weaver, 1976; Dill y Chan, 1997; Baldwin y Rose, 1999; Nauli *et al.*, 2001; Onuchic y Wolynes, 2004; Udgaonkar, 2008). En relación con ello, habría que tener presente que, en un estudio reciente llevado a cabo sobre la cinética de plegamiento y desplegado de la molécula AS-48 nativa, se demostró la existencia de un modelo de tres estados, en el cual, una forma intermediaria incompletamente desplegada pero con parte de estructura secundaria, conocida como “*molten globule*”, se encuentra en equilibrio con el estado nativo y el desnaturalizado (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2009). La existencia de este tipo de intermediarios podría, sin duda, favorecer la inestabilidad de la proteína, más susceptible al ataque proteolítico, lo que supone un riesgo añadido cuando se trata de expresarla en el citoplasma bacteriano como una proteína lineal madura. En consecuencia sería posible que se produjera el ataque de los intermediarios por parte de proteasas intracelulares, antes incluso de que la proteína adopte una conformación tridimensional estable o de que sea depositada como cuerpos de inclusión. Curiosamente este fenómeno ha sido observado incluso en cepas deficientes en proteasas (Hong *et al.*, 1995; Lloyd *et al.*, 1997; Lukacin *et al.*, 2000). De cualquier forma, no sería hasta que la producción de proteínas parcialmente desplegadas excediera la capacidad de degradación de la célula que éstas precipitasen como cuerpos de inclusión y pudieran ser aisladas (Betton *et al.*, 1998; Goldberg, 2003; Gottesman *et al.*, 1997). Abundando en ello, es también factible que, además de carecer de la necesaria estructura, la existencia de alto contenido en Lys y Arg las haga aún más susceptibles a las proteasas, como ha sido descrito con las variantes de cecropina (Chen *et al.*, 2007) y sarcotoxina (Skosyrev *et al.*, 2003).

La síntesis de estos resultados es la imposibilidad de expresar en *E. coli* ninguna de las formas abiertas de AS-48 construidas (AS<sub>1/70</sub>, AS<sub>23/24</sub>, AS<sub>48/49</sub> y AS<sub>10/11</sub> con y sin RI) ni tampoco del fragmento AS<sub>43-27</sub>, al no haber sido posible su detección en los extractos celulares a pesar del

empleo de diferentes concentraciones de inductor, con tiempos de inducción y temperaturas de crecimiento variables, y ello, a pesar de haber confirmado la existencia de mensajeros específicos en los casos investigados. Ello, unido a la ausencia de cuerpos de inclusión en los transformantes, nos lleva a proponer que las proteínas lineales diseñadas sean incapaces de alcanzar el plegamiento correcto, siendo por ello rápidamente degradadas en la célula huésped. Este comportamiento resulta, si cabe, más sorprendente en el caso de los genes *as-48L<sup>10/11</sup>* y *as-48L<sup>43-27</sup>* diseñados tras comprobar que las respectivas proteínas obtenidas mediante proteólisis controlada de AS-48 con termolisina conservaban en parte la actividad biológica de la forma nativa. Sin embargo, de los resultados expuestos en el trabajo de Montalbán-López *et al.* (2008) ya se deducía que el esqueleto circular de AS-48, aunque no es condición imprescindible para mantener parte de la actividad, sí resultaba determinante para salvaguardar la estructura 3D de las formas derivadas, presentando una estructura secundaria más relajada que la forma nativa. Entre las posibles razones a barajar sería posible admitir que las nuevas moléculas permutadas y abiertas carezcan de la necesaria conectividad entre los extremos, lo que impediría la formación del núcleo de la proteína y el consiguiente plegamiento, viéndose también afectadas las esenciales interacciones entre los residuos hidrófobos internos (Langdon *et al.*, 1998). De hecho, se ha afirmado que el diseño de nuevas secuencias que se asemejan a la de la proteína original en composición pero no en conectividad entre las cadenas, puede tener dificultades para plegarse en la conformación nativa o al menos en estructuras estables (Korsinczk *et al.*, 2001). Estos resultados, aunque inesperados, tal vez puedan ser explicados si se comparan con los obtenidos con la Microcina J25, una bacteriocina de 21 residuos producida por *E. coli* inicialmente considerada como una molécula con una estructura macrocircular debido a la unión peptídica cabeza-cola de sus extremos (Salomon y Farias, 1992; Blond *et al.*, 1999). Sin embargo resultados posteriores obtenidos mediante espectrometría de masas y RMN a partir de la molécula nativa y de fragmentos peptídicos derivados de ella, confirmaron la existencia de un anillo de 8 residuos que se forma mediante enlace lactámico interno entre el grupo amino de la Gly<sup>1</sup>

y el carboxilo del Glu<sup>8</sup>, a través del cual se introduce la cola de los 13 residuos restantes (Tyr<sup>9</sup>-Gly<sup>21</sup>). Dicho esqueleto, conocido como estructura “*lasso-tail*”, descrito en algunos inhibidores enzimáticos, se encuentra estabilizado por la posición de los residuos aromáticos Phe<sup>19</sup> y Tyr<sup>20</sup> que se disponen flanqueando el anillo (Wilson *et al.*, 2003; Rosengren *et al.*, 2003; Bayro *et al.*, 2003). Resulta interesante confirmar que la linearización controlada de la MCCJ25 con termolisina origina una molécula que conserva la estructura tridimensional y actividad antibacteriana de la molécula nativa (MccJ25-L<sub>1,21</sub>), mientras que un análogo obtenido por síntesis química, con una secuencia idéntica a MccJ25-L<sub>1,21</sub>, carecía tanto de actividad como de organización estructural (Blond *et al.*, 2002). Cuando se determinó la estructura secundaria de ambas moléculas mediante RMN de protones, se observó que, a pesar de la identidad en la secuencia aminoacídica, ambos péptidos adoptaban conformaciones diferentes y los NOEs específicos que caracterizaban la estructura del péptido originado enzimáticamente estaban ausentes en el péptido sintético. Como explicación de estos resultados los autores propusieron que la conservación de la estructura entre MccJ25 y la forma lineal obtenida con termolisina no está determinada por la secuencia lineal en sí misma y, en consecuencia, la cadena lineal sintetizada es incapaz de adoptar la conformación activa de forma espontánea (Blond *et al.*, 2002).

Finalmente, resulta obvio que un único microorganismo no puede ser apropiado para todas las aplicaciones y que es posible que estos genes no puedan ser expresados de forma eficiente en él. Sea cual fuere el(los) motivo(s) de los reiterados resultados negativos obtenidos en la expresión de las diferentes proteínas lineales derivadas de AS-48 en *E. coli*, debemos concluir que, a pesar de la eficacia ampliamente demostrada por esta bacteria, en nuestro caso, la expresión de formas lineales de AS-48, no ha sido posible.

### **3.2 Ensayos de expresión heteróloga en *Lactococcus lactis* empleando diferentes péptidos señal.**

Los lactococos son bacterias ampliamente empleadas como cultivos iniciadores o adjuntos en la industria alimentaria, particularmente en el

sector lácteo, al ser organismos reconocidos como seguros (GRAS) por la FDA (*Food and Drug Administration*, USA), propuestos para formar parte de la lista de microorganismos QPS de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Como se ha expuesto en la Introducción de esta Memoria, no había sido posible hasta la fecha la obtención de transformantes de lactococos con el cluster *as-48* con un fenotipo productor de AS-48, probablemente, debido a la carencia de los enzimas necesarios para el proceso de maduración de la forma nativa, que parecen residir en algún determinante cromosómico de las especies del género *Enterococcus* (Fernández *et al.*, 2007). Por todo ello se consideró que el disponer de variantes lineales de AS-48, permutadas circularmente, representaba una oportunidad única de obtener cepas GRAS de *L. lactis*, capaces de producir este inhibidor, con amplio espectro de acción e interesantes características biotecnológicas para su aplicación como bioconservante de alimentos

El amplio conocimiento existente a nivel molecular de los mecanismos de expresión de bacteriocinas de Clase II por *L. lactis* ha permitido, por otra parte, el desarrollo de vectores de expresión adecuados para la producción de proteínas recombinantes. Quizás uno de los sistemas mejor adaptados sea el que utiliza péptidos señal (PS) de moléculas bien caracterizadas, en particular cortos péptidos señal de bacteriocinas de Clase II como el de la lactococcina A, empleado con éxito en la secreción al medio extracelular de plasmina bovina (Arnau *et al.*, 1997),  $\beta$ -lactoglobulina (Chatel *et al.*, 2001), la proteína no estructural NSP4 del rotavirus bovino 4 (Enouf *et al.*, 2001) o la interleukina-2 murina (IL-2) e IL-6 (Steidler *et al.*, 1998), o bien el péptido señal de la proteína Usp45 (USPsp) (van Asseldonk *et al.*, 1990; 1993) utilizado con éxito en la secreción de  $\alpha$ -amilasa (van Asseldonk *et al.*, 1993), plasmina bovina (Arnau *et al.*, 1997), la proteína Nuc (Dieye *et al.*, 2001; Poquet *et al.*, 1998) o la lipasa (Drouault *et al.*, 2000). Es sabido que el péptido señal actúa como una chaperona intracelular para retrasar el plegamiento de la proteína, manteniéndola con una conformación compatible con la translocación de la misma y evitando los posibles efectos tóxicos de las proteínas en la célula (Le Loir *et al.*, 2001)



La expresión heteróloga de los genes *as-48<sup>L</sup>* construidos en *L. lactis* ha sido por este motivo planteada como proteínas de fusión con péptidos señal de sistemas de secreción previamente validados (Dodd *et al.*, 1992; Wegmann *et al.*, 1999). Este trabajo ha sido realizado en colaboración con el Dr. Juan Miguel Rodríguez (Univ. Complutense, Madrid), Nikki Horn y el Dr. Arjan Narbad del Institute of Food Research (IFR) de Norwich (Reino Unido).

Las fusiones de cada uno de los cuatro genes (*as-48L<sup>23/24</sup>*, *as-48L<sup>48/49</sup>*, *as-48L<sup>10/11</sup>* y *as-48L<sup>43-27</sup>*) se obtuvieron utilizando el método de extensión de fragmentos solapados (*splice overlap extenssion*) que consiste en la amplificación del promotor y el líder seleccionado, en el cual se ha introducido una cola en el extremo 3' que solapa con el extremo 5' del producto de la siguiente PCR en la que se amplifica el gen que se quiere clonar, en nuestro caso las diferentes construcciones lineales derivadas de *as-48A*. Posteriormente, estos dos productos se mezclan en igual proporción y, gracias a la región solapante, al volver a amplificar se origina un producto que contiene fusionados los dos fragmentos anteriores. Finalmente, los productos amplificados son ligados en pCR2.1 o pGEM-T y empleados para transformar *E. coli* TOP10. Una vez realizados los correspondientes análisis aleatorios de colonias para comprobar que tenían interrumpido el gen de la  $\beta$ -galactosidasa y secuenciados varios clones positivos, los genes fueron cortados de este vector y subclonados en los correspondientes vectores de expresión.

En este trabajo los dos péptidos-síñal (*lcnA<sub>PS</sub>* y *usp<sub>PS</sub>*) seleccionados se encuentran bajo el promotor P<sub>nisA</sub> inducible por nisina: el líder de la lactococcina A que requiere la clonación en *cis* de los genes *lcnCD* (responsables de la escisión de dicha señal y el transporte del péptido maduro al exterior celular) y el péptido señal de la proteína Usp45 que, al ser de tipo Sec, no requiere ningún tipo de transportador. Ambos sistemas de expresión cuyo control de inicio de la transcripción es inducido por nisina, se escogieron por haberse demostrado versátiles y eficaces para la expresión de cantidades importantes de proteínas, al existir una relación lineal entre la cantidad de nisina añadida a los cultivos y la actividad del promotor. Como hospedadoras se emplearon las cepas modificadas UKLc10

(con los genes de resistencia para la nisina integrados en el cromosoma) y FI7847 (que posee el cluster *nis* con el gen *nisA* interrumpido) y que, por tanto, en ningún caso eran productoras de nisina (Dodd *et al.*, 1992). Para ser empleadas como cepas productoras fue necesario transformarlas previamente con el plásmido compatible pIL253-64 (*as48CC<sub>1</sub>DD<sub>1</sub>*) en el que la existencia de determinantes de inmunidad les confería una resistencia parcial a la enterocina AS-48 (frente al menos 0,3 mg/ml). Fue también necesario preparar estas cepas para ser utilizadas como indicadoras, sensibles a AS-48 pero resistentes a nisina –empleada como inductor en los ensayos de producción- y a eritromicina -usada como agente selectivo-, para lo que fue necesario transferirles el plásmido pIL252.

Las diferentes construcciones quiméricas fusionadas a los dos tipos de péptidos señal (*lcnA<sub>PS</sub>* y *usp<sub>PS</sub>*) fueron introducidas por transformación en las dos cepas modificadas de *L. lactis*. Entonces, los cultivos se dejaron crecer hasta una D.O de 0,5 antes de ser inducidos (durante 2, 4 ó 24 h) con diferentes cantidades de nisina (0,1, 1, 10, y 100 ng/ml). Fue realmente desalentador comprobar la ausencia de expresión de todas las proteínas quiméricas de AS-48 construídas en las condiciones expuestas. De hecho, no fue posible detectar actividad tras la inducción de cultivos ni en medios líquidos ni en sólidos. Para confirmar la ausencia de actividad, los sobrenadantes fueron concentrados mediante precipitación con TCA o intercambio iónico. Tampoco fue posible encontrar bandas con el tamaño esperado en los extractos celulares obtenidos con lisozima y desarrollados en SDS-PAGE, ni la detección de bandas específicas cuando se realizó un Western empleando Ac anti-AS-48. Ciertamente, se ha descrito que incluso utilizando PS apropiados, la secreción puede no ser eficiente, de tal forma que en algunos intentos de expresión heteróloga de proteínas no se produce secreción o los niveles son muy bajos (Le Loir *et al.*, 2001)).

Será, pues, necesario continuar con estos estudios, modificando las condiciones de los ensayos y confirmar si efectivamente hay expresión génica pero existe un problema cuantitativo que impide su valoración mediante los ensayos de actividad realizados o si en realidad nos encontramos ante la misma situación de inestabilidad de las proteínas, debido a problemas en el plegamiento de las cadenas, como sugieren los

ensayos de expresión en *E. coli* de los otros genes construidos y que han sido anteriormente comentados. En tal caso habría que recurrir a su expresión como proteínas de fusión, con el fin de obtenerlas e investigar la importancia de la ciclación en la estructura tridimensional y en las propiedades fisico-químicas de esta molécula circular. Además, podría ser interesante intentar relacionar estos resultados con los obtenidos en la expresión de la proteína Nuc de *S. aureus*, en los que se ha confirmado que la secuencia existente en el extremo amino del pro péptido puede ser determinante de la translocación a través de la membrana (Le Loir *et al.*, 1998; 2001).

#### 4. Expresión de los nuevos genes permutados como proteínas de fusión en *E. coli*.

(Montalbán *et al.* Design and construction of linear variants from circular enterocin AS-48. J. Bacteriol. MS in review)

La expresión *in vivo* de péptidos catiónicos recombinantes es uno de los métodos más utilizados en la expresión de proteínas, pero cuando no se obtienen los resultados deseados por la capacidad potencial de matar a la célula productora y/o la sensibilidad del péptido a la degradación proteolítica, queda como alternativa intentar la expresión de proteínas híbridas mediante fusión con una proteína heteróloga (Chen *et al.*, 2007). Se trata de una unión covalente que las hace estables e impide que sean degradadas por proteasas del huésped e incluso se ha descrito que podrían estabilizar los correspondientes ARNm (ver Chen *et al.*, 2007). Son muchos los sistemas empleados como proteínas de fusión para expresar y purificar péptidos antimicrobianos, tomando la proteína RepA, el fragmento F4 de PurF, la thioredoxina, la proteína verde fluorescente (GFP) o la proteína PaP3.30 [Chen *et al.*, 2007]. En nuestro caso seleccionamos la clonación y expresión de las diferentes formas de AS-48<sup>L</sup> construidas (genes *as-48L*<sup>23/24</sup>, *as-48L*<sup>48/49</sup>) como productos de fusión empleando el vector pALEXa que contiene el extremo carboxilo del gen *lytA* de *Streptococcus pneumoniae* (C- Lytag Purification System Biomedal) entre el promotor Pm/lac y un sitio de clonación múltiple.

Los diferentes productos de fusión clonados e introducidos en *E. coli* REG-1 fueron expresados mediante inducción con salicilato y separados de forma individual mediante cromatografía de afinidad, gracias al dominio C-Lytag que se une a los grupos amonio de la resina C-Lytrap, de la que fueron eluidos mediante lavado con cloruro de colina. En estas condiciones se pudo finalmente confirmar expresión, aunque con diferente intensidad, de las proteínas recombinantes correspondientes a todos los genes, siendo la expresión desde pALEX-L<sup>23/24</sup> más abundante. Puede ser interesante apuntar que se encontraron diferencias en la densidad óptica alcanzada por los cultivos antes y después de la inducción, que podrían indicar que las proteínas podrían ser tóxicas para la célula, si bien también se podría considerar que los recursos biosintéticos de la célula, volcados en la

producción de la proteína recombinante, podrían frenar la producción de moléculas esenciales en el crecimiento del cultivo. Estos resultados son similares a los descritos por Chen *et al.* (2007) al intentar expresar como proteína de fusión el péptido catiónico ABP-CM4 perteneciente a la familia de las cecropinas. Se ha descrito que este tipo de proteínas, ricas en residuos positivamente cargados, tienen mayores posibilidades de interaccionar con moléculas cargadas negativamente como el ADN o ARN cuando son expresadas a nivel citoplasmático en *E. coli*, lo que puede inhibir sus funciones citoplasmáticas y, por tanto, ser las responsables de la detención del crecimiento celular detectado.

Es interesante comentar la existencia de cuerpos de inclusión, mas abundantes en el caso de la construcción C-Lytag-AS<sub>23/24</sub> tras la inducción, los cuales, tras ser solubilizados con cloruro de guanidinio, permitieron la visualización de la banda con el tamaño esperado (aprox. 29.000 Da) en los geles de SDS-PAGE. No se obtuvieron los mismos resultados con la construcción C- Lytag-AS<sub>48/49</sub> cuyos niveles de expresión fueron más bajos, aunque la banda esperada pudo ser detectada en ensayos de Western Blotting, empleando anticuerpos anti-Lytag y anti-AS-48. No resulta fácil explicar las diferencias en los niveles de expresión de ambas proteínas de fusión obtenidas que, en principio, desde un punto de vista estructural y funcional deberían ser similares. Sin embargo, los ensayos han sido repetidos varias veces y los resultados han sido los mismos. Por otra parte, las proteínas de fusión carecían de actividad biológica y ello a pesar de que algunos dominios de la molécula nativa deben estar presentes ya que son reconocidos por los Ac anti-AS-48. Este resultado era, por otra parte, esperable teniendo en cuenta que se trata de proteínas quiméricas mucho más complejas, a las que se le ha añadido una secuencia que triplica el tamaño de AS-48, con un pI que ha sido calculado en 5,5.

En principio, la secuencia DDDDK presente en las construcciones debería ser reconocida de manera específica por la enteroquinasa, facilitando la obtención de las nuevas proteínas lineales de AS-48 libres del tag (C-Lytag) utilizado en la fusión, una vez optimizada la reacción de digestión mediante diálisis en presencia de una moderada concentración

salina y cloruro de colina y tras un tiempo de proteólisis con EK que se estableció entre 48-72 horas.

Llevada a cabo la correspondiente proteólisis, la identificación de las proteínas lineales presentes en la mezcla se inició analizando las bandas resultantes mediante separación en SDS-PAGE, las cuales fueron ensayadas frente a *Listeria*, empleando como control fracciones purificadas de AS-48 y de la proteína C-Lytag. De esta forma se pudo comprobar en los extractos de las diferentes proteínas C-Lytag/AS-48<sup>L</sup> eluidos de la columna, antes y después de la rotura con enteroquinasa, la existencia de bandas que mostraban actividad inhibidora, así como de otras tres fracciones de menor Pm (entre 7000 y 9000 Da) que, sin embargo, carecían de ella. La existencia de bandas de menor tamaño en el gel antes del tratamiento enzimático con EK, se podría explicar como construcciones truncadas de la proteína o bien a fragmentos derivados de ataques enzimáticos no controlados.

Las mezclas de péptidos, originados en cada una de las construcciones tras el tratamiento con EK, fueron separadas mediante RP-HPLC empleando columnas de C4. De esta forma se obtuvieron cromatogramas muy similares entre sí, con el perfil que se muestra en la figura 5-R, el ensayo de actividad frente a *L. monocytogenes* de las diferentes fracciones y el posterior análisis mediante SDS-PAGE confirmó que la actividad se localizaba en el tercer pico de los cromatogramas y que se correspondía con una banda mayoritaria cuyo Pm era muy superior al de AS-48 utilizado como control. Fue, además, sorprendente comprobar el incremento en los halos de actividad que se producía tras 24-48 h de incubación de las placas, lo que sugería que se podía estar produciendo una activación de las autolisinas celulares, y ello a pesar de que el *tag* solo contiene el extremo carboxilo de la proteína LytA que carece de la capacidad de degradar la pared celular (Sánchez-Puelles *et al.*, 1990), como por otra parte habíamos podido confirmar en este trabajo, en los controles llevados a cabo con la construcción pALEX (C-Lytag).

Por último y mediante la espectrometría de masas realizada a la fracción tercera procedente de HPLC, se confirmó la existencia de un pico con alto Pm (17861,75 Da) que, de acuerdo con los datos de su huella

peptídica, se corresponde de forma inequívoca a una proteína híbrida (106 residuos del *tag* y 55 de AS<sub>23/24</sub>). Diversos picos de proteínas detectados con Pm similares, se correspondían con fragmentos de composición parecida al descrito. Se pudo, además, comprobar en todos estos casos la existencia del sitio de corte (DDDDK) intacto en la secuencia de las proteínas quiméricas obtenidas, lo que sugiere que la EK había perdido su especificidad en las condiciones del ensayo o bien no había tenido acceso a su diana debido al posible plegamiento que la proteína de fusión pudiera presentar. La actividad de la nueva molécula puede ser explicada por la presencia de las hélices  $\alpha 2$ - $\alpha 5$  de AS-48, si bien en los dominios repetidos conservados del *tag* se encuentran numerosos Trp y residuos polares que podrían favorecer la actividad global de la proteína además de estabilizar su estructura.

Los resultados obtenidos invitan a realizar una serie de estudios estructurales y funcionales sobre la proteína híbrida obtenida así como de fragmentos que pudieran derivarse de ella, con el fin de establecer el tamaño mínimo necesario para conservar la estabilidad y la actividad antibacteriana.







## ***Conclusiones***



## Conclusiones/ Conclusions

1. Se han construido diversos genes para la expresión de proteínas lineales derivadas de la enterocina AS-48: el gen *as-48L<sup>1/70</sup>* correspondiente a la forma nativa carente del péptido señal y los genes *as-48L<sup>23/24</sup>*, *as-48L<sup>48/49</sup>* y *as-48L<sup>10/11</sup>*, este último con y sin la región intergénica (RI)- así como el gen *as-48L<sup>43-27</sup>* que codifica un fragmento de 55 residuos de los 70 que contiene la proteína nativa, todos ellos mediante aplicación de técnicas de permutación circular en el gen estructural *as-48A*.

*1. Different genes codifying linear proteins derived from enterocin AS-48 have been generated: gene as-48L<sup>1/70</sup>, which is the native one without signal peptide, and genes as-48L<sup>23/24</sup>, as-48L<sup>48/49</sup> and as-48L<sup>10/11</sup>, the last one with or without IR, as well as gene as-48L<sup>43-27</sup>, which encodes a 55 amino acids fragment from the native enterocin. All of them were constructed using circular permutation of gene as-48A.*

2. Dichos genes han sido clonados en vectores de expresión apropiados y transferidos a diversas cepas de *E. coli*. A pesar de las diferentes condiciones de expresión ensayadas, en las que se han modificado las condiciones de inducción y las características de la cepa hospedadora, no ha sido posible, en ningún caso, la detección de ninguna de las proteínas lineales por ellos codificadas.

*2. These genes have been cloned into appropriate expression vectors and transferred to several E. coli strains. Different expression conditions were tested, modifying induction conditions and host strains, but it was not possible to detect the proteins.*

3. De forma alternativa, las construcciones *as-48L<sup>23/24</sup>*, *as-48L<sup>48/49</sup>*, *as-48L<sup>10/11</sup>* y *as-48L<sup>43-27</sup>*, han sido clonadas en fase con el péptido señal de la proteína Usp45 de lactococos. Paralelamente, *as-48L<sup>10/11</sup>* fue también fusionado con el péptido señal de la lactococina A en presencia de los determinantes genéticos necesarios para el transporte. Todas las construcciones fueron clonadas bajo el promotor de la nisina ( $P_{nisA}$ ). Tampoco en estas condiciones ha sido posible la detección de ninguna de las proteínas clonadas tras la inducción de los cultivos con nisina, ni en los

## Conclusiones

---

extractos celulares ni en los sobrenadantes de los cultivos realizados en medios sólidos o líquidos.

3. *Alternatively, as-48L<sup>23/24</sup>, as-48L<sup>48/49</sup>, as-48L<sup>10/11</sup> and as-48L<sup>43-27</sup>, have been cloned in frame with Usp45 signal peptide. Gene as-48L<sup>10/11</sup> has also been fused to lactococcin A leader with the devoted machinery for processing and export. All of the constructions mentioned above were under control of nisin promoter (*P<sub>nisA</sub>*). Detection of proteins in the lactococcal expression systems has not been possible after nisin induction in solid or liquid media, neither in cell extracts nor in culture supernatants.*

4. En ensayos de proteólisis controlada de muestras purificadas de AS-48 con termolisina en presencia de agentes desnaturalizantes (0,1% de SDS o 15% de TFE) se han aislado y caracterizado, tanto a nivel biológico como estructural, la forma lineal AS<sub>10/11</sub> y el fragmento correspondiente a las posiciones 43-27 que mantienen en parte la actividad biológica frente a *Listeria monocytogenes*, si bien en ambos casos de forma más reducida que la bacteriocina nativa.

4. *Limited proteolysis assays conducted on purified AS-48 samples with thermolysin in presence of denaturant agents (15% TFE or 0.1% SDS), allowed us the isolation and structural and biological characterization of a linear protein AS<sub>10/11</sub> and also fragments AS<sub>43-27</sub> and AS<sub>42,43-10</sub>. They were active against *Listeria monocytogenes* but with a reduced activity compared with the wild-type AS-48.*

5. El análisis mediante DC de las formas de AS-48 abiertas *in vitro* demostró que la apertura del esqueleto circular se traducía en una desestabilización de la estructura de las proteínas, ya que, en medio acuoso, presentaban menor helicidad que AS-48, si bien en ambientes similares al de la membrana adoptaban una configuración similar a la de la molécula nativa.

5. *Circular dichroism analysis of AS-48 linear derivatives obtained by limited proteolysis shows a reduced ellipticity in aqueous solution, thus demonstrating that opening the circular backbone destabilises the structure.*

*However, in a membrane-like ambient induced by SDS addition its secondary structure turns similar to the wild-type AS-48.*

6. La expresión de proteínas quiméricas obtenidas mediante fusiones de los genes *as-48L<sup>23/24</sup>* y *as-48L<sup>48/49</sup>* con la proteína C-Lytag de *S. pneumoniae*, ha sido la única vía que ha permitido la expresión y purificación de proteínas recombinantes.

*6. Expression of chimeric proteins generated by fusing genes as-48L<sup>23/24</sup> and as-48L<sup>48/49</sup> with C-Lytag protein from Streptococcus pneumoniae is the only successful pathway used to produce and purify recombinant proteins.*

7. La ulterior proteólisis de las mismas con enteroquinasa para la liberación de las correspondientes proteínas lineales, rindió proteínas híbridas de mayor Pm (17861,75 Da) que presentaban actividad antibacteriana.

*7. Enterokinase cleavage of fusion proteins rendered hybrid proteins with an Mw higher than expected (17861.75 Da), which exhibited antibacterial activity.*



## ***Bibliografía***





**Abriouel, H., Lucas, R., Ben Omar, N., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A.** 2005. Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by the food isolate *Enterococcus faecium* RJ16. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**: 383-397.

**Abriouel, H., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E.**, 2002. Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1473-1477.

**Abriouel, H., Sánchez-González, J., Maqueda, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Gálvez-Ruiz, M.** 2001a. Monolayer characteristics of bacteriocin AS-48, pH effect and interactions with dipalmitoyl phosphatidic acid at the air-water interface. *J. Colloid. Interface Sci.* **233**: 306-312.

**Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A., Maqueda, M.** 1998. Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4623-4626.

**Abriouel, H., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Gálvez, A.** 2003. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *J. Microbiol. Methods.* **55**: 599-605.

**Aguirre, M., Collins, M.D.** 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 95-107.

**Albericio, F., Chinchilla, R., Dodsworth, D.J., Najera, C.** 2001. New trends in peptide coupling reagents. *Org. Prep. Proc. Int.* **33**: 203-303.

**Allaker, R.P.** 2008. Host defence peptides –a bridge between the innate and adaptive immune responses. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **102**: 3-4.

**Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Valdivia, E.** 2005c. Synergistic effect on enterocin AS-48 in combination with outer membrane permeabilizing treatments against *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 1364-1372.

**Ananou, S., Garriga, M., Hugas, M., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Valdivia, E.** 2005a. Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* **103**: 179-190.

**Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Valdivia., E.** 2005b. Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Sci.* **71**: 549-556.

**Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Valdivia, E.** 2007. Bactericidal synergism through enterocin AS-48 and Chemicals preservatives against *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**: 19-23.

**Ananou, S., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Maqueda, M.** 2004. Effect of combined physico-chemical preservatives on enterocin AS-48 activity against the enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* CECT 976 strain. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 48-56.

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

**Andersson, M., Curstedt, T., Jörnvall, H., Johansson, J.** 1995. An amphipathic helical motif common to tumorolytic polypeptide NK-lysin and pulmonary surfactant polypeptide SP-B. *FEBS Lett.* **362**: 328-332.

**Andersson, M., Gunne, H., Agerberth, B., Boman, A., Bergman, T., Sillard, R., Jörnvall, H., Mutt, V., Olsson, B., Wigzell, H.** 1995. NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *EMBO J.* **14**: 1615-1625.

**Arai, M., Kuwajima, K.** 2000. Role of the molten globule state in protein folding. *Adv. Protein Chem.* **53**: 209-282.

**Arnau, J., Hjerl-Hansen, E., Israelsen, H.** 1997. Heterologous gene expression of bovine plasmin in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 331-338.

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

**Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.** 2002. Short protocols in molecular biology. *Ed.* Ausubel, F.M. et al. John Wiley & Sons, Inc. USA.

**Åvall-Jääskeläinen, S., Kylä-Nikkilä, K., Kahala, M., Miikkulainen-Lahti, T., Palva, A.** 2002. Surface display of foreign epitopes on the *Lactobacillus brevis* S-layer. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5943-5951.

**Babasaki, K., Takao, T., Shimonishi, Y., Kurahashi, K.** 1985. Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J. Biochem.* **98**: 585-603.

**Baca, A.M., Hol, W.G.J.** 2000. Overcoming codon bias: a method for high-level overexpression of *Plasmodium* and other AT-rich parasite genes in *Escherichia coli*. *Int. J. Parasitol.* **30**: 113-118.

**Bachere, E.** 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: Potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture* **227**: 427-438.

**Bachmair, A., Finley, D., Varshavsky, A.** 1986. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**: 179-186

**Baird, G.S., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y.** 1999. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 11241-11246.

**Baldwin, R.L., Rose, G.D.** 1999. Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 77-83.

**Baneyx, F., Georgiou, G.** 1992. Degradation of secreted proteins in *Escherichia coli*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **13**: 301-308.

**Baneyx, F., Mujacic, M.** 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**: 1399-1408.

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

**Bayley, P.M.** 1980. En: Brown, S.B. (Ed). An introduction to spectroscopy for biochemists. London: Academic Press. p. 148.

**Bayro, M.J., Mukhopadhyay, J., Swapna, G.V., Huang, J.Y., Ma, L.C., Sineva, E., Dawson, P.E., Montelione, G.T., Ebright, R.H.** 2003. Structure of antibacterial peptide microcin J25: a 21-residue lariat protoknot. J. Am. Chem. Soc. **125**: 12382-12383.

**Bechinger, B., Zasloff, M., Opella, S.J.** 1993. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. Protein Sci. **2**: 2077-2084.

**Beernink, P.T., Yang, Y.R., Graf, R., King, D.S., Shah, S.S., Schachman, H.K.** 2001. Random circular permutation leading to chain disruption within and near alpha helices in the catalytic chains of aspartate transcarbamoylase: effects on assembly, stability, and function. Protein Sci. **10**: 538-537.

**Benincasa, M., Skerlavaj, B., Gennaro, R., Pellegrini, A., Zanetti, M.** 2003. In vitro and in vivo antimicrobial activity of two alpha-helical cathelicidin peptides and of their synthetic analogs. Peptides. **24**: 1723-1731.

**Bera, A., Singh, S., Nagaraj, R., Vaidya, T.** 2003. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. Mol. Biochem. Parasitol. **127**: 23-35.

**Betton, J.M., Sassoon, N., Hofnung, M., Laurent, M.** 1998. Degradation versus aggregation of misfolded maltose-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **273**: 8897-8902.

**Bhunja, A.K., Bhowmik, T.K., Johnson, M.G.** 1994. Determination of bacteriocin encoding plasmids of *Pediococcus acidilactici* strains by Southern hybridization. Lett. Appl. Microbiol. **18**: 168-170.

**Bhunja, A.K., Johnson, M.C., Ray, B.** 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Ind. Microbiol. **2**: 319-322.

**Biet, F., Berjeaud, J.M., Worobo, R.W., Cenatiempo, Y., Fremaux, C.** 1998. Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway. *Microbiology* **144**: 2845-2854.

**Billman-Jacobe, H.** 1996. Expression in bacteria other than *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 500-504.

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

**Blank, A., R.H. Sugiyama, C.A. Dekker.** 1982. Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: use of aqueous isopropanol to remove detergent from gels. *Anal. Biochem.* **120**: 267-275.

**Blond, A, Cheminant, M., Destoumieux-Garzón, D., Ségalas-Milazzo, I., Peduzzi, J., Goulard, C., Rebuffat, S.** 2002. Thermolysin-linearized microcin J25 retains the structured core of the native macrocyclic peptide and displays antimicrobial activity. *Eur. J. Biochem.* **269**: 6212-6222.

**Blond, A., Peduzzi, J., Goulard, C., Chiuchiolo, M.J., Barthelemy, M., Prigent, Y., Salomon, R.A., Farias, R.N., Moreno, F., Rebuffat, S.** 1999. The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. *S. Eur. J. Biochem.* **259**: 747-755.

**Boissinot, M., Karnas, S., Lepock, J.R., Cabelli, D.E., Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Hallewell, R.A.** 1997. Function of the Greek key connection analysed using circular permutants of superoxide dismutase. *EMBO J.* **16**: 2171-2178.

**Boman, H.G.** 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Ann. Rev. Immunol.* **13**: 61-92.

**Bond, J.S.** 1990. Commercially available proteases. In: *Proteolytic Enzymes: A practical approach*. Beynon, R.J., Bond, J.S. (Eds.) pp 232-240. IRL Press, Oxford.

**Bourne, G.T., Golding, S.W., McGeary, R.P., Meutermans, W.D.F., Jones, A., Marshall, G.R., Alewood, P.F., Smythe, M.L.** 2001.

Development and application of a novel safety catch linker for Boc-based assembly of libraries of cyclic peptides. *J. Org. Chem.* **66**: 7706-7713.

**Bowdish, D.M., Davidson, D.J., Lau, Y.E., Lee, K., Scott, M.G., Hancock, R.E.** 2005. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J. Leukoc. Biol.* **77**: 451-459.

**Bowles, D.J., Marcus, S.E., Pappin, D.J., Findlay, J.B., Eliopoulos, E., Maycox, P.R., Burgess, J.** 1986. Posttranslational processing of concanavalin A precursors in jackbean cotyledons. *J. Cell Biol.* **102**: 1284-1297

**Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

**Brahmachary, M., Krishnan, S.P., Koh, J.L., Khan, A.M., Seah, S.H., Tan, T.W., Brusic, V., Bajic, V.B.** 2004. ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Res.* **32**: 586-589.

**Breslauer, K.J., Frank, R., Blöcker, H., Marky, L.A.** 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3746-3750.

**Brewer, D., Hunter, H., Lajoie, G.** 1998. NMR studies of the antimicrobial salivary peptides histatin 3 and histatin 5 in aqueous and nonaqueous solution. *Biochem Cell Biol* **76**: 247-256.

**Broadbent, J.R., Chou, Y.C., Gillies, K., Kondo, J.K.** 1989. Nisin inhibits several Gram-positive, mastitis-causing pathogens. *J. Dairy Sci.* **72**: 3342-3345.

**Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., Samblanx, G.W., Osborn, R.W.** 1997. Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant. Sci.* **16**: 297-323.

**Brogden, K.A.** 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 238-250.

**Brogden, K.A., Heidari, M., Sacco, R.E., Pamquist, D., Guthmiller, J.M., Johnson, G.K., Jia, H.P., Tack, B.F., McCray P.B.** 2003. Defensin-

induced adaptive immunity in mice and its potential in preventing periodontal disease. *Oral Microbiol. Immunol.* **18**: 95-99.

**Bulet, P., Stocklin, R., Menin, L.** 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* **198**: 169-184.

**Campbell, D., Downing, A.K.** 1994. Building protein structure and function from modular units. *Trends Biotechnol.* **12**: 168-174.

**Capstick, D.S., Willey, J.M., Buttner, M.J., Elliot, M.A.** 2007. SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **64**: 602-613.

**Casadaban, M.J., Cohen, S.N.** 1980. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**: 179-207.

**Castle, M., Nazarian, A., Yi, S.S., Tempst, P.** 1999. Lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets. *J. Biol. Chem.* **274**: 32555-32564.

**Cebolla, A., Royo, J.L., De Lorenzo, V., Santero, E.** 2002. Improvement of recombinant protein yield by a combination of transcriptional amplification and stabilization of gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5034-5041.

**Cemazar, M., Craik, D.J.** 2006. Factors influencing the stability of cyclotides: proteins with a circular backbone and cystine knot motif. *Int. J. Pept. Protein Res.* **12**: 253-260.

**Chamberlin, M., McGrath, J., Waskell, L.** 1970. New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. *Nature* **228**: 227-231.

**Chatel, J.M., Langella, P., Adel-Patient, K., Commissaire, J., Wal, J.M., Corthier, G.** 2001. Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**: 545-551.

**Chen, H., Hoover, D.G.** 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2**: 81-100.

**Chen, Y.Q., Zhang, S.Q., Li, B.Q., Qiu, W., Jiao, B., Zhang, J., Diao, Z.** 2007. Expression of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in



*Escherichia coli* using two fusion partners. *Protein Expr. Purif.* **57**: 303-311.

**Chmiel, D.** 2001. Mode of action of antimicrobial peptides. *Adv. Cell Biol.* **16**: 261-73.

**Chong, B.F., Nielsen, L.K.** 2003. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidermicus*. *J. Biotechnol.* **100**: 33-41.

**Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H., Xu, M.Q.** 1997. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene* **192**: 277-281.

**Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F., Havarstein, L.S.** 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* **180**: 1988-1994.

**Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**: 1-20.

**Cobos, E.S., Filimonov, V.V., Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Martínez, J.C., Mateo, P.L.** 2001. AS-48: a circular protein with an extremely stable globular structure. *FEBS Lett.* **505**: 379-382.

**Cobos, E.S., Filimonov, V.V., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez, J.C., Mateo, P.L.** 2002. The denaturation of circular enterocin AS-48 by urea and guanidinium hydrochloride. *Biochim. Biophys. Acta.* **1598**: 98-107.

**Cole, A.M., Hong, T., Boo, L.M., Nguyen, T., Zhao, C., Bristol, G., Zack, J.A., Waring, A.J., Yang, O.O., Lehrer, R.I.** 2002. Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 1813-1818.

**Cole, A.M., Wabg, W., Waring, A.J., Lehrer, R.I.** 2004. Retrocyclins: using past as prologue. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **5**: 365-372.

**Colgrave, M.L., Craik, D.J.** 2004. Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. *Biochemistry* **43**: 5965-5975.

**Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W., Wingfield, P.T.** 1999. Current protocols in protein science. *Ed.* Virginia Benson Chanda. John Wiley & Sons, Inc. USA.

**Cooper, D.G.** 1983. Biosurfactants. *Microbiol. Sci.* **3**: 145-149.

**Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P.** 2005a. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Curr. Protein. Pept. Sci.* **6**: 61-75.

**Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P.** 2005b. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 777-788.

**Craik, D.J.** 2001. Plant cyclotides: circular, knotted peptide toxins. *Toxicon.* **39**: 1809-1813.

**Craik, D.J., Cemazar, M., Wang, C.K.L., Daly, N.L.** 2006. The Cyclotide Family of Circular Mini-Proteins: Nature's combinatorial peptide template. *Biopolymers.* **84**: 250-266.

**Craik, D.J., Daly, N.L., Bond, T., Waine, C.** 1999. Plant cyclotides: a unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J. Mol. Biol.* **294**: 1327-1336.

**Craik, D.J., Daly, N.L., Mulvenna, J., Plan, M.R., Trabi, M.** 2004. Discovery, structure and biological activities of the cyclotides. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **5**: 297-315.

**Craik, D.J., Daly, N.L., Saska, I., Trabi, M., Rosengren, K.J.** 2003. Structures of naturally occurring circular proteins from bacteria. *J. Bacteriol. Review* **185**: 4011-4021.

**Crandall, A.D., Montville, T.J.** 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 231-237.

**Daly, N.L., Craik, D.J.** 2000. Acyclic permutants of naturally occurring cyclic proteins: characterization of cystine knot and  $\beta$ -sheet

formation in the macrocyclic polypeptide Kalata B1. *J. Biol. Chem.* **275**: 19068-19075.

**Daly, N.L., Koltay, A., Gustafson, K.R., Boyd, M.R., Casas-Finet, J.R., Craik, D.J.** 1999a. Solution structure by NMR of Circulin A: a macrocyclic knotted peptide having anti-HIV activity. *J. Mol. Biol.* **285**: 333-345.

**Daly, N.L., Love, S., Alewood, P.F., Craik, D.J.** 1999b. Chemical synthesis and folding pathway of large cyclic polypeptides: studies of the cystine knot polypeptide Kalata B1. *Biochemistry.* **38**: 10606-10614.

**Dalzoppo, D., Vita, C., Fontana, A.** 1985. Folding of thermolysin fragments: identification of the minimum size of a carboxyl-terminal fragment that can fold into a stable native like structure. *J. Mol. Biol.* **182**: 331-340.

**Danders, W., Marahiel, M.A., Krause, M., Kosui, N., Kato, T., Izumiya, N., Kleinkauf, H.** 1982. Antibacterial action of gramicidin S and tyrocidines in relation to active transport, in vitro transcription, and spore outgrowth. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**: 785-790.

**Darby, N.J., Kemmink, J., Creighton, T.E.** 1996. Identifying and characterizing a structural domain of protein disulfide isomerase. *Biochemistry* **35**: 10517-10528.

**David, R., Ritcher, M.P.O., Beck-Sickinger, A.G.** 2004. Expressed protein ligation. *Eur. J. Biochem.* **271**: 663-677.

**Davies, J.S.** 2003. The cyclization of peptides and depsipeptides. *J. Pept. Sci.* **9**: 471-501.

**Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I., Kent, S.B.H.** 1994. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **266**: 776-779.

**De Ruyter, P.G., Kuipers, O.P., Beerthuyzem, M.M., van Alen-Boerringter, I., de Vos, W.M.** 1996. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **178**: 3434-3439.

**De Vuyst, L., Foulquié-Moreno, M.R., Revets, H.** 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* **84**: 299-318.

**De Vos, W.M., Simons, G.F.M.** 1994. Gene cloning and expression systems in Lactococci.. In: Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. M.J. Gasson, W.M. de Vos. Blackie (Eds). Chapter 2, pp 52-105

**Dennison, S.R., Harris, F., Phoenix, D.A.** 2005b. Are oblique orientated  $\alpha$  -helices used by antimicrobial peptides for membrane invasion?. *Prot. Pept. Lett.* **12**: 31-39.

**Dennison, S.R., Wallace, J., Harris, F., Phoenix, D.A.** 2005a. Amphiphilic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. *Prot. Pept. Lett.* **12**: 27-29.

**Deshayes, S., Heitz, A., Morris, M.C., Charnet, P., Divita, G., Heitz, F.** 2004. Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis. *Biochemistry* **43**: 1449–1457.

**Deshayes, S., Morris, M.C., Divita, G., Heitz, F.** 2006a. Interactions of amphipathic carrier peptides with membrane components in relation with their ability to deliver therapeutics. *J. Pept. Sci.* **12**: 758-765.

**Deshayes, S., Plénat, T., Charnet, P., Divita, G., Molle, G., Heitz, F.** 2006b. Formation of transmembrane ionic channels of primary amphipathic cell-penetrating peptides. Consequences on the mechanism of cell penetration. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**: 1846-1851.

**Díaz, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Fernández, M., Soler-González, A.S., Ramírez-Rodrigo, H., Maqueda, M.** 2003. Characterization of a new operon, *as-48EFGH*, from the *as-48* gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1229-1236.

**Diep, D.B., Nes, I.F.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram-positive bacteria. *Curr. Drug Targets.* **3**: 107-122.

**Dieye, Y., Usay, S., Clier, F., Gruss, A., Piard, J.C.** 2001. Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* **183**: 4157-4166.

**Dill, K.A., Chan, H.S.** 1997. From Levinthal to pathways to funnel. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 10-19.

**Dobson, C.M.** 2003. Protein folding and disease: A view from the first Horizon Symposium. *Nature Rev. Drug Discov.* **2**: 154-160.

**Dodd, H.M., Horn, N., Chan, W.C., Giffard, C.J., Bycroft, B.W., Roberts, G.C.K., Gasson, M.** 1996a. Molecular analysis of the regulation of nisin immunity. *Microbiology.* **142**: 2385-2392.

**Dodd, H.M., Horn, N., Giffard, C.J., Gasson, M.J.** 1996b. A gene replacement strategy for engineering nisin. *Microbiology* **142**: 47-55.

**Dodd, H.D., Horn, N., Hao, Z., Gasson, M.J.** 1992. A lactococcal expression system for engineered nisins. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3683-3693.

**Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S.D., Renault, P.** 2000. Expression of the *Staphylococcus hyicus* lipase in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 588-598.

**Duitman, E.H., Hamoen, L.W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., Vater, J.** 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 13294-13299.

**Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, C.M., Obradovic, Z.** 2002. Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* **41**: 6573-6580.

**Dunker, A.K., Obradovic, Z.** 2001. The protein trinity: linking function and disorder. *Nat. Biotechnol.* **19**: 805-806.

**Dutton, J.L., Renda, R.F., Waine, C., Clark, R.J., Daly, N.L., Jennings, C.V., Anderson, M.A., Craik, D.J.** 2004. Conserved structural

and sequence elements implicated in the processing of gene-encoded circular proteins. *J. Biol. Chem.* **29**: 46858-46867.

**Ehrenstein, G., Lecar, H.** 1977. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* **10**: 1-34.

**Eichenbaum, Z., Federle, M.J., Marra, D., de Vos, W.M., Kuipers, O.P., Kleerebezem, M., Scott, J.R.** 1998. Use of the lactococcal *nisA* promoter to regulate gene expression in Gram-positive bacteria: comparison of induction level and promoter strength. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2763-2769.

**Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lurz, R., Lanka, E.** 2000. Maturation of IncP pilin precursors resembles the catalytic dyad-like mechanism of leader peptidases. *J. Bacteriol.* **182**: 6751-6761.

**Eliezer, D., Wright, P.E.** 1996. Is apomyoglobin a molten globule? Structural characterization by NMR. *J. Mol. Biol.* **263**: 531-538.

**Eliezer, D., Yao, J., Dyson, H.J., Wright, P.E.** 1998. Structural and dynamic characterization of partially folded states of apomyoglobin and implications for protein folding. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 148-155.

**Ellison, R.T., Giehl, T.J.** 1991. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.* **88**: 1080-1091.

**Enouf, V., Langella, P., Commissaire, J., Cohen, J., Corthier, G.** 2001. Bovine rotavirus non-structural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1423-1428.

**Epand, R.M., Vogel, H.J.** 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta.* **1462**: 11-28.

**Falla, T.J., Karunaratne, D.N., Hancock, R.E.W.** 1996. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J. Biol. Chem.* **271**: 19298-19303.

**Falnes, P.Ø., Olsnes, S.** 1998. Modulation of the intracellular stability and toxicity of diphtheria toxin through degradation by the N-end rule pathway. *EMBO J.* **17**:615-625

**Fath, M.J., Kolter, R.** 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev. Review.* **57**: 995-1017.

**Fath, M.J., Zhang, L.H., Rush, J., Kolter, R.** 1994. Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants. *Biochem.* **33**: 6911-6917.

**Felizmenio-Quimio, M.E., Daly, N.L., Craik, D.J.** 2001. Circular proteins in plants: solution structure of a novel macrocyclic trypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis*. *J. Biol. Chem.* **276**: 22875-22882.

**Fernández, L., Delgado, S., Maldonado, A., Rodríguez, J.M.** 2008a. The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. *J. Human Lact.*, en prensa.

**Fernández, M., Martínez-Bueno, M., Martín, M.C., Valdivia, E., Maqueda, M.** 2007. Heterologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 1350-1361.

**Fernández, M., Sánchez-Hidalgo, M., García-Quintáns, N., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., López, P., Maqueda, M.** 2008b. Processing of *as-48ABC* RNA in AS-48 enterocin production by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **190**: 240-250.

**Fiedler, S., Wirth, R.** 1991. Transformation of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* by electroporation. In: *Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci*. Dunny, G.M., Clearly, P.P., McKay, L.L. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 301.

**Fimland, G., Eijsink, V.G.H., Nissen Meyer, J.** 2002. Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. *Biochemistry.* **41**: 9508-9515.

**Fink, A.L.** 1998. Protein aggregation: Folding intermediates, inclusion bodies and amyloid. *Folding Des.* **3**: 9-23.

**Finlay, B.B., Hancock, R.E.** 2004. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 497-504.

**Fjell, C.D., Hancock, R.E., Cherkasov, A.** 2007. AMPer: a database and an automated discovery tool for antimicrobial peptides. *Bioinformatics* **23**: 1148-1155.

**Floriano, B., Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R.** 1998. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4883-4890.

**Folli, C., Ramazzina, I., Arcidiaco, P., Stoppini, M., Berni, R.** 2003. Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. *FEMS Microbiol. Lett.* **221**: 143-149.

**Fontaine, L., Boutry, C., Guédon, E., Guillot, A., Ibrahim, M., Grossiord, B., Hols, P.** 2007. Quorum-sensing regulation of the production of Blp bacteriocins in *Streptococcus termophilus*. *J. Bacteriol.* **189**: 7195-7205.

**Fontana, A., Fassina, G., Vita, C., Dalzoppo, D., Zamai, M., Zambonin, M.** 1986. Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin. *Biochemistry.* **25**: 1847-1851.

**Fontana, A., Polverino de Laureto, P., De Filippis, V.** 1993. Molecular aspects of proteolysis of globular proteins. In: *Protein Stability and Stabilization*, van den Tweel W, Harder A, Buitelear M, (Eds.) pp 101-110. Elsevier Science Publ, Amsterdam.

**Fontana, A., Polverino de Laureto, P., De Filippis, V., Scaramella, E., Zambonin, M.** 1997a. Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. *Folding Des.* **2**: 17-26.

**Fontana, A., Polverino de Laureto, P., De Filippis, V., Scaramella, E., Zambonin, M.** 1999. Limited proteolysis in the study of protein conformation. In: *Proteolytic enzymes: Tools and targets*. Sterchi, EE., Stöcker, W. (Eds.) pp 257-84. Springer Verlag, Heidelberg.

**Fontana, A., Polverino de Laureto, P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P., Zambonin, M.** 2004. Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim. Polon.* **51**: 299-321.



**Fontana, A., Zambonin, M., Polverino de Laureto, P., De Filippis, V., Clementi, A., Scaramella, E.** 1997b. Probing the conformational state of apomyoglobin by limited proteolysis. *J. Mol. Biol.* **266**: 223-30.

**Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E.** 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* **47**: 1-24.

**Franz, C.M., van Belkum, M.J., Holzapfel, W.H., Abriouel, H., Gálvez, A.** 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**: 293-310.

**Frechet, D., Guitton, J.D., Herman, F., Faucher, D., Helynck, G., Monegier du Sorbier, B., Ridoux, J.P., James-Surcouf, E., Vuilhorgne, M.** 1994. Solution structure of RP 71955, a new 21 amino acid tricyclic peptide active against HIV-1 virus. *Biochemistry.* **33**: 42-50.

**Fujimoto, S., Ike, Y.** 2001. pAM401-based shuttle vectors that enable overexpression of promoterless genes and one-step purification of tag fusion proteins directly from *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1262-1267.

**Gallo, R.L., Murakami, M., Ohtake, T., Zaiou, M.** 2002. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**: 823-831.

**Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Ben Omar, N.** 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **120**: 51-70.

**Gálvez, A., Giménez-Gallego, G., Maqueda, M., Valdivia, E.** 1989a. 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., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E.** 1989b. 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., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E.** 1991. Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial

membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **173**: 886-892.

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

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

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

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

**Gálvez, A., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M.** 1990. Induction of autolysis in *Enterococcus faecalis* S-47 by peptide AS-48. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 406-413.

**Ganz, T.** 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Rev. Immunol.* **3**: 710-720.

**Ganz, T., Lehrer, R.I.** 1998. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 41-44.

**Ganz, T., Lehrer, R.I.** 1999. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol. Med. Today.* **5**: 292-297.

**Ganz, T., Selsted, M.E., Lehrer, R.I.** 1990. Defensins. *Eur. J. Haematol.* **44**: 1-8.

**Garrett, J.B., Mullins, L.S., Raushel, F.M.** 1996. Are turns required for the folding of ribonuclease T1? *Protein Sci.* **5**: 204-211.

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

**Gasser, F.** 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur.* **92**: 45-67.

**Gasson, M.J., Anderson, P.H.** 1985. High copy number plasmid vectors for use in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**: 193-196.

**Gennaro, R., Zanetti, M., Benincasa, M., Podda, E., Miani, M.** 2002. Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 763-778.

**Ghriari, T., Manai, M., Berjeaud, J.M., Frère, J.** 2004. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 621-628.

**Giacometti, A., Cirioni, O., Ghiselli, R., Mocchegiani, F., D'Amato, G., Del Prete, M.S., Orlando, F., Kamysz, W., Lukasiak, J., Saba, V., Scalise, G.** 2003. Administration of protegrin peptide IB-367 to prevent endotoxin induced mortality in bile duct ligated rats. *Gut.* **52**: 874-878.

**Giglione, C., Boularot, A., Meinel, T.** 2004. Protein N-terminal methionine excision. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**: 1455-1474.

**Gill, S.C., von Hippel, P.H.** 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**: 319-326.

**Gold, L., Stormo, G.D.** 1990. High-level translation initiation. *Methods Enzymol.* **185**: 89-93.

**Goldberg, A.L.** 1992. The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur. J. Biochem.* **203**: 9-23.

**Goldberg, A.L.** 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**: 895-899.

**Goldberg, A.L., Goff, S.A.** 1986. The selective degradation of abnormal proteins in bacteria, p. 287-314. *In* W. Reznikoff and L. Gold (ed.), *Maximizing gene expression*. Butterworths, Boston.

**Gomori, after Sørensen.** 1955. *Data for Biochemical Research*. Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Ellioy, W.H., Jones, K.M.(Eds.) 1986. 3<sup>a</sup> Ed. Oxford Science Publications, N.Y. *Meth. Enzymol.* **1**: 143.

**González, C., Langdon, G.M., Bruix, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., Rico, M.** 2000. Bacteriocin AS-48, a cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97**: 11221-11226.

**Göransson, U., Svängård, E., Claeson, P., Bohlin, L.** 2004. Novel strategies for isolation and characterization of cyclotides: the discovery of bioactive macrocyclic plant polypeptides in the Violaceae. Curr. Prot. Pept. Sci. **5**: 317-329.

**Gordon, Y.J., Romanowski, E.G., Dermott, E.G.** 2005. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. Curr. Eye Res. **30**: 505-515.

**Gottesman, S.** 1990. Minimizing proteolysis in *Escherichia coli*: genetic solutions. Methods Enzymol. **185**: 119-129.

**Gottesman, S.** 2003. Proteolysis in bacterial regulatory circuits. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **19**: 565-587.

**Gottesman, S., Wickner, S., Maurizi, M.R.** 1997. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. Genes Dev. **11**: 815-823.

**Gouaux, E.** 1997. Channel-forming toxins: tales of transformation. Curr. Opin. Struct. Biol. **7**: 566-573.

**Gran, L.** 1970. An oxytocin principle found in *Oldenlandia affinis* DC. An indigenous, Congolese drug “Kalata-Kalata” used to accelerate delivery. Meddelsem fra Norsk Farmaceutisk selskap **32**: 173-180.

**Gran, L.** 1973. On the effect of a polypeptide isolated from “Kalata-Kalata” (*Oldenlandia affinis* DC) on the oestrogen dominated uterus. Acta Pharmacol. Toxicol. **33**: 400-408.

**Grande, M. J., Lucas, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Valdivia, E., Gálvez A.** 2005a. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. Int. J. Food Microbiol. **104**: 289-297.

**Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A.**

2005b. Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 185-194.

**Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A.** 2006a. Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 185-194.

**Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A.** 2006b. Inhibition of *Bacillus licheniformis* LMG 19409 from ropy cider by enterocin AS-48. *J. Appl. Microbiol.* **101**: 422-428.

**Gratia, A.** 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Comp. Rend. Soc. Biol.* **93**: 1040-1041.

**Gratia, A., Fredericq, P.** 1946. Diversité des souches antibiotiques de *E. coli* et étendue variable de leur champs d'action. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **1**: 130-139.

**Gross, G.** 1989. High-level gene expression in *Escherichia coli*. *Chimicaoggi March*: 21-29

**Gross, E., Kiltz, H.H., Nebelin, E.** 1973. Subtilin, VI: the structure of subtilin. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **354**: 810-812.

**Gruber, C.W., Cemazar, M., Clark, R.J., Horibe, T., Renda, R.F., Anderson, M.A., Craik, D.J.** 2007. A novel plant protein disulfide isomerase involved in the oxidative folding of cystine knot defense proteins. *J. Biol. Chem.* **282**: 20435-20446.

**Guillon, A.D., Saska, I., Jennings, C.V., Guarino, R.F., Craik, D.J., Anderson, M.A.** 2008. Biosynthesis of circular proteins in plants. *Plant J.* **53**: 505-515.

**Gustafson, K.R., Sowder, R.C., Henderson, L.E., Parsons, I.C., Kashman, Y., Cardellina, J.H., McMahan, J.B., Buckheit, Jr. R.W., Pannell, L.K., Boyd, M.R.** 1994. Circulins A and B: novel HIV-inhibitory macrocyclic peptides from the tropical tree *Chassalia parvifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 9337-9338.

**Haase, J., Lurz, R., Grahn, A.M., Bamford, D.H., Lanka, E.** 1995. Bacterial conjugation mediated by plasmid RP4: RSF1010 mobilization, donor-specific phage propagation, and pilus production require the same Tra2 components of a proposed DNA transport complex. *J. Bacteriol.* **177**: 4779-4791.

**Hale, J.D., Hancock, R.E.** 2007. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* **5**: 951-959.

**Halskau, O., Underhaug, J., Frøystein, N.A., Martínez, A.** 2005. Conformational flexibility of alpha-lactalbumin related to its membrane binding capacity. *J. Mol. Biol.* **349**: 1072-1086.

**Hamilton-Miller, J.M.** 2004. Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe. *Int. J. Antimicrob. Agents* **23**: 209-212.

**Hancock, R.E., Chapple, D.S.** 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1317-1323.

**Hancock, R.E.W., Diamond, G.** 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* **8**: 402-410.

**Hancock, R.E.W., Lehrer, R.** 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* **16**: 82-88.

**Hansen, J.N.** 1993. Antibiotics synthesized by posttranslational modifications. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**: 535-564.

**Harwig, S.S.L., Kokryakov, V.N., Swiderek, K.M., Aleshina, G.M., Zhao, C., Lehrer, R.I.** 1995. Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *FEBS Lett.* **362**: 65-69.

**Havarstein, L.S., Diep, D.B., Nes, I.F.** 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* **16**: 229-240.

**Hecht, O., Van Nuland, N.A., Schleinkofer, K., Dingley, A.J., Bruhn, H., Leippe, M., Grötzinger, J.** 2004. Solution structure of the

pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*. J. Biol. Chem. **279**: 17834-17841.

**Hegde, R.S., Bernstein, H.D.** 2006. The surprising complexity of signal sequences. Trends Biochem. Sci. **31**: 563-571.

**Heinemann, U., Hahn, M.** 1995. Circular permutation of polypeptide chains: implications for protein folding and stability. Prog. Biophys. Mol. Biol. **64**: 121-143.

**Heitz, A., Hernandez, J.F., Gagnon, J., Hong, T.T., Pham, T.T., Nguyen, T.M., Le-Nguyen, D., Chiche, L.** 2001. Solution structure of the squash trypsin inhibitor MCoTI-II. A new family for cyclic knottins. Biochemistry. **40**: 7973-7983.

**Helmerhorst, E.J., Breeuwer, P., van't Hof, W., Walgreen-Weterings, E., Oomen, L.C., Veerman, E.C., Amerongen, A.V., Abee, T.** 1999. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. J. Biol. Chem. **274**: 7286-7291.

**Henderson, J.T., Chopko, A.L., Wassenaar, P.D.** 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1. Arch. Biochem. Biophys. **295**: 5-12.

**Heng, N.C., Burthenshaw, G.A., Jack, R.W., Tagg, J.R.** 2007. Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 7763-7766.

**Heng, N.C.K., Tagg, J.R.** 2006. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. Nat. Rev. Microbiol. **4** (doi:10.1038/nrmicro1273-c1).

**Heng, N.C.K., Wescombe, P.A., Burton, J.P., Jack, R.W., Tagg, J.R.** 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-positive Bacteria. In: Bacteriocins. Ecology and Evolution. Riley M.A. y Chavan M.A. (eds). Springer. Heidelberg, Germany.

**Henriques, S.T., Castanho, M.A.** 2004. Consequences of nonlytic membrane perturbation to the translocation of the cell penetrating peptide pep-1 in lipidic vesicles. Biochemistry **43**: 9716-9724.

**Henriques, S.T., Melo, M.N., Castanho, M.A.** 2006. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochem. J.* **399**: 1-7.

**Herbst, R., Ott, C., Jacobs, T., Marti, T., Marciano-Cabral, F., Leippe, M.** 2002. Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *J. Biol. Chem.* **21**: 22353-22360.

**Herschlag, D.** 1988. The role of induced fit and conformational changes of enzymes in specificity and catalysis. *Bioorganic Chem.* **16**: 62-69.

**Hernández, J.F., Gagnon, J., Chiche, L., Nguyen, T.M., Andrieu, J.P., Heitz, A., Trinh, H.T., Pham, T.T., Le Nguyen, D.** 2000. Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. *Biochemistry* **39**: 5722-5730.

**Higazi, A.A.R., Ganz, T., Kariko, K., Cines, D.B.** 1996. Defensin modulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen binding to fibrin and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 17650-17655.

**Higgins, C.F., Hiles, I.D., Salmond, G.P., Gill, D.R., Downie, J.A., Evans, I.J., Holland, I.B., Gray, L., Buckel, S.D., Bell, A.W., Hermodson, M.A.** 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**: 448-450.

**Higuchi, R., Krummel, B., Saiki, R.** 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7351-7367.

**Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.

**Hockney, R.C.** 1994. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **12**: 456-463

**Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Ezekowitz, R.A.B.** 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**: 1313-1318.



**Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S., Nes, I.F.** 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiol.* **147**: 643-651.

**Holzappel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U.** 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* **24**: 343-362.

**Hong, Y.R., Mullaney, J.M., Black, L.W.** 1995. Protection from proteolysis using a T4::T7-RNAP phage expression-packaging-processing system. *Gene* **162**: 5-11.

**Horn, N., Martínez, M.I., Martínez, J.M., Hernández, P.E., Gasson, M.J., Rodríguez, J.M., Dodd, H.M.** 1999. Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4443-4450.

**Hu, D., Qin, Z., Xue, B., Fink, A.L., Uversky, V.N.** 2008. Effect of methionine oxidation on the structural properties, conformational stability, and aggregation of immunoglobulin light chain LEN. *Biochemistry* **47**: 8665-8677.

**Hubbard, S.J.** 1998. The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1382**: 191-206.

**Hubbard, S.J., Eisenmenger, F., Thornton, J.M.** 1994. Modeling studies of the change in conformation required for cleavage of limited proteolytic sites. *Protein Sci.* **3**: 757-768.

**Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H.G.** 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* **106**: 7-16.

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

**Hwang, B.J., Park, W.J., Chung, C.H., Goldberg, A.L.** 1987. *Escherichia coli* contains a soluble ATP-dependent protease (Ti) distinct from protease La. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5550-5554.

**Ingham, A.B., Sproat, K.W., Tizard, M.L.V., Moore, R.J.** 2005. A versatile system for the expression of non-modified bacteriocins in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* **98**: 676-683

**Ireland, D.C., Colgrave, M.L., Nguyencong, P., Daly, N.L., Craik, D.J.** 2006. Discovery and characterization of a linear cyclotide from *Viola odorata*: implications for the processing of circular proteins. *J. Mol. Biol.* **357**: 1522-1535.

**Islam, K., Hawser, S.P.** 1998. MSI-78 (Magainin Pharmaceuticals). I. *Drugs.* **1**: 605-609.

**Iwakura, M., Nakamura, T., Yamane, C., Maki, K.** 2000. Systematic circular permutation of an entire protein reveals essential folding elements. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 580-585.

**Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B.** 1995. Bacteriocins of Gram-positive Bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: 171-200.

**Jennings, C.V., Rosengren, K.J., Daly, N.L., Plan, M., Stevens, J., Scanlon, M.J., Waine, C., Norman, D.G., Anderson, M.A., Craik, D.J.** 2005. Isolation, solution structure, and insecticidal activity of kalata B2, a circular protein with a twist: do Möbius strips exist in nature? *Biochemistry* **44**: 851-860.

**Jennings, C., West, J., Waine, C., Craik, D.J., Anderson, M.** 2001. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 10614-10619.

**Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R.E.** 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 491-511.

**Jiménez, M.A., Barrachi-Saccilotto, A.C., Valdivia, E., Maqueda, M., Rico, M.** 2005. Design, NMR characterization and activity of a 21-residue peptide fragment of bacteriocin AS-48 containing its putative membrane interacting region. *J. Peptide Sci.* **11**: 29-36.

**Joerger, M.C., Klaenhammer, T.R.** 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* **167**: 439-446.

**Johansson, J., Gudmundsson, G.H., Rottenberg, M.E., Berndt, K.D. and Agerberth, B.** 1998. Conformation-dependent antibacterial

activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J. Biol. Chem.* **273**: 3718-3724.

**Jones, A.L., Lai, E.M., Shirasu, K., Kado, C.I.** 1996. VirB2 is a processed pilin-like protein encoded by the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J. Bacteriol.* **178**: 5706-5711.

**Joosten, H.M., Nuñez, M., Devreese, B., Van Beeumen, J., Marugg, J.D.** 1996. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4220-4223.

**Kado, C.I.** 1994. Promiscuous DNA transfer system of *Agrobacterium tumefaciens*: role of the virB operon in sex pilus assembly and synthesis. *Mol. Microbiol.* **12**: 17-22.

**Kagan, B.M., Krevsky, D., Milzer, A., Locke, M.** 1951. Polymyxin B and polymyxin E; clinical and laboratory studies. *J. Lab. Clin. Med.* **37**: 402-414.

**Kalkum, M., Eisenbrandt, R., Lanka, E.** 2004. Protein Circlets as Sex Pilus Subunits. *Curr.Prot. Pept. Sci.* **5**: 417-424.

**Kalkum, M., Eisenbrandt, R., Lurz, R., Lanka, E.** 2002. Tying rings for sex. *Trends Microbiol.* **10**: 382-387.

**Kalmokoff, M.L., Cyr, T.D., Hefford, M.A., Whitford, M.F. Teather, R.M.** 2003. Butyrivibriocin AR10, a new cyclic bacteriocin produced by the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10: characterization of the gene and peptide. *Can. J. Microbiol.* **49**: 763-773.

**Kalmokoff, M.L., Teather, R.M.** 1997. Isolation and characterization of a bacteriocin (butyrivibriocin AR10) from the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10: evidence in support of the widespread occurrence of bacteriocin-like activity among ruminal isolates of *B. fibrisolvens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 394-402.

**Kamysz, W., Okrój, M., Lukasiak, J.** 2003. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim. Pol.* **50**: 461-469.

**Karlea, I., Ranganathan, D.** 2003. Construction of polar and hydrophobic pores and channels by assembly of peptide molecules. *J. Mol. Struct.* **647**: 85-96.

**Karplus, M., Weaver, D.L.** 1976. Protein-folding dynamics. *Nature* **260**: 404-406.

**Katahira, R., Shibata, K., Yamasaki, M., Matsuda, Y., Yoshida, M.** 1995. Solution structure of endothelin B receptor selective antagonist RES-701-1 determined by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Bioorg. Med. Chem.* **3**:1273-1280.

**Katahira, R., Yamasaki, M., Matsuda, Y., Yoshida, M.** 1996. MS-271, a novel inhibitor of calmodulin-activated myosin light chain kinase from *Streptomyces* sp.--II. Solution structure of MS-271: characteristic features of the "lasso" structure. *Bioorg. Med. Chem.* **4**: 121-129.

**Katayama-Fujimura, Y., Gottesman, S., Maurizi, M.R.** 1987. A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**: 4477-4485.

**Kaur, K., Andrew, L.C., Wishart, D.S., Vederas, J.C.** 2004. Dynamic relationships among type IIa bacteriocins: temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic  $\alpha$  helix as a receptor-binding region. *Biochemistry* **43**: 9009-9020.

**Kavanagh, K., Dowd, S.** 2004. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**: 285-289.

**Kawai, Y., Ishii, Y., Uemura, K., Kitazawa, H., Saito, T., Itoh, T.** 2001. *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. *Food Microbiol.* **18**: 407-415.

**Kawai, Y., Ishii, Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., Nishimura, J., Kitazawa, H., Yamazaki, Y., Tateno, Y., Itoh, T., Saito, T.** 2004a. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2906-2911.

**Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J., Saito, T.** 2004b. The Circular Bacteriocins Gassericin A and Circularin A. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **5**: 393-398.

**Kawai, Y., Saito, T., Kitazawa, H., Itoh, T.** 1998. Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C-terminal ends. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 2438-2440.

**Kawai, Y., Saito, T., Toba, T., Samant, S.K., Itoh, T.** 1994. Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**: 1218-1221.

**Kawulka, K., Sprules, T., Diaper, C.M., Whittal, R.M., McKay, R.T., Mercier, P., Zuber, P., Vederas, J.C.** 2004. Structure of Subtilosin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to alpha-carbon cross-links: formation and reduction of alpha-thio-alpha-amino acid derivatives. *Biochemistry* **43**: 3385-3395.

**Kawulka, K., Sprules, T., McKay, R.T., Mercier, P., Diaper, C.M., Zuber, P., Vederas, J.C.** 2003. Structure of subtilosin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 4726-4727.

**Kelly, S.M., Jess, T.J., Price, N.C.** 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1751**: 119-139.

**Kelly, S.M., Price, N.C.** 2000. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **1**: 349-384.

**Kemperman, R., Jonker, M., Nauta, A., Kuipers, O.P., Kok, J.** 2003a. Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5839-5848.

**Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O., Kok, J.** 2003b. Identification and characterization of two novel clostridial

bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1589-1597.

**Klaenhammer, T.R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 39-85.

**Kleerebezem, M.** 2004. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides.* **25**: 1405-1414.

**Kleerebezem, M., Beerthuyzen, M.M., Vaughan, E.E., de Vos, W.M., Kuipers, O.P.** 1997b. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4581-4584.

**Kleerebezem, M., de Vos, W.M., Kuipers, O.P.** 1999. The lantibiotics nisin and subtilin act as an extracellular regulators of their own biosynthesis. In: *Cell-cell signalling in bacteria*. Dunny, G.M., Winams, S.C. (Eds.). A.S.M. Washington, D.C.

**Kleerebezem, M., Quadri, L.E., Kuipers, O.P., de Vos, W.M.** 1997a. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **24**: 895-904.

**Klenow, H., Henningsen, I.** 1970. Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **65**: 168-175.

**Kobayashi, S., Chikushi, A., Tougu, S., Imura, Y., Nishida, M., Yano, Y., Matsuzaki, K.** 2004. Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2. *Biochemistry* **43**: 15610-15616.

**Koczulla, A.R., Bals, R.** 2003. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs* **63**: 389-406.

**Kokryakov, V.N., Harwig, S.S.L., Panyutich, E.A., Shevchenko, A.A., Aleshina, G.M., Shamova, O.V., Korneva, H.A., Lehrer, R.** 1993.

Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett.* **327**: 231-236.

**Kondejewski, L.H., Lee, D.L., Jelokhani-Niaraki, M., Farmer, S.W., Hancock, R.E., Hodges, R.S.** 2002. Optimization of microbial specificity in cyclic peptides by modulation of hydrophobicity within a defined structural framework. *J. Biol. Chem.* **277**:67-74.

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

**Konings, W.N., Kok, J., Kuipers, O.P., Poolman, B.** 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 276-282.

**Kopp, F., Marahiel, M.A.** 2007a. Macrocyclization strategies in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **24**: 735-749.

**Kopp, F., Marahiel, M.A.** 2007b. Where chemistry meets biology: the chemoenzymatic synthesis of nonribosomal peptides and polyketides. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**: 513-20.

**Korsinczky, M.L., Clark, R.J., Craik, D.J.** 2005. Disulfide bond mutagenesis and the structure and function of the head-to-tail macrocyclic trypsin inhibitor SFTI-1. *Biochemistry* **44**: 1145-1153.

**Korsinczky, M.L., Schirra, H.J., Rosengren, K.J., West, J., Condie, B.A., Otvos, L., Anderson, M.A., Craik, D.J.** 2001. Solution structures by <sup>1</sup>H-NMR of the novel cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds and an acyclic permutant. *J. Mol. Biol.* **311**: 579-591.

**Kreitman, R.J., Puri, R.K., Pastan, I.** 1994. A circularly permuted recombinant interleukin 4 toxin with increased activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 6889-6893.

**Krokoszynska, I., Otlewski, J.** 1996. Thermodynamic stability effects of single peptide bond hydrolysis in protein inhibitors of serine proteases. *J. Mol. Biol.* **256**: 793-802.

**Kuipers, O., Beerthuyzen, M.M., de Ruyter, P.G., Luesink, E.J., de Vos, W.M.** 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.* **270**: 27299-27304.

**Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., Siezen, R.J., de Vos, W.M.** 1993. Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *Eur. J. Biochem.* **216**: 281-291.

**Labrenz, S.R., Calmann, M.A., Heavner, G.A., Tolman, G.** 2008. The oxidation of methionine-54 of epoetinum alfa does not affect molecular structure or stability, but does decrease biological activity. *J Pharm Sci Technol.* **62**: 211-223.

**Ladokhin, A.S., Selsted, M.E., White, S.H.** 1997. Bilayer interactions of indolicidin, a small antimicrobial peptide rich in tryptophan, proline, and basic amino acids. *Biophys. J.* **72**: 794-805.

**Ladokhin, A.S., White, S.H.** 2001. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim. Biophys. Acta* **1514**: 253-260.

**Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.

**Lai, E.M., Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lanka, E., Kado, C.I.** 2002. Biogenesis of T pili in *Agrobacterium tumefaciens* requires precise VirB2 propilin cleavage and cyclization. *J. Bacteriol.* **184**: 327-330.

**Langdon, G.M., Bruix, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., Rico, M.** 1998. Sequence-specific <sup>1</sup>H assignment and secondary structure of the bacteriocin AS-48 cyclic peptide. *J. Biomol. NMR* **1**: 173-175.

**Lawton, E.M., Ross, R.P., Hill, C., Cotter, P.D.** 2007. Two-peptide lantibiotics: a medical perspective. *Mini Rev. Medicin. Chem.* **7**: 1236-1247.

**Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, S.D., Langella, P.** 1998. A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **180**: 1895-1903.

**Le Loir, Y., Noaille, S., Commissaire, J., Bretigny, L. Gruss, A., Langella, P.** 2001. Signal peptide and propeptide optimization for



heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 4119-4127.

**Leer, R.J., van der Vossen, J.M.B.M., van Giezen, M., van Noort, J.M., Pouwels, P.H.** 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Microbiol. **141**: 1629-1635.

**Lehrer, R.I., Ganz, T.** 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. Curr. Opin. Immunol. **11**: 23-27.

**Lehrer, R.I., Ganz, T.** 2002. Defensins of vertebrate animals. Curr. Opin. Immunol. **14**: 96-102.

**Lehrer, R.I., Lichtenstein, A.K., Granz, T.** 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. Annu. Rev. Immunol. **11**: 105-128.

**Levy, S.B., Marshall, B.** 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat. Med. **10**: 122-129.

**Li, C., Salditt, T.** 2006. Structure of magainin and alamethicin in model membranes studied by x-ray reflectivity. Biophys. J. **91**: 3285-3300.

**Li, L., Shakhnovich, E.I.** 2001. Different circular permutations produced different folding nuclei in proteins: a computational study. J. Mol. Biol. **9**: 121-132.

**Liepinsh, E., Andersson, M., Ruyschaert, J. M., Otting, G.** 1997. Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. Nat. Struct. Biol. **4**: 793-795.

**Lillard, J.W. Jr., Boyaka, P.N., Chertov, O., Oppenheim, J.J., McGhee, J.R.** 1999. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. Proc. Natl. Acad. Sci. **96**: 651-656.

**Lindgre, M., Hallbrink, M., Prochiantz, A., Langel, U.** 2000. Cell-penetrating peptides. Trends Pharmacol. Sci. **21**: 99-103.

**Lloyd, J.S., Bhambra, A., Murrell, J.C., Dalton, H.** 1997. Inactivation of the regulatory proteina B of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) by proteolysis can be overcome by a Gly to Gin modification. Eur. J. Biochem. **248**: 72-79.

**López-Lara, I., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Valdivia, E.** 1991. Purification, characterization, and biological effects of a second bacteriocin from *Enterococcus faecalis* ssp. *liquefaciens* S-48 and its mutant strain B-48-28. *Can. J. Microbiol.* **37**: 769-774.

**Luckett, S., García, R.S., Barker, J.J., Konarev, A.V., Shewry, P.R., Clarke, A.R., Brady, R.L.** 1999. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. *J. Mol. Biol.* **290**: 525-533.

**Luger, K., Hommel, U., Herold, M., Hofsteenge, J., Kirschner, K.** 1989. Correct folding of circularly permuted variants of a beta alpha barrel enzyme *in vivo*. *Science* **243**: 206-210.

**Lukacin, R., Groning, I., Schiltz, E., Britsch, L., Matern, U.** 2000. Purification of recombinant flavanone 3b-hydroxylase from *Petunia hybrida* and assignment of the primary site of proteolytic degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* **375**: 364-370.

**Ma, J.K., Drake, P.M., Christou, P.** 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.* **4**: 794-805.

**Mader, J.S., Hoskin, D.W.** 2006. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin. Investig. Drugs* **15**: 933-946.

**Maisnier-Patin, S., Forni, E., Richard, J.** 1996. Purification, partial characterisation and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **30**: 255-270.

**Makrides, S.C.** 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**: 512-538.

**Mangoni, M.L., Papo, N., Mignogna, G., Andreu, D., Shai, Y., Barra, D., Simmaco, M.** 2003. Ranacyclins, a new family of short cyclic antimicrobial peptides: biological function, mode of action, and parameters involved in target specificity. *Biochemistry* **42**: 14023-14035.

**Mano, M., Henriques, A., Paiva, A., Prieto, M., Gavilanes, F., Simoes, S., Pedroso de Lima, M.C.** 2006. Cellular uptake of S413-PV peptide occurs upon conformational changes induced by peptide-membrane interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**: 336-346.

**Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Guerra, I., Valdivia, E.** 1993. Neutralizing antibodies against the peptide antibiotic AS-48: immunocytological studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 148-151.

**Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Sánchez-Barrena, M.J., González, C., Albert, A., Rico, M., Valdivia, E.** 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **5**: 399-416.

**Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E.** 1998. Widespread production of AS-48-like bacteriocins in strains of *Enterococcus faecalis*?. *Mol. Microbiol.* **29**: 1318-1319.

**Maqueda, M., Sánchez-Hidalgo, M., Fernández, M., Montalbán-López, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M.** 2008. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 2-22.

**Marassi, F.M., Opella, S.J., Juvvadi, P., Merrifield, R.B.** 1999. Orientation of cecropin A helices in phospholipid bilayers determined by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys. J.* **77**: 3152-3155.

**Martín, M.C., Alonso, J.C., Suárez, J.E., Álvarez, M.A.** 2000. Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2599-2604.

**Martin-Visscher, L.A., van Belkum, M.J., Garneau-Tsodikova, S., Whittall, R.M., Zheng, J., McMullen, L.M., Vederas, J.C.** Isolation and characterization of carnocyclin A, a novel circular bacteriocin, produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 4756-4763.

**Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E.** 1990b. Genetic stability of the antagonistic character of *Enterococcus faecalis* subsp.

*liquefaciens* and the detection of a new inhibitory bacteriocin-like substance. *Folia Microbiol.* **35**: 113-123.

**Martínez-Bueno M, Gálvez A, Valdivia E, Maqueda M.** 1990a. A transferable plasmid associated with AS-48 production in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.* **172**: 2817-2818.

**Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Samyn, B., Van Beeumen, J., Coyette, J., Valdivia, E.** 1994. Determination of the gene sequence and molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **176**: 6334-6339.

**Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Gálvez, A., Coyette, J., Maqueda, M.** 1998. Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **27**: 347-358.

**Marx, R., Stein, T., Entian, K.D., Glaser, S.J.** 2001. Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilosin A determined by <sup>1</sup>H-NMR and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Protein Chem.* **20**: 501-506.

**Matsuzaki, K.** 1998. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**: 391-400.

**Mattick, A.T.R., Hirsch, A.** 1944. A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature* **154**: 551.

**Maxwell, A.I., Morrison, G.M., Dorin, J.R.** 2003. Rapid sequence divergence in mammalian beta-defensins by adaptive evolution. *Mol. Immunol.* **40**: 413-421.

**Mazzotta, A.S., Crandall, A.D., Montville, T.J.** 1997. Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2654-2659.

**McNulty, D.E., Claffee, B.A., Huddleston, M.J., Porter, M.L., Cavnar, K.M., Kane, J.F.** 2003. Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **27**:365-374.

**McWherter, C.A., Feng, Y., Zurfluh, L.L., Klein, B.K., Baganoff, M.P., Polazzi, J.O., Hood, W.F., Paik, K., Abegg, A.L., Grabbe, E.S., Shieh, J.J., Donnelly, A.M., McKearn, J.P.** 1999. Circular permutation of the granulocyte colony-stimulating factor receptor agonist domain of myelopoietin. *Biochemistry* **38**: 4564-4571.

**Mendoza, F., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E.** 1999. Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48-adapted strain of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 618-625.

**Menendez, C., Igloi, G., Henninger, H., Brandsch, R.** 1995. A pAO1-encoded molybdopterin cofactor gene (*moaA*) of *Arthrobacter nicotinovorans*: characterization and site-directed mutagenesis of the encoded protein. *Arch. Microbiol.* **164**: 142-151.

**Mihalyi, E.** 1978. Application of proteolytic enzymes to protein structure studies. CRC Press, Boca Raton, FL.

**Millette, M., Cornut, G., Dupont, C., Shareck, F., Archambault, D., Lacroix, M.** 2008. Capacity of human nisin and pediocin-producing LAB to reduce vancomycin-resistant Enterococci (VRE) intestinal colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 1997-2003.

**Ming, X., Daeschel, M.** 1993. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* **56**: 944-948.

**Mironova, R., Niwa, T., Hayashi, H., Dimitrova, R., Ivanov, I.** 2001. Evidence for non-enzymatic glycosylation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **39**: 1060-1068.

**Miteva, M., Andersson, M., Karshikoff, A., Otting, G.** 1999. Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Let.* **462**: 155-158.

**Molinos, A.C, Abriouel, H., Ben Omar, N., Valdivia, E., Lucas, R., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A.** 2005. Effect of immersion solutions containing Enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetables foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7781-7787.

**Monaco, V., Locardi, E., Formaggio, F., Crisma, M., Mammi, S., Peggion, C., Toniolo, C., Rebuffat, S., Bodo, B.** 1998. Solution conformational analysis of amphiphilic helical, synthetic analogs of the lipopeptaibol trichogin GA IV. *J. Pept. Res.* **52**: 261-272.

**Mookherjee, N., Brown, K.L., Bowdish, D.M.E., Doria, S., Falsafi, R., Hokamp, K., Roche, F.M., Mu, R., Doho, G.H., Pistolic, J., Powers, J.P., Bryan, J., Brinkman, F.S.L., Hancock, R.E.W.** 2006. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J. Immunol.* **176**: 2455-2464.

**Mookherjee, N., Hancock, R.E.** 2007. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell. Mol. Life. Sci.* **64**: 922-933.

**Mootz, H.D., Marahiel, M.A.** 1997. The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J. Bacteriol.* **179**: 6843-6850.

**Mor, A., Nguyen, V.H., Delfour, A., Migliore-Samour, S.D., Nicolas, P.** 1991. Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry* **30**: 8824-8830.

**Mulvenna, J.P., Mylne, J.S., Bharathi, R., Burton, R.A., Shirley, N.J., Fincher, G.B., Anderson, M.A., Craik, D.J.** 2006b. Discovery of cyclotide-like protein sequences in graminaceous crop plants: ancestral precursors of circular proteins? *Plant Cell.* **18**: 2134-2144.

**Mulvenna, J.P., Wang, C., Craik, D.J.** 2006a. CyBase: a database of cyclic protein sequence and structure. *Nucleic Acid Res.* **34**: D192-194.

**Mulvenna, J.P., Sando, L., Craik, D.J.** 2005. Processing of a 22 kDa precursor protein to produce the circular protein tricyclon A. *Structure.* **13**: 691-701.

**Muñoz, A.** 2006. Optimización de la producción de la enterocina AS-48 en sistemas alimentarios. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

**Muñoz, A., Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Maqueda, M., Valdivia, E.** 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced *in situ* and *ex situ*: bactericidal synergism through heat and AS-48. *Int. Dairy J.* **17**: 760-769.

**Muñoz, A., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Valdivia, E.** 2004. Biocontrol of psychrotrophic enterotoxigenic *Bacillus cereus* in nonfat hard cheese by a enterococcal strain-producing Enterocin AS-48. *J. Food Protect.* **67**: 1517-1521.

**Nagaoka, I., Hirota, S., Niyonsaba, F., Hirata, M., Adachi, Y., Tamura, H., Heumann, D.** 2001. Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF- $\alpha$  by blocking the binding of LPS to CD14<sup>+</sup> cells. *J. Immunol* **167**: 3329-3338.

**Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., Shimonishi, Y.** 1988. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *J. Biol. Chem.* **263**: 16709-16713.

**Nakamura, T., Iwakura, M.** 1999. Circular permutation analysis as a method for distinction of functional elements in the M20 loop of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase. *J. Biol. Chem.* **274**: 19041-19047.

**Nauli, S., Kuhlman, B., Baker, D.** 2001. Computer-based redesign of a protein folding pathway. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 602-605.

**Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**: 113-128.

**Nes, I.F., Diep, D.B., Holo, H.** 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* **189**: 1189-1198.

**Ni, X., Schachman, H.K.** 2001. *In vivo* assembly of aspartate transcarbamoylase from fragmented and circularly permuted catalytic polypeptide chains. *Protein Sci.* **10**: 519-527.

**Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H.** 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 2975-2984.

**Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K., Nes, I.F.** 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. J. Bacteriol. **174**: 5686-5692.

**Nissen-Meyer, J., Nes, I.F.** 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis and mechanism of action. Arch. Microbiol. **167**: 67-77.

**Nizet, V., Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., Dorschner, R.A., Pestonjamas, V., Piraino, J., Huttner, K., Gallo, R.L.** 2001. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. Nature **414**: 454-457.

**Nomura, T., Kamada, R., Ito, I., Chuman, Y., Shimohigashi, Y., Sakaguchi, K.** 2008. Oxidation of methionine residue at hydrophobic core destabilizes p53 tetrameric structure. Biopolymers. En prensa.

**Nygren, P.A., Stashl, S., Uhlen, M.** 1994. Engineering proteins to facilitate bioprocessing. Trends Biotechnol. **12**: 184-188

**O'Keeffe, T., Hill, C., Ross, R.P.** 1999. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 1506-1515.

**Okuda, K., Edwards, G.C., Winnick, T.** 1963. Biosynthesis of gramicidin and tryocidine in the Dubos strain of *Bacillus brevis*. I. Experiments with growing cultures. J. Bacteriol. **85**: 329-338.

**Onuchic, J.N., Wolynes, P.G.** 2004. Theory of protein folding. Curr. Opin. Struct. Biol. **14**: 70-75.

**Oren, Z., Shai, Y.** 1998. Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. Biopolymers **47**: 451-463.

**Oren, Z., Shai, Y.** 2000. Cyclization of a cytolytic amphipathic  $\alpha$ -helical peptide and its diastereomer: effect on structure, interaction with model membranes, and biological function. Biochemistry **39**: 6103-6114.



**Oscáriz, J.C., Pisabarro, A.G.** 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* **4**: 13-19.

**Otzen, D.E., Fersht, A.R.** 1998. Folding of circular and permuted chymotrypsin inhibitor 2: retention of the folding nucleus. *Biochemistry.* **37**: 8139-8146.

**Palm, C., Nerzereab, S., Hällbrink, M.** 2006. Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides.* **27**: 1710-1716.

**Pansegrau, W., Lanka, E., Barth, P.T., Figurski, D.H., Guiney, D.G., Haas, D., Helinski, D.R., Schwab, H., Stanisich, V.A., Thomas, C.M.** 1994. Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP alpha plasmids. Compilation and comparative analysis. *J. Mol. Biol.* **239**: 623-663.

**Patrzykat, A., Friedrich, C.L., Zhang, L., Mendoza, V., Hancock, R.E.** 2002. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 605-614.

**Pavan, S., Hols, P., Delcour, J., Geoffroy, M.C., Grangette, C., Kleerebezem, M., Mercenier, A.** 2000. Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study *in vivo* biological effects. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4427-4432.

**Pazgier, M. Li, X., Lu, W., Lubkowski, J.** 2007. Human defensins: synthesis and structural properties. *Curr. Pharm. Des.* **13**: 3096-3118.

**Peng, Z.Y., Wu, L.C.** 2000. Autonomous protein folding units. *Adv Protein Chem.* **53**: 1-47.

**Peränen, J., Rikkonen, M., Hyvonen, M., Kaariainen, L.** 1996. T7 vectors with modified T7lac promoter for expression of proteins in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **236**: 371-373.

**Perler, F.B., Adam, E.** 2000. Protein splicing and its applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 377-383.

**Persson, S., Killian, J.A., Lindblom, G.** 1998. Molecular ordering of interfacially localized tryptophan analogs in ester- and ether-lipid bilayers studied by 2H-NMR. *Biophys. J.* **75**: 1365-1371.

**Peschel, A., Sahl, H.G.** 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 529-536.

**Picotti, P., Marabotti, A., Negro, A., Musi, V., Spolaore, B., Zambonin, M., Fontana, A.** 2004. Modulation of the structural integrity of helix F in apomyoglobin by single amino acid replacements. *Protein Sci.* **13**: 1572-1585.

**Polverino de Laureto, P., De Filippis, V., Di Bellos, M., Zambonin, M., Fontana, A.** 1995. Probing the molten globule state of  $\alpha$ -lactalbumin by limited proteolysis. *Biochemistry.* **34**: 12596-12604.

**Polverino de Laureto, P., Taddei, N., Frare, E., Capanni, C., Costantini, S., Zurdo, J., Chiti, F., Dobson, C.M., Fontana, A.** 2003. Protein aggregation and amyloid fibril formation by an SH3 domain probed by limited proteolysis. *J. Mol. Biol.* **334**: 129-141.

**Poquet, I., Ehrlich, S.D., Gruss, A.** 1998. An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **180**: 1904-1912.

**Price, N.C., Johnson, C.M.** 1990. Proteinases as probes of conformation of soluble proteins. In: *Proteolytic enzymes: A practical approach*. Beynon, R.J., Bond, J.S., (Eds.), pp 163-80. IRL Press, Oxford.

**Ptitsyn, O.B.** 1987. Protein folding: hypotheses and experiments. *J. Protein Chem.* **6**: 273-293.

**Ptitsyn, O.B.** 1995. Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem.* **47**: 83-229.

**Pütsep, K., Carlsson, G., Boman, H.G., Andersson, M.** 2002. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet* **360**: 1144-1149.

**Qi, F., P. Chen, Caufield, P.W.** 1999. Functional analyses of the promoters in the lantibiotic mutacin II biosynthetic locus in *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 652-658.

**Quirantes, R., Gálvez, A., Valdivia, E., Martín, I., Martínez-Bueno, M., Méndez, E., Maqueda, M.** 1995. Purification of specific sex

pheromones for pMB1 and pMB2 plasmids of *Enterococcus faecalis* S-48. Can. J. Microbiol. **41**: 629-632.

**Rebuffat, S.A., Blond, A., Destoumieux-Garzón, D., Goulard, C., Peduzzi, J.** 2004. Microcin J25, from the macrocyclic to the lasso structure: implications for biosynthetic, evolutionary and biotechnological perspectives. Curr. Prot. Pep. Sci. **5**: 383-391.

**Reddy, K.V., Aranha, C., Gupta, S.M., Yedery, R.D.** 2004. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: in vitro and in vivo studies. Reproduction **128**: 117-126.

**Rico, M., Jimenez, M.A., Gonzalez, C., De Filippis, V., Fontana, A.** 1994. NMR solution structure of the C-terminal fragment 255-316 of thermolysin: a dimer formed by subunits having the native structure. Biochemistry **33**: 14834-14847.

**Riley, M.A., Gordon, D.M.** 1992. A survey of col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of col-plasmid lineages. J. Microbiol. **138**: 1345-1352.

**Rivas, L., Andreu, D.** 2003. Péptidos antimicrobianos eucarióticos: ¿una nueva alternativa en clínica?. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. **21**: 358-365.

**Rogers, L.A.** 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bacteriol. **16**: 321-325.

**Rogers, S., Wells, R., Rechsteiner, M.** 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science **234**: 364-368.

**Rogowsky, P.M., Powell, B.S., Shirasu, K., Lin, T.S., Morel, P., Zyprian, E.M., Steck, T.R., Kado, C.I.** 1990. Molecular characterization of the *vir* regulon of *Agrobacterium tumefaciens*: complete nucleotide sequence and gene organization of the 28.63-kbp regulon cloned as a single unit. Plasmid **23**: 85-106.

**Rosenbaum, C., Waldmann, H.** 2001. Solid phase synthesis of cyclic peptides by oxidative cyclative cleavage of an aryl hydrazide linker - Synthesis of stylostatin 1. Tetrahedron Lett. **42**: 5677-5680.

**Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.S., Lin, S.W., Dunn, J.J., Studier, F.W.** 1987. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**: 125-135.

**Rosengren, K.J., Clark, R.J., Daly, N.L., Goransson, U., Jones, A., Craik, D.J.** 2003. Microcin J25 has a threaded sidechain-to-backbone ring structure and not a head-to-tail cyclized backbone. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 12464-12474.

**Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C.** 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* **79**: 3-16.

**Royo, J.L., Manyani, H., Cebolla, A., Santero, E.** 2005a. A new generation of vectors with increased induction ratios by overimposing a second regulatory level by attenuation. *Nucleic Acids Res.* **33**: e169.

**Royo, J.L., Moreno-Ruiz, E., Cebolla, A., Santero, E.** 2005b. Stable long-term indigo production by overexpression of dioxygenase genes using a chromosomal integrated cascade expression circuit. *J. Biotechnol.* **116**: 113-124.

**Rozeck, A., Friedrich, C.L., Hancock, R.E.** 2000. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulphate micelles. *Biochemistry* **39**: 15765-15774.

**Ryan, M.P., Meaney, W.J., Ross, R.P., Hill, C.** 1998. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2287-2290.

**Sacchettini, J.C., Kelly, J.W.** 2002. Therapeutic strategies for human amyloid diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**: 267-275.

**Saether, O., Craik, D.J., Campbell, I.D., Sletten, K., Juul, J., Norman, D.G.** 1995. Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. *Biochemistry* **34**: 4147-4158.

**Saleh, L., Perler, F.B.** 2006. Protein splicing in cis and in trans. *Chem. Rec.* **6**: 183-193.

**Salh, H.G., Jack, R.W., Bierbaum, G.** 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.* **230**: 827-853.

**Salomon, R.A., Farias, R.N.** 1992. Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 7428-7435.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

**Samyn, B., Martínez-Bueno, M., Devreese, B., Maqueda, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Coyette, J., Van Beeumen, J.** 1994. The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Lett.* **352**: 87-90.

**Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L., García, E.** 1990. Cloning and expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases. *Gene.* **89**: 69-75

**Sánchez-Barrena, M., Martínez-Ripoll, G., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., Cruz, V., Albert, A.** 2003. Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state. *J. Mol. Biol.* **334**: 541-549.

**Sánchez-Hidalgo, M., Martínez-Bueno, M., Fernández-Escamilla, A.M., Valdivia, E., Serrano, L., Maqueda, M.** 2008. Effect of replacing glutamic residues upon the biological activity and stability of the circular enterocin AS-48. *J Antimicrob. Chemother.* **61**: 1256-1265.

**Sánchez-Hidalgo, M., Fernández-Escamilla, A.M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Serrano, L., Maqueda, M.** 2009. Conformational stability and activity of circular enterocin AS-48-derivatives. *Appl. Environ. Microbiol.* Sometido a publicación.

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

**Santos, M.A.S., Tuite, M.F.** 1993. New insights into mRNA decoding-implications for heterologous protein synthesis. *Trends Biotechnol.* **11**: 500-505.

**Saris, P.E., Immonen, T., Reis, M., Sahl, H.G.** 1996. Immunity to lantibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*. **69**: 151-159.

**Saska, I., Guillon, A.D., Hatsugai, N., Dietzgen, R.G., Hara-Nishimura, I., Anderson, M.A., Craik, D.J.** 2007. An asparaginyl endopeptidase mediates in vivo protein backbone cyclization. *J. Biol. Chem.* **282**: 29721-29728.

**Sawers, G., Jarsch, M.** 1996. Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 1-9.

**Schechter, I., Berger, A.** 1967. On the size of the active site in proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**: 152-162.

**Schibli, D.J., Hunter, H.N., Aseyev, V., Starner, T.D., Wienczek, J.M., McCray, Jr. P.B., Tack, B.F., Vogel, H.J.** 2002. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **277**: 8279-8289.

**Schillinger, U., Lücke, F.K.** 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1901-1906.

**Scott, C.P., Abel-Santos, E., Jones, A.D., Benkovic, S.J.** 2001. Structural requirements for the biosynthesis of backbone cyclic peptide libraries. *Chem. Biol.* **8**: 801-815.

**Scott, M.G., Davidson, D.J., Gold, M.R., Bowdish, D., Hancock, R.E.W.** 2002. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J. Immunol.* **169**: 3883-3891.

**Scott, M.G., Rosenberger, C.M., Gold, M.R., Finlay, B., Hancock, R.E.W.** 2000. An  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptide selectively modulates macrophage responses to lipopolysaccharide and directly alters macrophage gene expression. *J. Immunol.* **165**: 3358-3365.

**Sears, P.M., Smith, B.S., Stewart, W.K., Gonzalez, R.N.** 1992. Evaluation of a nisin based germicidal formulation on teat skin of live cows. *J. Dairy Sci.* **75**:3185-3190.

**Selkoe, D.J.** 2003. Folding proteins in fatal ways. *Nature*. **426**: 900-904.

**Selsted, M.E.** 2004.  $\theta$ -Defensins: Cyclic antimicrobial peptides produced by binary ligation of truncated  $\alpha$ -Defensins. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **5**: 365-371.

**Selsted, M.E., Novotny, M.J., Morris, W.L., Tang, Y.Q., Smith, W., Cullor, J.S.** 1992. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J. Biol. Chem.* **267**: 4292-4295.

**Serkedjieva, J., Danova, S., Ivanova, I.** 2000. Antiinfluenza virus activity of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii*. *Appl. Biochem. Biotech.* **88**: 285-298.

**Sforça, M.L., Machado, A., Figueredo, R.C., Oyama, S. Jr., Silva, F.D., Miranda, A., Daffre, S., Miranda, M.T., Spisni, A., Pertinhez, T.A.** 2005. The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the alpha-chain of bovine haemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*. *Biochemistry* **44**: 6440-6451.

**Shai, Y.** 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* **1462**: 55-70.

**Shelburne, Ch.E., An, F. Y., Dholpe, V., Ramamoorthy, A., Lopatin, D.E., Lantz, M.S.** 2007. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilosin A. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**: 297-300.

**Sheldon, P.S., Keen, J.N., Bowles, D.J.** 1996. Post-translational peptide bond formation during concanavalin A processing *in vitro*. *Biochem. J.* **320**: 865-870.

**Skerlavaj, B., Benincasa, M., Risso, A., Zanetti, M., Gennaro, R.** 1999. SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. *FEBS Lett.* **463**: 58-62.

**Skosyrev, V.S., Kuleskiy, E.A., Yakhnin, A.V., Temirov, Y.V., Vinokurov, L.M.** 2003. Expression of the recombinant antibacterial

peptide sarcotoxin IA in *Escherichia coli* cells. *Protein Expr. Purif.* **28**: 350-356.

**Sletten, K., Gran, L.** 1973. Some molecular properties of kalatapeptide B-1. A uterotonic polypeptide isolated from *Oldenlandia affinis* DC. *Meddelelser fra Norsk Farmaceutisk Selskap* **8**: 69-82.

**Smith, V.F., Matthews, C.R.** 2001. Testing the role of chain connectivity on the stability and structure of dihydrofolate reductase from *E. coli*: fragment complementation and circular permutation reveal stable, alternatively folded forms. *Protein Sci.* **10**: 116-128.

**Sosunov, V., Mischenko, V., Eruslanov, B., Svetoch, E., Shakina, Y., Stern, N., Majorov, K., Sorokoumova, G., Selishcheva, A., Apt, A.** 2007. Antimycobacterial activity of bacteriocins and their complexes with liposomes. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**: 919-925.

**Spolaore, B., Bermejo, R., Zambonin, M., Fontana, A.** 2001. Protein interactions leading to conformational changes monitored by limited proteolysis: Apo form and fragments of horse cytochrome c. *Biochemistry.* **40**: 9460-9468.

**Spolaore, B., Poverino de Laureto, P., Zambonin, M., Fontana, A.** 2004. Limited proteolysis of human growth hormone at low pH: Isolation, characterization and complementation of the two biologically relevant fragments 1-44 and 45-191. *Biochemistry* **43**: 6576-6586.

**Stefani, M., Dobson, C.M.** 2003. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* **81**: 678-699.

**Steidler, L., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, K.M., Remaut, E., Le Page, R.W., Wells, J.M.** 1998. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect. Immun.* **66**: 3183-3189.

**Steiner, H.** 1982. Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*. *FEBS Lett.* **137**: 283-287.

**Straus, S.K., Hancock, R.E.** 2006. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with



cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**: 1215-1223.

**Studier, F.W., Moffatt, B.A.** 1986. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *J. Mol. Biol.* **189**:113-130.

**Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W.** 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60-89.

**Sugimoto, N., Nakano, S., Yoneyama, M., Honda, K.** 1996. Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. *Nucleic. Acids. Res.* **24**: 4501-4505.

**Suzuki, T., Hayashi, K., Fujikawa, K., Tsukamoto, K.** 1963. Contribution to the elucidation of the structure of polymyxin B1. *J. Biochem.* **54**: 555-556.

**Tabor, S.** 1990. Expression using T7 RNA polymerase/promoter system. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds). Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, pp 16.2.1-16.2.11.

**Tagg, J.R.** 1992. Bacteriocins of Gram-positive bacteria: an opinion regarding their nature, nomenclature and numbers. *Bacteriocins, microcins and lantibiotics. Nato Asi. Series, H5.* **65**: 33-35.

**Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W.** 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**: 722-756.

**Tagg, J.R., McGiven, A.R.** 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* **21**: 934.

**Takeda, O., Miura, Y., Mitta, M., Matsushita, H., Kato, I., Abe, Y., Yokosawa, H., Ishii, S.** 1994. Isolation and analysis of cDNA encoding a precursor of *Canavalia ensiformis* asparaginylnyl endopeptidase (legumain). *J. Biochem.* **116**: 541-546.

**Tam, J.P., Lu, Y.A.** 1998. A biomimetic strategy in the synthesis and fragmentation of cyclic protein. *Protein Sci.* **7**: 1583-1592.

**Tang, Y.Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C.J., Ouellette, A.J., Selsted, M.E.** 1999. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated  $\alpha$ -defensins. *Science* **286**: 498-502.

**Taniuchi, H., Parr, G.R., Juillerat, M.A.** 1986. Complementation in folding and fragment exchange. *Methods Enzymol.* **131**: 185-217.

**Taylor, J.I., Hirsch, A., Mattick, A.T.R.** 1949. The treatment of bovine streptococcal and staphylococcal mastitis with nisin. *Vet. Rec.* **61**: 197-198

**Teather, R.M., Kalmokoff, M.L., Whitford, M.F.** 1999. The Role of Bacteriocins in Rumen Microbial Ecology. In: *The Rumen Microbial Ecosystem. Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology.* Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P. (Eds.). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

**Thomma, B.P., Cammue, B.P., Thevissen, K.** 2003. Mode of action of plant defensins suggests therapeutic potential. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **3**: 1-8.

**Toba, T., Samant, S.K., Yoshioka, E., Itoh, T.** 1991. Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. *Lett. Appl. Microbiol.* **13**: 281-286.

**Tobías, J.W., Shrader, T.E., Rocap, G., Varshavsky, A.** 1991. The N-end rule in bacteria. *Science* **254**: 1374-1377.

**Todorov S.D., Wachsman, M.B., Knoetze, H., Meincken, M., Dicks, L.M.T.** 2005. An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4V isolated from soya beans. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **25**: 508-513.

**Toke, O.** 2005. Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers (Peptide Science).* **80**: 717-735.

**Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., Ike, Y.** 1997. Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *J. Bacteriol.* **179**: 7843-7855.

**Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 4350-4354.

**Trabi, M., Craik, D.J.** 2002. Circular proteins-no end in sight. *Trends Biochem. Sci.* **27**: 132-138.

**Trabi, M., Schirra, H.J., Craik, D.J.** 2001. Three-dimensional structure of RTD-1, a cyclic antimicrobial defensin from Rhesus macaque leukocytes. *Biochemistry* **40**: 4211-4221.

**Tsai, H., Bobek, L.A.** 1998. Human salivary histatins: promising antifungal therapeutic agents. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **9**: 480-497.

**Udgaonkar, J.B.** 2008. Multiple routes and structural heterogeneity in protein folding. *Annu. Rev. Biophys.* **37**: 489-510.

**van Asseldonk, M., de Vos, W.M., Simons, G.** 1993. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* *usp45* secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous alfa-amylase. *Mol. Gen. Genet.* **240**: 428-434.

**van Asseldonk, M., Rutten, G., Oteman, M., Siezen, R. J., de Vos, W. M., Simons, G.** 1990. Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of *usp45*, a gene encoding a highly secreted protein from *Lactococcus lactis* MG1363. *Gene* **95**: 155-160.

**van Belkum, M.J., Stiles, M.E.** 2000. Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **4**: 323-335.

**Venema, G., Kok, J., Sinderen, D.** 1999. From DNA sequence to application: possibilities and complications. *Antoine van Leeuwenhoek* **76**: 3-23.

**Wachsman, M.B., Faras, M.E., Takeda, E., Sesma, F., de Ruiz Holgado, A.P., de Torres, R.A., Coto C.E.** 1999. Antiviral activity of

enterocin CRL35 against herpesviruses. *Int. J. Antimicrob. Agents* **12**: 293-299.

**Wadia, J.S., Stan, R.V., Dowdy, S.F.** 2004. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.* **10**: 310-315.

**Wegmann, U., Klein, J.R., Drumm, I., Kuipers, O.P., Henrich, B.** 1999. Introduction of peptidase genes from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* into *Lactococcus lactis* and controlled expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4729-4733.

**Willey, J.M., van der Donk, W.A.** 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**: 477-501.

**Williams, N.K., Prosselkov, P., Liepinsh, E., Line, I., Sharipo, A., Littler, D.R., Curmi, P.M.G., Otting, G., Dixon, N.E.** 2002. In vivo protein cyclization promoted by a circularly permuted *Synechocystis* sp. PCC6803 DnaB mini-intein. *J. Biol. Chem.* **277**: 7790-7798.

**Wilson, K.A., Kalkum, M., Ottesen, J., Yuzenkova, J., Chait, B.T., Landick, R., Muir, T., Severinov, K., Darst, S.A.** 2003. Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 12475-12483.

**Winans, S.C.** 1992. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Rev.* **56**: 12-31.

**Wirawan, R.E., Klesse, N.A., Jack, R.W., Tagg, J.R.** 2006. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1148-1156.

**Wirawan, R.E., Swanson, K.M., Kleffmann, T., Jack, R.W., Tagg, J.R.** 2007. Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology* **153**: 1619-1630.

**Witherup, K.M., Bogusky, M.J., Anderson, P.S., Ramjit, H., Ransom, R.W., Wood, T., Sardana, M.** 1994. Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*. *J. Nat. Prod.* **57**: 1619-1625.

**Wu, M., Hancock, R.E.** 1999. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* **274**: 29-35.

**Wu, M., Maier, E., Benz, R., Hancock, R.E.W.** 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **38**: 7235-7242.

**Wu, X., Jörnvall, H., Berndt, K.D., Oppermann, U.** 2004. Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **313**: 89-96.

**Yagi, Y., Clewell, D.B.** 1980. Recombination-deficient mutant of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **143**: 966-970.

**Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L.W., Oppenheim, J.J.** 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* **23**: 291-296.

**Yang, D., Chen, Q., Schmidt, A.P., Anderson, G.M., Wang, J.M., Wooters, J., Oppenheim, J.J., Chertov, O.** 2000. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.* **192**: 1069-1074.

**Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., Huang, H.W.** 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* **81**: 1475-1485.

**Yang, L., Morriello, G.** 1999. Solid phase synthesis of head to tail cyclic peptides using a sulfonamide safety catch linker: the cleavage by cyclisation approach. *Tetrahedron Lett.* **40**: 8197-8200.

**Yau, W.M., Wimley, W.C., Gawrisch, K., White, S.H.** 1998. The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry.* **37**: 14713-14718.

**Zasloff, M.** 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 5449-5453.

**Zheng, G., Hehn, R., Zuber, P.** 2000. Mutational Analysis of the *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis*: identification of genes required for subtilosin production and immunity. *J. Bacteriol.* **182**: 3266-3273.

**Zheng, G., Yan, L.Z., Vederas, J.C., Zuber, P.** 1999. Genes of the *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilosin. *J. Bacteriol.* **181**: 7346-7355.

**Zhou, H.X.** 2003. Effect of backbone cyclization on protein folding stability: chain entropies of both the unfolded and the folded states are restricted. *J. Mol. Biol.* **332**: 257-264.



## Índice de figuras

<b>Figura 1-I.</b> Estructura de algunos CAMPs. (A) Estructura mixta de la $\beta$ -defensina-2 humana. (B) Tanatina. (C) Lámina beta de polifemusina. (D) Defensina-1 de riñón de conejo. (E) Magainina. (F) Indolicidina. Tomado de Jenssen <i>et al.</i> , 2006.	2
<b>Figura 2-I.</b> Esquema del mecanismo de acción de los CAMPs. La primera etapa (A) requiere la unión por interacción con el lipopolisacárido de naturaleza electrostática e interaccionar con la membrana citoplasmática para ejercer su acción (B) por inserción de acuerdo con el modelo de barril, (C) poro toroidal, (D) agregación molecular, o (E) alfombra. El modelo de agregación molecular puede explicar la translocación a través de la membrana de los CAMPs para interferir (F) con la síntesis de ADN o ARN, (G) la síntesis proteica, o (H) la formación y mantenimiento de la integridad de la pared celular. Tomado de Hale y Hancock, 2007.	9
<b>Figura 3-I.</b> Esquema de las posibles acciones de CAMPs a nivel sistémico.	10
<b>Figura 4-I.</b> Estructura de algunos péptidos cíclicos de síntesis no ribosómica.	18
<b>Figura 5-I.</b> Estructura de alguna proteínas circulares (Sánchez-Hidalgo <i>et al.</i> , 2007).	21
<b>Figura 6-I.</b> Esquema de la organización genética de las proteínas circulares producidas por microorganismos.	31
<b>Figura 7-I.</b> Organización y estructura de los ciclótidos.	33
<b>Figura 8-I.</b> Estructuras de Kalata B1, Cycloviolacina O1 y MCoTI-II, representantes de las familias Möbius, Bracelet e Inhibidores de tripsina, respectivamente. Los puentes disulfuro se indican en amarillo. Derecha, superposición de las 20 mejores estructuras determinadas por RMN (tomado de Craik <i>et al.</i> , 2004).	34
<b>Figura 9-I.</b> Reacción de ciclación por síntesis en fase sólida por formación de tiolactona. Tomado de Davies 2003.	38
<b>Figura 10-I.</b> Reacción de ciclación mediada por inteínas. Tomado de Trabi y Craik, 2002.	38
<b>Figura 11-I.</b> Esquema de la organización de un ciclótido. ER, secuencia señal para el retículo endoplasmático, NTPP, propéptido N-terminal, NTR, región N-terminal, cyclotide, secuencia del ciclótido, CTPP, propéptido C-terminal. Los recuadros rojos marcan los residuos más conservados en la molécula necesarios para la ciclación. En azul se muestran otros aminoácidos que se han encontrado en ciclótidos en menor cantidad para esa posición. Adaptado de Saska <i>et al.</i> , 2007.	39



<b>Figura 12-I.</b> Mecanismo de ciclación propuesto de los ciclótidos. (a) El péptido con el dominio ciclótido y el CTPP es reconocido por la enzima (zona sombreada) encajando cada residuo en un sitio de unión específico. (b) La enzima rompe el grupo carboxilo de la asparagina liberando el CTPP y creando un complejo intermedio acil-enzima con el dominio ciclótido. (c) El tripéptido N-terminal (GLP) ocupa los sitio que deja libre el CTPP permitiéndose un ataque nucleofílico y la formación del enlace peptídico. Tomado de Gillon <i>et al.</i> , 2008.	42
<b>Figura 13-I.</b> Maduración de los precursores de la pilina para producir la molécula cíclica. Las hélices transmembrana predichas se muestran en azul oscuro. Las secuencias parciales se indican por colores: en rojo la secuencia C-terminal no esencial; en rosa, el péptido señal N-terminal; en naranja el tetrapéptido C-terminal, en azul claro la secuencia central (adaptado de Kalkum <i>et al.</i> , 2004).	43
<b>Figura 14-I.</b> Organización del complejo enzimático responsable de la síntesis de la tirocidina. Tomado de Kopp y Marahiel, 2007a.	44
<b>Figura 15-I.</b> Esquema de la reacción de proteólisis. Adaptado de Fontana <i>et al.</i> , 2004.	46
<b>Figura 16-I.</b> Inducción con IPTG.	53
<b>Figura 17-I.</b> Inducción con nisina.	55
<b>Figura 18-I.</b> Inducción con salicilatos.	56
<b>Figura 19-I.</b> Estructura primaria (abajo) y secundaria (arriba) de la enterocina AS-48. Se representa la unión cabeza-cola.	62
<b>Figura 20-I.</b> Visión estereoscópica de la superposición de las mejores 20 estructuras de AS-48 obtenidas mediante RMN. En negro se muestra la superposición de los átomos y en rojo la de las cadenas laterales hacia el corazón de la molécula.	63
<b>Figura 21-I.</b> Comparación de las estructuras tridimensionales de la bacteriocina AS-48 (arriba) y de la NK-lisina (abajo).	63
<b>Figura 22-I.</b> (A) Potencial electrostático positivo de AS-48 al nivel de $2kT/q$ , calculado con el programa GRASP. La dirección del cambio máximo del potencial es aproximadamente vertical. Se indica la longitud del polipéptido en esa orientación, 20 Å. (B) Vista frontal (arriba, misma orientación que en A) y posterior (abajo) de AS-48, indicando las regiones hidrófobas en la superficie (color cian).	64
<b>Figura 23-I.</b> Estereovisión de la superposición de los 20 mejores modelos de AS-48 obtenidos mediante RMN (amarillo) y cristalografía de rayos X (azul).	65

Figura 24-I. Representación de las formas diméricas encontradas en cristales de AS-48 en solución. Estructura de la DF-I (A) y la DF-II (B).	66
<b>Figura 25-I.</b> Representación del mecanismo molecular de la inserción en membrana de AS-48. El modelo incluye la aproximación de la forma DFI a la membrana y la transición de DF-I a DF-II a nivel de la superficie de la membrana.	68
<b>Figura 26-I.</b> Representación del hipotético plano formado por los 4 residuos de Glu presentes en AS-48.	68
<b>Figura 27-I.</b> (A) Superposición de las 20 mejores estructuras calculadas para B-49-69 en TFE al 30%. El puente disulfuro aparece en amarillo. (B) Superposición de las estructuras de B-49-69 y la bacteriocina AS-48. En verde, B-49-69, en negro, el segmento 49-69 de AS-48. Las cadenas laterales de I59 y V67 en AS-48 aparecen en naranja, y el puente disulfuro entre C59-C67 de B-49-69 en amarillo.	69
<b>Figura 28-I.</b> Secuencias promotoras del gen <i>as-48A</i> . Las flechas indican la repetición invertida (RI). Se toma como posición inicial el sitio <i>SphI</i> de la región <i>as-48</i> clonada en pAM401.	71
<b>Figura 29-I.</b> Mapa físico y genético del plásmido pMB2 con los sitios de corte de diversas enzimas de restricción, en el que se destaca los genes identificados en la región <i>as-48</i> .	72
<b>Figura 30-I.</b> Modelo propuesto para el procesamiento de la enterocina AS-48: eliminación del péptido señal (35 aminoácidos) mediante ruptura entre His <sup>-1</sup> y Met <sup>+1</sup> seguida de la formación del enlace peptídico entre la Met <sup>+1</sup> y el Trp <sup>+70</sup> para originar la molécula circular madura.	74
<b>Figura 1-MM.</b> Construcción del gen <i>as-48L</i> <sup>23/24</sup> mediante permutación circular. En cada caso se muestra el nombre del par de cebadores empleados dentro del cuadro.	105
<b>Figura 2-MM.</b> Esquema del método de mutagénesis dirigida por PCR mediante extensión de fragmentos solapados. Se indican los nombres de los oligonucleótidos A, B, M (mutante) y MC (mutante complementario). Cada reacción de PCR se nombra como PCR1, PCR2 y PCR3, para indicar que son reacciones separadas	106
<b>Figura 3-MM.</b> Técnica de los pocillos. Se forma un pocillo en una placa cubierta con una sobrecapa de organismo indicador (1) y se rellena con solución de bacteriocina (2), la cual se deja difundir por el agar (3). La incubación del microorganismo sensible dará halos de inhibición visibles (4).	123
<b>Figura 4-MM.</b> Esquema del cromatógrafo empleado en la purificación de AS-48.	126

- Figura 5-MM.** Espectros de DC en el UV lejano característicos de varios tipos de estructura secundaria en proteínas 135
- Figura 6-MM.** Espectropolarímetro. 136
- Figure 1-R.** Secondary structures of wild-type AS-48 and linear derivatives. The schematic outline of the sequence connectivity of the  $\alpha$ -helices in the new molecules obtained by the unmodified version of AS-48 (AS<sub>1/70</sub>) or by circular permutation (AS<sub>23/24</sub> and AS<sub>48/49</sub>) in the structural *as-48A* gene is indicated at the bottom. The AS<sub>23/24</sub> protein starts with a M<sup>24</sup> residue instead of W<sup>24</sup>, followed by V<sup>25</sup>, whilst in the AS<sub>48/49</sub> variant, an M residue has been introduced before E<sup>49</sup> and the penultimate G<sup>47</sup> has been replaced by N<sup>47</sup>. 161
- Figure 2-R.** Cell extracts of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pBAT-L<sup>23/24</sup> (A) or pBAT-L<sup>48/49</sup> (B) after 2 hours' induction at 28 °C monitored by SDS-PAGE. IPTG concentrations used were: 0.5 mM (lanes 2 and 3); 1 mM (lanes 4 and 5); 1.5 mM (lanes 6 and 7); 2 mM (lanes 8 and 9). Lanes 2, 4, 6 and 8 correspond to pBAT-4m used as control. 162
- Figure 3.** RT-PCR analysis of the transcription of the *as-48A* permuted genes. RNA was isolated from *E. coli* BL21 carrying the pBAT-L<sup>23/24</sup> (A) and pBAT-L<sup>48/49</sup> (B) plasmids after 2, 4 and 6 hours' induction with 1 mM IPTG at 28° C. RNA from *E. coli* BL21(pBAT-4m) was used as control. The specific primers used and amplification conditions are described in Methods. 163
- Figure 4-R.** Expression of fusion products with C-Lytag protein in *E. coli* REG-1. Cell extracts from pALEX-L<sup>23/24</sup> (A) and pALEX-L<sup>48/49</sup> (B) monitored by SDS-PAGE. (Lane 1) ladder, (lane 2) 0 h, (lane 3) after 5 h induction, (lane 4) supernatant after sonication, (lane 5) pellet after sonication. (C) Enterokinase treatment of the C-Lytag/AS<sub>23/24</sub> fusion protein developed by SDS-PAGE: (lane 1) Ladder, (lane 2) purified AS-48 use as control, (3) the fusion protein, (lane 4) after EK treatment for 72 h. 165
- Figure 5-R.** Activity of the different fractions from C-Lytag/AS-48-fusion proteins against *L. monocytogenes* after EK digestion and separation by RP-HPLC (A).Activity assays of the recovered fractions from pALEX-L<sup>23/24</sup> (1) and pALEX-L<sup>48/49</sup> (2) after 18 h of incubation (B) and the same plate after 72 h of incubation (C). 166
- Figure 6-R.** 3D structure of AS-48. A. Three-dimensional structure of AS-48 derived from the NMR structure of the protein (file 1E68 taken from the Brookhaven Protein Data Bank) using the program WebLab Viewer Pro 4.0 (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA, USA). Amino acids M<sup>1</sup> and W<sup>70</sup> appear separated but in the protein they are connected by a peptide bond. The five major helical regions of the protein spanning residues 9–21 ( $\alpha$ 1), 25–34 ( $\alpha$ 2), 37–45 ( $\alpha$ 3), 51–62 ( $\alpha$ 4) and 64–5 ( $\alpha$ 5) are indicated and showed with different colours (see B). B. Amino acid sequence of 188

AS-48. The regions of  $\alpha$ -helical structure are indicated with coloured boxes and arrows indicate the sites of initial proteolytic cleavage by thermolysin (Th) in 0.1% SDS and 15% TFE. C. Schematic representation of AS<sub>10/11</sub> and of fragments AS<sub>43-27</sub> and AS<sub>43/42-10</sub> produced by limited proteolysis of AS-48.

- Figure 7-R.** Limited proteolysis of AS-48 by thermolysin. RP-HPLC analyses of the proteolytic mixtures of AS-48 reacted with thermolysin in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (A), with the addition of 15% TFE (B) or in the presence of 0.1% SDS (C). Aliquots of the reaction mixtures after 8 hours (A and B) and 10 minutes (C) of incubation. 190
- Figure 8-R.** Spectroscopic characterization by circular dichroism of AS<sub>10/11</sub> nicked form and AS<sub>43-27</sub> and AS<sub>43,42-10</sub> fragments. (A) Far-UV CD spectra of AS-48 and AS<sub>10/11</sub>, in the presence and in the absence of 0.1% SDS. (B) Far-UV CD spectra of fragments AS<sub>43-27</sub> and AS<sub>42,43-10</sub>. Spectra were recorded at room temperature in 50 mM Tris-HCl, pH 7. 192
- Figure 9-R.** Thermal denaturation of AS<sub>10/11</sub>. (A) Melting profile of AS<sub>10/11</sub> in 10 mM phosphate buffer at pH 2.5. The temperature dependence of the dichroic signal at 222 nm was recorded. (B). Far-UV CD spectra of AS<sub>10/11</sub> at 9.7°C recorded before and after the thermal denaturation. 192
- Figure 10-R.** Inhibition halos of AS-48 and its derivatives against *E. faecalis* (A) and *L. monocytogenes* (B) after 18 h of incubation at 37°C. 1. Native AS-48 (control), 2. AS<sub>10/11</sub>, 3. AS<sub>43-27</sub>, 4. AS<sub>43,42-10</sub>, 5. 50% acetonitrile 0.05%TFA (solvent control). Samples (5  $\mu$ l) contained approximately a concentration of 0.3 mg/ml of each species. 193
- Figure 11-R.** Kinetics of the proteolysis reaction of AS-48 (0.7 mg/ml) in 0.1 M NaCl pH 3.0 with pepsin (1/100) at R/T. Chromatogram on the left shows initial time in which in can be noted the presence of native AS-48 and AS-48 ox. On the right is represented the reaction after two hours. 204
- Figure 12-R.** Limited proteolysis with trypsin (E/S 1/50) of AS-48 (1.1 mg/ml) in 50 mM Tris, 5 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.5 at 37 °C. Times 0, 1, 4, and 24 hours are shown. 205
- Figure 13-R.** Limited proteolysis with V8 of AS-48 (0.9 mg/ml) in 50 mM ammonium acetate pH 7.8. 206
- Figure 14-R.** Limited proteolysis of AS-48 (0.6 mg/ml) with proteinase K in 30% TFE. 207
- Figure 15-R.** Limited proteolysis of AS-48 (0.4 mg/ml) in 0.1% SDS with trypsin. 208
- Figure 16-R.** Limited proteolysis of AS-48 (0.8 mg/ml) with endoprotease V8 in presence of 0.1% SDS. 209

<b>Figure 17-R.</b> Circular permutation pathway for <i>as-48L</i> <sup>10/11</sup> and <i>as-48L</i> <sup>43-27</sup> construction.	218
<b>Figure 18-R.</b> Construction of pBAT-L <sup>10/11</sup> expression vector. After circular permutation, <i>as-48L</i> <sup>10/11</sup> gene was ligated into pGEM-T (A). Subsequently, the new plasmid pGEM-L <sup>10/11</sup> and pBAT-4m were digested with <i>Nco</i> I and <i>Bam</i> HI and ligated to generate pBAT-L <sup>10/11</sup> (B).	220
<b>Figure 19-R.</b> Expression assays in <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ ClpQ. Cells were grown at 28 °C with or without 2 mM IPTG. (1) Ladder; (2) pBAT-4m; (3) pBAT-4m with IPTG; (4) pBAT-L <sup>10/11-RI</sup> ; (5) pBAT-L <sup>10/11-RI</sup> with IPTG.	226
<b>Figure 20-R.</b> RT-PCR analysis of BL21(DE3) transformed with pBAT-L10/11 (left) and pBAT-L43-27 (right) induced with 1 mM IPTG at 28 °C after different induction times. (1) 100 bp ladder; (2) negative control; (3) 2h induction; (4) 4h induction; (5) 6h induction.	226
<b>Figure 21-R.</b> Figure 21-R. Expression analysis of FI10670 and FI10668 (A) and FI10679 and FI10667 (B) using different concentrations of nisin. (1) Ladder. (2) Uninduced control. (3) 10 ng/ml nisin. (4) 100 ng/ml nisin.	229
<b>Figure 22-R.</b> Expression assays of FI10673 and FI10679 with different nisin concentration. (1) Ladder. (2) Uninduced. (3) 1 ng/ml nisin (4) 10 ng/ml nisin (5) 100 ng/ml nisin.	229
<b>Figura 1-D.</b> Secuencia de las nuevas moléculas de AS-48 lineales diseñadas	251
<b>Figura 2-D.</b> Cromatogramas correspondientes a la proteólisis con termolisina en presencia de porcentajes crecientes de TFE. Se observa un perfil similar de fragmentación que requiere más tiempo a medida que aumenta el porcentaje de TFE en la mezcla.	254
<b>Figura 3-D.</b> Esquema propuesto para la cinética de proteólisis de AS-48	255
<b>Figura 4-D.</b> Comparación de las moléculas de AS-48 obtenidas mediante proteólisis controlada en relación con el péptido de síntesis química BC-49-69.	259

## Índice de tablas

<b>Tabla 1-I.</b> Clasificación de las bacteriocinas de las BAL.	16
<b>Tabla 2-I.</b> Diferencias entre Bacteriocinas y Antibióticos (Cleveland <i>et al.</i> , 2001).	19
<b>Tabla 3-I.</b> Proteínas circulares descritas.	21
<b>Tabla 4-I.</b> Características de los sistemas de expresión heteróloga de proteínas más comunes. Adaptada de Ma <i>et al.</i> , 2003.	51
<b>Tabla 1-MM.</b> Microorganismos utilizados en este trabajo y características más relevantes. AS-48 <sup>+</sup> : productor de AS-48, AS-48 <sup>s</sup> : sensible a AS-48, AS-48 <sup>r</sup> : resistente a AS-48, CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.	85
<b>Tabla 2-MM.</b> Plásmidos utilizados en este trabajo. Ap <sup>r</sup> resistencia a ampicilina. Cm <sup>r</sup> resistencia a cloramfenicol. Em <sup>r</sup> resistencia a eritromicina. Km <sup>r</sup> resistencia a kanamicina.	86
<b>Tabla 3-MM.</b> Proporciones de solución X y de solución Y necesarias para preparar el tampón fosfato a diferentes pHs.	93
<b>Tabla 4-MM.</b> Oligonucleótidos empleados en este trabajo.	109
<b>Tabla 5-MM.</b> Sondas utilizadas en las hibridaciones ADN-ARN.	113
<b>Tabla 1-R.</b> Microorganisms and plasmids used in this work. Ap <sup>R</sup> : Ampicillin resistance; Cm <sup>R</sup> : chloramphenicol resistance; AS-48 <sup>S</sup> : AS-48 sensitive.	153
<b>Table 2-R.</b> Primers used for PCR amplifications, RT-PCR and sequencing. In the primers used for circular permutation, the region that hybridized with the template is underlined.	154
<b>Table 3-R.</b> OD ( $A_{600\text{ nm}}$ ) of <i>E. coli</i> REG-1 transformants harbouring pALEX-L <sup>23/24</sup> or pALEX-L <sup>48/49</sup> plasmids after induction with 2mM salicylate at 28 °C during different induction times.	164
<b>Table 4-R.</b> Primer used in spliced overlap extension and sequencing.	178
<b>Table 5-R.</b> Strains generated during intermediate cloning steps and to construct expression vectors for <i>Lactococcus lactis</i> . Ap <sup>R</sup> : ampicillin resistant plasmid derived from either pCR2.1 or pGEM-T. Cm <sup>R</sup> : chloramphenicol resistant plasmid derived from pTG262. Ery <sup>R</sup> : erythromycin resistance. Nis <sup>R/r</sup> : nisin resistance.	178
<b>Table 6-R.</b> Molecular masses of fragments of AS-48 obtained by proteolysis with thermolysin in 0.1% SDS or 15% TFE. (a)	189

Fragments obtained by proteolysis of AS-48 with thermolysin in 0.1% SDS or 15% TFE (Figure 2). (b) Molecular masses calculated from the amino acid sequence of AS-48. Mass values above 4500 Da are given as average molecular masses. (c) Experimental molecular masses determined by ESI-MS.

- Table 7-R.** Bacterial strains used and plasmids generated in this work. Nis<sup>R</sup>, nisin resistant; Nis<sup>-</sup>, unable to produce nisin; *usp*, presence of the *usp45* gene; Em<sup>R</sup>, erythromycin resistant; Cm<sup>R</sup>, chloramphenicol resistant. 219
- Table 8-R.** Bacterial lactococcal strains used and plasmids generated in this work. Nis<sup>R</sup>, nisin resistant; Nis<sup>-</sup>, unable to produce nisin; Usp<sub>SP</sub>, *usp45* signal peptide; LcPS; lactococcal signal peptide; pIL253-64 (as-48CC<sub>1</sub>DD<sub>1</sub>) that confers a partial AS-48 resistance; Em<sup>R</sup>, erythromycin resistant; Cm<sup>R</sup>, chloramphenicol resistant. 222
- Table 9-R.** Synthetic oligonucleotides used in this work. Underlined sequences are those which do not hybridize with the template. 223