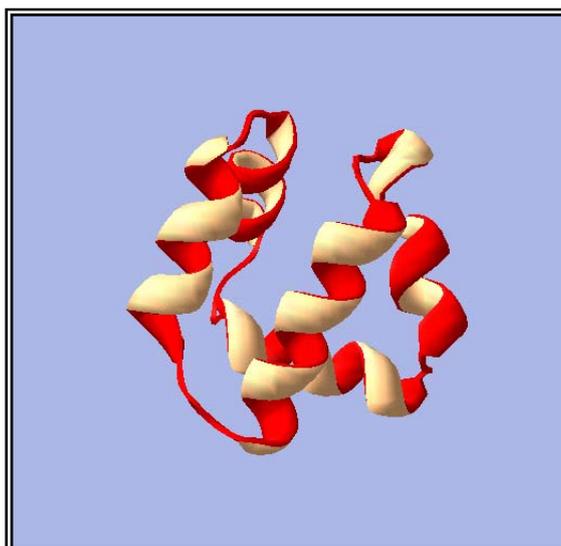




UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



**CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES DE LA
ENTEROCINA AS-48 OBTENIDAS MEDIANTE
MUTAGÉNESIS DIRIGIDA**



TESIS DOCTORAL

MARINA SÁNCHEZ HIDALGO

Granada

2006

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: marina Sánchez Hidalgo
D.L.: Gr. 1873 - 2006
ISBN: 978-84-338-4103-2



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



**CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES DE LA
ENTEROCINA AS-48 OBTENIDAS MEDIANTE
MUTAGÉNESIS DIRIGIDA**

TESIS DOCTORAL

MARINA SÁNCHEZ HIDALGO

Granada

2006

Tesis Doctoral dirigida por las Dras. Mercedes Maqueda Abreu y Eva Valdivia Martínez, Catedráticas de Microbiología de la Universidad de Granada, y por el Dr. Manuel Martínez Bueno, Profesor Titular de la Universidad de Granada.

CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES DE LA ENTEROCINA AS-48 OBTENIDAS MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.

Memoria presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas, Marina Sánchez Hidalgo, para optar al título de Doctora en Ciencias.

La Doctoranda,

Marina Sánchez Hidalgo

Vº Bº los Directores del Trabajo,

Mercedes Maqueda Abreu

Eva Valdivia Martínez

Manuel Martínez Bueno

Granada, 2006

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada durante los años 2001-2006, dentro del Grupo de Investigación “Estudio de sustancias antagonistas producidas por microorganismos”

La Doctoranda ha disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia durante los años 2001-2005 (referencia AP/2000-2064). Asimismo, ha sido beneficiaria de dos ayudas del Ministerio de Educación y Ciencia para realizar dos estancias breves en el European Molecular Biology Laboratory (EMBL) de Heidelberg (Alemania) en 2002 y 2003.

La investigación ha sido financiada a través de los proyectos “Obtención de variantes de la bacteriocina AS-48 mediante mutagénesis dirigida, con propiedades físico-químicas y actividad biológicas mejoradas” (BIO2001-3237)) financiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y “Expresión y caracterización de mutantes del péptido cíclico AS-48” (BIO205-01544) financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia y por el Plan Andaluz de Investigación (CVI 160).

De la presente Tesis Doctoral así como del periodo de investigación tutelada para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados (DEA), se han extraído las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Congresos:

- Sánchez-Hidalgo, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Abriouel, H., Valdivia, E. y Martínez-Bueno, M. 2002. The protein sequence and genetic determinants of enterocin EJ97. 1st International Symposium of Enterococci in Foods. Berlin (Alemania).
- Sánchez-Hidalgo, M., Martínez-Bueno, M., Fernández-Escamilla, A, Serrano, L., Valdivia, E y Maqueda, M. 2004. Obtención de una variante de la enterocina AS-48 carente de actividad biológica. V Reunión Grupo Biología Molecular. Jaca. (España).
- Sánchez-Hidalgo, M., Martínez-Bueno, M., Fernández-Escamilla, A., Serrano, L., Valdivia, E. y Maqueda, M. 2004. Obtención de variantes de un péptido catiónico producido por enterococos con actividad biológica. IV Reencontré Andalou-Marocaine sus la Chimie des Produits Naturels y I Congres Maroco-Espagnol sur la Chimie Organique. Marrakech. (Marruecos).
- Sánchez-Hidalgo, M., Fernández-Escamilla, A., Martínez-Bueno, M., Serrano, L., Valdivia, E. y Maqueda, M. 2006. Effect of amino acid substitutions in the biological activity of enterocin AS-48. Food and Medical Applications of Antimicrobial Peptides. Nantes. (Francia).
- Sánchez-Hidalgo, M., Fernández-Escamilla, A., Martínez-Bueno, M., Serrano, L., Valdivia, E. y Maqueda, M. 2006. Influence of mutated residues of enterocin AS-48 on bactericidal activity, physico-chemical properties and structure. 2nd FEMS Congress of European Microbiologists. Madrid. (Spain).

Publicaciones:

- Sánchez-Hidalgo, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Abriouel, H., Valdivia, E., and Martínez-Bueno, M. (2002) The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* are located on a conjugative plasmid. *Appl. Env. Microbiol.* **69**: 1633-1641.

- Sánchez-Hidalgo, M., M. Maqueda, A. Gálvez, H. Abriouel, E. Valdivia y M. Martínez-Bueno. Identificación de los determinantes genéticos responsables de la enterocina EJ9. Bacteriocinas de bacterias lácticas en la mejora de la calidad de los alimentos. 2003. 2ª reunión. INIA. NIPO 404-03-013-1. 2003, pp 37-48.
- Fernández, M., Sánchez-Hidalgo, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., and Maqueda, M. Transcriptional analysis and regulation of the *as48ABC* gene cluster, essential to AS-48 biogenesis *J. Bacteriol.* (Sometido a publicación).
- Sánchez-Hidalgo, M., Martínez-Bueno, M., Fernández-Escamilla, A.M., Valdivia, E., Serrano, L. and Maqueda, M. Effect of Amino Acid Substitutions on the Activity of the Enterocin AS-48. *Appl. Env. Microbiol* (En preparación).

Agradecimientos

En estas páginas quiero expresar mi gratitud a todas las personas que de una manera u otra me han ayudado durante la realización de esta Tesis Doctoral:

A los directores de este trabajo, los Dres. Mercedes Maqueda, Eva Valdivia y Manuel Martínez, por todo lo que me han enseñado a lo largo de estos años en el laboratorio, y su constante apoyo para seguir adelante.

A todos los profesores del Departamento de Microbiología, especialmente a su Director, el Dr. José M^a Arias.

A Conchi y M^a Carmen, por echarme una mano siempre que lo he necesitado con los papeleos, las fotocopias, los autoclaves...además de por esos ratitos de charla.

Al Dr. Luis Serrano, por haberme acogido en su laboratorio del EMBL en Heidelberg y por su ayuda durante mi estancia.

A los Dres. Frederic Rousseau y Joost Schymkovitz, muchas gracias por su ayuda para la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Manuel Rico, por haberme permitido trabajar en su laboratorio y por su inestimable ayuda.

Al Dr. Antonio Gálvez, que me ha ayudado siempre con mis múltiples dudas sobre la purificación de AS-48.

A la Dra. Ana M^a Fernández, por todo lo que he aprendido de ella tanto a nivel científico como personal y por toda su ayuda, sin la cual este trabajo no hubiera podido salir adelante. ¡Gracias de corazón Anuschka!.

A mis amigos de Valdepeñas, Ballesteros y Granada: Fátima, Carmen Mari, Petri, M^a Rosa, Adela, Loli, Toñi, M^a Carmen, Isabel, Paco, Pedro, Bego, Elo, Laura, Mari y Sandra, por todos los buenos ratos y las risas.

A todos mis compañeros del laboratorio durante estos años, por haber creado el mejor ambiente de trabajo que se puede tener. Gracias por todos los cafés, cigarros pasivos, “cutreríos” y por compartir conmigo penas, alegrías y juergas: Arantxa, Mati, Pedro, Manolo, Jessi, Platero, Samir, Ana, Fouad, Vicky, Thierry, Esther, Fadwa,

Fernando, Chiara, Hikmate, Magdalena, Rosa, Araceli, M^a Victoria, Juanma, M^a del Mar, Samira, Teresa, Alba, Alberto, Alfredo, Ana, Jana, Lydia.

A Olga, la mejor experta en estrellas de carbono, por tantos años de amistad incondicional y sincera.

A toda mi familia, en especial a mis abuelos, por su cariño y por todo lo que han rezado por mi.

A mis padres, por todo su apoyo y su cariño y porque sin ellos no habría llegado hasta aquí.

A Lucía, por ser mi amiga además de mi hermana y por todo lo que nos reímos juntas. Gracias por aguantarme tantos años.

A Juan, para el que no existen palabras suficientes que expresen todo mi agradecimiento y amor. Gracias por apoyarme en todo, por tus consejos y ánimo y por estar a mi lado siempre.

A mi familia y a Juan

***“Sorprendernos por algo es el primer paso
de la mente hacia el descubrimiento”***

(Louis Pasteur)

ABSTRACT

Bacterial antagonism mediated by ribosomally synthesised peptides has gained considerable attention in recent years because of its potential applications in the control of undesirable microbiota. These peptides, generally referred to as bacteriocins, are defined as a heterogeneous group of ribosomally synthesised, proteinaceous substances (with or without further modifications) extracellularly secreted by many Gram-positive and some Gram-negative bacteria. Their mode of activity is primarily bactericidal and directed against closely related strains and species (Tagg, 1976; Tagg *et al.*, 1992; Jack *et al.*, 1995; Diep and Nes, 2002). These peptides are nearly all cationic and very often amphiphilic, which is reflected in the fact that many of these peptides kill their target cells by accumulation in the membrane causing increasing permeability and loss of barrier functions (Nissen-Meyer and Nes, 1997).

AS-48 is a 70-residue α -helical bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48 and encoded by the 68-kb pheromone-responsive plasmid pMB2. AS-48 is a cyclic, hydrophobic, cationic peptide containing no lanthionine residues and is ribosomally synthesized and post-translationally modified by a head-to-tail peptide bond (Gálvez *et al.*, 1989a; Samyn *et al.*, 1994). The coordinated expression of the *as-48* biosynthetic gene cluster, *as-48ABCC₁DD₁EFGH*, is involved in AS-48 production and immunity (Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2003). AS-48 exerts a bactericidal action on the cytoplasmic membrane of most Gram-positive and some Gram-negative bacteria (Abriouel *et al.*, 1998; Ananou *et al.*, 2004, 2005a; Gálvez *et al.*, 1989b; Mendoza *et al.*, 1999), in which inserts in a voltage-independent manner and open pores, leading to the dissipation of the proton motive force and cell death. Features of AS-48, such as its broad-spectrum antimicrobial activity, stability at a wide range of temperatures and pH values, and sensitivity to digestive proteases, point to this enterocin as a promising alternative to chemical preservatives in foodstuffs (Gálvez *et al.*, 1986; Abriouel *et al.*, 1998; Ananou *et al.*, 2004, 2005a, b; Muñoz *et al.*, 2004).

The three-dimensional structure of bacteriocin AS-48 established by NMR (González *et al.*, 2000) and X-ray (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003) shows that the molecule folds in an all- α -helix manner and the global structure is fairly compact, with the hydrophobic side chains of the α -helices forming the core of the protein. The hydrophobic surface is mainly located on the outer part of helices 1, 2, and 3. The head-

to-tail union between Trp⁷⁰ and Met¹ lies in the middle of helix 5 and has a marked effect on the stability of the 3D structure. AS-48 has 14 charged residues (8 Lys, 2 Arg, and 4 Glu), which make it strongly positive charged (pI of 10.5). This exceptionally high net positive charge becomes enhanced at pH 3, where all 4 Glu side chains are presumably protonated.

In this work, we have established a strategy for site-directed mutagenesis in *as-48A* structural gene using the JH2-2 strain harbouring a pAM401-81_X plasmid (25-kb) carrying the *as-48* gene cluster. In addition, we have established that the intergenic region between the *as-48A-B* genes is decisive for the AS-48 expression, since a 3-base-pair substitution, to create a *XhoI* restriction site, resulted in a hypo-producer phenotype. Transcriptional analysis of the *E. faecalis* wild-type and mutant by primer extension, northern blot and RT-PCR supported that the *as-48ABC* are constitutively transcribed from the P_A promoter located upstream of *as-48A*. Moreover, translation of the AS-48 peptide is uncoupled and controlled at the post-transcriptional level by processing of the unstable *as-48ABC* mRNA at the secondary structure located between *as-48A* and *as-48B*, generating two RNA species with different half-lives.

In an attempt to determine the mode of action of this bacteriocin, this study has been focused in the role of seven residues that have been drastically changed (E4A, E20A, E58A, A53S, W24A, G13K and L40K) that could be involved in the membrane insertion or implicated in the hydrophobic nature of AS-48. The results demonstrate that E20A, A53S, G13K and L40K remained almost fully active, but those mutated peptides in which the net negative charge was reduced by one, by replacing each charged residue with Ala (E4A, E58A), exhibited a 10-35-fold reduction in antimicrobial activities against the majority of the Gram-positive bacteria tested. The unquestionable residue involved in the activity was W24, since its replacement with Ala caused a decrease in activity of at least 40%.

Secondary structure content of mutants has been monitored using CD spectroscopy. In addition, we have study the stability of AS-48 mutants, using heat and guanidinium hydrochloride (GdnHCl) as denaturant reagents for the estimation of the thermodynamic parameters of unfolding. All mutants showed less stability than the wild-type molecule. Furthermore, the GdnHCl data analysis showed that an excellent fit of experimental data is obtained when using a three-state model, indicating that unfolding mechanism of mutants and wild-type molecules involves and intermediate state.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS CATIÓNICOS	3
1.1. Clasificación de los Péptidos Antimicrobianos Catiónicos	4
1.2. Mecanismo de acción de los Péptidos Antimicrobianos Catiónicos	6
1.3. Péptidos Antimicrobianos producidos por Bacterias: Bacteriocinas	8
2. PROTEÍNAS CIRCULARES	11
2.1. Proteínas Circulares Naturales	12
2.1.1. Proteínas Circulares producidas por Microorganismos	15
2.1.2. Proteínas Circulares producidas por Plantas: Ciclotidos	20
2.1.3. Proteínas Circulares de Mamíferos: θ -Defensinas	26
2.2. Proteínas Circulares Sintéticas	27
2.3. Mecanismos propuestos para la biosíntesis de los Péptidos Circulares	29
3. BACTERIOCINA AS-48	35
3.1. Actividad biológica y modo de acción de AS-48	36
3.2. Características bioquímicas de AS-48	39
3.3. Características estructurales de AS-48	40
3.4. Relación estructura-función	45
3.5. Estabilidad de AS-48	48
3.6. Determinantes genéticos de AS-48	49
3.7. Biosíntesis de AS-48	53
OBJETIVOS	55
MATERIAL Y MÉTODOS	59
1. MICROORGANISMOS	61
2. PLÁSMIDOS	62
3. MEDIOS DE CULTIVO	63
3.1. Medios de crecimiento generales	63
3.2. Medio Complejo (MC)	64

3.3. Medios empleados para el ensayo de la actividad antibacteriana	65
3.4. Medios empleados en los experimentos de transformación genética	66
3.5. Medios empleados en la conservación de organismos	67
3.6. Antibióticos empleados en los medios de cultivo	67
4. PREPARACIÓN DE TAMPÓN FOSFATO SÓDICO (PB) pH 5,8-8	68
5. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ADN	69
5.1. Técnicas de aislamiento de ADN plasmídico	69
5.1.1. Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala (minipreparaciones)	69
5.1.2. Aislamiento de ADN plasmídico a gran escala (maxipreparaciones)	72
5.1.3. Extracción rápida de ADN	73
5.1.4. Extracción mediante preparado comercial	74
5.2. Técnicas de análisis de ADN	74
5.2.1. Electroforesis en gel de agarosa	74
5.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	75
5.2.3. Purificación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa	76
5.2.4. Determinación de la concentración de ADN	77
5.2.5. Eliminación del ARN contaminante en soluciones de ADN	77
5.2.6. Precipitación de ADN	78
5.2.7. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción	78
5.3. Técnicas para la ligación de fragmentos de ADN	79
5.3.1. Desfosforilación del vector de ligación	79
5.3.2. Ligación del ADN	79
5.3.3. Ligación de productos de PCR en pGEM-T	80
5.3.4. Ligación utilizando el “Rapid Ligation Kit”	80
5.3.5. Diálisis de la mezcla de ligación	80
5.4. Amplificación del ADN mediante PCR	80
5.4.1. Purificación de los productos de PCR	81
5.5. Mutagénesis dirigida con oligonucleótidos	82
5.5.1. Método de extensión de fragmentos que se solapan	82
5.5.2. Mutagénesis dirigida mediante PCR inversa	83
5.6. Oligonucleótidos de síntesis empleados	84

5.6.1. Diseño de oligonucleótidos para la mutagénesis	84
5.6.2. Oligonucleótidos empleados	85
5.7. Secuenciación del ADN	87
6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ARN	87
6.1. Extracción del ARN total en <i>Enterococcus faecalis</i>	87
6.1.1. Método del fenol caliente	87
6.1.2. Extracción mediante Fastprep	89
6.2. Determinación de la concentración de ARN	89
6.3. Transferencia e hibridación de ARN (Northern Blotting)	89
6.3.1. Preparación de sondas no radioactivas marcadas con digoxigenina-11-UTP mediante PCR	89
6.3.2. Sondas empleadas	90
6.3.3. Electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa con formaldehído	90
6.3.4. Transferencia de ARN a membranas de nylon (Northern Blot)	92
6.3.5. Prehibridación e hibridación ADN-ARN	93
6.3.6. Revelado inmunológico	93
6.3.7. Estimación del tamaño de los ARNs	94
6.4. Electroforesis de ARN en geles de agarosa	95
6.5. RT-PCR semicuantitativa	95
6.6. Extensión reversa a partir de cebador (Primer Extension)	96
6.6.1. Marcaje de oligonucleótidos mediante fosforilación	96
6.6.2. Hibridación	97
6.6.3. Extensión reversa a partir de cebador	97
6.6.4. Electroforesis y secuenciación	98
7. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE MICROORGANISMOS	99
7.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5- α mediante el método del cloruro de calcio	99
7.1.1. Preparación de células competentes	99
7.1.2. Transformación	99
7.2. Transformación de <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	100
7.3. Electroporación de <i>Escherichia coli</i> DH5- α	101
7.3.1. Preparación de células electrocompetentes	101

7.3.2. Electroporación	101
7.4. Electroporación de <i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2	102
7.4.1. Preparación de células electrocompetentes	102
7.4.2. Electroporación	102
8. DETECCIÓN Y VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y RESISTENCIA FRENTE A AS-8 Y SUS VARIANTES	103
8.1. Técnica de la doble capa	103
8.2. Técnica de las gotas	103
8.3. Técnica de los pocillos	104
8.4. Curvas de crecimiento y producción de bacteriocina	104
8.5. Determinación de la concentración mínima inhibidora	105
8.6. Determinación de la actividad hemolítica	105
9. PURIFICACIÓN DE LA ENTEROCINA AS-48 Y DE LAS VARIANTES OBTENIDAS	105
9.1. Producción en medio líquido	105
9.2. Cromatografía de intercambio catiónico	106
9.3. Cromatografía de fase reversa sobre soporte sólido (C-18)	106
9.4. Cromatografía líquida de fase reversa de alta resolución (HPLC)	107
9.4.1. Escala semipreparativa	108
9.4.2. Escala analítica	108
9.5. Liofilización	108
9.6. Diálisis de las muestras	109
10. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	109
10.1. Determinación de la concentración de proteínas	109
10.1.1. Método de Bradford	109
10.1.2. Determinación de la concentración de AS-48 y las variantes a partir del coeficiente de extinción molar	110
10.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	111
10.2.1. Preparación de los geles de poliacrilamida	111
10.2.2. Condiciones de desarrollo de la electroforesis	112
10.2.3. Tinción de los geles con azul de Coomassie	113

10.3. Detección de AS-48 y los mutantes mediante transferencia a membranas de nitrocelulosa y revelado con anticuerpos específicos (Western Blotting)	114
10.3.1. Transferencia a membranas de nitrocelulosa	114
10.3.2. Revelado inmunológico	114
10.4. Estudio de la influencia de diversos agentes químico-físicos sobre AS-48 y sus variantes	115
10.4.1. Entrecruzamiento con formaldehído	115
10.4.2. Influencia del pH en la formación de oligómeros	116
10.4.3. Influencia del pH en la estabilidad térmica	116
10.4.4. Influencia del pH y la concentración de bacteriocina en la actividad biológica	117
10.5. Estudios de dicroísmo circular (DC)	117
10.5.1. Estudios de DC a temperatura constante	121
10.5.2. Estudios de desnaturalización térmica mediante DC	122
10.5.3. Estudio del desplegamiento y del replegamiento en presencia de cloruro de guanidinio mediante DC.	123
11. PROGRAMAS INFORMÁTICOS UTILIZADOS	127
 RESULTADOS	 131
 CAPÍTULO I: CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE <i>E. faecalis</i> JH2-2 (pAM401-81_X)	 133
1.1. Creación de una diana <i>Xho</i> I en la región intergénica <i>as48A-B</i>	133
1.2. Restitución de la región <i>as-48</i> con el sitio <i>Xho</i> I	137
1.3. Estudio fenotípico de <i>E. faecalis</i> JH2-2(pAM401-81 _X)	137
<i>a) Producción de bacteriocina en medio sólido</i>	137
<i>b) Curva de crecimiento y de producción de bacteriocina en medio líquido</i>	138
<i>c) Estudio de la resistencia de JH2-2(pAM401-81_X) frente a AS-48</i>	139
 CAPÍTULO II: ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE LA REGIÓN <i>as-48ABC</i>	 141

2.1. Estudios de hibridación ADN-ARN (Northern Blotting)	141
2.2. Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa	142
2.3. Predicción de estructuras secundarias en el ARNm	144
2.4. Identificación del punto de inicio de la transcripción	146
CAPÍTULO III: OBTENCIÓN DE VARIANTES DE AS-48 MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA. ESTUDIO FENOTÍPICO	149
3.1. Diseño y obtención de los mutantes	149
<i>a) Cambios para identificar la superficie implicada en la actividad biológica de AS-48</i>	149
<i>b) Obtención de variantes con menor hidrofobicidad</i>	150
<i>b) Mutagénesis dirigida en el gen estructural as-48A</i>	152
3.2. Análisis de los cambios fenotípicos que confieren las diversas variantes obtenidas en relación al fenotipo silvestre	153
<i>a) Actividad biológica en medio sólido</i>	153
<i>b) Actividad biológica en medio líquido</i>	155
<i>c) Resistencia frente a AS-48</i>	157
<i>d) Ensayo de la actividad hemolítica</i>	158
3.3. Análisis de expresión del gen <i>as-48A</i> en JH2-2(pAM401-81 _X) y en los transformantes JH2-2(pAM401-81 _{X-Mut})	158
CAPÍTULO IV: PURIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE LAS VARIANTES DE AS-48	161
4.1. Purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico	161
4.2. Purificación mediante cromatografía de fase reversa sobre soporte sólido (C18)	164
4.3. Purificación mediante RP-HPLC	165
4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	167
4.5. Detección de AS-48 y los mutantes mediante transferencia a membranas de nitrocelulosa y revelado con anticuerpos específicos	168

CAPÍTULO V: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DIVERSOS AGENTES QUIMICO-FÍSICOS SOBRE AS-48 Y LAS VARIANTES OBTENIDAS	169
5.1. Características de las variantes AS-48 ^M	169
5.2. Formación de asociados moleculares de las variantes AS-48 ^M	170
5.3. Influencia del pH y de la concentración de bacteriocina en la actividad biológica. Determinación de la Concentración Mínima Inhibidora (CMI)	172
5.4. Estudio de la estabilidad térmica de las variantes AS-48 ^M y de la influencia del pH en la misma.	177
CAPÍTULO VI: ESTUDIOS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE AS-48 Y DE LAS VARIANTES AS-48^M	179
6.1. Espectros de DC en el ultravioleta lejano	179
6.2. Desnaturalización térmica	181
6.3. Desnaturalización en presencia de cloruro de guanidinio (GdnHCl)	183
<i>Análisis de las curvas de desplegamiento/replegamiento de AS-48 y los mutantes en presencia de GdnHCl.</i>	186
<i>Espectrometría de masas de AS-48</i>	189
CAPÍTULO VII: ESTUDIOS PREDICTIVOS DE AS-48 Y DE LOS MUTANTES	191
7.1. Predicción de segmentos transmembrana	191
7.2. Estudio de la hidrofobicidad y la anfipatía	192
7.3. Estudio de predicción de agregaciones empleando el programa TANGO	198
DISCUSIÓN	203
<i>Influencia de la inserción de un sitio XhoI en la región intergénica as48A-B en la expresión de los genes as-48ABC</i>	205
<i>Características estructurales de AS-48 y diseño de las variantes AS-48^M</i>	211
<i>Obtención de las variantes de AS-48 mediante mutagénesis dirigida.</i>	
<i>Estudio fenotípico</i>	215

<i>Purificación y detección de las variantes de AS-48^M</i>	219
<i>Estudio de la influencia de diversos factores físico-químicos sobre las variantes AS-48^M</i>	223
<i>Estudios de dicroísmo circular de AS-48 y sus variantes a temperatura constante</i>	230
<i>Estudios de desnaturalización térmica mediante DC</i>	233
<i>Estudios de desnaturalización en presencia de GdnHCl mediante DC</i>	236
<i>Análisis de predicción sobre los mutantes AS-48^M</i>	238
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	241
BIBLIOGRAFÍA	247

Introducción

1. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS CATIÓNICOS

Los trabajos científicos sobre antagonismo bacteriano mediado por moléculas de naturaleza proteica que se iniciaron durante la década de los años ochenta constituyen hoy un área de investigación relevante, cuyos resultados se han plasmado en la descripción de una amplia familia de sustancias antimicrobianas, conocidas como péptidos antimicrobianos (PAMs), que son producidas por muchos tipos celulares en una gran variedad de formas de vida, encontrándose en protozoos, procariotas, animales y plantas (Boman, 1995; Brogden, 2005; Bulet *et al.*, 2004; Cammue *et al.*, 1994; Charlet *et al.*, 1996; Epanand y Vogel, 1999; Ganz, 2003; Leippe, 1999; Nes *et al.*, 2002; Nissen-Meyer y Nes, 1997; García-Olmedo *et al.*, 1998; Pag *et al.*, 2002; Papaggiani, 2003; Sahl, 1994; Zasloff, 2002). Algunos se producen de forma constitutiva y otros se sintetizan en respuesta a un ataque microbiano (Gallo *et al.*, 2002; Dennison *et al.*, 2005a). Probablemente, uno de sus atractivos ha sido considerar que este tipo de moléculas representan un mecanismo de defensa ancestral no explorado (Maxwell *et al.*, 2003), y que constituyen una alternativa a la difícil situación planteada hoy por la aparición de resistencias a los antibióticos (Bachere, 2003; Thomma *et al.*, 2003; Dennison *et al.*, 2005a).

Entre las proteínas y péptidos identificados hay una gran diversidad de estructuras primarias (Epanand y Vogel, 1999), pero en la mayoría de los casos son moléculas catiónicas de síntesis ribosómica y frecuentemente anfifílicas (Hancock y Diamon, 2000), lo que dirige su acción hacia la membrana, en la que interaccionan con las estructuras cargadas negativamente conduciendo a su permeabilización (Kamysz *et al.*, 2003; Nissen-Meyer y Nes, 1997). Hoy se sabe que los péptidos antimicrobianos no sólo producen la permeabilización de las membranas bacterianas, sino que poseen otras funciones como son la inhibición de la síntesis de proteínas o el ADN, la actividad antitumoral, la estimulación de la proliferación celular o la angiogénesis (Kamysz *et al.*, 2003).

1.1. Clasificación de los Péptidos Antimicrobianos Catiónicos

Los organismos diana de los péptidos antimicrobianos son muy diversos (virus envueltos, bacterias, hongos, tripanosomas, plasmodios y células cancerosas) pero todos ellos tienen en común la posesión de una membrana con la superficie cargada negativamente y con bajo contenido en colesterol, así como un gran potencial eléctrico transmembrana (Hancock, 1997; Hancock y Chapple, 1999).

Los péptidos antimicrobianos se han clasificado de acuerdo con su estructura secundaria y también según sus estructuras antipáticas. De acuerdo con su estructura secundaria, los péptidos antimicrobianos catiónicos se clasifican en varios grupos (Epanand y Vogel, 1999; Toke 2005; Bulet *et al.*, 2004; Kamysz *et al.*, 2003; Leher y Ganz, 1999; Hancock y Diamon, 2000):

- a. *Péptidos lineales que forman hélices anfipáticas o hidrófobas.* Son péptidos desestructurados que forman hélices α anfipáticas al entrar en contacto con las membranas. Un ejemplo son las magaininas de *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987) o las cecropinas de insectos (Steiner, 1982).
- b. *Péptidos cíclicos y pequeñas proteínas que forman estructuras en lámina beta.* Se trata de péptidos que presentan una estructura en lámina β antiparalela. Este tipo de estructuras se ven favorecidas en muchos casos porque los péptidos son cíclicos. La ciclación puede ocurrir por la formación de un puente disulfuro (protegrinas, Kokryakov *et al.*, 1993), de tres o cuatro puentes disulfuro (α - y β -defensinas, Ganz y Lehrer, 1998) o por la circularización de la cadena peptídica (gramicidina S, polimixina B, tirocidinas, θ -defensinas).
- c. *Péptidos con composición aminoacídica única o irregular.* Son péptidos que poseen una secuencia rica en algún aminoácido. Como ejemplos aparecen las histatinas, ricas en His (Brewer *et al.*, 1998; Helmerhorst *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 1998), las profeninas, ricas en Pro (Harwig *et al.*, 1995) y las indolicinas, ricas en Trp (Selsted *et al.*, 1992; Falla *et al.*, 1996). El Trp no suele ser muy abundante en las proteínas, pero es importante para la inserción de péptidos antimicrobianos en la membrana porque tiende a situarse en la interfase hidrófila/hidrófoba de la bicapa lipídica y favorecen el anclaje de la cadena peptídica a las cabezas fosfolipídicas (Yau *et al.*, 1998; Persson *et al.*, 1998; Ladokhin *et al.*, 1997; Schibli *et al.*, 2002)

- d. *Lipopéptidos con un grupo amino-alcohol terminal (“Peptaibols”)*. Poseen una gran proporción de ácido α -amino-isobutírico (Aib), que favorece la formación de hélices 3_{10} . (Monaco *et al.*, 1998) 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).
- e. *Péptidos macrocíclicos “anudados”: Ciclotidos*. Son péptidos cíclicos de unos 30 aminoácidos producidos por la familia de las *Rubiaceae* que poseen un motivo característico llamado “nudo de cistina”, consistente en que un puente disulfuro 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. Los ciclotidos se tratarán con más profundidad en el capítulo 2.1.2.
- f. *Péptidos originados por digestión proteolítica de grandes proteínas catiónicas*. El ejemplo más significativo es la lactoferrina (Ellison y Giehl, 1991).

De acuerdo con sus estructuras anfipáticas (Dennison *et al.*, 2005a) se establecen los siguientes grupos:

1. *Anfipatía primaria*. Poseen un segmento central hidrófobo flanqueado por residuos catiónicos (ej: indolicina y tripticina).
2. *Anfipatía secundaria*. La presentan algunos péptidos antimicrobianos con estructura secundaria en hélice α . Consiste en la segregación de los residuos hidrófilos e hidrófobos a lo largo del eje de la hélice. Ej: magainina 1.
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.

No existe una correlación entre la actividad de los PAMs y su pI, peso molecular o longitud. Sin embargo, se ha visto que la posesión de residuos de Lys y Arg ayuda a los péptidos a alcanzar las membranas bacterianas, aunque también participan en el mecanismo de permeabilización. La anfipatía y la hidrofobicidad sí son factores determinantes para la actividad permeabilizadora de los PAMs (Dennison *et al.*, 2005a) Recientemente se ha visto

que algunos PAMs insertan sus hélices de manera oblicua para favorecer la permeabilización de la membrana (Dennison *et al.*, 2005b).

1.2. Mecanismo de acción de los Péptidos Antimicrobianos Catiónicos

La muerte celular mediada por péptidos antimicrobianos catiónicos ocurre en una serie de pasos, con independencia del tiempo requerido o la especificidad del mecanismo antimicrobiano (Brogden, 2005):

1. Atracción: el péptido catiónico se une mediante interacciones electrostáticas a la superficie de la membrana cargada negativamente (LPS en Gram- y ácidos teicoicos en Gram+)
2. Adhesión: A baja relación péptido/lípido, los péptidos en hélice α , en lámina β y las θ -defensinas se adhieren y penetran entre las cabezas fosfolipídicas en un estado inactivo que compacta la membrana.
3. Inserción del péptido y permeabilización de la membrana: 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.

La formación de estos poros se ha explicado mediante 3 mecanismos (Figura 1) que dependen de las características químico-físicas del péptido antimicrobiano y de la composición de la membrana (Ganz y Lehrer, 1999; Chmiel, 2001; Brogden, 2005; Toke, 2005; Kamysz *et al.*, 2003):

a) Modelo en barril:

Cuando dominan las interacciones hidrófobas, el péptido se inserta en la membrana perpendicularmente, formando un haz en la membrana a modo de barril con un lumen central, en el que la parte hidrófoba interacciona con las cadenas de los fosfolípidos y la parte hidrófila delimita el interior del poro (Yang *et al.*, 2001; Ehrenstein y Lecar, 1977).

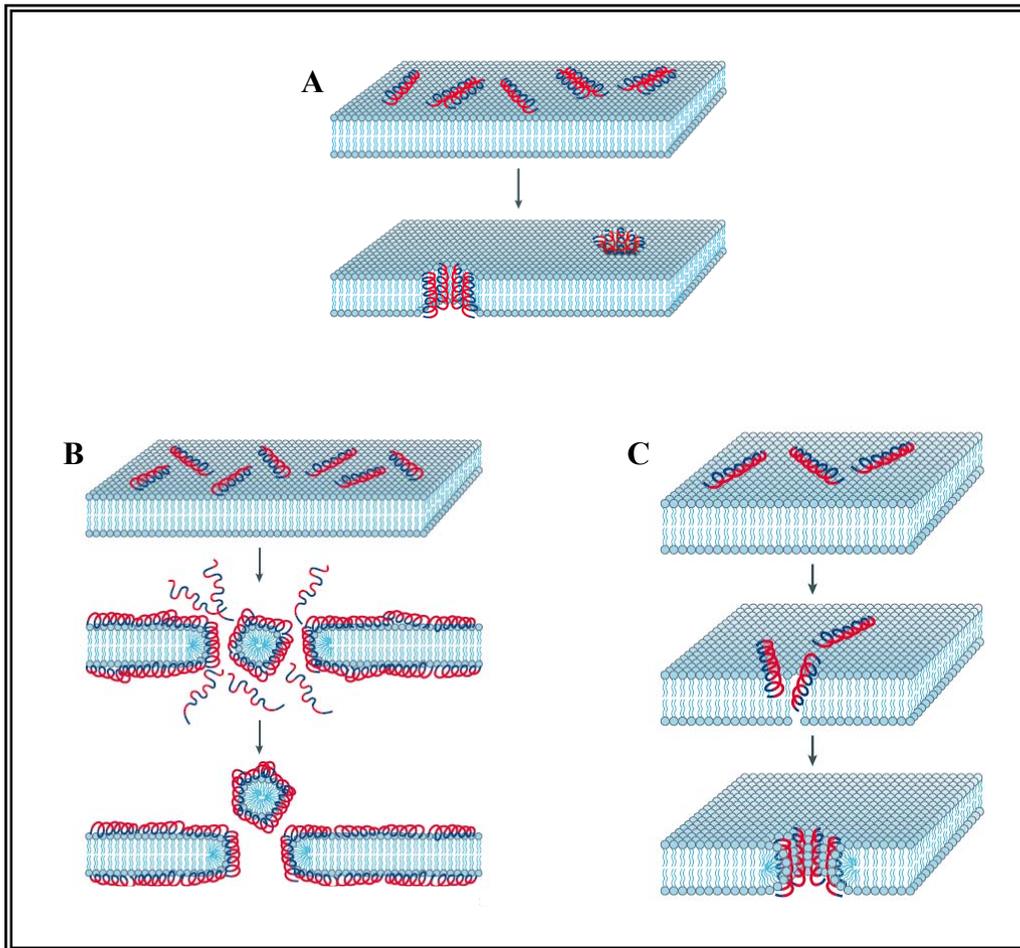


Figura 1. Esquema de los diferentes mecanismos de acción propuestos para los péptidos antimicrobianos (A) Modelo en barril, (B) Modelo en alfombra, (C) Modelo toroidal. Las regiones hidrófilas del péptido se muestran en rojo y las hidrófobas en azul. (Tomado de Brogden, 2005).

b) Modelo en alfombra:

Los péptidos se acumulan en la superficie de la bicapa mediante interacciones electrostáticas de los aminoácidos cargados positivamente con las cabezas aniónicas de los fosfolípidos. A altas concentraciones de péptido, se crea una tensión en la bicapa lipídica que lleva a su disgregación o ruptura, formándose micelas (Shai, 1999; Ladokhin y White, 2001).

c) Modelo toroidal o en “agujero de gusano”:

Las hélices del péptido antimicrobiano se insertan en la membrana y para disminuir la curvatura causada por esta unión, los fosfolípidos se mueven continuamente desde una mitad de la membrana hacia la otra. Las cadenas peptídicas situadas en la membrana

son empujadas junto a los lípidos, de modo que se forma un poro en cuya luz aparecen las cabezas de los fosfolípidos y las cadenas peptídicas.

1.3. Péptidos Antimicrobianos producidos por Bacterias: Bacteriocinas

Los péptidos antimicrobianos producidos por bacterias se denominan bacteriocinas, y se definen como un “*grupo heterogéneo de péptidos de síntesis ribosómica- con o sin modificaciones posteriores-, que son secretados extracelularmente y poseen un mecanismo de acción bactericida frente a cepas relacionadas*” (Diep y Nes, 2002; Jack *et al.*, 1995; Tagg *et al.*, 1976; Tagg, 1992). Las bacteriocinas difieren de los péptidos antimicrobianos eucariotas en 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 clásicos antibióticos en su estructura molecular, su naturaleza, el modo y espectro de acción, así como en la ausencia de toxicidad y los mecanismos de resistencia inducidos (Cleveland *et al.*, 2001). Su importancia reside en el hecho de que este tipo de inhibidores han sido descritos en prácticamente en todos los linajes del Dominio *Bacteria*, siendo frecuente la producción de diversos tipos de bacteriocinas entre las cepas de una misma especie (Tagg, 1992; Maqueda *et al.*, 1998; Gálvez, 1987; Riley y Gordon, 1992).

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 miembros del grupo *Enterobacteriaceae* (Fath *et al.*, 1994; Baquero y Moreno, 1984)

En las bacterias Gram-positivas la producción de este tipo de antagonistas está muy extendida (Jack *et al.*, 1995), si bien en los últimos quince años las investigaciones se han centrado de forma prioritaria en el estudio de las bacteriocinas producidas 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 mejorar la calidad higiénica de los mismos.

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

- a. Clase I: Lantibióticos
- b. Clase II: Pequeños péptidos termoestables
- c. Clase III: Grandes proteínas termolábiles
- d. Clase IV: Bacteriocinas complejas que contienen motivos lipídicos o carbohidratos.

El descubrimiento y caracterización de nuevas bacteriocinas ha hecho necesario modificar esta clasificación, especialmente para la clase II (Cleveland *et al.*, 2001; Nes *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1999; Van Belkum y Stiles, 2000; Ross *et al.*, 2002; Cotter *et al.*, 2005). La Tabla 1 muestra la clasificación de bacteriocinas basada en las propuestas por Diep y Nes, (2002) y Cotter *et al.*, (2005).

CLASE	SUBCLASE	EJEMPLOS	REFERENCIA
Clase I: Lantibióticos	Ia: Péptidos lineales catiónicos	Nisina Epidermina	Rogers, 1928; Mattick y Hurst, 1944 Schnell <i>et al.</i> , 1988
	Ib: Péptidos globulares sin carga o con carga neta negativa.	Lacticina 3147 Mersacidina	Ryan <i>et al.</i> , 1999 Sahl <i>et al.</i> , 1995
Clase II: Bacteriocinas termoestables, no modificadas (< 10 kDa)	IIa: Bacteriocinas anti-Listeria, similares a pediocina	Pediocina PA-1 Enterocina A	Henderson <i>et al.</i> , 1992. Aymerich <i>et al.</i> , 1996
	IIb: Bacteriocinas heterodiméricas	Lactacina F Lactococcina G	Allison <i>et al.</i> , 1994 Nissen-Meyer <i>et al.</i> , 1992
	IIc: Bacteriocinas sec-dependientes	Bacteriocina 31 Enterocina P	Tomita, <i>et al.</i> , 1996 Cintas <i>et al.</i> , 1997
	II d: Bacteriocinas sin péptido líder	EJ97 Enterocina L50	Sánchez-Hidalgo <i>et al.</i> , 2003. Cintas <i>et al.</i> , 1998; Floriano <i>et al.</i> , 1998.
	IIe: Bacteriocinas cíclicas (Propuesta como clase V)	AS-48 Circularina A Gassericina A	Gálvez <i>et al.</i> , 1986; Maqueda <i>et al.</i> , 2004. Kemperman <i>et al.</i> , 2003b Kawai <i>et al.</i> , 1998
	II f: Bacteriocinas no agrupables	Lactococcina A Enterocina B	Holo <i>et al.</i> , 1991 Casaus <i>et al.</i> , 1997
Clase III: Grandes proteínas termolábiles (Bacteriolisinas)*		Helveticina J Enterolisina A	Joerger y Klaenhemmer, 1990. Nilsen <i>et al.</i> , 2003.

Tabla 1. Clasificación de bacteriocinas basada en las clasificaciones propuestas por Diep y Nes, (2002) y Cotter *et al.*, (2005). La clase IV (bacteriocinas con motivos no proteicos) no se incluye ya que no se ha demostrado la existencia de miembros de esta clase. *Se sugiere que esta clase no sea considerada como bacteriocinas.

En el género *Enterococcus*, son muy numerosos los trabajos que describen la producción de bacteriocinas, referidas en este grupo como enterocinas. La mayoría de los trabajos han sido realizados en las especies *E. faecalis* y *E. faecium* (Park *et al.*, 2003; De Vuyst *et al.*, 2003; Foulquié *et al.*, 2006) y de las más de las 30 enterocinas descritas en la actualidad, la mejor caracterizada desde el punto de vista genético y bioquímico es, sin duda, la enterocina AS-48, la cual presenta la característica nada usual de ser una proteína circular y poseer un amplio espectro de acción. Por ello, Maqueda *et al.*, (2004), como ya hicieran Kemperman *et al.* (2003b) propusieron incluir a la enterocina AS-48 en una nueva clase (clase V): las bacteriocinas circulares.

2. PROTEÍNAS CIRCULARES

Las proteínas se han definido clásicamente como moléculas formadas por una cadena lineal de aminoácidos que se pliega en el espacio, adoptando una configuración tridimensional determinada que define 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.

En hongos y bacterias se ha descrito la producción de otro tipo de moléculas denominadas péptidos cíclicos. Se trata de pequeños péptidos (menos de 12 aminoácidos) de síntesis no ribosómica, es decir, no de origen génico directo, que son 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 2). Tal es el caso de la micosubtilina (Duitman *et al.*, 1999), la tirocidina A (Mootz y Marahiel, 1997), la ciclosporina A, la polimixina B1 (Suzuki *et al.*, 1963) o la gramicidina S (Danders *et al.*, 1982).

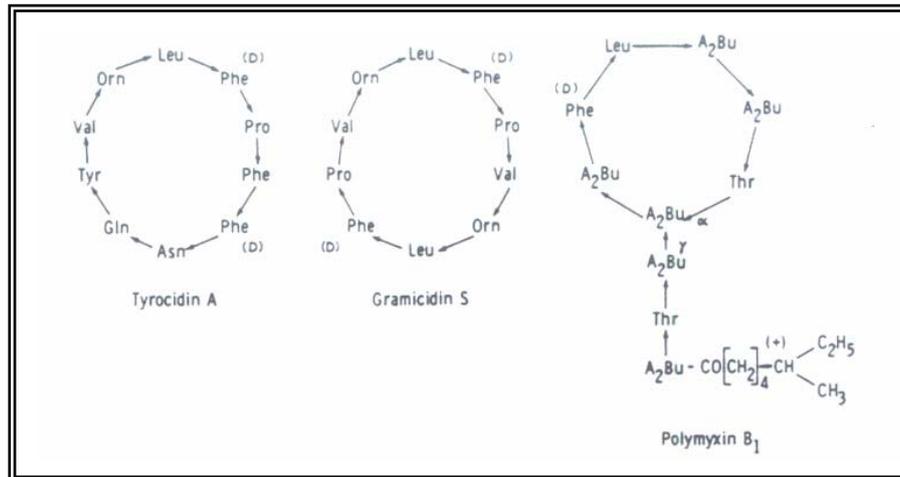


Figura 2. Estructura de diversos péptidos cíclicos de síntesis no ribosómica

Teóricamente, no hay razones que justifiquen que los extremos de las proteínas no puedan estar unidas por enlaces peptídicos al igual que el resto de la cadena, tal vez por ello no ha sido difícil admitir la existencia de proteínas circulares de síntesis ribosómica descritas 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, aunque con una estructura tridimensional bien definida. Son por tanto moléculas sin comienzo ni fin, bien diferenciadas de los péptidos cíclicos de síntesis no ribosómica antes comentados. Y cuando se ha podido comprobar las ventajas y el interés biotecnológico que estas moléculas presentan, la síntesis de proteínas circulares ha adquirido una gran importancia y se ha 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

La primera molécula descrita con estas características y una de las mejores conocidas es la bacteriocina AS-48, cuya secuencia y estructura circular fue resuelta en 1994 por Samyn *et al.* Las características bioquímicas, estructurales y genéticas de AS-48 serán expuestas extensamente en el apartado 3 por tratarse de la molécula central de este trabajo. En realidad, a principios de la década de los años setenta, se habían descrito las propiedades uterotónicas de un extracto procedente de la planta africana *Oldenlandia affinis*, asociadas a la presencia de Kalata B1, un péptido de 29 aminoácidos (Gran, 1970; Gran, 1973; Sletten y Gran, 1973). Sin embargo,

tuvieron que pasar 20 años antes de que se descubriera que el péptido, cuya secuencia estaba codificada genéticamente, era circular y tenía una estructura tridimensional bien definida (Saether *et al.*, 1995; Jennings *et al.*, 2001).

La diversidad de estructuras de las proteínas circulares de origen natural descritas en la última década, se resume en la Tabla 2. En todo caso se trata de moléculas con una estructura tridimensional bien definida y un tamaño comprendido entre 14 y 78 aminoácidos. Es interesante señalar que la mayoría de estas moléculas presentan actividad biológica (antibacteriana, antivírica y/o farmacológica) y por ende están implicadas en mecanismos de defensa (Trabi y Craik, 2002). 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, y muestran que se trata de moléculas con una estructura tridimensional bien definida y con motivos que se repiten regularmente en su estructura secundaria, sin diferencias notables con los que aparecen en las proteínas lineales.

POLIPÉPTIDOS CIRCULARES	ORIGEN	TAMAÑO (RESIDUOS)	COMENTARIOS	REFERENCIA
SFTI-1	<i>Helianthus annuus</i>	14	Potente inhibidor de tripsina	Luckett <i>et al.</i> , 1999
RTD-1	<i>Macaca mulatta</i>	18	Defensina de leucocitos de primates	Tang <i>et al.</i> , 1999
Microcina J25	<i>Escherichia coli</i>	21	Péptido antibacteriano	Wilson <i>et al.</i> , 2003; Bayro <i>et al.</i> , 2003; Rosengren <i>et al.</i> , 2003
Ciclótidos	Fam. <i>Rubiaceae</i> y <i>Violaceae</i>	28–37	Bioactividad	Craik <i>et al.</i> , 1999; Craik, 2001; Craik <i>et al.</i> , 2006
MCoTI-I y II	<i>Momordica cochinchinensis</i>	34	Inhibidores de tripsina	Hernández <i>et al.</i> , 2000
Gassericina A	<i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactobacillus reuteri</i>	58	Proteína catiónica antibacteriana (bacteriocina)	Kawai <i>et al.</i> , 1994; Toba <i>et al.</i> , 1991
Circularina A	<i>Clostridium beijerinckii</i>	68	Proteína catiónica antibacteriana (bacteriocina)	Kemperman <i>et al.</i> , 2003b
AS-48	<i>Enterococcus faecalis</i>	70	Proteína catiónica antibacteriana (bacteriocina). Amplio espectro	González <i>et al.</i> , 2000 ; Sánchez-Barrena <i>et al.</i> , 2003; Maqueda <i>et al.</i> , 2004
Pilina T	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	73	Promover contacto celular	Kalkum <i>et al.</i> , 2002
TrbC	Amplio rango de hospedador	78	Promover contacto celular	Kalkum <i>et al.</i> , 2002

Tabla 2. Origen y características de proteínas/péptidos circulares de origen natural

2.1.1. Proteínas Circulares producidas por Microorganismos

Las proteínas circulares descritas hasta el momento presentan secuencias primarias con tamaños que oscilan entre los 21 y los 78 aminoácidos (ver Tabla 2), y todas tienen en común la existencia de una alta proporción de residuos hidrófobos.

A) Microcina J25 (MccJ25)

Descrita con anterioridad por Salomón y Farias, (1992), la microcina MccJ25 producida por *Escherichia coli* fue el segundo péptido antibacteriano cíclico conocido, pero su caracterización en detalle fue posterior (Blond *et al.*, 1999). La microcina madura es el resultado de la ruptura proteolítica de un precursor de 58 residuos en un sitio específico (Lys¹⁻ Gly¹⁺) que origina un péptido maduro de 21 aminoácidos, en su mayoría de naturaleza hidrófoba, y en ningún caso modificado.

Inicialmente se creyó que esta molécula tenía una estructura macrocíclica por la unión peptídica de sus extremos (Gly¹- Gly²¹) (ver Figura 3), sin embargo resultados muy recientes obtenidos mediante espectrometría de masas y RMN a partir de la molécula nativa y de fragmentos peptídicos derivados de ella (Wilson *et al.*, 2003; Rosengren *et al.*, 2003; Bayro *et al.*, 2003), han permitido concluir que existe un anillo de 8 residuos, formado mediante enlace lactámico interno entre el grupo amino de la Gly¹ y el grupo carboxilo del Glu⁸, a través del cual se introduce la cola de los 13 residuos restantes (Tyr⁹-Gly²¹) (Figura 3). Dicha estructura, conocida como “lazo peptídico” (lasso-peptide) había sido descrita en algunos inhibidores producidos por especies de *Streptomyces* (Katahira *et al.*, 1995; 1996; Frechet *et al.*, 1994), y en este caso, se ha visto que encuentra estabilizada por la posición de los residuos aromáticos Phe¹⁹ y Tyr²⁰, que se disponen flanqueando el anillo (Wilson *et al.*, 2003; Rosengren *et al.*, 2003; Bayro *et al.*, 2003; Rebuffat *et al.*, 2004).

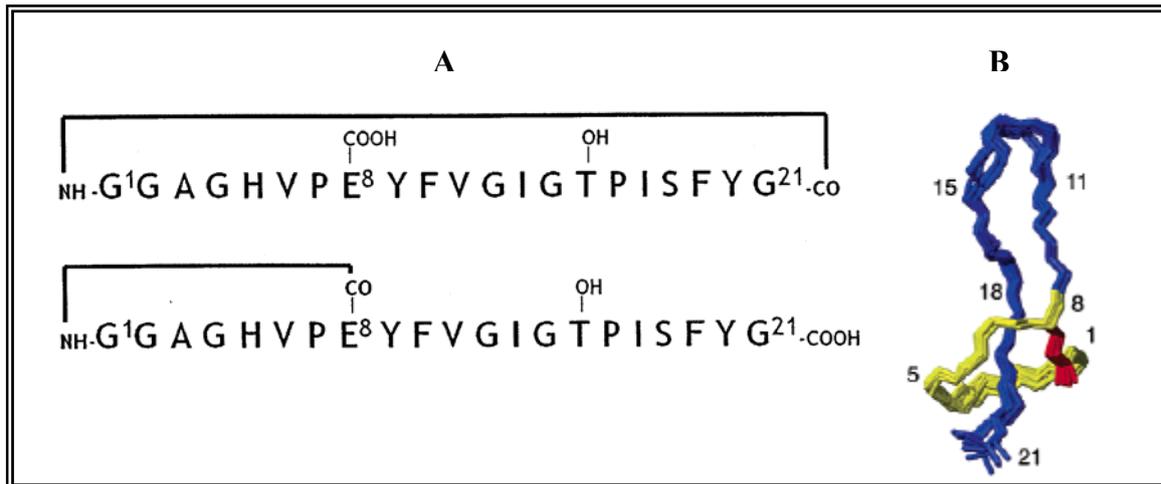


Figura 3. Posibles esquemas de ciclación propuestos para la MccJ25. A) Se muestra la posible ciclación cabeza-cola (arriba) y la formación de un enlace peptídico entre el E⁸ y la G¹ (abajo) responsable del plegamiento que origina la estructura “lazo peptídico” de la MccJ25 mostrado en B) (tomado de Rosengren *et al.*, 2003 y Rebuffat *et al.*, 2004).

Una de las características constantes en las moléculas circulares, y también en la microcina MccJ25, es el presentar un importante grado de estabilidad cuando se somete a la acción de agentes desnaturalizantes, incluyendo temperaturas superiores a los 100 °C o altas concentraciones de agentes caotrópicos (cloruro de guanidinio 10 M o urea 8 M) combinados con temperaturas superiores a los 65 °C (Blond *et al.*, 2002).

MccJ25 es un péptido de potente actividad bactericida cuya producción, a diferencia de las restantes bacteriocinas descritas, se induce ante la falta de nutrientes. MccJ25 ejerce su acción inhibiendo la transcripción a través de su unión a la subunidad β' de la ARN polimerasa de diversas especies sensibles de *Salmonella* y *Escherichia*. Pero también han sido descritas otras dianas para la microcina J25, como la membrana citoplasmática, en la cual, tras su permeabilización, interrumpe el potencial eléctrico. La entrada de MccJ25 a cepas sensibles, requiere la proteína multifuncional FhuA de la membrana externa, caracterizada como miembro de la familia de sideróforos (Rebuffat *et al.*, 2004).

La región genética responsable del carácter MccJ25 consta de 4 genes, *mcjABCD*, localizados en el plásmido pTUC100 (50 kb) albergado por las cepas de *E. coli* productoras de MccJ25 (Figura 4)

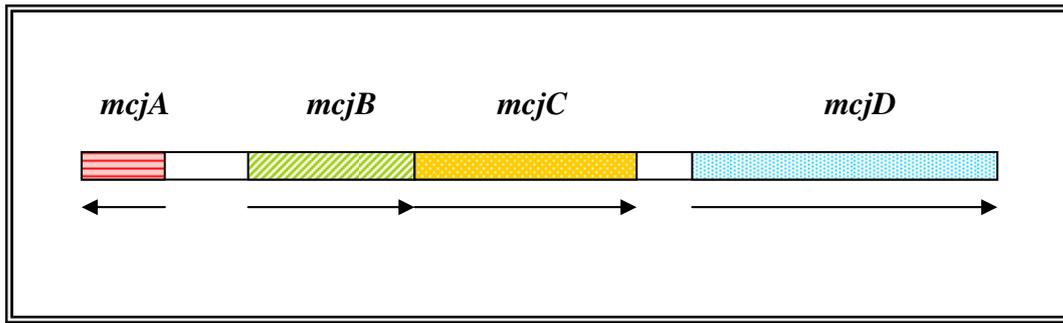


Figura 4. Organización de los genes *mccJ* responsables del carácter MccJ25.

B) Gassericina A y Acidocina B

Entre las bacteriocinas de las bacterias del ácido láctico (BAL) pertenecientes a la Clase II se han descrito otras dos proteínas circulares, la gassericina A, producida por dos especies del género *Lactobacillus*, *Lb. gasseri* LA39 (Kawai *et al.*, 1994) y *Lb. reuteri* LA6 (Toba *et al.*, 1991) y la acidocina B, producida por *Lb. acidophilus* M46 (Leer *et al.*, 1995). Ambas comparten un 98% de su secuencia (Figura 5). En realidad, la acidocina B difiere de la gassericina A sólo en un residuo, por lo que se puede considerar una variante natural de la misma, a pesar de que aún no se ha descrito si posee una estructura circular (Kawai *et al.*, 2004).

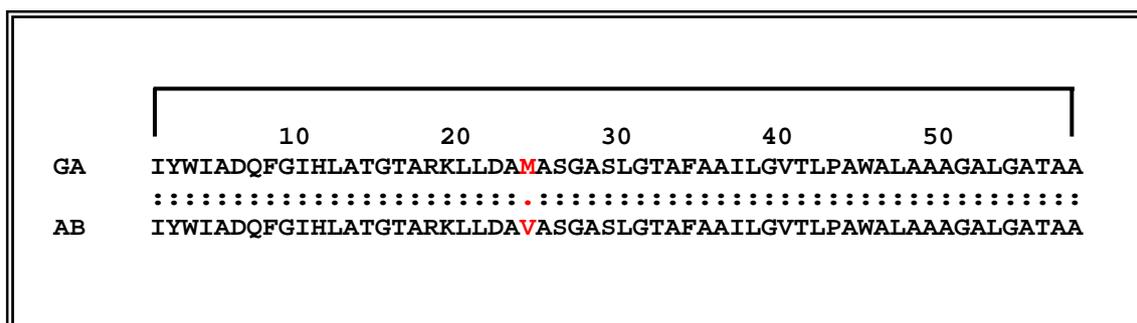


Figura 5. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la gassericina A y la acidocina B indicando los residuos implicados en la ciclación (tomado de Kawai *et al.*, 2004)

La gassericina A fue inicialmente descrita en 1991 bajo el nombre de reutericina 6 como un péptido muy pequeño (aprox. 3 kDa), pero en realidad está compuesto por 58 residuos que se encuentran unidos por sus extremos amino y carboxilo mediante enlace

peptídico (Pm 5,6 kDa) (Kawai *et al.*, 1998; 2001). Presenta un 74% de residuos hidrófobos, probablemente expuestos en la superficie del péptido. Si bien en un principio se consideró que la gassericina A y la reutericina 6 eran bacteriocinas diferentes, más tarde se comprobó que se trataba de la misma molécula (Kawai *et al.*, 2001) Sin embargo, existían diferencias en el modo de acción y en los espectros de dicroísmo circular (DC) de ambas moléculas, hecho que fue explicado por el diferente contenido en D- y L-Ala de las moléculas.

Las predicciones acerca de su estructura secundaria indican que la gassericina A es helicoidal, y que puede estar organizada en una estructura compacta muy estable que le confiere la capacidad de mantener su actividad tras ser calentada a 100 °C durante 60 min. Desde el punto de vista biológico, presenta un interesante espectro de acción, que incluye, además de especies de *Lactobacillus*, algunos patógenos alimentarios como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*.

C) Circularina A

Más recientemente, ha sido descrita una cuarta bacteriocina circular denominada circularina A (Kemperman *et al.*, 2003b), producida por *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. Se trata de un péptido de 69 aminoácidos con un pI de 10,6. Su espectro de acción incluye a cepas de *Clostridium tyrobutyricum*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus*. La circularina A se produce como un prepéptido de 72 aminoácidos, el cual es procesado hasta la forma circular madura mediante hidrólisis del puente peptídico entre la Leu⁻¹ y la Val⁺¹, y formación de un nuevo enlace peptídico entre Val¹ y Tyr⁷² (Figura 6). Cabe preguntarse si los tres residuos separados pueden constituir realmente un péptido señal capaz de dirigir el proceso de secreción y maduración de la circularina A, siendo en tal caso el péptido señal más pequeño descrito. Hoy se especula con la posibilidad de que las señales que dirigen la modificación de la proteína estén implícitas en su propia secuencia, como ha sido descrito para algunas proteínas de peroxisomas (Subramani *et al.*, 2000). Los determinantes genéticos de la circularina A, localizados en el cromosoma bacteriano (región *cir*) comprenden 5 genes, entre los que se encuentran los responsables de la inmunidad (*cirE*) y aquéllos que codifican posibles transportadores ABC (*cirB* y *cirD*) y que, al igual que ocurre con AS-48, con la que comparte un cierto grado de homología, confieren a la célula productora un cierto grado de resistencia adicional (Kemperman *et al.*, 2003a).

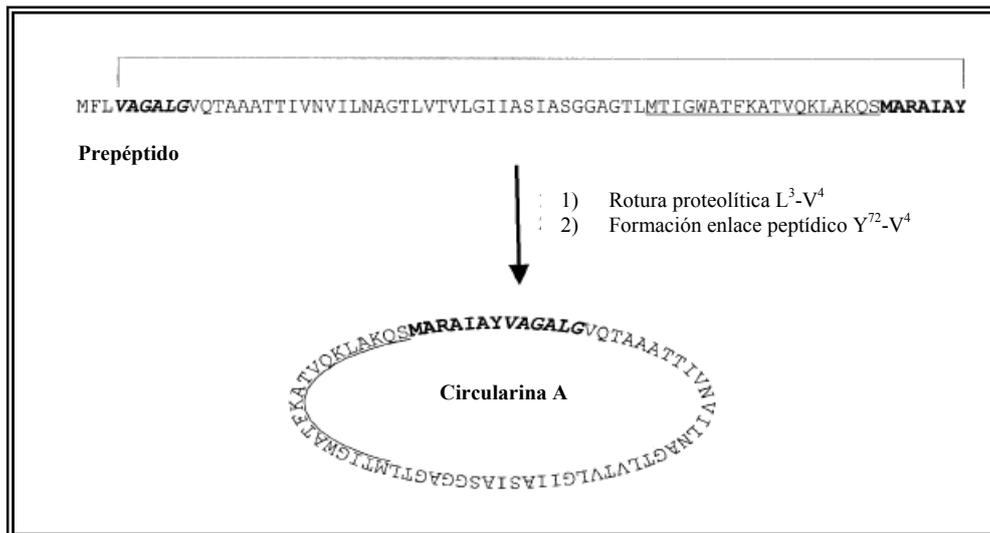


Figura 6. Maduración de la circularina A. El enlace peptídico entre Leu³ y Val⁴ se rompe, y se forma un nuevo enlace entre Tyr⁷² y Val⁴. En la reacción se libera el péptido MFL y se origina la bacteriocina circular. La línea en el prepeptido es una representación del nuevo enlace formado (tomado de Kemperman *et al.*, 2003a).

D) Pilinas

No todas las proteínas circulares de origen bacteriano tienen actividad antimicrobiana. Dos moléculas circulares, las pilinas TrbC y T, comparten una función muy diferente: promover el contacto entre células durante la conjugación (Kalkum *et al.*, 2002). TrbC y T son subunidades de los *pili* codificadas por los plásmidos Inc P (RP4) de *Escherichia coli* y Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

RP4 es un plásmido conjugativo de 60 kb responsable de múltiples resistencias a antibióticos (ampicilina, kanamicina, tetraciclina) y también al agente tóxico telurito potásico. RP4 pertenece al grupo de incompatibilidad IncP, que se caracteriza por presentar un amplio rango de hospedador. En dicho plásmido se han identificado 74 genes, de los cuales 20 son necesarios para la conjugación bacteriana (región *tra*). El gen *trbC* se ha identificado como el responsable de la formación de los pelos sexuales o *pili*, esenciales para establecer el contacto físico entre la célula donadora y la receptora durante el proceso de conjugación. Kalkum *et al.* (2002) demostraron que las pilinas TrbC y T son proteínas con estructura circular producida por enlace peptídico entre sus extremos (Figura 7), a diferencia de los pelos sexuales codificados por los plásmidos F de *E. coli*, que son proteínas lineales (TraA) constituidas por

71 aminoácidos y cuyo extremo N-terminal se encuentra acetilado. Otra diferencia interesante respecto a las células F⁺ de *E. coli*, que en todo caso presentan entre 1-3 pelos sexuales, es que sólo 1 de cada 50 células que albergan el plásmido RP4 expresan estas estructuras (Kalkum *et al.*, 2004). Además, la transferencia conjugativa de RP4 se produce de manera eficiente sólo en medios sólidos y no en medios líquidos, como ocurre con el plásmido F.

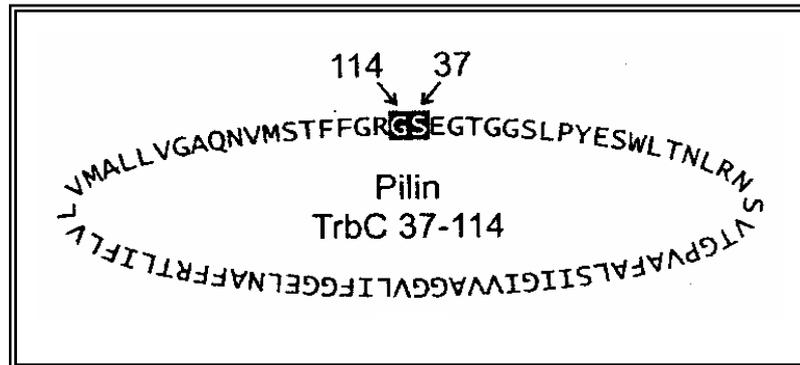


Figura 7. Estructura circular propuesta para la pilina TrbC (tomado de Kalkum *et al.*, 2004).

E) AS-48

La bacteriocina AS-48, por ser la molécula de estudio de este trabajo, se tratará con más detalle en el apartado 3.

2.1.2. Proteínas Circulares producidas por Plantas: Ciclotidos

Los ciclotidos, producidos por plantas, constituyen el grupo más abundante de proteínas circulares. Hasta la fecha se han descrito más de 80 moléculas diferentes, (Craik *et al.*, 2006). Curiosamente, el descubrimiento de estas proteínas macrocíclicas bioactivas se produjo en la década de los años setenta gracias a programas de rastreo para la búsqueda de nuevos compuestos para su aplicación en medicina natural, pero las publicaciones que dieron lugar al conocimiento de los mismos no se produjeron hasta 20 años más tarde (Gustafson *et al.*, 1994; Witherup *et al.*, 1994; Saether *et al.*, 1995).

El término “ciclótido” fue acuñado en 1999 para reflejar la naturaleza peptídica cíclica de estos compuestos (Craik *et al.*, 1999), que presentan un variado e interesante rango de actividades biológicas: por ejemplo, las circulinas A y B presentan actividad anti-HIV (Gustafson *et al.*, 1994), el ciclopsicótrido A inhibe la unión de la neurotensina (Witherup *et al.*, 1994), y Kalata B1 presenta actividad uterotónica (Gran, 1970; Gran, 1973; Sletten y Gran, 1973; Saether *et al.*, 1995). Todas proceden de especies tropicales de las familias *Rubiaceae*, *Violaceae* y *Cucurbitaceae* (Göransson *et al.*, 2004; Craik *et al.*, 2006). En los cuatro últimos años se han descrito nuevos ciclótidos procedentes de las mismas familias botánicas: circulinas de *Chassalia parvifolia* (Gustafson *et al.*, 2000), cicloviolinas A-D de *Leonia cymosa* (Hallock *et al.*, 2000), palicoureína de *Palicourea condensata* (Bokesch *et al.*, 2001), e hypa A de *Hybanthus parviflorus* (Broussalis *et al.*, 2001).

Una característica común a esta familia de proteínas, además de su origen vegetal, es el presentar un tamaño en torno a los 30 aminoácidos, tamaño que no les hace ser considerados como proteínas, aunque su plegamiento globular es más propio de una proteína que de un péptido. Por ello, el término mini-proteína resulta más adecuado para describir a este tipo de moléculas (Craik *et al.*, 2006). Otra característica común a los ciclótidos es la posesión de un esqueleto circular con seis residuos conservados de cisteína que forman tres puentes disulfuro, dos de los cuales, junto a los segmentos peptídicos que los conectan (asas 1 y 4), forman un anillo que es atravesado por el tercer puente disulfuro. A este entrecruzamiento se le conoce como motivo CCK (Cyclic Cystine Knot) (Figura 8), y fue caracterizado por primera vez en el ciclótido Kalata B1 (Saether *et al.*, 1995).

La existencia de una pequeña lámina β formada por tres cadenas es otra característica de este motivo. Esta lámina está compuesta por una horquilla β y una cadena β distorsionada. Las cadenas β de la horquilla contienen las Cys^{IV}, Cys^V y Cys^{VI} (Craik *et al.*, 2006). El análisis de homologías en la secuencia primaria de los ciclótidos descritos, así como los análisis mediante RMN, indican que el motivo CCK está conservado en todos los miembros de esta familia, a pesar de que podrían crearse hasta 15 tipos de puentes disulfuro diferentes debido al fuerte empaquetamiento de las Cys (Rosengren *et al.*, 2003). Se ha sugerido que el nudo de cistina es más importante que la circularización para la estabilización del plegamiento de los ciclótidos (Daly y Craik, 2000), ya que el análisis de permutantes acíclicos de Kalata B1 que se abrieron en un asa del motivo CCK, demostró que no se plegaban como la forma nativa. En cambio, si la linearización ocurría en cualquier otra asa, el plegamiento se mantenía.

Asimismo, se ha visto que el motivo CCK es crucial para la estabilidad frente a la degradación térmica, enzimática o química (Colgrave y Craik., 2004).

La estructura circular de estas proteínas, junto a la existencia de tres puentes disulfuro, hace que estas moléculas sean extremadamente estables, muy resistentes a la hidrólisis enzimática y a la desnaturalización térmica (Gran *et al.*, 2000). Los permutantes acíclicos de Kalata B1 que retenían el motivo CCK perdieron actividad biológica (Daly y Craik, 2000), indicando que la circularización es necesaria para la actividad y quizá para prevenir el ataque de exoproteasas.

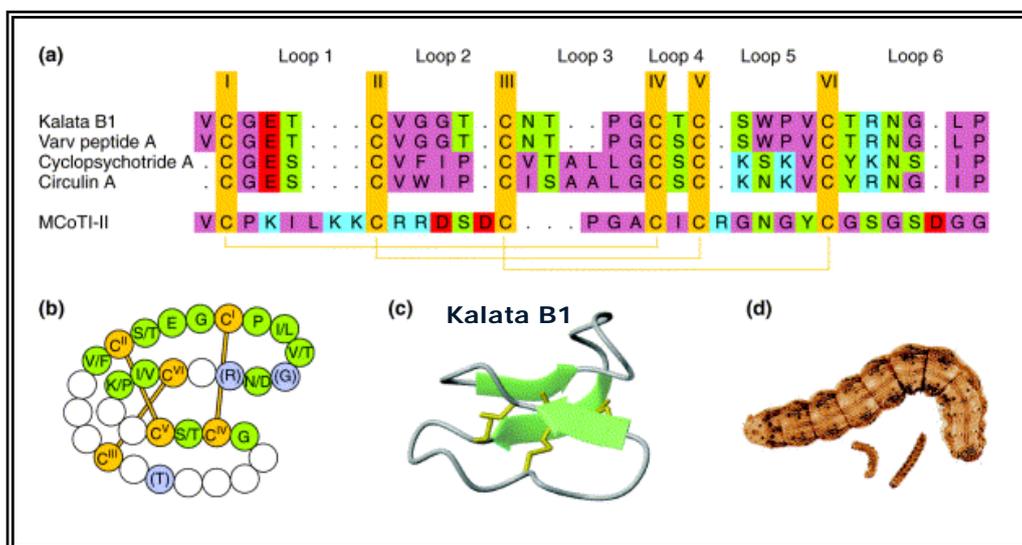


Figura 8. Características estructurales y 3D de ciclótidos. (a) Secuencias representativas en donde se marca la localización de las Cys y los puentes disulfuro (naranja). Colores de los residuos: hidrófobos, morados; hidrófilos, verdes; básicos, azules; ácidos, rojos. (b) Topología del motivo CCK. Se indican los residuos muy conservados (verde), moderadamente conservados (azul) o variables (blanco). Las Cys y los puentes disulfuro aparecen en naranja. (c) Estructura de Kalata B1. (d) Actividad insecticida de Kalata B1 frente a larvas de *Helicoverpa punctigera* (tomado de Trabi y Craik, 2002).

La existencia de residuos altamente conservados en los ciclótidos también tiene un importante papel estructural y funcional (Craik *et al.*, 2006). Por ejemplo, la presencia de un residuo de Glu en el asa 1 contribuye a una gran estabilización estructural debido a la formación de puentes de hidrógeno con dos protones amida de la cadena peptídica del asa 3 adyacente. Por otra parte, la presencia de residuos con grupos hidroxilo proporciona una red de puentes de hidrógeno que contribuye a la estabilización de la estructura. Por motivos estéricos, las cadenas laterales de los residuos hidrófobos están orientadas hacia el exterior de

forma que se crea un parche hidrófobo expuesto, que participa en la interacción con las membranas biológicas. La posición de las Gly en la molécula suele estar muy conservada, sobre todo la Gly adyacente a la Cys^{IV} del asa 3 y la Gly presente en el asa 6. Existe además un residuo conservado de Asn o Asp en el asa 6 que se ha relacionado con el procesamiento de los ciclótidos a partir de sus precursores, junto a una Gly conservada en el extremo N-terminal.

A pesar de las restricciones impuestas por la presencia del motivo CCK, el pequeño número de aminoácidos existentes en la molécula y la presencia de residuos muy conservados, los ciclótidos muestran un interesante grado de diversidad que ha permitido su división en 3 subfamilias (Möbius, Bracelet e Inhibidores de tripsina) de acuerdo con la similitud en la secuencia, tamaño de las asas, estructura e incluso mecanismo de acción (Craik *et al.*, 2004) (Figura 10).

Los miembros de la **subfamilia Möbius** se caracterizan por la presencia de un enlace peptídico en *cis* delante de una Pro conservada del asa 5, que introduce un giro en la cadena peptídica (cinta de Möbius, Figura 9). Estos ciclótidos poseen 29 ó 30 aminoácidos, mayoritariamente hidrófobos, de los cuales el 60% están muy conservados (lo que limita las posibilidades de diversidad en este grupo). Presentan una gran similitud de secuencias y prácticamente no se encuentran variaciones en el tamaño de las asas existentes. Las Cys y el asa 1 del motivo CCK están muy conservados. A esta subfamilia pertenecen los ciclótidos Kalata B1 (Rosengren *et al.*, 2003) y Kalata B2 (Jennings *et al.*, 2005).

En la **subfamilia Bracelet** se han descrito más de 60 miembros (Craik *et al.*, 2006). Todos ellos carecen del enlace peptídico en *cis* típico de la subfamilia Möbius, por lo que se representan como un brazalete (Figura 9). Estas moléculas contienen entre 28 y 31 residuos, que son sólo 10 de los 20 aminoácidos naturales. Ninguna de las asas de las moléculas está conservada. Tan sólo 10 residuos están conservados: las 6 Cys responsables del motivo CCK, la Gly en el tercer asa (necesaria para su típico plegamiento 3D), un residuo de Pro y dos residuos hidrófobos del asa 1. Pertenecen a esta subfamilia la Circulina A (Daly *et al.*, 1999a) y la Cicloviolecina O1 (Rosengren *et al.*, 2003).

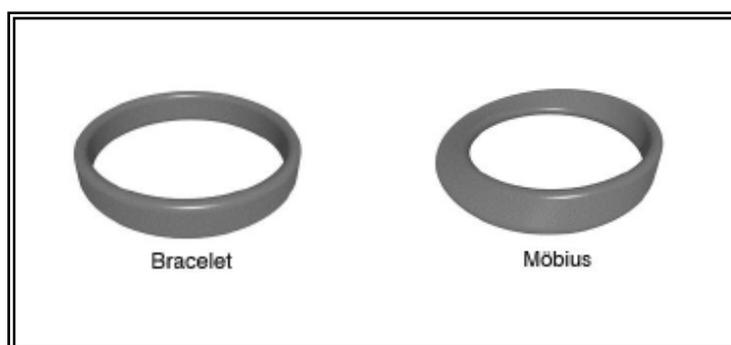


Figura 9. Representación esquemática de las topologías Bracelet y Möbius (tomado de Craik *et al.*, 2006).

Recientemente se ha caracterizado la estructura de un nuevo ciclótido, Kalata B8 (Daly *et al.*, 2006), que parece ser un híbrido de las subfamilias Möbius y Bracelet. Se ha observado que el motivo CCK de esta molécula es más flexible.

La *subfamilia de Inhibidores de Tripsina* es más difícil de definir, ya que hasta la fecha sólo se han descrito dos moléculas, McoTI-I y McoTI-II, (Hernández *et al.*, 2000) producidas por *Momordica cochinchinensis*, de la familia *Cucurbitaceae*, que es capaz de producir un homólogo lineal de los mismos, McoTI-III, que puede coexistir con la forma circular en la misma planta. Las características de este pequeño grupo se han establecido en base a sus diferencias con los inhibidores de tripsina lineales. De esta forma, se ha comprobado que la primera asa suele contener una secuencia P(K/R)I seguida por un residuo hidrófobo, mientras que el asa 2 contiene 2 ó 3 residuos de Asp combinados con dos aminoácidos básicos. El asa 4 sólo contiene un aminoácido hidrófobo (Ile).

Existe un inhibidor de tripsina circular distinto a los ciclótidos, SFTI-1, que fue aislado de semillas de girasoles. Posee 14 residuos y comparte grandes homologías con la familia de pequeños inhibidores de serín-proteasas encontrados en semillas de legumbres y conocidos como inhibidores Bowman-Birk (Luckett *et al.*, 1999). A diferencia de los ciclótidos, SFTI-1 posee dos cadenas β antiparalelas estabilizadas por un único puente disulfuro.

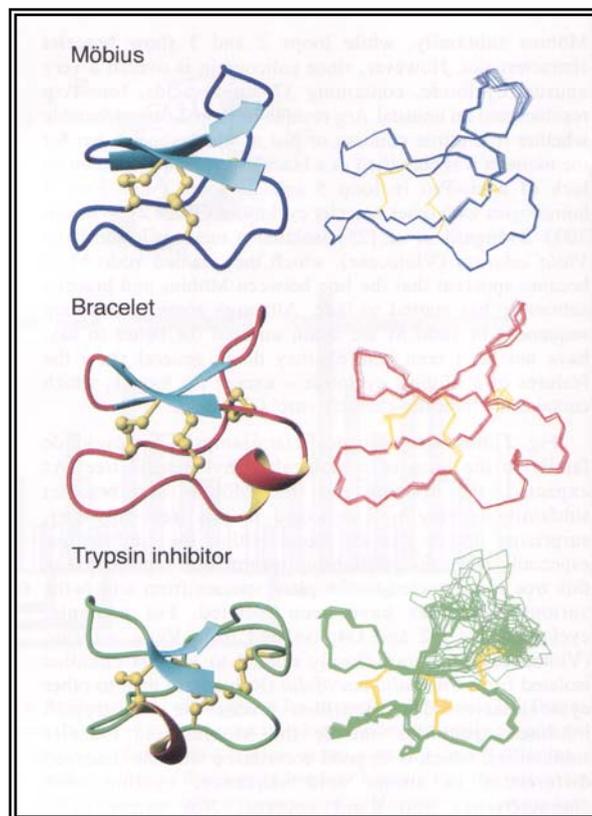


Figura 10. Estructuras de Kalata B1, Cycloviolacina O1 y MCoTI-II, representantes de las familias Möbius, Bracelet e Inhibidores de tripsina, respectivamente. Los puentes disulfuro se indican en amarillo. Derecha, superposición de las 20 mejores estructuras determinadas por RMN (tomado de Craik *et al.*, 2004).

Muchos ciclótidos poseen interesantes propiedades farmacológicas (Tam *et al.*, 1999), entre las que destacan actividades uterotónicas, anti-VIH, antibacterianas, antifúngicas e insecticidas. Por ejemplo, Kalata B1 actúa como un potente inhibidor del crecimiento y desarrollo de diferentes especies 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, podría estar relacionada con mecanismos de protección del organismo productor, bien frente a infecciones por microorganismos u hongos o frente al ataque de insectos (Trabi y Craik, 2002).

2.1.3. Proteínas Circulares de Mamíferos: θ -Defensinas

Las defensinas son péptidos antimicrobianos producidos por plantas, insectos, aves y mamíferos, incluidos humanos (Lehrer y Ganz, 2002; Ganz, 2003; Brogden *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 1999). El origen tan amplio de estas sustancias puede tener su explicación en su función, que es actuar como mediadores 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 descubiertas en mamíferos fueron las α - y β -defensinas (Figura 11). Se trata de péptidos catiónicos de bajo Pm (29-42 aminoácidos), en todo caso lineales, que están estabilizadas de diferente forma por puentes disulfuro, aunque en general todas ellas muestran un plegamiento muy similar. Más recientemente, ha sido descrita una nueva familia, las θ -defensinas (Tang *et al.*, 1999) que presentan la particularidad de ser moléculas cíclicas sintetizadas en una nueva ruta a partir de precursores similares a las α -defensinas (Figura 11) (Selsted, 2004).

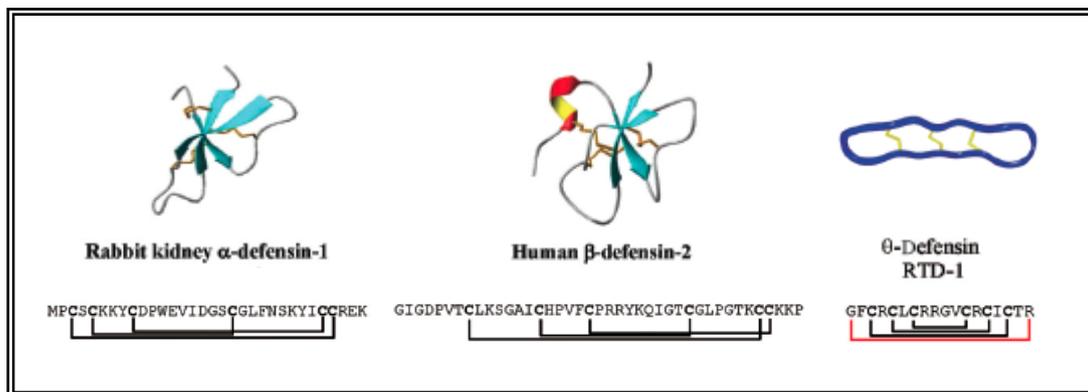


Figura 11. Estructuras de varios miembros de las familias α -, β - y θ -defensinas y esquema de los puentes disulfuro presentes en las moléculas (líneas negras). La línea roja de la θ -defensina representa el enlace peptídico cabeza-cola (tomado de Bulet *et al.*, 2004).

La familia de las θ -defensinas está representada por la defensina RTD-1 (*Reshus Theta Defensina 1*), y sus homólogas RTD-2 y RTD-3 (Tang, 1999), de las que difiere por el porcentaje de carga positiva neta de las moléculas. La defensina RTD-1 es un péptido de 18

aminoácidos, incluyendo 6 Cys y 5 Arg, (Pm 2082,7), cuyos extremos se encuentran unidos mediante enlace peptídico (Gly¹-Arg¹⁸). La estructura de RTD-1 (Trabi *et al.*, 2001) consiste en dos cadenas β conectadas mediante estrechas regiones de giro. Al igual que ocurre 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 (Figura 11). 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, la cual no se ve afectada por la presencia de NaCl a concentraciones fisiológicas, como ocurre con las α - y β -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 relacionarse 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, que es donde estos péptidos actúan fundamentalmente. RTD-1 también posee actividad anti-retroviral (Cole *et al.*, 2002). Recientemente 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, que ha sido denominado retrociclina (Cole *et al.*, 2002).

2.2. Proteínas Circulares Sintéticas

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 cíclicas, debido a que los ingenieros químicos, aunando esfuerzos con los biólogos moleculares, han diseñado métodos de ciclación de proteínas lineales cuyos extremos se encuentran razonablemente próximos en su estructura nativa lineal (Karlea y Ranganathan, 2003; Scott *et al.*, 2001).

Los principales métodos de ciclación han sido la ligación química nativa mediante síntesis en fase sólida y los métodos basados en las inteínas (David *et al.*, 2004) (Figura 12):

- En el primer método (Dawson *et al.*, 1994) hay que diseñar el péptido precursor con un residuo de Cys en el extremo N-terminal, y con un motivo α -tioéster en el extremo C-terminal. Estos dos grupos reaccionan para formar un intermediario unido por un enlace tioéster, que más tarde sufre una reorganización intramolecular, y de forma espontánea se origina un enlace peptídico entre ambos extremos.
- En el segundo método (Perler y Adan, 2000), se incluye una secuencia peptídica entre unos dominios proteicos reactivos llamados inteínas, y la circularización ocurre mediante la unión autocatalítica de ambos dominios. La producción de la proteína circular madura implica la eliminación de los dominios auxiliares que flanquean el precursor lineal de la proteína.

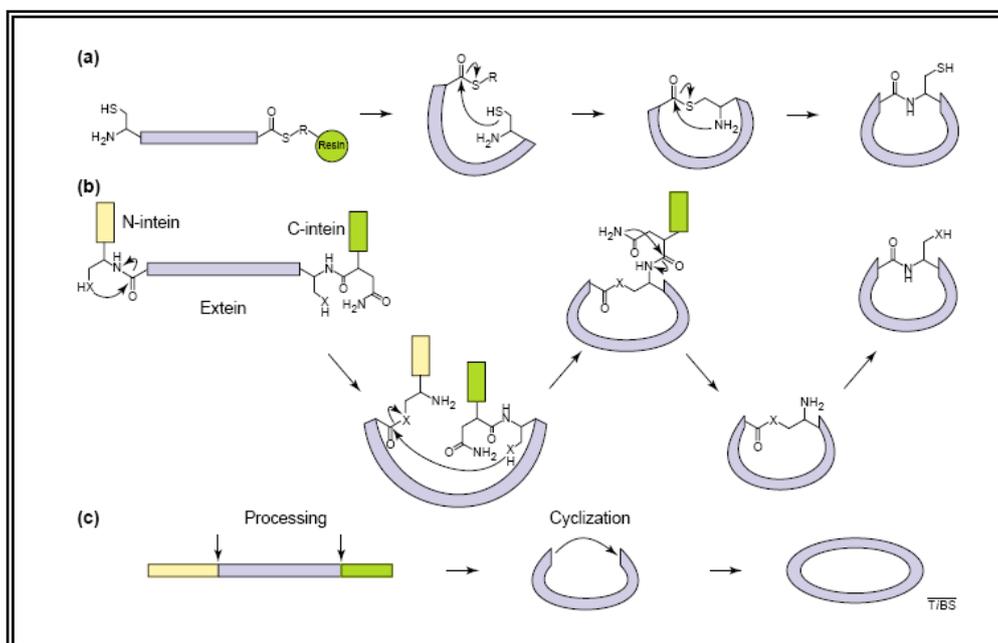


Figura 12. Estrategias para la síntesis de proteínas circulares en paralelo con el procesamiento de péptidos naturales. (a) Ligación química para la síntesis de péptidos en fase sólida (b) Mecanismo propuesto de las Inteínas. (c) Modelo genérico propuesto para el procesamiento de proteínas circulares naturales (tomado de Trabi y Craik, 2002).

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 para permitir finalmente su ciclación (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 permitan obtener análogos de proteínas circulares naturales tales como los ciclótidos, con interesantes aplicaciones en el diseño de nuevos medicamentos (Craik, 2001; Trabi y Craik, 2002).

2.3. Mecanismos propuestos para la biosíntesis de los Péptidos Circulares

Poco se conoce acerca de los mecanismos de circularización de las proteínas producidas por procariotas ni de los enzimas implicados en el proceso. En las diferentes familias de proteínas circulares investigadas, no se han encontrado homologías entre los aminoácidos implicados en la formación del enlace peptídico, 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). Sin embargo, todas tienen en común el ser sintetizadas a partir de precursores más largos (pro-péptidos), que han de sufrir un proceso de maduración, consistente en la escisión del péptido señal y la unión de los extremos mediante enlace peptídico. 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). Profundizar en el conocimiento de los mecanismos de ciclación es muy interesante, no sólo como una curiosidad biológica, sino también desde un punto de vista aplicado para el diseño de medicamentos peptídicos cíclicos, que serían más estables y resistentes a la digestión proteolítica.

En procariotas, el sistema mejor conocido es el de la **síntesis de la pilina TrbC**. El precursor de la pilina, el producto del gen *trbC* (^{Pre-Pro}TrbC), presenta dos secuencias con potencialidad para atravesar la membrana (TM), las cuales podrían favorecer una estrecha proximidad entre los extremos C- y N-terminal 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-Pro}TrbC 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-terminal y después, una 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). Allí, TraF (maturasa), con actividad serán

proteasa, eliminaría un tetrapéptido (AIEA) de la molécula (TrbC*) y dirigiría el proceso de circularización, *via* aminolisis, gracias a la proximidad física existente entre los extremos de la molécula (Figura 13).

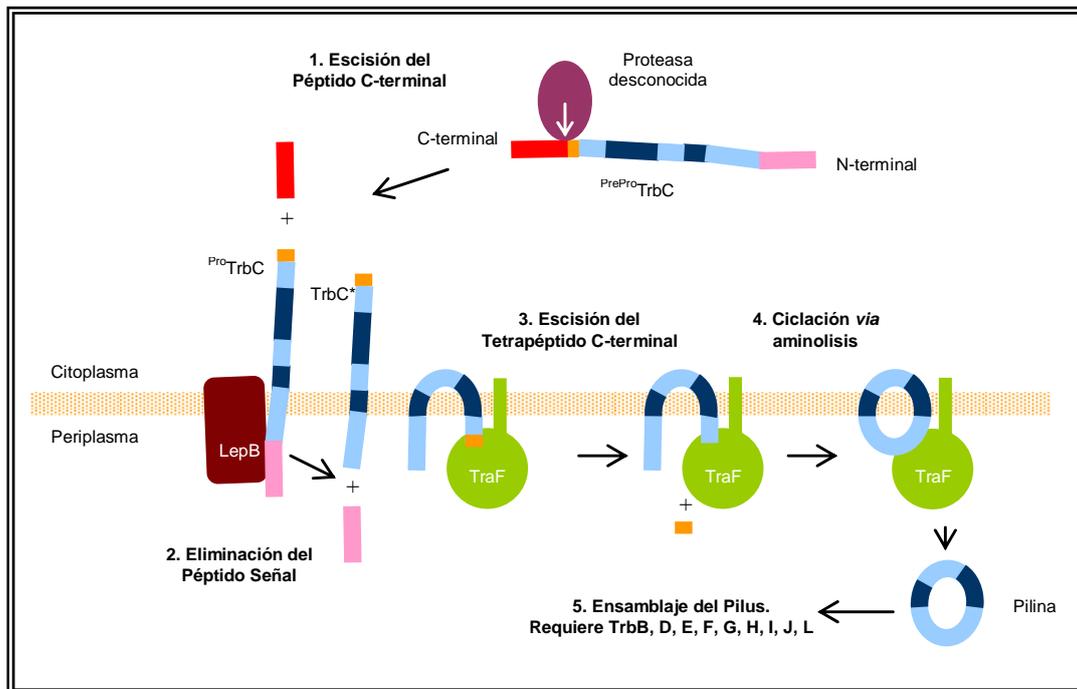


Figura 13. Maduración de los precursores de la pilina para producir la molécula cíclica. Las hélices transmembrana predichas se muestran en azul oscuro. Las secuencias parciales se indican por colores: en rojo la secuencia C-terminal no esencial; en rosa, el péptido señal N-terminal; en naranja el tetrapéptido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

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 su 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.

En el caso de la **síntesis de pilina T**, el extremo C-terminal no sólo no es eliminado durante la maduración, sino que tales residuos están implicados en la unión peptídica con el residuo Q⁴⁸ 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*, esta 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).

Las proteínas auxiliares implicadas en la expresión de las bacteriocinas AS-48, MccJ25 y de la circularina A, codificadas en sendos plásmidos y en el cromosoma bacteriano, respectivamente, se han localizado agrupadas junto a sus correspondientes genes estructurales, pero con los datos disponibles hasta el momento, no se puede descartar la existencia de proteínas de diferente origen que aún no hayan sido identificadas (Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Kemperman *et al.*, 2003a).

En el caso de la **Microcina J25**, se han identificado los genes *mcjABCD* en una región de 4,8 kb del plásmido pTUC100 de *E. coli*, organizados en dos operones divergentes y separados por 339 pb (Rebuffat *et al.*, 2004) (Figura 14). El primer operón incluye al gen estructural *mcjA*, que codifica el precursor de la MccJ25 (58 residuos, de los cuales los primeros 37 forman un típico péptido señal y los 21 restantes darán lugar a la proteína madura). En el segundo operón se localizan dos genes adyacentes, *mcjB* y *mcjC*, seguidos del gen *mcjD*. La función de los genes *mcjB* y *mcjC* podría ser la eliminación del péptido señal y la subsiguiente ciclación de MccJ25. El gen *mcjD*, está implicado en la secreción de la molécula madura y en la inmunidad y resistencia del organismo productor (Moreno *et al.*, 2002). La proteína McjD muestra homología con los sistemas de transporte de tipo ABC, y formaría un canal en la membrana interna para permitir el paso de la proteína madura a través de la membrana.

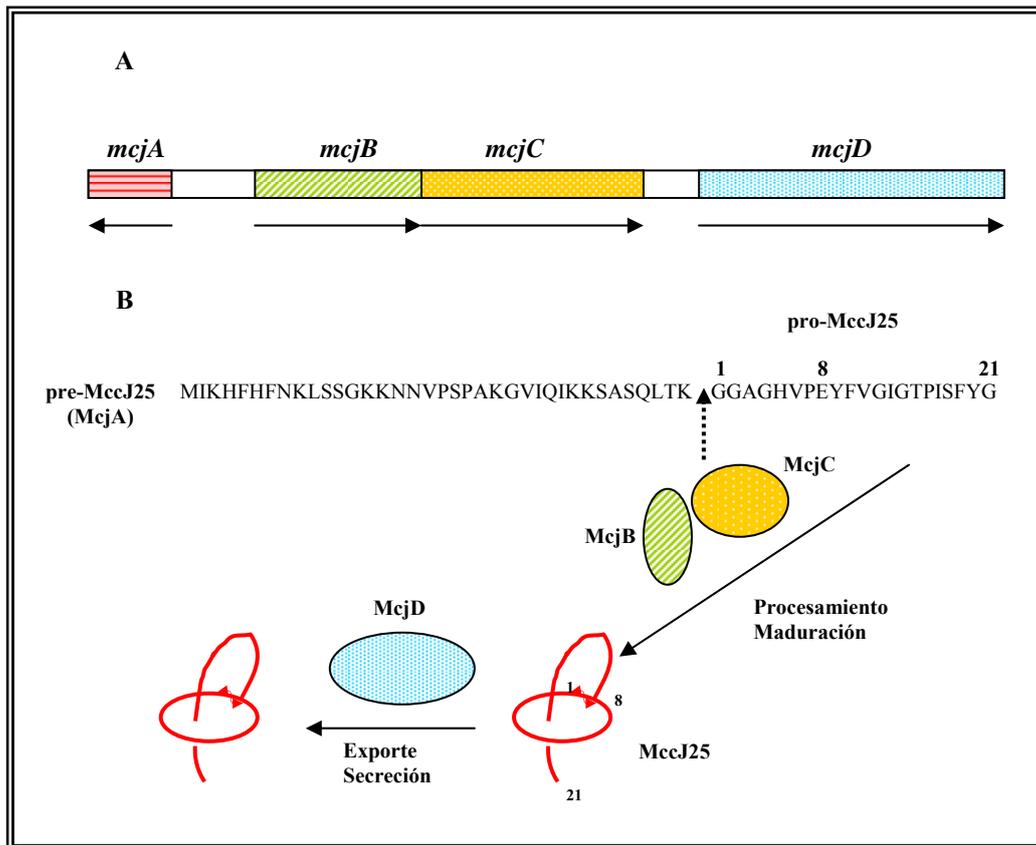


Figura 14. Mapa genético y mecanismo de biosíntesis de la MccJ25. A) Organización de los genes implicados en la expresión del carácter MccJ25, localizados en el plásmido pUT100. B) esquema de maduración y exporte propuestos: el producto del gen *mccjA* (58 aminoácidos) pre-MccJ25 es convertido en la forma madura y cíclica de 21 residuos mediante rotura proteolítica y posterior ligación (tomado de Rebuffat *et al.*, 2004).

Para la **producción a nivel basal de Circularina A** son necesarios 5 genes (*cirABCDE*): el gen estructural *cirA*, *cirE* responsable de la proteína de la inmunidad y los genes *cirB* y *cirD* que codifican las que parecen ser las subunidades de un típico transportador ABC (CirB y CirD) presumiblemente encargado de la secreción de esta bacteriocina. Los autores asignan, por eliminación, al producto del gen *cirC* la función de maduración del prepéptido. La proteína CirC presenta un cierto grado de homología (21%) con As-48C (Kemperman *et al.*, 2003a) cuya función hasta el momento no había sido asignada (Martínez-Bueno *et al.*, 1998).

En el caso de la **síntesis de Ciclotidos** la situación es más compleja, ya que se estima que estas sustancias son derivadas de una familia multigénica (12 genes), algunos de los cuales codifican un precursor en el que se pueden encontrar los siguientes dominios o exones (Jennings *et al.*, 2001) (Figura 15): una señal para el retículo endoplásmico (ER), una secuencia relativamente larga y poco conservada llamada pro-región, seguida de una o varias

unidades repetidas que incluye el ciclótido maduro y en el extremo C-terminal un núcleo muy hidrófobo (cola: GLPSLAA / GLPSAAA / SLPLVAA). Cada una de estas unidades repetidas contiene una región N-terminal muy conservada (ntr) de función desconocida precediendo a la secuencia madura. Es posible que esta secuencia ntr esté relacionada con el plegamiento correcto de la proteína precursora antes de sufrir la rotura y posterior ciclación.

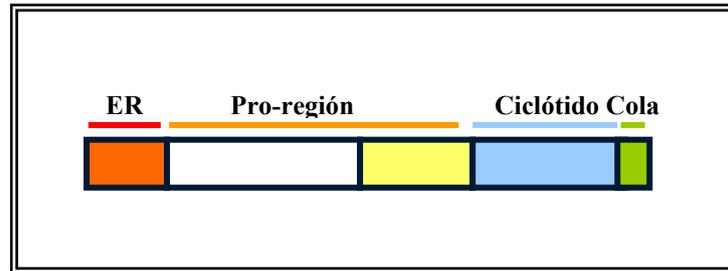


Figura 15. Estructura de las proteínas precursoras de los ciclótidos

De la estructura de estos precursores se deduce que se requieren al menos dos roturas para escindir el péptido, y que los sitios de procesamiento no pueden ser muy diversos ya que siempre se encuentran los motivos GLP o SLP flanqueando a las secuencias maduras. Se han descrito 5 posibilidades que conducirían a la formación de un péptido circular (Figura 16):

- Cuando el motivo GLP aparece flanqueando la secuencia del ciclótido maduro, hay cuatro sitios posibles de procesamiento.
- Cuando aparece el motivo SLP en la cola, sólo existe un sitio posible de rotura. La existencia de la secuencia SLP, que sólo se encontró en el ciclótido Oak4, hace pensar que en todos los ciclótidos la rotura probablemente ocurra tras un residuo de Lys conservado en el extremo N-terminal y tras un residuo conservado Asp/Asn en el extremo C-terminal.

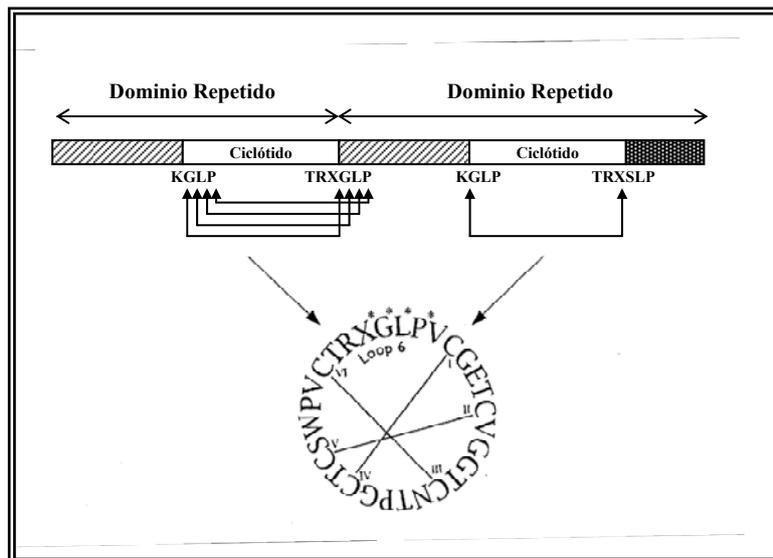


Figura 16. Representación esquemática de la biosíntesis de los ciclótidos mostrando los posibles sitios de rotura del precursor, dependiendo de la presencia del motivo GLP (4 sitios posibles) o SLP (un único sitio) (tomado de Craik *et al.*, 2004).

Aunque se desconoce el enzima que puede romper la cola del péptido (LAA), se han descrito unas asparagina endopeptidasas (legumainas) capaces de cortar a nivel del Asn y a las que por tanto se le podría asignar esta función (Scott *et al.*, 1992). Sin embargo, en el terreno de la hipótesis también se baraja la posibilidad de que exista un mecanismo autocatalítico similar al de las inteínas (Craik *et al.*, 2004).

La situación es aun más novedosa en el caso de **síntesis de la defensina RTD-1**. En los estudios de rastreo para la localización de los genes responsables de RTD-1 (Tang *et al.*, 1999) se aislaron dos cDNAs, que, sorprendentemente, no tenían la longitud suficiente para codificar la molécula completa (18 aminoácidos). La comparación de la secuencia peptídica con la de los posibles genes identificados puso de manifiesto que la defensina RTD-1 presentaba en su composición aminoácidos presentes en los productos derivados de ambos genes, a los que se llamó RTD1a y RTD1b (Figura 17). Estos genes (*RTD1.1* y *RTD1.2*) presentan la estructura típica de los genes de las α -defensinas mieloides (3-exones/2-intrones), con los que muestran un 88% de identidad. De hecho, RTD-1 parece estar compuesta por dos péptidos de 9 residuos unidos por enlace peptídico cabeza-cola, derivados de los precursores altamente conservados RTD1a/1b.

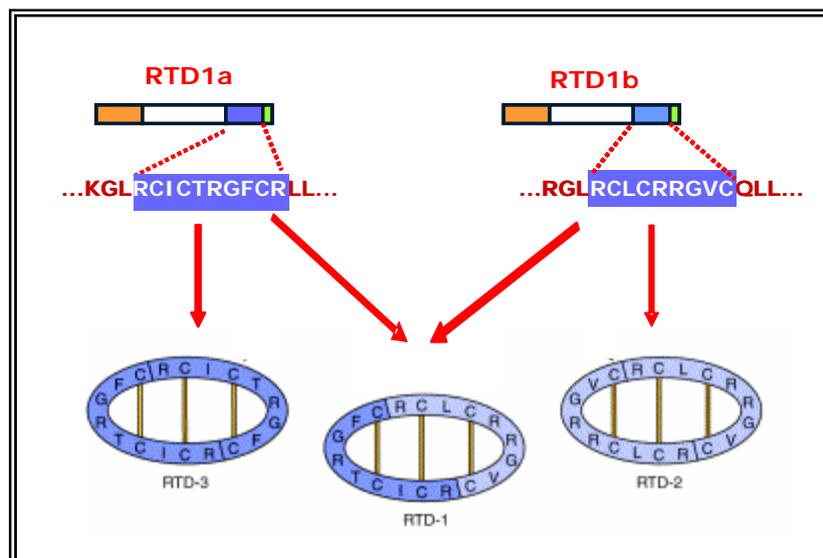


Figura 17. Organización y secuencia de los exones correspondientes a los genes *RTD1.1* y *RTD1.2* y posible mecanismo de biosíntesis de las defensinas RTD-1, RTD-2 y RTD-3.

Los pasos del procesamiento postraduccional requeridos para originar la molécula madura incluyen (Figura 17):

- Eliminación del péptido señal.
- Rotura proteolítica en los sitios que flanquean a cada uno de los nonapéptidos.
- Formación de dos nuevos enlaces peptídicos.
- Finalmente, formación de puentes disulfuro debido a la presencia de Cys, que serían los responsables de la orientación final de ambas cadenas en la molécula.

3. BACTERIOCINA AS-48

Los primeros datos sobre el péptido AS-48 fueron publicados por Gálvez *et al.* (1985) como resultado de un estudio realizado sobre la producción de sustancias de tipo bacteriocina por diferentes especies del género *Enterococcus*. De un total de 90 cepas analizadas, 36 producían esta clase de antagonistas, y en concreto la cepa productora de AS-48 fue identificada como *Enterococcus faecalis* subsp *liquefaciens* S-48. Esta bacteria producía, además, una segunda bacteriocina de alto Pm (80 kDa) que fue denominada Bc-48 y que se

consideró perteneciente a la Clase III al tratarse de una bacteriocina con alto Pm y estrecho espectro de acción (López-Lara *et al.*, 1991). No ha sido ésta la única referencia de enterococos productores de AS-48, 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. Suelen tratarse de variantes naturales que muestran pequeñas diferencias en cuanto a la composición aminoacídica, los 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). Este ha sido también el caso de la enterocina AS-48, publicada bajo diferentes nombres como la enterocina EFS2 (Maisnier-Patin *et al.*, 1996), la enterocina 4 (Joosten *et al.*, 1996), o la bacteriocina 21 (Tomita *et al.*, 1997), todas ellas producidas por cepas de *E. faecalis*. Más recientemente, la producción de AS-48 ha sido incluso referida en dos cepas de *E. faecium*, 7C5 (Folli *et al.*, 2003) y RJ16 (Abriouel *et al.*, 2005).

Los análisis genéticos preliminares realizados en *E. faecalis* subsp *liquefaciens* S-48, pusieron de manifiesto la presencia de cuatro plásmidos con diferentes movilidades electroforéticas: dos de alto Pm, pMB1 y pMB2 (90 y 68 kb, respectivamente) y dos miniplásmidos, pMB3 y pMB4 (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, 1990).

El origen plasmídico de las bacteriocinas AS-48 y Bc-48 fue determinado en estudios de estabilidad genética y de curación de plásmidos, los cuales permitieron establecer una relación inequívoca entre la presencia del plásmido pBM1 y la producción de Bc-48, y de pMB2 con la capacidad productora de AS-48. (Martínez-Bueno *et al.*, 1990a, b; López-Lara *et al.*, 1991).

3.1. Actividad biológica y modo de acción de AS-48

La enterocina AS-48 presenta actividad bactericida sobre la mayoría de las bacterias Gram-positivas ensayadas, siendo especialmente sensibles las estirpes de *Enterococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Planococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Nocardia*. Estos 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 facilita la unión y el acceso de la molécula AS-48 a su diana celular, la membrana citoplasmática (Gálvez, 1987; Gálvez *et al.*, 1989b). Es obligado resaltar la gran sensibilidad que muestran las especies de *Listeria*, bacteria patógena frecuentemente vehiculizada por alimentos, que requiere para ser inhibida concentraciones 50 veces inferiores a las necesarias para provocar su efecto inhibitor frente a otras bacterias sensibles como *Enterococcus* o *Bacillus*.

Además, 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 thermophacta* (Muñoz, 2006) y *Paenibacillus*, habiéndose 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; Grande *et al.*, 2005 a, b; Grande *et al.*, 2006; Cobo *et al.*, 2005).

Aunque AS-48 afecta también a diversas especies de bacterias Gram-negativas, éstas son mucho menos sensibles, debido al efecto protector que les proporciona la membrana externa (Gálvez *et al.*, 1989b; Abriouel *et al.*, 1998). Sin embargo, muchas cepas que a priori son resistentes, se vuelven sensibles cuando se emplean tratamientos combinados, 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. Estos resultados ofrecen perspectivas prometedoras a muy corto plazo para el desarrollo de cultivos iniciadores que posibiliten el control de este tipo de patógenos en alimentos y también para el empleo directo de la bacteriocina como bioconservante.

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 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 ("asolectina de soja"), 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. La adición a bajas concentraciones desencadenaba una serie de señales eléctricas que se pueden corresponder con la apertura de canales cuyo diámetro podría 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, que han sido de gran utilidad para conocer el tipo de interacción que esta molécula establece con algunos componentes de la membrana citoplasmática. De esta forma se ha podido comprobar que la principal interacción 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).

En una gran parte de las bacterias sensibles se observa también como efecto secundario un descenso en la densidad óptica de los cultivos, debido a la lisis celular producida (Gálvez, 1987; Gálvez *et al.*, 1989b). En *Enterococcus faecalis*, dicha acción es dependiente de iones Mg²⁺, y es atribuible a la actividad de las autolisinas presentes en la pared de esta bacteria. Estos resultados han sido interpretados de forma que tras los daños letales ocasionados a nivel de membrana, se produciría la desregulación de las autolisinas encargadas de digerir la pared celular (Gálvez *et al.*, 1990). Desde un punto de vista aplicado,

la inducción de bacteriolisis puede tener un gran interés en productos maduros, por ejemplo en quesos, en los que los enzimas intracelulares liberados contribuyen a potenciar el sabor.

3.2. Características bioquímicas de AS-48

E. faecalis subsp. *liquefaciens* A-48-32, que contiene únicamente el plásmido pMB2, y 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-*, 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 diversas endopeptidasas (tripsina, proteinasa K o proteasa V-8), aunque no por exopeptidasas. Es una molécula muy estable a pH ácido (3 a 5), y neutro, sólo a pH alcalino (10-11) sufre una ligera pérdida de actividad (Gálvez *et al.*, 1986; Gálvez, 1987). En su composición de aminoácidos destaca la ausencia de cisteína y de aminoácidos modificados como la lantionina, la beta-metil-lantionina ni otros residuos deshidratados, lo que la diferencia netamente de los lantibióticos (bacteriocinas de Clase I). El análisis de la composición aminoacídica de AS-48 demuestra la existencia de una alta proporción de residuos básicos, justificando así su carácter fuertemente catiónico (pI 10,5). Además contiene una gran cantidad de residuos hidrófobos (Ala, Pro, Val, Met, Ile, Leu y Phe) y de aminoácidos hidrófilos sin carga neta (Ser, Gly, Thr, y Tyr) (Gálvez *et al.*, 1989a).

De acuerdo con las características bioquímicas de AS-48 y su actividad anti-listeria, esta molécula estaría considerada como uno de los péptidos catiónicos antibacterianos producidos por las bacterias del ácido láctico (BAL) pertenecientes a la Clase II. Sin embargo, la estructura circular de AS-48, que le confiere una gran estabilidad, unida a su amplio espectro de acción, la diferencian 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 publicaciones se abogue por la creación de una

cuarta Clase para encuadrar a la enterocina AS-48, considerada como el prototipo de las bacteriocinas circulares producidas por bacterias Gram-positivas (Kemperman *et al.*, 2003b; Maqueda *et al.*, 2004). Es interesante comprobar que estas bacteriocinas circulares tienen en común similitudes respecto al tamaño molecular (entre 3 y 7 kDa) y el punto isoeléctrico (cerca de 10), lo que sugiere que la producción de este tipo de péptidos catiónicos pueda representar un nuevo mecanismo de antibiosis que se ha conservado durante la evolución, porque confieren a las bacterias productoras indudables ventajas desde el punto de vista ecológico.

3.3. Características estructurales de AS-48

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, que indicaban asimismo el bloqueo del grupo carboxilo terminal. Por ello la estructura primaria completa de AS-48 (Figura 6), 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, establecida en 7.149,5 kDa, se obtuvo mediante espectrometría de masas con electrospray. El valor asignado se correspondía exactamente con el calculado al sumar la masa de los diferentes residuos de AS-48, disminuído en la masa de una 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 postraduccional de un péptido que da lugar a una molécula con estructura circular, surgida de la unión de los residuos situados en ambos extremos, Met¹ y Trp⁷⁰ (pre-péptido), tras la eliminación del péptido señal.

Posteriormente, se realizó el estudio de resonancia de protones (¹H RMN) de AS-48 en solución acuosa para establecer la estructura secundaria del péptido (Figura 18) (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 α de acuerdo con la topología indicada en la Figura 19. Las cinco hélices corresponden a los residuos Ala⁹-Ala²¹ (α_1), Val²⁵-Ala³⁴ (α_2), Ser³⁷-Ala⁴⁵ (α_3), Ile⁵¹-Lys⁶² (α_4) y Lys⁶⁴-Phe⁵ (α_5) y se encuentran

conectadas por cortas regiones de giro. Las hélices α_1 y α_2 son antiparalelas entre sí y la α_4 se sitúa perpendicularmente a las hélices α_1 y α_2 , mientras la hélice α_3 es perpendicular a α_4 y corta en el plano definido por α_1 y α_2 con un ángulo de 40° . Finalmente, la hélice α_5 es perpendicular a la α_3 y forma un ángulo de 50° con α_4 y α_1 . La estructura global de AS-48 es, pues, muy compacta, y las cadenas hidrófobas laterales de las hélices α configuran el corazón de la proteína e interaccionan entre sí, estabilizando la estructura (Figura 19). Sin embargo, no todos los residuos hidrófobos se disponen en el centro de la molécula, ya que muchos de los situados en las hélices α_1 , α_2 y α_3 están expuestos al solvente (Figura 21B) (González, *et al.*, 2000).

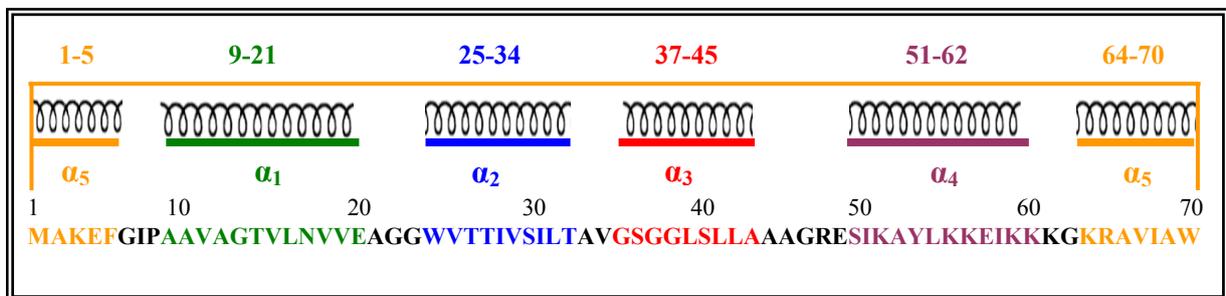


Figura 18. Estructura primaria (abajo) y secundaria (arriba) de la enterocina AS-48. Se representa la unión cabeza-cola.

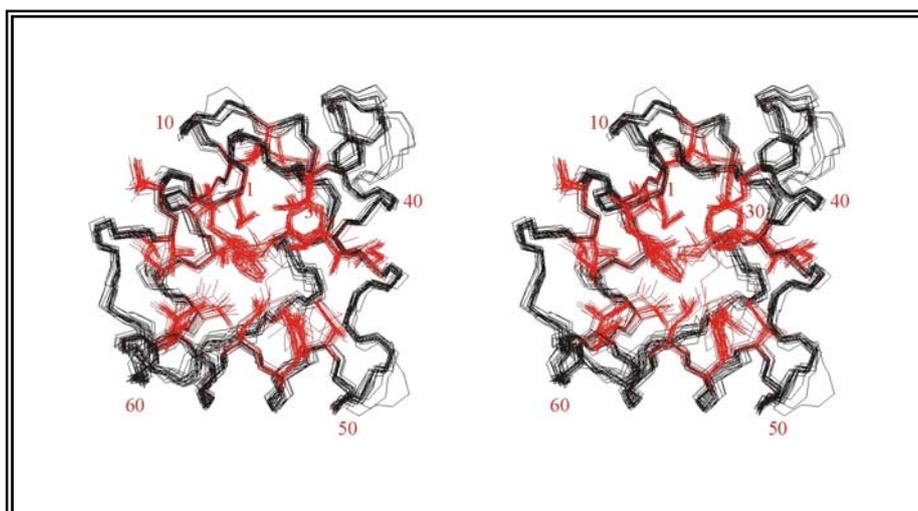


Figura 19. Visión estereoscópica de la superposición de las mejores 20 estructuras de AS-48 obtenidas mediante RMN. En negro se muestra la superposición de los átomos y en rojo la de las cadenas laterales hacia el corazón de la molécula.

Como se comentará más adelante, es un hecho demostrado que AS-48 es una molécula muy estable debido a que la ciclación de la molécula reduce la entropía en términos conformacionales. Además, la unión cabeza-cola de AS-48 se produce en la mitad de la hélice α_5 (residuos 64-5), lo que también tiene un marcado efecto en la estabilidad de la estructura tridimensional. En la hélice α_5 hay una serie de residuos hidrófobos (Val⁶⁷, Met¹ y Phe⁵) que interaccionan con el corazón hidrófobo de la molécula, hecho que también contribuye 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 asemeja a la NK-lisina (Figura 20), un polipéptido de 78 residuos que posee actividad antibacteriana y tumorolítica, aislado del intestino del cerdo (Andersson *et al.*, 1995), y que posee un plegamiento de tipo “saposina” (Liepinsh *et al.*, 1997).

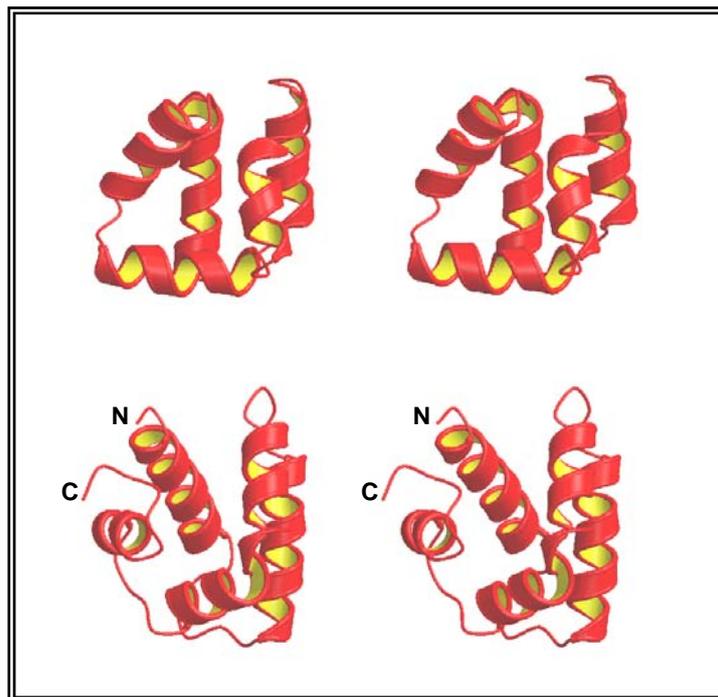


Figura 20. Comparación de las estructuras tridimensionales de la bacteriocina AS-48 (arriba) y de la NK-lisina (abajo).

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 α_1 , α_2 y α_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 y los 4 Glu no protonados, lo que determina un alto potencial electrostático positivo, en particular en la región que comprende la hélice α_4 y el asa entre las hélices α_4 y α_5 (Figura 21A). Esta organización origina a una fuerte acumulación de cargas positivas en una zona superficial de la proteína (hélices α_4 y α_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).

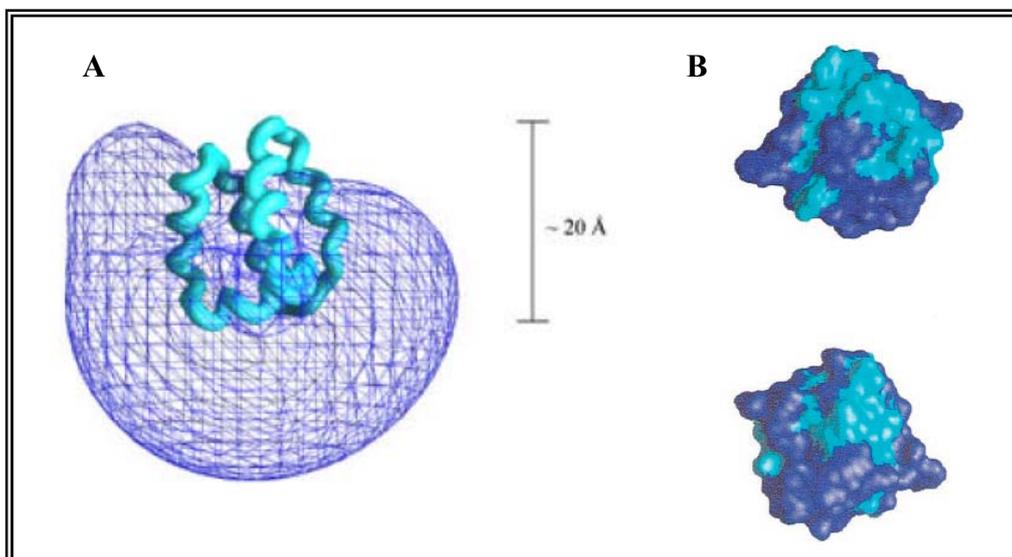


Figura 21. (A) Potencial electrostático positivo de AS-48 al nivel de $2kT/q$, calculado con el programa GRASP. La dirección del cambio máximo del potencial es aproximadamente vertical. Se indica la longitud del polipéptido en esa orientación, 20 Å. (B) Vista frontal (arriba, misma orientación que en A) y posterior (abajo) de AS-48, indicando las regiones hidrófobas en la superficie (color cyan).

El análisis cristalográfico llevado a cabo sobre AS-48 en solución a pHs 4,5 y 7,5 (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003) confirmó en todos sus extremos la estructura propuesta mediante RMN, pero los resultados diferían en lo relativo a la composición del corazón hidrófobo y en la superficie molecular de la molécula (Figura 22). 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.

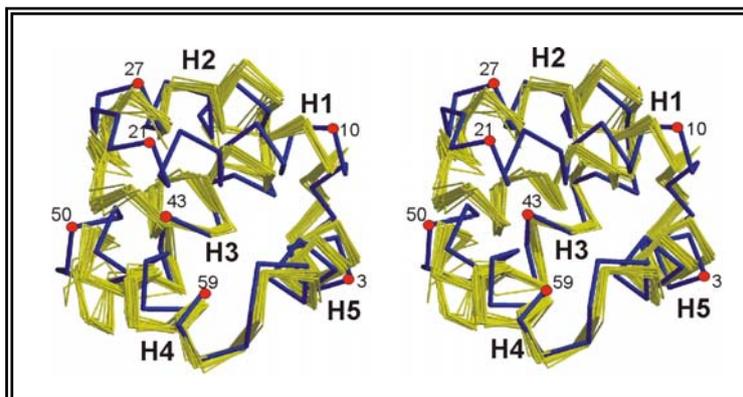


Figura 22. Estereovisión de la superposición de los 20 mejores modelos de AS-48 obtenidos mediante RMN (amarillo) y cristalografía de rayos X (azul).

Los datos obtenidos en los cristales permiten suponer que los átomos $C\alpha$ de Glu⁴, Glu²⁰, Glu⁴⁹ y Glu⁵⁸ de la molécula forman un plano que segrega los residuos cargados positivamente (hélice α_4 , el extremo N-terminal de α_5 y el asa que conecta α_4 y α_5) del resto de los residuos no cargados o hidrófobos (hélices α_1, α_2 y α_3) (Figura 23).

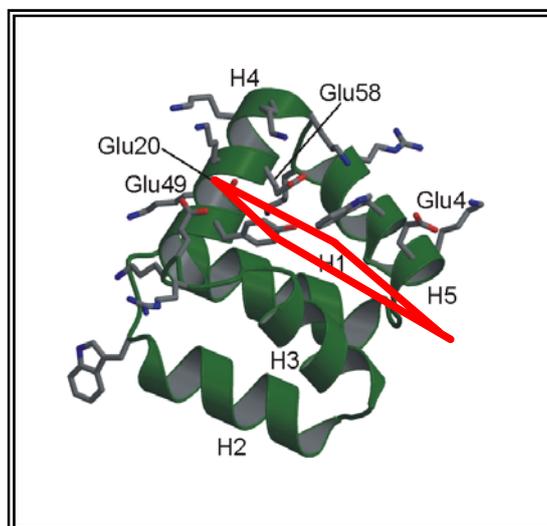


Figura 23. Representación del hipotético plano formado por los 4 residuos de Glu presentes en AS-48.

Por otra parte, se ha confirmado que las moléculas de AS-48 en el cristal adoptan dos formas diméricas diferentes, abreviadas como DF-I y DF-II, según las condiciones ambientales en las que se encuentren:

- Las moléculas de AS-48 en DF-I interactúan a través de las hélices α_1 y α_2 (Figura 24A), 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 como la membrana, las moléculas de AS-48 se encuentran formando dímeros DF-II (Figura 24B) gracias a la interacción entre las hélices hidrófilas α_4 y α_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.

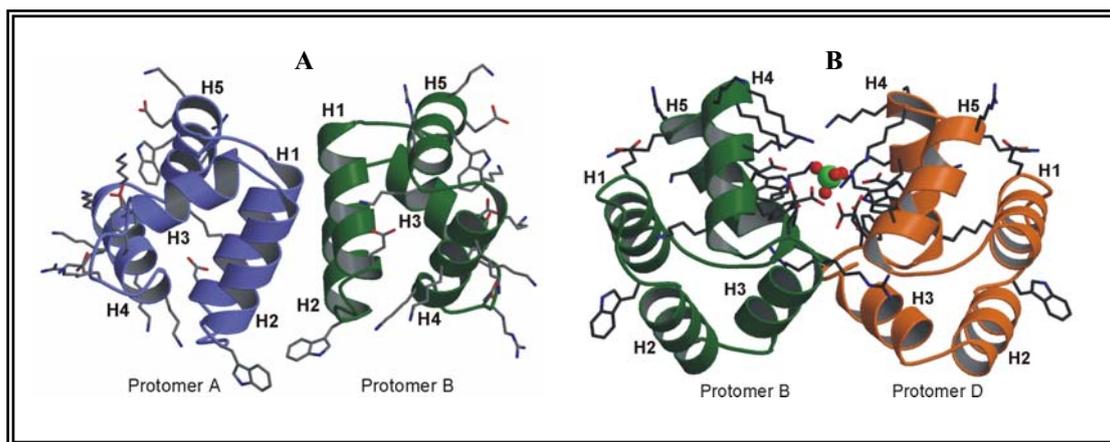


Figura 24. Representación de las formas diméricas encontradas en cristales de AS-48 en solución. Estructura de la DF-I (A) y la DF-II (B).

3.4. Relación Estructura-Función

Según el modelo de RMN, AS-48 actuaría sobre las membranas siguiendo el mecanismo de electroporación molecular (González *et al.*, 2000), que describe la formación de poros en la membrana producida por la unión de una molécula cargada en su superficie, y está ejemplificado por la NK-lisina (Miteva *et al.*, 1999). Este mecanismo sería también aplicable a AS-48 dadas sus características electrostáticas. De hecho, en estudios previos

(Gálvez *et al.*, 1991) se demostró que la bacteriocina AS-48 interacciona con la membrana citoplasmática de las bacterias sensibles induciendo la permeabilización iónica y el colapso del potencial de membrana. Según el modelo de electroporación molecular, AS-48 se uniría inicialmente a la superficie de la membrana a través de su superficie hidrófila y se acumularía en ella, incrementando su concentración local y favoreciendo la electroporación y la permeabilización de la membrana (González *et al.*, 2000).

Sin embargo, los dos tipos de dímeros de AS-48 encontrados en la cristalización de la molécula (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003), han llevado a proponer un mecanismo molecular alternativo para explicar la actividad formadora de poros de AS-48, el cual implica una transición de la forma soluble (dímero DF-I) a la forma unida a la membrana (dímero DF-II), permitiéndole así su inserción (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003). El fuerte momento dipolar de DF-I podría dirigir el acercamiento de AS-48 a la membrana y el bajo pH que hay en su 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 cómo 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).

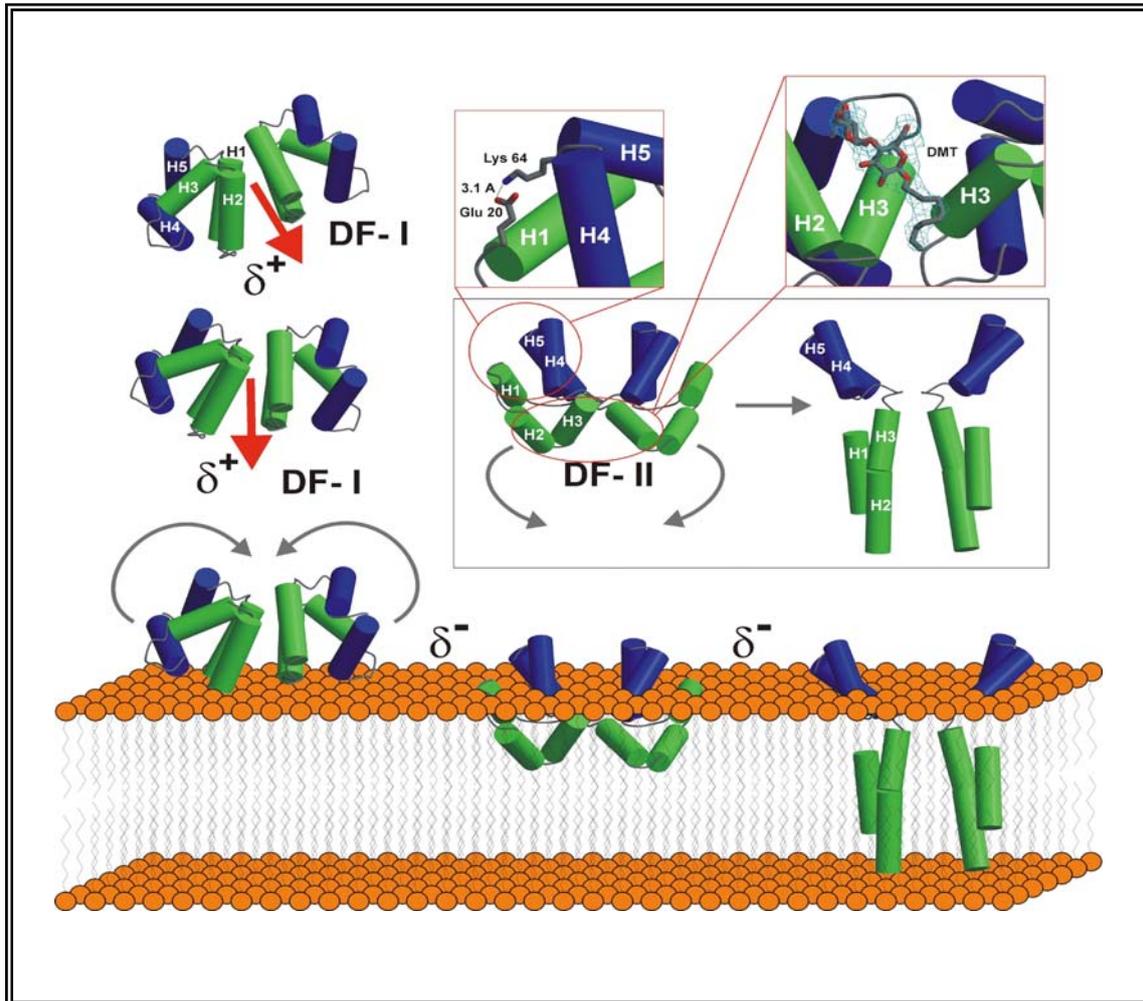


Figura 25. Representación del mecanismo molecular de la inserción en membrana de AS-48. El modelo incluye la aproximación de la forma DF-I a la membrana y la transición de DF-I a DF-II a nivel de la superficie de la membrana.

Para aclarar cuál es el mecanismo de acción de la bacteriocina AS-48 se diseñó un fragmento de 21 aminoácidos llamado B-49-69 (Jiménez *et al.*, 2005) que contenía la región cargada positivamente de AS-48 (hélices α_4 y α_5), que se considera implicada en la interacción con las membranas bacterianas (González *et al.*, 2000). La estructura de B-49-69 determinada por RMN fue prácticamente la misma que la de la región homóloga en AS-48 (Figura 26), si bien no fue reconocida por anticuerpos específicos anti-AS-48.

La minibacteriocina B-49-69 no mostró actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* CECT 4032 en medio sólido ni en medio líquido, pero disminuyó la actividad de AS-48 cuando fue añadida a cultivos en fase exponencial antes que la bacteriocina. Según este resultado, B-49-69 se uniría a la superficie celular cargada negativamente, y una vez que

dicha superficie estuviera cubierta por moléculas de B-49-69, la aproximación de AS-48 se dificultaría, impidiendo la permeabilización de la membrana. La adición de B-49-69 al medio con posterioridad a la adición de AS-48 no tuvo ningún efecto. Los datos sugieren que B-49-69 parece realizar el primer paso en el mecanismo de acción antibacteriano de AS-48, es decir, la unión de las áreas de la molécula cargadas positivamente a la superficie bacteriana cargada negativamente a través de interacciones electrostáticas. En cambio, B-49-69 no es capaz de permeabilizar las membranas debido a que no posee una distribución de las superficies hidrófilas e hidrófobas en la molécula, que sí existe en AS-48 (Jiménez *et al.*, 2005).

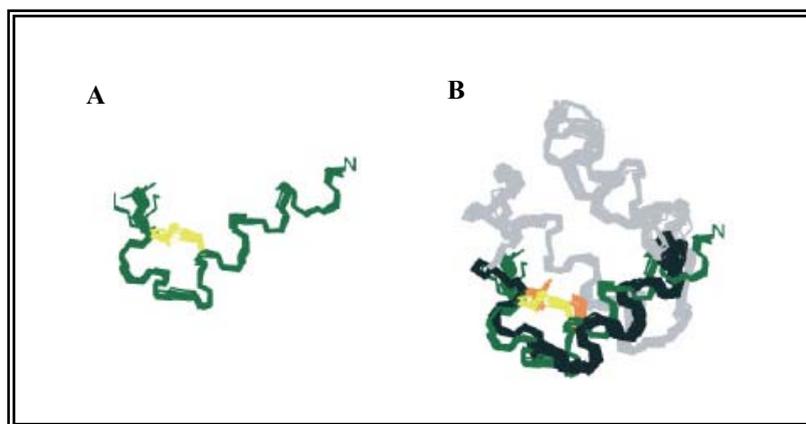


Figura 26. (A) Superposición de las 20 mejores estructuras calculadas para B-49-69 en TFE al 30%. El puente disulfuro aparece en amarillo. (B) Superposición de las estructuras de B-49-69 y la bacteriocina AS-48. En verde, B-49-69, en negro, el segmento 49-69 de AS-48. Las cadenas laterales de I59 y V67 en AS-48 aparecen en naranja, y el puente disulfuro entre C59-C67 de B-49-69 en amarillo.

3.5. Estabilidad de AS-48

Es un hecho indiscutible que la ciclación confiere una gran estabilidad a las moléculas, y en el caso de AS-48 esta estabilización se puso de manifiesto en los estudios de calorimetría diferencial de barrido, realizados a pH 2,5 y a baja fuerza iónica, en los que la desnaturalización térmica ocurría a temperaturas superiores a los 102 °C en condiciones de equilibrio, mientras que el estado desnaturalizado agrega irreversiblemente a pH neutro o alcalino (Cobos *et al.*, 2001). Por otra parte, el desplegamiento de la molécula requiere altas concentraciones de cloruro de guanidinio (> 7M). Los estudios cinéticos del desplegamiento-replegamiento de la proteína, muestran que se trata de una de las proteínas globulares con mayor

velocidad de plegamiento descritas hasta el momento. Este hecho, de nuevo está relacionado con el bajo coste entrópico de este proceso, debido a la circularización de la cadena polipeptídica (Cobos *et al.*, 2002).

3.6. Determinantes genéticos de AS-48

Las primeras investigaciones sobre los aspectos genéticos de AS-48 permitieron localizar sus determinantes genéticos en un plásmido conjugativo de 68 kb que responde a feromonas, denominado pMB2 (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.*, 1990; Quirantes *et al.*, 1995).

El gen estructural de AS-48 (*as-48A*) fue localizado y secuenciado por Martínez-Bueno *et al.* (1994) y los resultados obtenidos permitieron concluir que, aunque el péptido activo posee 70 residuos, el producto primario del gen contiene 105 aminoácidos, de los que los 35 primeros, de naturaleza hidrófoba, actúan como un péptido señal que ha de ser escindido para permitir la ciclación de la molécula. 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 (IKKKGKRAVIAW) correspondiente al extremo carboxilo (I⁺⁵⁹ a W⁺⁷⁰) del producto génico traducido y termina con cuatro residuos (MAKE) correspondientes al extremo amino del pro-péptido AS-48.

La región genética donde se localiza el gen estructural *as-48A* está bien definida. El gen se encuentra precedido por un promotor fuerte capaz de expresarse en *E. coli* (Fujimoto e Ike, 2001). Se ha identificado, además un sitio típico de unión a ribosomas (GGAGGA) y una repetición invertida a continuación del codon stop (TAA) considerada como un terminador ρ -independiente (Martínez-Bueno *et al.*, 1998) (Figura 27).



Figura 27. Secuencias promotoras del gen *as-48A*. Las flechas indican la repetición invertida. Se toma como posición inicial el sitio *SphI* de la región *as-48* clonada en pAM401.

Subsiguientes estudios realizados para investigar la región genética *as-48* permitieron localizar en el plásmido pMB2, además del gen estructural, un conjunto de genes situados corriente abajo de éste (Figura 28): *as-48B*, *as-48C*, *as-48C1*, *as-48D*, *as-48D1*, *as-48E*, *as-48F*, *as-48G* y *as-48H*, que han sido identificados como los determinantes genéticos responsables de la expresión del carácter AS-48 (producción e inmunidad) (Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2003).

Toda la región *as-48* (14,8 kb) ha sido clonada y expresada en el plásmido lanzadera pAM401, elegido por ser un vector bifuncional para *Enterococcus-E. coli*. La construcción obtenida fue el plásmido recombinante pAM401-81, que al ser transferido mediante electroporación a *E. faecalis* JH2-2 le confería la capacidad de expresar el carácter AS-48 con una eficiencia similar a la de la estirpe silvestre *E. faecalis* S-48. (Díaz *et al.*, 2003).

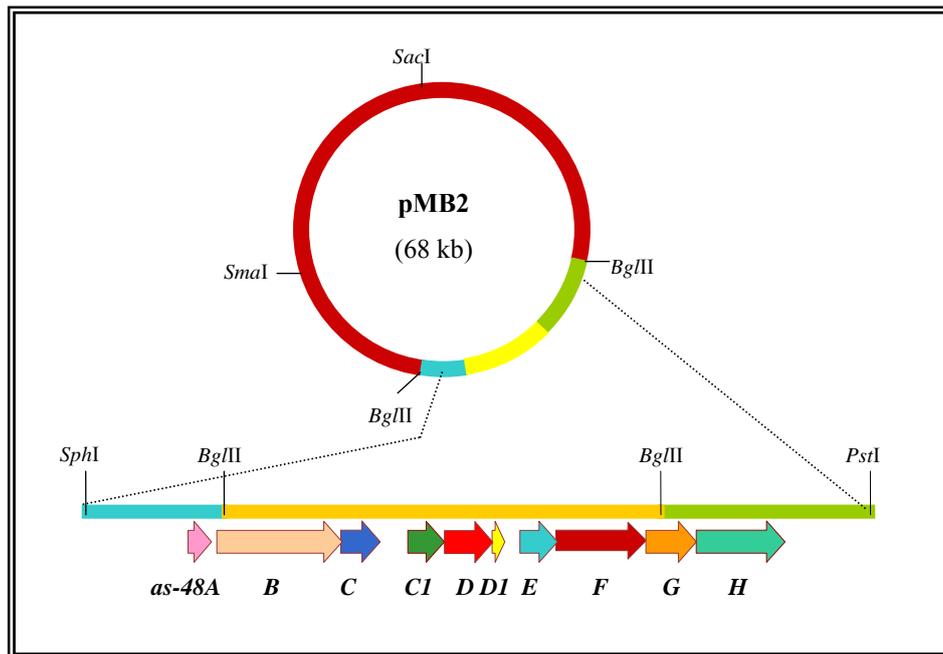


Figura 28. Mapa físico y genético del plásmido pMB2 con los sitios de corte de diversas enzimas de restricción, en el que se destaca los genes identificados en la región *as-48*.

Los primeros estudios moleculares realizados en diversos transformantes de JH2-2, permitieron identificar el producto del gen *as-48DI* como el determinante de la inmunidad al ser capaz de conferir por sí mismo cierto grado de resistencia (Martínez-Bueno *et al.*, 1998). Se trata de un péptido catiónico (pI 10,81) fuertemente hidrófobo, cuya predicción de estructura secundaria sugiere la existencia de dos segmentos transmembrana con una conformación típica en hélice α y un extremo carboxilo hidrófilo. La existencia de estas proteínas de inmunidad ha sido también descrita en otros péptidos catiónicos, tales como Pep1 (Reis *et al.*, 1994) o lactococina A (Nissen-Meyer *et al.*, 1993). Sin embargo, no se puede descartar la existencia de mecanismos complementarios de inmunidad en los que estén implicadas otros productos del grupo de genes *as-48*, como es el caso de la bomba de tipo ABC constituida por *As-48EFGH* (Díaz *et al.*, 2003), así como el producto del gen *as-48C* (Fernández *et al.*, 2006), que en todo caso aumentarían la resistencia frente a AS-48 bien administrado de manera exógena o durante su biosíntesis, respectivamente, de forma similar a lo descrito para la microcina B17, nisina, subtilina y Pep5 (Garrido *et al.*, 1988; Saris *et al.*, 1996).

Para el resto de los productos génicos identificados en la región *as-48*, se han propuesto diversas funciones basadas en su homología con proteínas bien caracterizadas, depositadas en las bases de datos, así como mediante análisis funcional por mutagénesis con el transposón Tn5

(Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2003; Fernández, 2004). De esta forma, se ha podido demostrar la importante función de *as-48B*, *as-48C1* y *as-48D* en la biogénesis de AS-48, ya que la inactivación de cualquiera de ellos determina el cese de la producción de AS-48, mientras que la de *as-48C* y *as-48G* sólo la disminuye, como se deduce del fenotipo hipoprodutor de los mutantes. De los restantes genes identificados, los productos mejor caracterizado fueron As-48D y As-48G por tratarse de proteínas parcialmente hidrófilas con sitios de unión al ATP, de acuerdo con las homologías que ambas presentaban con los dominios Walkers A y B de los transportadores ABC (ATP-Binding-Casette) (Higgins *et al.*, 1986; Fath y Kolter, 1993). La proteína codificada por el gen *as-48F* se encuentra anclada en la membrana citoplasmática por el extremo amino-terminal y presentan una región super-enrollada conocida como "*coiled coil region*". La estructura secundaria sigue una organización ($\alpha+\beta$) similar a la de la proteína GrpE, con la que comparte un cierto grado de homología. La función asignada a la proteína As-48F ha sido la de intercambiador de nucleótidos, estimulando la actividad ATPasa de As-48G y acelerando la liberación del ADP, permitiendo un reciclaje más rápido del sistema, con la finalidad última de aumentar su eficacia en la protección celular (Díaz *et al.*, 2003). Las proteínas As-48C₁, As-48E y AS-48H, resultaron ser muy hidrófobas ya que presentaban, respectivamente, seis, cuatro y cuatro dominios capaces de atravesar la membrana. Por ello han sido propuestas como los dominios de expansión en membrana necesarios para completar la función de los dos transportadores ABC identificados en esta región (As-48C₁D y As-48EFGH) (Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2003).

La función de ambos transportadores, deducida del comportamiento de los mutantes de inserción con el transposón Tn5, ha permitido determinar que el sistema As-48C₁D es esencial para la secreción y exporte de la molécula, y en ningún caso puede ser sustituido por el segundo transportador identificado, As-48EFGH, último responsable de la auto-protección frente a AS-48, posiblemente interactuando de forma cooperativa con la proteína de la inmunidad As-48D y, de acuerdo con resultados muy recientes, también con la proteína As-48C (Fernández *et al.*, 2006). En la mayoría de los sistemas descritos, la secreción de bacteriocinas tiene lugar de forma simultánea a la separación del péptido-sígnal y son, por tanto, necesarios para la secreción y maduración de estos péptidos (Havarstein *et al.*, 1995). Sin embargo, en el caso de AS-48 el proceso parece aún más complejo, dadas las características del péptido-sígnal y la naturaleza circular de la molécula.

3.7. Biosíntesis de AS-48

La biosíntesis de AS-48 aún no ha sido completamente aclarada a pesar de los esfuerzos realizados para identificar la(s) proteína(s) responsable(s) de la maduración y ciclación de la misma. Los primeros resultados que se obtuvieron comparando la secuencia del gen estructural con los de la proteína madura demostraron que la molécula activa contenía 70 residuos, mientras que el producto primario del gen contenía 105 aminoácidos, lo que permitió concluir que los primeros 35 residuos de la molécula, de naturaleza hidrófoba, actuaban como un péptido señal (Martínez-Bueno *et al.*, 1994; Samyn *et al.*, 1994). Consecuentemente con ello, se ha propuesto que el producto primario de *as-48A* seguiría las siguientes etapas en su procesamiento (Figura 29): (i) ruptura del péptido señal del prepéptido y (ii) unión entre los residuos M^{+1} y W^{+70} terminales del prepéptido. Ello exigiría la intervención de una peptidasa señal y la formación de un enlace peptídico (ciclasa), actividades que no han sido aún asignadas a ninguno de los determinantes genéticos identificados en la región *as-48*. Es probable que este proceso ocurra durante la translocación de la enterocina a través de la membrana y por ello no sea posible detectar el péptido maduro en el citoplasma.

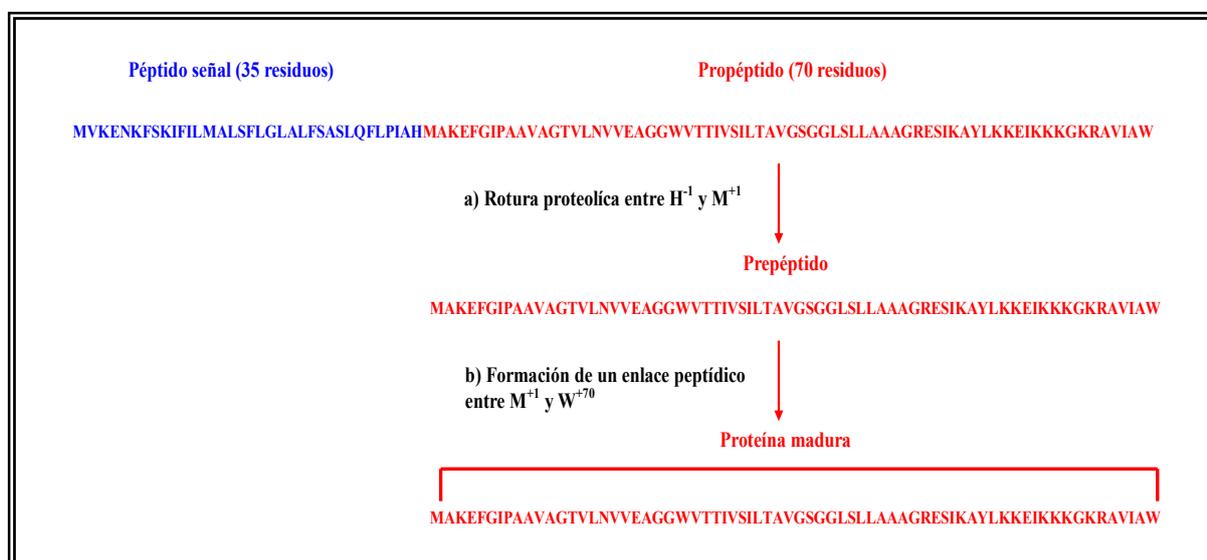


Figura 29. Modelo propuesto para el procesamiento de la enterocina AS-48: eliminación del péptido señal (35 aminoácidos) mediante ruptura entre H^{-1} y M^{+1} seguida de la formación del enlace peptídico entre la M^{+1} y el W^{+70} para originar la molécula circular madura.

Objetivos

El trabajo experimental presentado en esta Tesis Doctoral se ha desarrollado dentro de la línea de investigación del Grupo “Estudios de sustancias antagonistas producidas por microorganismos” de la Universidad de Granada y ha estado centrado en el estudio de la enterocina AS-48 producida por *Enterococcus faecalis*, dadas sus singulares características estructurales, su amplio espectro de acción y la complejidad de la región genética responsable de su expresión. Sin embargo, debido a que los aspectos moleculares de su interacción a nivel de membrana aún no habían sido completamente aclarados, dicho extremo ha sido abordado en esta Memoria a través de la obtención de variantes de este péptido cíclico, mediante mutagénesis dirigida en el gen estructural *as-48A*. De esta forma se pretende conocer la influencia de los residuos modificados en su actividad biológica y su estabilidad termodinámica, así como modificar la distribución de cargas en la superficie de la proteína, para mejorar su aplicación biotecnológica como conservante natural de alimentos. Por todo ello, los objetivos concretos planteados en esta Memoria han sido:

- Modificar la región en la que se encuentra el gen *as-48A* para que estuviera flanqueada por dos sitios de corte únicos, y facilitar así su manipulación en la obtención de mutantes puntuales.
- Realizar el análisis transcripcional de los genes *as-48ABC* y el papel de la región intergénica *as-48A-B* en la regulación de la expresión de estos genes.
- Sustituir algunos residuos que, de acuerdo con estructura tridimensional de AS-48, pudieran ser esenciales en la actividad formadora de poros, que AS-48 ejerce sobre las membranas bacterianas.
- Cambiar algunos de los residuos hidrófobos expuestos al solvente, con la finalidad de reducir la superficie de contacto entre los monómeros de AS-48.
- Valorar la influencia de las sustituciones introducidas en la actividad biológica y la estabilidad de las nuevas moléculas mutadas.

Material y Métodos

1. MICROORGANISMOS

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo, junto a su procedencia y características más relevantes, se muestran en la Tabla 3.

Las cepas de *E. coli* DH5 α y XL1-Blue se emplearon como intermediarios en los experimentos de clonación y transformación genética. La cepa libre de plásmidos *E. faecalis* JH2-2 (Yagi y Clewell, 1980) fue empleada como hospedadora de los diferentes plásmidos recombinantes, en los estudios de producción y/o resistencia de AS-48 y sus variantes, así como indicadora sensible en la mayoría de los ensayos de producción de bacteriocina. Ocasionalmente se utilizaron otras cepas indicadoras que se describen en la Tabla 3.

Microorganismo	Características	Referencia
<i>Bacillus cereus</i> LWL1	AS-48 ^s	Dufrenne <i>et al.</i> , (1995)
<i>Bacillus megaterium</i>	AS-48 ^s	CECT 44
<i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2	Libre de plásmidos, Rif ^r , Fus ^r , AS-48 ^s	Yagi y Clewell (1980)
<i>Enterococcus faecalis</i> S-47	AS-48 ^s	Gálvez <i>et al.</i> , (1989c)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44 Δlac U169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Bethesda Research Lab.
<i>Escherichia coli</i> U-9	AS-48 ^s	CUGr
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^rZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i> .	Stratagene
<i>Listeria innocua</i> 4030	AS-48 ^s	CECT 4030
<i>Listeria monocytogenes</i> 4032	AS-48 ^s	CECT 4032
<i>Salmonella choleraesuis</i> LT2	AS-48 ^r	CECT 722
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	AS-48 ^s	CECT 240

Tabla 3. Microorganismos utilizados en este trabajo y características más relevantes. Rif^r: resistente a rifampicina, Fus^r: resistente a ácido fusídico, Tet^r: resistente a tetraciclina, AS-48^s: sensible a AS-48, AS-48^r: resistente a AS-48, CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, CUGr: colección Universidad de Granada (Dpto Microbiología).

Las cepas de *Enterococcus faecalis*, *Bacillus*, *Listeria* y *Staphylococcus aureus* se cultivaron en reposo a 37 °C, mientras que las cepas de *E. coli* y *Salmonella choleraesuis* se cultivaron a 37 °C en agitación.

2. PLÁSMIDOS

En la Tabla 4 se describen los plásmidos utilizados en este trabajo y sus características más relevantes.

Plásmido	Características	Referencia
pGEM-T	Ap ^r , vector de clonación para productos de PCR (3 kb)	Promega
pAM401	Cm ^r , Tc ^r , vector de clonación bifuncional <i>E.coli-E.faecalis</i> (10,4 kb)	Wirth <i>et al.</i> , (1986)
pBgD12S	Ap ^r , gen <i>as-48A</i> clonado en pSL1180 (5,4 kb)	Este trabajo
pGEM-T_{as48A-X}	Ap ^r , <i>lacZ</i> , pGEM-T que contiene el gen estructural <i>as-48A</i> con el sitio de restricción <i>XhoI</i> al final del mismo (5,1 kb)	Este trabajo
pAM401-76	Cm ^r , fragmentos D y B de pMB2 clonados en pAM401 (18,4 kb)	Díaz <i>et al.</i> , (2003)
pAM401-76_X	Cm ^r , pAM401-76 con un sitio <i>XhoI</i> al final del gen <i>as-48A</i> (18,4 kb)	Este trabajo
pAM401-81	Cm ^r , región <i>as-48</i> clonada en pAM401 (25 kb)	Díaz <i>et al.</i> , (2003)
pAM401-81_X	Cm ^r , pAM401-81 con un sitio <i>XhoI</i> al final del gen <i>as-48A</i> (25kb)	Este trabajo
pAM401-81_{X-E4A}	Cm ^r , pAM401-81 _X con la mutación E4A en el gen <i>as-48A</i> (25kb)	Este trabajo
pAM401-81_{X-E20A}	Cm ^r , pAM401-81 _X con la mutación E20A en el gen <i>as-48A</i> (25kb)	Este trabajo
pAM401-81_{X-E58A}	Cm ^r , pAM401-81 _X con la mutación E58A en el gen <i>as-48A</i> (25kb)	Este trabajo
pAM401-81_{X-G13K}	Cm ^r , pAM401-81 _X con la mutación G13K en el gen <i>as-48A</i> (25kb)	Este trabajo
pAM401-81_{X-L40K}	Cm ^r , pAM401-81 _X con la mutación L40K en el gen <i>as-48A</i> (25kb)	Este trabajo
pAM401-81_{X-W24A}	Cm ^r , pAM401-81 _X con la mutación W24A en el gen <i>as-48A</i> (25kb)	Este trabajo
pAM401-81_{X-A53S}	Cm ^r , pAM401-81 _X con la mutación A53S en el gen <i>as-48A</i> (25kb)	Este trabajo

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo.

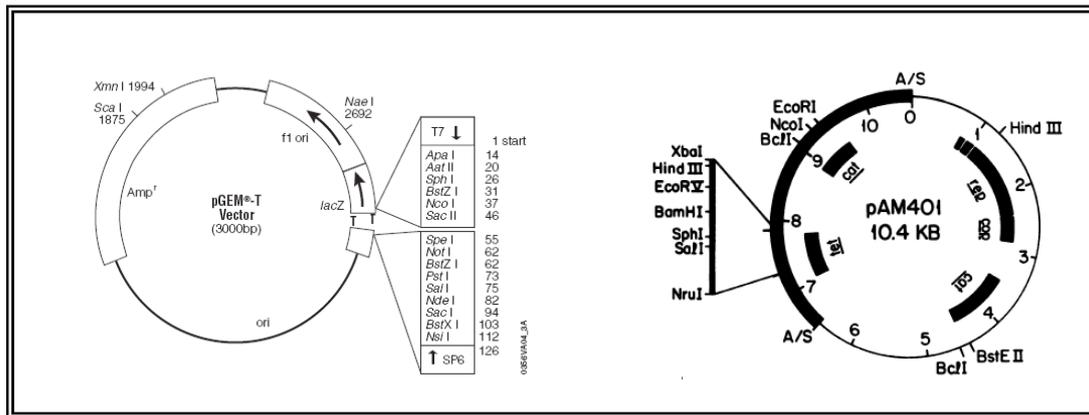


Figura 30. Vectores de clonación utilizados en este trabajo

3. MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los medios de cultivo utilizados, a menos que se indique lo contrario, 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 ó 0,75 % (p/v) respectivamente, a los correspondientes medios líquidos. Los medios 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* y *Salmonella choleraesuis* LT2. El preparado comercial (Gibco BRL) se reconstituyó a razón de 25 g/l de agua destilada. Su composición es:

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

- 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*, *L. innocua*, *B. cereus* y *S. aureus*. El preparado comercial deshidratado (Scharlau) se disolvió a razón de 37 g/l de agua destilada.

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 ₂ HPO ₄	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 g/l de agua destilada.

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

3.2. Medio complejo (MC)

El medio complejo MC se utilizó para mejorar la producción de AS-48 y de todas las variantes por su bajo contenido en macromoléculas, facilitando así su posterior purificación (Gálvez *et al.*, 1986). Su composición es la siguiente:

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

El medio complejo se preparó de la siguiente forma: las sales y el BHI fueron disueltos en agua destilada y se esterilizaron en autoclave; los casaminoácidos y la base nitrogenada 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 aparte en autoclave (110 °C, 15 min). Todas estas soluciones se mezclaron y la solución final, o bien se utilizó inmediatamente o bien se congeló a -20 °C.

3.3. Medios empleados para el ensayo de la actividad antibacteriana

Los medios empleados para el ensayo de la actividad de AS-48 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 la bacteria, lo que se denota con una T.

- Agar Mueller-Hinton tamponado (MHA-T)

El MHA-T se utilizó como capa base (10 ml) de las placas en los ensayos de actividad antibacteriana, por ser un medio apropiado para la difusión de sustancias inhibitoras. El preparado comercial (Scharlau) se disolvió a razón de 38 g/l en tampón. Su composición es la siguiente:

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

- 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 g/l de BHI, y se suplementó de agar al 0,75 % para poder inocularlo con la bacteria indicadora mantenido en sobrefusión.

- Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2

Se preparó según lo descrito en el apartado 4.

3.4. Medios empleados en los experimentos de transformación genética

- Medio Todd Hewitt (THB)

El preparado comercial (Difco) se utilizó en los experimentos de electroporación de *Enterococcus faecalis*. Su composición es:

Infusión de corazón de buey	500,0 g
Neopeptona	20,0 g
Dextrosa	2,0 g
Cloruro sódico	2,0 g
Fosfato disódico	0,4 g
Carbonato sódico	2,5 g

- Medio SOC

Se empleó en los experimentos de transformación genética de *E. coli* XL1-Blue. La composición del medio es:

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

3.5. Medios empleados en la conservación de organismos

Para la conservación de las cepas durante períodos de tiempo prolongados, a cultivos líquidos en fase logarítmica se adicionó glicerol al 50 % (v/v), 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 inclinados con los respectivos medios sólidos o en placas de Petri y se mantuvieron a 4 °C. Estos cultivos fueron resembrados periódicamente a partir de las cepas conservadas en glicerol.

3.6. Antibióticos empleados en los medios de cultivo

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 tamaño de poro (Millipore). El cloranfenicol (Cm) (Sigma-Aldrich) se disolvió en etanol a razón de 20 mg/ml.

4. PREPARACIÓN DE TAMPÓN FOSFATO SÓDICO (PB) pH 5,8-8

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 (1955), mezclando distintas proporciones de la solución X (fosfato disódico 0,2 M) con la solución Y (fosfato monosódico 0,2 M), según el pH deseado, y completando con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml (ver Tabla 5).

Solución X (Na_2HPO_4 0,2 M)	28,39 g/l
Solución Y ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M)	31,21 g/l

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

Tabla 5. Proporciones de solución X y de solución Y necesarias para preparar el tampón fosfato a diferentes pHs.

Para preparar el tampón a pHs inferiores a 5,8, se ajustó el pH con ácido fosfórico al 85%, mientras que para valores superiores a pH 8,0 se añadió NaOH 0,5 M. Cuando el tampón se utilizó para preparar disoluciones proteicas, se filtró siempre a través de filtros de 0,22 μm (Millipore).

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 bacteria de la que se quisiera obtener el ADN, del grado de pureza requerido, de la cantidad de ADN 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 del antibiótico correspondiente 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 se eliminó 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 % (p/v)

Solución III

Acetato sódico	3 M
pH 4,8	

Tampón TE

Tris-HCl	10 mM
EDTA-Na ₂	1 mM
pH 7,4	

• **Minipreparaciones en *Enterococcus faecalis***

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

- La cepa a analizar se inoculó en 2 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), se incubó a 37 °C durante 30 min.

- La lisis se desencadenó mediante la adición de 58 µl de EDTA 250 mM, pH 8 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 3M recién preparada.
- Tras realizar suaves inversiones durante 10 min, el lisado se neutralizó añadiendo 60 µl de Tris-HCl 2M, pH 7, 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) 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: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 ₂	1 mM
pH 7,4	

Solución A

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

Solución de lisis

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

5.1.2. Aislamiento de ADN plasmídico a gran escala (maxipreparaciones)

• **Maxipreparaciones en *Escherichia coli***

Al igual que en las minipreparaciones, en las preparaciones de ADN plasmídico a gran escala se utilizó el método de lisis alcalina (Birnboim y Dolly, 1979) modificado:

- Las células procedentes de un cultivo de 50 ml en fase estacionaria se resuspendieron en 5 ml de Solución I (adicionada de lisozima 2 mg/ml y ARNasa 40 µg/ml).
- A continuación se añadieron 5 ml de Solución II, dejando actuar 5 min.
- Seguidamente, se adicionaron 5 ml de solución III y la mezcla se incubó durante 15 min en hielo.
- Después de centrifugar 20 min a 14.000 rpm, el sobrenadante se mezcló con 0,8 volúmenes de isopropanol, manteniéndose en hielo durante 20-30 min.
- Tras centrifugar, el precipitado se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en 2 ml de Tris-HCl 0,2 M, pH 8 (cuando se consideró oportuno, se volvió a tratar con ARNasa), incubándose 10 min a temperatura ambiente.
- El ADN se extrajo dos veces con un volumen de fenol y posteriormente con cloroformo:isoamílico (24:1).
- El ADN se precipitó mediante la adición de 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, incubándose durante 1 h a -20 °C.
- Tras centrifugar, el sedimento se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en 300 µl de tampón TE o agua bidestilada estériles.

• **Maxipreparaciones en *Enterococcus faecalis***

Se utilizó la técnica de Anderson y McKay (1983), con algunas variaciones:

- A partir de un cultivo en fase estacionaria se inocularon (2 % v/v) 100 ml de medio BHI y se incubó a 37 °C durante 4-5 h.
- Las células se recogieron por centrifugación a 4 °C durante 30 min a 5.000 rpm y se lavaron con 20 ml de tampón TE.
- El sedimento de células se resuspendió en 5 ml de solución A y se añadieron entonces 1,25 ml de solución extemporánea de lisozima (10 mg/ml en Tris-HCl 25 mM, pH 8), incubándose durante 30 min a 37 °C.
- Después se adicionaron 0,625 ml de EDTA 250 mM- Tris-HCl 50 mM (pH 8).
- La lisis de las células se indujo mediante la adición de 0,375 ml de solución de lisis, que se dejó actuar durante 5 min a temperatura ambiente.
- A continuación se añadieron 0,4 ml de NaOH 3 M, mezclándose por inversión suave durante 10 min.
- La solución fue neutralizada rápidamente con 0,650 ml de Tris-HCl 2 M pH 7 (preenfriado en hielo), agitándose por inversión suave durante 3 min.
- El ADN cromosómico y los restos celulares se precipitaron añadiendo 0,95 ml de NaCl 5 M.
- La mezcla se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se realizaron dos fenolizaciones sucesivas, centrifugando cada vez a 14.000 rpm durante 5 min a 4 °C, para separar la fase acuosa de la fenólica.
- La fracción acuosa se extrajo con un volumen de cloroformo:isoamílico (24:1), centrifugando en las mismas condiciones.
- Finalmente, la fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol preenfriado y se incubó a -20 °C durante al menos 4 h.
- El ADN plasmídico se recogió centrifugando a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C, lavándose a continuación con etanol al 70%.
- Una vez seco, el ADN se resuspendió en 300 µl de agua bidestilada o en tampón TE estériles.

5.1.3. 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 μ l 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 μ l de H₂O y se agitó bien.
- La mezcla se centrifugó 5 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 μ l.

5.1.4. 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 DEL 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 μ g/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 (Gibco BRL).

Los geles fueron fotografiados con una videocámara UVP ImageStore 5000.

<u>Tampón TAE (50x)</u>	
Tris base	242,0 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA-Na ₂ 0,5 M, pH 8	100,0 ml
Agua destilada hasta 1 litro	

<u>Solución de carga (10x)</u>	
Glicerol	50 %
TE	49,75 %
Azul de bromofenol	0,25 %

5.2.2. Electroforesis en gel 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), empleando un voltaje constante de 100 V. Como patrón de pesos moleculares se utilizaron 100 pb DNA Ladder (Gibco BRL). 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. El tampón de la electroforesis fue TBE (1x).

La composición de los geles fue la siguiente:

Acrilamida:Bisacrilamida (29:1)	1,7 ml
Persulfato amónico	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 ₂ 0,5 M, pH 8	40 ml
Agua destilada hasta 1 litro	

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

Se realizó según la técnica descrita por Vogelstein y Gillespie (1979). Una vez realizada la electroforesis en gel de agarosa y visualizadas las bandas de ADN, se cortó con un bisturí el trozo de agarosa correspondiente al fragmento de ADN que se quería recuperar y se añadieron 2 volúmenes de NaI 5 M. Esta mezcla se fundió en un baño a 55 °C durante 5 min y a continuación se adicionó Sephaglass (Amersham Biosciences) (5 µg/µl de ADN), incubando 5 min a temperatura ambiente. A continuación la mezcla se sometió a un pulso de centrifugación (30 segundos) en la microfuga, y una vez retirado el sobrenadante se lavó el sedimento tres veces con tampón de lavado (50 % de etanol diluido en Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM). Finalmente, el ADN se eluyó con tres volúmenes de agua bidestilada o tampón TE estériles, respecto al volumen de Sephaglass adicionado.

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 $\mu\text{g/ml}$ 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:

$$C = (A / 0,01 \times N) \times f$$

C: concentración de ADN (pmol/ μl)

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 al ADN del fago lambda digerido con *HindIII*, empleado como marcador de tamaño y concentración conocidos.

5.2.5. Eliminación del ARN contaminante 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 $\mu\text{g/ml}$, 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:isoamílico (25:24:1), centrifugando 1 min a 14.000 rpm y precipitando la fase acuosa como se describe en el apartado siguiente.

Preparación de ARNasa:

Se preparó a 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 de 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 30 min en hielo, el ADN precipitado se recogió por centrifugación, 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.

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 extrajeron los fragmentos de restricción a partir de geles de agarosa para ser digeridos a continuación por el siguiente enzima. Los 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 de 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-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 µl, y se incubó a 14 °C durante 8-14 h.

Antes de ser introducida en la cepa adecuada, la mezcla de ligación se sometió a diálisis (apartado 5.3.5.).

5.3.3. Ligación de productos de PCR en pGEM-T

Para subclonar fragmentos obtenidos mediante amplificación por PCR en el vector pGEM-T, se empleó el kit pGEM-T Vector System I (Promega), siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. Antes de ser introducida en la cepa adecuada, la mezcla de ligación de sometió a diálisis (apartado 5.3.5.)

5.3.4. Ligación utilizando el “Rapid Ligation Kit”

En ocasiones se utilizó el Rapid DNA Ligation Kit (Roche Applied Science), que permite la ligación hasta de 200 ng de ADN en cinco min. Antes de ser introducida en la cepa adecuada, la mezcla de ligación de sometió a diálisis (apartado 5.3.5.)

5.3.5. Diálisis de la mezcla de ligación

Antes de realizar la transformación genética de las bacterias de interés, la mezcla de ligación se dializó frente a agua ultrapura en filtros de nitrocelulosa con 0,025 µm de tamaño de poro (Millipore), con el fin de eliminar el exceso de sales que pudieran interferir en el proceso.

5.4. AMPLIFICACIÓN DEL ADN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (Polimerase Chain Reaction, PCR)

Esta técnica se utilizó tanto para verificar la presencia de un gen determinado en los transformantes obtenidos, como para llevar a cabo la mutagénesis dirigida con oligonucleótidos (apartado 5.5.), así como para obtener sondas no radiactivas (apartado 6.3.) 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	100 pmol
Oligonucleótido 2	100 pmol
dNTPs (10 mM)	2 μ l
<i>Taq</i> polimerasa	1 U
Tampón de la <i>Taq</i> polimerasa (10x)	5 μ l
H ₂ O ultrapura hasta	50 μ 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):

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$
 - 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 MgCl₂ 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 CON OLIGONUCLEÓTIDOS

5.5.1. Método de extensión de fragmentos que se solapan

Para la introducción de una diana *XhoI* al final del gen estructural *as-48A*, se empleó el método de extensión de 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 la mutación que se desea introducir (Tabla 6) y son complementarios al menos en una parte de sus secuencias.

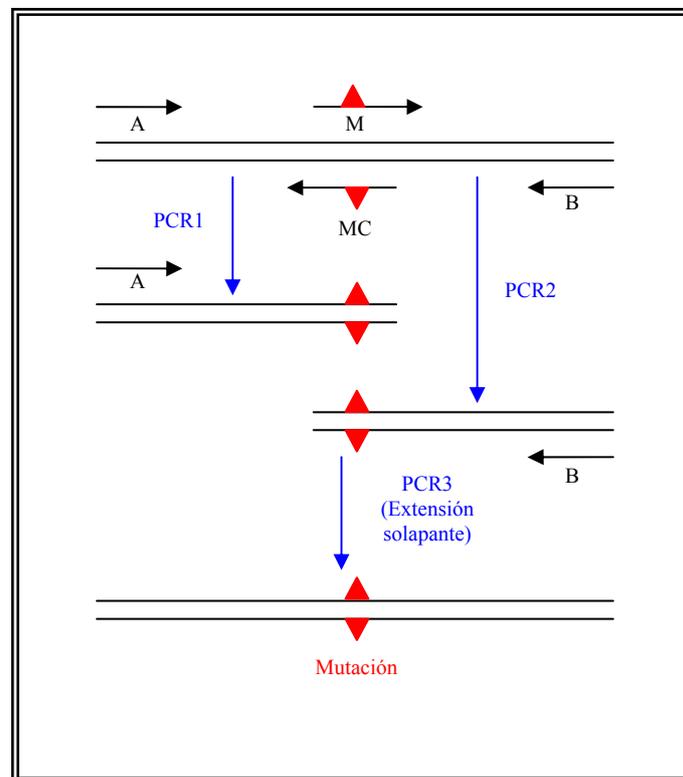


Figura 31. Esquema del método de mutagénesis dirigida por PCR mediante extensión de fragmentos que se solapan. Se indican los nombres de los oligonucleótidos A, B, M (mutante) y MC (mutante complementario). Cada reacción de PCR se nombra como PCR1, PCR2 y PCR3, para indicar que son reacciones separadas

En primer lugar se realizaron dos reacciones de PCR paralelas, una utilizando los cebadores A y M (este último porta la mutación), y otra utilizando los cebadores MC y B (donde MC porta la mutación y es parcialmente complementario a M). De esta forma se generaron dos fragmentos de ADN que tenían una secuencia común en un extremo y

contenían la mutación deseada. Estos dos fragmentos sirvieron simultáneamente de molde y de cebador en los ciclos iniciales de una tercera reacción de PCR, de modo que se obtuvo un fragmento suma de los dos productos que contenía la mutación deseada y que se amplificó con los cebadores A y B (Figura 31).

Las condiciones que se emplearon para realizar las dos primeras reacciones de PCR fueron: un ciclo a 94 °C durante 1 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C, 1 min; 45 °C, 1 min y 72 °C, 70 seg; y una etapa de terminación a 72 °C durante 5 min. Para la tercera reacción de amplificación, se realizaron 5 ciclos de desnaturalización y amplificación (94 °C, 1 min; 50 °C, 1 min y 72 °C, 120 seg) utilizando los dos productos anteriores y sin añadir cebadores, para después realizar 30 ciclos con los cebadores A y B (94 °C, 1 min; 40 °C, 1 min; 72 °C, 10 min).

5.5.2. Mutagénesis dirigida mediante PCR inversa

Para la obtención de mutantes puntuales en el gen *as-48A* se empleó un método basado en la PCR inversa (Hemsley *et al.*, 1989) con modificaciones, utilizando el sistema de la *Pwo* polimerasa (Roche Applied Science). Para cada mutación que se quería introducir se diseñó un par de oligonucleótidos con parte de sus secuencias complementarias y que contenían la mutación deseada (Tabla 8).

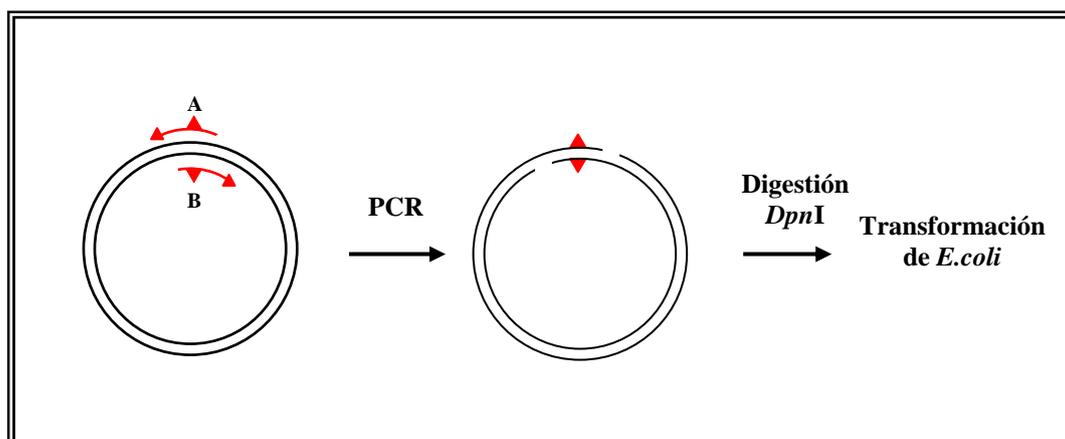


Figura 32. Esquema del método de mutagénesis dirigida mediante PCR inversa. Se indican los nombres de los oligonucleótidos (A, B).

Como resultado de esta reacción se amplificó el plásmido, que ahora contenía la secuencia mutada, quedando dos mellas en la secuencia que serían reparadas posteriormente en el interior de la célula (Figura 32). Tras la amplificación, la mezcla de PCR se digirió con *DpnI* (Fermentas), de forma que se eliminaran las cadenas parentales de ADN (metiladas) que no contienen la mutación deseada. La PCR se purificó y se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*.

Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 96 °C, 50 seg, seguido de 15 ciclos a 96 °C, 45 seg; 64 °C, 45 seg y 72 °C, 10 min, y por último 10 min a 72 °C.

5.6. OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS EMPLEADOS

5.6.1. Diseño de oligonucleótidos para la mutagénesis

Uno de los aspectos más importantes e influyentes en el éxito de la mutagénesis dirigida es el diseño de los oligonucleótidos empleados. Para realizar este diseño se siguieron una serie de pautas:

- Que los oligonucleótidos tuvieran entre 30-40 bases.
- El porcentaje de G+C debía estar entre 40-60 % (siendo lo ideal 50).
- Se dejaron unas 15 bases entre la mutación y el extremo 5', y unas 15-20 entre el extremo 3'.
- Se intentó dejar siempre una G en 3', y se evitó poner G o A en 5' y T en 3'.
- Se evitaron secuencias de tres o más GC en el final del extremo 3'.
- La temperatura de fusión (T_m) del extremo 3' del cebador había de ser suficientemente alta como para que permitiera buena hibridación con el ADN molde. Se consideró suficiente una T_m de 50 °C.
- Se procuró no introducir secuencias de 3 o más repeticiones de un mismo nucleótido.
- La formación de estructuras secundarias fue evitada.
- Se tuvo en cuenta la preferencia en el uso de codones del hospedador a la hora de diseñar la mutación.

5.6.2. Oligonucleótidos empleados

Los oligonucleótidos empleados en esta Memoria aparecen en las Tablas 6 a 9. Los nucleótidos marcados en negrita indican las mutaciones introducidas en la secuencia. Estos oligonucleótidos fueron suministrados por Amersham Biosciences o Genotek.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Posición Inicial *	Tm (°C)
M13-20 (A)	GTAAAACGACGGCCAGT	Vector	45,2
Reverso (B)	AACAGCTATGACCATG	Vector	43,8
mutXh3 (M)	TTTAACAATATGATAAAAAAA <u>CTCGAG</u> ATTTTCTAGAGATATTCTGTTTTT	1708	66,3
mutXh4 (MC)	AAAACAGAATATCTCTAGAAAAT <u>CTCG</u> <u>AGTTTTTTT</u> TATCATATTGTTAAATTA	-1757	66,2

Tabla 6. Oligonucleótidos sintéticos empleados para la introducción de un sitio *XhoI*. El sitio de restricción introducido aparece subrayado y los nucleótidos mutados en negrita. (*) Se toma como posición inicial la referente al sitio de restricción *SphI* del plásmido pAM401-81.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Posición Inicial *	Tm (°C)	Características
A	TTTTGAGGAGGAGTATCA TGGTTAAAGAAAA	1373	59,9	RT-PCR <i>as-48A</i>
B	CTGCTCTTTTTCCTTTTTT CTTAATTTCTTT	-1693	58,2	RT-PCR <i>as-48A</i>
C	CGCTTCTAAGATCGTCTC CTAATGGTTTGA	2976	62,8	RT-PCR <i>as-48B</i>
D	GGTATCTAATCGCATGTA CAACAAAAATTCCTTTC	-3467	63,5	RT-PCR <i>as-48B</i>
E	TGCAGCAGGAAGAGAGT CAATTAAAGCATACT	1626	65,6	RT-PCR <i>as-48A- as48-B</i>
F	CGTGTGTTCTATAACAAT TTGATGCTCCTTGAACA	-2045	66	RT-PCR <i>as-48A- as48B</i>
G	TCTTTAACCATGATACTC CTCC	-1400	47,1	Extensión reversa de cebador

Tabla 7. Oligonucleótidos sintéticos empleados en los experimentos de RT-PCR y extensión reversa a partir de cebador. (*) Se toma como posición inicial la referente al sitio de restricción *SphI* del plásmido pAM401-81.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Posición Inicial *	Tm (°C)
E4A-AS48_fw	GCACATATGGCTAAAG CTTTC GGTATAC CAGCAGCAGTTGCAGGA ACTGTG	1489	80
E4A-AS48_rv	CTGGTATACCGAA AGCTTT AGCCATATG TGCAATCGGCA AAAACTG	-1519	76
E20A-AS48_fw	TAATGTAGTT GCTGCT GGTGGATGGGTC ACTACTATTGTATCAATT CTTACTG	1542	74
E20A-AS48_rv	CATCCACCAGC AGCA ACTACATTAAGCA CAGTTCCTGCA ACTGCTG	-1565	79
E58A-AS48_fw	CATACCTTAAGAA AGCTATTA AGAAAA AAGGAAAAAGAGCAGTTATT GCTTGG	1652	71
E58A-AS48_rv	CTTAATAGCTTTCTTA AGGTATGCTTTAA TTGACTCTCTT CTG	-1674	66
G13K-AS48_fw	CCAGCAGCAGTTGCA AAAACTGTGCTTA ATGTAGTTGAAGCTGGTGGATG	1516	79
G13K-AS48_rv	CATTAAGCACAGTT TTTGCA ACTGCTGC TGGTATACCGAA CTTTAG	-1546	74
L40K-AS48_fw	TAGCGGAGGT AAATCTTT ACTCGCTGCA GCAGGAAGAGAG	1602	73
L40K-AS48_rv	CAGCGAGTAAAGAT TTTACCTCCGCTACC TACAGCAGTAAGA ATTG	-1627	72
W24A-AS48_fw	CTGGTGGAG CTGTC ACTACTATTGTATC AATTCTTACTGCTGTAGGTAGCG	1556	74
W24A-AS48_rv	CAATAGTAGTGAC AGCTCC ACCAGCTTC AACTACATTAAGCACAG	-1579	72
A53S-AS48_fw	GGAAGAGAGTCAATTA ATCATA CCTTA AGAAAG	1633	76
A53S-AS48_rv	TGCTGCAGCGAGTAAAG	-1632	52

Tabla 8. Oligonucleótidos sintéticos empleados para generar mutantes en el gen *as-48A*. Las posiciones cambiadas se marcan en negrita. (*) Se toma como posición inicial la referente al sitio de restricción *SphI* del plásmido pAM401-81.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Posición Inicial *	Tm (°C)
as-48-1	AATAAACTACATGGGT	+1327	28,9
as-48-2	TAATTTCTTTCTTAAGGT	-1672	32,8
as-48-4	GATAAAAAAACAGGATAT	+1719	32,5
as-48B-5	GCGGGCTCCAATGCT	-2352	49,4

Tabla 9. Oligonucleótidos sintéticos empleados en la preparación sondas radiactivas. (*) Se toma como posición inicial la referente al sitio de restricción *SphI* del plásmido pAM401-81.

5.7. SECUENCIACIÓN DEL ADN

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un secuenciador ABI PRISM Pye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer) del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (CSIC, Granada). En cada reacción se utilizaron del orden de 0,6-1 µg de ADN purificado, junto con 3,2 pmol del oligonucleótido seleccionado como cebador, completando hasta un volumen final de 6 µl. Este sistema, basado en la técnica de Sanger *et al.*, (1977), utiliza la polimerasa *AmpiTaq* FS y dideoxinucleótidos marcados diferencialmente con cromóforos fluorescentes. El secuenciador detecta la fluorescencia de cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos, que terminan la reacción al carecer del grupo hidroxilo en 3', necesario para la elongación de la cadena de ADN. Cada marcador emite a una longitud de onda diferente cuando es excitado por luz láser, lo que permite que los cuatro colores puedan ser detectados en una misma línea.

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 *Enterococcus faecalis*

6.1.1. Método del fenol caliente

La obtención de ARN total de *E. faecalis* JH2-2 se realizó siguiendo el método del fenol caliente (Tomita *et al.*, 1996) con algunas modificaciones:

- Se inocularon 5 ml de medio BHI al 2 % con un cultivo en fase estacionaria de la cepa bacteriana correspondiente, y se incubó hasta alcanzar una $A_{590}=0,6-0,7$ (aproximadamente 3 h).
- Las células se recogieron por centrifugación (10 min a 5.000 rpm, a 4 °C) y se resuspendieron en 1 ml de 25 % sacarosa-Tris HCl 50 mM (p/v).
- A esta suspensión celular se le adicionaron 500 μ l de EDTA 0,5 M y 25 μ l de lisozima (Amersham Biosciences) preparada extemporáneamente (20 mg/ml de sacarosa Tris-HCl), dejando incubar durante 30 min a temperatura ambiente.
- Las células volvieron a ser recogidas por centrifugación, y resuspendidas en 150 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 8, EDTA 3 mM, NaCl 200 mM) adicionando a continuación 150 μ l de tampón de lisis + SDS 1% (p/v). La mezcla fue homogeneizada por inversión suave, calentada a 95 °C durante 2 min, y por último enfriada rápidamente en hielo.
- Se adicionaron 300 μ l de fenol saturado en Tris-HCl 20 mM pH 8, precalentado a 65 °C, agitando vigorosamente en vórtex hasta lograr mezclarlo. La mezcla se incubó a 65 °C durante 3 min, mezclando ocasionalmente.
- Seguidamente se enfrió en hielo 5 min, y se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a 14.000 rpm.
- El sobrenadante se volvió a fenolizar en frío y fue extraído tres veces consecutivas con éter etílico.
- Finalmente, para precipitar el ARN, se añadieron 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto preenfriado a -20 °C. El ARN se recogió por centrifugación 4 °C, y una vez seco se disolvió en 10 μ l de agua estéril-DEPC.
- La muestra fue tratada con 10 U de ADNasa I libre de ARNasa (Roche Applied Sciences), para eliminar posibles restos de contaminación por ADN, incubándose durante 1 h a 37 °C.
- La ADNasa fue inactivada a 70 °C durante 10 min y el ARN de la muestra se volvió a precipitar con acetato sódico y etanol absoluto, resuspendiendo finalmente en 12 μ l de agua-DEPC. El ARN obtenido puede conservarse a -70 °C hasta el momento de su uso.

6.1.2. Extracción mediante Fastprep

Cuando fue necesario obtener ARN de gran pureza de transformantes de *E. faecalis* JH2-2, se utilizó el Fastprep RNA Pro Blue Kit (Q-BIOgene). Para ello, 10 ml de medio fueron inoculados (4 %) con un cultivo de una noche, y se dejó incubar a 37 °C durante 3,5-4 h, hasta alcanzar una A_{600} de 0,8-0,9. Tras recoger las células mediante centrifugación, se procedió a la extracción de ARN siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

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 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 μg /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 2 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	50 pmol
Oligonucleótido 2	50 pmol
dNTPs-Dig (2 mM)	10 µl
Tampon de la <i>Taq</i> polimerasa (10x)	5 µl
<i>Taq</i> polimerasa	1 U
Volumen final	50 µl

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 10. 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 µl de sonda a 8-10 ng/µl).

Sondas <i>as-48</i>	Oligonucleótido 1* (posición)**	Oligonucleótido 2* (posición)**	Tamaño (pb)
as48-A	as-48-1 (+1327)	as-48-2 (-1672)	345 pb
as48-B	as-48-4 (+1719)	as-48B-5 (-2352)	633 pb

Tabla 10. Sondas deducidas de la región *as-48* utilizadas en este trabajo. (*)Ver Tabla 9. (**) Se toma como posición inicial la referente al sitio de restricción *Sph*I del plásmido pAM401-81.

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 desnaturalizada, a la muestra 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 Hoeffer con 30 ml de capacidad. La composición del gel se detalla a continuación:

	<u>Para 100 ml</u>	<u>Para 30 ml</u>
10xMOPS	10 ml	3 ml
H ₂ 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

10 x MOPS

MOPS pH 7	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 ARNr se visualizaron en un transiluminador Spectroline (modelo TS-302); para ello, se dispuso 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 (Northern Blot)

Una vez realizada la electroforesis y visualizadas las bandas de ARN, el gel se lavó con H₂O-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 éste 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/10cm²) 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 revelador, 4 min en fijador y se lavó con agua abundante.

Tampón I (5x)

Ácido maleico	0,10M
NaCl	0,15M
pH	7,5
Tween-20	3 %*

* 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)

Diluir 10 g de reactivo de bloqueo (Roche Applied Science) 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 ARNr: 5S (120 b), 16S (1.540 b) y 23S (2.900 b).

6.4. ELECTROFORESIS DE ARN EN GELES DE AGAROSA

La separación y visualización del ARN total se realizó para comprobar si existía contaminación de ADN en las muestras. El procedimiento fue el mismo descrito para la electroforesis en geles de agarosa del ADN (apartado 5.2.1.) pero introduciendo las siguientes variaciones:

- Todo el material empleado en la electroforesis fue previamente tratado con H₂O₂ al 3% o con NaOH 40 mM y después lavado con abundante agua DEPC estéril.
- El tampón TAE se preparó diluyendo una solución 50 veces concentrada en agua DEPC estéril.

La concentración de agarosa fue del 2 %.

6.5. RT-PCR SEMICUANTITATIVA

El análisis semicuantitativo de los niveles de transcripción se realizó mediante el sistema ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Para la obtención del ADNc se mezclaron 500 ng de ARN, 10 pmol de oligonucleótido específico y 2 µl de dNTPs (10 mM) hasta un volumen de 12 µl (completados con H₂O-DEPC).
- La mezcla se incubó a 70 °C durante 5 min e inmediatamente se enfrió en hielo.
- A la mezcla anterior se le añadieron 4 µl de tampón de síntesis de ADNc (5x), 1 µl de DTT 0,1 M, 40 unidades (1 µl) de RNaseOUT (Gibco, BRL), 1 µl de H₂O-DEPC y 1 µl de retrotranscriptasa ThermoScript. Como controles negativos se prepararon reacciones con la misma cantidad de ARN a las que no se añadió retrotranscriptasa.
- La mezcla se incubó durante 30 min a 56-60 °C. Siguió una incubación a 85 °C durante 5 min para finalizar la reacción.
- La transcripción reversa se finalizó incubando a 37 °C durante 20 min en presencia de 2 unidades de ARNasa H (Invitrogen).

Para la amplificación del ADNc por PCR, se tomó un 10% de la mezcla de ADNc obtenida (2 µl), 50 pmol de cada cebador, 1 µl de dNTPs 10 mM, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 5

μl de Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), 1,5 μl de KCl 50 mM, 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen), y H₂O-DEPC hasta completar un volumen total de 50 μl. Cada PCR se preparó por cuadruplicado para sacar un tubo a los 15 ciclos, otro a los 20, a los 25 y a los 30 ciclos de amplificación.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo a 96 °C durante 2 min, y 15, 20, 25 y 30 ciclos (94 °C durante 1 min, 56-60 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min). En estas PCRs no se añadió tiempo adicional para la terminación de las cadenas a 72 °C. Los productos de RT-PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

6.6. EXTENSIÓN REVERSA A PARTIR DE CEBADOR (PRIMER EXTENSION)

La detección del sitio de inicio de la transcripción de los genes en estudio se realizó mediante extensión reversa a partir de cebador, según lo descrito por García-Quintans *et al.*, (1998).

6.6.1. Marcaje de oligonucleótidos mediante fosforilación

Para la reacción de marcaje del oligonucleótido en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP se preparó la siguiente mezcla:

Oligonucleótido	10 pmol
Tampón de Reacción (5x)	10 μl
T4 Polynucleotido Kinasa (Gibco BRL)	2 μl (20 U)
[γ - ³² P]ATP (10 μCi/μl, 3000 Ci/mmol)	5 μl (50 μCi)
H ₂ O estéril	Hasta 50 μl

La mezcla se incubó durante 10 min a 37 °C, calentando a continuación a 65 °C durante 10 min. El oligonucleótido fue purificado con el kit QIAquick Nucleotide Removal (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.6.2. Hibridación

Se mezclaron 1 pmol de oligonucleótido marcado (Tabla 7) con 3,8 µg de ARN, añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto enfriado a -20 °C. La mezcla se incubó a -80 °C durante 1 h como mínimo. Se centrifugó a 4 °C (15 min, 14000 rpm) y el sedimento se lavó con etanol al 70% (-20 °C), centrifugando después durante 5 min a 4 °C. Se eliminó el etanol de la muestra secando el sedimento al aire libre, que posteriormente fue resuspendido en 30 µl de tampón de hibridación. La solución se incubó a 80 °C durante 10 min y seguidamente a 30-35 °C durante 16 h.

Posteriormente, se añadieron 170 µl de agua estéril y 400 µl de etanol absoluto (-20 °C), dejando 1 h en hielo. Tras ello, se centrifugó a 4 °C (15 min, 14000 rpm) y se lavó el sedimento con etanol al 70 % (-20 °C), centrifugando de nuevo durante 5 min a 4 °C y secando el sedimento.

Tampón de hibridación

PIPES 40 mM (pH 6,4)

EDTA 1 mM (pH 8,0)

NaCl 0,4 M

Formamida desionizada 80 %

6.6.3. Extensión reversa a partir de cebador

La mezcla ARN:oligonucleótido se resuspendió en 38 µl de tampón RT y se incubó a 42 °C durante 2 min. Se añadieron 15 U de retrotranscriptasa ThermoScript (Invitrogen) y se incubó a 50 °C durante 30 min. La reacción se inactivó calentando a 70 °C durante 15 min. Seguidamente se incubó la mezcla con 2 µl de ARNasa H (Invitrogen) durante 30 min a 37 °C y después durante 3 min a 95 °C.

Para eliminar las proteínas de la muestra, se añadieron 158 µl de tampón TE y 200 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), centrifugando a continuación a máxima velocidad durante 5 min. La fase acuosa (superior) se pasó a un tubo limpio, y el ADNc se precipitó añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol (-20 °C),

guardando a -80 °C durante al menos 1 h. A continuación se centrifugó a máxima velocidad a 4 °C durante 15 min, lavando con etanol al 70 % y secando el sedimento durante 5 min.

El sedimento se resuspendió finalmente en 4 µl de tampón TE y 6 µl de tampón de carga con formamida, y se guardó a -20 °C.

Tampón RT

Tampón de síntesis de ADNc (5x)	8 µl
DTT 0,1 M	4 µl
dNTPs 50 mM	4 µl
RNase Out	2 µl
H ₂ O-DEPC	20 µl

Tampón de carga

Formamida 80%	
EDTA 10 mM (pH 8,0)	
Xilencianol 1 mg/ml	
Azul de bromofenol 1 mg/ml	

6.6.4. Electroforesis y secuenciación

El tamaño de los productos de reacción se determinó en un gel de poliacrilamida al 8%, conteniendo urea 7 M. Las bandas marcadas con ³²P se detectaron por exposición en películas Kodak X-Omat S.

El ADN se secuenció mediante el método de Sanger *et al.*, (1977), utilizando el kit de secuenciación de la polimerasa T7 (Amersham Biosciences) y dCTP marcado con ³²P. El plásmido pFS21 (Sesma *et al.*, 1990), que contiene una secuencia heteróloga, se utilizó como molde.

7. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE MICROORGANISMOS

7.1. TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli* DH5 α 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* DH5 α 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 (5000 rpm, 15 min)
- A continuación se resuspendieron en un volumen de una solución preenfriada de MgSO₄ 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 y 50 mM de CaCl₂, 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 CaCl₂ y glicerol al 20 %.
- Esta suspensión se repartió rápidamente a razón de 100 μ l/tubo en tubos eppendorf preenfriados, que se mantuvieron a -70 °C hasta su uso.

7.1.2. Transformación

- Se mezclaron 100 μ l de células competentes, previamente descongeladas en hielo, con 20-50 ng de ADN plasmídico libre de sales y se incubaron en hielo durante 30 min.
- A continuación, las células se sometieron a un choque térmico a 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 μ l 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 200 µl de la suspensión celular en placas de LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado. Las placas se incubaron 16 h 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 µl (20 mg/ml) de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido). 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.

Preparación de X-Gal: disolver 20 mg de X-Gal en 1 ml de N,N'-dimetil-formamida. Cubrir el tubo con papel de aluminio y almacenar a -20 °C.

7.2. TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli* XL1-Blue

Cuando se transformaron células supercompetentes de *E. coli* XL-1Blue se siguieron las indicaciones del fabricante (Stratagene):

- Preenfriar un tubo Falcon de 15 ml en hielo. Precaentar medio SOC a 42 °C.
- Descongelar las células supercompetentes en hielo. Una vez descongeladas, mezclar suavemente y poner una alícuota de 100 µl en el tubo Falcon preenfriado.
- Añadir 1,7 µl de β-mercaptoetanol.
- Mezclar suavemente e incubar 10 min en hielo, agitando cada 2 min cuidadosamente.
- Añadir 0,1-50 ng de ADN a las células. Incubar 30 min en hielo.
- Someter las células a choque térmico a 42 °C durante 45 segundos en baño.
- Incubar en hielo inmediatamente durante 2 min.
- Añadir 900 µl del medio SOC precaentado e incubar a 37 °C durante 1 h en agitación (225–250 rpm).
- Repartir 200 µl de la mezcla de transformación en placas de LB conteniendo el antibiótico correspondiente.

- Centrifugar los 800 μ l de células restantes (10 min, 1000 rpm) y resuspender el precipitado en 200 μ l de medio SOC. Sembrar en placas de LB conteniendo el antibiótico correspondiente.
- Incubar las placas a 37 °C durante una noche.

7.3. ELECTROPORACIÓN DE *Escherichia coli* DH5 α

7.3.1. Preparación de células electrocompetentes

Se partió de un cultivo en fase estacionaria de *E. coli* DH5 α 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 5000 rpm durante 15 min a 4 °C y se lavaron 4 veces a esta misma temperatura con volúmenes decrecientes de agua destilada preenfriada (1, 0,5, 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 μ l en tubos eppendorf, siendo seguidamente congeladas a -70 °C hasta el momento de su uso.

7.3.2. Electroporación

La electroporación se realizó según las condiciones descritas en el protocolo del electroporador Electro Cell Manipulator 600 (BTX Electroporation System) para *E. coli* DH5 α , utilizando cubetas BTX con 2 mm de distancia entre los electrodos. En la cubeta se mezclaron 1-5 μ l de ADN (10-20 ng) y 45 μ 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 129 Ω y una capacitancia de 25 μ F. A continuación, las células se diluyeron rápidamente en 950 μ l de medio LB 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 μ 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 todos los experimentos se utilizaron como control células electrocompetentes sin transformar incubadas en las mismas condiciones que las electroporadas.

7.4. ELECTROPORACIÓN DE *Enterococcus faecalis* JH2-2 (Fiedler y Wirth, 1991)

7.4.1. Preparación de células electrocompetentes

Para la obtención de células competentes se inocularon al 2 % con un cultivo bacteriano de una noche matraces de medio THB adicionado de glicina al 2,5%, incubándose hasta alcanzar una $A_{590} = 0,4-0,6$. A continuación las células se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 15 min a 4 °C en una centrífuga Sorvall, y se lavaron 4 veces, en las mismas condiciones, con volúmenes decrecientes (1, 0,5, 0,5 y 0,01 volúmenes) de una solución preenfriada de glicerol al 10 %. Finalmente las células se resuspendieron en 0,005 volúmenes de la misma solución, se alicuotaron a razón de 50 μ l en tubos preenfriados y se guardaron a -70 °C hasta su uso.

7.4.2. Electroporación

La transformación mediante electroporación se realizó según las condiciones descritas en el protocolo del electroporador Electro Cell Manipulator 600 (BTX Electroporation System) para *E. faecalis* JH2-2, utilizando cubetas BTX con 2 mm de distancia entre los electrodos. En la cubeta se mezclaron 1-5 μ l de ADN (10-20 ng) con 45 μ l de células electrocompetentes, previamente descongeladas en hielo. La mezcla se dispuso inmediatamente en el electroporador y se aplicó un voltaje de 1,25 kV, a una resistencia de 480 Ω y una capacitancia de 25 μ F.

Inmediatamente, las células se diluyeron en 950 μ l de THB frío, y se incubaron a 37 °C durante 90 min para permitir la expresión fenotípica del ADN. Después se sembraron en

placas de BHA adicionado del antibiótico de selección a razón de 0,2 ml/placa e incubando a 37 °C durante 2-3 días.

8. DETECCIÓN Y VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y RESISTENCIA FRENTE A AS-48 Y SUS VARIANTES

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 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 µl con diferentes concentraciones del inhibidor purificado, incubándose posteriormente las

placas durante 18-24 h a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria. La aparición de halos de inhibición del crecimiento en las zonas donde se depositaron las gotas era indicativa de la sensibilidad de la bacteria.

8.3. TÉCNICA DE LOS POCILLOS

La producción de AS-48 en medio líquido se determinó midiendo la actividad presente en sobrenadantes libres de células (mediante centrifugación de los cultivos a 14.000 rpm durante 10 min) por la técnica de los pocillos (Shillinger y Lucke, 1989; Tagg y McGiven, 1971). 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 que contenía 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). Seguidamente se vertieron 7 ml de una sobrecapa de BHA blando (mantenida 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 dejados por éstos (pocillos) se depositaron 100 µl de la muestra líquida a ensayar. A continuación las placas se incubaron a la temperatura adecuada para el crecimiento de la estirpe indicadora durante 18-24 h, tiempo tras el cual se midió el diámetro del halo de inhibición producido alrededor de cada muestra.

8.4. CURVAS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINA

Se inocularon 50 ml de medio Complejo (MC) con un preinóculo de 1 ml (2 %) de un cultivo de una noche de la bacteria productora de bacteriocina. Durante 24 h, y a intervalos de 1 h, se midió la absorbancia (A_{600}) del cultivo y se tomaron 300 µl del mismo, centrifugándolos (14.000 rpm, 10 min) para eliminar las células. Se ensayaron 100 µl de los sobrenadantes frente a una bacteria indicadora (normalmente *E. faecalis* JH2-2) mediante la técnica de los pocillos.

De esta forma se obtuvo una curva que relacionaba el diámetro de los halos de inhibición con la densidad óptica del cultivo a lo largo del tiempo.

8.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBIDORA

La concentración mínima inhibidora (CMI) se definió como aquella que inhibía el totalmente el crecimiento en medio sólido. Para establecer la CMI, se prepararon diluciones seriadas de bacteriocina purificada a una concentración conocida, y se ensayaron alícuotas (5 μ l) frente a las bacterias indicadoras mediante la técnica de las gotas. Tras la incubación a 37 °C durante 18 h, se determinó la cantidad mínima de bacteriocina que producía un halo de inhibición visible.

8.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

La actividad hemolítica de las cepas productoras de bacteriocina fue determinada creciéndolas en placas de agar-sangre (Agar Columbia, Merck) adicionado de un 5% de sangre de caballo desfibrinada. Tras incubar a 37 °C durante una noche, las placas fueron examinadas en cuanto a la capacidad de lisar a los eritrocitos.

9. PURIFICACIÓN DE LA ENTEROCINA AS-48 Y DE LAS VARIANTES OBTENIDAS

9.1. PRODUCCIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

La producción de AS-48 y de sus variantes en medio líquido se llevó a cabo en matraces con 12 litros de medio complejo (MC) precalentados a 37 °C durante 1 h, 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 las enterocinas a partir de los cultivos.

9.2. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIONICO

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 reconstituye en tampón fosfato sódico 0,02 M pH 6,5 durante 24 h a 4 °C y la suspensión es 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 (C-18)

Las fracciones con actividad antibacteriana recogidas mediante intercambio iónico fueron repurificadas mediante cromatografía de fase reversa utilizando para ello cartuchos rellenos de C-18, que fueron lavados con acetonitrilo y equilibrados en solvente A. Las muestras (50 ml) se pasaron por el relleno C-18 (5 g) a un flujo moderado, 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 experimentos que requerían una total pureza de AS-48, las muestras procedentes de cromatografía de fase reversa sobre soporte sólido fueron purificadas a homogeneidad mediante cromatografía RP-HPLC. Se utilizó un equipo cromatográfico Agilent 1100 Series, provisto de los siguientes módulos (Figura 33): 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.

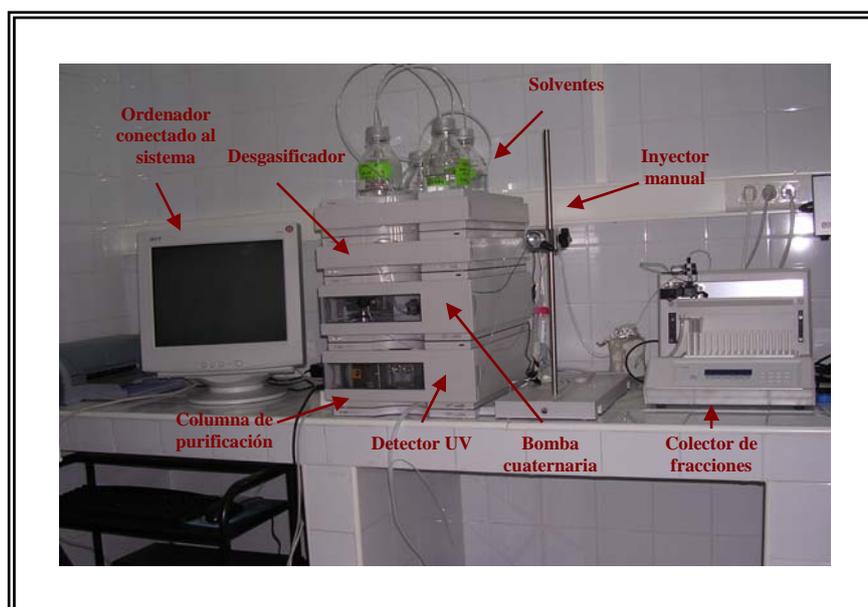


Figura 33. Esquema del sistema de cromatografía mediante RP-HPLC

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 μm (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. 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 eluído 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 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. 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.

El proceso de diálisis consiste en un intercambio molecular a través de una membrana semipermeable con un tamaño de poro inferior al tamaño de la proteína. De esta forma, si se introduce en una disolución con el tampón final deseado o H₂O desionizada una bolsa de membrana de diálisis rellena de la disolución de proteína, el tampón y las sales se intercambiarán entre el interior y el exterior de la bolsa, mientras que la proteína permanecerá en el interior. Las muestras se sometieron a diálisis a través de una membrana con un límite de exclusión de 2.000 kDa (Sigma), durante una noche a 4 °C y en agitación, frente a agua desionizada o tampón (un volumen 10 ó 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 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. Se agitó con un agitador de tubos (Vortex) y 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 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:

$$A = c \cdot \epsilon \cdot d$$

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

10.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-Poliacrilamide 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 el ditioneitol (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	4,00 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 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 liofilizadas de bacteriocina purificada fueron resuspendidas en diversos tampones, y se mezclaron con solución desnaturalizante (2x) en proporción 1:1 (v:v), calentando a continuación a 100 °C durante 3 min en tubos eppendorf herméticamente cerrados. Se depositaron 20 µl de muestra en cada pocillo del gel, y se aplicó un voltaje de 100 V a 4 °C, hasta que el indicador del frente alcanzó el final 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), α -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, pH 8,3 (mantener a 4°C)

Tris	3,02 g
Glicina	14,41 g
SDS	1,00 g
Agua destilada	1000 ml

Solución desnaturalizante (2x, 10 ml)

Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	2,50 ml
SDS al 10 %	4,00 ml
Glicerol	2,00 ml
Ditiotreitol	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 Coomasie brillante R	0,50 g
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 DE 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 μm 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/cm², 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-seroalbumina 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). A continuación, 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 NC 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, pH 7,5

Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM

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. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DIVERSOS AGENTES QUÍMICO-FÍSICOS SOBRE AS-48 Y SUS VARIANTES.

10.4.1. Entrecruzamiento con formaldehído

Para estabilizar los posibles oligómeros formados por AS-48 y por las variantes en solución acuosa, se empleó formaldehído, agente entrecruzante que reacciona con los grupos amino de las proteínas formando hemiacetales o hemitioacetales, que luego se condensan con otros grupos funcionales próximos (fenol, imidazol o indol) dando como resultado la

formación de puentes metileno (-CH₂-). El entrecruzamiento de AS-48 y de todas las variantes obtenidas se realizó incubando con formaldehído al 1 % durante 1 h a temperatura ambiente. La solución de formaldehído se preparó disolviendo paraformaldehído (Taap, Altermaston, England) en agua destilada bajo condiciones de agitación en caliente, y adicionando NaOH 1 M para permitir su completa disolución.

10.4.2. Influencia del pH en la formación de oligómeros

Para determinar la influencia del pH sobre el grado de oligomerización de las enterocinas en soluciones acuosas, se prepararon soluciones de las mismas (50 µM) en tampón fosfato 10 mM a distintos valores de pH (3, 7 y 9) y se mantuvieron durante 30 min a temperatura ambiente antes de proceder a la fijación con formaldehído. Los distintos oligómeros formados en estas condiciones fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

10.4.3. Influencia del pH en la estabilidad térmica

Para determinar la estabilidad de las bacteriocinas frente a tratamientos térmicos, se prepararon soluciones de bacteriocina (10 µM) en tampón fosfato 10 mM a distintos valores de pH (3, 7 y 9). Dichas soluciones fueron calentadas en baño a diferentes temperaturas durante distintos intervalos de tiempo (60 °C durante 30 min, 70 °C durante 10 min, 80 °C durante 5 min, 100 °C durante 5 min). Tras el tratamiento térmico, las muestras se enfriaron en hielo, y una vez frías fueron ensayadas para determinar la actividad biológica residual frente a *E. faecalis* JH2-2 empleando la técnica de las gotas. Como controles positivos se utilizaron soluciones de bacteriocina en las mismas condiciones de pH, mantenidas a temperatura ambiente durante 30 min. Asimismo, los diferentes tampones fueron ensayados como controles negativos.

10.4.4. Influencia del pH y la concentración de bacteriocina en la actividad biológica

Para este estudio, se prepararon soluciones de las bacteriocinas a diversas concentraciones (14 μM , 28 μM , 56 μM , 84 μM y 167 μM) y a distintos valores de pH (3, 7 y 9) en tampón fosfato 10 mM. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y tras ese tiempo se ensayó su actividad frente a las cepas indicadoras mediante la técnica de las gotas. La actividad se valoró midiendo el diámetro de los halos de inhibición aparecidos.

10.5. ESTUDIOS DE DICROÍSMO CIRCULAR (DC)

La luz plana polarizada posee dos componentes de igual magnitud circularmente polarizados, uno hacia la derecha y otro hacia la izquierda. El dicroísmo circular (DC) es una técnica espectroscópica que mide la diferente absorción de los dos componentes de la luz polarizada a una longitud de onda dada por parte de moléculas ópticamente activas, también llamadas quirales (Kelly y Price, 2000; Kelly *et al.*, 2005). La radiación resultante de la absorción por parte de moléculas quirales posee polarización elíptica (Figura 34). La quiralidad es una propiedad universal de los sistemas biológicos, como los aminoácidos, los nucleótidos y los carbohidratos.

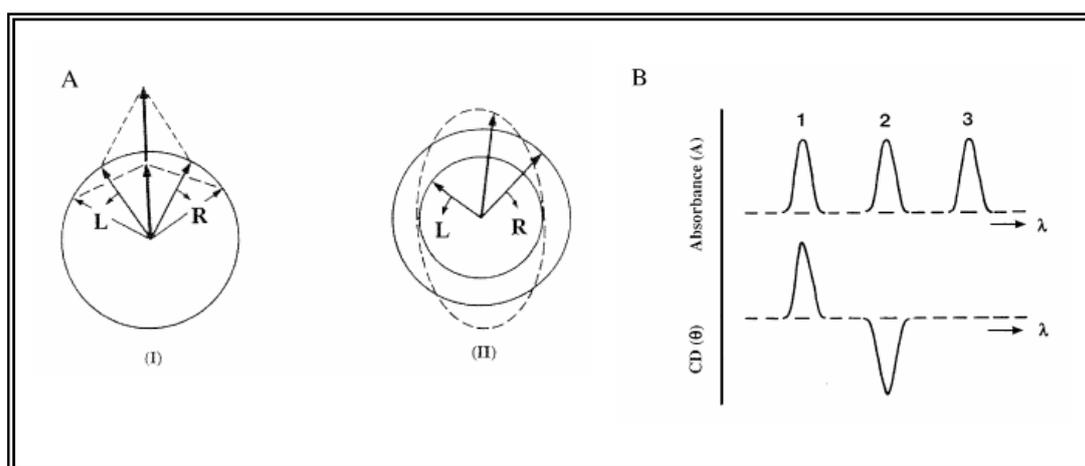


Figura 34. Origen de la señal de DC. (A) Componentes circularmente polarizados a la izquierda (L) y a la derecha (R) de la luz plana polarizada: (I) los dos componentes poseen la misma magnitud y cuando se combinan generan radiación plana polarizada; (II) los componentes poseen magnitudes diferentes y la radiación resultante (línea discontinua) está polarizada elípticamente (B) Relación entre la absorbancia y el espectro de DC. El compuesto 1 tiene un espectro positivo de DC (la absorción de L es mayor que la de R), el compuesto 2 tiene un espectro negativo (la absorción de R es mayor que la de L) y el compuesto 3 es un cromóforo aquiral (tomado de Kelly *et al.*, 2005).

El DC se emplea en el estudio de moléculas orgánicas, y es especialmente útil en el estudio de las propiedades conformacionales de proteínas en solución [contenido en estructura secundaria (UV-lejano) y terciaria (UV-cercano)]. El DC permite realizar un seguimiento de los cambios conformacionales provocados en estas moléculas por variaciones de temperatura, pH, agentes desnaturizantes, unión a ligandos y cambios en el estado de asociación. El análisis de los espectros de DC raramente proporciona información absoluta sobre la estructura de proteínas porque es un resultado promedio de parámetros de cada conformación.

En las proteínas, los enlaces peptídicos y los aminoácidos aromáticos en entornos asimétricos presentan quiralidad y dan lugar a señal de dicroísmo circular. 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. Las proteínas plegadas presentan en el UV lejano espectros característicos de DC, correspondientes a las distintas estructuras secundarias (Figura 35).

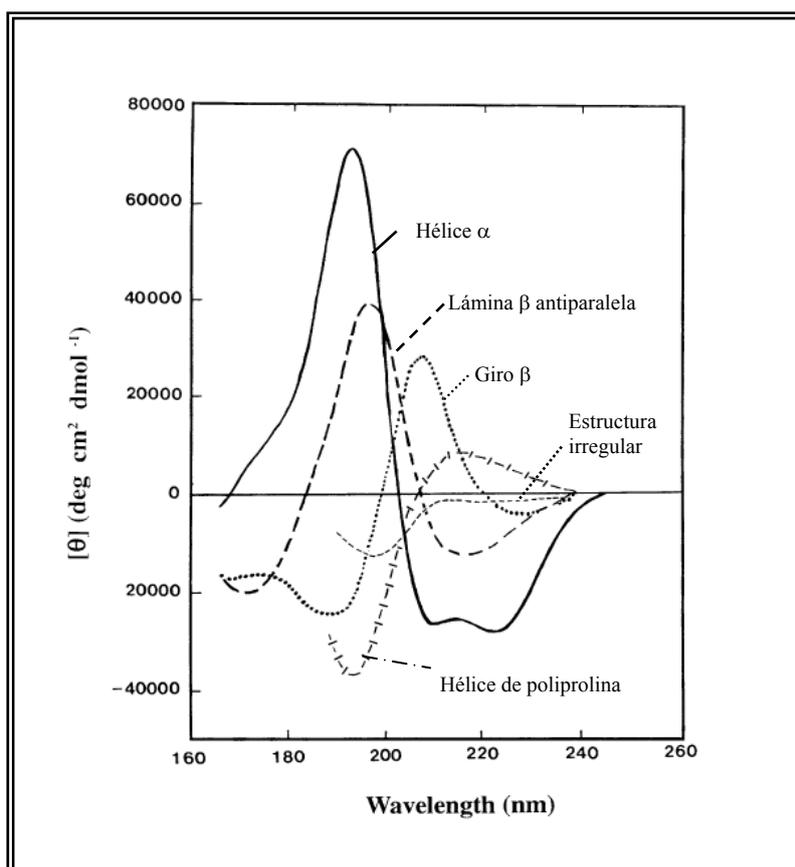


Figura 35. Espectros de DC en el UV lejano característicos de varios tipos de estructura secundaria en proteínas (Tomado de Kelly *et al.*, 2005).

Cada uno de los tipos de luz polarizada (a izquierda y a derecha) sigue la ley de Lambert-Beer, según la cual un espectro de DC puede definirse como la diferencia entre las absorbancias que presentan estas dos formas de luz polarizada (A_I y A_D , respectivamente) en función de la longitud de onda (λ):

$$\Delta A(\lambda) = A_I(\lambda) - A_D(\lambda) = [\epsilon_I(\lambda) - \epsilon_D(\lambda)] \cdot c \cdot l = \Delta\epsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{ecuación 1})$$

c : la concentración de la muestra ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$), l : la longitud del paso de luz en la cubeta (cm) y ϵ_I y ϵ_D : los coeficientes de extinción molar ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) para cada tipo de luz.

Las bandas de un espectro de DC pueden ser negativas o positivas, dependiendo de qué tipo de luz se absorba más (Figura 35). El instrumento que se utiliza para realizar medidas de DC se llama espectropolarímetro o dicrógrafo (Figura 37). En el espectropolarímetro se genera un haz de luz monocromática y polarizada linealmente, a partir de la cual 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. La señal que éste genera se compone de un valor elevado de señal de corriente continua que es proporcional a la intensidad de luz no absorbida que emerge de la muestra; superpuesta a esta señal existe una corriente alterna proporcional a la señal de DC (Figura 36).

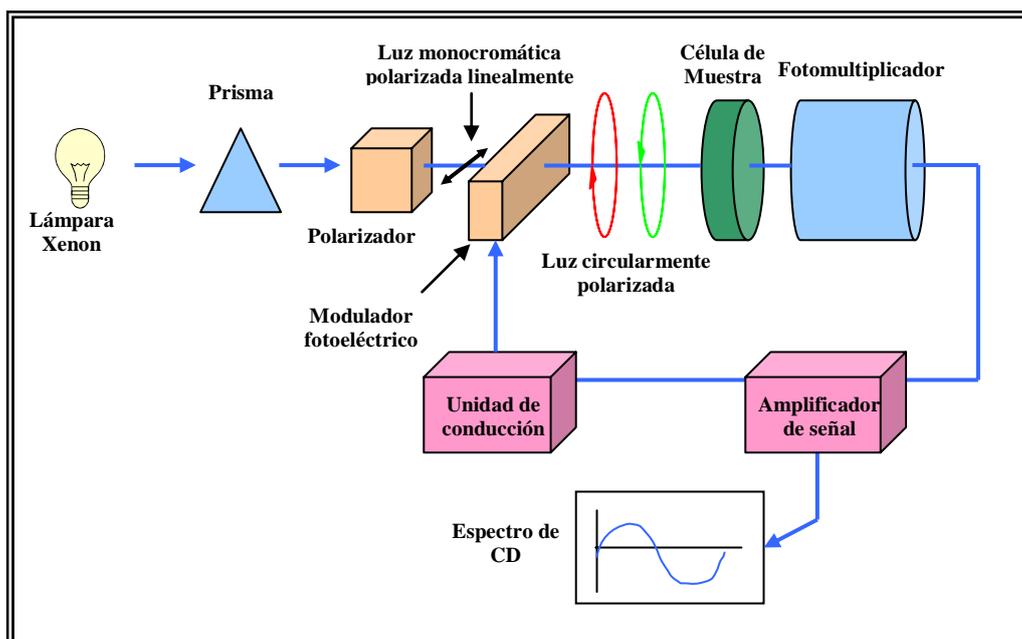


Figura 36. Representación esquemática de un espectropolarímetro.

Los espectropolarímetros generalmente expresan la diferencia de absorción $[\Delta A(\lambda)]$ en términos de elipticidad (θ), en grados. La elipticidad es una medida angular de la excentricidad de la elipse característica de la luz polarizada resultante. La relación entre elipticidad y absorbancia es $\theta = 32,98\Delta A$. La señal de elipticidad recogida experimentalmente se convirtió en elipticidad molar por residuo, según la ecuación (Bayley, 1980):

$$[\theta] = \frac{\theta}{\frac{C}{M} \cdot l \cdot 10 \cdot n} \quad (\text{ecuación 2})$$

θ : la elipticidad en grados, C: la concentración de proteína (g/l), l: la longitud del camino recorrido (cm), M: el peso molecular (g/mol) y n: el número de residuos en la proteína.

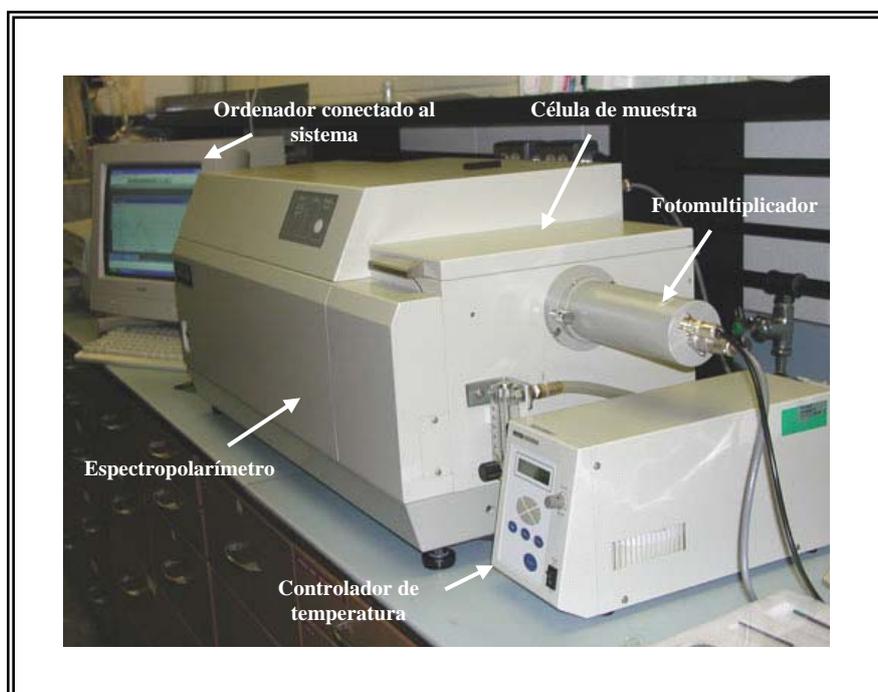


Figura 37. Espectropolarímetro J-810 de la casa comercial JASCO.

El espectropolarímetro utilizado para la realización de los experimentos de dicroísmo circular fue un modelo J-810 de JASCO Corporation (Figura 37) y un controlador de la temperatura en el compartimento de célula basado en el efecto Peltier (modelo PTC-348WI). 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.

10.5.1. Estudios de dicroísmo circular a temperatura constante

En este trabajo se registraron espectros de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano (190-260 nm) a 25 °C. Las muestras a analizar, procedentes de la purificación por HPLC, se prepararon a una concentración 20 µM de proteína en 500 µl de tampón fosfato 10 mM, pH 3 y se depositaron en una cubeta de cuarzo de 0,5 cm de paso de luz (Hellma). 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 conteniendo la muestra dentro del soporte de célula un mínimo de 5 min antes de realizar el barrido, para su termostatización. El blanco se restó al espectro de cada muestra.

10.5.1.1. Preparación de las muestras

Se partió de muestras liofilizadas de bacteriocina, purificadas por RP-HPLC, que se reuspendieron en tampón fosfato 10 mM pH 3,0. 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.

10.5.1.2. Parámetros experimentales

Los parámetros programados fueron: tipo de barrido (continuo), anchura de banda espectral (1 nm), sensibilidad (100 mgrad), tiempo de respuesta (4s), intervalo de longitud de onda (190-260 nm), resolución (0,2 nm), velocidad de barrido (50 nm/min) y número de acumulaciones (10).

10.5.1.3. Análisis de los espectros de DC

Como ya se ha descrito, la señal de elipticidad recogida experimentalmente se convirtió en elipticidad molar por residuo, según la ecuación 2 (Bayley, 1980). Para ello, se empleó el programa Origin 6.0 (Microcal).

El contenido en hélice α de cada péptido se estimó según Greenfield y Fasman (1969) y Wu *et al.*, (1981):

$$\% \text{ Contenido en hélice } \alpha = ([\theta]_{222} - [\theta]_{222}^0) / ([\theta]_{222}^{100} - [\theta]_{222}^0) \times 100 \quad (\text{ecuación 3})$$

siendo $[\theta]_{222}$ la elipticidad molar por residuo observada a 222 nm, y asignando los valores de -30.300 y -2.000 al 100% ($[\theta]_{222}^{100}$) y al 0% ($[\theta]_{222}^0$) de contenido en hélice α , respectivamente.

10.5.2. **Estudios de desnaturalización térmica mediante dicroísmo circular.**

Para la realización de desnaturalizaciones térmicas se utilizó una muestra proteica (preparada según lo explicado en el apartado anterior) que fue calentada hasta completar la desnaturalización (entre 3 °C y 98 °C). La muestra se preparó a una concentración 20 μ M en 500 μ l de tampón fosfato 10 mM, pH 3 y se depositó en una cubeta de 0,5 cm de paso de luz (Hellma). Antes de comenzar el barrido de temperatura se recogió un espectro de DC en el UV-lejano de igual forma a lo descrito en el apartado anterior, otro a la temperatura de inicio del barrido (3 °C) y otro justo después de terminar el barrido, a 25 °C, con el fin de comprobar el estado de la proteína al inicio y finalización del experimento.

10.5.2.1. Parámetros experimentales

Los parámetros que se programaron fueron: longitud de onda (222 nm), temperatura de inicio y de finalización del barrido (3-98 °C), intervalo adquisición de datos (2 °C), tiempo de espera previo al comienzo del experimento (600 s), velocidad de barrido (2 °C/min), tiempo de respuesta (4s), ancho de banda (1 nm), sensibilidad (100 mgrad).

10.5.2.2. Análisis de las curvas de desnaturalización térmica

Al igual que en el apartado anterior, la señal de elipticidad recogida experimentalmente a 222 nm se convirtió en elipticidad molar por residuo, según la ecuación 2 (Bayley, 1980) y haciendo uso del programa Origin 6.0 (Microcal).

10.5.3. Estudio del desplegamiento y del repliegamiento en presencia de cloruro de guanidinio mediante dicroísmo circular.

Para la obtención de curvas de titulación de AS-48 y las variantes en presencia de cloruro de guanidinio (GdnHCl) se registró el cambio de elipticidad a 222 nm en cada uno de los espectros de DC tomado a diferentes concentraciones del agente desnaturalizante. Las curvas de titulación se obtuvieron gracias a una unidad de titulación automática JASCO JWATS-429S acoplada al espectropolarímetro, compuesta por dos jeringas de 2,5 ml de capacidad controladas mediante el software comercial incluido en el sistema. Ambas jeringas estaban conectadas al compartimento de la célula, dejando pasar su contenido al interior de la cubeta gracias a dos conectores que se adaptaban al tapón de cierre. La cubeta que se utilizó (Hellma) correspondía a 1 cm de paso de luz y poseía un agitador magnético para homogenizar la disolución en cada momento de la titulación.

En el caso de las curvas de desnaturalización, se preparó, por un lado, una disolución de proteína sin GdnHCl, y por otro, una disolución con la misma concentración de proteína y alta concentración de desnaturalizante. En la cubeta se puso la proteína sin desnaturalizante (1,5 ml como mínimo) y se registró un espectro de DC (ver apartado 10.5.1.) En una de las jeringas (1) se depositó la disolución de proteína con desnaturalizante, quedando la otra jeringa (2) inicialmente vacía. Durante la titulación, la jeringa 2 retiró de la cubeta un

volumen de disolución igual al que se añadió después desde la jeringa 1. Se dejó un tiempo para que se alcanzara el equilibrio, de forma que la concentración en la cubeta no cambió, pero sí la de GdnHCl, que aumentó en cada adición.

Para las curvas de renaturalización el proceso fue el mismo, pero en la cubeta se depositó una disolución de proteína y alta concentración de desnaturizante, mientras que en la jeringa 1 se puso la disolución con la misma concentración de proteína sin desnaturizante. De este modo, en cada adición la concentración de proteína se mantuvo constante mientras que la de GdnHCl fue disminuyendo.

10.5.3.1. Preparación de muestras

Se partió de una muestra concentrada de bacteriocina (preparada según el apartado 10.5.1.1) a partir de la cual se prepararon disoluciones 10 μM de proteína en tampón fosfato 10 mM pH 3, con y sin GdnHCl.

Las muestras con GdnHCl se prepararon pesando la cantidad necesaria del mismo (Pierce) para obtener una disolución 8,5 M. A esta cantidad se le añadió (en agitación) el volumen de proteína necesario para lograr una concentración final 10 μM . El volumen se completó añadiendo poco a poco (en agitación) tampón fosfato 10 mM pH 3, hasta que se disolvió el GdnHCl. Entonces se ajustó el pH a 3 con NaOH 1 M y se enrasó hasta el volumen deseado en un matraz aforado, midiendo a continuación la concentración real de proteína.

La concentración real de GdnHCl se determinó midiendo el incremento en el índice de refracción (ΔN) de la disolución respecto a un blanco (10 μM de proteína en tampón Pi 10 mM, pH 3), utilizando para ello un refractómetro de mano R5000 (ATAGO):

$$\Delta N = N_{\text{muestra}} - N_{\text{blanco}} \quad (\text{ecuación 4})$$

La concentración de cloruro de guanidinio de la muestra se calculó según la ecuación (Nozaki, 1972):

$$[\text{GdnHCl}] = 57,147 \Delta N + 38,68 \Delta N^2 - 91,60 \Delta N^3 \quad (\text{ecuación 5})$$

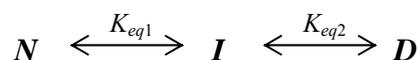
10.5.3.2. Parámetros experimentales

Las titulaciones se realizaron a 25 °C, registrando los espectros a 222 nm. Se programaron los siguientes parámetros:

- Volumen sustraído/inyectado en cada punto: 25 μ l.
- Tiempo entre la sustracción y la adición de muestra en las jeringas: 20 segundos.
- Tiempo entre la adición de muestra y la medida: 60 segundos.
- Tiempo de respuesta: 1 seg.
- Acumulaciones: 10.
- Sensibilidad: 100 mgrad.
- Ancho de banda: 1 nm.

10.5.3.3. Ajuste de las curvas de titulación a un modelo de tres estados

El modelo de tres estados establece que en la desnaturalización de una proteína aparece una especie adicional intermediaria (I) (no correspondiente a asociados) entre el estado nativo (N) y el estado desnaturalizado (D), según se refleja en el siguiente equilibrio:



Las constantes de equilibrio del proceso se relacionan con las fracciones molares de las especies presentes a través de las ecuaciones:

$$K_{eq1} = \frac{X_I}{X_N} \quad (\text{ecuación 6})$$

$$K_{eq2} = \frac{X_D}{X_I} \quad (\text{ecuación 7})$$

donde las fracciones molares cumplen la relación:

$$X_N + X_I + X_D = 1 \quad (\text{ecuación 8})$$

La señal espectroscópica utilizada para realizar el seguimiento del proceso de desnaturalización se compone de las señales correspondientes a cada uno de los estados existentes, las cuales dependen linealmente de la concentración de agente desnaturalizante (C):

$$y = (y_{N0} + a_N C)X_N + (y_{I0} + a_I C)X_I + (y_{D0} + a_D C)X_D \quad (\text{ecuación 9})$$

donde y_{N0} , y_{I0} e y_{D0} son las ordenadas en el origen para el estado nativo, intermediario y desnaturalizado, respectivamente, y a_N , a_I y a_D son las pendientes correspondientes a cada estado.

Combinando las ecuaciones anteriores se obtiene la expresión:

$$y = \frac{(y_{N0} + a_N C) + (y_{I0} + a_I C)K_{eq1} + (y_{D0} + a_D C)K_{eq1}K_{eq2}}{1 + K_{eq1} + K_{eq1}K_{eq2}} \quad (\text{ecuación 10})$$

que es la ecuación general que corresponde a un modelo de tres estados. Las constantes de equilibrio deben sustituirse por la expresión adecuada que relacione la energía libre con la variación del agente desnaturalizante empleado. En el caso de la desnaturalización química, se establece una relación lineal entre la energía libre de la desnaturalización y la concentración de agente desnaturalizante (Pace, 1986; Santoro y Bolen, 1988; Yao y Bolen, 1995):

$$\Delta G = \Delta G_w - mC \quad (\text{ecuación 11})$$

donde ΔG_w corresponde a la energía libre de desplegamiento en agua (en este caso en el tampón correspondiente), C es la concentración de agente desnaturalizante y m es la pendiente de proporcionalidad entre la energía libre del proceso y la concentración de agente desnaturalizante, parámetro que se relaciona con el cambio de área expuesta al solvente al desplegarse la proteína (Pace *et al.*, 1989; Myers *et al.*, 1996).

Por otra parte, el cambio de energía libre del desplegamiento está relacionada con la constante de equilibrio K_{eq} mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln(K_{eq}) \quad (\text{ecuación 12})$$

siendo $R = 1,99 \cdot 10^{-3} \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ y $T = 298 \text{ K}$.

Al aplicar las ecuaciones 11 y 12 a la ecuación 10, se obtiene la ecuación para ajustar las curvas de desnaturalización química recogidas por cualquier técnica espectroscópica a un modelo de tres estados:

$$y = \frac{(y_{N0} + a_N C) + (y_{I0} + a_I C)e^{-\Delta G_{IN}/RT} + (y_{D0} + a_D C)e^{-(\Delta G_{IN} + \Delta G_{DI})/RT}}{1 + e^{-\Delta G_{IN}/RT} + e^{-(\Delta G_{IN} + \Delta G_{DI})/RT}} \quad (\text{ecuación 13})$$

donde ΔG_{IN} y ΔG_{DI} son los incrementos de la energía de Gibbs del proceso de paso del estado nativo al estado intermediario y del proceso de paso del estado intermediario al estado desnaturalizado, respectivamente:

$$\Delta G_{IN} = \Delta G_{wIN} - m_{IN} C \quad (\text{ecuación 14})$$

$$\Delta G_{DI} = \Delta G_{wDI} - m_{DI} C \quad (\text{ecuación 15})$$

Las energías libres de desplegamiento, ΔG_{wIN} y ΔG_{wDI} , se relacionan con la concentración de desnaturalizante a la que la mitad de la proteína se encuentra en estado intermediario (C_{mIN} , para la primera transición) o desnaturalizado (C_{mDI} , para la segunda), mediante la expresión:

$$\Delta G_w = m C_m \quad (\text{ecuación 16})$$

11. PROGRAMAS INFORMÁTICOS UTILIZADOS

Los programas informáticos DNA Strider v 1.1 (Marck, 1988) y Vector NTI 8.0 (Informax) se emplearon para el tratamiento y análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos, así como para la estimación de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos.

Para predecir estructuras secundarias en el ARN se emplearon los programas MFOLD (Zuker y Mathews, 1999), Fold (del paquete Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin) y RNA Analyzer (Bengert y Dandekar, 2003), algunos de ellos disponibles en la red (Tabla 11).

La predicción de terminadores transcripcionales a partir de estructuras secundarias en el ARNm se realizó empleando el algoritmo desarrollado por d'Aubenton Carafa *et al.* (1990) para *E.coli* y optimizado por De Hoon *et al.* (2005) para bacterias con bajo contenido en G+C, en el que el valor d para un terminador se calcula a partir de la ecuación:

$$d = 7.9 \cdot \left(\frac{\Delta G}{n_{SL}} \right) + 2.67 \cdot T - 14.61$$

donde ΔG es la energía libre de Gibbs de la formación de un bucle (kcal/mol), n_{SL} es el número de nucleótidos del bucle y T es un parámetro que depende del número de U consecutivas en los 14 nt adyacentes al extremo 3' del bucle, y para el que se aplica un peso de caída exponencial en dirección 5'-3'. La condición $d > 0$ establece un umbral que separa los terminadores transcripcionales de las estructuras intracistrónicas, y señala que un valor positivo de d puede tomarse como una indicación fuerte de terminadores ρ -independientes.

La visualización de la estructura terciaria de proteínas se realizó con el programa Swiss Pdb Viewer (Guex y Peitsch, 1997) igualmente disponible en la red (Tabla 11).

La estimación del pI, peso molecular y coeficiente de extinción molar de cada una de las bacteriocinas se realizó con el paquete M.M., pI, composition, titrage del grupo L'Atelier BioInformatique de Marseille (ABIM), incluido en las herramientas del servidor Expasy (www.expasy.org).

El análisis de las curvas obtenidas mediante dicroísmo circular se realizó con el programa Origin 6.0 (Microcal).

La predicción de segmentos transmembrana se realizó a través de internet con el programa TMPred (Hofmann y Stoffel, 1993), mientras que para la representación planar de las hélices α se empleó la página web descrita en la Tabla 11.

Los perfiles de hidrofobicidad se realizaron de acuerdo con Kyte y Doolittle (1982), utilizando el servidor descrito en la Tabla 11.

Para predecir agregaciones en péptidos, se utilizó el programa TANGO (Fernández-Escamilla *et al.*, 2004) disponible en la página web del EMBL (Tabla 11).

Programa	Dirección
Helical Wheel Projection	http://kael.net/helical.htm
M.M., pI, composition, titrage	http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html
MFOLD	http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html
RNA Analyzer	http://rnaanalyzer.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/
Spdb-viewer	http://www.expasy.org/spdbv/
TANGO	http://tango.embl.de
TMPred	http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html
Predicción de anfipaticidad (Kyte y Doolittle,1982)	http://occawlonline.pearsoned.com/bookbind/pubbooks/bc_mccampbell_genomics_1/medialib/activities/kd/kyte-doolittle.htm

Tabla 11. Programas informáticos utilizados en este trabajo y sus direcciones en internet.

Resultados

CAPÍTULO I

CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE *E. faecalis* JH2-2(pAM401-81_X)

Como se ha expuesto en la introducción de esta Memoria, la región genética *as-48* (14,8 kb) identificada como responsable del carácter AS-48, consta del gen estructural *as-48A* y nueve genes situados a continuación (*as-48BCC₁DD₁EFGH*) que, según se ha demostrado anteriormente, son imprescindibles para la completa expresión del mismo, entendiéndose por tal, la capacidad de producir AS-48 y de resistir frente al inhibidor (Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2003).

En un estudio previo, la región *as-48* fue clonada y expresada en el vector lanzadera pAM401, por ser un vector bifuncional en *E. faecalis-E. coli*, originando el plásmido recombinante pAM401-81, el cual, al ser transferido mediante electroporación a la cepa JH2-2 de *E. faecalis* (carente de material extracromosómico), confería la capacidad de expresar el carácter AS-48 con una eficacia similar a la de la estirpe silvestre *E. faecalis* S-48 (Díaz *et al.*, 2003).

1.1. Creación de un diana *XhoI* en la región intergénica *as-48A-B*

El gran tamaño de la región *as-48* (14,8 kb) y de la construcción generada pAM401-81 (25,2 kb) es un serio obstáculo para la manipulación de los genes que alberga. Por ello, y para evitar manejar esta extensa región genética, se planteó la posibilidad de crear un fragmento o “cassette” que sólo contuviera el gen estructural *as-48A* flanqueado por sitios de corte únicos. Como ya se disponía del sitio *SphI* situado en el extremo 5' del gen, se diseñó la introducción de otra diana, un sitio de corte para el enzima *XhoI*, en la corta región intergénica (73 nt) existente entre los genes *as-48A* y *as-48B*. La diana *XhoI* fue creada a una distancia de 21 nucleótidos del extremo 3' del gen *as-48A* (Figura 38) empleando la técnica de mutagénesis dirigida mediante PCR (Mullis y Faloona, 1987). Para ello se siguió el método de extensión de fragmentos que se solapan (apartado 5.5.1. de Material y Métodos) utilizando dos cebadores complementarios, MutXh3 y MutXh4 (Tabla 6), diseñados con una longitud de 15 pares de bases, con las tres sustituciones necesarias para introducir el sitio de corte.

Las dos primeras reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo de forma separada, utilizando como ADN molde la construcción pBgD12S (Tabla 4, Figura 39), que contiene parte del fragmento D del plásmido original pMB2 (1,8 kb *SphI/BglII*) en el que se encuentra el gen estructural *as-48A* (Figura 39). En la primera reacción de PCR se emplearon como cebadores los oligonucleótidos M13-20 y MutXh4, y en la segunda, MutXh3 y Reverso, aplicando condiciones de temperatura restrictivas (58 °C). De esta forma, se obtuvieron dos productos de PCR, de 1,9 kb y 0,2 kb, respectivamente, que, en la región en la que se solapaban, contenían el sitio de corte para el enzima *XhoI* que se deseaba introducir. Ambos productos fueron purificados y secuenciados para verificar la existencia de la diana y la ausencia de mutaciones no deseadas.

Para la tercera reacción de amplificación se emplearon los dos fragmentos anteriores en cantidades equimoleculares, junto a los cebadores M13-20 y Reverso, obteniéndose finalmente un fragmento de 2,1 kb que, una vez purificado, fue clonado en el vector pGEM-T. La construcción pGEM-T_{*as48A-X*} obtenida (Figura 39) fue secuenciada para confirmar la presencia de la diana *XhoI* y la ausencia de mutaciones adicionales no deseadas, y entonces utilizada para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , empleada como hospedador intermediario para la obtención del fragmento clonado.

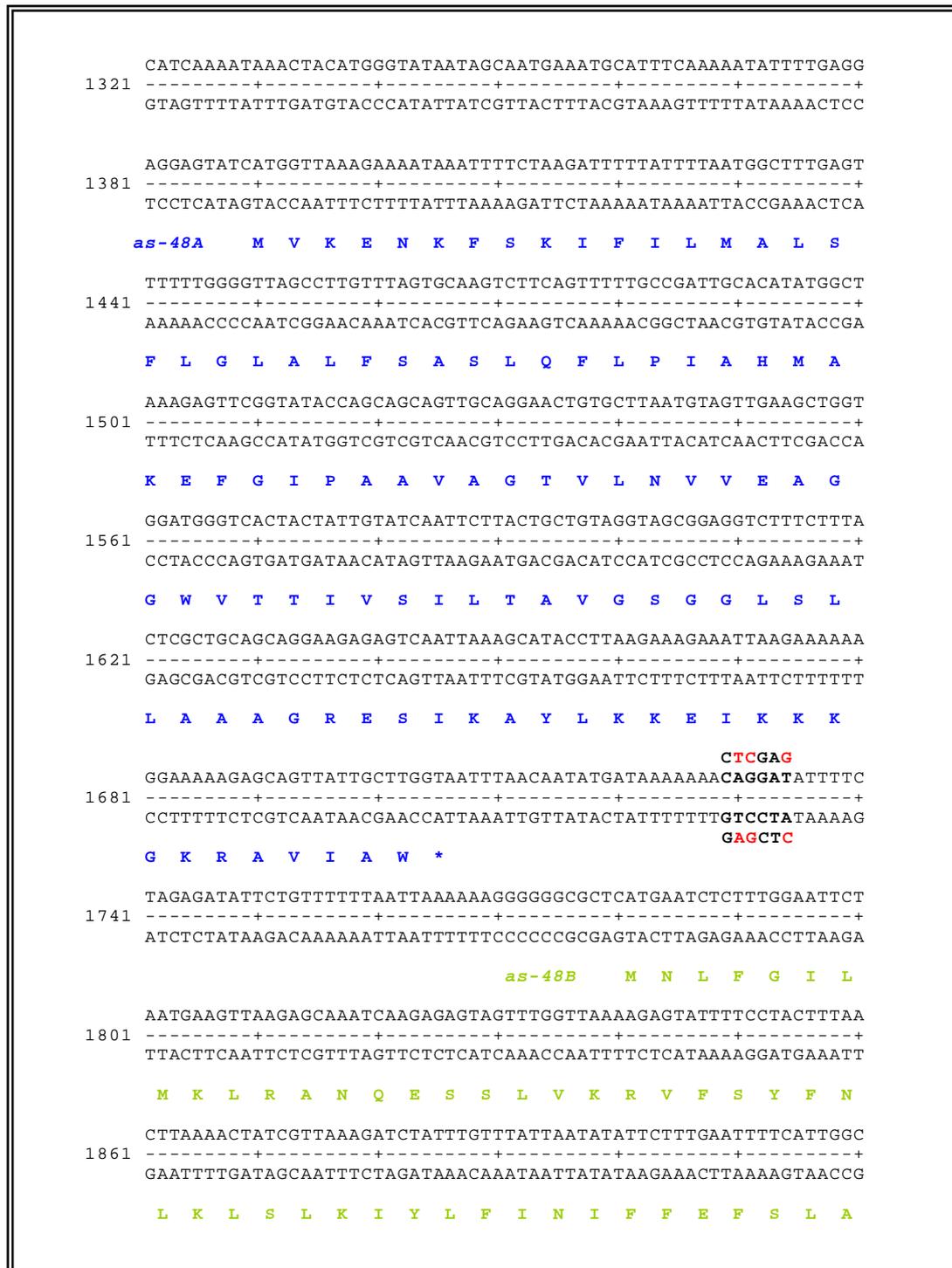


Figura 38. Secuencia de la región intergénica *as-48A-B* mostrando la diana *XhoI* introducida (CTCGAG) (en rojo las bases que se han introducido). Para la numeración se ha tomado como posición inicial el sitio *SphI* de la región *as-48* clonada en pAM401.

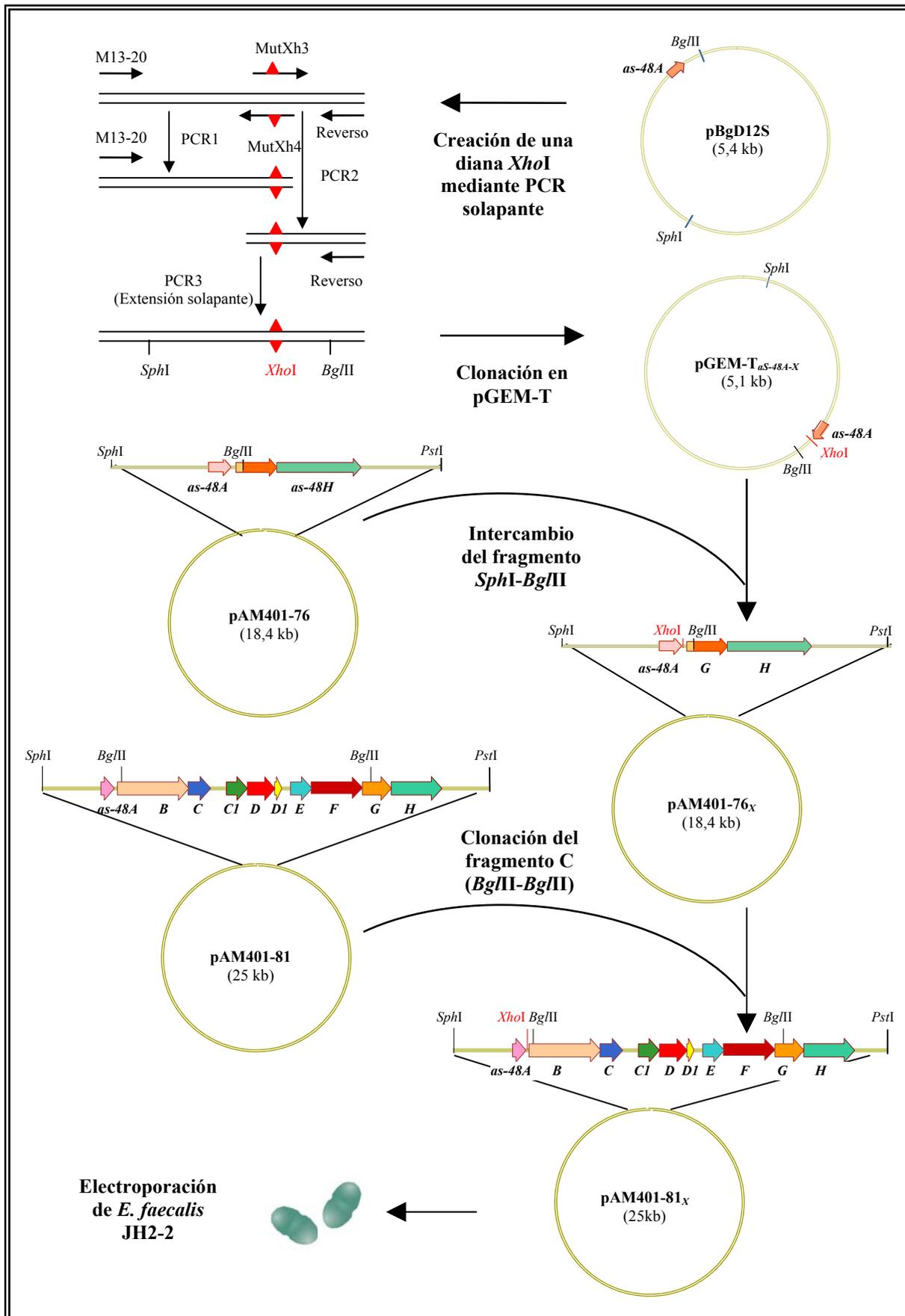


Figura 39. Estrategia seguida para la inserción del sitio *XhoI* al final del gen estructural: construcción del mutante pAM401-81_X mediante mutagénesis dirigida.

1.2. Restitución de la región *as-48* con el sitio *XhoI*.

El estudio del fenotipo de los transformantes que portan la región *as-48* (original o mutante), así como de las características biológicas y físico-químicas de la bacteriocina, requieren la expresión de todos los genes identificados en la región *as-48* (Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2003). Para llevar a cabo este tipo de estudios era, pues, necesario disponer de la región *as-48* completa, ahora con el sitio *XhoI* introducido. Por ello, la región *as-48-X* fue restituida en la construcción pAM401-76 mediante intercambio del fragmento equivalente *SphI/BglIII* procedente del plásmido pGEM-T_{*as-48A-X*}, obtenido a partir de *E. coli* DH5 α , lo que generó el plásmido pAM401-76_X (Figura 39). Posteriormente, en esta nueva construcción se clonó en fase el fragmento C (*BglIII-BglIII*) procedente de pAM401-81, que previamente se había digerido con *BglIII*, lo que dio lugar a la construcción pAM401-81_X, la cual fue utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , empleada como hospedadora intermediaria y como fuente del plásmido. La confirmación de que el fragmento C se había insertado en la orientación correcta se obtuvo digiriendo los plásmidos pAM401-81_X y pAM401-81 (utilizado como control) con el enzima *EcoRI*, que origina un perfil de restricción característico para cada orientación. La construcción pAM401-81_X fue también transferida mediante electroporación a la cepa JH2-2 de *Enterococcus faecalis* para investigar el fenotipo conferido por el cambio de tres bases realizado (CTCGAG en lugar de CAGGAT).

1.3. Estudio fenotípico de *E. faecalis* JH2-2(pAM401-81_X).

a) Producción de bacteriocina en medio sólido

Para investigar la capacidad productora de bacteriocina del nuevo transformante JH2-2 (pAM401-81_X) se empleó la técnica de la doble capa. Para ello, se realizaron réplicas de colonias de este transformante en placas de BHA, empleando como control colonias de la cepa original JH2-2(pAM401-81), las cuales, una vez crecidas, se cubrieron con una sobrecapa de BHA-blando inoculada con *E. faecalis* JH2-2, utilizada como cepa indicadora.

La presencia de halos de inhibición del crecimiento de la bacteria indicadora alrededor de las colonias del nuevo transformante, permitió comprobar que el mutante JH2-2(pAM401-81_X) seguía siendo productor de bacteriocina AS-48, si bien su actividad inhibidora era claramente inferior a la de la estirpe original empleada como control (11 mm de halo frente a 16 mm) (Figura 40). No obstante, dada la complejidad del procedimiento de obtención del mutante y su aceptable nivel de producción de bacteriocina, se consideró adecuado proseguir con su utilización para la obtención de los diferentes mutantes puntuales de AS-48 que se deseaban generar.

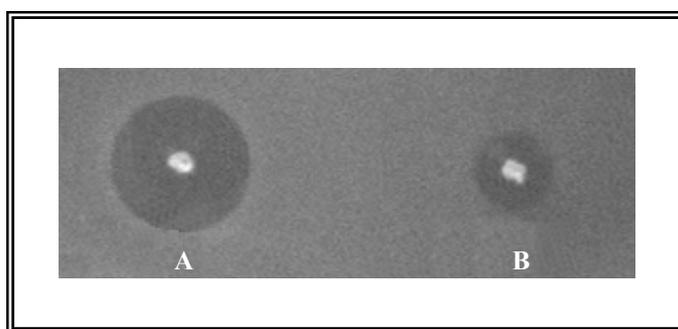


Figura 40. Halos de inhibición producidos por los transformantes *E. faecalis* JH2-2(pAM401-81) (A) y JH2-2(pAM401-81_X) (B) en medio BHA, siguiendo la técnica de doble capa frente a la cepa JH2-2, empleada como indicadora.

b) Curva de crecimiento y de producción de bacteriocina en medio líquido

El estudio de la cinética de crecimiento y de producción de AS-48 en el nuevo transformante obtenido JH2-2(pAM401-81_X) se llevó a cabo cultivándolo en 50 ml de medio Complejo (MC) durante 24 h a 37 °C. La curva de crecimiento y producción de AS-48 (Material y Métodos, apartado 8.4) se estableció mediante medida de la absorbancia (A_{600}) del cultivo de esta cepa y del control, JH2-2(pAM401-81), tomando para ello muestras de sobrenadantes a intervalos de una hora, que fueron ensayados frente a la bacteria indicadora JH2-2 mediante la técnica de los pocillos, para determinar el halo de inhibición producido a lo largo del crecimiento.

Como había sido establecido anteriormente, la máxima producción de AS-48 en la cepa de referencia JH2-2(pAM401-81) se producía entre las 8 y las 12 horas de incubación (Díaz *et al.*, 2003), y la capacidad inhibidora se mantenía estable durante el resto de la fase estacionaria. Sin embargo, en el caso del mutante JH2-2(pAM401-81_X), la inhibición fue sólo

detectada entre las 5 y 7 horas de crecimiento y, también en estas condiciones los halos producidos fueron sensiblemente inferiores (9 mm frente a 14 mm) a los de la cepa control (Figura 41).

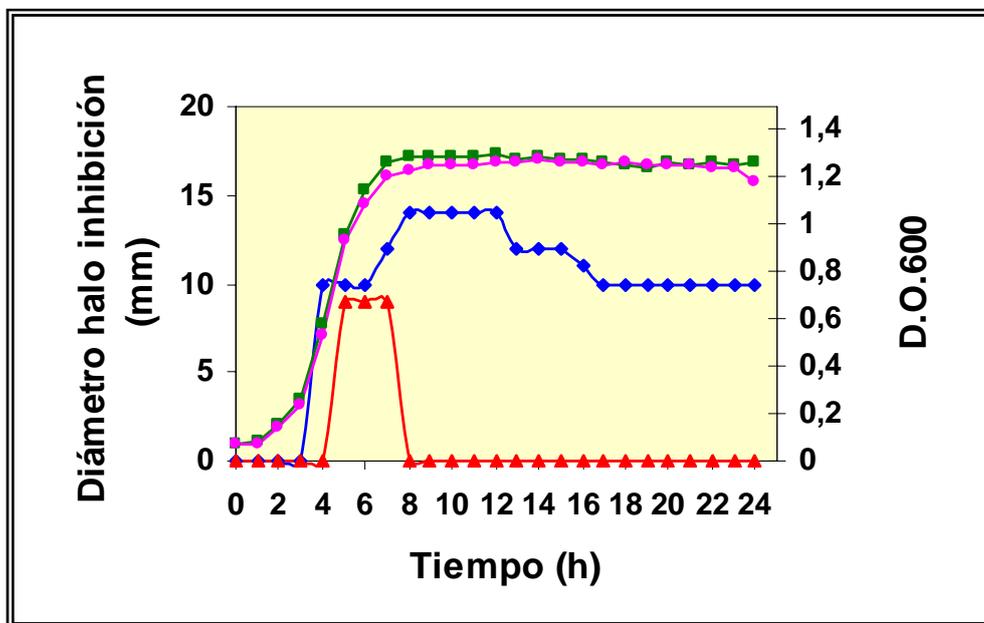


Figura 41 Curva de producción de AS-48 durante el crecimiento ($DO_{600\text{ nm}}$) de las cepas JH2-2(pAM401-81) (—■—) y JH2-2(pAM401-81_X) (—●—). La actividad se expresa en función de los halos de inhibición producidos frente a la cepa indicadora JH2-2 (—▲— pAM401-81_X) (—◆— pAM401-81)

c) Estudio de la resistencia de JH2-2(pAM401-81_X) frente a AS-48.

Para comprobar si el cambio de bases introducido en pAM401-81_X afectaba a la resistencia frente a AS-48, se llevó a cabo un estudio empleando concentraciones crecientes de AS-48 (apartado 8.2. de Material y Métodos) (Tabla 12). Para ello se ensayaron gotas (5 μ l) con cantidades crecientes de la enterocina AS-48, purificada y disuelta en agua destilada estéril, sobre placas que habían sido cubiertas con sobrecapas de BHA-blando, inoculadas con 0,1 ml de un cultivo de una noche del mutante. Se llevaron a cabo controles en paralelo de la cepa parental JH2-2(pAM401-81) (control positivo) y de JH2-2(pAM401) (control negativo).

Los resultados obtenidos permitieron comprobar que el nivel de resistencia del mutante no había resultado afectado por el cambio introducido, ya que, al igual que la cepa original, resistía la concentración más alta de AS-48 ensayada (18 μ g/5 μ l) (Tabla 12).

Cepa	Producción de AS-48 (halo en mm)	Resistencia ($\mu\text{g AS-48/5}\mu\text{l}$)									
		0,5	1	1,5	2	2,5	5	7,5	10	15	18
JH2-2 (pAM401)	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
JH2-2(pAM401-81)	16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
JH2-2(pAM401-81_x)	11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 12. Resistencia de los diversos transformantes frente a cantidades crecientes de AS-48 purificado disuelto en 5 μl de agua y valorado mediante la técnica de las gotas. R: resistencia; S: sensibilidad.

CAPÍTULO II

ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE LA REGIÓN *as-48ABC*

El fenotipo hipoproducer conferido por el cambio de tres bases introducido en la región intergénica *as-48A-B* para crear la diana *XhoI*, fue determinante para realizar el estudio transcripcional de los genes *as-48ABC*, el cual sido realizado en colaboración con la Dra. Fernández del Departamento de Microbiología (Universidad de Granada) y de las Dras. García y López del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, CSIC. Madrid).

2.1. Estudios de hibridación ADN-ARN (Northern Blotting)

La expresión de los genes *as-48ABC* fue investigada mediante Northern Blotting tanto en la estirpe parental JH2-2(pAM401-81) como en el mutante JH2-2(pAM401-81_X). Para ello, se extrajo el ARN total de ambos transformantes durante la fase logarítmica de crecimiento, y se fraccionó mediante electroforesis desnaturizante en geles de agarosa para ser transferido a una membrana de nylon (Hybond N+) y proceder a su hibridación con sondas específicas derivadas del gen *as-48A*. En la Figura 42 se observa la existencia de una única banda de ARNm en ambos transformantes, con un tamaño aproximado de 0,3 kb, correspondiente al transcrito T_A, responsable de la expresión del gen estructural *as-48A*. La menor intensidad observada en la banda correspondiente al mutante (calle 2) estaría de acuerdo con el fenotipo hipoproducer mostrado por el mismo.

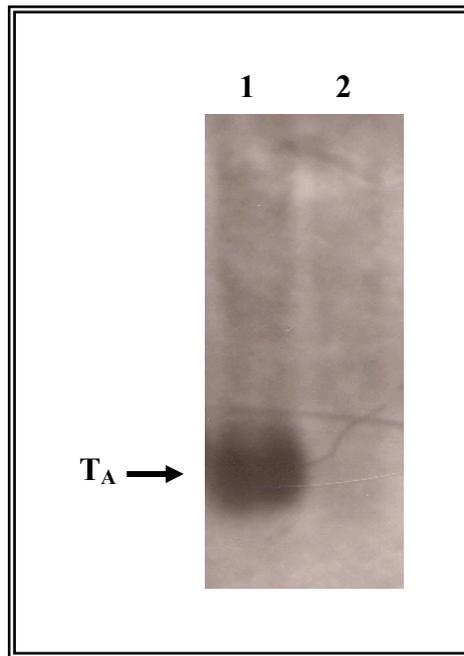


Figura 42. Análisis transcripcional mediante Northern Blotting del gen *as-48A* en JH2-2(pAM401-81) (1) y JH2-2(pAM401-81_X) (2), empleando sondas derivadas del gen *as-48A*.

2.2. Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa

Con los datos de expresión de la región *as-48* disponibles hasta el momento, se conocía la existencia de una onda de transcripción (T_1) con un tamaño adecuado para cubrir la expresión de los genes *as-48BC* (T_{BC}) (Fernández, 2004). En aquel trabajo previo se planteó la posibilidad de que T_1 pudiera incluir también la expresión del gen *as-48A*, a pesar de que no había sido posible su detección utilizando sondas del gen estructural, ya que la diferencia de tamaños (300 pb) haría imperceptible su identificación en una zona deformada del gel debido a su coincidencia con el ARNr 23S. Tal hipótesis estaba además apoyada por el hecho de que la búsqueda de promotores en la corta región intergénica existente entre los genes *as-48A* y *as-48B*, utilizando el programa NNPP (Neural Network Program, Reese, 2001), no permitió localizar ninguna secuencia que pudiera ser identificada como un promotor funcional para la expresión de los dos últimos genes, lo que sugería que los genes *as-48ABC* podrían transcribirse juntos.

Para confirmar este extremo, se investigó la existencia de una onda de transcripción que cubriera la región intergénica de 73 nt existente entre los genes *as-48A-B* mediante retrotranscripción, empleando la técnica de RT-PCR semicuantitativa (apartado 6.5 de Material y Métodos). Para ello se utilizaron dos cebadores específicos deducidos del extremo 3' del gen estructural *as-48A* (directo) y del extremo 5' del gen *as-48B* (reverso) (Tabla 7), empleando como molde el ARN total extraído de los transformantes JH2-2(pAM401-81) y JH2-2(pAM401-81_x).

Los resultados de este primer análisis se exponen en la Figura 43, en la que se observa con toda claridad la presencia de una banda de 420 pb correspondiente al producto de amplificación esperado, más intensa incluso en el mutante que en la cepa parental. Este resultado confirma la existencia de una onda de transcripción que cubriría la región intergénica. Se trata de la primera evidencia de que los genes *as-48ABC* podrían constituir una unidad transcripcional, probablemente dirigida desde el promotor P_A, la cual no había sido detectada mediante Northern Blotting, por tratarse de una técnica con menor sensibilidad.

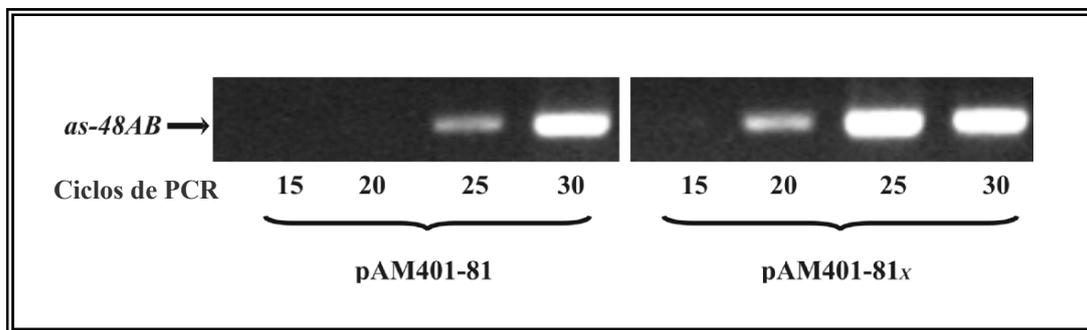


Figura 43. Análisis de la región intergénica *as-48A-B* mediante RT-PCR semicuantitativa. Se indican las cepas empleadas y el número de ciclos realizados en cada muestra.

Se hicieron entonces nuevas RT-PCRs con el fin de comparar los niveles de transcripción de los genes *as-48A* (T_A) y *as-48BC* (T_1) previamente identificados por Fernández (2004) en la cepa original, incluyendo ahora el mutante y empleando sondas específicas deducidas de los genes *as-48A* o *as-48B* (Tabla 7).

De este estudio, y a pesar de tratarse de una técnica semicuantitativa, se desprende que los niveles del transcrito T_A son más altos en la cepa parental, lo que, por otra parte, estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en el Northern y justificaría el fenotipo hipoproducción

del mutante JH2-2(pAM401-81_x) (Figura 44A). Sin embargo, en el caso de T₁ ocurre lo contrario, detectándose en el mutante niveles de expresión de este mensajero desde los 20 ciclos de amplificación y con mayor intensidad (Figura 44B).

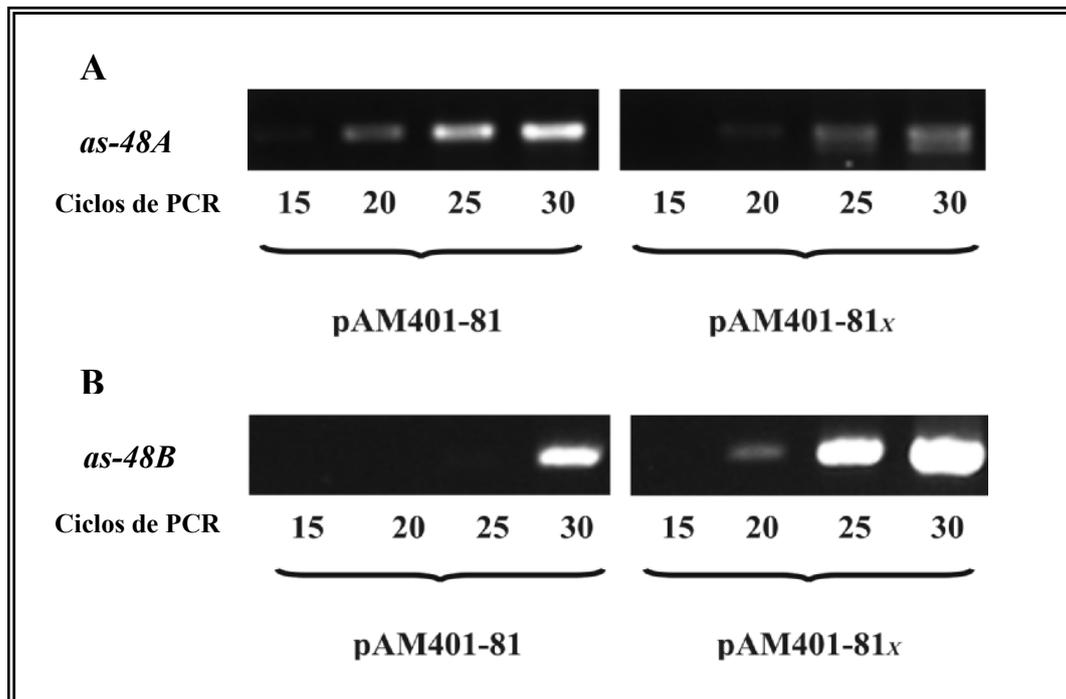


Figura 44. Análisis de los genes *as-48A* y *as-48B* mediante RT-PCR semicuantitativa. Se indican las cepas empleadas y el número de ciclos de amplificación realizados.

2.3. Predicción de estructuras secundarias en el ARNm

Con el fin explicar los resultados obtenidos, se analizó la región intergénica *as-48A-B* de la cepa silvestre junto a los primeros 5 codones del gen *as-48B*, empleando el programa MFOLD. En este estudio se reveló la existencia de dos repeticiones invertidas (IR) (I y II, Figura 45A) capaces de formar una estructura secundaria compleja, con una energía libre estimada de $-12,7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, que había sido anteriormente identificada como un terminador ρ -independiente (Martínez-Bueno *et al.*, 1998). Sin embargo, este tipo de estructuras también han sido relacionadas con sustratos específicos para endorribonucleasas (Marqués *et al.*,

1993; Drider *et al.*, 1998), lo que permite pensar en un posible procesamiento de un transcrito más largo (T_{ABC}) que originaría los transcritos T_A y T_I (T_{BC}) identificados en los Northern.

Cuando se realizó la predicción de estructura secundaria de esta misma región en el mutante, se encontró que las repeticiones invertidas se encontraban fuertemente distorsionadas por la modificación de bases introducida (Figura 45B). La predicción de plegamiento de T_A realizada con el programa FOLD puso de manifiesto, por otra parte, que en la cepa silvestre el extremo 3' formaba una estructura secundaria similar a la de los terminadores transcripcionales ρ -independientes, cuya función podría ser alargar la vida media del transcrito, protegiéndolo del ataque de las 3'-exorribonucleasas (Regnier y Adriano, 2000) (Figura 45C). Dicha estructura no aparecía en la cepa mutante (Figura 45D).

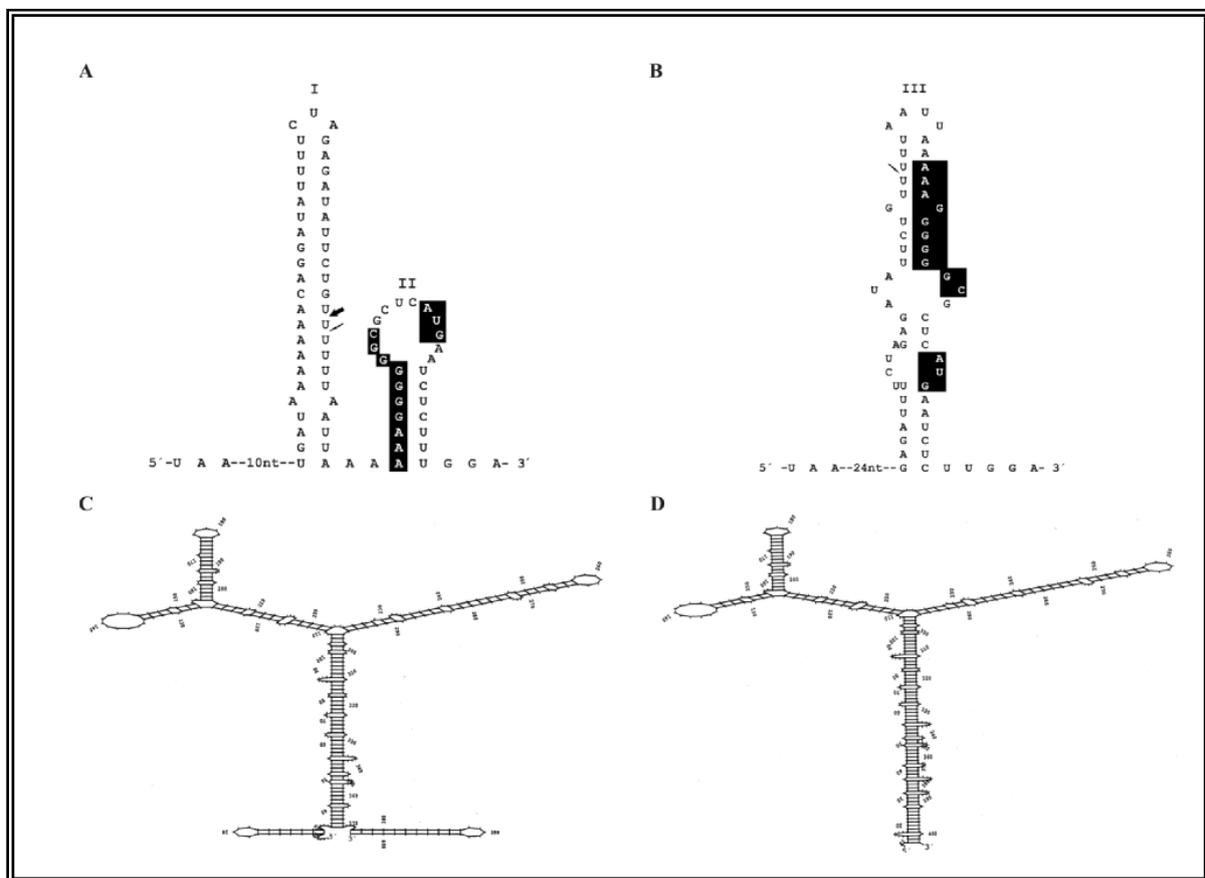


Figura 45. Predicción de estructura secundaria realizada con el programa MFOLD sobre la región intergénica y los primeros 5 codones del gen *as-48B*, en JH2-2(pAM401-81) (A) y JH2-2(pAM401-81_x) (B). Predicción de la estructura secundaria realizada con el programa FOLD de los transcritos T_A resultantes del procesamiento de T_{ABC} en JH2-2(pAM401-81) (C) y JH2-2(pAM401-81_x) (D).

Con estos datos se pueden predecir algunas de las consecuencias del cambio de bases introducido en el mutante. En primer lugar, la estructura secundaria existente en la región intergénica se encuentra fuertemente modificada (energía libre estimada $-8'1$ kcal/mol), lo que podría provocar un procesamiento incorrecto de T_{ABC} . En segundo lugar, la ausencia de protección del extremo 3' de T_A podría ser responsable de una menor vida media del mismo, lo que unido a los menores niveles detectados de este transcrito justificarían de nuevo el carácter hipoprodutor del mutante (Figura 45D).

2.4. Identificación del punto de inicio de la transcripción

La determinación del punto de inicio del transcrito T_{ABC} y de sus posibles sitios de procesamiento se realizó mediante ensayos de extensión reversa a partir de cebador (apartado 6.6. de Material y Métodos) en los transformantes JH2-2(pAM401-81) y JH2-2(pAM401-81_X), empleando cebadores específicos para los $ARNm_{AM401-81}$ y $ARNm_{AM401-81X}$, respectivamente. La detección del extremo 5' del $ARNm$ confirmó que ambos transcritos comenzaban por un residuo de adenosina localizado a 38 bases de distancia del codon iniciador del gen *as-48A*, dato que estaba de acuerdo con la posición del promotor P_A identificado (Figura 47). Sin embargo, fue interesante observar que la reacción de extensión del $ADNc$ en el mutante se producía con menor eficiencia que en la cepa parental, de acuerdo con la intensidad de la marca observada (Figura 46A). Este resultado podría ser atribuido a la menor vida media de aquel mensajero, probablemente provocado por los cambios en la estructura secundaria antes descritos.

Cuando se empleó un cebador próximo al extremo 3' de la estructura secundaria del $ARNm$, se identificaron dos especies de mensajeros en la cepa de referencia, una más abundante que la otra, cuyos extremos se localizaban en dos restos de uridina adyacentes (Figura 45A), mientras en el mutante sólo era detectable la especie menos abundante (Figura 46B).

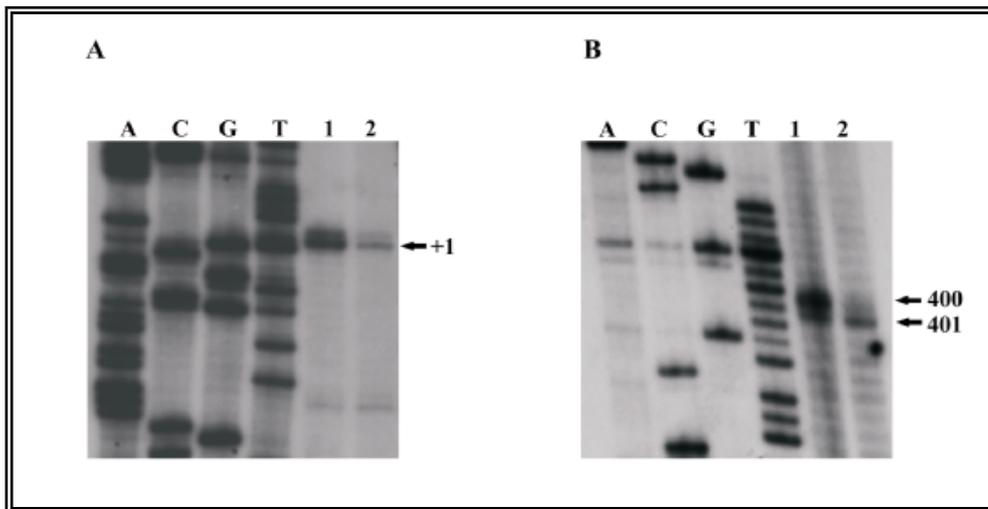


Figura 46. Extensión reversa a partir de cebador. A) Detección del sitio de inicio de la transcripción de T_{ABC} de JH2-2(pAM401-81) (1) y de JH2-2(pAM401-81_x) (2). B) Detección de los sitios de procesamiento en JH2-2(pAM401-81) (1) y JH2-2(pAM401-81_x) (2).

Todos los resultados expuestos coinciden en la importancia que la región intergénica tiene en el procesamiento de T_{ABC} (Figura 47), ya que su estructura secundaria parece determinante para la actuación de posibles endorribonucleasas (Figura 45), afectando por tanto, los niveles de expresión de los genes *as-48A* y *as-48BC*.

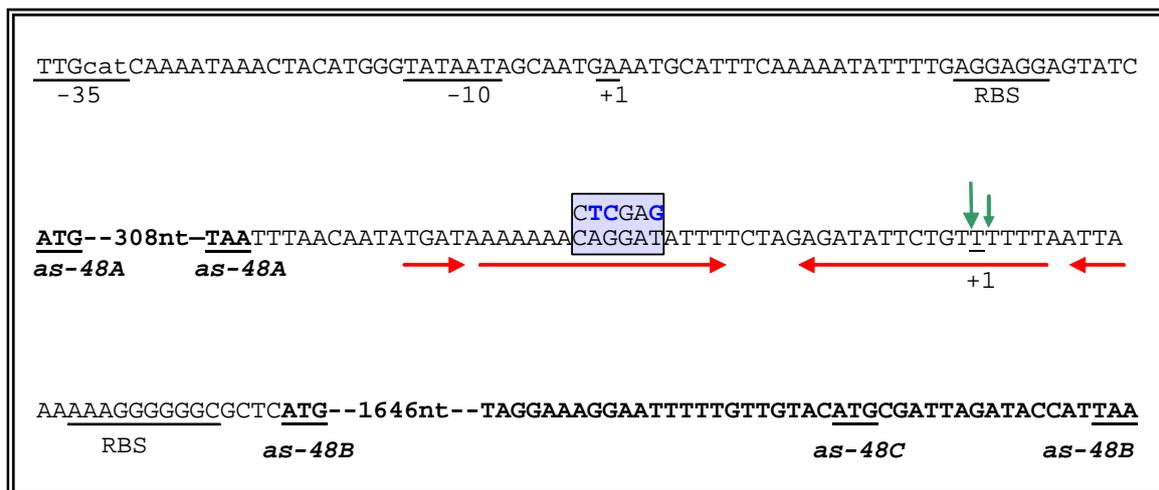


Figura 47. Secuencias relevantes en la transcripción y traducción del operón *as-48ABC*, incluida la región intergénica *as-48A-B* (73 nt). Aparecen subrayados el promotor del operón *as-48ABC* (P_A), los sitios de unión a ribosomas (RBS) y los codones de inicio y fin de la traducción. La larga repetición invertida (IR) se indica con flechas horizontales rojas. Los sitios de procesamiento del ARNm se muestran con flechas verticales verdes. Los sitios de inicio de la transcripción de *as-48A* y *as-48BC* aparecen subrayados y marcados como +1. El cambio de tres bases para generar una diana *XhoI* se muestra en el recuadro azul.

CAPÍTULO III

OBTENCIÓN DE VARIANTES DE AS-48 MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.

ESTUDIO FENOTÍPICO

3.1. Diseño y obtención de mutantes

El principal objetivo de este trabajo de investigación era la identificación de residuos esenciales en la actividad biológica y en la estabilidad de AS-48, así como la obtención de variantes de la molécula con menor tendencia a la agregación, para facilitar su aplicación como conservante natural de alimentos. Para obtener las variantes de AS-48 deseadas se han llevado a cabo modificaciones puntuales en la secuencia del gen estructural mediante mutagénesis dirigida (Figura 48).

a) Cambios para identificar la superficie implicada en la actividad biológica de AS-48

Cuando se quiere profundizar en aspectos relacionados con la actividad de los péptidos catiónicos antibacterianos formadores de poros como AS-48, es de crucial importancia examinar las propiedades electrostáticas de la molécula. De acuerdo con la estructura tridimensional de AS-48 (Figuras 19, 28), la molécula presenta una importante acumulación de residuos cargados, 8 Lys, 2 Arg, y 4 Glu, en la región comprendida entre la hélice α_4 , el giro entre α_4 y α_5 y la región N-terminal de α_5 (González *et al.*, 2000), que son los responsables de la alta carga positiva de AS-48 (pI ~ 10.5), la cual se incrementa aún más a pH 3, cuando los 4 glutámicos de la molécula se encuentran protonados. Una región de tales características tiene que ser determinante de su actividad biocida debida a la permeabilización de membranas ricas en fosfolípidos ácidos, como es el caso de las membranas bacterianas.

Otros datos de importancia para este análisis fueron los derivados del estudio fractal de AS-48 (Reyes-Zurita y Ramírez-Rodrigo, 2000), en el que se proponía que el residuo A53 estaba situado en el centro de una superficie expuesta formada por los aminoácidos I51, L52,

A53, K56 y K57 de la hélice α_4 , y el residuo E20 de la hélice α_1 , lo que sugería que dicho residuo podría estar también implicado en la interacción con las membranas.

Por todas estas razones, y de acuerdo con nuestros objetivos, centrados en la identificación de residuos que pudieran estar involucrados en la actividad biológica de la molécula, y cuya sustitución no afectara la estabilidad de la misma, nos planteamos introducir cinco cambios drásticos en residuos considerados *a priori* esenciales en la actividad de AS-48, para analizar después el fenotipo de las variantes obtenidas, así como el grado de inestabilidad que las mutaciones pudieran conferir a las moléculas:

- Tres variantes en las que se sustituyeron los glutámicos (residuos polares) presentes en la molécula (E4, E20 y E58) por alanina, un residuo no polar. Estos aminoácidos fueron seleccionados de acuerdo con los resultados obtenidos por Sánchez-Barrena *et al.* (2003), que sugieren que la interacción de las cadenas laterales de los mismos con los grupos fosfato de los fosfolípidos pueden dirigir la transición de la forma dimérica DF-I a la DF-II facilitando su inserción en la membrana, lo que además estaría favorecido por el pH ácido de la misma. Además, estos resultados sugieren que los Glu parecen definir un plano que segregaría los residuos cargados de la molécula, presentes en las hélices α_4 y α_5 , de los no cargados.
- Y una cuarta variante en la que el residuo A53 (no polar) antes comentado sería sustituido por serina (residuo polar sin carga neta).

b) Obtención de variantes con menor hidrofobicidad

En este caso se trataba de analizar la influencia de aquellos residuos hidrófobos que estuvieran muy expuestos al disolvente, y cuya sustitución pudiera afectar a la hidrofobicidad de la molécula, facilitando la existencia de monómeros de AS-48 en solución. Para ello se seleccionaron:

- El residuo W24, aminoácido sin grupos ionizables pero de naturaleza polar situado al inicio de la hélice α_2 , para ser sustituido por alanina (no polar).
- Los residuos no polares G13 (situado en la hélice α_1) y L40 (hélice α_3) para ser en ambos casos intercambiados por lisina (residuo polar).

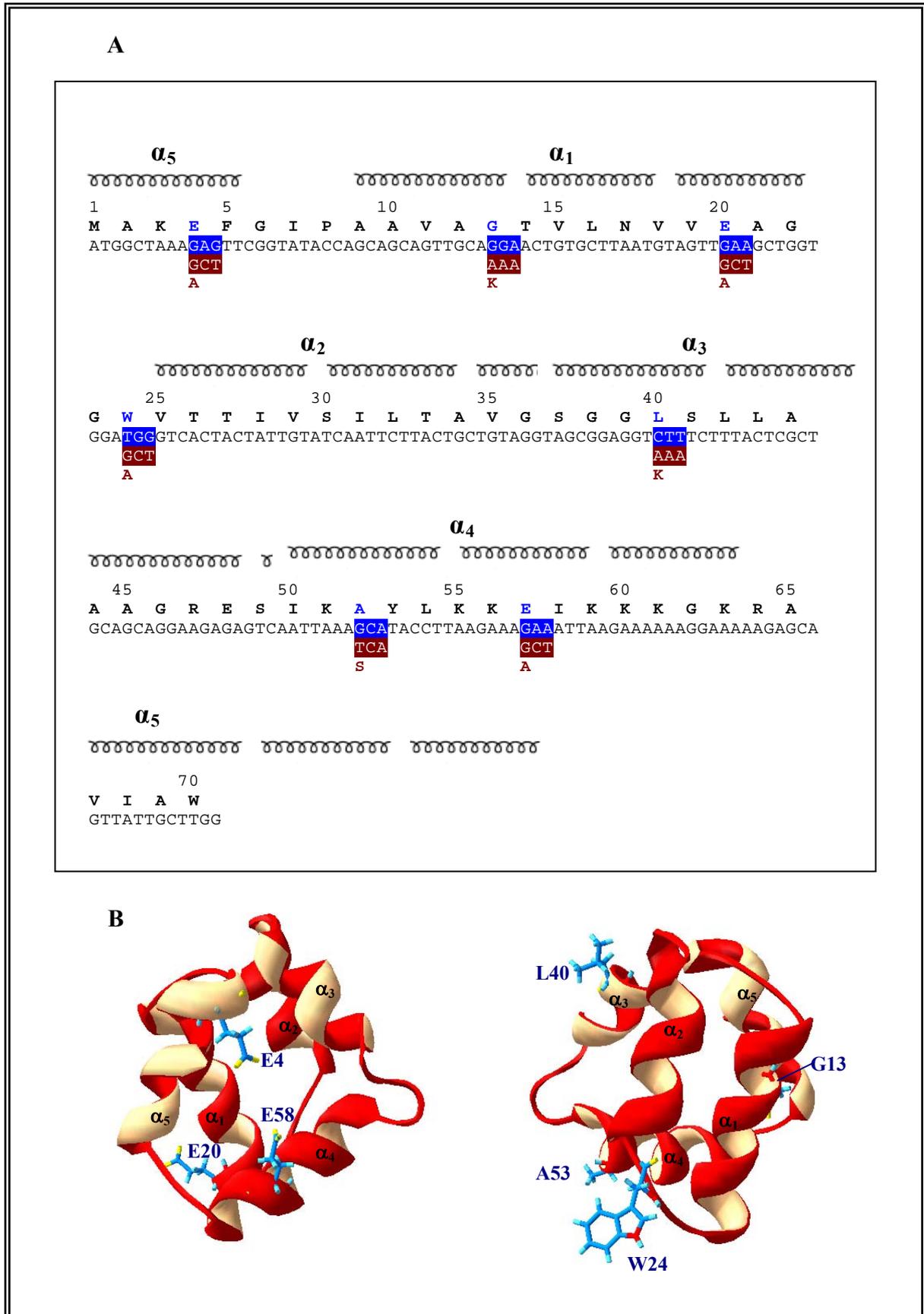


Figura 48. Cambios realizados en la secuencia de AS-48 y posición de los residuos sustituidos en la estructura secundaria (A) y terciaria (B) de la molécula.

En la Figura 48 (A y B) se muestran los cambios introducidos y su situación respecto a la estructura secundaria y terciaria de AS-48.

La obtención de las diversas variantes descritas se realizó en colaboración con los Dres. Serrano y Fernández-Escamilla, durante una estancia corta realizada en el European Molecular Biology Laboratory (EMBL) de Heidelberg (Alemania).

c) Mutagénesis dirigida en el gen estructural *as-48A*

Los diferentes cambios en la secuencia del gen estructural fueron llevados a cabo mediante PCR inversa (apartado 5.5.2. de Material y Métodos), empleando como ADN molde la construcción pGEM-T_{as48A-X} y como cebadores, las diferentes parejas de oligonucleótidos que habían sido diseñadas con la mutación que se deseaba introducir (Tabla 8).

Los productos resultantes de la amplificación, que fueron denominados en general como pGEM-T_{as48A-X-Mut}, se utilizaron para transformar células supercompetentes de *Escherichia coli* XL1Blue. De los transformantes obtenidos se seleccionaron varias colonias, a partir de las cuales se extrajo el ADN plasmídico y se secuenció para confirmar la presencia de la mutación introducida y descartar la existencia de mutaciones adicionales no deseadas. Tras ello, cada una de las construcciones fue digerida con los enzimas *SphI* y *XhoI*, y los respectivos fragmentos que contenían el gen estructural mutado (1,9 kb) fueron purificados.

Para restituir y completar los diferentes genes mutantes, cada uno de estos fragmentos fue introducido en la construcción pAM401-81_X mediante intercambio del fragmento *SphI-XhoI* silvestre equivalente, lo que originó las construcciones pAM401-81_{X-Mut} (Figura 49). Las ligaciones realizadas en cada caso fueron transferidas a células competentes de *E. coli* DH5 α , con el fin de disponer de una fuente del plásmido. En cada caso, se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes DH5 α (pAM401-81_{X-Mut}) y las diferentes construcciones pAM401-81_{X-Mut} fueron analizadas mediante digestión con *EcoRI* y *SphI-XhoI*, para confirmar la correcta organización de las mismas. Posteriormente, cada una de las construcciones pAM401-81_{X-Mut} fue transferida a la cepa JH2-2 mediante electroporación con el fin investigar el fenotipo que confería.

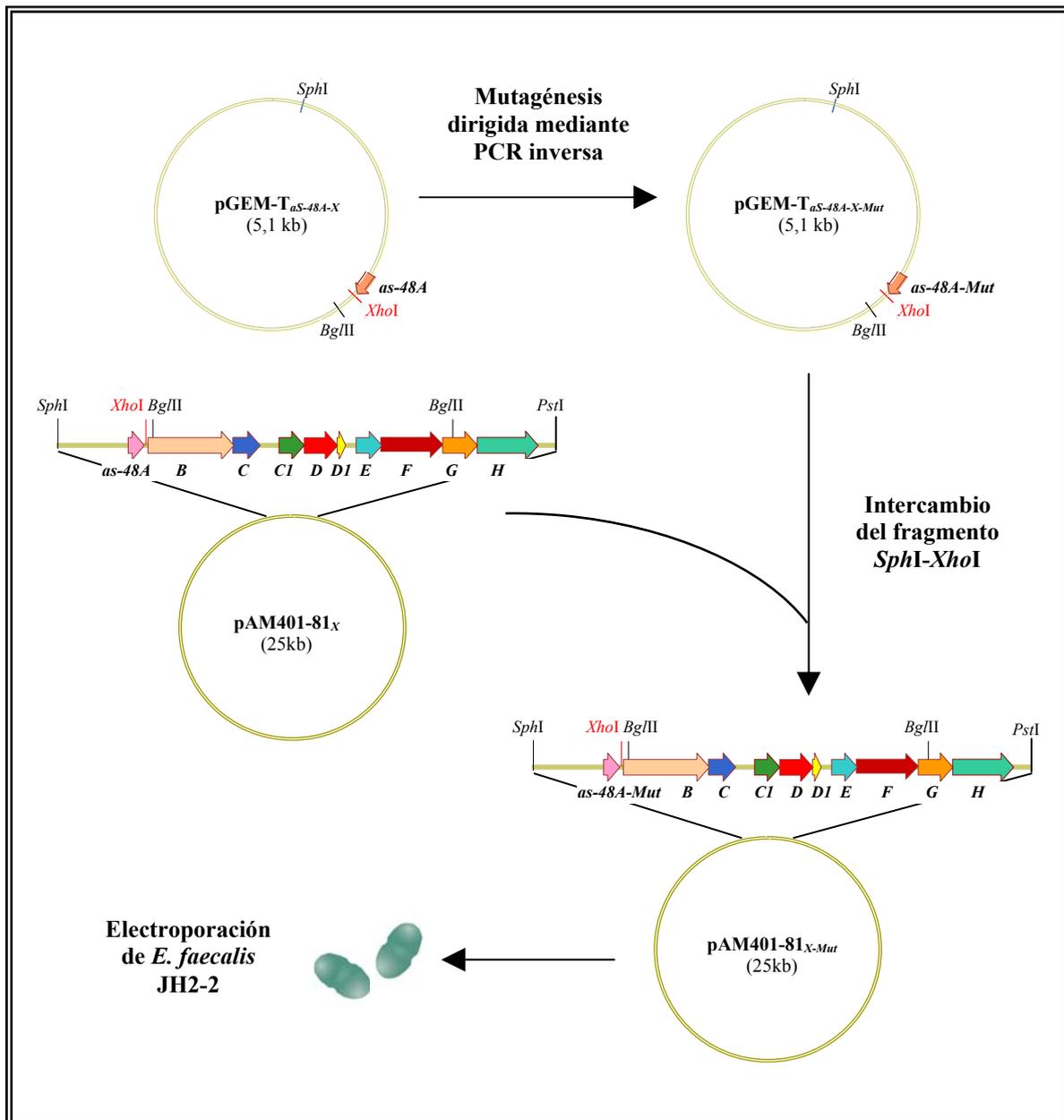


Figura 49. Esquema de la estrategia seguida para la construcción de los diversos mutantes ($pAM401-81_{X-Mut}$)

3.2. Análisis de los cambios fenotípicos que confieren las diversas variantes obtenidas en JH2-2 en relación al fenotipo silvestre

a) Actividad biológica en medio sólido

Los transformantes obtenidos en *E. faecalis* JH2-2 con las respectivas construcciones generadas ($pAM401-81_{XMut}$), fueron cultivados durante una noche en caldo BHI, empleando

como referencia cultivos de JH2-2, JH2-2(pAM401-81) y de JH2-2(pAM401-81_X). De cada uno de ellos, incluidos los controles, se tomaron muestras de 1 µl para inocular placas de BHA, que fueron incubadas durante una noche a 37 °C para permitir el crecimiento. Entonces cada una de las placas fue cubierta con 6 ml de BHA-blando mantenido en sobrefusión e inoculado (2%) con diferentes cepas indicadoras (Tabla 13). Con el fin de valorar la actividad inhibidora, las placas fueron incubadas de nuevo a 37 °C para observar la presencia de halos de inhibición en torno a las colonias productoras.

Transformante <i>E. faecalis</i> JH2-2	<i>B. cereus</i> LWL1 (A)	<i>E. faecalis</i> JH2-2 (B)	<i>L. innocua</i> 4030 (C)	<i>L. monocytogenes</i> 4032 (D)	<i>E. faecalis</i> S-47 (E)	<i>S. aureus</i> 240 (F)	<i>B. megaterium</i> 44 (G)
pAM401-81	18	22	23	20	21	10	25
pAM401-81 _X	11	17	18	16	14	-	19
pAM401-81 _{X-A53S}	9	16	15	13	13	-	19
pAM401-81 _{X-E4A}	-	-	-	-	-	-	-
pAM401-81 _{X-E20A}	-	-	-	-	-	-	+
pAM401-81 _{X-E58A}	-	9	11	11	10	-	12
pAM401-81 _{X-G13K}	11	17	18	12	14	-	19
pAM401-81 _{X-L40K}	10	16	18	15	15	-	19
pAM401-81 _{X-W24A}	-	-	-	-	-	-	11

Tabla 13. Halos de inhibición (mm) obtenidos frente a cepas bacterianas sensibles, utilizadas como indicadoras, en placas de BHA inoculadas con 1 µl de cultivo de una noche de los diversos mutantes de AS-48. Se utiliza como referencia la actividad de las cepas isogénicas JH2-2(pAM401-81) y JH2-2(pAM401-81_X) cultivadas en las mismas condiciones. (+): aclaramiento (-): ausencia de actividad.

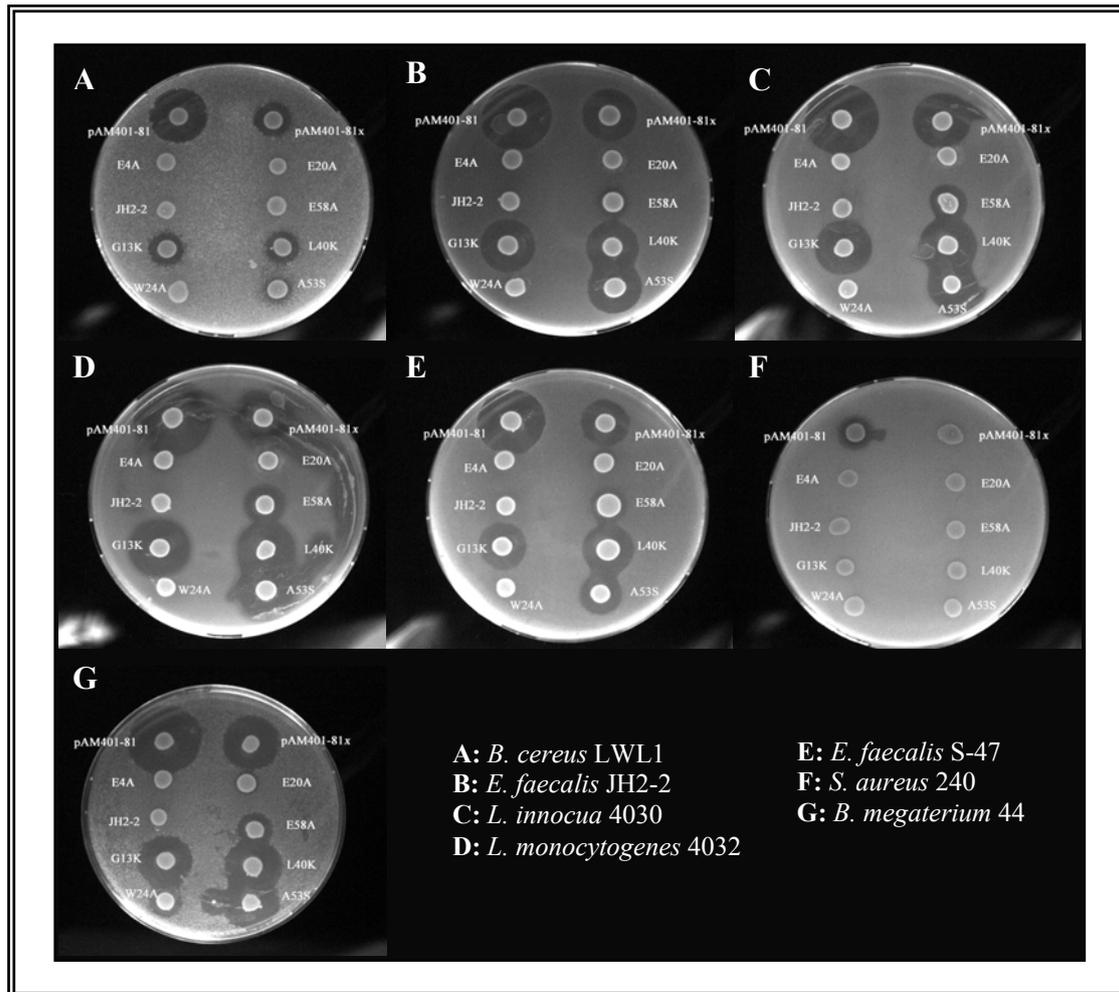


Figura 50. Halos de inhibición producidos por la cepa silvestre y los mutantes frente a varias cepas indicadoras, obtenidos mediante la técnica de la doble capa. Como control negativo se utilizó la cepa *E. faecalis* JH2-2

Los resultados sobre la capacidad de producción de bacteriocina en medio sólido se exponen en la Figura 50 y se resumen en la Tabla 13. Como era de esperar, en ningún caso se observaron los niveles de actividad de la cepa parental JH2-2(pAM401-81).

b) Actividad biológica en medio líquido

Tomando como referencia el tiempo óptimo de incubación de la cepa JH2-2(pAM401-81_X) para detectar la producción de bacteriocina (apartado 1.3 b), las variantes JH2-2(pAM401-81_{X-Mut}) y los controles JH2-2(pAM401-81_X) y JH2-2(pAM401-81) fueron inoculados en 5 ml de medio BHI e incubados a 37 °C durante 7 h, tiempo tras el cual los

cultivos fueron centrifugados para obtener muestras libres de células. Tras ello, se ensayaron 10 µl de los sobrenadantes mediante la técnica de las gotas (apartado 8.2 de Material y Métodos) frente a la cepa indicadora *E. faecalis* JH2-2, que había sido previamente inoculada en una sobrecapa de BHA blando tamponado.

Como puede observarse en la Figura 51, con este método de detección, menos sensible que el anterior, no fue posible poner de manifiesto la existencia de actividad inhibitora en ninguno de los mutantes, ni siquiera la cepa JH2-2(pAM401-81_X) mostró actividad frente a JH2-2, sólo la cepa de referencia JH2-2(pAM401-81) originó un halo de inhibición de 16 mm.

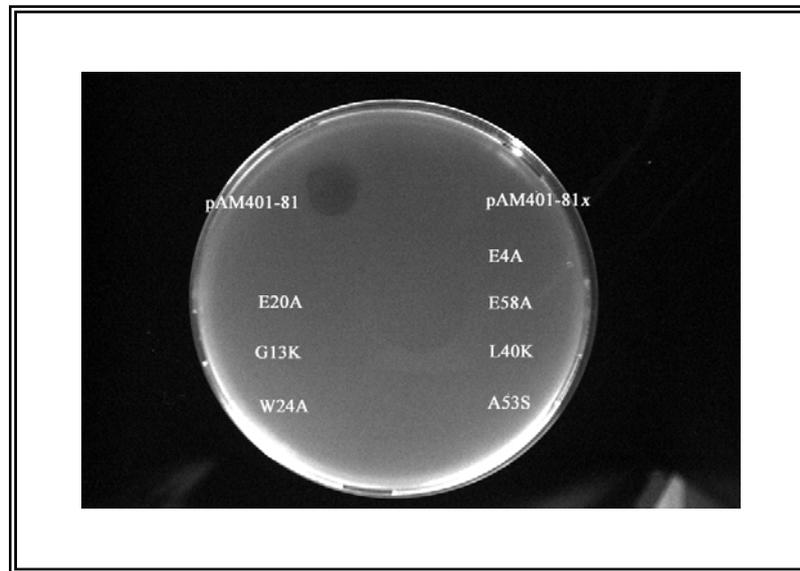


Figura 51. Actividad de los sobrenadantes libres de células (10 µl) de los transformantes JH2-2(pAM401-81), JH2-2(pAM401-81_X) y JH2-2(pAM401-81_{X-Mut}) ensayados frente a *Enterococcus faecalis* JH2-2 mediante la técnica de las gotas.

Sin embargo, cuando la actividad en medio líquido fue ensayada en las mismas condiciones pero empleando la técnica de los pocillos, se detectó un halo de aclaramiento mínimo en la cepa control JH2-2(pAM401-81_X) y en los mutantes JH2-2(pAM401-81_{X-A53S}), JH2-2(pAM401-81_{X-G13K}) y JH2-2(pAM401-81_{X-L40K}) (Tabla 14).

Cepa	Diámetro del halo de inhibición (mm)
JH2-2(pAM401-81)	16
JH2-2(pAM401-81 _X)	+
JH2-2(pAM401-81 _{X-E4A})	-
JH2-2(pAM401-81 _{X-E20A})	-
JH2-2(pAM401-81 _{X-E58A})	-
JH2-2(pAM401-81 _{X-G13K})	+
JH2-2(pAM401-81 _{X-L40K})	+
JH2-2(pAM401-81 _{X-W24A})	-
JH2-2(pAM401-81 _{X-A53S})	+

Tabla 14. Halos de inhibición (mm) de los sobrenadantes libres de células (100 μ l) de los transformantes JH2-2(pAM401-81), JH2-2(pAM401-81_X) y JH2-2(pAM401-81_{X-Mut}) frente a *Enterococcus faecalis* JH2-2, ensayados mediante la técnica de los pocillos. (+): aclaramiento alrededor del pocillo. (-): sin actividad.

c) Resistencia frente a AS-48

La valoración de la resistencia de los transformantes *E. faecalis* JH2-2(pAM401-81_{X-Mut}) se determinó frente a concentraciones crecientes de AS-48 purificada y disuelta en 5 μ l de agua destilada estéril (Tabla 15). Este ensayo se llevó a cabo empleando la técnica de las gotas (apartado 8.2. de Material y Métodos), para lo cual se inocularon sobrecapas de BHA blando con 0,1 ml de un cultivo de una noche de cada uno de los mutantes, así como de las cepas JH2-2(pAM401-81) y JH2-2(pAM401-81_X) (controles positivos) y de JH2-2 (control negativo).

La ausencia de halos de inhibición en todos los casos, demostraba que, como era de esperar, ninguna de las modificaciones introducidas modificaba la capacidad de resistir la máxima concentración de AS-48 ensayada (18 μ g /5 μ l) (Tabla 15).

Transformante <i>E. faecalis</i> JH2-2	Resistencia ($\mu\text{g AS-48/5}\mu\text{l}$)									
	0,5	1	1,5	2	2,5	5	7,5	10	15	18
JH2-2 (control negativo)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
pAM401-81 (control positivo)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
pAM401-81 _X (control positivo)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
pAM401-81 _{X-A53S}	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
pAM401-81 _{X-E4A}	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
pAM401-81 _{X-E20A}	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
pAM401-81 _{X-E58A}	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
pAM401-81 _{X-G13K}	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
pAM401-81 _{X-L40K}	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
pAM401-81 _{X-W24A}	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 15. Determinación de la resistencia de los diversos mutantes obtenidos frente a cantidades crecientes de AS-48 purificado, disueltas en 5 μl de agua y valorado mediante la técnica de las gotas. R: resistencia; S: sensibilidad.

d) Ensayo de actividad hemolítica

Los transformantes JH2-2(pAM401-81), JH2-2(pAM401-81_X) y JH2-2(pAM401-81_{X-Mut}) no mostraron actividad hemolítica alguna, cuando crecieron sobre placas de agar-sangre Columbia (Oxoid), en las que no se detectaron zonas de aclaramiento debido a la lisis de los eritrocitos en el medio.

3.3 Análisis de expresión del gen *as-48A* en JH2-2(pAM401-81) y en los transformantes JH2-2(pAM401-81_{X-Mut})

La expresión del gen *as-48A* fue investigada mediante Northern Blotting en la estirpe parental JH2-2(pAM401-81), en el mutante JH2-2(pAM401-81_X) y en los mutantes JH2-2(pAM401-81_{X-Mut}). Para ello, se extrajo el ARN total de todas las cepas durante la fase

logarítmica de crecimiento, y se fraccionó mediante electroforesis desnaturante en geles de azarosa, para ser transferido a una membrana de nylon (Hybond N+) y proceder a su hibridación con sondas específicas derivadas del gen *as-48A*. En la Figura 52 se observa la presencia de una única banda de ARNm de 0,3 kb, aproximadamente, correspondiente al transcrito T_A . La menor intensidad observada en la banda correspondiente a los mutantes confirma el fenotipo hipoprodutor mostrado por todos ellos.

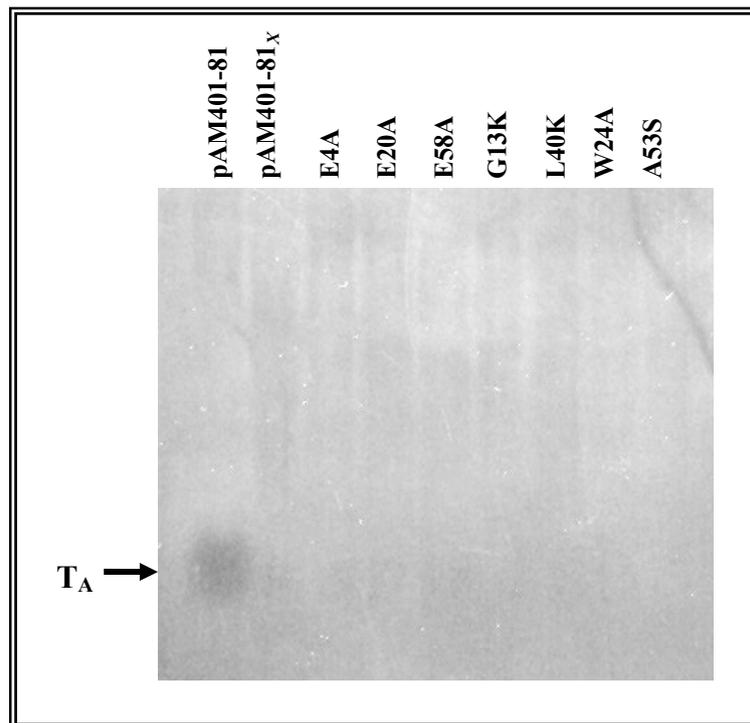


Figura 52. Análisis transcripcional (Northern Blotting) del gen *as-48A* en JH2-2(pAM401-81), JH2-2(pAM401-81^x) y los mutantes JH2-2(pAM401-81^{x-Mut}) empleando sondas derivadas del gen *as-48A*.

CAPÍTULO IV

PURIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE LAS VARIANTES DE AS-48

La producción de las diferentes variantes de AS-48 se realizó cultivando las células en Medio Complejo (MC), que al contener una baja concentración de péptidos resulta muy apropiado para la purificación de proteínas (Gálvez *et al.*, 1989a). Para purificar a homogeneidad las proteínas producidas por los transformantes JH2-2(pAM401-81_{X-Mut}) en este medio, se adoptó el protocolo puesto a punto para la molécula AS-48 nativa (Abriouel *et al.*, 2003; Gálvez *et al.*, 1989a), con ligeras modificaciones. En la Figura 53 se exponen los pasos seguidos para dicha purificación: cromatografía de intercambio catiónico sobre Carboximetil-Sephadex CM25, cromatografía de fase reversa sobre soporte sólido empleando matrices de C18 y finalmente repurificación mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) sobre C-18.

El mejor tiempo de incubación para la producción de las diversas variantes AS-48^M se estableció en 7 h, según los resultados obtenidos en los apartados 1.3. (b) y 3.2. (b).

4.1. Purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico

Todas las moléculas mutadas (AS-48^M) presentes en los caldos de cultivo de los diferentes transformantes obtenidos, se recuperaron mediante cromatografía de intercambio iónico sobre CM25, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 9.2. de Material y Métodos. Para ello, cada uno de los mutantes se inoculó en 12 litros de medio complejo y se incubó a 37 °C durante 7 h, transcurridas las cuales se ajustó el pH a 6,5 con NaOH 0,5 M, para favorecer la adsorción de las proteínas catiónicas al gel.

La adsorción de AS-48 se realizó directamente a partir de los cultivos y sin retirar las células, con objeto de recuperar la bacteriocina unida a ellas, mezclándolos con el gel en proporción 40:1 (v/v) (Abriouel *et al.*, 2003). Esta proporción tuvo que ser modificada para las variantes AS-48^M a razones más altas (60:1 v/v) por estimar que la concentración de inhibidor en los sobrenadantes era inferior. Las fracciones proteicas adsorbidas al CM25 fueron eluidas con NaCl 1,5 M y recogidas a razón de 25 ml/tubo. La actividad de las mismas

fue entonces ensayada frente a *E. faecalis* JH2-2, empleando la técnica de los pocillos. Todas las muestras, mostraran o no actividad, fueron congeladas a -20 °C.

Los mutantes AS-48^M mostraron un patrón de actividad inhibidora similar al comentado anteriormente: E58A, G13K, L40K y A53S mantenían la actividad con valores próximos a los de AS-48 obtenida a partir la cepa empleada como referencia (pAM401-81_X), mientras que W24A permaneció inactivo. Sin embargo, algunas de las fracciones obtenidas de los cultivos productores de E4A y E20A, que en principio carecían de actividad antibacteriana, tras su purificación y concentración en CM25 mostraron halos de inhibición con los diámetros que se recogen en la Tabla 16.

Fracción	pAM401-81*	pAM401-81 _X	pAM401-81 _{X-E4A}	pAM401-81 _{X-E20A}	pAM401-81 _{X-E58A}	pAM401-81 _{X-G13K}	pAM401-81 _{X-L40K}	pAM401-81 _{X-W24A}	pAM401-81 _{X-A53S}
Actividad Cultivo	15	+	-	-	-	+	+	-	+
1	19	13	10	10	10	12	12	-	12
2	21	15	11	12	14	14	13	-	14
3	20	15	11	12	14	16	16	-	15
4	19	15	13	14	13	17	17	-	14
5	18	15	+	13	13	15	16	-	14
6	18	13	+	12	12	15	15	-	14
7	17	13	+	11	11	13	13	-	11
8	17	10	+	+	10	13	13	-	10
9	17	10	-	+	+	12	12	-	10
10	17	+	-	+	-	11	11	-	10
11	17	-	-	-	-	11	+	-	+
12	16	-	-	-	-	11	+	-	+
13	16	-	-	-	-	11	-	-	-
14	15	-	-	-	-	+	-	-	-
15	15	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 16. Halos de inhibición (mm) de las fracciones eluidas del gel CM25, a partir de 12 litros de cultivo en medio MC (mutantes) y de 5 litros (cepa silvestre) y realizado en proporción 60:1 y 40:1 respectivamente. El ensayo frente a *E. faecalis* JH2-2 se realizó mediante la técnica de los pocillos. (+): aclaramiento alrededor del pocillo. (-): sin actividad

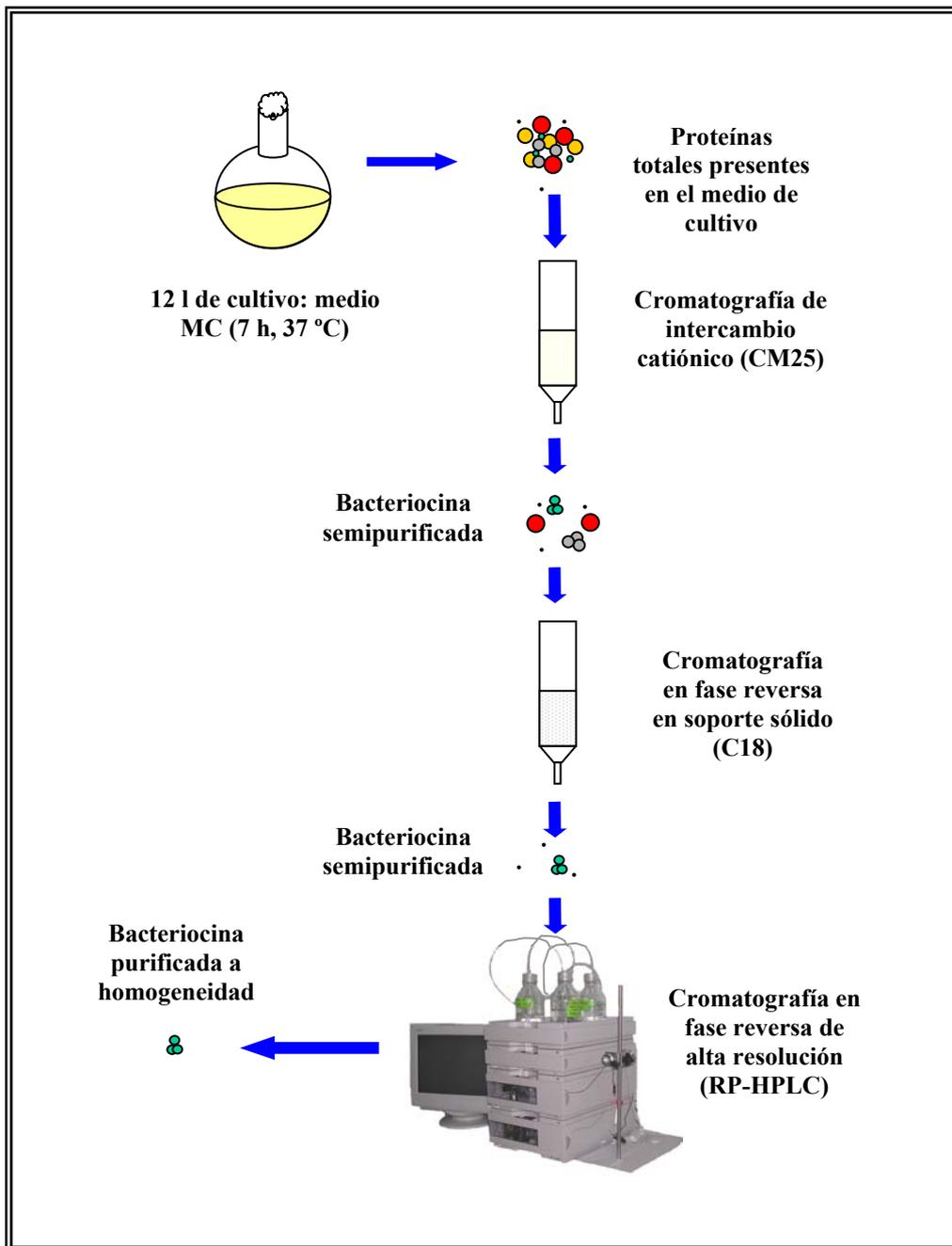


Figura 53. Esquema del proceso de purificación de la bacteriocina AS-48 y de los mutantes AS-48^M

4.2. Purificación mediante cromatografía de fase reversa sobre soporte sólido (C18)

Las fracciones eluidas en CM25 fueron sometidas a cromatografía de fase reversa, utilizando cartuchos rellenos de C-18 (ver apartado 9.3. de Material y Métodos). Para ello, las muestras (75 ml en el caso de los mutantes y 50 ml en el de la cepa silvestre) se filtraron a través de C-18 (5 g) a flujo moderado. El material retenido se recuperó eluyendo con distintos porcentajes (30%, 60%, 90% y 100%) de solvente B (TFA 4 mM en isopropanol:acetonitrilo 2:1) en solvente A (TFA 10 mM en agua Milli-Q). La actividad de las muestras recogidas (fracciones de 5 ml) se ensayó mediante la técnica de las gotas frente a *E. faecalis* JH2-2 antes de ser congeladas a -70 °C.

Como puede observarse en la Tabla 17, en este estadio de purificación las fracciones eluidas entre el 60-90% de solvente B mostraban capacidad para inhibir a la cepa indicadora; incluso las correspondientes al mutante W24A presentaban un cierto halo de aclaramiento.

Fracción	pAM401-81*	pAM401-81 _X	pAM401-81 _{X-E44}	pAM401-81 _{X-E204}	pAM401-81 _{X-E584}	pAM401-81 _{X-G13K}	pAM401-81 _{X-L40K}	pAM401-81 _{X-W24A}	pAM401-81 _{X-Δ53S}
30 % B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60% B	+	+	+	+	+	+	+	+-	+
90% B	+	+	+	+	+	+	+	+-	+
100% B	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 17. Inhibición del crecimiento de *E. faecalis* JH2-2 producido por fracciones semi-purificadas mediante cromatografía de fase reversa en C18. (+) : inhibición; (-): no inhibición ; (+-): aclaramiento

4.3. Purificación mediante RP-HPLC

Las muestras procedentes de la cromatografía de fase reversa sobre soporte sólido fueron liofilizadas y purificadas a homogeneidad mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC) a escala semipreparativa, según lo descrito en el apartado 9.4 de Material y Métodos.

Los cromatogramas obtenidos en los siete mutantes purificados, al igual que en el control, mostraban un pico predominante y bien definido (Figura 54) correspondiente a las fracciones con actividad (ensayadas mediante la técnica de las gotas frente a JH2-2), que se encontraba libre de proteínas acompañantes y por tanto contenía las moléculas deseadas con alto grado de pureza. La cantidad de enterocina recuperada en cada caso se describe en la Tabla 18.

Enterocina	Cantidad de enterocina purificada (mg totales)	Rendimiento (mg/l de cultivo)
AS-48 ^a	5	1
AS-48 ^b	3	0,250
AS-48 E4A	2,10	0,175
AS-48 E20A	2,02	0,168
AS-48 E58A	3	0,250
AS-48 G13K	2,88	0,240
AS-48 L40K	2,19	0,183
AS-48 W24A	2,51	0,209
AS-48 A53S	2,28	0,190

Tabla 18. Cantidad de enterocina AS-48^M recuperada a partir de 12 l de cultivo de los diferentes transformantes JH2-2(pAM401-81_{X-Mut}). (a) AS-48 purificada a partir de 5 l de cultivo de la cepa JH2-2(pAM401-81). (b) AS-48 purificada a partir de 12 l de cultivo de la cepa JH2-2(pAM401-81_X).

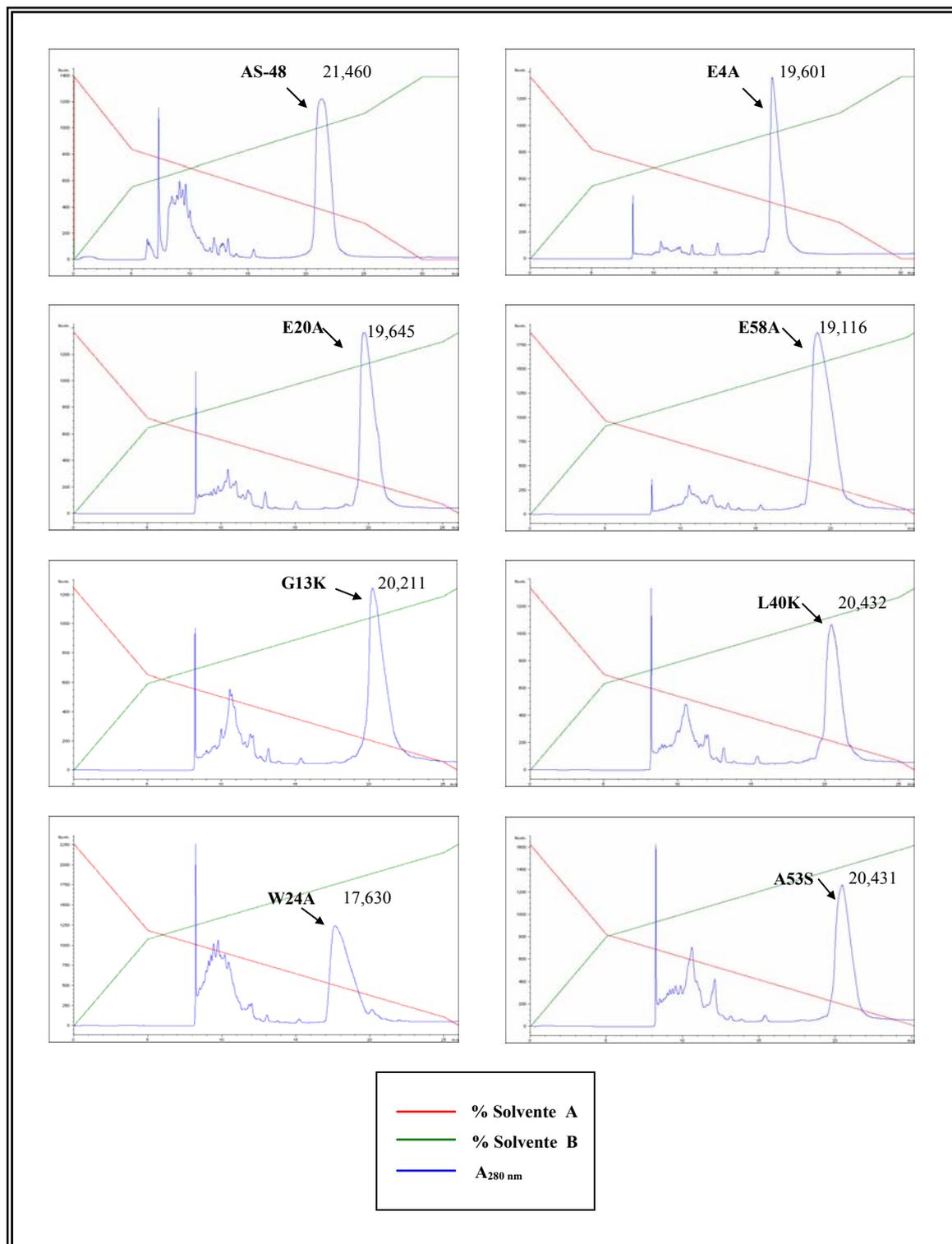


Figura 54. Perfiles cromatográficos de AS-48 y de los siete mutantes obtenidos mediante RP-HPLC a escala semipreparativa en una columna C-18. Se indica el tiempo de retención de cada molécula (min).

4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Para comprobar la pureza de las fracciones obtenidas, las variantes AS-48^M purificadas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de sodio-dodecil-sulfato (descrito en el apartado 10.2. de Material y Métodos). Para ello, las muestras procedentes de HPLC fueron liofilizadas y redisueltas en tampón fosfato 50 mM pH 7, hasta lograr una concentración de 10 μ M para cada muestra, y finalmente se depositaron 20 μ l en los pocillos del gel.

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con Azul de Coomasie, y una vez decolorados, se pudo identificar una única banda de aproximadamente 7 kDa en todos los mutantes, que migraba de idéntica forma que la molécula AS-48 original utilizada como control (Figura 55).

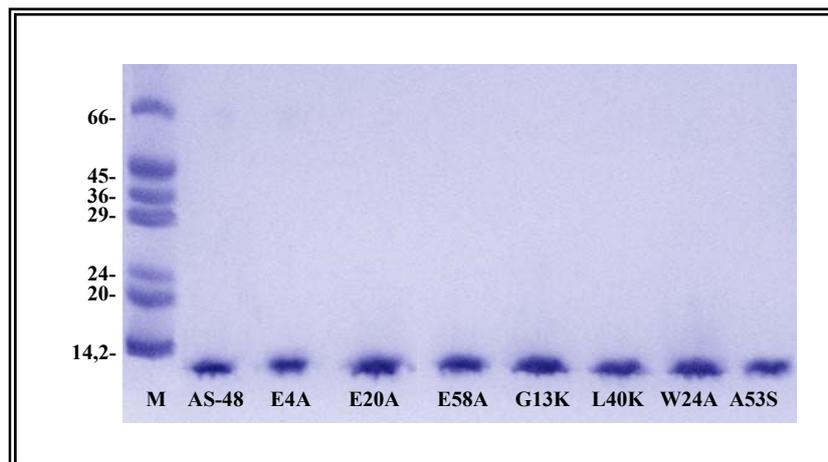


Figura 55. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de AS-48 y de todas las variantes tras su purificación mediante HPLC. Para ello las muestras fueron liofilizadas y resuspendidas en tampón fosfato 50 mM pH 7. El gel fue teñido con azul de Coomassie. M: patrones de peso molecular (kDa).

4.5. Detección de AS-48 y de los mutantes mediante transferencia a membranas de nitrocelulosa y revelado con anticuerpos específicos

Para investigar si las variantes AS-48^M visualizadas en los geles de poliacrilamida eran ser reconocidas por anticuerpos específicos anti-AS-48 (Maqueda *et al.*, 1993), se procedió a transferir las proteínas separadas en el gel a una membrana de nitrocelulosa y a su posterior revelado inmunológico con anticuerpos anti-AS-48 (Western Blotting, apartado 10.3. de Material y Métodos). Los resultados obtenidos (Figura 56) demostraron que todas las bandas transferidas eran reconocidas por los anticuerpos anti-AS-48, indicando que todas las variantes conservaban las características antigénicas de la molécula original.

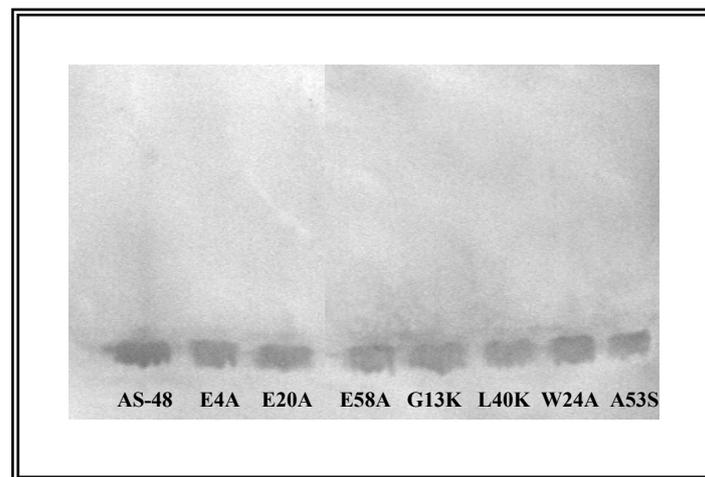


Figura 56. Western blotting de las variantes AS-48^M realizado con anticuerpos específicos anti-AS-48.

CAPÍTULO V**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DIVERSOS AGENTES FÍSICO-QUÍMICOS
SOBRE AS-48 Y LAS VARIANTES AS-48^M OBTENIDAS**

Para establecer las posibles consecuencias de los cambios realizados en AS-48 en relación a su capacidad inhibidora y a la estabilidad de la molécula, se llevó a cabo la valoración del efecto que diversos factores físico-químicos, en especial los que afectan a los sistemas alimentarios, ejercían sobre el comportamiento de las variantes AS-48^M purificadas.

5.1. Características de las variantes AS-48^M

Los coeficientes de extinción molar de las distintas proteínas fueron establecidos de acuerdo con Gill y von Hippel (1989). En la Tabla 19 se muestran los valores obtenidos a 280 nm para AS-48 y todos los mutantes, así como los pesos moleculares teóricos y los pI de cada una de las variantes.

Enterocina	Coeficiente de extinción molar (ϵ_{280})		Pm (kDa)	pI	Asp +	Arg +
	(mg/ml) ⁻¹ · cm ⁻¹	M ⁻¹ · cm ⁻¹				
AS-48	1,771	12660	7149,5	10,50	4	10
AS-48 A53S	1,767	12660	7165,5	10,70	4	10
AS-48 E4A	1,785	12660	7091,5	10,70	3	10
AS-48 E20A	1,785	12660	7091,5	10,70	3	10
AS-48 E58A	1,785	12660	7091,5	10,70	3	10
AS-48 G13K	1,753	12660	7220,6	10,59	4	11
AS-48 L40K	1,767	12660	7164,5	10,59	4	11
AS-48 W24A	0,991	6970	7034,4	10,50	4	10

Tabla 19. Coeficientes de extinción molar, pesos moleculares teóricos y pI de la enterocina AS-48 y de las variantes obtenidas. Se indica el contenido en aminoácidos con carga negativa (Asp y Glu) y positiva (Arg y Lys).

5.2. Formación de asociados moleculares de las variantes AS-48^M

La existencia de asociados moleculares de AS-48 en solución, influenciada por la concentración de proteína, la fuerza iónica y el pH había sido previamente descrita por Abriouel *et al.* (2003). En este estudio interesaba comprobar si en algunas de las variantes AS-48^M se había modificado dicho comportamiento. Para ello, el grado de oligomerización fue investigado preparando soluciones (50 μ M) de las diferentes moléculas AS-48^M purificadas por HPLC y disueltas en tampón fosfato 10 mM a varios pHs (3, 7 y 9). Los posibles oligómeros formados fueron estabilizados tratando las soluciones con formaldehído al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente (apartado 10.4.1. de Material y Métodos), ya que es sabido que el proceso de entrecruzamiento entre el formaldehído y las proteínas permite la formación de enlaces covalentes entre las diferentes formas físicas de la proteína y este agente, y por tanto aumenta su estabilidad en la posterior separación electroforética mediante SDS-PAGE. Como control se empleó una muestra de bacteriocina no fijada.

El revelado de los geles confirmó el marcado efecto que tenía el pH sobre el grado de asociación de todas las variantes: como ocurría en el control, en las muestras entrecruzadas a pH 3, la bacteriocina se encontraba en forma monomérica (7 kDa), sin embargo, a pHs 7 y 9 era patente la presencia de asociados, observándose bandas correspondientes a dímeros, trímeros, tetrameros y pentámeros (Figura 57).

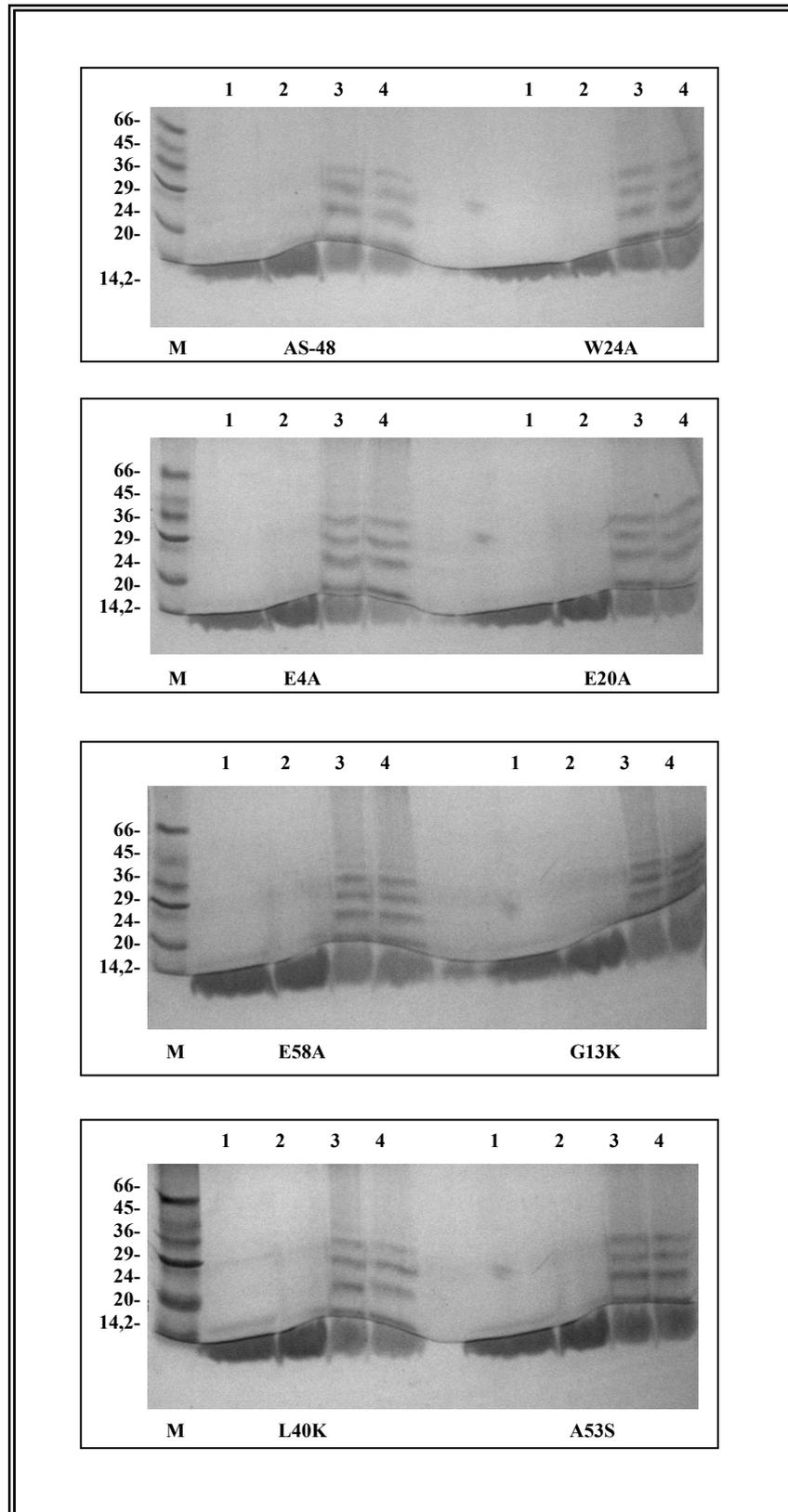


Figura 57. Efecto del pH en el estado de asociación de las moléculas AS-48^M. comparado con el de la molécula nativa, estudiado mediante desarrollo en SDS-PAGE tras su entrecruzamiento con formaldehído al 1%. **1:** control sin entrecruzar; **2, 3 y 4:** AS-48^M entrecruzada a pH 3, 7 y 9 respectivamente.

El peso molecular de las distintas formas oligoméricas se estimó a partir de los pesos moleculares de cada monómero (Tabla 20), y se comparó con el de la proteína estándar presente en el marcador de pesos moleculares empleado.

	AS-48	E4A	E20A	E58A	G13K	L40K	W24A	A53S
Monómero	7149,5	7091,5	7091,5	7091,5	7220,6	7164,5	7034,4	7165,5
Dímero	14299	14183	14183	14183	14441,2	14329	14068,8	14331
Trímero	21448,5	21274,5	21274,5	21274,5	21661,8	21493,5	21103,2	21496,5
Tetrámero	28598	28366	28366	28366	28882,4	28658	28137,6	28662
Pentámero	35747,5	35457,5	35457,5	35457,5	36103	35822,5	35172	35827,5

Tabla 20. Peso molecular teórico (kDa) de los oligómeros presentes en soluciones de AS-48 y de sus mutantes

5.3. Influencia del pH y de la concentración de bacteriocina en la Actividad Biológica. Determinación de la Concentración Mínima Inhibidora (CMI)

Para determinar la influencia del pH y de la concentración de bacteriocina en la actividad biológica de los mutantes, así como para determinar la mínima concentración inhibidora en cada caso, se prepararon soluciones de los mismos a diferentes concentraciones (0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 14 μ M, 28 μ M, 56 μ M, 84 μ M y 167 μ M) tamponadas a pHs 3, 7 y 9. Las muestras así preparadas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 min, y a continuación de cada una de ellas se tomaron 5 μ l para ser ensayados mediante la técnica de las gotas frente a diversas cepas indicadoras, tanto Gram-positivas (*E. faecalis* JH2-2, *E. faecalis* S-47, *B. cereus* LWL1, *B. megaterium* 44, *L. innocua* 4030, *L. monocytogenes* 4032, *S. aureus* 240) como Gram-negativas (*E. coli* U-9, y *S. choleraesuis* LT2).

Como era de esperar, en todos los casos se confirmó un aumento de la actividad antimicrobiana a medida que se incrementaba la concentración de proteína ensayada, y se observó que la actividad era ligeramente superior a pH 3. Los resultados obtenidos con la máxima concentración utilizada (167 μ M en tampón fosfato sódico ajustado a pH 3, 7 y 9),

expresados en función del diámetro de los halos de inhibición aparecidos alrededor de las gotas de AS-48^M y de AS-48 utilizada como control, se muestran en las Tabla 21. Es importante resaltar que ningún mutante presentó actividad frente a *S. choleraesuis* LT2 (resultados no mostrados) y que frente a *E. coli* U-9 los halos de inhibición fueron siempre turbios, incluidos los de la molécula nativa, lo que sugería que la concentración empleada era insuficiente para la completa inhibición de esta bacteria. Los resultados frente a las bacterias indicadoras Gram-positivas fueron, sin embargo, muy diferentes, manteniéndose *Listeria monocytogenes* y *Bacillus megaterium* como las más sensibles frente a AS-48 y sus mutantes y *S. aureus* como la más resistente.

Finalmente, se determinó la concentración mínima inhibidora (CMI) de cada una de las muestras, definida como la mínima concentración capaz de inhibir en medio sólido a las diferentes cepas indicadoras, ensayada mediante la técnica de las gotas. Los resultados obtenidos expuestos de forma detallada en la Tabla 22, se comentan brevemente:

a) Mutante E4A

La CMI de este mutante fue similar a la de AS-48 frente a *L. monocytogenes* 4032 y *B. megaterium* 44, aunque a pH 9 tenía un valor doble, igual que frente a *B. cereus* LWL1, *L. innocua* 4030 y *S. aureus* 240, aunque frente a esta última a pH 7 y 9 fue 10 veces mayor. Por último, frente a *E. faecalis* JH2-2 y S-47 y *E. coli* U-9, la CMI fue 4, 5 y 5,6 veces superior, respectivamente, si bien a pH 7 y 9 fue 10 veces superior frente a JH2-2.

b) Mutante E20A

Su actividad apenas mostró variaciones respecto a la molécula nativa AS-48. De hecho, la CMI fue la misma frente a las dos cepas de *Bacillus*, a *L. monocytogenes* 4032 y a *E. coli* U-9, e incluso frente a *L. innocua* 4030 y las dos cepas de *E. faecalis*, a pH 3 y 7, aunque a pH 9 fue de la mitad. La CMI frente a *S. aureus* 240 tampoco varió a pH 3 pero aumentó 5 veces a pH 7 y 9.

c) Mutante E58A

Mostró una CMI similar a la de AS-48 frente a *B. megaterium* 44, *E. coli* U-9 y *L. monocytogenes* 4032, mientras que para el resto de bacterias indicadoras la CMI fue del doble, excepto frente a *S. aureus* 240, en la que fue 5 y 10 veces superior a pH 3 y a pH 7 y 9, respectivamente.

<i>L. monocytogenes</i> 4032	pH 3	pH 7	pH 9	<i>B. megaterium</i> 44	pH 3	pH 7	pH 9
AS-48	18	18	15	AS-48	17	17	16
E4A	15	15	14	E4A	15	15	14
E20A	19	16	17	E20A	16	15	15
E58A	17	16	16	E58A	15	15	14,5
G13K	22	22	21	G13K	18	17	17
L40K	20	19	19	L40K	18	18	17
W24A	13	13	13	W24A	17	15	15
A53S	19,5	19,5	17,5	A53S	18	18	17
<i>L. innocua</i> 4030	pH 3	pH 7	pH 9	<i>B. cereus</i> LWL1	pH 3	pH 7	pH 9
AS-48	14	13	11	AS-48	11	12	9
E4A	13	12	12	E4A	9	8,5	6
E20A	15	15	14	E20A	16	15	15
E58A	15	15	14	E58A	9	9,5	9
G13K	17	17	15	G13K	13	13,5	12
L40K	18	17	17	L40K	13	11	11
W24A	7	7	7	W24A	10	10	9
A53S	16	16,5	15	A53S	11	10,5	10,5
<i>E. faecalis</i> JH2-2	pH 3	pH 7	pH 9	<i>E. faecalis</i> S-47	pH 3	pH 7	pH 9
AS-48	13	12	10	AS-48	10,5	10,5	8
E4A	10	9	9	E4A	9	9	9
E20A	10,5	11	10	E20A	11	11,5	11
E58A	12	11,5	11	E58A	11	10,5	10
G13K	14	13	13	G13K	13	12	12
L40K	14	12,5	12	L40K	13	13	11
W24A	9	8	6	W24A	2	2	2
A53S	12	12	11	A53S	12	11,5	11
<i>S. aureus</i> 240	pH 3	pH 7	pH 9	<i>E. coli</i> U9	pH 3	pH 7	pH 9
AS-48	8	7	6	AS-48	9	8	5
E4A	7	7	6,5	E4A	9	7	8
E20A	8	8	8	E20A	9,5	9,5	9,5
E58A	6,5	7	6	E58A	9	9	9
G13K	8	7,5	7,5	G13K	11	10	9
L40K	8	7,5	7	L40K	10,5	10,5	10,5
W24A	1	1	1	W24A	8	8	7
A53S	8	7	6	A53S	9,5	10	9

Tabla 21. Diámetro de los halos de inhibición de las muestras purificadas y ensayadas a alta concentración (167µM) en tampón fosfato ajustado a pH 3, 7 y 9.

d) Mutante G13K

La CMI de este mutante fue en términos generales similar a la de AS-48, aunque con matices: así, frente a *B. megaterium* 44, *E. faecalis* JH2-2, *E. coli* U-9, *L. innocua* 4030 y *L. monocytogenes* 4032 la CMI coincidió con la de AS-48, pero frente a *B. cereus* LWL1 llegó a ser de la mitad a pH 7 y 9. Frente a *E. faecalis* S-47 la CMI fue el doble y frente a *S. aureus* 240 fue 5 veces superior a pH 7 y 9.

e) Mutante L40K

Para este mutante, la CMI también coincidió con la de AS-48. Frente a *E. faecalis* JH2-2 y *L. monocytogenes* 4032 la CMI fue doble a pH 7 y a pH 9, respectivamente; frente a *B. cereus* LWL1 la CMI fue la mitad a pH 7 y 9, mientras que para *S. aureus* 240 la CMI fue 5 veces superior a pH 7 y 9.

f) Mutante W24A

El mutante W24A originó halos turbios de inhibición frente a todas las cepas ensayadas, con excepción de *B. cereus* LWL1 y *B. megaterium* 44, frente a las cuales los halos eran nítidos. La CMI de este mutante fue superior a la de AS-48 frente a *E. coli* U-9 (2,8 veces) y frente a *L. monocytogenes* 4032 y *B. megaterium* 44 (28 veces). Frente a *B. cereus* LWL1 fue también 28 veces superior a pH 3, si bien a pH 7 y 9 lo fue 14 veces. Frente a *E. faecalis* JH2-2 y *L. innocua* la CMI fue 56 veces mayor a pH 3 y 7 y 28 veces a pH 9. Por último, la CMI fue 84 veces superior frente a *E. faecalis* S-47 y *S. aureus* 240, aunque frente a este último a pH 3 fue 42 veces más alta.

g) Mutante A53S

La CMI de A53S frente a las distintas bacterias indicadora fue similar a la de la molécula silvestre, observándose un aumento del doble a pH 7 y 9 en algunos casos (Tabla 22). Frente a *S. aureus* 240 la CMI fue 3 veces superior a pH 3 y 10 veces mayor a pH 7 y 9.

Así pues, y de acuerdo con las CMIs de cada muestra, se puede afirmar que la modificación más deletérea para la actividad es la sustitución W24A, que requiere mayores concentraciones para ser activa frente a la mayoría de las cepas indicadoras, con excepción de *B. cereus* LWL1 y *B. megaterium*, seguida de las sustituciones E4A y E58A que, en general tienen una CMI doble a la de la molécula nativa, mientras que los mutantes E20A, G13K,

L40K y A53S conservan una CMI muy similar a la de AS-48 frente a la mayoría de las bacterias Gram-positivas ensayadas.

Bacteriocina	CMI (µM)																										
	<i>E. faecalis</i> JH2-2			<i>E. faecalis</i> S-47			<i>L. innocua</i> 4030			<i>L. monocytogenes</i> 4032			<i>S. aureus</i> CECT 240			<i>B. cereus</i> LWL1			<i>B. megaterium</i> 44			<i>E. coli</i> U-9					
	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH			
AS-48	3	7	9	1	1	2	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	2	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1
	0,5	0,5	1	1	1	2	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	2	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1
E4A	2	5	5	5	5	5	1	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	5	10	10	1	1	2	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1
	2	5	5	5	5	5	1	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	5	10	10	1	1	2	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1
E20A	0,5	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2	5	5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	0,5	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2	5	5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
E58A	1	1	2	2	5	5	1	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	10	10	10	1	1	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	1	1	2	2	5	5	1	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	10	10	10	1	1	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
G13K	0,5	1	1	2	2	2	0,5	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	2	5	5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	0,5	1	1	2	2	2	0,5	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	2	5	5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
L40K	0,5	1	1	1	1	2	0,5	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	2	5	5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	0,5	1	1	1	1	2	0,5	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	2	5	5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
W24A	28	28	28	84	84	84	28	28	28	14	14	14	14	14	14	84	84	84	14	14	14	14	14	14	14	14	14
	28	28	28	84	84	84	28	28	28	14	14	14	14	14	14	84	84	84	14	14	14	14	14	14	14	14	14
A53S	0,5	1	1	1	2	2	0,5	1	1	0,5	1	1	0,5	1	1	10	10	10	0,5	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1
	0,5	1	1	1	2	2	0,5	1	1	0,5	1	1	0,5	1	1	10	10	10	0,5	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1

Tabla 22. Determinación de la CMI de AS-48 y las variantes AS-48^M disueltas en tampón a pH 3, 7 y 9 frente a diversas indicatoras ensayadas en este trabajo

5.4. Estudio de la estabilidad térmica de las variantes AS-48^M y de la influencia del pH en la misma

Con objeto de determinar la estabilidad de los mutantes frente a tratamientos térmicos y su influencia en la actividad biológica de los mismos, se prepararon soluciones 10 μM de las diferentes bacteriocinas purificadas por HPLC y tamponadas en tampón fosfato 10 mM a distintos valores de pH (3, 7 y 9). En el caso del mutante W24A, se empleó una concentración de 100 μM , debido a su baja CMI frente a *E. faecalis* JH2-2. Dichas soluciones fueron calentadas en baño a diferentes temperaturas y durante intervalos de tiempo variables (60 °C, 30 min; 70 °C, 10 min; 80 °C, 5 min y 100 °C, 5 min). Tras el tratamiento térmico, las muestras se enfriaron en hielo, y se ensayaron por la técnica de las gotas, para valorar la actividad biológica residual frente a *E. faecalis* JH2-2.

Como controles positivos se utilizaron soluciones de las bacteriocinas en las mismas condiciones de pH pero mantenidas a temperatura ambiente durante 30 min. Asimismo, los diferentes tampones fueron empleados en el ensayo como controles negativos.

Bacteriocina	pH 3					pH 7					pH 9				
	C	1	2	3	4	C	1	2	3	4	C	1	2	3	4
AS-48	10	9	9	8	8	9,5	9,5	9,5	8	1	8	7	7	6	1
A53S	9	9	9	9	9	8	8	8	8	5	7,5	6,5	6,5	5,5	5
E4A	7	7	6	6	6	8	6	6	1	-	6	-	-	-	-
E20A	8	8	8	8	8	9	8	8	8	5	9	6	6	7	1
E58A	8,5	8	8	7	7	8	7	7	7	5	7	5	5	5	1
G13K	10	10	10	10	10	10	9	9	9	7	8,5	8	6	6	6
L40K	10	10	10	10	10	10	9	8	8	5	9	7,5	7	7	6
W24A	6	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	5	5	5

Tabla 23. Diámetros de los halos de inhibición frente a *E. faecalis* JH2-2 de las variantes AS-48^M (10 μM , 100 μM para W24A) disueltas en tampones a pH 3, 7 y 9 y sometidas a diferentes tratamientos térmicos. C: control sin tratar; 1: tratamiento a 60 °C, 30 min; 2: 70 °C, 10 min; 3: 80 °C, 5 min; 4: 100 °C, 5 min. (-): ausencia de actividad.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 23, se puede afirmar que todas las muestras retenían prácticamente toda su actividad a pH 3, incluso tras los diferentes

tratamientos térmicos aplicados. En realidad, sólo se detectó una pérdida relevante de actividad en algunos casos tras el tratamiento a 100 °C durante 5 min en las muestras que habían sido preparadas a pHs 7 y 9, en los porcentajes que se recogen a continuación:

- a) AS-48:* se observó disminución importante de la actividad (89 %) en las muestras preparadas a pHs 7 y 9 y tratadas a 100 °C.
- b) AS-48 E4A:* a pH 7 se observó una pérdida del 25 % de actividad a 80 °C y una pérdida total a 100 °C. A pH 9 la pérdida de actividad fue total en todos los tratamientos empleados.
- c) AS-48 E20A:* las muestras calentadas a 100 °C perdieron el 56 % de actividad a pH 7 y el 89 % a pH 9.
- d) AS-48 E58A:* se observó una pérdida del 37,5 % de actividad pH 7 en las muestras calentadas a 100 °C, mientras que a pH 9 la pérdida fue del 86 %.
- e) AS-48 G13K:* a pH 7 y 9 se detectó una pérdida del 30% de actividad con el tratamiento a 100 °C.
- f) AS-48 L40K:* las muestras tratadas a 100 °C perdieron el 50% de actividad a pH 7 y el 67% a pH 9.
- g) AS-48 A53S:* la disminución de actividad fue más marcada tras calentar a 100 °C las muestras a pH 7 (pérdida del 37,5% de actividad) y a pH 9 (pérdida del 67 %).
- h) AS-48 W24A:* se observó una disminución ligera de la actividad (aprox. 17 %) en los tratamientos térmicos a partir de 70 °C de las muestras preparadas a pH 9.

CAPÍTULO VI

ESTUDIOS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE AS-48 Y DE LAS VARIANTES AS-48^M

6.1. Espectros de DC en el ultravioleta lejano

Los espectros de DC en la región del ultravioleta lejano (190-260 nm) se recogieron según lo descrito en el apartado 10.5.1. de Material y Métodos, a 25 °C y a una concentración de bacteriocina 10 μ M en tampón fosfato 10 mM, pH 3, condiciones en que la molécula se encuentra en estado monomérico (apartado 4.4. de Resultados). La realización de espectros a otras concentraciones de bacteriocina en las mismas condiciones permitió comprobar que la elipticidad molar no dependía de la concentración de bacteriocina empleada, hecho que también descartaba la existencia de oligomerización en las muestras.

Los espectros de DC obtenidos para la molécula silvestre AS-48 y las variantes AS-48^M se muestran en las Figuras 58 y 59, respectivamente. Su análisis reveló que los valores de elipticidad molar de todas las moléculas eran similares y que todos los mutantes, al igual que la molécula silvestre, estaban bien estructurados en el tampón utilizado y poseían una estructura secundaria en hélice α , tal y como lo indicaba la aparición de valores máximos negativos a 208 y 222 nm y el máximo positivo a 195 nm.

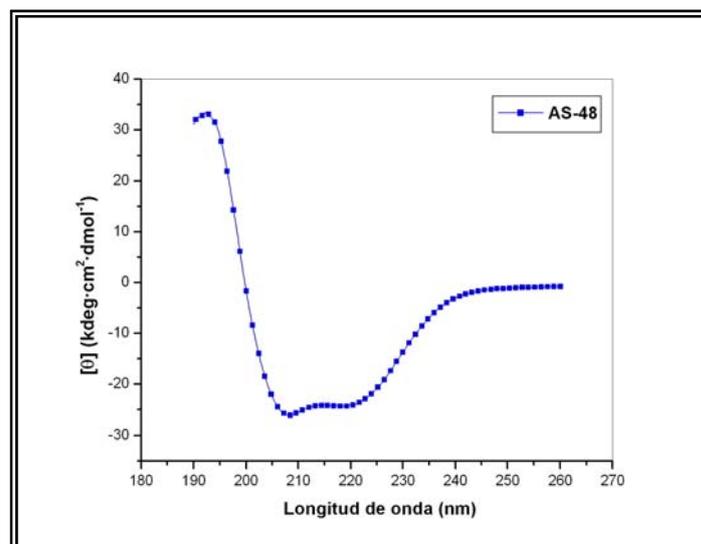


Figura 58. Espectro de dicroísmo circular de la bacteriocina AS-48, realizado a una concentración 10 μ M de proteína en tampón fosfato 10 mM pH 3.

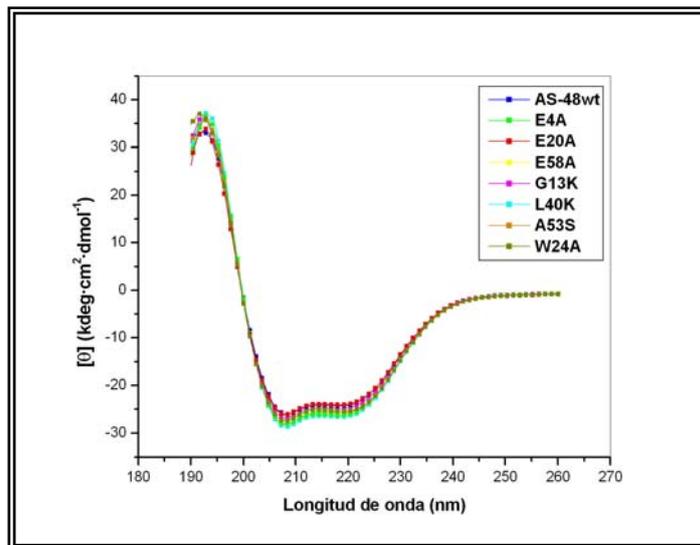


Figura 59. Espectros de dicroísmo circular de la bacteriocina AS-48 y de los mutantes, realizados a una concentración 10 μM de proteína en tampón fosfato 10 mM pH 3.

Cuando se estimó el contenido en hélice α de cada péptido (apartado 10.5.1. de Material y Métodos), se comprobó que todas las moléculas mostraban un alto porcentaje del mismo, con valores similares entre AS-48 y el mutante E20A, si bien este porcentaje es ligeramente superior en los mutantes E4A, E58A, G13K, L40K, W24A y A53S. (Tabla 24).

	AS-48	E4A	E20A	E58A	G13K	L40K	W24A	A53S
θ_{222}	-23356,9	-25284,5	-23252,8	-24632,9	-23944,8	-25704,7	-24839,2	-24987,9
% Hélice α	75,47 %	82,27 %	75,10 %	79,97 %	77,54 %	83,76 %	80,70 %	81,23 %

Tabla 24. Porcentajes del contenido en hélice α de AS-48 y los mutantes (10 μM) en tampón fosfato 10 mM (pH 3.0), calculados según Greenfield *et al.*, (1969) y Wu *et al.*, (1981). θ_{222} : elipticidad molar por residuo a 222 nm.

6.2. Desnaturalización térmica

Las curvas de desnaturalización térmica se realizaron monitorizando el cambio en la señal de DC a 222 nm durante el calentamiento (entre 3 y 98 °C), tal y como se ha descrito en Material y Métodos (apartado 10.5.2.). Se utilizó una concentración de proteína de 20 μ M en tampón fosfato 10 mM (pH 3).

Los espectros de desnaturalización térmica obtenidos no pudieron ser analizados debido a que, por la limitación que presenta el aparato, no se pudo elevar la temperatura más de 98 °C, lo que impidió realizar la desnaturalización completa de la proteína (Figura 60) y por consiguiente obtener la curva que describe el proceso, de cuyo análisis se derivan los parámetros termodinámicos tales como temperatura de desplegamiento de la proteína (T_m).

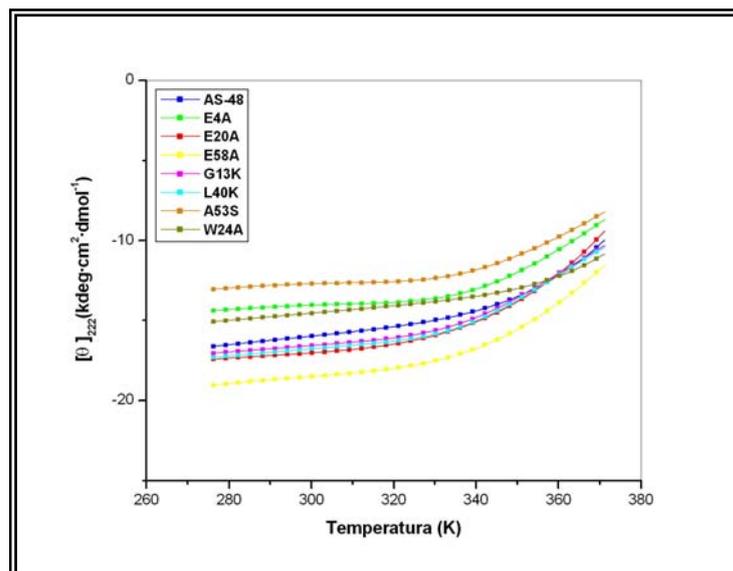


Figura 60. Curvas de desnaturalización térmica de AS-48 (azul) y los mutantes, en las que no se aprecia el estado desnaturalizado a la temperatura máxima aplicada.

Para comprobar el estado de la proteína al inicio y al final del barrido de temperatura, se recogieron espectros de DC en el ultravioleta lejano (de igual forma a lo descrito en el apartado anterior) antes de comenzar el experimento (25 °C), a la temperatura de inicio del barrido (3 °C) y tras finalizar el barrido (25 °C). Los resultados expuestos en la Figura 61 muestran que el contenido en hélice α no se vio afectado por el tratamiento térmico ni en el

caso de AS-48 ni tampoco en el de los mutantes, ya que los espectros antes y después del barrido de temperatura coincidían.

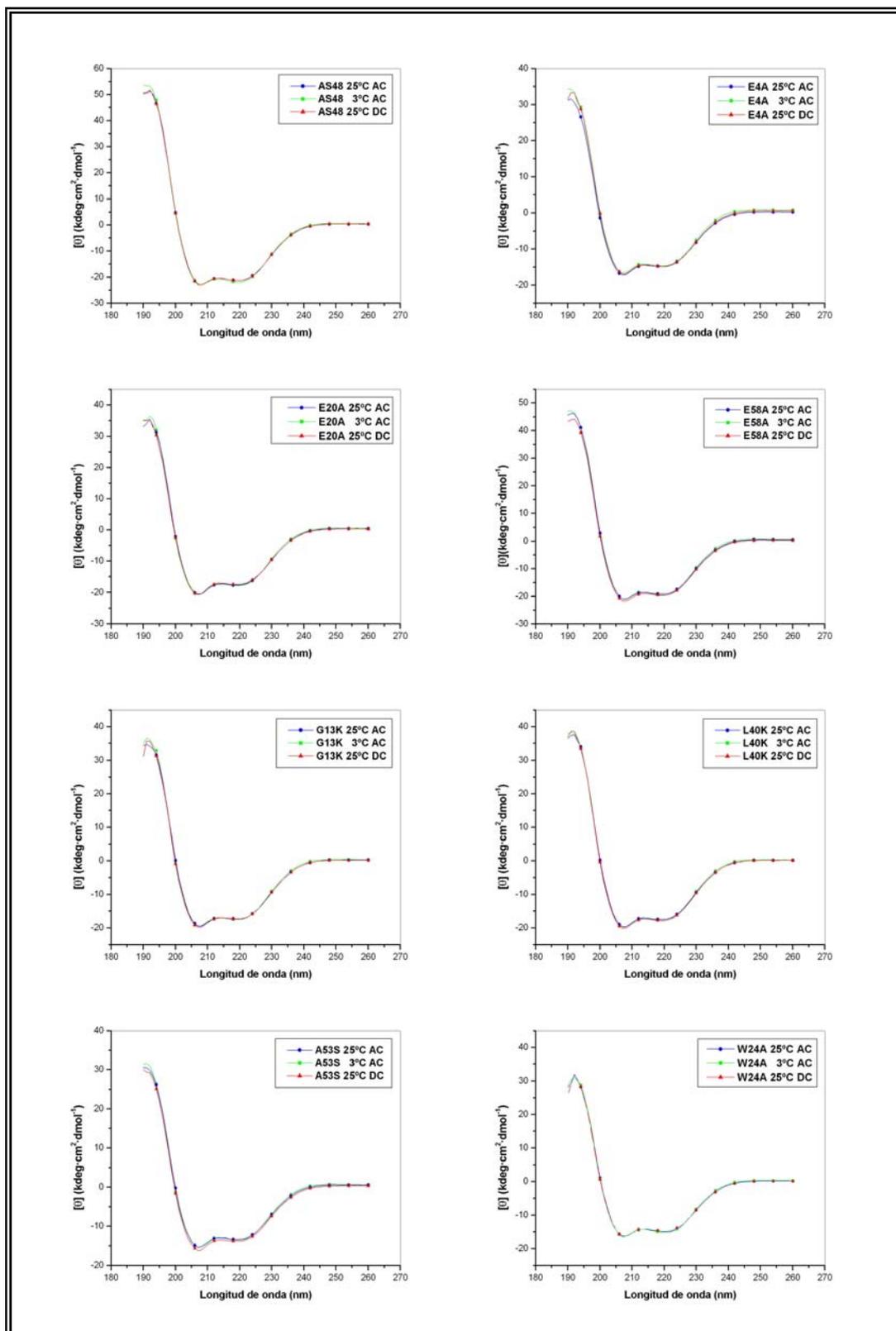


Figura 61. Espectros de dicroísmo circular de AS-48 y los mutantes AS-48^M recogidos antes y después del experimento de desnaturalización térmica. AC: antes de calentar, DC: después de calentar.

6.3. Desnaturalización en presencia de cloruro de guanidinio (GdnHCl)

Las curvas de titulación de AS-48 y de sus variantes en presencia de cloruro de guanidinio se obtuvieron registrando el cambio de elipticidad a 222 nm en cada uno de los espectros de DC tomados a las diferentes concentraciones del agente desnaturalizante. Se hicieron dos tipos de experimentos: uno de desnaturalización y otro de renaturalización siguiendo la metodología descrita en el apartado 10.5.3 de Material y Métodos.

En el caso de las curvas desnaturalización, se preparó, por un lado, una disolución de bacteriocina (10 μ M) en tampón fosfato 10 mM pH 3, sin cloruro de guanidinio, y por otro, una disolución con la misma concentración de bacteriocina y GdnHCl 8 M en tampón fosfato 10 mM pH 3, que fue añadida a la primera de forma que en cada adición la concentración de cloruro de guanidinio fue aumentando pero la concentración de bacteriocina se mantuvo constante gracias a que antes de cada adición se retiró el mismo volumen de muestra de la cubeta. Para las curvas de renaturalización el proceso fue el mismo, pero en la cubeta se depositó una disolución de bacteriocina 10 μ M y GdnHCl 8 M, a la que se le fue añadiendo una solución con la misma concentración de bacteriocina sin desnaturalizante, de modo que en cada adición la concentración de proteína se mantuvo constante mientras que la GdnHCl fue disminuyendo.

Los dos tipos de curvas obtenidas para AS-48 se muestran en la Figura 62. En ellas se aprecia que la molécula alcanza el estado desnaturalizado cuando la concentración de GdnHCl está en torno a 7 M. El estado desnaturalizado de las curvas tanto del proceso de desnaturalización como del proceso de renaturalización coincide, pero no así el estado nativo, que en las curvas de renaturalización muestra unos valores de elipticidad mayores que en el caso de las curvas de desnaturalización.

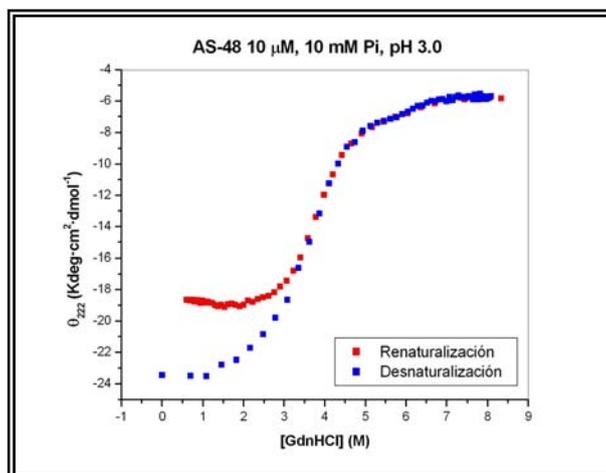


Figura 62. Curvas de desnaturalización y renaturalización en presencia de GdnHCl obtenidas para la bacteriocina AS-48.

También en el caso de los mutantes de AS-48 (Figura 63) se obtuvo este tipo de comportamiento, ya que los estados desnaturalizados del replegamiento y del desplegamiento coincidían, pero no así el estado nativo, que en las curvas de replegamiento no coincidía con el estado nativo antes de realizar la desnaturalización, lo que supone que la transición no es totalmente reversible. La desnaturalización se alcanzó también en torno al 7 M de GdnHCl. En la Figura 64 se muestran agrupadas las curvas de renaturalización y desnaturalización de AS-48 y de los mutantes, siendo lo más destacable el doble salto que en ellas aparece, correspondiente a un estado de transición intermedio, que es más acentuado en las transiciones de los mutantes en relación con la transición de proteína silvestre. Dicho estado intermedio no parece corresponderse con una posible oligomerización ya que, como anteriormente se ha comentado, las curvas obtenidas en ausencia de desnaturalizante y a temperatura constante en la región de UV-lejano no presentan dependencia alguna de la concentración.

Por otra parte, el equilibrio de desplegamiento de todas las muestras se había asegurado tomando puntos a diferentes concentraciones de GdnHCl, tanto de las muestras incubadas con dicho agente durante más de 8 h como de aquéllas sin incubar, sin observarse diferencias significativas entre ambas (datos no mostrados).

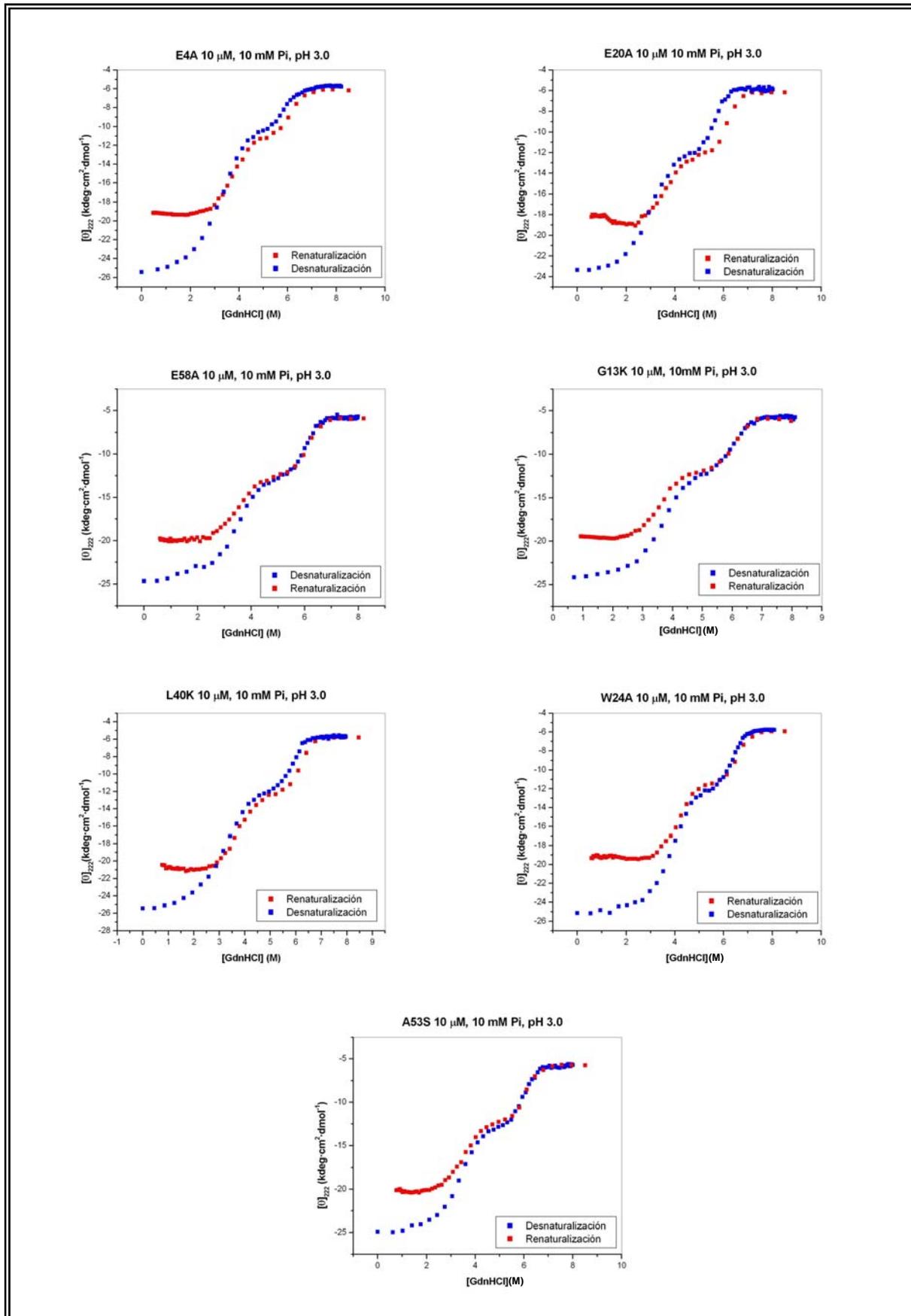


Figura 63. Curvas de desnaturalización y renaturalización en presencia de GdnHCl obtenidas para los mutantes de AS-48.

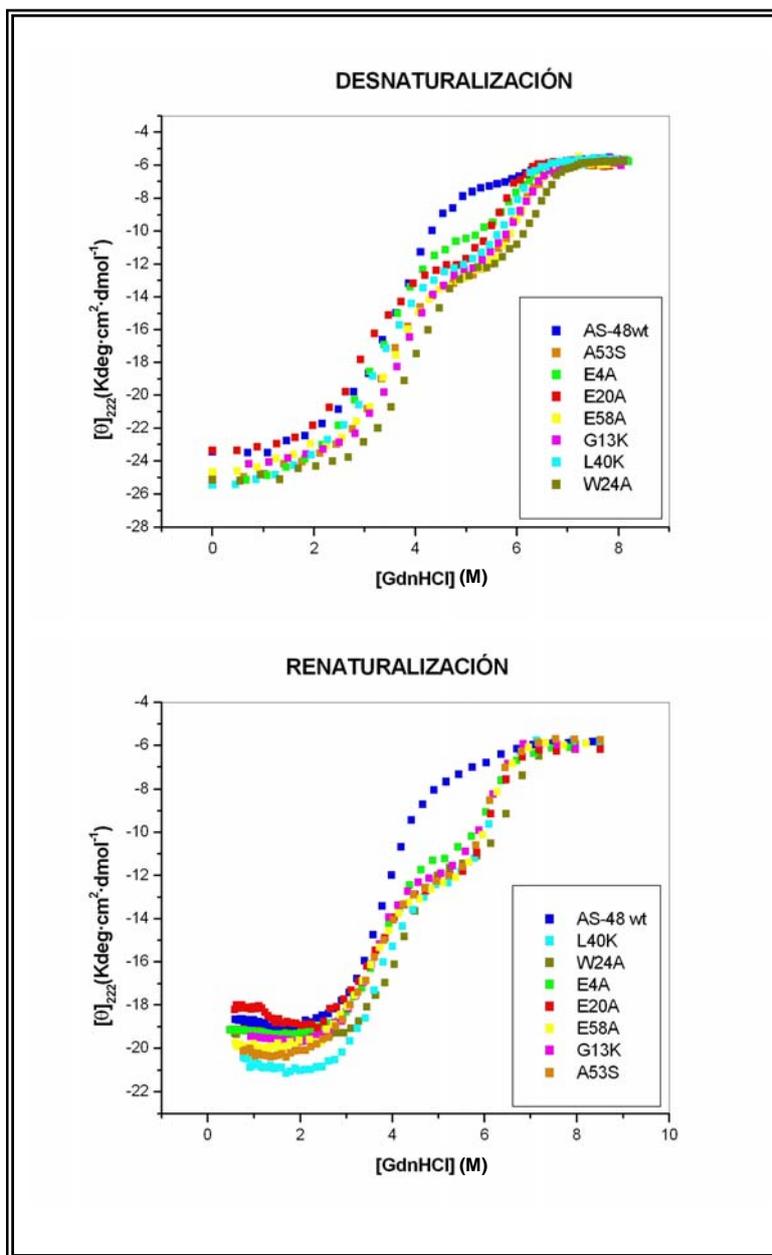


Figura 64. Curvas de desnaturalización (arriba) y renaturalización (abajo) en presencia de GdnHCl obtenidas para los mutantes y para AS-48.

Análisis de las curvas de desnaturalización de AS-48 y los mutantes en presencia de GdnHCl

En la Figura 65 se representan las curvas de desnaturalización obtenidas para AS-48 y para los mutantes, así como el mejor ajuste simultáneo (línea continua) de todas las curvas siguiendo un modelo de equilibrio de tres estados (Pace, 1986; Santoro y Bolen, 1988; Yao y

Bolen, 1995). En todos los casos, se observó una primera transición, correspondiente al paso del estado nativo al estado intermediario, entre 0 y 5 M de GdnHCl, aproximadamente, y una segunda transición, correspondiente al paso del estado intermediario al estado desnaturalizado, aproximadamente entre 5,5 y 7 M de GdnHCl.

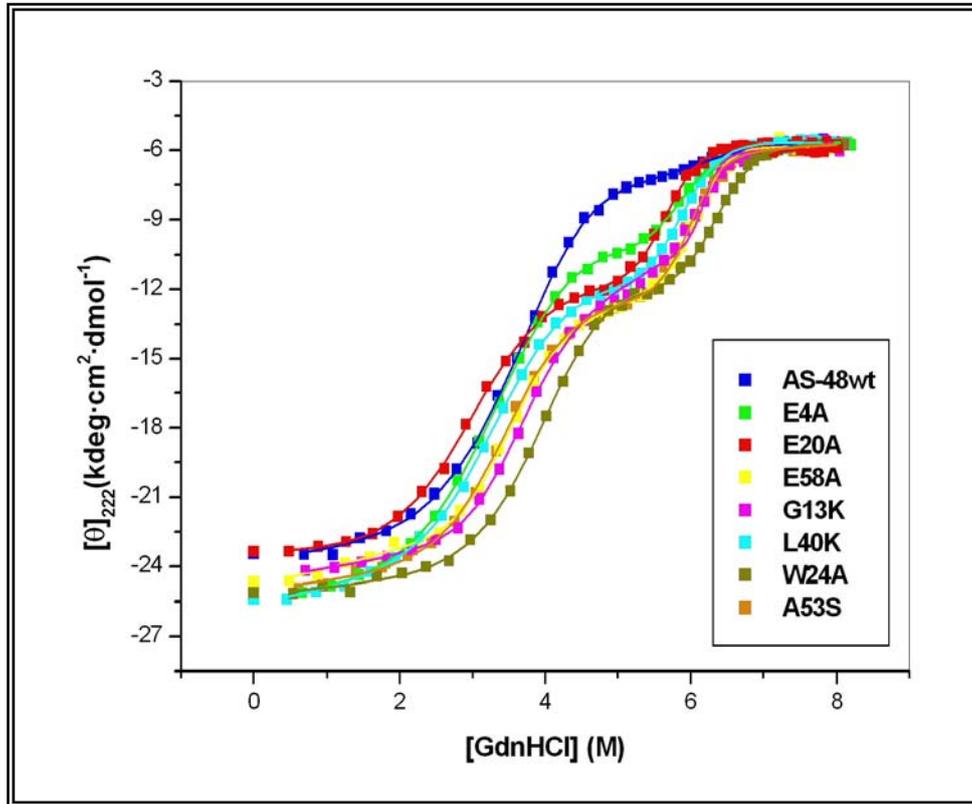


Figura 65. Ajuste de las curvas de desnaturalización con GdnHCl de AS-48 y los mutantes a un modelo de tres estados (línea continua).

En la Tabla 25 se recogen los parámetros termodinámicos que se deducen de este ajuste: los valores de Energía Libre de Gibbs de desplegamiento en tampón fosfato 10 mM, pH 3 para ambas transiciones (ΔG_{wIN}^0 y ΔG_{wDI}^0) (valores de Energía Libre de Gibbs en ausencia de desnaturalizante), los valores de dependencia lineal de la Energía Libre de Gibbs con la concentración de agente desnaturalizante (pendiente de proporcionalidad) (m_{IN} y m_{DI}), parámetro relacionado con el cambio de área expuesta al solvente cuando se desnaturaliza la proteína (Pace *et al.*, 1989; Myers *et al.*, 1996), la Energía libre de Gibbs para el proceso global de desnaturalización (ΔG_{DN}^0), la pendiente de proporcionalidad del proceso global

(Δm), y los valores C_m correspondientes a la concentración de agente desnaturalizante a la que hay un 50% de cada una de las formas presentes en la transición.

Bacteriocina	ΔG^0_{wIN} (kcal·mol ⁻¹)	ΔG^0_{wDI} (kcal·mol ⁻¹)	m_{IN} (kcal·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)	m_{DI} (kcal·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)	C_{mIN} (M)	C_{mDI} (M)
AS-48	3.62±0.09	18.67±7.11	1.01±0.03	2.89±1.09	3.58±0.01	6.46±0.1
E4A	3.28±0.08	11.01±0.77	1.01±0.03	1.84±0.12	3.23±0.02	5.97±0.03
E20A	3.33±0.02	13.98±0.73	1.12±0.04	2.47±0.12	2.98±0.02	5.65±0.02
E58A	3.97±0.16	15.02±0.91	1.14±0.05	2.48±0.15	3.48±0.02	6.07±0.02
G13K	4.61±0.13	12.60±0.58	1.26±0.04	2.08±0.09	3.66±0.02	6.07±0.02
L40K	3.17±0.08	15.71±0.82	0.98±0.03	2.65±0.13	3.23±0.02	5.93±0.01
W24A	4.55±0.12	16.01±0.83	1.17±0.03	2.50±0.13	3.90±0.02	6.41±0.01
A53S	4.06±0.15	13.25±0.75	1.20±0.05	2.21±0.12	3.37±0.02	6.00±0.02

Tabla 25. Parámetros obtenidos tras el ajuste de las curvas a un modelo de tres estados. ΔG^0_{wIN} : variación de energía libre de Gibbs correspondiente a la transición del estado nativo al estado intermediario; ΔG^0_{wDI} : variación de energía libre de Gibbs correspondiente a la transición del estado intermediario al estado desnaturalizado; m_{IN} : pendiente de proporcionalidad entre la energía libre del proceso y la concentración de agente desnaturalizante en la transición del estado nativo al estado intermediario; m_{DI} : pendiente de proporcionalidad entre la energía libre del proceso y la concentración de agente desnaturalizante en la transición del estado intermediario al estado desnaturalizado; C_{mIN} : concentración de GdnHCl a la que hay un 50 % de forma nativa y forma intermediaria en la primera transición; C_{mDI} : concentración de GdnHCl a la que hay un 50 % de forma intermediaria y forma desnaturalizada en la segunda transición.

Bacteriocina	ΔG^0_{DN} (kcal·mol ⁻¹)	Δm	$\theta_{222} N$	$\theta_{222} I$	$\theta_{222} D$
AS-48	15.05	2.88	-23.39±0.09	-6.53±0.12	-5.76±0.04
E4A	7.73	2.74	-25.23±0.08	-9.82±0.16	-5.74±0.03
E20A	10.65	2.67	-23.40±0.08	-11.69±0.12	-5.85±0.03
E58A	11.05	2.58	-24.24±0.09	-12.13±0.17	-5.80±0.03
G13K	7.99	2.41	-23.96±0.06	-11.74±0.14	-5.70±0.03
L40K	12.54	2.70	-25.35±0.07	-11.14±0.13	-5.70±0.03
W24A	11.46	2.51	-24.90±0.06	-11.42±0.12	-5.77±0.03
A53S	9.19	2.63	-24.70±0.08	-12.47±0.15	-5.79±0.04

Tabla 25 (cont.). Parámetros obtenidos tras el ajuste de las curvas a un modelo de tres estados. ΔG^0_{DN} : variación de energía libre de Gibbs del proceso global de desnaturalización; Δm : pendiente de proporcionalidad entre la energía libre del proceso global y la concentración de agente desnaturalizante; $\theta_{222} N$, $\theta_{222} I$, $\theta_{222} D$: valores de elipticidad recogidos a 222 nm para los estados nativo, intermediario y desnaturalizado, respectivamente.

Observando las curvas obtenidas en la Figura 65 y los resultados expuestos en la Tabla 25 se deduce claramente la existencia del estado intermediario, que es más patente en el caso de cada uno de los mutantes en comparación con la forma silvestre. Los mutantes presentan una primera transición con valores C_m entre 3.0 y 4.0 M de GdnHCl, mientras que los valores C_m en la segunda transición oscilan entre 5.6 y 6.4 M de GdnHCl. Como puede observarse en la Tabla 23, en todos los casos la primera transición está más favorecida que la segunda, pues la variación en la energía libre de Gibbs es menor en el primer caso. Los valores de Energía libre de Gibbs para el proceso global de desnaturalización (ΔG_{DN}^0) determinan la mayor estabilidad de AS-48 respecto a los mutantes.

Espectrometría de masas de AS-48

Con el objetivo de corroborar que el intermediario detectado en las curvas no es el resultado de la disociación de posibles formas diméricas en solución, que podrían no haber sido detectadas en los experimentos de entrecruzamiento con formaldehído a pH 3, (apartado 5.2. de Resultados), se entrecruzó con formaldehído una muestra de AS-48 (10 μ M) en las condiciones del ensayo (disuelta en tampón fosfato 10 mM, pH 3). La proteína fue precipitada con ácido tricloroacético (TCA) y analizada mediante espectrometría de masas. El espectro obtenido confirmó que, en estas condiciones, la molécula se encontraba en estado monomérico (Figura 66), lo que permitió descartó la posibilidad de oligómeros que justificaran el comportamiento descrito.

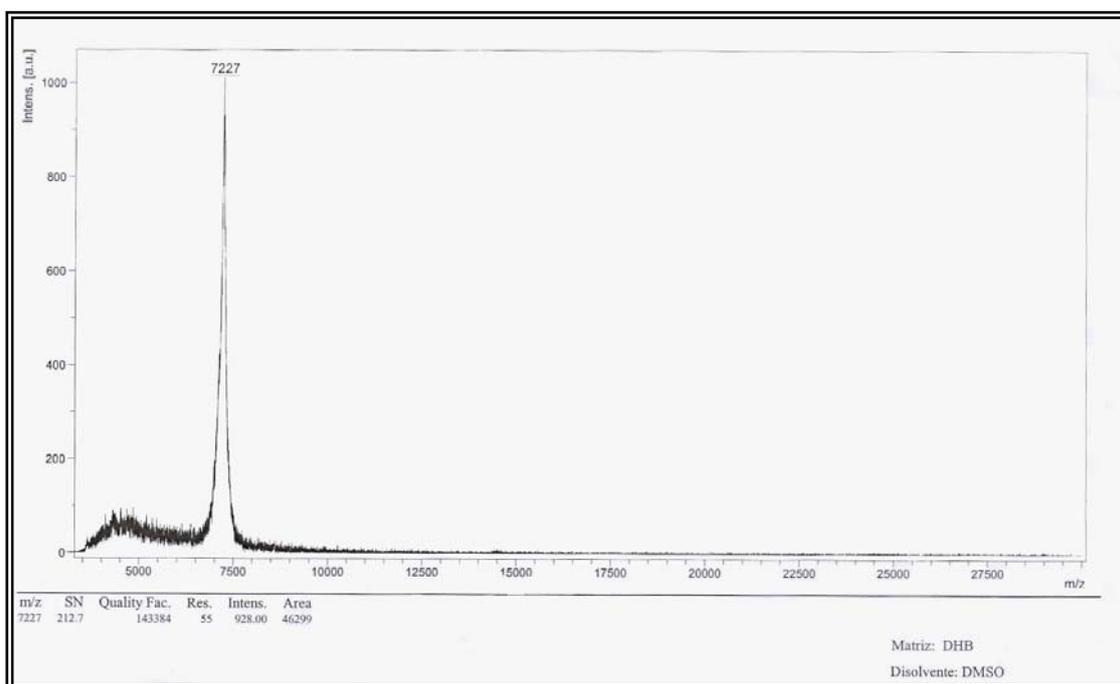


Figura 65. Espectrometría de masas de AS-48 (10 μ M) en tampón fosfato 10 mM, pH 3, entrecruzada con formaldehído al 1 %.

CAPÍTULO VII

PREDICCIONES SOBRE AS-48 Y LAS VARIANTES AS-48^M

La caracterización de las variantes AS-48^M se completó realizando algunos estudios predictivos que pudieran indicar si las mutaciones introducidas podrían haber alterado las propiedades de la molécula silvestre. Puesto que no se disponía de las estructuras de los mutantes resueltas por RMN o difracción de rayos X que pudieran explicar si las diferencias observadas en la actividad biológica obedecían a causas estructurales, se utilizaron algunas herramientas disponibles en la red (ver apartado 11 de Material y Métodos).

7.1. Predicción de segmentos transmembrana

En primer lugar, se planteó si alguna de las mutaciones podría haber afectado al mecanismo de secreción y/o a la ciclación de la bacteriocina. Admitiendo que la ciclación de la molécula de AS-48 siguiera un modelo similar al propuesto para la pilina codificada por el plásmido conjugativo RP4 (Kalkum *et al.*, 2004), se realizó la predicción de los posibles segmentos transmembrana del producto génico completo (105 aminoácidos), incluyendo al péptido líder (35 aminoácidos), ya que algunos de los cambios introducidos podrían distorsionar la situación relativa de las hélices α en la pre-proteína insertada en la membrana citoplasmática, provocando el alejamiento de los extremos e impidiendo la secreción y/o la ciclación.

Las predicciones, realizadas con el programa TMPred (Hofmann y Stoffel, 1993), sugieren la existencia de dos posibles hélices transmembrana (Figura 67): una, que se orientaría desde el interior hacia el exterior de la membrana y que abarcaría los residuos 10 a 28 del péptido líder; y otra, formada desde el exterior hacia el interior de la membrana, que incluiría los residuos 60 a 78 de la molécula (residuos 25 a 43 de la molécula madura, que engloban a las hélices α_2 y α_3).

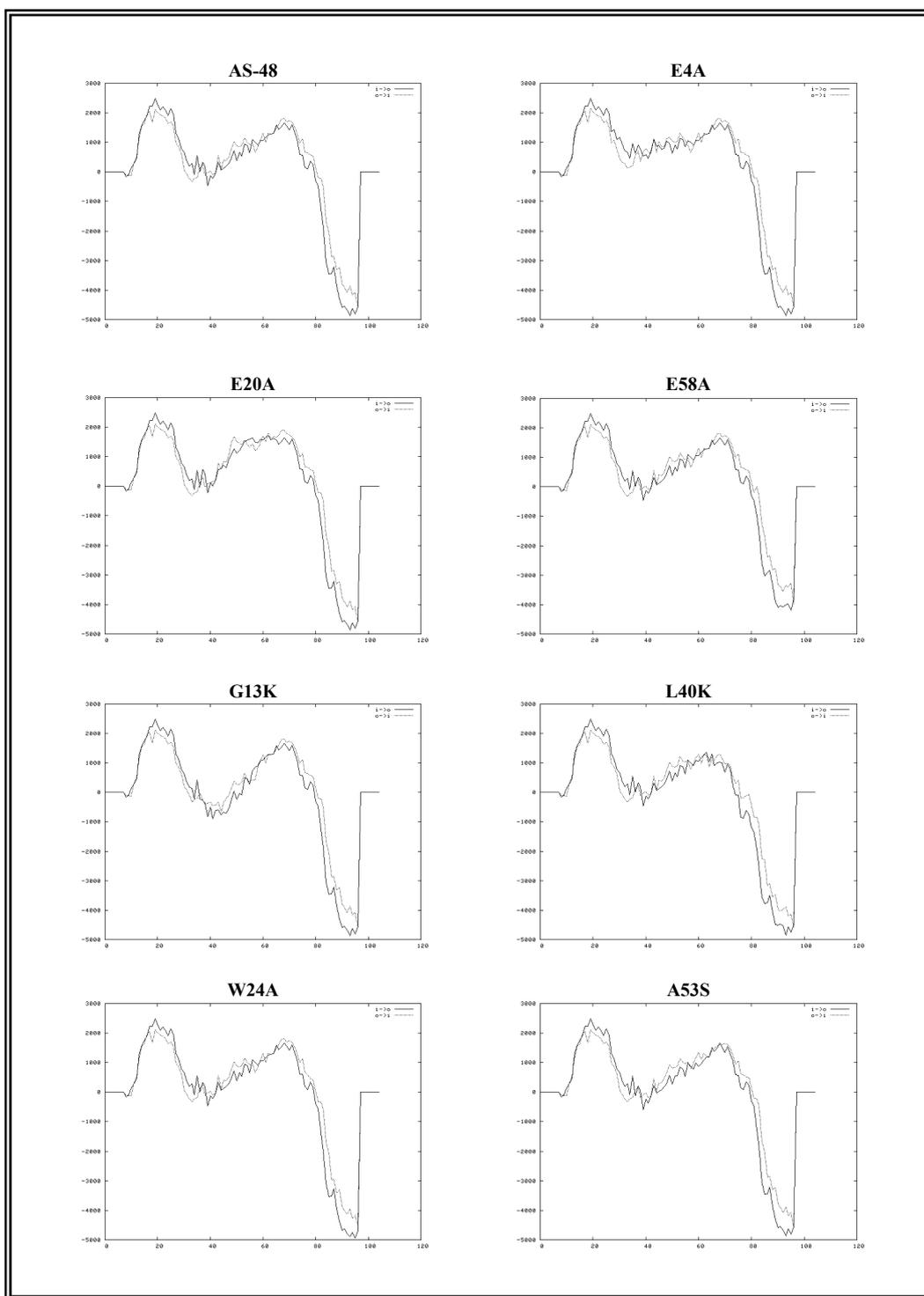


Figura 67. Predicción de segmentos transmembrana en AS-48 y las variantes utilizando el programa TMPred. Se incluye la secuencia del péptido líder en la predicción.

Esta predicción es común para AS-48 y los mutantes E4A, E58A, G13K y A53S, sin embargo para el resto de los mutantes la segunda hélice transmembrana varía ligeramente. Así, en el caso de E20A abarcaría los residuos 53 a 78 (18 a 43 de la molécula madura), en E49A los residuos 60 a 80 (25 a 45), en L40K los residuos 53 a 73 (18 a 38) y finalmente en W24A los residuos 63 a 80 (28 a 45).

7.2. Estudio de la hidrofobicidad y la anfipatía

Las curvas de hidropatía de Kyte y Doolittle (1982) dan información acerca de las posibles regiones expuestas de una proteína, en base a una escala de hidrofobicidad de los diferentes aminoácidos, en la que los valores más negativos corresponden a los aminoácidos más hidrófilos, y los valores más positivos a los aminoácidos más hidrófobos. Utilizando este programa, se analizó el perfil de hidropatía de las diferentes variantes AS-48^M. Se escogió un tamaño de ventana de 9, que es el idóneo para buscar regiones expuestas en proteínas globulares. Los resultados (Figura 68) indicaron que todas las moléculas eran en su mayor parte hidrófobas, pero la presencia de un gran pico negativo en el segmento comprendido entre los residuos 50 y 70, que conforman las hélices α_4 y α_5 , indica la presencia de regiones más hidrófilas. El perfil de hidropatía apenas varió entre las distintas moléculas ni respecto a la molécula silvestre AS-48, por lo que cabe suponer que las sustituciones introducidas no afectaban de forma importante la hidrofobicidad total de la molécula, a pesar de que en algunas de ellas, en particular en G13K y L40K, se había sustituido sendos residuo apolares por uno básico como la lisina.

Para comprobar si las mutaciones introducidas habían alterado la anfipatía de las hélices α , se realizó la representación planar de las mismas (Helical Wheel Projection) utilizando el programa descrito en Material y Métodos, y se comparó con la distribución de los residuos en las hélices α de AS-48 en la estructura descrita mediante RMN (pdb 1e68, González *et al.*, 2000).

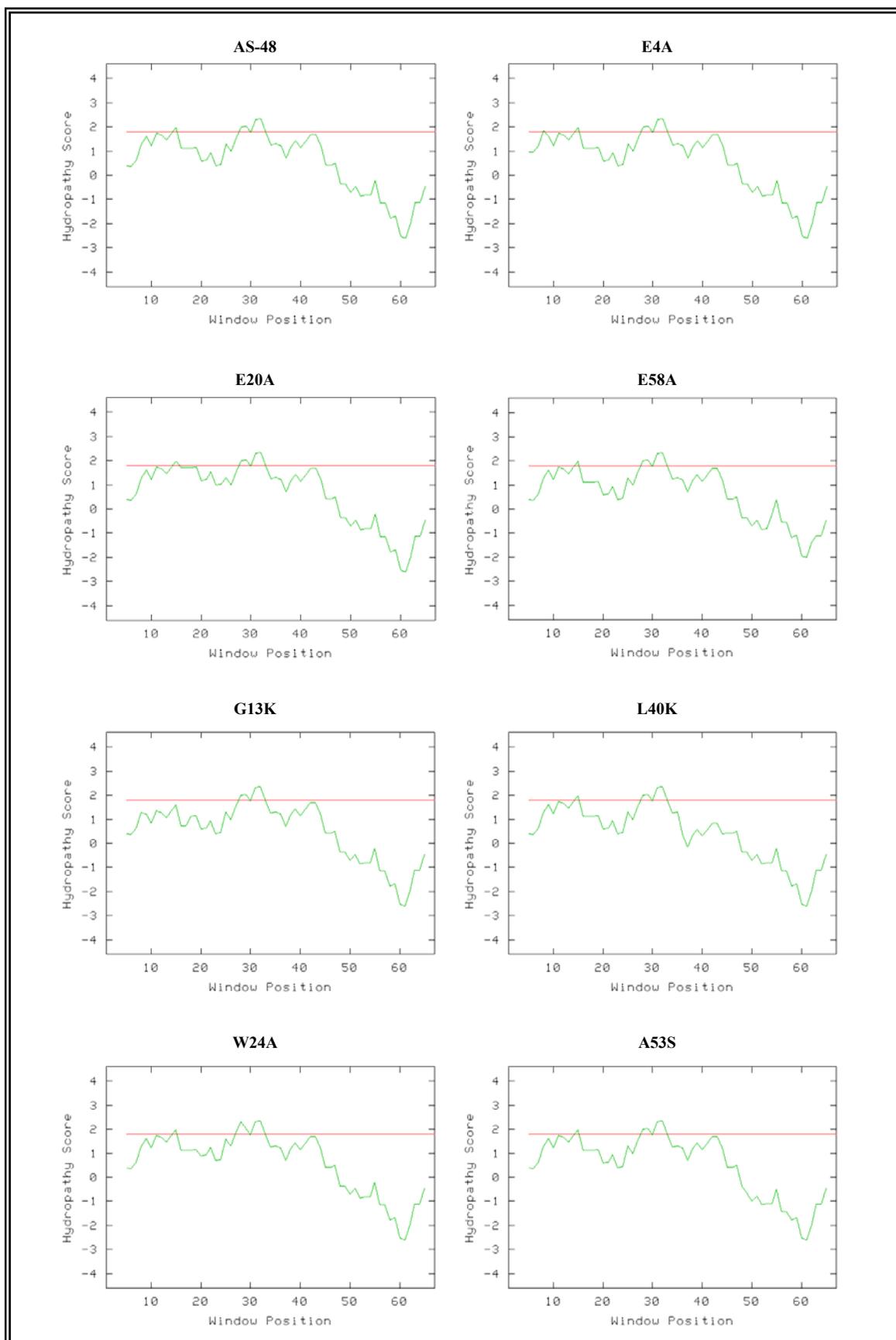


Figura 68. Análisis de la hidrofobicidad de AS-48 y las variantes realizado según Kyte y Doolittle (1982). Los valores negativos y positivos corresponden a regiones hidrófilas e hidrófobas, respectivamente.

La Figura 69 muestra la proyección planar de las hélices, así como los cambios introducidos, excepto para el residuo W24, por estar situado en un giro. La distribución de los residuos en cada hélice coincide con la descrita en la estructura tridimensional de AS-48 (Figura 70). Así, se puede apreciar que las hélices de la molécula son altamente hidrófobas, excepto las hélices α_4 y α_5 , que presentan una acumulación de residuos cargados. Asimismo, se observa que existe anfipatía en las hélices, puesto que los residuos cargados están separados de los no cargados. La introducción de las diferentes mutaciones provocó ligeros cambios en las hélices. Así, el cambio E58A equiparó el número de residuos hidrófobos y no hidrófobos de la hélice α_4 , mientras que los cambios E4A y E20A aumentaron la hidrofobicidad de las hélices α_5 y α_1 , respectivamente. El cambio L40K aumentó la carga positiva en la hélice α_3 , mientras que G13K lo hizo en la α_1 , ambas con un alto contenido en residuos hidrófobos. Por último, el cambio A53S no alteró la carga de la hélice α_4 , puesto que se sustituyó un residuo apolar por otro polar sin carga. En realidad los cambios no afectaron a los residuos hidrófobos que se encuentran orientados hacia el interior de la molécula y contribuyen a su estabilización (González *et al.*, 2000). Por ello, es lógico pensar que las mutaciones no han afectado a la estabilidad global de AS-48.

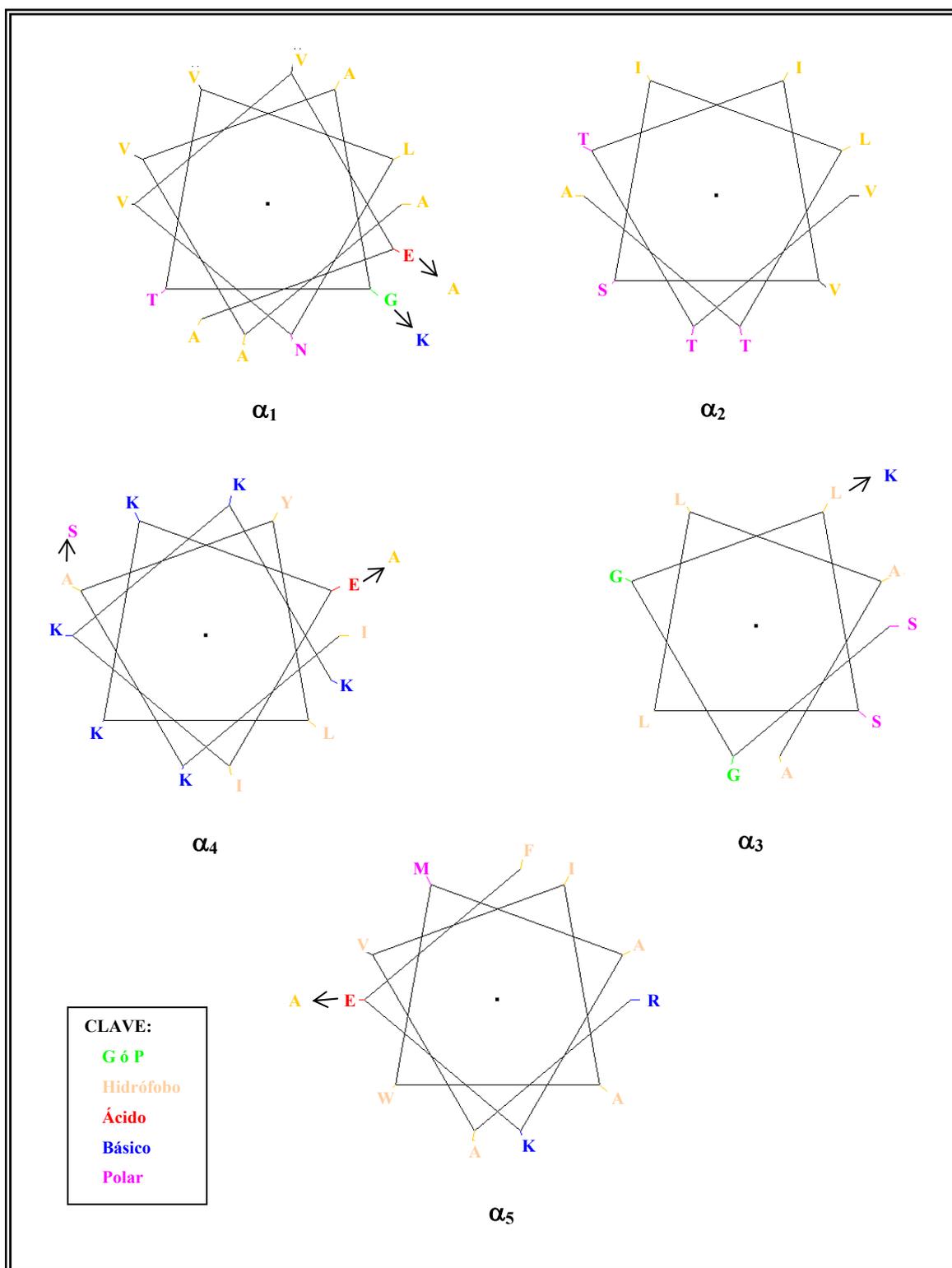


Figura 69. Representación planar de las hélices α de AS-48. Se indican los cambios realizados para obtener los diferentes mutantes, excepto para E49A y W24A, que están situados en los giros.

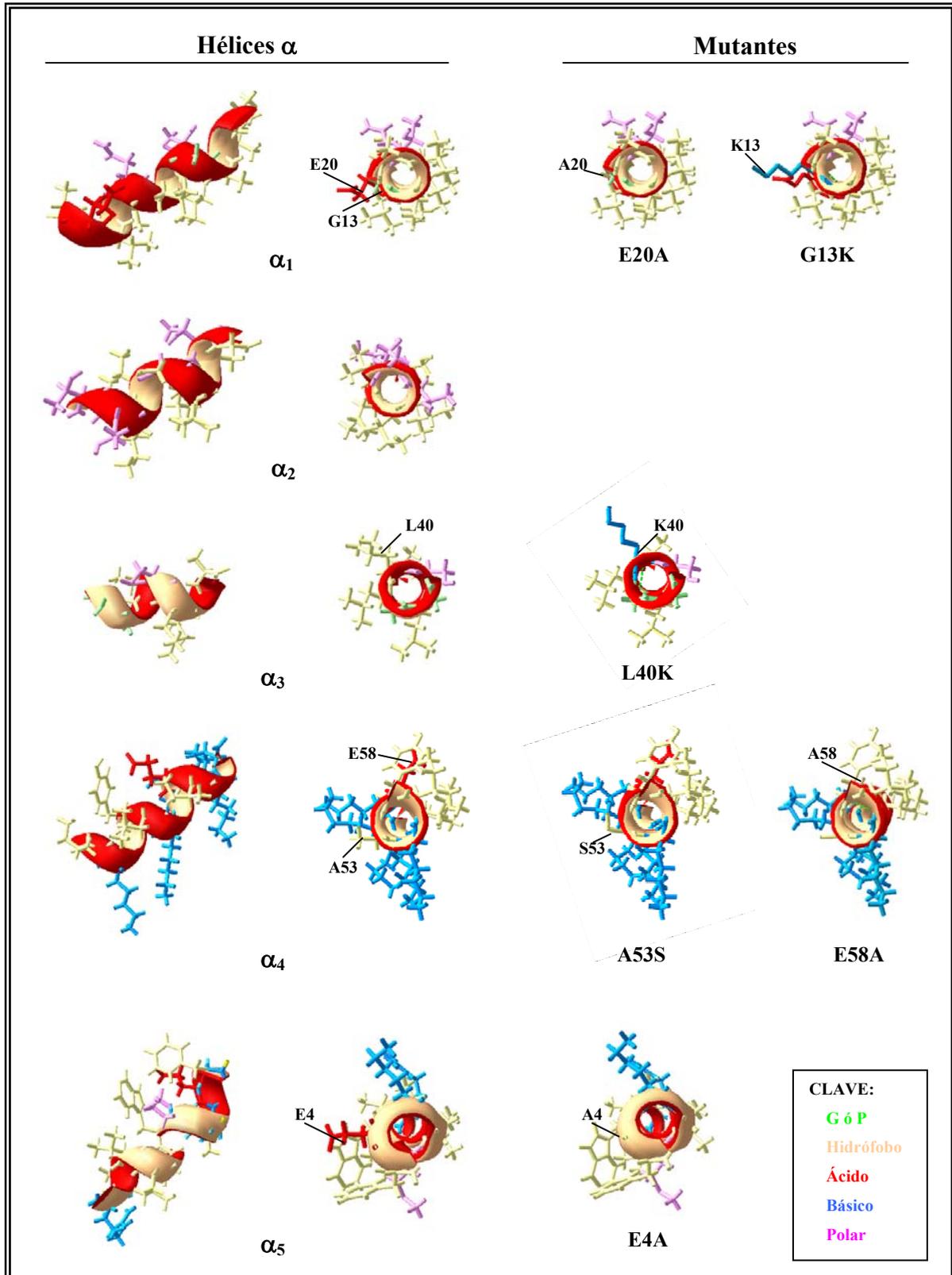


Figura 70. Representación de las hélices α de AS-48 a partir de la estructura descrita mediante RMN (pdb 1e68). A la izquierda se representan lateral y frontalmente las hélices, y a la derecha se indican los cambios realizados para obtener los diferentes mutantes, excepto para E49A y W24A, que están situados en los giros.

7.3. Predicción de agregaciones empleando el programa TANGO

TANGO es un algoritmo desarrollado por Fernández-Escamilla *et al.* (2004) que predice agregación de tipo beta en péptidos y proteínas desnaturalizadas, según su secuencia o las mutaciones introducidas en las moléculas, considerando un conjunto de factores (hidrofobicidad, puentes de hidrógeno, estructura secundaria y carga) para predecir aquellos segmentos que muestran la tendencia a la agregación.

La aplicación de este algoritmo se realizó sobre la secuencia lineal de AS-48 y de los mutantes a los tres pHs ensayados en este estudio (3, 7 y 9) introduciendo los siguientes parámetros: 25 °C, fuerza iónica 0,01 M, 0% TFE.

Curiosamente, los resultados predijeron que existe una zona en la secuencia (aminoácidos 25 a 35, que forman la hélice α_2) con una gran tendencia a formar agregados beta a los tres valores de pH empleados. Este resultado es común para AS-48 y los mutantes E4A, E58A, L40K, W24A y A53S (Figura 71). Sin embargo, en los mutantes E20A y G13K esta tendencia a la agregación se mantiene en los residuos 25 a 35 pero en otros aparece modificada (Figuras 72 y 73).

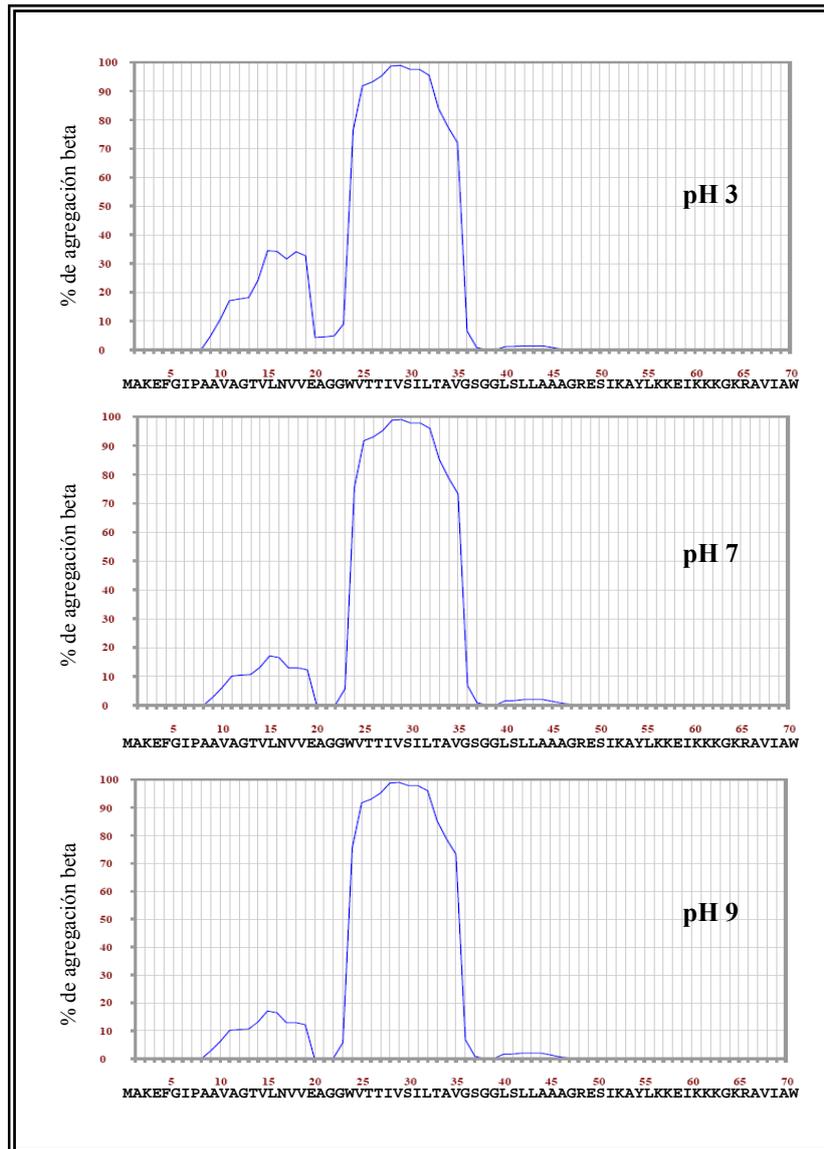


Figura 71. Predicción de la agregación beta de AS-48, E4A, E49A, E58A, L40K, W24A y A53S con el algoritmo TANGO. Se muestra la secuencia de AS-48 como referencia.

En el caso de E20A (Figura 72), la tendencia a la agregación aumenta en los residuos 15 a 24 (que incluyen a la hélice α_1), con valores similares a los tres pHs utilizados.

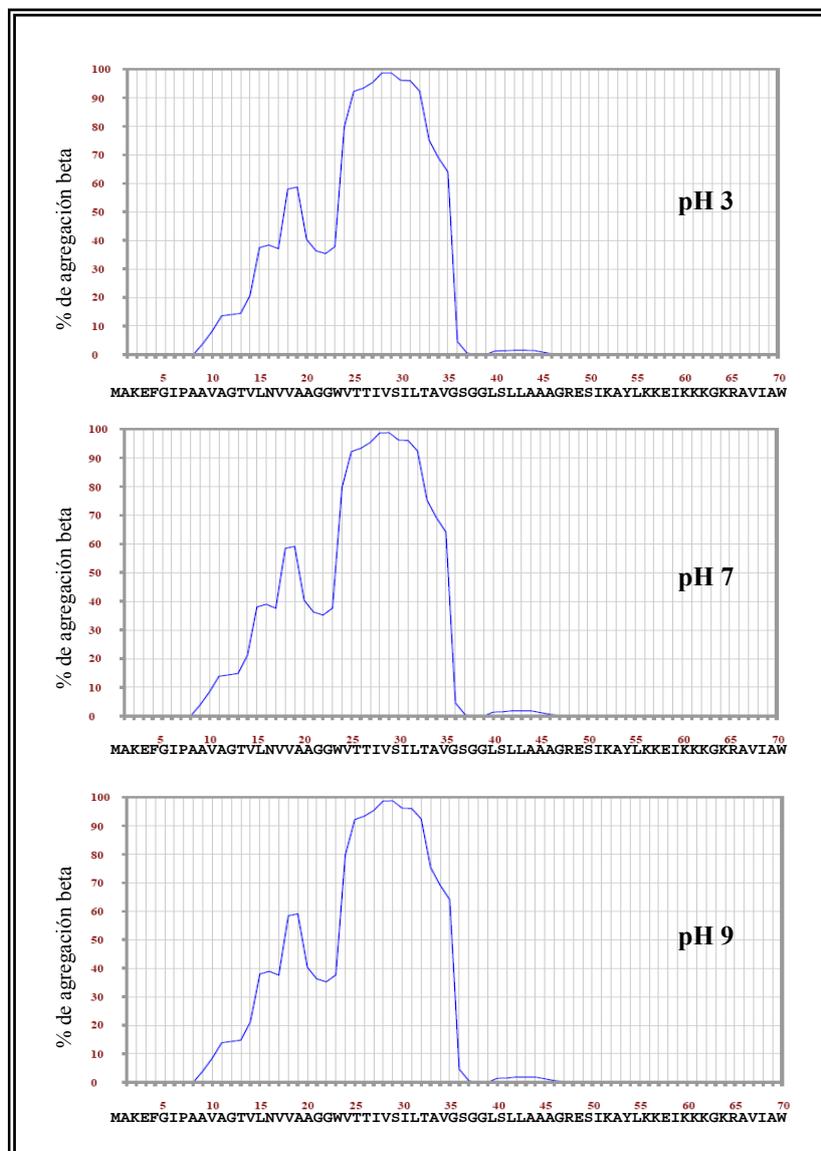


Figura 72. Predicción de la agregación beta de E20A con el algoritmo TANGO.

En cuanto al mutante G13K, hay un notable aumento de la tendencia a la agregación en los residuos 11 a 19 (hélice α_1) a pH 3, que disminuye a pHs 7 y 9 (Figura 73).

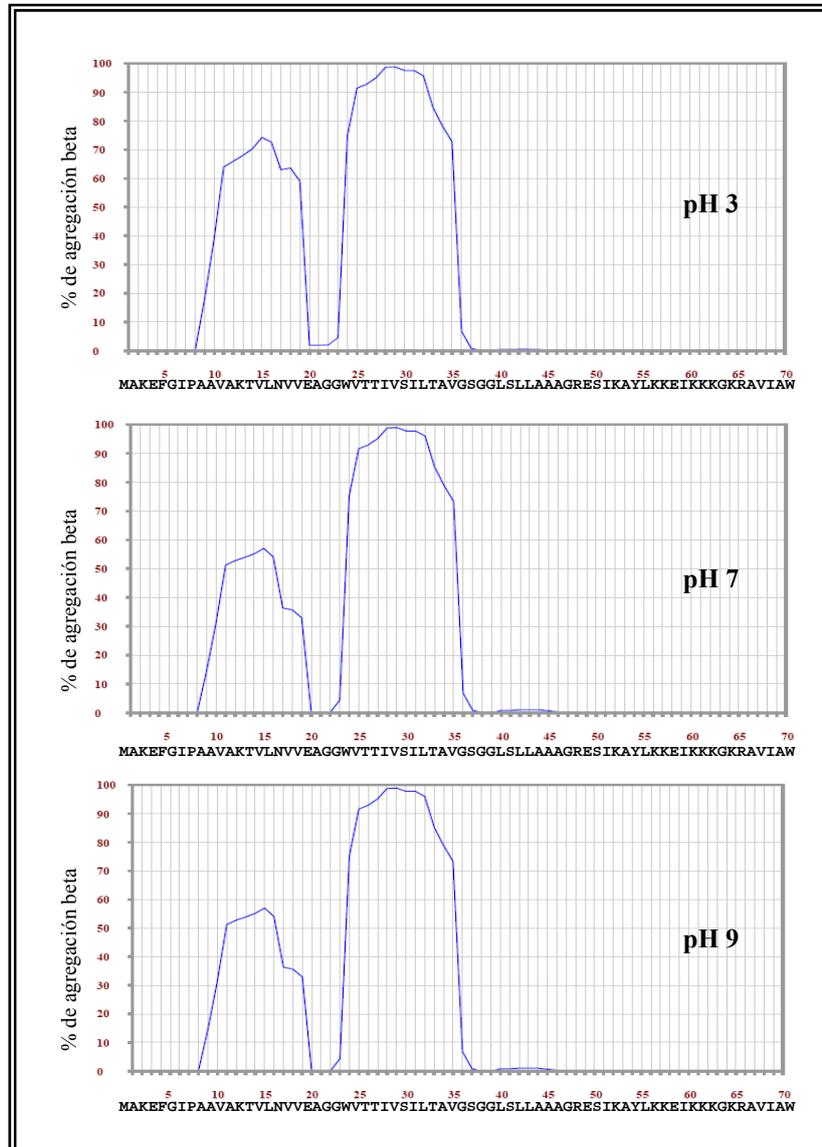


Figura 73. Predicción de la agregación beta de G13K con el algoritmo TANGO.

Discusión

Influencia de la inserción de un sitio XhoI en la región intergénica as-48A-B en la expresión de los genes as-48ABC

El análisis de expresión de la región *as-48* responsable del carácter AS-48, inicialmente localizada en el plásmido pMB2, fue realizado tras su clonación en el vector bifuncional pAM401 (Martínez-Bueno *et al.*, 1998). En aquel trabajo previo se demostró que la región *as-48* estaba organizada en dos operones que se transcribían de forma independiente (T₁ para los genes *as-48ABC* y T₂ para *as-48CIDDIEFGH*) (Martínez-Bueno *et al.*, 1998). Sin embargo, resultados más recientes sugerían la existencia de un promotor interno capaz de dirigir, bajo determinadas condiciones, la expresión independiente de los cuatro últimos genes *as-48EFGH* (Díaz *et al.*, 2003).

El planteamiento del trabajo presentado en esta Memoria fue el diseño de variantes de AS-48, obtenidas mediante sustituciones puntuales en la secuencia del gen estructural *as-48A*, que tuvieran afectada su actividad biológica o la tendencia a la formación de asociados moleculares cuando se encuentran en solución. Para facilitar la manipulación de este gen, era conveniente disponer de sitios de corte único que lo flanquearan, como el sitio *SphI* situado en el extremo 5' del mismo. Por ello se estudió la secuencia de la corta región intergénica (73 pb) existente entre los genes *as-48A* y *as-48B* y se seleccionó la secuencia CAGGAT situada a 22 pb del gen *as-48A*, debido a que bastaba el cambio de 3 bases (CTCGAG) para disponer de una diana de corte único para el enzima *XhoI* (Figura 38).

No se valoraron las posibles consecuencias de este cambio en la producción de AS-48, el cual, una vez que la construcción pAM401-81_X fue obtenida y transferida a la cepa *E. faecalis* JH2-2, determinó un fenotipo visiblemente hipoprodutor, tanto en medios sólidos como líquidos, sin mostrar alterada la capacidad de resistir las altas concentraciones de AS-48 ensayadas. Este resultado inesperado apuntaba claramente a una alteración de la expresión del gen estructural que no afectaba en ningún sentido la del resto de genes.

Ello condujo a realizar un análisis en profundidad sobre un posible mecanismo pos-transcripcional que pudiera regular la expresión de los genes *as-48ABC*, los cuales desempeñan una función imprescindible en la biogénesis de AS-48 (*as-48A* y *as-48B*) y, como ha sido demostrado recientemente, también en la inmunidad (*as-48C*) (Fernández *et*

al., 2006). Fue muy interesante conocer los complejos mecanismos que regulan la expresión de estos tres genes que no responden, como es el caso de otros sistemas bacteriocinogénicos investigados, a la existencia de señales autoinducidas- pequeñas moléculas implicadas en la comunicación celular (*quorum sensing*)- que, en último término, han de ser producidas, liberadas y detectadas por la comunidad bacteriana (Water y Bassler, 2005). El mecanismo de *quorum sensing* dota a la célula de medios para monitorizar la presencia de situaciones muy diversas, modulando la expresión de genes en respuesta a cambios en la densidad de la población. Se trata de una respuesta adaptativa que induce la expresión génica a través de un mecanismo de transducción de señales, como respuesta a la detección de una cierta concentración del autoinductor, que se convierte en una respuesta en cascada para controlar procesos tan diferentes como la bioluminiscencia, la formación de biopelículas, la expresión de factores de virulencia, el inicio de la esporulación o del estado de competencia para la transformación, así como la producción de antibióticos y bacteriocinas. Todos estos procesos requieren la acción concertada de numerosas células de la población para ser eficientes, por lo que ha sido interpretado como una forma primitiva de “multicelularidad” bacteriana (Camilli y Bassler, 2006).

En efecto, una gran parte de las bacteriocinas pertenecientes a la clase I, conocidas como lantibióticos (revisado por Kleerebezem, 2004) o a la clase II no-lantibióticos (revisado por Eijsink *et al.*, 2002) a la cual, según las anteriores clasificaciones pertenecería AS-48, parecen estar reguladas por el sistema de transducción de señales de dos o de tres componentes (Khorchid y Ikura, 2006), en el que siempre interviene una proteína sensora (proteína-kinasa) que, en respuesta a un factor inductor de diversa naturaleza (FI), activa un regulador de respuesta (RR) (Hoch y Silhavy, 1995). Nuestros resultados, sin embargo, demuestran que ambos tipos de proteínas no se encuentran codificadas por ninguno de los diez genes que constituyen la región *as-48* (*as-48ABCC₁DD₁EFGH*), cuyas funciones e implicaciones a nivel celular han sido en su mayoría identificadas (Díaz, 2002; Fernández, 2004; Fernández *et al.*, 2006).

Para comprender la organización transcripcional de los genes *as-48ABC* hay que tener en cuenta que el gen estructural *as-48A* se encuentra precedido por un promotor fuerte (P_A) que contiene las secuencias canónicas TATAAT y TTGctA (regiones -10 y -35, respectivamente), separadas por un espaciamiento de 17 bases que permite la unión

correcta del factor σ de la ARN polimerasa, sin necesidad de activadores. Se trataría por tanto de un promotor constitutivo, capaz, además, de expresarse en *E. coli* (Fujimoto e Ike, 2001). En este trabajo se ha podido confirmar que dicho promotor dirige también la expresión de los genes *as-48B* y *as-48C*, que se encuentran separados de *as-48A* por una corta región intergénica de 73 nt y carecen de secuencias que pudieran ser identificadas como promotoras. Es en esta región, donde la repetición invertida (RI), que había sido inicialmente caracterizada como un terminador ρ -independiente (Martínez-Bueno *et al.*, 1998), ha cobrado su protagonismo al haber sido identificada además, como una diana característica para enzimas con actividad endorribonucleasa, lo que sugiere que podría estar implicada en el procesamiento del ARN policistrónico T_{ABC} . Curiosamente, este largo transcrito T_{ABC} no fue detectable mediante hibridación (Northern Blotting) cuando se realizó el análisis de expresión de los transformantes JH2-2(pAM401-81) y JH2-2(pAM401-81_X). En ellos sólo fue posible encontrar una fuerte señal correspondiente al transcrito T_A (gen estructural), la cual es casi imperceptible en el caso de JH2-2(pAM401-81_X) (Figura 42), lo que de alguna forma permite justificar el fenotipo hipoproducción del mutante.

La primera evidencia de la existencia del operón *as-48ABC* ha sido obtenida mediante RT-PCR realizada en ambos transformantes. La amplificación de la región intergénica *as-48A-B* con el tamaño esperado (420 nt) demostró inequívocamente que los genes *as-48A* y *as-48BC* se están expresando de forma agrupada (Figura 43). Este dato pudo ser finalmente confirmado con los resultados obtenidos en los ensayos de extensión reversa a partir del cebador, al haberse podido demostrar que el extremo 5' de T_{BC} se encuentra localizado en la estructura secundaria predicha para este mensajero con el programa FOLD (Figura 45). Los resultados de RT-PCR en la región intergénica sugieren, además, que el transcrito T_{BC} detectado en el Northern cuando se emplean sondas derivadas de los genes *as-48B* y *as-48C* (Fernández, 2004), debe proceder del procesamiento de un transcrito mayor (T_{ABC}) que, así, podría originar las dos especies T_A y T_1 (T_{BC}) detectadas. Todo ello podría explicar por qué T_{ABC} es tan difícil de observar en los Northern, al tratarse de un transcrito que es rápidamente procesado mediante rotura endonucleolítica mediada por algún tipo de ribonucleasas, a nivel de la estructura secundaria que adopta el mensajero, según lo demostrado en el apartado 2.4 de Resultados.

El análisis de la región intergénica con el programa MFOLD predijo la existencia de la doble estructura secundaria (I y II) expuesta en la Figura 45. En la primera (I) se localizarían los dos sitios de procesamiento (UU) identificados en el análisis de extensión del cebador y en la segunda (II) se encontraría el RBS propuesto para los genes *as-48BC* (5'-AAAGGGGGGC-3') cuya energía libre ($\Delta G = -14,2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) permite una unión más fuerte de lo habitual al ARNr 16S. Se entiende que esto facilitaría el inicio de la traducción cuando el codon iniciador se encuentra enmascarado por la estructura secundaria descrita (Kozak, 2005), lo que ocurre en el caso del gen *as-48A* (Figura 45 C) y también de *as-48B* (Figura 45 B). Es interesante tener en cuenta que el gen *as-48C* carece de un RBS capaz de iniciar su traducción; además, si observamos la organización de estos dos últimos genes, el extremo 5' del gen *as-48C* se encuentra solapado con el final de *as-48B* (Figura 47), lo que en último término sugiere que la traducción de ambos genes se debe producir de forma acoplada, algo, por otra parte, frecuente en algunos sistemas de bacteriocinas en los que este aspecto ha sido investigado, como es el caso de la sakacina Q (Mathiesen *et al.*, 2005).

Es sabido que el procesamiento y degradación de la mayoría de los ARNm requiere la acción combinada de endonucleasas (principalmente del tipo de las RNasas E y III) y 3'-5' exonucleasas (RNasa II y polinucleótido fosforilasa PNPasa) (revisado por Regnier y Adriano, 2000). Las endonucleasas, en particular la RNasa E, son capaces de cortar en varios sitios, determinando la decadencia de los mensajeros, y sus dianas no parecen estar muy definidas aunque se han descrito en *E. coli* secuencias *consensus* como RAU UW (donde R = G o A; W = U o A) localizadas en regiones de cadena sencilla como zonas preferentes (Bouvet y Belasco 1992). La diana de la RNasa III de *E. coli* se ha localizado en un doble giro de la estructura secundaria del ARN (formas RNA-A) y se ha comprobado su existencia en bacterias Gram-positivas del género *Lactococcus*, participando de forma importante en el procesamiento de los ARNs (mensajeros y ribosómicos) así como en su eliminación (Drider y Condon, 2004). Además, se admite que tales enzimas - debido a su importante función en la célula - son necesarias para el procesamiento y eliminación de los ARNs y por tanto deben ser ubicuas (revisado por Regnier y Adriano, 2000). De acuerdo con ello, es probable que en enterococos, enzimas similares a las RNasas E y III, sean las responsables de realizar el procesamiento del largo transcrito T_{ABC} en la doble UU identificada en la estructura secundaria I de la cepa JH2-2(pAM401-81). En el mutante JH2-2(pAM401-81_X) esta

estructura se encuentra distorsionada por los cambios introducidos a ese nivel y la doble U se localiza ahora en la estructura III propuesta (Figura 45 B) con una energía libre mucho menor que en el salvaje (-16,6 frente a -22,4 kcal·mol⁻¹). Ello, en último término, evidenciaría la menor eficacia detectada en el procesamiento de acuerdo con los resultados obtenidos mediante las RT-PCR realizadas para comparar los niveles de ambos transcritos (T_A y T_{BC}) en las construcciones salvaje y mutada (Figura 44). Sin embargo, la especificidad del procesamiento no sólo reside en la estructura que adopte el sustrato, también en la propia secuencia del ARNm, ya que, de acuerdo con los resultados de extensión del cebador (extremo 5') realizados con la finalidad de detectar el sitio de inicio de la transcripción, se observa en el mutante una sola banda con mucho menor intensidad que en la cepa parental (Figura 46A). Todo ello sugiere que el mensajero existe, pero probablemente tenga una vida media más corta incluso que en la cepa no mutada, debido a los cambios provocados por la inserción del sitio *XhoI* en la estructura secundaria del transcrito.

Quedaría finalmente por explicar el mecanismo responsable de que uno de los productos originados durante el procesamiento de T_{ABC} sea más abundante que el otro, ya que resulta fácil asumir que en la célula, la expresión del gen estructural sea requerida en cantidades mayores que la de otros genes de la región *as-48*. Si bien es cierto que el mecanismo de procesamiento propuesto para T_{ABC}, que permite el desacoplamiento de la traducción de los genes *as-48A* y *as-48BC*, sería suficiente para explicar el diferente grado de expresión de los productos codificados, considerando la gran estabilidad del transcrito T_A debida a la estructura secundaria que adopta este mensajero en su extremo 3' en la estirpe salvaje (en el mutante, sin embargo, el cambio de bases realizado impide la formación de tal estructura, siendo previsible que ello redunde en el acortamiento de la vida media de T_A). Se ha descrito, además, que este tipo de estructuras protege del ataque de las 3'-exonucleasas, lo que permite predecir para T_A una vida media larga que aseguraría los niveles adecuados de su producto en la célula. Sin embargo, no se puede obviar una segunda argumentación basada en la existencia de una doble ronda de transcripción desde P_A, gracias a la presencia de la secuencia UUUUUUAAUU localizada en la estructura I descrita en la Figura 45A, que recuerda a un terminador de la transcripción ρ -independiente, aunque débil, que podría actuar como un atenuador (revisado por Merino y Yanofsky, 2005). De esta forma, la región intergénica entre *as-48A* y *as-48B*, además de servir como sitio de

procesamiento, podría facilitar la transcripción independiente de este gen y una lectura limitada y regulada de los genes *as-48B* y *as-48C*, como ha sido propuesto en la regulación de la biosíntesis de la nisina (de Ruyter *et al.*, 1996), lacticina 3147 (McAuliffe *et al.*, 2001) o Pep5 (Pag *et al.*, 1999). Esta segunda hipótesis estaría de acuerdo con el resultado de extensión reversa a partir de cebador presentado en la Figura 46A, en la cual, además de confirmar el punto de inicio de la transcripción localizado a 38 bases del codon iniciador en un residuo de adenosina, pone de manifiesto la presencia de una banda mucho más intensa en la cepa parental que en el mutante, a pesar de la baja fuerza del terminador de T_A calculado de acuerdo con De Hoon *et al.* (2005) (Fernández *et al.*, 2006). Admitiendo pues, la existencia de ambos posibles mecanismos de regulación transcripcional, la célula tendría asegurada la producción del péptido AS-48 y la maquinaria biosintética y de resistencia (*As-48B* y *As-48C*, respectivamente) con la estequiometría exigida para su adecuado funcionamiento.

Características estructurales de AS-48 y diseño de las variantes AS-48^M

AS-48 es un péptido de síntesis ribosómica, que se produce a partir del gen estructural *as-48A* como un pre-péptido de 105 aminoácidos, de los cuales los primeros 35 residuos conforman un péptido señal, que ha de ser escindido para permitir la ciclación/maduración de la molécula (Figura 29). El diseño de variantes funcionales de AS-48, requiere tener en cuenta la necesidad de conservar residuos esenciales en la estabilidad, así como los situados en los extremos por ser necesarios para la maduración, y modificar aquéllos, que, de acuerdo con las características estructurales de AS-48, no alteren la estructura del propéptido (70 residuos, lineal) o impidan su maduración, ni tampoco afecten la estabilidad de la molécula.

La estructura tridimensional de AS-48 resuelta mediante RMN (González *et al.*, 2000), ha permitido conocer que la molécula se encuentra organizada en cinco hélices α , que presentan entre sí un patrón regular de puentes de hidrógeno interno, caracterizado por las interacciones entre el CO de los residuos i y el NH de los residuos $i+4$. Además, algunos de estos puentes están implicados en la estabilización de las cortas secuencias de giros que conectan las hélices α , de forma que los puentes de hidrógeno entre Ala 2 e Ile 7, Val 18 y Gly 23, y Thr 33 y Gly 36 estabilizan las asas de giro existentes entre las hélices α_5 y α_1 , α_1 y α_2 y α_2 y α_3 , respectivamente, y por lo tanto no deberían ser modificados. Finalmente, el único puente de hidrógeno existente entre residuos alejados se ha localizado entre la Phe 5 y la Ser 50 (González *et al.*, 2000). Este tipo de interacciones es, junto a las hidrófobas, una de las más importantes en la estabilización de la conformación de una cadena polipeptídica. También se pudo establecer que la molécula es moderadamente anfipática ya que no todos los residuos hidrófobos se localizan en el corazón de la estructura, sino que muchos de ellos se encuentran expuestos al solvente (Figura 21B).

Por otra parte, cuando uno de los grandes objetivos planteados está centrado en profundizar en la actividad biológica de un péptido catiónico, es de crucial importancia examinar las propiedades electrostáticas de la molécula. Se ha demostrado que AS-48 presenta una interesante acumulación de residuos cargados (8 Lys, 2 Arg, y 4 Glu) en la región comprendida entre la hélice α_4 , el giro entre α_4 y α_5 y la región N-terminal de α_5 (Figura 21A) (González *et al.*, 2000). La existencia de tales residuos (10 de ellos

básicos y situados en un segmento de 26, frente a un total de 70 en la molécula) confiere una alta carga positiva a AS-48, que se incrementa aún más cuando se encuentra a pH 3, ya que en tales condiciones los glutámicos de la molécula se encuentran protonados y aumenta la fuerza de repulsión electrostática, impidiendo la formación de agregados y oligómeros. Un dominio de tales características, pensamos que tenía que ser determinante de su actividad formadora de poros en membranas ricas en fosfolípidos ácidos, como es el caso de las membranas bacterianas.

De hecho, la permeabilización de la membrana, responsable de la muerte celular, ha sido ampliamente aceptada como el mecanismo de acción de numerosos polipéptidos líticos, entre los que se incluye AS-48. La posible función de algunos residuos de la molécula en la actividad de AS-48, se puede deducir de los estudios realizados sobre dos tipos de cristales (DF-I) y DF-II) encontrados en el análisis de AS-48 en solución acuosa (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003). De hecho, se ha planteado que la función molecular de AS-48 *in vivo* implica una transición de la forma dimérica DF-I- soluble en agua y con un fuerte momento dipolar- a la forma dimérica DF-II unida a la superficie de la membrana. Se ha propuesto que en los protómeros de AS-48 los átomos C α de los glutámicos presentes en la molécula definen un plano hipotético que segregaría los residuos cargados positivamente (situados en las hélices α_4 , la región N-terminal de α_5 y el asa que conecta las hélices α_4 y α_5) del resto de los residuos hidrófobos y no cargados que se sitúan en las hélices α_1 , α_2 y α_3 (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003). Ello ha servido para postular que el mecanismo de inserción no depende tanto del potencial de membrana como de la reorganización estructural de la forma dimérica hidrosoluble (DF-I) que, de acuerdo con nuestra hipótesis, podría adoptar la forma de dos capas de hélices hidrófobas (α_1 , α_2 y α_3) situadas en medio de las hélices polares α_4 y α_5 . Esta transición se vería facilitada por el bajo pH existente en la membrana que produciría la protonación de los glutámicos, permitiendo así una efectiva interacción entre las cadenas laterales carboxiladas y las cabezas polares de los fosfolípidos y la estabilización de los dominios hidrófobos de AS-48, que interaccionarían con las cadenas alifáticas de los fosfolípidos. La verdadera inserción en la bicapa se produciría como consecuencia de la acumulación de las cargas positivas que desestabilizaría el potencial de membrana y conduciría a la formación del poro. Obviamente, una conformación anfipática con un alto momento dipolar y la presencia

de segmentos capaces de insertarse en membrana han de ser decisivos para la determinación de su modo de acción.

El análisis de la dimensión fractal en proteínas globulares tiene un importante potencial predictivo en la identificación de sitios funcionalmente relevantes. Ello se fundamenta en la aplicación de algoritmos basados en el cálculo de superficies accesibles al disolvente, que permiten investigar la complejidad del relieve superficial de proteínas globulares, lo cual es considerado determinante para el reconocimiento genérico de sitios funcionales. Por ello, y basado en el estudio realizado con AS-48 sobre posibles sitios de unión a ligandos (Reyes-Zurita y Ramírez-Rodrigo, 2000) se estableció la importancia del residuo A53, que se encuentra situado en el centro de una superficie muy expuesta, formada por los aminoácidos I51, L52, A53, K56 y K57 de la hélice α_4 , y el residuo E20 de la hélice α_1 , y por ende, se supone podría estar directamente implicado en la interacción con sus dianas.

Finalmente, es sabido que determinados residuos aromáticos como el triptófano están directamente implicados en la actividad biológica de péptidos que interaccionan a nivel de membrana, dirigiendo la posición y reestructuración de los mismos durante su unión con la diana. Se ha descrito que estos residuos pueden jugar un papel crucial en la actividad, bien estabilizando horquillas en la molécula implicadas en la interacción o penetrando en el interior de las bicapas lipídicas (Fimland *et al.*, 2002; Padilla *et al.*, 2006). En la molécula de AS-48 sólo existen dos residuos de triptófano, uno situado al inicio de la hélice α_2 , en una corta asa de giro (W24), y el segundo que aparece en mitad de la hélice α_5 (W70), directamente implicado en la formación del enlace peptídico cabeza-cola durante el proceso de ciclación de la molécula.

En consideración a todo lo anteriormente expuesto, se seleccionaron dos grupos de aminoácidos, uno en función de su posible implicación en la actividad biológica (E4, E20, E58 y W24), y otro formado por residuos hidrófobos muy expuestos al solvente (A53, G13 y L40). En todos los casos se han realizado sustituciones drásticas para intentar determinar su influencia en la actividad antimicrobiana y en el grado de oligomerización de la molécula. De esta forma se plantearon los siguientes cambios:

- E4A, E20A, E58A y W24A, en los que residuos polares con carga negativa como los glutámicos de carácter ácido y el triptófano, también de naturaleza

polar pero con grupos no ionizables, serían sustituidos por un residuo no polar como la alanina.

- A53, situado en la hélice α_4 , para el que se propuso un cambio por serina, un residuo polar sin carga neta (A53S).
- Los residuos G13, situado dentro de la hélice α_1 y L40, localizado en la hélice α_3 , ambos apolares y expuestos al solvente, serían sustituidos por un residuo básico como la lisina.

Obtención de las variantes de AS-48 mediante mutagénesis dirigida. Estudio fenotípico

Uno de los principales objetivos del diseño de proteínas es generar moléculas con características nuevas y/o mejoradas, que tengan aplicación práctica en la industria química, farmacéutica o agrícola, o bien sean adecuadas para profundizar en la función de las proteínas o, incluso, sirvan para crear funciones nuevas. 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 en base a un conocimiento predecible de las consecuencias mecánicas y/o estructurales que el cambio produciría. Esta última opción exige un conocimiento amplio de la relación estructura-función en las proteínas que no siempre es suficiente para llevarlo a cabo. Todas son posibles, pero la última aproximación parece ser una de las más interesantes, pues 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 implica disponer de técnicas de ingeniería genética que permitan modificar el ADN en el cual se encuentra la información precisa, para dar lugar a la síntesis de las mismas. Entre las muchas metodologías desarrolladas para llevar a cabo la manipulación de genes, sobresale la mutagénesis dirigida realizada *in vitro*, una técnica que ha revolucionado la química y la bioquímica de proteínas. El objetivo de la mutagénesis dirigida es modificar una proteína cambiando un residuo aminoacídico por otro, eliminando una parte de la proteína (delección) o añadiendo otra (adición). Como punto de partida se requiere disponer del gen estructural que codifica la proteína de interés clonado en un vector para facilitar su manipulación. Las aplicaciones y las consecuencias derivadas de la mutagénesis son muy diversas; permiten tanto establecer la influencia de un residuo en la actividad catalítica, biológica o en el plegamiento de una proteína, como modificar una proteína para que sea inhibida por un determinado compuesto, o por el contrario, hacerla resistente a la inhibición por un compuesto dado, o incluso, diseñar proteínas más estables térmicamente o con especificidad por un sustrato.

Además de las características estructurales y biológicas de AS-48, ampliamente comentadas en la Introducción de esta Memoria, sobresalen sus cualidades biotecnológicas, que auguran un futuro muy prometedor para esta bacteriocina como conservante natural de alimentos, cuya aplicación como aditivo o como cepa productora bien como cultivo iniciador o protector, se prevé de gran utilidad a la hora de aumentar la vida útil de los alimentos e incrementar la calidad higiénica de los mismos (Abriouel *et al.*, 1998; Ananou *et al.*, 2004 a,b,c; Muñoz *et al.*, 2004, 2005). A todas estas características, hay que añadir el hecho de que, al ser una proteína de síntesis ribosómica su secuencia está dictada directamente por el gen *as-48A*, flanqueado ahora por dos sitios de corte únicos (*SphI* y *XhoI*) en la construcción pAM401-81_X, lo cual permite su manipulación mediante ingeniería genética para obtener los mutantes propuestos (AS-48^M).

Para ello, en todos los casos, se adoptó la técnica de mutagénesis dirigida mediante PCR inversa, empleando como ADN molde la construcción pGEM-T_{as48A-X}, en la que el gen estructural se encuentra flanqueado por los dos sitios de corte único (*SphI* y *XhoI*), y utilizando las diferentes parejas de oligonucleótidos diseñadas, con la mayor parte de sus secuencias complementarias al gen *as-48A*, salvo en la región que contiene la mutación (Tabla 8). Una vez obtenidos los productos de reacción y confirmado que contenían las secuencias deseadas, la expresión fenotípica de los mutantes exigía su clonación junto al resto de determinantes genéticos necesarios para la maduración, exporte e inmunidad frente a las variantes AS-48^M. Para ello se diseñó un sistema que permitía la sustitución del fragmento *SphI-XhoI* en pAM401-81_X, que contenía el gen original, por los genes equivalentes construidos en las diferentes PCRs inversas, originando las construcciones pAM401-81_{X-Mut}. Todas las construcciones así obtenidas fueron finalmente transferidas a *E. faecalis* JH2-2, la cepa elegida de *Enterococcus* por carecer de plásmidos, para, una vez expresadas, investigar las características biológicas y físico-químicas que les confiriera la mutación introducida.

Se había contemplado la posibilidad de que las variantes diseñadas en este trabajo produjeran AS-48 con menor efectividad, como ha sido descrito en otros péptidos antibacterianos modificados genéticamente, caso de la mersacidina (Szekat *et al.*, 2003), Pep5 (Bierbaum *et al.*, 1996), epidermina o nisina (Kuipers *et al.*, 1996). En estos trabajos se afirma que las variantes de estos lantibióticos se producían más lentamente y con un rendimiento final inferior al de la molécula original. Dicho

comportamiento era fácilmente justificable ya que la mayoría de los cambios introducidos afectaban negativamente la actividad de enzimas implicados en las modificaciones postraduccionales que estos lantibióticos requieren para madurar (Szekat *et al.*, 2003).

En el caso de las variantes de AS-48 obtenidas, se partía además de una situación aún menos ventajosa, ya que la inserción del sitio *Xho*I determinaba una importante reducción en la capacidad productora frente a las especies bacterianas empleadas como indicadoras (Figura 40), siendo incapaz de inhibir a la cepa CECT 240 de *S. aureus*, una de las más resistentes de las ensayadas frente a AS-48, por lo motivos antes comentados. A pesar de ello, y considerando la dificultad y complejidad del trabajo realizado, se decidió proseguir con la construcción pAM401-81_X en la expresión de las variantes, ya que mantenía la capacidad de producir AS-48 aunque con menor eficacia.

Cuando se comparó el espectro de inhibición de las variantes con el de la cepa pAM401-81_X tomada como referencia, valorando la producción directa de las mismas sobre medio sólido BHA, se encontró que, en las condiciones del ensayo, la presencia de alanina en el lugar de los residuos E4, E20, W24, determinaba la ausencia de actividad frente a prácticamente todas las bacterias ensayadas, incluidas las más sensibles, *L. monocytogenes* y *L. innocua* (Figura 50, Tabla 13). Sólo en el caso de la cepa 44 de *B. megaterium*, la variante W24A retuvo parte de su capacidad inhibidora (11 mm). En este estudio se ha podido valorar la gran sensibilidad de esta bacteria frente a todos los mutantes, salvo en el caso de E4A y E20A que prácticamente carecían de actividad frente a ella (Tabla 13). Esta gran susceptibilidad puede ser debida a la existencia de una cápsula gluco-polipeptídica en *B. megaterium*, cuyas propiedades electrostáticas de superficie pueden ser determinantes de tal comportamiento y también influir en la resistencia frente a tres de los cuatro cambios introducidos en los glutámicos. De hecho, la sustitución E58A, aunque conserva actividad frente a *B. megaterium*, es comparativamente menor (12 frente a 19 mm) que en el resto de las variantes activas. Por el contrario, los cambios que menos parecen afectar la actividad antibacteriana son A53S, G13K y L40K, con halos de inhibición muy similares a los del control, salvo en el caso de *S. aureus* y *Bacillus cereus* LWL1. Finalmente, la sustitución E58A confiere a la molécula producida *in vivo* una capacidad inhibidora intermedia, solo ausente frente a *B. cereus* LWL1. Como era de esperar, de acuerdo con

la falta de actividad del control JH2-2(pAM401-81_X), el ensayo directo de los sobrenadantes de las cepas mutantes no mostró actividad detectable frente a *S. aureus* CECT 240 y tampoco ninguna sustitución determinó incremento en la actividad. Estos resultados confirmaban el carácter hipoprodutor de las cepas mutantes, ya que cuando los ensayos se hicieron con muestras purificados, el espectro de inhibición obtenido fue muy diferente y variable en función de la muestra y la cepa utilizada.

Se comprobó, sin embargo, que todos los mutantes, incluido JH2-2(pAM401-81_X), retenían el nivel máximo de resistencia de la cepa salvaje, establecido en 18µg/5µl. La explicación a este comportamiento se obtuvo al realizar el análisis de expresión de los genes *as-48ABC*. En efecto, los niveles de transcripción de los genes *as-48A* (T_A) y *as-48BC* (T_{BC}) en JH2-2(pAM401-81_X) fueron analizados mediante RT-PCR que, aunque es una técnica semicuantitativa, permite su comparación (Figura 44). Los datos demostraron en el mutante un bajo nivel de expresión para T_A (que explica el fenotipo hipoprodutor) y una banda intensa y detectable con menor número de ciclos para T_{BC}, con niveles superiores a los de la cepa parental JH2-2(pAM401-81). En este resultado parece residir la clave para explicar la alta resistencia de JH2-2(pAM401-81_X) y, por extensión, de los diferentes mutantes obtenidos que después se comentará, ya que un fenotipo completamente resistente debe requerir la expresión de todos los determinantes genéticos involucrados en la resistencia frente a AS-48, a saber, el producto de los genes *as-48D₁*, *as-48EFGH* y *as-48C* (Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2006).

El análisis de estos resultados a nivel celular y desde una perspectiva funcional de los productos codificados, refuerza las razones para la transcripción conjunta de los genes *as-48ABC*. En trabajos previos había quedado demostrado el papel fundamental de los genes *as-48A* y *as-48B* en la biogénesis de AS-48, ya que el primero era el gen estructural y la interrupción del segundo anulaba su producción, mientras que la del gen *as-48C* con un fenotipo hipoprodutor, provocaba además una importante reducción en los niveles de resistencia frente a AS-48 (< 70%) (Díaz, 1999; Fernández *et al.*, 2006). La importancia de su co-expresión con el gen estructural posiblemente radique en su capacidad para preservar a la célula productora de los posibles efectos deletéreos que las moléculas de AS-48 recién sintetizadas pudieran provocarle, antes de que el resto de la maquinaria de la inmunidad (*as-48D₁* y *as-48EFGH*) que se encuentra situada en un operón independiente (T₂) pueda ser funcional (Díaz *et al.*, 2003; Fernández, 2004).

Purificación y detección de las variantes AS-48^M

El protocolo seguido para purificar a homogeneidad las diversas moléculas de AS-48 mutadas, junto a la molécula nativa AS-48 utilizada como control, ha sido una adaptación del establecido previamente por nuestro Grupo de Investigación (Gálvez *et al.*, 1989a; Abriouel *et al.*, 2003). Éste consta de un paso de cromatografía de intercambio catiónico, empleando una matriz débilmente cargada (CM25), seguido de dos pasos de cromatografía de fase reversa sobre C18, el último, empleando cromatografía líquida de alta resolución (RP-HPLC). Las únicas diferencias con el procedimiento previamente estandarizado fueron impuestas por la menor producción de los mutantes que obligó a partir de mayores volúmenes de cultivo (12 litros frente a 5), a cambiar el tiempo de incubación utilizado (7 h en los mutantes frente a 12 h en la cepa salvaje) y a modificar las proporciones del cultivo con el CM25 utilizadas en el intercambio (1/40 frente a 1/60) y los volúmenes de las muestras sometidas a la fase reversa en C18 (75 ml frente a 50).

Como ya se ha mencionado, un problema con el que previsiblemente nos podríamos encontrar es que no fuera posible la detección y por tanto el seguimiento del proceso de purificación de alguna de las proteínas mutadas por el procedimiento habitual, basado en ensayos de actividad frente a una cepa indicadora. Por ello, todas las fracciones eluidas en las condiciones normalizadas y recogidas en los diferentes pasos de cromatografía, tuvieran o no actividad, fueron conservadas a -20 °C para proceder a su concentración y repurificación en etapas sucesivas. Salvo que se diga lo contrario, la valoración de la actividad se realizó empleando la técnica de los pocillos que permite incrementar la sensibilidad del ensayo al poder valorar la actividad que hay en los 100 µl empleados, frente a los 5-10 µl utilizados en la técnica de las gotas.

De esta forma se pudo detectar un cierto aclaramiento en los sobrenadantes de la cepa utilizada como control JH2-2(pAM401-81_X) y en algunos mutantes (G13K, L40K y A53S) lo que confirmó la presencia, aunque tímida, de actividad en ellos (Tabla 14). Sin embargo en los sobrenadantes de los restantes mutantes no fue posible la detección de actividad inhibidora. Todo ello ratificaba los resultados obtenidos en medio sólido, y sugería que los cambios introducidos debían afectar a la actividad, en particular en el caso de los mutantes E4A, E20A, E58A y W24A de AS-48, validando lo adecuado de

su selección. Estos resultados estaban de acuerdo con los obtenidos con la cepa RJ16 de *E. faecium*, productora de una variante de AS-48 (AS-48RJ) que presenta un 99% de identidad con AS-48, en la que el residuo E20 estaba sustituido por V, lo que era determinante de un espectro de actividad ligeramente más reducido (Abriouel *et al.*, 2005). Resultados similares también habían sido descritos en otros péptidos antibacterianos modificados genéticamente, como la mersacidina (Szekat, *et al.*, 2003), Pep5 (Bierbaum *et al.*, 1996), epidermina o nisina (Kuipers *et al.*, 1996). En estos trabajos se afirmaba que las variantes de estos lantibióticos se producían más lentamente y con un rendimiento final inferior al de la molécula original. En estos casos, sin embargo, el comportamiento era fácilmente justificable ya que los cambios habían sido introducidos en residuos implicados en la ciclación y afectaban negativamente la actividad de los enzimas implicados en las modificaciones postraduccionales que estos lantibióticos necesitan para madurar (Szekat, *et al.*, 2003).

Fue también llamativa la progresiva disminución en la actividad detectada en los sobrenadantes de los diferentes mutantes, incluida la de la cepa de referencia JH2-2(pAM401-81_X), a tiempos prolongados de incubación, probablemente debido a su unión a las células productoras, en particular en aquellos casos en los que la sustitución introducida disminuía la carga neta de la molécula o contribuía a aumentar su hidrofobicidad. Por ello, y con la finalidad de recuperar toda la bacteriocina presente en los sobrenadantes, éstos se mezclaron con la resina intercambiadora sin haber retirado previamente las células, en las condiciones establecidas previamente por Abriouel *et al.* (2003). Se pudo así comprobar que tras el intercambio catiónico por CM25, algunas fracciones de los mutantes E4A y E20A, que en medio sólido carecían de actividad, presentaban halos de inhibición frente a JH2-2, si bien con valores mucho más bajos que las restantes muestras. La única excepción encontrada fue la muestra procedente del mutante W24A que permaneció inactiva a pesar del factor de concentración que supone el intercambio catiónico (según lo estimado en el proceso estandarizado para AS-48 nativo, aprox. x 10). Debido al bajo rendimiento de las muestras, no fue posible establecer la actividad específica al no poderse titular la actividad para relacionarla con la concentración de proteínas existente.

En estudios anteriores realizados por Abriouel *et al.* (2003) se había establecido que AS-48 era fuertemente retenida en las matrices de fase reversa de tipo C4 o C18, y requería concentraciones altas del solvente para su elución y además, la presencia de

otras proteínas con tiempos de retención similares a AS-48 en fracciones procedentes de intercambio catiónico era bastante baja. Ello sugería que la mayoría de las proteínas existentes en las fracciones eluidas entre el 60-90% de solvente B (isopropanol: acetonitrilo 2:1, TFA 4mM) de las columnas de C18 debían corresponder a las moléculas AS-48^M. Efectivamente, la actividad de todas las muestras, ahora bastante concentradas y por ello valorables mediante la técnica de gotas, correspondía a fracciones eluidas entre el 60-90% de solvente B, que era el gradiente en el que la molécula nativa AS-48 eluía (Abriouel *et al.*, 2003).

En el último paso de purificación sobre RP-HPLC utilizando una columna semipreparativa de C18, se eliminaron todas las proteínas contaminantes de acuerdo con la presencia de un único pico en todos los cromatogramas de la Figura 54. Las escasas, aunque significativas, diferencias entre ellas se refieren a los tiempos de retención marcados en cada uno de los picos, que nos puede dar una idea del grado de hidrofobicidad del péptido y de su relación con la actividad biológica (Kim *et al.*, 2005). De hecho parece que existe cierta relación entre la disminución en los tiempos de retención y la pérdida de actividad, ya que coincide que los mutantes con menores tiempos como W24A (17,630 min) E4A (19,601 min), E20A (19,645 min) o E58A (19,116 min) son los que muestran menor actividad, mientras que las variantes cuyas sustituciones no parecen afectar la actividad, A53S (20,431 min), L40K (20,432 min) y G13K (20,211 min) muestran tiempos de retención próximos al de la molécula AS-48 no mutada (21,460 min). Estos resultados son coincidentes con los obtenidos con el mutante CbnS33 de la carnobacteriocina B2, que carece de actividad y muestra un tiempo de retención menor respecto a la molécula silvestre (Quadri *et al.*, 1997).

El resumen del proceso de purificación recogido en la Tabla 18, permitió obtener muestras con alta pureza, aunque en todos los casos con escaso rendimiento (entre el 16,8 y el 25%) debido a la débil expresión de los genes *as-48ABC* provocada por la inserción del sitio *XhoI*. La pureza de las muestras obtenidas en HPLC, fue posteriormente corroborada mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Como era previsible, las bandas obtenidas se correspondían con el tamaño esperado (aprox. 7 kDa). Ya que era posible que algunas de las sustituciones introducidas pudieran afectar las características antigénicas de las moléculas, se llevó a cabo la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa para ser sometida a una hibridación con anticuerpos específicos anti-AS-48 (Western

Blotting) (Maqueda *et al.*, 1998). Sin embargo, dada la estructura de AS-48 en la que la ciclación impone fuerte restricciones a los posibles cambios que las interacciones producidas por las sustituciones pudieran inducir, todas las bandas de las proteínas purificadas fueron reconocidas por los anticuerpos.

*Estudio de la influencia de diversos factores físico-químicos sobre las variantes
AS-48^M*

En este capítulo se analiza la importancia de las sustituciones introducidas en AS-48^M en relación a su estabilidad y actividad biológica, estudiando la influencia del pH y la temperatura en el comportamiento de las variantes purificadas, por ser los dos tipos de variables físico-químicas frecuentemente aplicadas a los sistemas alimentarios, en los que una molécula como AS-48 podría ser utilizada como conservante natural.

A la hora de valorar la importancia de las sustituciones introducidas en AS-48, es conveniente recordar su estructura cíclica organizada en cinco hélices α , incluso cuando se encuentra en soluciones acuosas, a diferencia de la mayoría de los péptidos con esta organización, que en tales condiciones se encuentran desestructurados y sólo adoptan su conformación efectiva tras la interacción con disolventes hidrófobos o vesículas de fosfolípidos, como ha sido descrito en el caso de las cecropinas, magaininas y melittina (Kondejewski *et al.*, 2002). Curiosamente, la organización de AS-48 recuerda más a la de péptidos como la gramicidina S o la tirocidina que, aunque poseen láminas β y no hélices α como AS-48, están fuertemente constreñidos por la ciclación del esqueleto aminoacídico (Kondejewski *et al.*, 2002).

En este trabajo se han comparado los cálculos teóricos (coeficientes de extinción molar, Pm y pl) obtenidos, considerando el contenido de aminoácidos aromáticos, la ciclación de la molécula y la presencia de residuos con carga negativa (Asp y Glu) y positiva (Arg y Lys). Las diferencias, como puede apreciarse, no son significativas, salvo en el caso de W24A en el que hay una reducción en el coeficiente de extinción molar (0,991 frente a $1,771(\text{mg/ml})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ de la molécula nativa) debido a la pérdida de un residuo aromático en la molécula.

En este estudio, enfocado a la identificación de residuos responsables de la actividad de AS-48, era preciso llevar a cabo un profundo estudio de la actividad biológica de las variantes obtenidas, ensayándolas frente a diversas cepas indicadoras, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, e investigando, además, la influencia del pH y de la concentración de bacteriocina.

Es importante subrayar que la mayoría de las sustituciones introducidas mejoran la actividad frente a *E. coli*, en particular cuando se ensayan a pH 9 y a la mayor

concentración utilizada (167 μM). Los mejores resultados se obtuvieron con aquellos mutantes en los que la sustitución se traducía en un aumento de la carga neta del péptido (G13K y L40K) cuyos halos de inhibición a pH 9 presentaban un diámetro doble al del control (9-10,5 frente a 5 mm) (Tabla 21). Sin embargo, cuando se determinó la concentración mínima inhibidora (CMI) requerida para inhibir el crecimiento de esta bacteria (Tabla 22) no se observaron variaciones significativas entre AS-48 y los mutantes E20A, E58A, G13A, L40K y sólo en el caso de las variantes E4A y W24A se necesitaron concentraciones muy superiores para inhibirla (58 y 28 μM frente a 10 μM que requería el control).

En cuanto a la actividad frente a las bacterias Gram-positivas empleadas, seleccionadas entre las que eran sensibles a AS-48 y tenían mayor interés biotecnológico, los resultados fueron muy diferentes y el grado de inhibición variable según la cepa indicadora. En general, a la concentración más alta ensayada (167 μM), se puede ver (Tabla 21) que las sustituciones A53S, E4A, E20A, E58A mantenían una actividad muy similar a la de la molécula nativa, a pesar de la disminución en la carga neta de algunas variantes; por el contrario, un incremento en la carga como el supuesto por los cambios G13K y L40K, se traducía en una mayor actividad, incluso a los pHs más altos ensayados, salvo en el caso de *S. aureus*. Finalmente el mutante W24A, al igual que se ha descrito para *E. coli*, originaba halos turbios de inhibición frente a la mayoría de las cepas ensayadas, en particular frente a *E. faecalis* S-47, *S. aureus* 240 y en menor medida frente a *L. innocua* 4030 y *E. faecalis* JH2-2. Las excepciones fueron *L. monocytogenes* 4032, *B. cereus* LWL1, *B. megaterium* 44, que resultaron claramente inhibidas por este mutante, si bien con halos inferiores a los del control.

Sin embargo, cuando se comparan estos resultados con los expuestos en la Tabla 22, en donde se establece la mínima concentración de proteína requerida para inhibir a las diferentes bacterias ensayadas, se observan comportamientos que no siempre coinciden con los anteriormente expuestos, poniendo de manifiesto que el método de difusión en medio sólido, normalmente utilizado para valorar la actividad, tiene sus limitaciones en particular en lo referido a la capacidad de las muestras muy concentradas para difundir y también en lo relativo a la concentración empleada, determinante, en último caso, del grado de oligomerización de las proteínas (Abriouel *et al.*, 1998). Además, el empleo de diversas cepas indicadoras para valorar la CMI, da una idea más exacta de la tendencia conferida por las mutaciones, ya que, como se observa en algunos casos, un efecto concreto puede ser dependiente de la cepa indicadora

utilizada. Comparando detenidamente los resultados se pueden establecer tres patrones de comportamiento, determinados por las sustituciones introducidas, tomando como referencia la molécula nativa AS-48:

- i) Los mutantes E20A, G13K, L40K y A53S, que en general mantienen una CMI muy similar a la de AS-48 frente a la mayoría de las bacterias Gram-positivas ensayadas, con excepción de *S. aureus*, que requiere concentraciones 5 veces superiores en el caso de las variantes E20A, G13K y L40K y mucho más altas en el de A53S (entre 14 y 29 veces superiores). Las pequeñas desviaciones en los valores de la CMI observadas con el resto de las indicadoras se refieren a la menor actividad que presentan G13K, L40K y A53S a pH neutro, con valores de CMIs dobles frente a las dos especies de *Enterococcus* y de *Listeria* incluidas en el ensayo.
- ii) En el segundo grupo se incluyen las variantes E4A y E58A que, en general tienen una CMI doble a la de la molécula nativa, salvo en el caso de las especies de *Enterococcus* y *Staphylococcus* ensayadas, que pueden llegar a requerir concentraciones entre 5 y 10 veces superiores para ser inhibidas.
- iii) Finalmente los resultados más llamativos corresponden al mutante W24A que requiere concentraciones comprendidas entre 196 y 598 $\mu\text{g/ml}$ de proteína para ser activo, frente a los 3,5 o 14,9 necesarios de AS-48, siendo las especies *S. faecalis* S-47 y *S. aureus* las que muestran más resistencia (CMI de 84 μM).

Es importante destacar que el comportamiento conferido por las sustituciones de cada uno de los glutámicos por alanina no es homogéneo, ya que depende de la localización del residuo en la molécula, viéndose más afectada la actividad de los mutantes E4A y E58A y menos la sustitución E20A. Todo ello significa que además de la pérdida de la carga negativa, es importante considerar su orientación en el espacio. Tampoco está claro que su actividad se vea afectada a pH 3, situación en el que los Glu se encuentran protonados y supondría una ligera modificación en la carga total de la molécula (de +10 a +9).

Modificaciones en la sensibilidad e incluso el espectro de acción han sido igualmente referidas en otros péptidos catiónicos pertenecientes a la clase II, tras su modificación genética. En estos trabajos se ha investigado la importancia de ciertos residuos en la actividad biológica, como ocurre por ejemplo con la Cys en la pediocina PA-1 (Fimland *et al.*, 2000) o la mesentericina Y10537 (Fleury *et al.*, 1996), con los

Trp y los residuos cargados de la sakacina P (Fimland *et al.*, 2002; Kazazic *et al.*, 2002), con el Trp³⁷ y la Arg²⁸ en la mesentericina Y105 (Morisset *et al.*, 2004), con la Ser³³ y la Phe³ en la carnobacteriocina B2 (Quadri *et al.*, 1997), con los residuos Tyr², Gly⁶, Cys^(9, 14, 24 y 44), Trp³³, His³⁷ en la pediocina PA-1 (Miller *et al.*, 1998; Tominaga y Hatakeyama, 2006) o con los Trp y las Tyr de la divercina V1 (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1999). Por otra parte, las variaciones en la sensibilidad de las diversas cepas bacterianas obtenidas, pueden indirectamente ser explicadas en base a diferencias netas en la carga superficial de las bacterias empleadas, debido a la composición de los lípidos de membrana, la presencia de cápsula o la existencia de proteínas de superficie. La secreción de proteasas es otro factor que ha sido esgrimido ya que puede aumentar la resistencia de algunas bacterias frente a moléculas de esta naturaleza, sin embargo en el caso de AS-48, conocida la gran estabilidad que le confiere la estructura cíclica y su resistencia a los enzimas proteolíticos, esta explicación parece menos plausible.

Desde una perspectiva general, se puede afirmar que los cambios introducidos en los péptidos catiónicos antimicrobianos tienen consecuencias deletéreas en su actividad, salvo que los nuevos residuos incrementen la carga positiva de la molécula, como ocurre en los mutantes G13K y L40K de AS-48, efecto que ha sido también descrito en las variantes H12K, T20K de la sakacina P que mejoran la capacidad de unión a su diana y producen un claro incremento de su potencia (Kazazic *et al.*, 2002; Morisset *et al.*, 2004). La importancia de los residuos cargados en estas bacteriocinas se deduce del hecho de que se encuentran normalmente localizados en la mitad N-terminal de la molécula y gobiernan la unión inicial a las mismas a sus dianas mediante interacciones electrostáticas. También en el caso de AS-48, como ya se ha comentado, hay una zona de la molécula en la que se localizan la mayoría de los residuos cargados (8 Lys, 2 Arg, y 4 Glu) y que ha sido considerada determinante de su actividad (González *et al.*, 2000).

Queda finalmente por comentar el profundo efecto negativo observado en la sustitución del triptófano situado en posición 24 por alanina (W24A). Se trata de un residuo muy conservado en las bacteriocinas de clase II, en particular en las pediocinas, y se ha propuesto, que puedan contribuir a que la bacteriocina alcance la posición correcta cuando se encuentra unida a la membrana de las células sensibles y por ende a facilitar su actividad. De esta forma, las sustituciones de los Trp en la sakacina P (Fimland *et al.*, 2002) reducen su actividad considerablemente, aunque el efecto es dependiente de la situación de estos residuos en la molécula. En el caso de la divercina

V41, la oxidación de los Trp provoca la ausencia de actividad (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1999), indicando que podría jugar un papel en la interacción y orientación de la bacteriocina en la membrana. De forma similar, la sustitución del Trp37 de la mesentericina Y105, al que se le atribuye un papel estabilizador de la hélice α en la membrana, disminuye notablemente la actividad (Morisset *et al.*, 2004). También, de los estudios realizados con la toxina Cry1Ab, se ha desarrollado un modelo que es aplicable a proteínas de membrana y péptidos que actúan a ese nivel (Padilla *et al.*, 2006). Se ha constatado que tras la oligomerización de Cry1Ab se produce un cambio conformacional que conduce al reordenamiento de la cadena lateral de los Trp haciéndolos menos accesibles, pero, una vez insertada en membrana ocurre un segundo cambio, que favorece que estos residuos entren en contacto con la membrana y posiblemente anclen el pre-poro en la bicapa lipídica. Nuestros resultados con la variante W24A, están de acuerdo con los obtenidos con péptidos que tienen actividad a nivel de membrana, en los que los Trp se consideran esenciales, en especial aquéllos que, por su situación en la molécula, tienen acceso a las interfases membranas/agua en la unión a la célula huésped. Esto es particularmente cierto en la región próxima a los grupos carbonilos de los lípidos, mientras que los que se encuentran situados en las hélices anfífilas parecen más bien estar implicados en las interacciones con la parte hidrofóbica de la membrana, dirigiendo su permeabilización (Killian y von Heijne., 2000; Ridder *et al.*, 2000; de Planque Maurits *et al.*, 1999; Yau *et al.*, 1998). Todos estos ejemplos sirven para explicar la pérdida de actividad del mutante W24A de AS-48. Es ahora el momento de justificar la razón por la que no se ha modificado el triptófano situado en posición 70 en la molécula: se trata de un residuo que participa directamente en la formación del enlace peptídico durante la ciclación de AS-48 y su eliminación, pensamos, podría conducir a un polipéptido inmaduro lineal que sería rápidamente degradado por las proteasas extracelulares que *E. faecalis* produce. Este extremo había sido comprobado anteriormente en un intento de sobre-expresar el gen estructural *as-48A* en *E. coli* y los resultados demostraron que el péptido lineal era incapaz de mantener la estructura nativa adoptada por el cíclico, probablemente debido a que la hélice α_5 , en donde se localiza la unión de los extremos de AS-48 (Met¹-Trp⁷⁰), estaba interrumpida y posiblemente tampoco se producirían las interacciones de los residuos hidrófobos, Val67, Met1 y Phe5 con los del corazón de la molécula, consideradas esenciales en el mantenimiento de su estabilidad (González *et al.*, 2000). Además, aunque como hemos visto, los aminoácidos aromáticos como el Trp juegan un

papel importante en la actividad de las bacteriocinas, su contribución varía en términos de magnitud y carácter según su posición en la molécula, siendo particularmente importantes aquéllos que están mas expuestos al solvente, como es el caso del W24 en AS-48.

Se ha descrito, además, la existencia de un paralelismo entre la anfipatía (distribución relativa de residuos hidrófobos y básicos) de algunas moléculas catiónicas con su posible actividad hemolítica, la cual se incrementa cuando aumenta la primera. De hecho se ha publicado que la actividad antimicrobiana se encuentra disociada de la actividad hemolítica, y que las diferencias entre los dos tipos de actividades pueden ser maximizadas seleccionando una anfipatía apropiada (Kondejewski *et al.*, 2002). En el caso de los protómeros de AS-48 que muestran una superficie anfipática muy pronunciada, los cambios introducidos apenas han modificado la anfipatía de la molécula, y aunque han influido en su actividad biológica, no han determinado en ningún caso capacidad hemolítica alguna. También se ha relacionado este parámetro con la actividad frente a diferentes tipos de microorganismos, a modo de índice terapéutico calculado como una medida de especificidad de los péptidos frente a ellos, requiriendo en líneas generales un menor grado de hidrofobicidad para ser más activos frente a las bacterias Gram-positivas que frente a Gram-negativas explicable por la presencia de la membrana externa en éstas últimas (Kondejewski *et al.*, 2002).

En un estudio previo, Abriouel *et al.* (2001b) demostraron que AS-48 en solución acuosa tiende a formar asociados moleculares reversibles, de forma dependiente al pH y la concentración de la proteína disuelta, debido a interacciones atractivas entre los grupos hidrofóbicos de la molécula. La existencia de un equilibrio de dimerización en función del pH fue corroborado por los resultados de sedimentación en equilibrio que indicaban que AS-48 era dimérica a pHs comprendidos entre 4.5 y 8.5 (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003) y monomérica a pH 3 (González *et al.*, 2000). Para comprobar si los cambios introducidos en AS-48 alteraban este comportamiento, se analizó en cada una de las variantes purificadas a homogeneidad la existencia de oligómeros en solución en un amplio intervalo de pH (ácido, neutro y básico), previa fijación de los mismos con formaldehído. Es sabido que el proceso de entrecruzamiento entre el formaldehído y las proteínas permite la formación de enlaces covalentes con las diferentes formas físicas de las proteínas, aumentando su estabilidad en la posterior separación electroforética. Cuando las moléculas AS-48^M se disolvieron a pHs por encima de la neutralidad en las condiciones del ensayo, es decir previa fijación con

formaldehído, se observaron en los geles bandas que se correspondían con asociados moleculares de 2, 3, 4 y 5 unidades. Sin embargo, cuando se sometió a pH 3, debido a la naturaleza catiónica de AS-48, situación en la que los aminoácidos básicos se encuentran fuertemente cargados y los glutámicos protonados y en consecuencia, las interacciones hidrófobas deben ser más débiles, solo se encontró la única banda correspondiente a los monómeros. El comportamiento general de las AS-48^M fue idéntico al de la molécula nativa, lo que permite afirmar que ninguna de las sustituciones introducidas ha modificado de forma sustancial las características superficiales de la molécula.

Asimismo, se analizó la estabilidad de las soluciones de AS-48^M (10 mM) (no fijadas con formaldehído) en varias condiciones de temperatura y pH, valorando la actividad residual de las mismas frente a JH2-2 tras los tratamientos aplicados. Los resultados fueron muy interesantes, pues se pudo comprobar que la modificación de cada uno de los glutámicos determinó un comportamiento similar al de la proteína nativa, siendo estables a pH 3, en el que se encuentran en estado monomérico, y perdiendo actividad a tratamientos térmicos más altos a medida que aumentaba el pH. Sin embargo, el resto de las variantes ensayadas, A53S, W24A, G13K y L40K, resultaron más estables en las diferentes condiciones aplicadas (con reducciones máximas entre el 15 y el 69% frente al 89% de la forma nativa), lo que puede ser muy interesante tenerlo en cuenta con vistas a su aplicación biotecnológica.

Estudios de dicroísmo circular de AS-48 y sus variantes a temperatura constante

La espectroscopía de dicroísmo circular (DC) es una técnica ampliamente utilizada en la determinación de la estructura secundaria de proteínas (Greenfield, 1996). Cada una de las estructuras en que se organizan las cadenas polipeptídicas (hélices α , láminas β y conformación al azar conocida como “random coil”) contribuye de forma diferente en el espectro de la proteína. Por numerosas razones, no es posible una estimación definitiva de la estructura secundaria ya que el espectro de DC se encuentra distorsionado por las cadenas laterales de la fenil-alanina, tirosina y triptófano y por los puentes de azufre, cuando existen (Bierzyński, 2001). Además, las medidas dentro de la región del UV-lejano (entre 180 y 210 nm) no siempre pueden realizarse debido a la fuerte absorción de la solución. Se requieren, pues, tampones de baja absorbancia, como fosfatos o fluoruros sódicos y potásicos en lugar de cloruros, para mantener la fuerza iónica, lo que no siempre es posible. Sin embargo, el DC es una herramienta muy sensible para monitorizar los cambios en la conformación de los péptidos inducidos mediante variación de pH, temperatura, concentración de sales, concentración de la solución peptídica o proteica (asociaciones), así como la presencia de agentes desnaturalizantes. Probablemente por ello se encuentran en la bibliografía numerosos estudios en los que se analiza la estructura secundaria de algunas bacteriocinas y de sus mutantes mediante esta técnica. En el caso de las bacteriocinas de clase IIa (similares a pediocina), el DC se ha utilizado para comparar las estructuras nativas de la pediocina PA-1, leucocina A, la carnobacteriocina B2 con la del mutante de la pediocina PA-1 ped[M31Nle que posee un puente disulfuro terminal (Kaur *et al.*, 2004). Así, se ha podido establecer que en ambientes acuosos estos péptidos no se encuentran estructurados, pero si lo están en presencia de 90% de TFE o en ambientes que mimetizan la membrana (micelas de dodecil-fosfo colina o vesículas), en donde presentan un contenido en hélice α entre el 30- 45%. Se piensa que este cambio conformacional puede ser debido a la asociación preferencial de las moléculas de TFE alrededor del péptido, provocando una constante dieléctrica baja y un ambiente hidrófobo (Kaur *et al.*, 2004). Sin embargo cuando se aumenta la temperatura se observa una pérdida de las hélices α y en consecuencia una disminución en la actividad que no se produce en el mutante ped[M31Nle], indicando que la presencia del puente disulfuro C-terminal introducido estabiliza la estructura.

No obstante, los estudios de DC realizados en lantibióticos han mostrado que no siempre existe relación entre la pérdida de actividad y la de estructura secundaria. Por ejemplo, los mutantes de la nisina Z muestran diferencias en su actividad biológica, estabilidad y espectro de acción respecto a la molécula salvaje, pero los cambios en su estructura secundaria deducidos de sus espectros de DC no son significativos (Yuan *et al.*, 2004). Sin embargo, los mutantes obtenidos a partir de la mesentericina Y105 muestran un espectro típico de estructura helicoidal, aunque con menor contenido en hélice α (9-15 %) que en la molécula silvestre (24 %), y además presentan una menor actividad bactericida (Morisset *et al.*, 2004). En el caso de la gassericina A, producida por *Lactobacillus gasseri* LA39 y *Lactobacillus reuteri* LA6, los espectros de DC muestran ligeras diferencias según se haya purificado a partir de una u otra especie bacteriana (Kawai *et al.*, 2004), ya que la molécula producida por *Lb. gasseri* LA39 posee dos residuos de D-Ala, frente a una D-Ala de la molécula producida por *Lb. reuteri* LA6 (reutericina), que tiene un espectro de acción más estrecho.

También en este trabajo se ha utilizado la espectroscopia de DC en la región de ultravioleta lejano para comparar las estructuras de la molécula AS-48 nativa con las de las variantes obtenidas. Se ha empleado un tampón de baja concentración (fosfato sódico 10 mM, pH 3/ácido fosfórico) que permite recoger espectros de todas las moléculas desde 190 hasta 260 nm. Los resultados confirmaron el alto contenido en hélice α de todas las variantes en tales condiciones, cuyas curvas son superponibles en todos los casos, indicando la ausencia de cambios conformacionales. Este comportamiento es diferente del mostrado por otros péptidos antimicrobianos que, como se ha dicho, sólo se encuentran estructurados en presencia de SDS, TFE o micelas, como algunas bacteriocinas de clase II (Kaur *et al.*, 2004) o las cecropinas, magaininas y melitina, que ya han sido comentadas (Kondejewski *et al.*, 2002).

AS-48, sin embargo, posee un tipo de plegamiento similar al de la NK-lisina, una proteína que pertenece a la familia de proteínas similares a saposina. Esta familia presenta una estructura tridimensional común, con tres puentes disulfuro muy conservados. Los datos disponibles hasta el momento parecen indicar que las proteínas de esta familia adoptan el mismo tipo de plegamiento en solución acuosa y en un ambiente de membrana, ya que los espectros de DC coinciden en ambas condiciones (Andersson *et al.*, 1995), por lo que probablemente este comportamiento sea similar para AS-48 y sus derivados.

Los datos recogidos para las variantes de AS-48 confirman que, salvo E20A, todos los mutantes muestran valores de elipticidad ligeramente menores que AS-48, en particular el mutante L40K. De hecho, todas las moléculas muestran un alto porcentaje de contenido en hélice α , con valores similares entre AS-48 y el mutante E20A (75 %), y valores algo superiores en los mutantes E4A, E58A, G13K, L40K, W24A y A53S (77-83 %). Estas pequeñas diferencias pueden ser explicadas si se analiza la tendencia a formar hélices α de cada residuo según la escala de Pace y Scholtz (1998), en la cual los residuos de Ala tendrían la mayor tendencia a formar hélices α , seguidos del Glu y Leu/Lys y el de menor tendencia (Gly). En base a ello se justificaría que los mutantes en los que se ha introducido Ala (E4A, E20A, E58A, W24A) o Lys (L40K o G13K) tengan favorecida la helicidad.

Estudios de desnaturalización térmica mediante DC

Es sabido que la mayoría de las proteínas de membrana así como aquellas capaces de insertarse en la misma o de sufrir translocación post-trasduccional, pueden sufrir cambios conformacionales al interactuar con ella (White y Wimley, 1999), siendo, pues, importante para comprender este tipo de procesos la caracterización de los posibles intermediarios existentes en el plegamiento de estas proteínas. Mas aún en el caso de AS-48, al tratarse de una molécula que presenta una estructura globular muy compacta, organizada en cinco hélices- α (González, *et al.*, 2000) en la que la unión cabeza-cola necesaria para su ciclación, se produce en mitad de la hélice α_5 (residuos 64-5), lo que tiene un marcado efecto en la estabilidad de la estructura tridimensional (González *et al.*, 2000; Cobos *et al.*, 2001).

La estabilidad de AS-48 había sido previamente estudiada mediante calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry, DSC) en diversas condiciones de pH y fuerza iónica (Cobos *et al.*, 2001). Los resultados entonces obtenidos confirmaron la gran estabilidad térmica de la estructura nativa de AS-48, observándose que a pH 2,5 y baja fuerza iónica, la desnaturalización solamente ocurría en equilibrio a 102 °C, como un proceso térmico reversible cuya transición se ajustaba a un modelo de equilibrio de dos estados (N \leftrightarrow D), caracterizado por una T_m de 375 K, mientras que a pH neutro y alcalino el estado desplegado agregaba irreversiblemente por su proximidad al punto isoeléctrico, donde la fuerza electrostática necesaria para evitar la agregación no existe. Los datos calorimétricos indicaban que el cambio de entalpía específica tras el desplegamiento era anormalmente pequeña y que el cambio en la capacidad calorífica era bastante normal para una proteína de este tamaño, mientras que el cambio en la energía libre de Gibbs a 25 °C resultó relativamente alto. Al menos parte de esta gran estabilidad térmica, una de las mayores referidas en la literatura, podría ser atribuida a las restricciones introducidas por la organización circular de la cadena polipeptídica.

En todas las variantes de AS-48 obtenidas, se ha investigado la desnaturalización térmica mediante DC con el fin de obtener los parámetros termodinámicos que permitan interpretar correctamente el proceso de plegamiento y así, profundizar en el comportamiento y la actividad biológica de AS-48. Sin embargo, tampoco en este trabajo se ha logrado alcanzar el estado desnaturalizado de AS-48 ni de sus mutantes aplicando la máxima temperatura que permite el dicrógrafo (98°C), al no poseer un

sistema de presurización para evitar la ebullición y evaporación de la muestra, como es el caso de calorimetría diferencial de barrido. Ello ha impedido disponer de la información relativa a sus estados desplegados y ha imposibilitado el ajuste y la obtención de valores termodinámicos tales como T_m , entalpía, Energía Libre de Gibbs, etc.

La comparación de los espectros de DC obtenidos a temperatura constante (25°C) para AS-48 silvestre así como para cada una de sus variantes, demuestran que todos ellos se encuentran plegados ya que están representados por una curva característica de una molécula altamente helicoidal. La realización de los espectros a diferentes concentraciones (datos no mostrados) demostró su no dependencia de ella, sugiriendo que no existe ningún grado de asociación molecular. Además, la comparación de los espectros en el ultravioleta lejano, antes y después de realizar el barrido de temperatura, permiten concluir que no se habían producido alteraciones en la estructura secundaria en ninguno de los mutantes (Figura 61). Este comportamiento es muy similar al de la NK-lisina y la saponina-B, que poseen un tipo de plegamiento similar al de AS-48, y son también muy estables frente a la desnaturalización térmica, ya que los espectros medidos por DC a 90 y a 20 °C coinciden, incluso en presencia del agente reductor DTT, que afecta sensiblemente a la actividad biológica (Andersson *et al.*, 1995). Ello indica que los puentes disulfuro de estas moléculas no son necesarios para mantener la estructura secundaria, pero sí para estabilizar la estructura tridimensional.

Es interesante comparar los resultados obtenidos con AS-48 con los referidos por Colgrave y Craik (2004) para el ciclótido Kalata B1. En ellos, se estudió la estabilidad térmica de este ciclótido y de un permutante acíclico lineal que retenía el motivo CCK, llamado des(24-28)kB1. Se demostró que Kalata B1 era estable hasta los 97 °C, mientras que la estabilidad del permutante acíclico era ligeramente inferior. Los resultados sugerían que el motivo CCK es más importante para la estabilidad térmica que la posesión de una cadena peptídica circular, aunque ésta también tiene una función esencial, como demuestra la disminución de estabilidad del permutante. Otras bacteriocinas, como las pertenecientes a la clase IIa, no son tan estables como AS-48. Estas moléculas poseen una lámina- β en el extremo N-terminal y una hélice α en el extremo C-terminal. El análisis de la estructura secundaria a varias temperaturas mediante CD (Kaur *et al.*, 2004) demostró que la pediocina PA-1, que contiene un puente disulfuro C-terminal, mantiene su estructura y su actividad a diferentes

temperaturas, si bien péptidos como la enterocina P, sakacina P, curvacina A, leucocina A o la carnobacteriocina B2, que no poseen dicho puente disulfuro, pierden parte de la estructura helicoidal a altas temperaturas y son 30-50 veces menos activos a 37 °C que a 25 °C, lo que indica que la hélice α es crítica para la actividad de estas moléculas.

Estudios de desnaturalización en presencia de GdnHCl mediante DC

En un estudio previo (Cobos *et al.*, 2002) se había demostrado AS-48 despliega sólo en presencia de GdnHCl 6,3 M a 25 °C, agente que fue seleccionado porque actúa como desnaturalizante y como estabilizador. El cambio de energía de Gibbs obtenido en presencia de GdnHCl fue muy alto para una proteína de este tamaño, probablemente debido a su efecto estabilizador acoplado a la desestabilización provocada por el propio agente desnaturalizante, explicando el desplegamiento de AS-48 a altas concentraciones del agente a temperatura ambiente. Sin embargo, se pudo comprobar que en presencia de urea no se producía el desplegamiento, ni a las más altas concentraciones utilizadas (8 M) (Cobos *et al.*, 2002). Parece claro que gran parte de la alta estabilidad de la molécula AS-48 nativa se debe a su estructura cíclica, ya que el resto de características estructurales son las habituales en proteínas de este tamaño. Un comportamiento similar al de AS-48 se encontró en el ciclótido Kalata B1 y en un permutante acíclico (Colgrave y Craik, 2004), en los que, ni siquiera la adición de GdnHCl 6 M o urea 8 M provocó la desnaturalización de la molécula, confirmando la gran importancia del motivo CCK presente en los ciclótidos, en la estabilidad estructural de los mismos.

Con objeto de caracterizar el desplegamiento de la proteína en su estado monomérico así como el de los mutantes, se realizaron los experimentos de desnaturalización mediante DC a pH 3 y en presencia de GdnHCl. En la Figura 65 se representan las curvas de desnaturalización obtenidas, observándose en todos los casos, una curva sigmoideal caracterizada por un doble salto ($N \leftrightarrow I$; $I \leftrightarrow D$) que era claramente indicativo de la presencia de, al menos, un estado intermediario en equilibrio con el estado nativo y desnaturalizado de las proteínas ($N \leftrightarrow I \leftrightarrow D$). Se ha descartado que este intermediario fuera debido al efecto de la asociación molecular, ya que anteriormente se había comprobado la no dependencia de las curvas de la concentración de proteína utilizada. Además, se había asegurado el equilibrio de desplegamiento de todas las muestras, al tomar puntos a diferentes concentraciones de GuHCl, tanto de las muestras incubadas con dicho agente durante más de 8 h como de aquéllas sin incubar, sin observarse diferencias significativas entre ambas.

Los resultados demuestran un desplegamiento secuencial de todas las proteínas ensayadas, tanto en la forma nativa como en los mutantes.

En efecto, observando las curvas obtenidas (Figura 65) así como los resultados expuestos en la Tabla 25, se deduce claramente la existencia de un estado intermediario, más patente en el caso de los mutantes que en la forma silvestre. Los mutantes presentan una primera transición entre 3.0 y 4.0 M de GuHCl y una segunda transición entre 5.6 y 6.4 M de GuHCl. Los valores de Energía Libre de Gibbs para el proceso global de desnaturalización (ΔG_{DN}^0) demuestran una mayor estabilidad de la proteína silvestre respecto a los mutantes, entre los cuales los de mayor estabilidad serían L40K, W24A, E58A y E20A. En el caso concreto de L40K, la sustitución de un resto apolar como la leucina por uno cargado positivamente como la lisina, favorecería el contacto con el disolvente, y por ello este mutante se ha desestabilizado en menor medida que el resto. Dicho mutante mantiene la actividad de la molécula silvestre y en algunos casos se incrementa levemente. Por otra parte, la estructura dimérica (DF-I) demostrada para AS-48 a pH 4.5 y 7.5 se encuentra estabilizada por la interacción de las cadenas laterales de los glutámicos pertenecientes al área hidrofílica de la DF-I y por la doble conformación que presentan las cadenas laterales de cada uno de los residuos E58 situados en las dos unidades del dímero, probablemente debido a la protonación de los mismos (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003). La sustitución de estos residuos cargados negativamente (protonados a pH 3) por uno apolar en una zona expuesta al disolvente estaría desestabilizando en mayor medida que la anterior mutación comentada.

Por último, de la observación de las curvas así como de los valores obtenidos en sus ajustes, se desprende que la elipticidad de todos los mutantes en la zona nativa (al comienzo de la curva) se mantiene prácticamente sin variaciones (entre -23.30 a -25.35) y tampoco las hay en la zona del estado desnaturalizado, al final de la curva (-5.7 y -5.8), indicando que en todos los casos se ha alcanzado la desnaturalización de todas las variantes. Por el contrario, la elipticidad respecto al estado intermediario, al comienzo de la segunda transición, varía entre -6.5 y -12.47, lo que es indicativo de que el estado intermediario en los diferentes mutantes varía su conformación y es por ello que la variación en la energía libre de Gibbs para la segunda transición resulte más alta en relación a la primera, indicando una estabilidad diferente para el intermediario. Estos datos hacen aún más interesante el estudio en más profundidad del intermediario formado que podría arrojar más luz sobre la conformación de esta proteína y su interacción con la membrana.

Análisis de predicción sobre los mutantes AS-48^M

Se realizó la representación planar de las hélices α de AS-48 (helical wheel projection) con la finalidad de comparar la influencia de seis de los siete residuos modificados (con excepción de W24 que se encuentra situado en un giro) respecto a la estructura descrita para AS-48 mediante RMN (pdb 1e68, González *et al.*, 2000). En este análisis se pudo comprobar que se trata de hélices anfipáticas, cuya función exacta en el reconocimiento y/o actividad de las moléculas no está aún muy clara. De hecho las características de las distintas hélices α modificadas se mantienen prácticamente inalteradas en todos los mutantes, sin diferencias significativas en la distribución de los residuos por los cambios introducidos. Este análisis confirma, como ya se había demostrado en los estudios de DC, que la estructura secundaria adoptada por los seis mutantes analizados era muy similar a la de la molécula nativa.

A pesar de ello, las diferentes sustituciones introducidas se tradujeron en diferencias en la actividad de las mismas. Así la sustitución E58A que equilibró el porcentaje de residuos hidrófobos y no hidrófobos de la hélice α_4 determinó una ligera pérdida de actividad, bastante inferior a la de las sustituciones E4A y E20A que aumentaron la hidrofobicidad de las hélices α_5 y α_1 . Los cambios L40K y G13K que aumentaron la carga positiva en las hélices α_3 y α_1 , incrementaron la actividad antibacteriana de ambos mutantes. Por último, el cambio A53S que no alteró la carga de la hélice α_4 (cambio de un residuo apolar por otro polar sin carga) no afectó prácticamente la actividad. Estos resultados indican que el mantenimiento de la hidrofobicidad y de la anfipatía de las hélices puede ser crítico en la actividad, y están de acuerdo con algunos estudios realizados con bacteriocinas de la clase II en un intento de identificar los dominios y residuos responsables de la actividad (Ramnath *et al.*, 2000; Hechard *et al.*, 2001; Dalet *et al.*, 2001).

Los perfiles de hidrofobicidad establecidos para AS-48 y sus variantes de acuerdo con Kyte y Doolittle (1982), coincidieron con los resultados estructurales, ya que todas las moléculas eran en su mayor parte hidrófobas, aunque aparecían regiones más hidrófilas en las hélices α_4 y α_5 que contienen un gran porcentaje de aminoácidos cargados y por ello son las más expuestas al solvente, lo que también está de acuerdo con la estructura de AS-48 (DF-I) en solución, por lo que se supone que en el resto de mutantes tendrán el mismo comportamiento.

El estudio de la agregación de los mutantes con el algoritmo TANGO (Fernández-Escamilla *et al.*, 2004) predijo una alta agregación para las hélices α_1 y α_2 en solución en todos los casos, lo que hace pensar que esta zona agregaría con otra superficie idéntica y apoyaría la existencia de DF-I en solución. La ausencia de agregación en las hélices α_4 y α_5 en estas condiciones, confirmaría los resultados obtenidos por Jiménez *et al.*, (2005) para la minibacteriocina B-49-69 en cuanto a la ausencia de agregación.

Conclusiones

Conclusions

1. La inserción de un sitio *XhoI* en la construcción pAM401-81_X a una distancia de 21 nt del extremo 3' del gen *as-48A*, en la repetición invertida (RI) existente en la región intergénica que separa los genes *A* y *B*, determinó en los nuevos transformantes de *E. faecalis* JH2-2, un fenotipo hipoprodutor sin alterar su capacidad para resistir altas concentraciones de bacteriocina AS-48.
2. El análisis de expresión realizado mediante Northern Blotting y RT-PCR en los transformantes con la inserción *XhoI*, ha demostrado la importancia de la RI en la expresión del operón *as-48ABC*, la cual está implicada en el procesamiento del transcrito policistrónico T_{ABC} y por tanto regula los niveles de expresión de los tres genes.
3. Se han obtenido mediante mutagénesis dirigida, siete variantes de AS-48 denominadas E4A, G13K, E20A, W24A, L40K, E58A y A53S, que han sido clonadas en la construcción pAM401-81_X. Todas las sustituciones introducidas alteraron la actividad y el espectro de acción de las moléculas mutadas, con valores variables según el residuo cambiado, su posición en la molécula y la cepa indicadora utilizada en el ensayo.
4. Las siete variantes de AS-48 han sido purificadas a homogeneidad mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) con un rendimiento final variable entre el 16,8 y el 25% respecto al de la cepa parental.
5. No se han encontrado diferencias en las características antigénicas de las variantes, ni en su tendencia a la oligomerización a pH neutro o alcalino, a pesar de las diferencias detectadas en los tiempos de retención en RP-HPLC de algunas de las moléculas purificadas.
6. Cuando se estableció la concentración mínima inhibidora de las diferentes variantes frente a diversas bacterias Gram-positivas se observó que E20A, G13K, L40K y A53S conservaban un valor de CMI muy similar al de AS-48, mientras que los valores de E4A y E58A fueron como mínimo el doble de los de la molécula nativa y solo en el

caso del mutante W24A se requirieron concentraciones por encima del 40% para ser activas. La bacteria que mostró más resistencia fue en todos los casos *S. aureus*.

7. Cuando se determinó el valor de la CMI frente a *E. coli*, sólo se observaron variaciones significativas con los mutantes E4A y W24A, los cuales requerían concentraciones 5,8 y 2,8 veces superiores respecto al control, para inhibirla.
8. Todas las variantes de AS-48 fueron estables a los diferentes tratamientos térmicos aplicados, en particular cuando se ensayaron a pH 3. Sólo se produjo una pérdida importante de actividad en algunos casos tras el tratamiento a 100 °C durante 5 min en las muestras preparadas a pHs 7 y 9.
9. Los espectros de dicroísmo circular (DC) obtenidos para AS-48 y sus variantes, confirmaron que todas las moléculas estaban bien estructuradas en el tampón utilizado. Las curvas obtenidas fueron superponibles y características de moléculas altamente helicoidales, indicando la ausencia de cambios conformacionales en la estructura secundaria de las variantes.
10. Las curvas de desnaturalización obtenidas mediante DC a pH 3 en presencia de GdnHCl se ajustan a un modelo de equilibrio de tres estados en todos los casos analizados, aunque de forma más patente en las variantes.
11. Los valores de Energía Libre de Gibbs para el proceso global de desnaturalización demuestran una mayor estabilidad de la proteína silvestre respecto a los mutantes, siendo los más estables L40K, W24A, E58A y E20A. Además y de acuerdo con los valores de Energía Libre de Gibbs determinados, la primera transición se encuentra más favorecida que la segunda. La variación de elipticidad determinada para los diferentes estados intermedios, indica diferencias en su conformación.

1. The *Xho*I insertion in the pAM401-81_X construction, at 21 nt from 3'-end of *as-48A* gene, just in the inverted repeat (IR) located at the intergenic region between *A* and *B* genes, caused an hypoproducer phenotype in the new *E. faecalis* JH2-2 transformants, although the immunity level was not altered.
2. Analysis of the pAM401-81_X transformants by Northern Blotting and RT-PCR, has demonstrated that the IR is involved in the processing of the polycistronic T_{ABC} transcript, thereby regulating the level expression of the three translated genes.
3. Seven AS-48 derivatives, named E4A, G13K, E20A, W24A, L40K, E58A and A53S have been obtained by site directed mutagenesis and cloned in pAM401-81_X construction. All substitutions have altered the activity and the inhibitory spectrum of the wild-type molecule at different levels depending on the mutated residue, its location on the molecule and the indicator strain employed.
4. All AS-48 derivatives have been purified to homogeneity by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), with a final yield of 16,8 to 25 % with respect to parental strain.
5. No differences between the antigenic characteristics and oligomerization behaviour at neutral or basic pH in AS-48-variants were found, instead of the detected differences into the retention times on RP-HPLC form some molecules.
6. E20A, G13K, L40K and A53S derivatives have shown MIC values similar to that of the wild-type molecule AS-48 against Gram-positive bacteria, while E4A and E58A MIC values were at least two-fold higher. Only in the case of mutant W24A concentrations above 40% were required for inhibition. The most resistant bacteria was, in all cases, *S. aureus*.
7. The MIC values against a *E. coli* showed significant differences only in the case of E4A and W24A derivatives, that required 5,8 and 2,8-fold higher concentrations for inhibition, in relation to the control.

- 8.** All AS-48-variants were stable to the thermal treatments applied, especially when they were assayed at pH3. Only a significant decrease on activity was detected in some cases after heating at 100 °C for 5 min at pH 7 and 9.
- 9.** Circular dichroism spectra for AS-48 and its derivatives confirmed that all molecules were structured in the buffer. The curves were superimposable and showed the characteristics of highly helicoidal molecules, indicating the absence of conformational changes on the secondary structure.
- 10.** All GdnHCl denaturation CD curves of AS-48 derivatives at pH 3 fit to a three-state equilibrium model, being more relevant in the derivatives.
- 11.** Gibbs Free Energy values for the global unfolding process indicate a higher stability of wild-type molecule with respect to derivatives, the more stable being L40K, W24A, E58A and E20A. Furthermore, the first transition is more favoured than the second one as shown by the Gibbs Free Energy values. Ellipticity variation between the intermediate states shows conformational differences.

Bibliografía

Abriouel, H., Lucas, R., Ben Omar, N., Martínez- Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M. y 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. y 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. y 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. y Maqueda, M. 1998. Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48. 1998. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 4623-4626.

Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A. y Maqueda, M. 2001b. Influence of Physico-Chemical Factors on the Oligomerization and Biological Activity of Bacteriocin AS-48. Curr. Microbiol. **42**: 89–95.

Abriouel, H., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. y 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.

Allison, GE., Fremaux, C. y Klaenhammer, T.R. 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. J. Bacteriol. **176**: 2235-2241.

Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. y Valdivia., E. 2005c. Synergistic effect on enterocin AS-48 in combination with outer membrana 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. y 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. y Valdivia., E. 2005b. Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Sci.* **71**: 549-556.

Ananou, S., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A. y 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. y 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. y Johansson, J. 1995. An amphipathic helical motif common to tumourolytic polypeptide NK-lysin and pulmonary surfactant polypeptide SP-B. *FEBS Lett.* **362**: 328-332.

Andrew, C. y Bonnie, L.B. 2006. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science.* **311**: 1113-1116.

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

Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, LS., Hugas, M., Garriga, M. y Nes IF. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1676-1682.

Bachere, E. 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: Potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture.* **227**: 427-438.

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., y Ebright, R.H. 2003. Structure of antibacterial peptide microcin J25: a 21-residue lariat protoknot. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 12382-12383.

Bengert, P. y Dandekar, T. 2003. A software tool-box for analysis of regulatory RNA elements. *Nucleic Acids Res.* **31**:3441-3445.

Bhugaloo-Vial, P., Jean-Paul Douliez, J.P., Mollé, D., Dousset, X., Boyaval, P. y Marion, D. 1999. Delineation of Key Amino Acid Side Chains and Peptide Domains for Antimicrobial Properties of Divercin V41, a Pediocin-Like Bacteriocin Secreted by *Carnobacterium divergens* V41. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2895-2900.

Bhunja, A.K., Bhowmik, T.K. y Johnson, M.G. 1994. Determination of bacteriocin encoding plasmids of *Pediococcus acidilactici* strains by Southern hybridization. *Letters in Applied Microbiology.* **18**: 168-170.

Bierbaum, G., Szekat, C., Josten, M., Hedrich, C., Kempter, C., Jung, G. y Sahl, H.G. 1996. Engineering of a novel thioether bridge and role of modifies residues in the lantibiotic Pep5. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 385-392.

Bierzyński, A. 2001. Methods of peptide conformation studies. *Acta Biochim. Polon.* **48**: 1091-1099.

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

Blond, A., Cheminant, M., Destoumieux-Garzon, D., Segalas-Milazzo, I., Peduzzi, J., Goulard, C., y 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. y Rebuffat, S. 1999. The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. *S. Eur. J. Biochem.* **259**: 747-755.

Bokesch, H.R., Pannell, L.K., Cochran, P.K., Sowder II, R.C., McKee, T.C. y Boyd, M.R. 2001. A novel anti-HIV macrocyclic peptide from *Palicourea condensata*. *J. Nat. Prod.* **64**: 249-250.

Boman, H.G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 61–92.

Bouvet, P. y Belasco, J.G. 1992. Control of RNase E-mediated RNA degradation by 5'-terminal base pairing in *E.coli*. *Nature.* **360**: 488-491.

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.

Brewer, D., Hunter, H. y 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.

Brogden, K.A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 238–250.

Brogden, K.A., Ackermann, M., McCray, P.B. y Tack, B.F. 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22**: 465–478.

Broussalis, A.M., Goransson, U., Coussio, J.D., Ferraro, G., Martino, V. y Claeson, P. 2001. First cyclotide from *Hybanthus* (Violaceae). *Phytochemistry* **58**: 47–51.

Bulet, P., Stocklin, R. y Menin, L. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* **198**: 169–184.

Camilli, A. y Bassler, B.L. 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science.* **311**: 1113-1116.

Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Schoffs, H.M.E., Terras, F.R.G., Thevissen, K., Osborn, R.W., Rees, S.B. y Broekaert, W.F. 1994. Gene encoded antimicrobial peptides from plants. En: Bomam HG, Marsh J, Goode JA (eds) *Antimicrobial peptides*. Wiley, NewYork, pp 91–106.

Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E. y Holo, H. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology.* **143**: 2287-2294.

Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J.A. y Bulet, P. 1996. Innate immunity: isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **271**:21808–13.

Chmiel, D. 2001. Mode of action of antimicrobial peptides. *Adv. Cell. Biol. (Suppl.)*. **16**: 261–73.

Cintas, L.M., Casaus, P., Havarstein, L.S., Hernández, P.E. y Nes, I.F. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4321-4330.

Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F. y 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. y Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**: 1-20.

Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Valdivia, E., Lucas, R., Maqueda, M., Martínez Cañamero, M., y Gálvez, A. 2005. Effect of immersion solutions containing Enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetables foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7781-7787.

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

Cobos, E., Filimonov, V.V., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez, J.C. y 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. y 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.

Colgrave, M.L. y 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.

Cotter, P.D., Hill, C. y Ross, R.P. 2005. 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. y 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. y Waime, 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. y 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. y Rosengren, K.J. 2003. Structures of naturally occurring circular proteins from bacteria. *J. Bacteriol. Review* **185**: 4011-4021.

Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P. y Hechard, Y. 2001 A $\delta(54)$ -dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology.* **147**: 3263-3269.

Daly N. L., Clark R.J., Plan M.R. y Craik D. J. Kalata B8, a novel antiviral circular protein, exhibits conformational flexibility in the cystine knot motif. 2006. *Biochem. J.* **393**: 619–626.

Daly, N.L. y Craik, D.J. 2000. Acyclic permutants of naturally occurring cyclic proteins: characterization of cystine knot and β -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. y 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. y 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.

- Danders, W., Marahiel, M.A., Krause, M., Kosui, N., Kato, T., Izumiya, N. y 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.
- d'Aubenton Carafa, Y., Brody, E. y Thermes, C.** 1990. Prediction of Rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators. *J Mol Biol.* **216**: 835–858.
- David, R., Ritcher, M.P.O. y Beck-Sickinger, A.G.** 2004. Expressed protein ligation. *Eur. J. Biochem.* **271**: 663–677.
- Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I. y Kent, S.B.H.** 1994. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, **266**:776-779.
- De Hoon, M.J., Makita, Y., Nakai, K. y Miyano, S.** 2005. Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species. *PLoS Comput Biol* **1**: 212-221.
- de Planque Maurits, R.R., Kruijtzter, J.A.W., Liskamp, R.M.J., Marsh, D., Greathouse, D.V., Koeppe, R.E., de Kruiff, B. y Killian, J.** 1999. Different membrane anchoring positions of tryptophan and lysine in synthetic transmembrane R-helical peptides. *J. Biol. Chem.* **274**: 20839-20846.
- De Ruyter, P.G., Kuipers, O.P., Beerthuyzem, M.M., van Alen-Boerringter, I. y de Vos, W.M.** 1996. Funcional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **178**: 3434-3439.
- De Vuyst, L., Foulquié-Moreno, M.R. y 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 Vuyst, L., y Vandamme, E.J.** 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, págs. 91–142. En: L. De Vuyst and E. J. Vandamme (ed.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, 1ª Ed. Blackie Academic & Professional, Londres, Reino Unido.
- Dennison, S.R., Harris, F. y Phoenix, D.A.** 2005b. Are Oblique Orientated α - Helices Used by Antimicrobial Peptides for Membrane Invasion?. *Prot. Pept. Letters.* **12** : 31-39.

Dennison, S.R., Wallace, J., Harris, F. y Phoenix, D.A. 2005a. Amphiphilic α -Helical Antimicrobial Peptides and Their Structure/Function Relationships. *Prot. Pept.Letters.* **12** : 27-29.

Díaz Torres, ML. 1999. Análisis y expresión de los genes implicados en la producción y resistencia frente a AS-48. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Díaz, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Fernández, M., Soler-González, A.S., Ramírez-Rodrigo, H. y 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**: 1229-36.

Diep, D.B. y Nes, I.F. 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram-positive bacteria. *Curr. Drug Targets.* **3**: 107-122.

Drider, D. y Condon, C. 2004. The continuing story of endoribonuclease III. *J Mol Microbiol Biotechnol* **8**:195-200.

Drider, D., Santos, J.M. Arriano, C.M. y López, P. 1998. RNA processing is involved in the post-transcriptional control of the *citQRP* operon from *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. *Mol. Gen. Genet.* **258**: 9-15.

Dufrenne, J., Bijwaard, M., te Giffel, M., Beumer, R. y Notermans, S. 1995. Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* **27**:175–183.

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. y 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.

Ehrenstein, G. y Lecar, H. 1977. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* **10**: 1–34.

Eijsink, V.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Holo, H. y Nes, I.F. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek.* **81**: 639-654.

Ellison, R.T. y Giehl, T.J. 1991. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.* **88**: 1080–1091.

Epand, R.M. y 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. y Hancock, R.E.W. 1996. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J. Biol. Chem.* **271**:19298–19303.

Fath, M.J. y Kolter, R. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev. Review.* **57**: 995-1017.

Fath, M.J., Zhang, L.H., Rush, J. y Kolter, R. 1994. Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants. *Biochem.* **33**: 6911-6917.

Fernández, M. 2004. Análisis funcional y de expresión de la enterocina AS-48 en *Enterococcus faecalis* y transferencia a otras bacterias del ácido láctico. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Fernández, M., Sánchez-Hidalgo, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., García-Quintáns, N., López, P. y Maqueda, M. 2006. Transcriptional analysis and regulation of the *as-48ABC* cluster, essential for the biogenesis of the enterocin AS-48. *Appl. Env. Microbiol.* (Sometido a publicación).

Fernández-Escamilla, A.M., Rousseau, F., Schymkowitz, J. y Serrano, L. 2004. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature Biotech.* **22**: 1302-1306.

Fiedler, S. y Wirth, R. 1991. Transformation of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* by electroporation. En: *Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci.* Dunny, G.M., Clearly, P.P. y McKay, L.L. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 301.

Fimland, G., Eijsink, V.G.H. y Nissen Meyer, J. 2002. Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. *Biochemistry.* **41**: 9508-9515.

Fimland, G., Johnsen, L., Axelsson, L., Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G.H. y Nissen-Meyer, J. 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.* **182**:2643–2648.

Fleury, Y., Dayem, M.A., Montagne, J.J., Chaboisseau, E., Caer, J.P.L., Nicolas, P. y Delfour, A. 1996. Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 10537, a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Biol. Chem.* **271**:14421–14429.

Floriano, B., Ruiz-Barba, J.L. y 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**: 4883-90.

Folli, C., Ramazzina, I., Arcidiaco, P., Stoppini, M. y 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.

Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. y De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 1-24.

Franz, C.M., Holzapfel, W.H. y Stiles, M.E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food. Microbiol.* **47**: 1-24.

Frechet, D., Guitton, J.D., Herman, F., Faucher, D., Helynck, G., Monegier du Sorbier, B., Ridoux, J.P., James-Surcouf, E. y 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. y 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. y Zaiou, M. 2002. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**: 823-831.

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

Gálvez, A., Giménez-Gallego, G., Maqueda, M. y 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. y 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. y 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. y 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. y 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. y 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. y 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. y Maqueda, M. 1990. Induction of autolysis in *Enterococcus faecalis* S-47 by peptide AS-48. J. Appl. Bacteriol. **69**: 406-13.

Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nature Rev. Immunol. **3**: 710–720.

Ganz, T. y Lehrer, R. 1998. Antimicrobial peptides of vertebrates. Curr. Opin. Immunol. **10**: 41-44.

Ganz, T. y Lehrer, R. 1999. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. Mol. Med. Today. **5**:292–7.

García-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M., Rodríguez-Palenzuela, P. 1998. Plant defense peptides. *Biopolymers*. **47**: 479–491.

García-Quintáns, N., Magni, C., de Mendoza, D. y López, P. 1998. The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* is induced by acid stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 850-857.

Garrido, M.C., Herrero, M., Kolter, R. y Moreno, J. 1988. The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO J.* **7**: 1853-1862.

Gill, S.C. y von Hippel, P.H. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**: 319– 326.

Gomori, after Sørensen. 1955. *Meth. Enzymol.* **1**: 143. En: Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elioy, W.H. y Jones, K.M. 1986. *Data for Biochemical Research*. 3^a Ed. Oxford Science Publications, N.Y.

González, C., Langdon, G.M., Bruix, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M. y 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. y 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.

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.

Gran, L., Sandberg, F. y Sletten, K. 2000. *Oldenlandia affinis* (R&S) DC. A plant containing uteroactive peptides used in African traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* **70**: 197–203.

Grande, M. J., Lucas, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Valdivia, E. y 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., y 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. y Gálvez, A. 2006b. Inhibition of *Bacillus licheniformis* LMG 19409 from ropy cider by enterocin AS- 48. *J. Appl. Microbiol.* **In press.**

Grande, M.J., Lucas, R., Valdivia, E., Abriouel, H., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., Ben Omar, N., y Gálvez, A. 2005b. Stability of Enterocin AS-48 in Fruit and Vegetable Juices. *J. Food Protect.* **68**: 2085-2094.

Gratia, J. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Comp. Rend. Soc. Biol.* **93**: 1040-1041.

Gratia, J. y Fredericq, P. 1946. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol.* **93**: 1040-1041.

Greenfield, N. 1996. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.* **253**: 1-10.

Greenfield, N. y Fasman, G.D. 1969. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry.* **8**: 4108–4116.

Guex, N. y Peitsch, M.C. 1997. Swiss-Model and the Swiss-PDBViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714-2723.

Gustafson, K.R, Walton, L.K., Sowder, R.C.Jr., Johnson, D.G., Pannell, L.K., Cardellina, J.H.Jr. y Boyd, M.R. 2000. New circulin macrocyclic polypeptides from *Chassalia parvifolia*. *J. Nat. Prod.* **63**: 176–178.

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. y 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.

Hallock, Y.F., Sowder, R.C. 2nd, Pannell, L.K., Hughes, C.B., Johnson, D.G., Gulakowski R, Cardellina JH 2nd y Boyd MR. 2000. Cycloviolins A–D, anti-HIV macrocyclic peptides from *Leonia cymosa*. *J. Org. Chem.* **65**: 124–128.

Hancock, R.E.W. 1997. Peptide antibiotics. *The Lancet.* **349**: 418-422.

Hancock, R.E.W. y Chapple, D.S. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **43**: 317–1323.

Hancock, R.E.W. y Diamond, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* **8**: 402-410.

Hancock, R.E.W. y Lehrer, R. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* **16**:82–88.

Harwig, S.S.L., Kokryakov, V.N., Swiderek, K.M., Aleshina, G.M., Zhao, C. y 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. y 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.

Hechard, Y., Pelletier, C., Cenatiempo, Y. y Frere, J. 2001. Analysis of $\delta(54)$ -dependent genes in *Enterococcus faecalis*: A mannose PTS permease (EIIMan) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology.* **147**: 1575-1580.

Helmerhorst, E.J., Breeuwer, P., van't Hof, W., Walgreen-Weterings, E., Oomen, L.C., Veerman, E.C., Amerongen, A.V. y Abee, T. 1999. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem* **274**:7286–7291.

Hemsley, G., Arnheim, N., Toney, M.D., Cortopassi, G. y Galas, D. 1989. A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17**: 6545-6551.

Henderson, J.T., Chopko, A.L. y Wassenaar, P.D. 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1. Arch. Biochem. and Biophys. **295**: 5-12.

Hernández, J.F., Gagnon, J., Chiche, L., Nguyen, T.M., Andrieu, J.P., Heitz, A., Trinh, H.T., Pham, T.T. y 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. y 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. y Hermodson, M.A. 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. Nature. **323**: 448-50.

Higuchi, R., Krummel, B. y 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. y Pease, L.R. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene. **77**: 51-59.

Hoch, J.A. y Silhavy, T.J. (eds.). 1995. Two Component Signal Transduction. ASM Press. Washington DC.

Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. y Ezekowitz, R.A.B. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science. **284**: 1313–1318.

Hofmann, K. y Stoffel, W. 1993. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. Biol. Chem. Hoppe-Seyler. **374**:166.

Holo, H., Nilssen, O. y Nes, I.F. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolation and characterization of the protein and its gene. J. Bacteriol. **173**: 3879-3887.

Jack, R.W., Tagg, J.R. y Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive Bacteria. Microbiol. Rev. **59**: 171-200.

Jennings, C., West, J., Waine, C., Craik, D.J., y 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.

Jennings, C.V., Rosengren, K.J., Daly, N.L., Plan, M., Stevens, J., Scanlon, M.J., Waine, C., Norman, D.G., Anderson, M.A. y 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.

Jiménez, M.A., Barrachi-Saccilotto, A.C., Valdivia, E., Maqueda, M. y 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. y Klaenhammer, T.R. 1990. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. J. Bacteriol. **172**: 6339–6347.

Joosten, H.M., Nuñez, M., Devreese, B., Van Beeumen, J. y Marugg, J.D. 1996. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 4220-4223.

Kalkum, M., Eisenbrandt, R. y Lanka, E. 2004. Protein Circlets as Sex Pilus Subunits. Curr.Prot. Pept. Sci. **5**: 417-424.

Kalkum, M., Eisenbrandt, R., Lurz, R. y Lanka, E. 2002. Tying rings for sex. Trends Microbiol. **10**: 382-387.

Kamysz, W., Okrój, M. y Lukasiak, J. 2003. Novel properties of antimicrobial peptides. Acta Biochim. Pol. **50**: 461-469.

Karlea, I. y Ranganathan, D. 2003. Construction of polar and hydrophobic pores and channels by assembly of peptide molecules. J. Mol. Struct. **647**: 85–96.

Katahira, R., Shibata, K., Yamasaki, M., Matsuda, Y. y Yoshida, M. 1995. Solution structure of endothelin B receptor selective antagonist RES-701-1 determined by ¹H NMR spectroscopy. Bioorg Med Chem. **3**:1273-80.

Katahira, R., Yamasaki, M., Matsuda, Y. 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.

Kaur, K., Andrew, L.C., Wishart, D.S. y Vederas, J.C. 2004. Dynamic Relationships among Type IIa Bacteriocins: Temperature Effects on Antimicrobial Activity and on Structure of the C-Terminal Amphipathic α Helix as a Receptor-Binding Region. *Biochemistry*. **43**: 9009-9020.

Kawai, Y., Ishii, Y., Uemura, K., Kitazawa, H., Saito, T. y 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., Kemperman, R., Kok, J. y Saito, T. 2004. The Circular Bacteriocins Gassericin A and Circularin A. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **5**: 393-398.

Kawai, Y., Saito, T., Kitazawa, H. y 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. y Itoh, T. 1994. Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**: 1218-1221.

Kazazic, M., Nissen-Meyer, J. y Fimland, G. 2002. Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiology* **148**: 2019–2027.

Kelly, S.M. y Price, N.C. 2000. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **1**: 349-384.

Kelly, S.M., Jess, T.J., Price, N.C. 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1751**: 119 – 139.

Kemperman, R., Jonker, M., Nauta, A., Kuipers, O.P. y 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. y Kok, J. 2003b. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1589-1597.

Khorchid, A. e Ikura, M. 2006. Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *Int J Biochem Cell Biol.* **38**: 307-312.

Killian, J.A. y von Heijne, G. 2000. How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 429-434.

Kim, S., Kim, S.S. y Lee, B.J. 2005. Correlation between the activities of α -helical antimicrobial peptides and hydrophobicities represented as RP HPLC retention times. *Peptides.* **26**: 2050-2056.

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.

Kohli, R.M. y Walsh, C.T. 2003. Enzymology of acyl chain macrocyclization in natural product biosynthesis. *Chem. Commun. (Cambridge)* **20**: 297-307.

Kokryakov, V.N., Harwig, S.S.L., Panyutich, E.A., Shevchenko, A.A., Aleshina, G.M., Shamova, O.V., Korneva, H.A. y 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.W. y Hodges, R.S. 2002. Optimization of microbial specificity in cyclic peptides by modulation of hydrophobicity within a defined structural framework. *J. Biol. Chem.* **4**: 67-74.

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

Kozak, M. 2005. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene.* **361**: 13-37.

Kuipers, O.P., Bierbaum, G., Ottenwa"lder, B., Dodd, H.M., Horn,N., Metzger, J., Kupke, T., Gnau, V., Bongers, R., van den Bogaard, P., Kusters, H., Rollema, H. S., de Vos, W. M., Siezen, R. J., Jung, G., Go"tz, F., Sahl, H. G. y Gasson, M. J. 1996. Protein engineering of lantibiotics. *Antonie Leeuwenhoek.* **69**:161-169.

Kyte, J. y Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.

Ladokhin, A.S. y White, S.H. 2001. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim. Biophys. Acta* **1514**: 253–260.

Ladokhin, A.S., Selsted, M.E. y 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.

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. y 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. y Rico, M. 1998. Sequence-specific 1H assignment and secondary structure of the bacteriocin AS-48 cyclic peptide. *J. Biomol. NMR* **1**: 173-175.

Leer, R.J., Van der Vossen, J.M.B.M., van Giezen, M., van Noort, J.M. y Pouwels, P.H. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol.* **141**: 1629-1635.

Lehrer, R.I. y Ganz, T. 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 23–7.

Lehrer, R.I. y Ganz, T. 2002. Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.*, **14**: 96-102.

Leippe, M. 1999. Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa-effector molecules of primitive phagocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **23**: 267–279.

Liepinsh, E., Andersson, M., Ruyschaert, J. M. y Otting, G. 1997. Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 793–795.

López-Lara, I., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. y 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**: 769-74.

Luckett, S., García, R.S., Barker, J.J., Konarev, A.V., Shewry, P.R., Clarke, A.R. y Brady, R.L. 1999. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. J. Mol. Biol. **290**: 525–533.

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**: 255-70.

Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M. y Valdivia, E. 1998. Widespread production of AS-48-like bacteriocins in strains of *Enterococcus faecalis*? Mol. Microbiol. **29**: 1318-1319.

Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Guerra, I. y 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. y Valdivia, E. 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. Curr. Prot. Pept. Sci. **5**: 399-416.

Marck, C. 1988. "DNA Strider": a "C" program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. Nucleic Acids Res. **16**: 1829-1836.

Marqués, S., Ramos, J.L. Timmis, K.N. 1993. Analysis of the mRNA structure of the *Pseudomonas putida* TOL *meta* fission pathway operon around the transcription initiation point, the *xylTE* and the *xylFJ* regions. Biochim. Biophys. Acta **1215**: 227-236.

Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Maqueda, M. y Valdivia, E. 1990b. Genetic stability of the antagonistic character of *Enterococcus faecalis* ssp. *liquefaciens* and the detection of a new inhibitory bacteriocin-like substance. Folia Microbiol. **35**: 113-123.

Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Valdivia, E. y 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. y 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. y Maqueda, M. 1992. Transfer of a plasmid determining bacteriocin Bc-48 production and immunity, and a response to sexual pheromones in *Enterococcus faecalis* S-48. *Plasmid* **28**: 1-8.

Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Gálvez, A., Coyette, J. y 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.

Mathiesen, G., Huehne, K., Kroeckel, L., Axelsson, L., and Eijsink, V.G.H. 2005. Characterization of a New Bacteriocin Operon in Sakacin P-Producing *Lactobacillus sakei*, Showing Strong Translational Coupling between the Bacteriocin and Immunity Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3565-3574.

Mattick, A.T.R. y Hurst, A. 1944. A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature.* **154**: 551.

Maxwell, A.I., Morrison, G.M., y Dorin, J.R. 2003. Rapid sequence divergence in mammalian beta-defensins by adaptive evolution. *Mol. Immunol.* **40**: 413-421.

McAuliffe, O., O'Keeffe, T., Hill, C. y Ross, R.P. 2001. Regulation of immunity to the two-component lantibiotic, lactacin 3147, by the transcriptional repressor LtnR. *Mol. Microbiol.* **39**: 982-993.

Mendoza, F., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M. y 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.

Miller, K.W., Schamber, R., Osmanagaoglu, O., y Ray, B. 1998. Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1997-2005.

Miteva, M., Andersson, M., Karshikoff, A. y Otting, G. 1999. Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Letters.* **462**: 155-158.

Monaco, V., Locardi, E., Formaggio, F., Crisma, M., Mammi, S., Peggion, C., Toniolo, C., Rebuffat y S., Bodo, B. 1998. Solution conformational analysis of amphiphilic helical, synthetic analogs of the lipopeptaibol trichogin GA IV. *J. Pept. Res.* **52**: 261-272.

Mootz, H.D. y 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.

Moreno, M.R., Leisner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Radu, S., Rusul, G., Vancanneyt, M. y De Vuyst, L. 2002. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Appl. Microbiol.* **92**: 147-157.

Morisset, D., Berjeaud, J.M., Marion, D. Lacombe, C. y Frère J. 2004. Mutational analysis of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin, for determination of impact on bactericidal activity, in vitro secondary structure, and membrane interaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4672-4680.

Mullis, K.B. y Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.

Muñoz, A., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., y 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.

Muñoz, A., Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Maqueda, M. y Valdivia, E. 2006. 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.* (Sometido a publicación)

Muñoz, A. 2006. Optimización de la producción de la enterocina AS-48 en sistemas alimentarios. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Myers, J.K., Pace, C.N. y Scholtz, J.M. 1996. Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accesible surface areas of protein unfolding. *Protein. Sci.* **4**: 2138-2148.

- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. y Holo, H.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**: 113-128.
- Nes, I.F., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H.H. y Nissen-Meyer, J.** 2002. Unmodified peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. En: Dutton, C.J., Haxell, M.A., McArthur, H.A.I., Wax, R.G., eds. *Peptide Antibiotics: Discovery, Mode of Actions, and Applications*. New York: Marcel Dekker, 81–117.
- Nilsen, T., Nes, I.F. y Holo, H.** 2003. Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2975-2984.
- Nissen-Meyer, J. y Nes, I.F.** 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* **167**: 67-77.
- Nissen-Meyer, J., Havarstein, L.S., Holo, H., Sletten, K. y Nes, I.F.** 1993. Association of the lactococcin A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1503-9.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Håvarstein, L.S., Sletten, K. y Nes, I.F.** 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* **174**: 5686-5692.
- Nozaki, Y.** 1972. The preparation of guanidine hydrochloride. *Methods Enzymol.* **26**: 43-50.
- Ottenwälder, B., Kupke, T., Brecht, S., Gnau, V., Metzger, J., Jung, G. y Götz, F.** 1995. Isolation and characterization of genetically engineered gallidermin and epidermin analogs. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3894–3903.
- Pace, C.N.** 1986. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* **131**: 266-280.
- Pace, C.N. y Scholtz, J.M.** 1998. A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins. *Biophysical J.* **75**: 422–427.
- Pace, C.N., Shirley, B.A. y Thomson, J.A.** 1989. Measuring the conformational stability of a protein. En *Protein Structure: a practical approach*, 311-330.

Padilla, C., Pardo-López, L., de la Riva, G., Gómez, I., Sánchez, J., Hernández, G., Núñez, M.E, Carey, M.P., Dean, D.H., Alzate, O., Soberón, M. y Bravo, A. 2006. Role of Tryptophan Residues in Toxicity of Cry1Ab Toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 901-907.

Pag, U. y Sahl, H.G. 2002. Lanthionine-containing bacterial peptides. En: Dutton, C.J., Haxell, M.A., McArthur, H.A.I., Wax, R.G., eds. *Peptide Antibiotics: Discovery, Mode of Actions, and Applications*. New York: Marcel Dekker, 2002: 47–80.

Pag, U., Heidrich, C., Bierbaum, G., y Sahl, H.G. 1999. Molecular analysis of expression of the lantibiotic Pep5 immunity phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 591-598.

Papagianni, M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotech. Advan.* **21**: 465-499.

Park, S.H., Itoh, K. y Fujisawa, T. 2003. Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. *J Appl. Microbiol.* **95**: 294-300.

Perler, F.B. y Adam, E. 2000. Protein splicing and its applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 377–383.

Persson, S., Killian, J.A. y 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.

Quadri, L.E.N., Yan, L.Z., Stiles, M.E. y Vederas, J.C. 1997. Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2. *J. Biol. Chem.* **272**: 3384–3388.

Quirantes, R., Gálvez, A., Valdivia, E., Martín, I., Martínez-Bueno, M., Méndez, E. y Maqueda, M. 1995. Purification of specific sex pheromones for pMB1 and pMB2 plasmids of *Enterococcus faecalis* S-48. *Can. J. Microbiol.* **41**: 629-632.

Ramnath, M., Beukes, M., Tamura, K. y Hastings, J.W. 2000. Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin-A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional

sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 3098-3101.

Rebuffat, S.A., Blond, A., Destoumieux-Garzón, D., Goulard, C. y 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.

Reese, M. 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. Comput.Chem. **26**:51-56.

Regnier, P. y Adriano M.C. 2000. Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. BioEssays **22**: 235-244.

Reis, M., Eschbach-Bludau, M., Iglesias-Wind, M.I., Kupke, T. y Sahl, H.G. 1994. Producer immunity towards the lantibiotic Pep5: identification of the immunity gene *pepI* and localization and functional analysis of its gene product. Appl Environ Microbiol. **60**: 2876-83.

Reyes-Zurita, F.J. y Ramírez-Rodrigo, H. 2000. Estudios de la complejidad fractal de los sitios de unión a ligandos en proteínas globulares. Libro de Resúmenes del XXIII Congreso de la SEBBM, Granada. pp. 94.

Ridder, A.N.J.A., Morein, S., Stam, J.G., Kuhn, A., de Kruijff, B. y Killian, J.A. 2000. Analysis of the role of interfacial tryptophan residues in controlling the topology of membrane proteins. Biochemistry. **39**: 6521-6528.

Riley, M.A. y 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. y 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.

Rosengren, K.J., Clark, R.J., Daly, N.L., Goransson, U., Jones, A. y 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. y Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* **79**: 3–16.

Ryan, M.P., Jack, R.W., Josten, M., Sahl, H.G., Jung, G., Ross, R.P. y Hill, C. 1999. Extensive translational modification, including a serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lacticine 3147. *J. Biol. Chem.* **247**: 37544-57550.

Saether, O., Craik, D.J., Campbell, I.D., Sletten, K., Juul, J. y Norman, D.G. 1995. Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. *Biochemistry.* **34**: 4147-4158.

Sahl, H.G. 1994. Gene-encoded antibiotics made in bacteria. En: Bomam, H.G., Marsh, J. y Goode, J.A. (eds) *Antimicrobial peptides*. Wiley, New York, pp 27–53.

Salh, H.G., Jack, R.W. y Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.* **230**: 827-853.

Salomon, R.A. y Farias, R.N. 1992. Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 7428-35.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory Manual*, 2nd 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. y Van Beeumen, J. 1994. The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Lett.* **352**: 87-90.

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

Sánchez-Hidalgo, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Abriouel, H., Valdivia, E. y Martínez-Bueno, M. 2003. The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1633-1641.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, R.A. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463–5467.

Santoro, M.M. y Bolen, D.W. 1988. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation. Method 1. *Biochemistry*. **27**: 8063-8068.

Saris, P.E., Immonen, T., Reis, M. y Sahl, H.G. 1996. Immunity to lantibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **69**: 151-9.

Schnell, N., Entian, K.D., Schneider, U., Gitz, F., Zahner, H., Kellner, R. y Jung, G. 1988. Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature (London)* **333**:276-278.

Schibli, D.J., Hunter, H.N., Aseyev, V., Starner, T.D., Wiencek, J.M., McCray, Jr. P.B. et al. 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**: 8279–89.

Scott, C.P., Abel-Santos, E., Jones, A.D. y Benkovic, S.J. 2001. Structural requirements for the biosynthesis of backbone cyclic peptide libraries. *Chem. Biol.* **8**: 801-815.

Scott, M.P., Jung, R., Muntz, K. y Nielson, N.C. 1992. A protease responsible for post-translational cleavage of a conserved Asn-Gly linkage in glycinin, the major seed storage protein of soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* **89**: 658–662.

Selsted, M.E. 2004. θ -Defensins: Cyclic Antimicrobial Peptides Produced by Binary Ligation of Truncated α -Defensins. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **5**: 365-371.

Selsted, M.E., Novotny, M.J., Morris, W.L., Tang, Y.Q., Smith, W. y Cullor, J.S. 1992. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J. Biol. Chem.* **267**: 4292–4295.

Sesma, F., Gardiol, D., de Ruiz Holgado, A.P. y de Mendoza, D. 1990. Cloning and expression of the citrate permease gene of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2099-2103.

Shai, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1462**: 55–70.

Shillinger, U. y Lucke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1901-1906.

Sletten, K. y 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.

Steiner, H. 1982. Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*. FEBS Letters **137**: 283–287.

Subramani, S., Koller, A. y Snyder, W.B. 2000. Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. Annu. Rev. Biochem. **69**: 399-418.

Suzuki, T., Hayashi, K., Fujikawa, K. y Tsukamoto, K. 1963. Contribution to the elucidation of the structure of polymyxin B1. J. Biochem. **54**: 555–556.

Szekat, C., Jack, R.W., Skutlarek, D., Farber, H. y Birbaum, G. 2003. Construction of an expression system for site-directed mutagenesis of the lantibiotic mersacidin. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 3777-3783.

Tagg, J.R. 1992. Bacteriocins of Gram-positive bacteria: an opinión regarding their nature, nomenclature and numbers. Bacteriocins, microcins and lantibiotics. Nato Asi. Series, H5. 65: 33-35.

Tagg, J.R. y McGiven, A.R. 1971. Assay system for bacteriocins. Appl. Microbiol. **21**: 934.

Tagg, J.R., Dajani, A.S. y Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. **40**: 722-756.

Tam, J.P., Lu, Y.A., Yang, J.L. y Chiu, K.W. 1999. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96**: 8913–8918.

Tang, Y.Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C.J., Ouellette, A.J. y Selsted, M.E. 1999. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins. Science. **286**: 498–502.

Thomma, B.P., Cammue, B.P. y 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. y Itoh, T. 1991. Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. Lett. Appl. Microbiol. **13**:281-286.

Toke, O. 2005. Antimicrobial Peptides: New Candidates in the Fight Against Bacterial Infections. *Biopolymers (Peptide Science)*. **80**: 717–735.

Tominaga, T. y Hatakeyama, Y. 2006. Determination of Essential and Variable Residues in Pediocin PA-1 by NNK Scanning. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1141–1147

Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K. y Ike, Y. 1996. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J. Bacteriol.* **178**: 3585-3593.

Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K. y 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. y 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. y Craik, D.J. 2002. Circular proteins-no end in sight. *Trends Biochem. Sci.* **27**: 132-138.

Trabi, M., Schirra, H.J. y Craik, D.J. 2001. Three-dimensional structure of RTD-1, a cyclic antimicrobial defensin from rhesus macaque leukocytes. *Biochemistry* **40**: 4211–4221.

Tsai, H. y Bobek, L.A. 1998. Human salivary histatins: promising antifungal therapeutic agents. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **9**: 480–97.

Van Belkum, M.J. y Stiles, M.E. 2000. Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **4**:323-335.

Vogelstein, B. y Gillespie, D. 1979. Preparative method and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 615-619.

Waters, C.M. y Bassler, B.L. 2005. Quorum sensing: Cell-to-Cell Communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**: 319-346.

White, S.H. y Wimley, W.C. 1999. Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**: 319–65.

Wilson, K.A., Kalkum, M., Ottesen, J., Yuzenkova, J., Chait, B.T., Landick, R., Muir, T., Severinov, K. y 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.

Wirth, R., An, F.Y. y Clewell, D.B. 1986. Highly efficient protoplast system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*Streptococcus faecalis* shuttle vector. *J. Bacteriol.* **143**: 966-970.

Witherup, K.M., Bogusky, M.J., Anderson, P.S., Ramjit, H., Ransom, R.W., Wood, T. y Sardana, M. 1994. Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*. *J. Nat. Prod.* **57**: 1619-1625.

Wu, C.S., Ikeda, K. y Yang, J.T. 1981. Ordered conformation of polypeptides and proteins in acidic dodecyl sulfate solution. *Biochemistry.* **20**: 566-570.

Yagi, Y. y Clewell, D.B. 1980. Recombination-deficient mutant of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **143**:966-970.

Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L.W. y Oppenheim, J.J. 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* **23**: 291-296.

Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L. y Huang, H.W. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* **81**: 1475-1485.

Yao, M. y Bolen, D.W. 1995. How valid are denaturant-induced unfolding free energy measurements? Level of conformance to common assumptions over an extended range of ribonuclease A stability. *Biochemistry* **34**: 3771-3781.

Yau, W.M., Wimley, W.C., Gawrisch, K. y White, S.H. 1998. The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry.* **37**: 14713-14718.

Yuan, J., Zhang, Z.Z., Chen, X.Z., Yang, W. y Huan, Z.L.D. 2004. Site-directed mutagenesis of the hinge region of nisinZ and properties of nisinZ mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 806-815.

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.

Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. **415**: 389–395.

Zimmermann, N. y Jung, G. 1997. The three-dimensional solution structure of the lantibiotic murein-biosynthesis-inhibitor actagardine determined by NMR. *Eur. J. Biochem.* **246**:809–819.

Zimmermann, N., Metzger, J.W. y Jung, G. 1995. The tetracyclic lantibiotic actagardine. ¹H-NMR and ¹³C-NMR assignments and revised primary structure. *Eur. J. Biochem.* **228**:786–797.

Zuker, M., y Mathews, D.H. 1999. Turner Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction. *In* J. Barciszewski and B. F. C. Clark (ed.), *A Practical Guide in RNA Biochemistry and Biotechnology*, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers.