

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**Departamento de Microbiología**



**ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS  
EN LA PRODUCCIÓN Y RESISTENCIA  
FRENTE A AS-48**

**Martha Lucia Díaz Torres**

**Tesis Doctoral  
1998**

Martha Lucia Díaz Torres

98 / 99

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha ... 11/01/99 .....  
ENTRADA NUM. ... 23 .....

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
28 DIC. 1998  
COMISION DE DOCTORADO

~~T. Prov. 22/45~~  
5/64

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**Departamento de Microbiología**



|                                 |
|---------------------------------|
| <b>BIBLIOTECA UNIVERSITARIA</b> |
| <b>GRANADA</b>                  |
| Nº Documento <u>613377164</u>   |
| Nº. Copia <u>15551040</u>       |

**ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS  
EN LA PRODUCCIÓN Y RESISTENCIA  
FRENTE A AS-48**

**Martha Lucia Díaz Torres**

**Tesis Doctoral**  
**1998**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**TESIS DOCTORAL**

**ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA  
PRODUCCIÓN Y RESISTENCIA FRENTE A AS-48**

**Martha Lucía Díaz Torres**

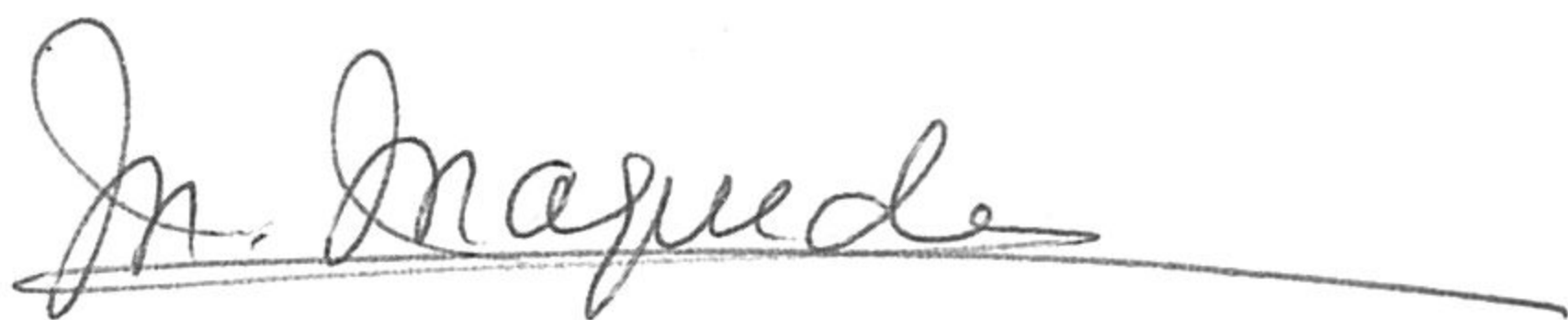
**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**1998**

**ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA PRODUCCIÓN  
Y RESISTENCIA FRENTE A AS-48**

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Licenciada D. Martha Lucia Díaz Torres, dirigida por los Dres. Mercedes Maqueda Abreu, Eva Valdivia Martínez y Manuel Martínez Bueno.

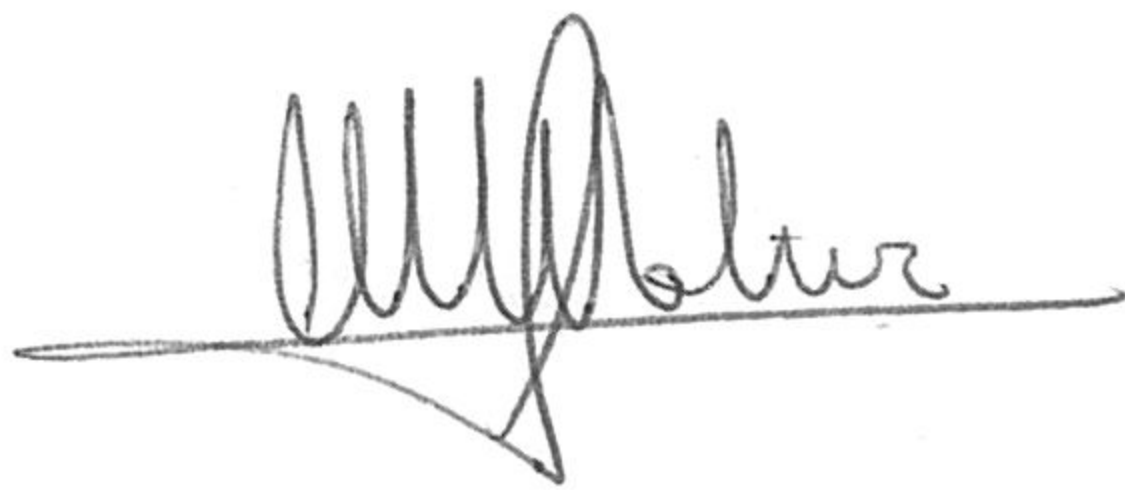
**Directores:**



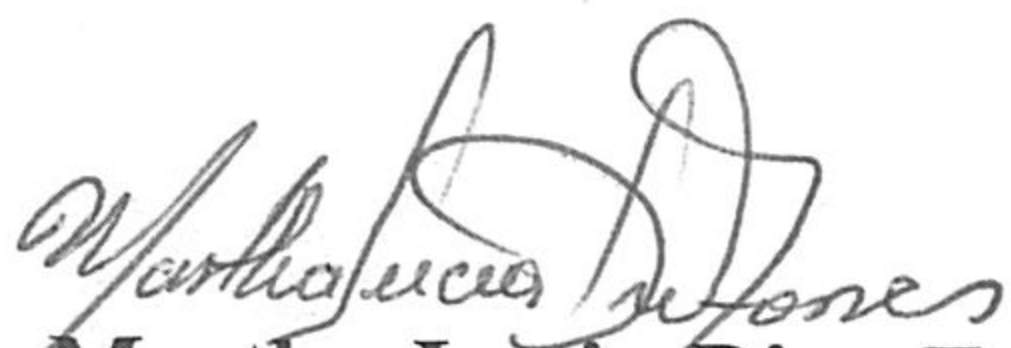
**Dra. Mercedes Maqueda Abreu**



**Dra. Eva Valdivia Martínez**



**Dr. Manuel Martínez Bueno.**



**Fdo. Martha Lucia Diaz Torres**

**Aspirante al grado de Doctor en Ciencias.**

Esta tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada durante los años 1995-1998, siendo subvencionada por el proyecto de la COMISION INTERMINISTERIAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA BIO95-0466 del Ministerio de Educación y Ciencia Español.

Para realizar los estudios de Doctorado la doctoranda disfrutó de una beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) durante los años 1996-1998.



|  | pag |
|--|-----|
| INTRODUCCION.....  | 15  |
| 1.-CONCEPTOS SOBRE ANTAGONISMO BACTERIANO.....   | 15  |
| 1.1.-Interés aplicado de las bacteriocinas.....  | 17  |
| 2.-EL GENERO <i>Enterococcus</i> .....   | 19  |
| 2.1.-Características genéticas de los enterococos.....   | 20  |
| 2.2.-Antagonistas producidos por <i>E. faecalis</i> .....  | 23  |
| 2.2.1.-Citolisina.....   | 23  |
| 2.2.2.-Bacteriocina 31.....  | 26  |
| 2.2.3.-Péptido AS-48.....  | 26  |
| 2.2.3.1.-Características y naturaleza.....   | 26  |
| 2.2.3.2.-Actividad biológica de AS-48.....   | 28  |
| 2.2.3.3.-Determinantes genéticos<br>responsables de AS-48.....   | 30  |
| 3.-EL GENERO <i>Lactococcus</i> .....  | 36  |
| 3.1.-Importancia biotecnológica y aplicaciones<br>de las bacterias del género <i>Lactococcus</i> ..... | 37  |
| OBJETO DEL TRABAJO.....  | 41  |
| MATERIAL Y METODOS.....  | 45  |
| 1.-MICROORGANISMOS Y PLÁSMIDOS.....  | 45  |
| 1.1.-Cepas bacterianas.....  | 45  |
| 1.2.-Plásmidos.....  | 45  |
| 2.-MEDIOS DE CULTIVO.....  | 50  |
| 2.1.-Medios de crecimiento.....  | 50  |
| 2.2.-Medios empleados en la conservación<br>de microorganismos.....                                    | 51  |
| 2.3.-Medios empleados para detección<br>de características bioquímicas.....                            | 52  |



|  |    |
|--|----|
| 2.4.-Medios utilizados para la producción AS-48.....   | 53 |
| 2.5.-Medios sólidos utilizados para ensayos de resistencia frente a AS-48.....                   | 53 |
| 2.6.-Medios utilizados para ensayos de mutagénesis con <i>Tn5</i> .....                          | 54 |
| 2.7.-Medios utilizados en los experimentos de electrotransformación ( electroporación ).....     | 54 |
| 2.8.-Tampones utilizados en los medios de cultivo.....   | 55 |
| 3.-PRODUCTOS Y REACTIVOS EMPLEADOS.....  | 55 |
| 4.-DETERMINACION DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE AS-48.....                                      | 57 |
| 4.1.-Curvas de crecimiento y producción de AS-48.....  | 57 |
| 4.2.-Purificación de la bacteriocina AS-48.....  | 58 |
| 4.3.-Determinación de la concentración de proteínas.....   | 58 |
| 4.4.-Valoración de la actividad AS-48.....   | 59 |
| 4.4.1.-Detección de AS-48 en preparaciones líquidas.....   | 59 |
| 4.4.2.-Detección y valoración de AS-48 producida en medio sólido.....                            | 60 |
| 5.-DETECCION Y VALORACION DE LA RESISTENCIA FRENTE A AS-48.....                                  | 60 |
| 5.1.-Detección de la resistencia en medio líquido.....   | 61 |
| 5.2.-Detección de la resistencia en medio sólido.....  | 61 |
| 6.-TECNICAS GENETICAS.....   | 61 |
| 6.1.-Aislamiento rápido de ADN a partir de pequeños volúmenes de cultivo: Minipreparaciones..... | 61 |
| 6.1.1.-Minipreparaciones de enterococos y lactococos.....  | 62 |
| 6.1.2.-Minipreparación de plásmidos de <i>E.coli</i> .....                                       | 63 |

|  |    |
|--|----|
| 6.2.-Aislamiento de plásmidos a gran escala : Maxipreparaciones.....   | 64 |
| 6.2.1.-Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E.coli</i> mediante lisis alcalina.....                                 | 64 |
| 6.2.2.-Maxipreparaciones de plásmidos de <i>E.faecalis</i> .....   | 65 |
| 6.3.-Purificación de ADN plasmídico.....   | 66 |
| 6.3.1.-Purificación de ADN plasmídico en gradiente de CsCl.....  | 66 |
| 6.3.2.-Extracción y purificación de ADN de <i>E.coli</i> .....   | 66 |
| 6.3.3.-Purificación de ADN a partir de la agarosa.....   | 66 |
| 6.3.4.-Separación e identificación de plásmidos o fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa..... | 67 |
| 6.4.-Determinación de la concentración de ADN y ARN.....   | 68 |
| 6.5.-Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.....   | 69 |
| 6.6.-Desfosforilación del vector de ligación.....  | 70 |
| 6.7.-Ligación del ADN.....   | 70 |
| 6.8.-Transformación genética de <i>E.coli</i> .....  | 71 |
| 6.8.1.-Método del CaCl <sub>2</sub> .....  | 71 |
| 6.8.2.-Electrotransformación.....  | 72 |
| 6.9.-Electrotransformación de <i>L.lactis</i> LM2301 y <i>E.faecalis</i> JH2-2.....                                | 72 |
| 6.10.-Selección y análisis de los transformantes de <i>E.coli</i> seleccionados.....                               | 73 |
| 6.11.-Estudio de la estabilidad de los plásmidos recombinantes.....  | 73 |
| 6.12.-Amplificación del ADN mediante la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....                             | 74 |
| 6.12.1.-Técnica de PCR.....  | 74 |

|   |    |
|---|----|
| 6.12.2.-Preparación mediante PCR,<br>de sondas no radiactivas marcadas<br>con digoxigenina 11-dUTP.....       | 76 |
| 6.13.-Secuenciación del ADN.....  | 76 |
| 6.14.-Análisis de las secuencias<br>de ADN y proteínas.....   | 77 |
| 6.15.-Mutagénesis de los plásmidos<br>recombinantes mediante en el transposón <i>Tn5</i> .....                | 78 |
| 6.15.1.-Obtención de una suspensión<br>del fago lambda 467.....   | 78 |
| 6.15.2.-Inserciones con el transposón <i>Tn5</i> .....  | 78 |
| 6.16.-Extracción del ARN total de <i>E.faecalis</i> .....   | 80 |
| 6.17.-Transferencia de los ARNs a membranas<br>( Northern blotting).....                                      | 81 |
| 6.17.1.-Electroforesis desnaturalizante del ARN.....  | 81 |
| 6.17.2.-Transferencia del ARN a membranas<br>de nylon.....  | 82 |
| 6.17.3.-Hibridación de ADN-ARN.....   | 82 |
| 6.17.4.-Revelado inmunológico.....  | 83 |
| 6.18.-Oligonucleótidos de síntesis<br>empleados en este trabajo.....  | 84 |
| <br>  |    |
| 7.-TECNICAS PARA PROTEINAS.....   | 84 |
| 7.1.-Obtención de lisados y fracciones<br>subcelulares de enterococos y lactococos.....                       | 84 |
| 7.2.-Electroforesis en geles de<br>poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes<br>(PAGE-SDS).....         | 87 |
| 7.2.1.-Preparación de los geles.....  | 87 |
| 7.2.2.-Condiciones de desarrollo de<br>la electroforesis.....   | 87 |
| 7.3.-Transferencia de proteínas a membranas<br>de nitrocelulosa y revelado inmunológico<br>de las mismas..... | 89 |
| 7.3.1.-Transferencia de proteínas a membranas<br>de nitrocelulosa ( Western blotting).....                    | 89 |
| 7.3.2-Revelado inmunológico de las proteínas<br>transferidas.....   | 90 |

|  |     |
|--|-----|
| RESULTADOS.....  | 93  |
| 1.-CONSTRUCCIÓN DE DIFERENTES PLÁSMIDOS<br>RECOMBINANTES.....  | 93  |
| 1.1.-Clonación parcial de pMB2 en pSL1180.....   | 93  |
| 1.2.-Clonación del fragmento CB en pAM401.....   | 94  |
| 1.3.-Construcción del plásmido pAM401-81.....  | 99  |
| 2.-TRANSFORMACIÓN DE CEPAS DE <i>E.faecalis</i> JH2-2.....   | 99  |
| 3.-SECUENCIACIÓN DE LA REGION GENÉTICA AS-48.....  | 99  |
| 3.1.-Secuenciación de la región situadas<br>aguas abajo del fragmento C <i>Bgl</i> III.....  | 99  |
| 3.2.-Secuenciación de la región genética<br>situada aguas arriba del gen estructural<br><i>as-48A</i> .....                          | 100 |
| 3.3.-Mapa físico y genético de los plásmidos<br>pAM401-52, pAM401-81 y pAM401-CB.....  | 113 |
| 4.-ANÁLISIS DE HOMOLOGÍA Y PREDICCIÓN<br>DE ESTRUCTURAS.....   | 115 |
| 5.-GENERACIÓN DE MUTANTES.....   | 127 |
| 5.1.-Mutante de delección.....   |     |
| 5.2.-Mutantes de inserción con el transposón<br><i>Tn5</i> .....   | 127 |
| 5.3.-Obtención de los transformantes de<br><i>E.faecalis</i> JH2-2.....  | 130 |
| 6.-PRODUCCIÓN DE AS-48.....  | 130 |
| 6.1.-Producción de AS-48 por los transformantes<br>de <i>E.faecalis</i> .....  | 130 |
| 6.2.-Caracterización de los diferentes<br>mutantes de inserción obtenidos en pAM401-81<br>en relación a su capacidad productora..... | 133 |

|  |     |
|--|-----|
| 7.-ESTUDIO DE LOS NIVELES DE RESISTENCIA<br>FRENTE A AS-48.....                                      | 137 |
| 7.1.-Resistencia de los diferentes<br>transformantes.....  | 137 |
| 7.2.-Niveles de resistencia de nuevas<br>construcciones obtenidas.....                               | 137 |
| 7.3.-Niveles de resistencia de diferentes<br>mutantes de inserción.....                              | 138 |
| 8.-ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL PLÁSMIDO<br>RECOMBINANTE pAM401-81.....                             | 141 |
| 9.-ANÁLISIS DE TRANSCRIPCIÓN.....  | 143 |
| 9.1.-Detección de ARN mensajeros.....  | 143 |
| 10.-TRANSFERENCIA Y EXPRESIÓN DEL CARÁCTER<br>AS-48 A CEPAS DE <i>Lactococcus lactis</i> LM2301..... | 146 |
| 10.1.-Electrotransformación de <i>L.lactis</i> LM2301.....   | 146 |
| 10.2.-Caracterización de los transformantes.....   | 146 |
| 10.3.-Producción de AS-48 por los diferentes<br>transformantes de <i>L.lactis</i> LM2301.....        | 148 |
| 10.3.1.-Detección e identificación de AS-48<br>mediante técnicas inmunológicas.....                  | 148 |
| 10.3.2.-detección e identificación de AS-48<br>mediante HPLC.....                                    | 149 |
| 10.4.-Niveles de resistencia de los<br>diferentes transformantes frente a AS-48.....                 | 152 |
| 10.5.-Retrotransformación de <i>E-faecalis</i> JH2-2.....  | 152 |
| DISCUSION.....   | 157 |
| CONCLUSIONES.....  | 177 |
| BIBLIOGRAFIA.....  | 181 |

## **INTRODUCCIÓN**

---

## **INTRODUCCIÓN**

### 1.- CONCEPTOS SOBRE ANTAGONISMO BACTERIANO

La interferencia bacteriana, referida a las relaciones de antagonismo que ocurren entre las bacterias, es un fenómeno ya referido por Pasteur & Joubert cuando describieron las relaciones comensalistas entre una bacteria "normal" (probablemente *Escherichia. coli*) y el bacilo del ántrax. Hoy día no sabemos cuánto había de inhibición específica y cuánto de falta de nutrientes o de acúmulo de metabolitos tóxicos en esta interacción.

Aunque se han señalado desde entonces muchos casos de interferencia bacteriana, quizás el primero que se pueda atribuir a la producción de bacteriocinas se deba a Babes, que en 1895 (Florey *et al.*, 1949) observó que "los estafilococos cuando crecen en medio sólido impiden sobre todo el crecimiento de otros estafilococos". El primer investigador que se refirió a la naturaleza del antagonista fue Gratia, quién en 1925 demostró que la raza V de *E. coli* producía en medio líquido una sustancia dializable y estable al calor, que fué referida que inhibía el crecimiento de *E. coli*  $\phi$ , posteriormente como colicina V.

En términos muy generales, las sustancias antagonistas específicas pueden encuadrarse en dos grandes grupos, uno, el de los antibióticos clásicos, y el otro, de mas reciente definición, constituido por las bacteriocinas. Sin embargo, en los últimos años y sobre todo en el caso de bacterias Gram-positivas, se han descrito un gran número de pequeños péptidos antimicrobianos que hacen cada vez mas imprecisas las fronteras entre uno y otro grupo (Kolter & Moreno, 1992).

Respecto del primer grupo de antibacterianos, el término antibiótico se acuñó para designar sustancias de origen biológico y naturaleza química variada, generalmente con bajo peso molecular y potente efecto antibacteriano sobre una amplia gama de microorganismos. Éstos, son producidos principalmente como metabolitos secundarios sobretudo por los miembros de los géneros *Streptomyces* y *Bacillus*. Se trata de moléculas no proteicas, o si lo son, de síntesis no ribosómica.

Las bacteriocinas fueron definidas inicialmente en base a las características de las colicinas (Jacob *et al.*, 1953) inhibidores bacterianos producidos por miembros de la Familia *Enterobacteriaceae*- con expresa referencia a su actividad antibacteriana intraespecífica y la

adsorción a receptores específicos de las células diana. A esta definición también podrían ajustarse, con algunas salvedades, las microcinas, término que surgió para designar a antagonistas producidos por enterobacterias, de naturaleza proteica y síntesis ribosómica, con bajo peso molecular y espectro de acción reducido a especies relacionadas (Asensio & Perez-Diaz, 1976). Una característica significativa de ellas es que, al contrario que la mayoría de las colicinas, son capaces de producirse y ejercer su acción antibiótica bajo condiciones de privación nutricional, por lo que se trata de uno de los pocos grupos de inhibidores bacterianos a los que se les ha asignado un claro papel ecológico.

Sin embargo, en el caso de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas, surgieron serias dificultades a la hora de ajustarlas a esta definición, especialmente en lo que se refiere al espectro de acción, en general más amplio. Como alternativa a este confuso panorama, Konisky en 1982, propuso que el término "bacteriocina" se empleara para designar "proteínas o complejos de proteínas, con actividad antibacteriana, no activas frente a la estirpe productora", definición que por lo relajada conduce a un solapamiento, cada vez mayor, entre las bacteriocinas propiamente dichas y varios de los recientemente denominados péptidos antibióticos.

Recientemente (Tagg, 1992; Jack *et al.*, 1995) han redefinido el término bacteriocina como "productos bacterianos extracelulares, de síntesis ribosómica, primarios o modificados, que tienen un espectro de acción bactericida relativamente estrecho, sobre al menos algunas razas de la misma especie que la raza productora, la cual presenta a su vez un mecanismo específico de autoprotección". En esta definición se pueden incluir tanto las bacteriocinas clásicas como los nuevos péptidos antibióticos denominados lantibióticos. Como alternativa, Tagg (1992), recomendó que se conservara la definición original para designar aquellos inhibidores de bacterias Gram-positivas que fuesen muy parecidos a las colicinas, siendo entonces referidos éstos como sustancias inhibidoras tipo bacteriocinas (bacteriocin-like inhibitory substances, BLIS).

Otro término, muy usado actualmente, es el de "péptido antimicrobiano de síntesis ribosómica" (RSAP), que permite superar la vieja controversia de la definición de bacteriocina, si bien es cierto, que este término se usa más comúnmente para designar a un grupo particular de inhibidores, el de los lantibióticos (Hansen, 1994).



### 1.1.- Interés aplicado de las bacteriocinas

Entre los principales campos de aplicación de las bacteriocinas destaca la conservación de alimentos y la interferencia bacteriana.

En lo que respecta a la primera aplicación, desde hace algunos años se viene dedicando una gran atención al estudio de las bacteriocinas de las bacterias del ácido láctico (BAL). Esto es debido a que en nuestros días las BAL son consideradas como microorganismos seguros (GRAS: generally recognized as safe), esto es, que los consumidores no recelan de su uso en la elaboración de alimentos fermentados; de hecho ésta ha sido una práctica tradicional desde que los humanos se plantearon la necesidad de prolongar la vida de los alimentos. En este campo, el empleo de cepas productoras de bacteriocinas como iniciadoras en las fermentaciones, podría ser de interés al eliminar la interferencia de microorganismos no deseados, en el desarrollo de las mismas.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que, una consecuencia tecnológica de la producción de bacteriocinas por una bacteria, es su eventual predominio en una mezcla de cepas. Por tanto en el diseño de inóculos mediante mezcla de razas puras seleccionadas según sus características tecnológicas, debe de tenerse en cuenta de forma ineludible su compatibilidad, dada la eventual producción de bacteriocinas. En caso contrario, esta mezcla se desequilibraría rápidamente, por eliminación de una o varias cepas, dando lugar a la pérdida de ciertas propiedades tecnológicas.

La segunda aplicación tecnológica de la producción de bacteriocinas, es el diseño y empleo de nuevos tipos de fermentos que inhiban la microbiota indeseable deterioradora de alimentos, permitiendo así alargar su vida media o que impidan la proliferación de patógenos, vehiculizados por los mismos, como *Listeria monocytogenes* (Ray & Daeschel, 1992; Stiles & Hasting, 1991).

A estas cualidades hay que añadir el hecho de que, al ser sustancias proteicas, son inherentemente no tóxicas, ya que son hidrolizadas por los enzimas digestivos, lo que no ocurre con los clásicos antibióticos; además, debido a que su estructura está dictada directamente por secuencias génicas, pueden ser fácilmente manipuladas mediante ingeniería

genética para obtener una enorme variedad de análogos de péptidos naturales, que posean las características deseadas.

Sin embargo, si bien es posible el uso de las bacteriocinas en la industria alimentaria, para que una sustancia inhibidora pueda ser desarrollada como aditivo industrial, debe reunir una serie de características:

- Amplio espectro de acción, que afecte a bacterias Gram positivas y a Gram negativas, de forma que permita controlar no solo a *L. monocytogenes* y ciertos esporulados sino también a *E. coli* y *Salmonella*.
- Modo de acción bactericida, para evitar que se reinicie el crecimiento de los microorganismos indeseables, cuando se restablezcan las condiciones favorables para ello en el medio.
- Presentar buena actividad y estabilidad en las condiciones tecnológicas que concurren en todas las etapas de la fabricación de los productos, especialmente en lo que se refiere al pH y temperatura.
- No perturbar la cinética de acidificación de los cultivos iniciadores y no inhibirlos.
- Presentar una adecuada inocuidad para los consumidores, especialmente no desarrollar alergias y no perturbar los equilibrios de la microbiota intestinal.

Actualmente la nisina es, sin duda, la bacteriocina de uso más amplio, ya que está siendo aplicada en más de 48 países, sin embargo su uso presenta algunas limitaciones, como el que su actividad desaparece poco a poco en el transcurso de la conservación de los quesos fundidos, su baja solubilidad y actividad a pHs neutros y alcalinos, su adsorción a los componentes de los alimentos y su espectro restringido a bacterias Gram-positivas. Por todo ello están siendo investigadas otras muchas bacteriocinas producidas por lactococos y por otras BAL para su empleo alternativo o incluso conjunto con la nisina.

### 2.- EL GENERO *Enterococcus*.

Los enterococos son cocos Gram-positivos que se agrupan en parejas o en cortas cadenas. Algunas especies son pigmentadas (*E. mundtii*, *E. casseliflavus*) o móviles (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum*). En general son anaerobios aerotolerantes, ya que aunque carecen de catalasa, poseen superóxido dismutasas y peroxidasas que destruyen respectivamente el  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  que se produce en condiciones de aerobiosis (Piard & Desmazeud 1991).

La mayoría de los enterococos son, pues, anaerobios facultativos, quimioorganotrófos, produciendo como producto final de la fermentación de los carbohidratos predominantemente ácido láctico, y, en menores cantidades, ácido acético, ácido fórmico y etanol aunque no gas. Podrían considerarse por tanto, bacterias del ácido láctico (BAL). Taxonómicamente las BAL engloban los cuatro géneros tradicionales *Streptococcus* (hoy subdividido en *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y *Enterococcus*), *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, a los cuales se han añadido otros de más reciente definición como *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Erysipelothrix*, *Gemella*, *Globicatella*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus*, *Atopobium*, *Alloicoccus* y *Weisella*. Estas bacterias pertenecen a la subdivisión *Clostridium* de las eubacterias Gram-positivas (contenido en G+C inferior al 50%).

Los estudios de hibridación ADN/ARN ribosómico y la determinación y análisis de secuencias del ARNr 16S han mostrado que los enterococos forman un grupo coherente desde el punto de vista filogenético.

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

La denominación de *Streptococcus faecalis* fué acuñada por Andrewes y Horder en 1906 aludiendo el nombre específico al hábitat de dicho microorganismo, el intestino. Desde entonces, se han mantenido diferentes opiniones sobre la nomenclatura de esta bacteria que

han estado relacionadas con la polémica en torno a la clasificación del género *Streptococcus*.

Sherman en 1937 propuso una clasificación esquemática, que estructuraba a los estreptococos en 4 grupos: piógenos, viridans, lácticos y enterococos. El último grupo englobaba a aquellos microorganismos que crecen entre 10 y 45 °C, a pH 9,6, resisten concentraciones del 6,5% de NaCl, y además sobreviven tras calentamiento durante 30 minutos a 60 °C.

La clasificación de Sherman también se relaciona con los grupos de Lancefield, en base a la presencia de un antígeno de pared, la sustancia C. Siguiendo este criterio, el enterococo reacciona con el antisuero del grupo D, mientras que los estreptococos piógenos reaccionan con alguno de los antisueros de los grupos A, B, C, E, F, ó G, los estreptococos viridans no son agrupables, y los estreptococos lácticos son aglutinables por los sueros anti-N. El antígeno del grupo D no está asociado solamente a este grupo ya que otras especies de *Streptococcus* también lo poseen (*S. alactolyticus*, *S. suis*, *S. bovis* y *S. equinus*). Además, la especie *Streptococcus cecorum*, que no presenta el antígeno D, ha sido reclasificada en el género *Enterococcus* (Williams *et al.*, 1989).

En 1984, Schleifer y Kilpper-Bälz propusieron para las especies *S. faecalis* y *S. faecium* la inclusión en un nuevo grupo, el género *Enterococcus*, al que posteriormente, estudios quimiotaxonómicos llevados a cabo, permitieron asignar otras especies pertenecientes al grupo D: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* y *E. malodoratus* (Collins *et al.*, 1984), aunque también han sido descritas otras cinco especies (*E. hirae*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus* y *E. solitarius*). Las especies actualmente aceptadas en el género *Enterococcus*, se muestran en la Tabla 1 (Devriese *et al.*, 1992).

### 2.1.- Características genéticas de los enterococos.

Los enterococos, a semejanza con otras bacterias, poseen una gran variedad de elementos que facilitan el movimiento de información genética intra e intercelularmente, representados por plásmidos (responsables de hemolisinas, bacteriocinas y resistencia a antibióticos) y transposones.

Tabla 1.- Especies del género de *Enterococcus* ( Devriese et al.,1992)

| Test                        | <i>E. faecalis</i> | <i>E. faecium</i> | <i>E. hirae</i> | <i>E. durans</i> | <i>E. gallinarum</i> | <i>E. avium</i> | <i>E. casseliflavus</i> | <i>E. mundtii</i> | <i>E. malodoratus</i> | <i>E. pseudoavium</i> | <i>E. solitarius</i> | <i>E. raffinosus</i> | <i>E. cecorum</i> |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|-----------------|------------------|----------------------|-----------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| Acido de :                  |                    |                   |                 |                  |                      |                 |                         |                   |                       |                       |                      |                      |                   |
| L-arablnosa                 | -                  | +                 | -               | -                | +                    | +               | +                       | +                 | -                     | -                     | -                    | +                    | -                 |
| Manitol                     | +                  | +                 | -               | -                | +                    | +               | +                       | +                 | +                     | +                     | +                    | +                    | -                 |
| Sorbitol                    | +                  | -                 | -               | -                | -                    | +               | -                       | D                 | +                     | +                     | +                    | +                    | -                 |
| Rafinosa                    | -                  | D                 | D               | -                | +                    | -               | +                       | +                 | +                     | -                     | +                    | +                    | +                 |
| Sacarosa                    | +                  | +                 | +               | -                | +                    | +               | +                       | +                 | +                     | -                     | +                    | +                    | +                 |
| Meloblosa                   | -                  | +                 | +               | -                | +                    | -               | +                       | +                 | +                     | -                     | +                    | +                    | +                 |
| Movilidad                   | -                  | -                 | -               | -                | +                    | -               | +                       | -                 | -                     | -                     | -                    | -                    | -                 |
| Pigmento amarillo           | -                  | -                 | -               | -                | -                    | -               | +                       | +                 | -                     | -                     | -                    | -                    | -                 |
| Crecimiento en 6.5% de NaCl | +                  | +                 | +               | +                | +                    | D               | +                       | +                 | +                     | +                     | +                    | +                    | -                 |
| Pirrolidoni-amilidasa       | +                  | +                 | +               | +                | +                    | +               | +                       | +                 | +                     | +                     | +                    | +                    | -                 |

La localización intestinal de estas bacterias y la abundancia en ellas de elementos genéticos extracromosómicos, podría asignarle un papel de reservorio de información genética, que estaría disponible para otras bacterias Gram-positivas intestinales, e incluso para algunas Gram-negativas.

De todas las especies de este grupo, *E. faecalis* es la mejor caracterizada genéticamente a nivel plasmídico, debido a que presenta una gran cantidad de estos elementos y algunos son transmisibles por vía conjugativa.

En 1981 Clewell revisó toda la información disponible y encontró que se habían descrito en *E. faecalis* un total de 47 plásmidos diferentes, mientras que en las restantes especies de enterococos sólo se habían identificado 38. En esta especie se pueden encontrar diferentes tipos de plásmidos: pequeños plásmidos crípticos y grandes plásmidos conjugativos que responden o no, a feromonas sexuales.

*Enterococcus faecalis* fué la primera especie en la que se describió la existencia de los llamados plásmidos "sexuales", con algunas características que los diferencian de los plásmidos conjugativos "normales", dentro de las bacterias Gram-positivas (Dunny *et al.*, 1978). Sin embargo, se han descrito recientemente nuevos grupos en los que la reacción de agregación aumenta la frecuencia de transferencia de genes, tal es el caso de *Bacillus thuringiensis* (Andrup *et al.*, 1993), *Lactobacillus plantarum* (Reniero *et al.*, 1992) y *Lactococcus lactis* (Van der Lelie *et al.*, 1991), de entre los cuales *L. lactis* es el que muestra características fenotípicas similares a las de *E. faecalis*.

De manera general podemos establecer las siguientes diferencias entre ambas clases de plásmidos conjugativos:

- Los plásmidos normales portan determinantes de resistencia a drogas, mientras que en los plásmidos sexuales éstos sólo se encuentran ocasionalmente.
- Con alguna frecuencia, ambos tipos de plásmidos pueden coexistir en una misma raza, entonces, la frecuencia de transferencia de los plásmidos normales puede verse indirectamente incrementada por la presencia de los plásmidos sexuales, ya que la respuesta a las feromonas sexuales supone un estrecho contacto físico y más prolongado, entre las razas donadoras y receptoras.
- Los plásmidos normales tienen rango amplio de hospedador, mientras que los plásmidos que responden a feromonas sexuales parecen estar restringidos a *E. faecalis*, única especie en donde se ha detectado con toda claridad el sistema de

feromonas (Dunny *et al.*, 1978).

- Los plásmidos que responden a feromonas presentan la capacidad de transferirse en medio líquido, a diferencia de los plásmidos normales que requieren superficies sólidas (cruces en filtro).

### 2.2.- Antagonistas producidos por *Enterococcus faecalis*

La producción de bacteriocinas por los enterococos (comunmente denominadas enterocinas) ha sido referida en varias ocasiones (Brock *et al.*, 1963; Gálvez *et al.*, 1985). Sin embargo, ha sido recientemente cuando se ha despertado mayor interés por ellas, ya que se ha encontrado que su producción es muy frecuente entre las cepas de enterococos que se aíslan de forma natural de diversos sistemas alimentarios, como el queso y los encurtidos (Giraffa, 1995). En tales medios es posible que cumplan un importante papel en el control de la microbiota indeseable, bien patógena como *Listeria monocytogenes*, o deterioradora como *Clostridium* (Piard & Desmazeaud, 1992, Nettles & Barefoot, 1993).

De todas las bacteriocinas descritas, sólo algunas han sido bien caracterizadas desde el punto de vista genético y bioquímico. Entre ellas, podríamos destacar tres tipos: la citolisina que es una bacteriocina/hemolisina, la bacteriocina 31 y el péptido AS-48 que presentan en común el estar codificadas por plásmidos conjugativos que responden a feromonas (pAD1, pY117 y pMB2, respectivamente).

#### 2.2.1.- Citolisina

Algunas razas de *E. faecalis*, especialmente las de origen clínico, presentan un fenotipo hemolítico asociado a una actividad bacteriocina con acción lítica frente a bacterias Gram-positivas y determinadas células eucariotas. Ya en los primeros estudios, se puso de manifiesto que ambas actividades eran atribuibles a la misma sustancia, que fué por ello denominada citolisina (Brock & Davies, 1963). Se trata además, de una molécula de naturaleza compleja, ya que el componente lítico (L) éste constituido por dos subunidades estructurales, Cyl<sub>L</sub> y Cyl<sub>S</sub>, que han de ser activados por un tercer componente activador

(Cyl<sub>A</sub>) (Granato & Jackson, 1960; Ike *et al.*, 1990; Booth *et al.*, 1996).

Los determinantes genéticos de la citolisina, que barcan una región de 7 kb, se encuentran en el plásmido pAD1 (59 kb) de *E. faecalis* subsp. *zymogenes* (Jacob *et al.*, 1970; Gilmore *et al.*, 1990, 1994) y están organizados en dos regiones L y A (Ike *et al.*, 1990). La región L comprende cuatro ORFs (*cylL<sub>L</sub>*, *cylL<sub>S</sub>*, *cylL<sub>M</sub>* y *cylL<sub>B</sub>*) con la información necesaria para la producción de los componentes líticos así como genes con funciones auxiliares: el producto de *cylM* (M) que es responsable de la modificación postraducciona l de las subunidades L<sub>L</sub> y L<sub>S</sub> en moléculas con características de lantibióticos y el sistema de secreción (*cylB*) (Booth *et al.*, 1996). La región A contiene el gen estructural para el activador (*cylA*). Asimismo es sabido que el componente A de la citolisina (*cylA*) que es secretada al espacio extracelular, tiene actividad serín-proteasa, y es sintetizada como un preproenzima por lo que ha de sufrir un procesamiento postraducciona l para originar una proteína madura de 38,4 kDa con actividad proteásica (Segarra *et al.*, 1991; Booth *et al.*, 1996).

La expresión y maduración de la citolisina ha resultado ser un proceso más complejo de lo inicialmente descrito, para el cual se ha propuesto el siguiente modelo (Figura 1):

\* Las subunidades Cyl<sub>L</sub> y Cyl<sub>S</sub> son modificados postraducciona lmente por la proteína citosólica Cyl<sub>M</sub>, para formar los lantibióticos precursores (Cyl<sub>L</sub>\* y Cyl<sub>S</sub>\*) (Gilmore *et al.*, 1994).

\* entonces ambos precursores son translocados a través de la membrana citoplasmática por un transportador ABC, que ha sido asignado al componente Cyl<sub>B</sub>, una proteína relacionada con la proteína *HlyB* del operón alfa-hemolisina de *E. coli*, con homología significativa con proteínas de la familia de transportadores ABC (Gilmore *et al.*, 1990, 1994). Cyl<sub>B</sub> presumiblemente presenta actividad proteolítica y es la responsable de retirar el péptido líder de ambas subunidades, transformándolas en Cyl<sub>L</sub>' y Cyl<sub>S</sub>' (Havarstein *et al.*, 1995).

\* finalmente, en el espacio extracelular, los precursores son procesados proteolíticamente por Cyl<sub>A</sub> que elimina una secuencia de 6 residuos (GDVQAE) dentro de una región conservada de 26 aminoácidos que presentan ambos precursores. De esta forma se originan las subunidades activas Cyl<sub>L</sub>'' y Cyl<sub>S</sub>'' cuya interacción parece imprescindible



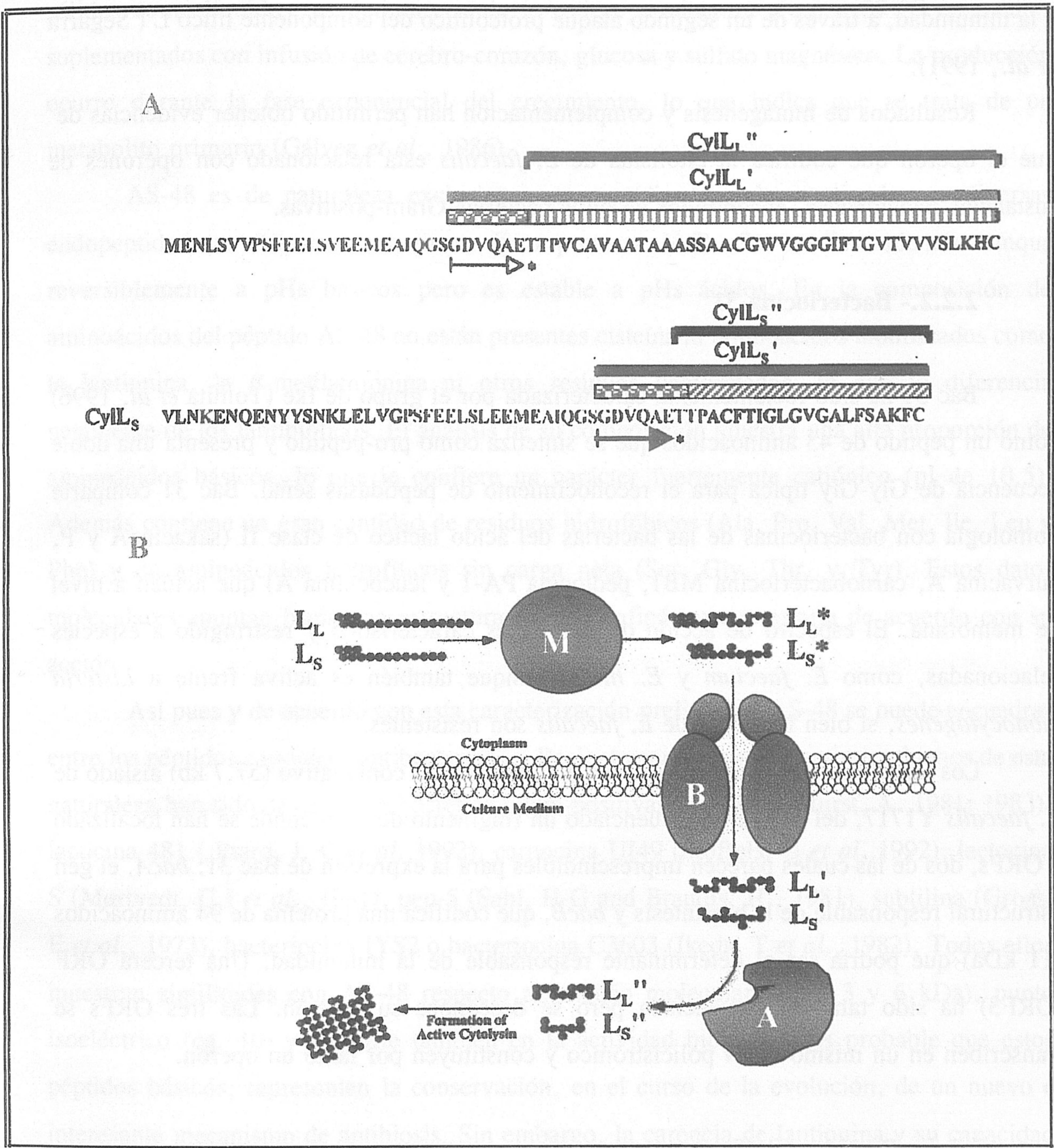


Figura 1.- A. Secuencia de aminoácidos de los componentes estructurales CylL<sub>L</sub> y CylL<sub>S</sub>  
 B. Modelo de la modificación postraduccion, exporte y activación de la citolisina en *E. faecalis*. (Gilmore *et al.*, 1994)

para la formación de la molécula de citolisina activa.

En previos estudios se había sugerido además que el producto del gen *cyIA* contribuye a la inmunidad, a través de un segundo ataque proteolítico del componente lítico L ( Segarra *et al.*, 1991).

Resultados de mutagénesis y complementación han permitido obtener evidencias de que el operón que codifica la citolisina de *E. faecalis* está relacionado con operones de sustancias relacionadas, encontrados en otras bacterias Gram-positivas.

### 2.2.2.- Bacteriocina 31

Bac 31 ha sido recientemente caracterizada por el grupo de Ike (Tomita *et al.*, 1996) como un péptido de 43 aminoácidos que se sintetiza como pro-péptido y presenta una doble secuencia de Gly-Gly típica para el reconocimiento de peptidasas señal. Bac 31 comparte homología con bacteriocinas de las bacterias del ácido láctico de clase II (sakacinaA y P, curvacina A, carnobacteriocina MB1, pediocina PA-1 y leucocidina A) que actúan a nivel de membrana. El espectro de acción de Bac 31 es característico y restringido a especies relacionadas, como *E. faecium* y *E. hirae*, aunque también es activa frente a *Listeria monocytogenes*, si bien las cepas de *E. faecalis* son resistentes.

Los determinantes genéticos residen en un plásmido conjugativo (57,7 kb) aislado de *E. faecalis* Y1717, del que se ha secuenciado un fragmento de 1-kb donde se han localizado 3 ORFs, dos de las cuales parecen imprescindibles para la expresión de Bac 31: *bacA*, el gen estructural responsable de la biosíntesis y *bacB*, que codifica una proteína de 94 aminoácidos (11 kDa) que podría ser el determinante responsable de la inmunidad. Una tercera ORF (ORF3) ha sido también secuenciada pero se desconoce su función. Las tres ORFs se transcriben en un mismo ARN policistrónico y constituyen por tanto un operón.

### 2.2.3.- Péptido AS-48

#### 2.2.3.1.- Características y naturaleza

El péptido AS-48 ha sido aislado de *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48 (Gálvez *et al.*, 1985). Su producción, que tiene lugar en diversos tipos de medios tanto

sólidos como líquidos, es óptima cuando la estirpe productora crece a 37 °C en medios suplementados con infusión de cerebro-corazón, glucosa y sulfato magnésico. La producción ocurre durante la fase exponencial del crecimiento, lo que indica que se trata de un metabolito primario (Gálvez *et al.*, 1986).

AS-48 es de naturaleza exclusivamente peptídica, siendo inactivado por diversas endopeptidasas (tripsina, proteinasa K o proteasa V-8). Se inactiva además aunque reversiblemente a pHs básicos pero es estable a pHs ácidos. En la composición de aminoácidos del péptido AS-48 no están presentes cisteína ni aminoácidos modificados como la lantionina, la  $\beta$ -metilantionina ni otros residuos deshidratados, lo que lo diferencia netamente de los lantibióticos. El análisis de su composición muestra una alta proporción de aminoácidos básicos, lo que le confiere un carácter fuertemente catiónico (pI de 10,5). Además contiene un gran cantidad de residuos hidrofóbicos (Ala, Pro, Val, Met, Ile, Leu y Phe) y de aminoácidos hidrofílicos sin carga neta (Ser, Gly, Thr, y Tyr). Estos datos moleculares apuntan hacia una estructura de tipo anfipático que estaría de acuerdo con su acción.

Así pues y de acuerdo con esta caracterización preliminar, AS-48 se puede encuadrar entre los péptidos catiónicos antibacterianos. Recientemente, muchos antimicrobianos de esta naturaleza han sido descritos en bacterias Gram-positivas i.e. nisina (Hurst, A., 1981; 1983), lacticina 481 (Piard, J. C *et al.*, 1992), carnocina UI49 (Stoffels, G *et al.*, 1992), lactocina S (Mørtvedt, C.I *et al.*, 1991), pep-5 (Sahl, H-G and Brandis, H., 1981), subtilina (Gross, E *et al.*, 1973), bacteriocina IYS2 o bacteriocina C3603 (Ikeda, T *et al.*, 1982). Todos ellos muestran similitudes con AS-48 respecto al tamaño molecular (entre 3 y 6 kDa), punto isoeléctrico (ca. 10) y en parte también en la actividad biológica. Es probable que estos péptidos básicos, representen la conservación, en el curso de la evolución, de un nuevo e interesante mecanismo de antibiosis. Sin embargo, la carencia de lantionina y su capacidad de inhibir a bacterias Gram-negativas, diferencian a AS-48 claramente de los péptidos referidos.

Este tipo de antagonistas muestran en común un mecanismo de acción que supone la formación de poros en la membranas de las células sensibles, mediante interacción de sus residuos hidrofóbicos y aquellos cargados positivamente, con las membranas bacterianas,

caracterizadas por presentar un alto potencial de membrana y alto contenido en lípidos cargados negativamente. Además este tipo de péptidos tienen una actividad bactericida más rápida que los antibióticos convencionales, y puedan representar por ello una interesante alternativa a los clásicos antibióticos. Los intentos realizados para determinar la estructura primaria de AS-48 mediante degradación Edman fueron infructuosos, lo que sugirió que tenía el extremo N-terminal bloqueado. Esta hipótesis fue apoyada por la resistencia a exopeptidasas tales como las carboxipeptidasas A y B. Por ello la estructura primaria completa de AS-48, ha sido determinada mediante análisis de digeridos obtenidos por tratamiento con endoproteasas Lys-C, Glu-C y quimiotripsina.

La masa molecular del péptido AS-48 establecida mediante espectrometría de masas con electrospray es de 714925, que se corresponde exactamente con la calculada sumando las de los diferentes residuos de AS-48, disminuida en la masa de una molécula de agua, producido por la formación de un enlace peptídico cabeza-cola, dato que ha sido confirmado por los estudios de secuenciación del gen estructural de AS-48. Este caso representa el primer ejemplo de modificación postraduccional que da lugar a una molécula con estructura cíclica por unión cabeza cola del producto génico (Samyn *et al.*, 1994).

Recientemente se ha realizado un estudio de resonancia de protones ( $^1\text{H}$  RMN) de AS-48 en solución acuosa, y los resultados obtenidos han permitido establecer la estructura secundaria de este péptido, requisito imprescindible para la resolución de su estructura tridimensional (Langdon *et al.*, 1998). Los datos del espectro de RMN de AS-48 ponen de manifiesto que la mayoría de los residuos se encuentran en estructuras helicoidales conectadas por cortas regiones de giro: las correspondientes a los residuos 9-21 (alfa1), 24-34 (alfa2) 40-47 (alfa3) 51-59 (alfa4) y 64-3 (alfa5).

### 2.2.3.2.- Actividad biológica de AS-48

AS-48 tiene un efecto bactericida sobre la gran mayoría de las bacterias Gram-positivas ensayadas, siendo especialmente sensibles ciertas estirpes de *Enterococcus*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Planococcus*. Asimismo es interesante resaltar la actividad de AS-48 frente a bacterias patógenas vehiculizadas por alimentos, como *Listeria*. A este respecto es notable la alta sensibilidad de *L. monocytogenes*, requiriendo concentraciones 50 veces menores que las necesarias para provocar un efecto bactericida y

bacteriolítico en otras bacterias sensibles como *Enterococcus* o *Bacillus*. Además, la cepa productora de AS-48 produce el péptido cuando crece conjuntamente con *L. monocytogenes*, siendo capaz de controlar y eliminar totalmente a las listerias cuando se encuentra en relación inicial de enterococos/listerias = 100. Estos resultados, aunque preliminares, ofrecen prometedoras perspectivas para el desarrollo de cultivos iniciadores que posibiliten el control del desarrollo de patógenos en alimentos (Mendoza *et al.*, 1999).

Aunque afecta también a diversas especies de bacterias Gram-negativas, éstas son mucho menos sensibles debido al efecto protector de la membrana externa. En general AS-48 no afecta a los organismos eucariotas ensayados, si bien a muy altas concentraciones induce cambios morfológicos en la línea celular Vero (Gálvez *et al.*, 1989b).

El modo de acción de AS-48 se ha establecido investigando su efecto sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas intactas, así como sobre protoplastos y vesículas de membrana (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. Está de acuerdo con este mecanismo de acción, la rápida disminución en el potencial de membrana de las células sensibles, de forma similar a como lo hace el inhibidor de ATPasa, dicitclo-hexil-carbodiimida, siendo su acción independiente del potencial de membrana. AS-48 actúa también sobre liposomas de asolectina, 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).

El estudio en profundidad del mecanismo de acción se ha abordado analizando el efecto de AS-48 sobre la conductancia de bicapas lipídicas planas. La adición a bajas concentraciones desencadena 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. Este mecanismo de acción permitiría la despolarización celular, permitiendo la difusión de solutos de bajo peso molecular, disipando el potencial de la membrana y volviendo así la célula inviable.

Para confirmar estos resultados hemos utilizado programas de predicción de anfipatías

en las diferentes alfa-hélices de la molécula y los resultados han puesto de manifiesto la acumulación de residuos cargados enfrentados a los hidrófobos en sendos dominios de la hélice alfa2. Este tipo de estructuras permite la formación de oligómeros y la reorientación de ellas mismas en la membrana celular para crear poros y canales para iones. Además, los residuos de aminoácidos cargados del extremo carboxilo ( $K^{+60}$  a  $R^{+64}$ ) del péptido forman un asa que podría quedar expuesta en la molécula. Sobre esta base se puede proponer que los dominios hidrofóbicos de AS-48 interaccionarían con la membrana citoplasmática y participarían en la formación del poro, mientras que las zonas polares se orientarían hacia la cara interna permitiendo el paso de los iones.

### 2.2.3.3.- Determinantes genéticos responsables de AS-48

AS-48 está codificado por un plásmido conjugativo de 68 kb, denominado pMB2, que es responsable tanto de la producción del péptido como de la resistencia frente al mismo (Martínez-Bueno *et al.*, 1990) (Figura 2).

El gen estructural de AS-48 (*as-48A*) ha sido localizado y secuenciado. Los datos obtenidos han puesto de manifiesto que, aunque el péptido cíclico contiene 70 residuos, el producto primario de este gen es un polipéptido de 105 aminoácidos, cuyos primeros 35 residuos, de naturaleza hidrófoba, podrían actuar como péptido señal. La secuencia de *as-48A* está precedida por un sitio típico de unión a ribosomas (GGAGGA), y aguas abajo del codón stop TAA, se encuentra una repetición invertida que podría servir como terminador de la transcripción (Martínez-Bueno *et al.*, 1994).

El análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos deducida del gen *as-48A* y la del 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 cíclica.

Efectivamente, el péptido V8-5 comienza con una secuencia de 12 aminoácidos (IKKKGKRAVIAW) que se corresponde con la secuencia del extremo carboxilo ( $I^{+59}$  a  $W^{+70}$ ) del producto génico traducido y termina con cuatro residuos (MAKE), los correspondientes al extremo amino del propéptido AS-48.

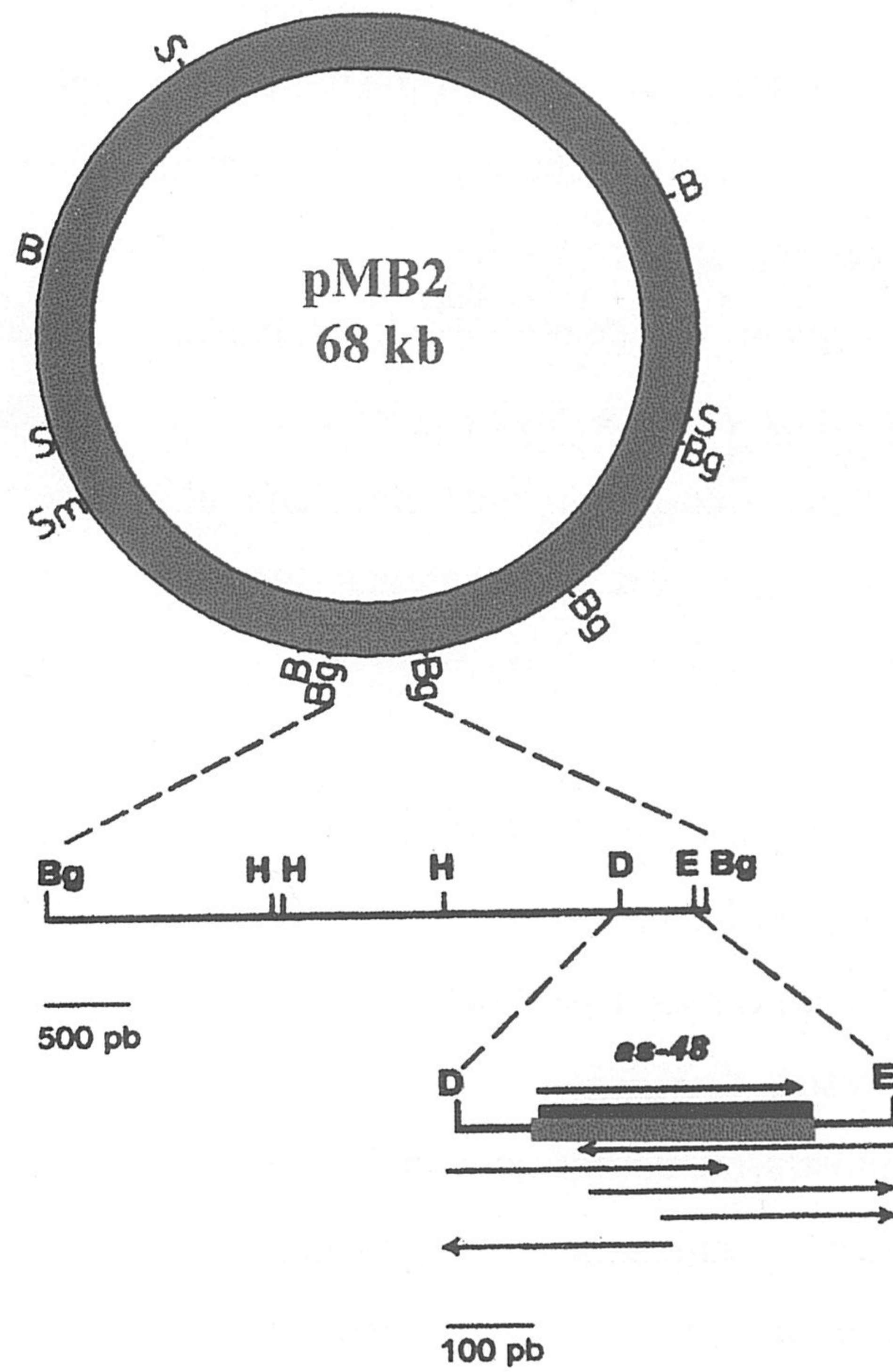


Figura 2 .- Mapa físico del plásmido pMB2, mostrando los sitios de corte de varias endonucleasas de restricción y estrategia de secuenciación de la región genética que contiene el gen *as-48A*. B; *Bam*HI, Bg; *Bgl*II, S; *Sac*I, Sm; *Sma*I

Consecuentemente con ello, se ha propuesto que el producto primario de *as-48A* seguiría las siguientes etapas en su procesado: (Figura 3). (i) ruptura del péptido señal del prepéptido y (ii) unión cabeza cola del propéptido. Esta estructura exigiría la intervención de una peptidasa señal y la formación de un enlace peptídico (actividad ciclasa), actividades que podrían residir en una misma molécula.

La localización de los genes implicados en la secreción e inmunidad frente al péptido AS-48, se obtuvo posteriormente por subclonación de un fragmento de 7,8 kb del plásmido pMB2 en el vector pAM401 (pAM401-52) con la información adyacente a los extremos 5' y 3' del gen *as-48A*. Los transformantes con pAM401-52 presentaban un fenotipo AS-48<sup>+</sup> Imm<sup>+</sup>, poniendo de manifiesto que en dicha región se encontraba la información necesaria para la producción y resistencia frente a AS-48.

La secuenciación de dicho fragmento permitió localizar 7 nuevas ORFs (además de gen estructural) denominadas *as-48B*, *as-48C*, *as-48C1*, *as-48D*, *as-48D1* y las ORF 6 y 7, algunas de cuyas funciones han sido aproximadas mediante alineamiento de la secuencia de los correspondientes productos génicos con proteínas bien caracterizadas de las bases de datos, así como mediante análisis funcional por mutagénesis con el transposón *Tn5* (Martínez-Bueno *et al.*, 1998) (Figura 4).

De esta forma, la inactivación de *as-48A*, *as-48B*, *as-48C1* o *as-48D* determinaba el cese en la producción de AS-48. La inactivación de *as-48C* disminuía la producción de AS-48, mientras que *as-48D1* era necesaria para la inmunidad. Las *ORF6* y *ORF7* no parecían ser requeridas para la expresión de AS-48.

Estos estudios demostraron de forma concluyente que las 6 ORFs descritas (*as-48ABCC1DD1*) eran necesarias y suficientes para la expresión del carácter AS-48 (producción y resistencia) pero a nivel basal, ya que los transformantes que albergaban la construcción pAM401-52 mostraban niveles de producción y resistencia en todo caso inferiores a los presentados por la estirpe salvaje S-48.



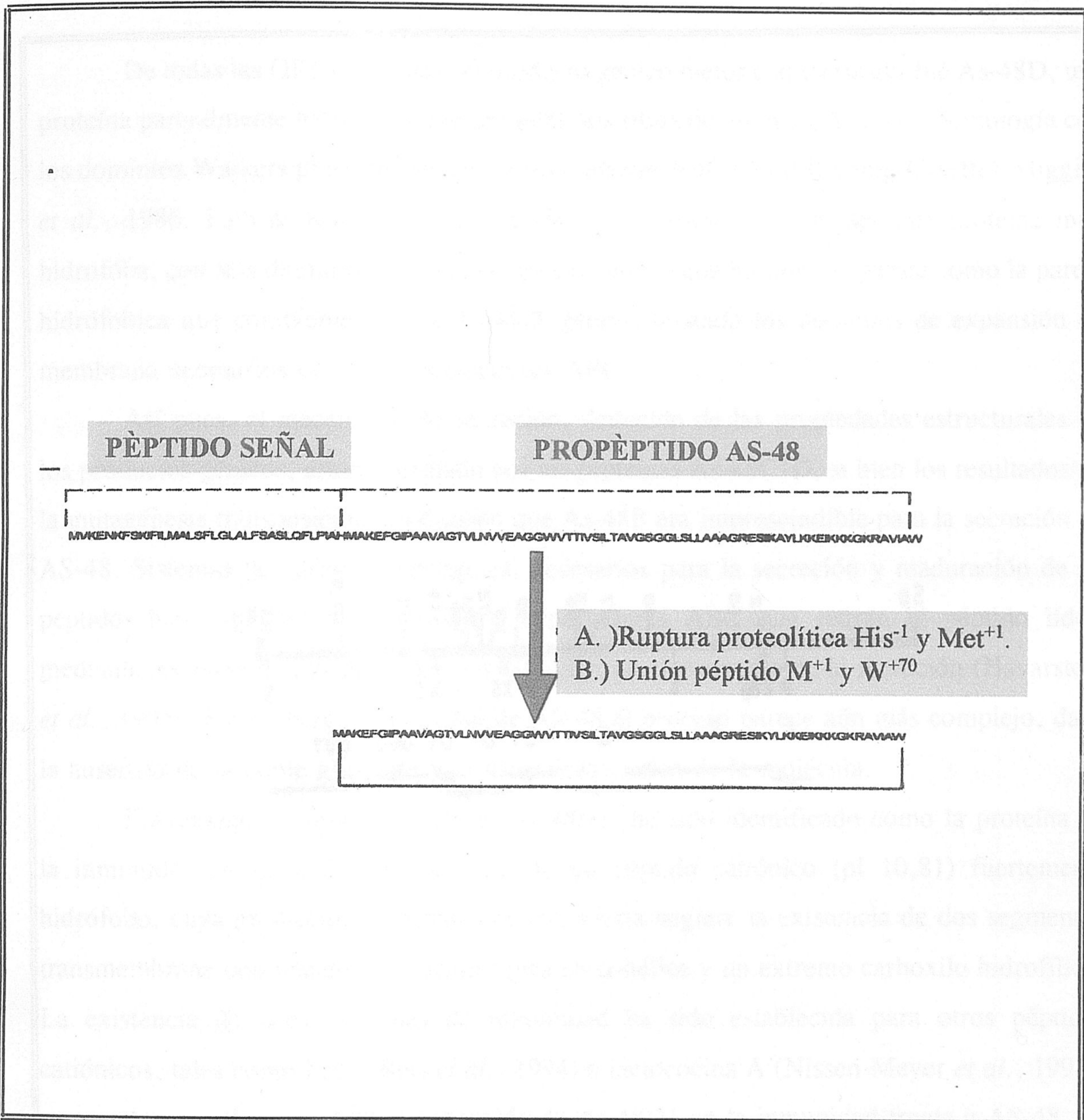
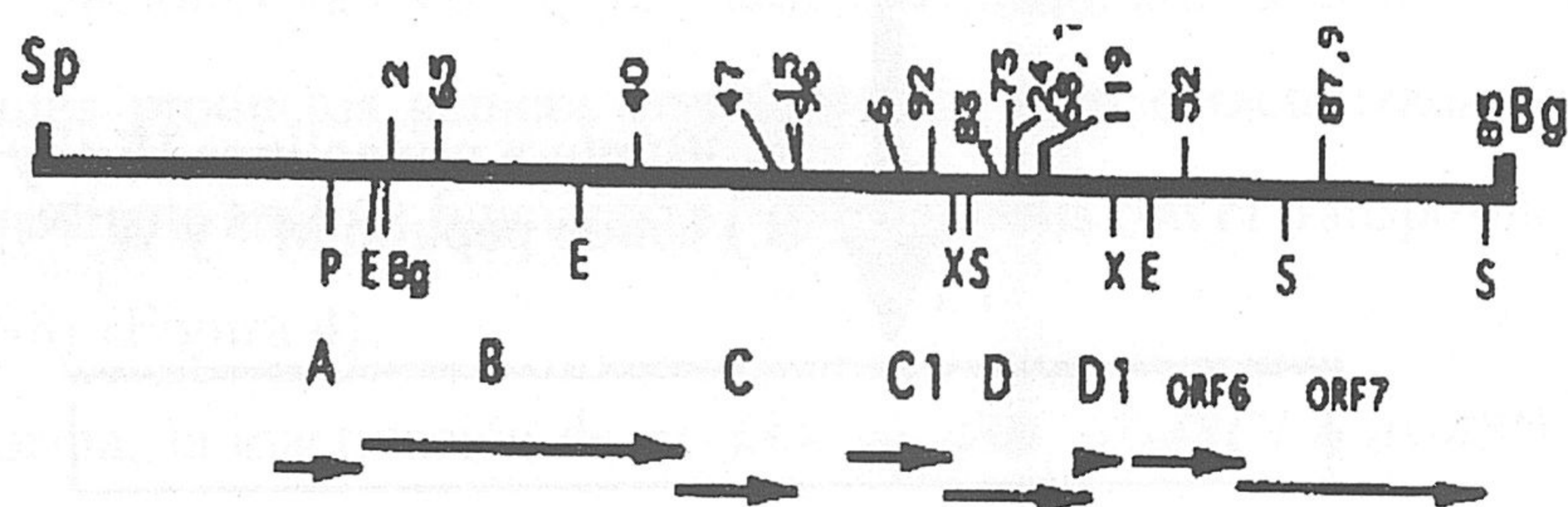


Figura 3.- Procesamiento y maduración del péptido AS-48. En primer lugar ocurre ruptura entre His<sup>-1</sup> y Met<sup>+1</sup>. En segundo lugar ocurre una reacción de eliminación de una molécula de H<sub>2</sub>O entre M<sup>+1</sup> y W<sup>+70</sup>, con la formación de un enlace peptídico para dar un péptido cíclico ligado cabeza con cola.



**Figura 4.-** Mapa físico y genético del fragmento de 7,8 kb del plásmido pMB2 clonado en pAM401-52 y localización de las inserciones obtenidas mediante mutagénesis con *Tn5*. Las flechas horizontales indican los genes identificados y la dirección de la transcripción de las mismas. Las flechas verticales indican el punto de cada inserción y se acompaña de números de identificación del correspondiente plásmido mutado (Martínez-Bueno *et al.*, 1998).

De todas las ORFs descritas, el producto génico mejor caracterizado fué As-48D, una proteína parcialmente hidrofílica que presenta dos sitios de unión al ATP con homología con los dominios Walkers presentes en los transportadores ABC (ATP-Binding-Casette) (Higgins *et al.*, 1986; Fath & Kolter, 1993). As-48C1, en cambio, resultó ser una proteína muy hidrofóba, con seis dominios de transmembrana, por lo que ha sido propuesta como la pareja hidrofóbica que complementaría a As-48D, proporcionando los dominios de expansión en membrana necesarios en los transportadores ABC.

Así pues, el mecanismo de secreción, deducido de las propiedades estructurales de los productos génicos, estaría formado por las proteínas As-48C1D, si bien los resultados de la mutagénesis transposicional indicaron que As-48B era imprescindible para la secreción de AS-48. Sistemas de varios componentes, necesarios para la secreción y maduración de un péptido, han sido descritos en ciertos exportadores ABC que retiran el péptido líder, mediante reconocimiento de secuencias Gly-Gly, en el momento de la secreción (Havarstein *et al.*, 1995). Sin embargo, en el caso de AS-48 el proceso parece aún más complejo, dada la ausencia de la doble glicocola y la naturaleza cíclica de la molécula.

Finalmente, el producto del gen *as-48D1*, ha sido identificado como la proteína de la inmunidad frente a AS-48. 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  $\alpha$ -hélice y un extremo carboxilo hidrofílico. La existencia de tales proteínas de inmunidad ha sido establecida para otros péptidos catiónicos, tales como Pep1 (Reis *et al.*, 1994) o lactococina A (Nissen-Meyer *et al.*, 1993).

A pesar de la evidente implicación de As-48D1 en la inmunidad frente a AS-48, no se puede descartar un posible papel de otras ORFs del grupo de genes *as-48*, que actuarían aumentando la resistencia frente a AS-48 administrado de manera exógena. Mecanismos complementarios de inmunidad han sido sugerido también en el caso de la microcina B17, nisina, subtilina y Pep5 (Garrido *et al.*, 1988; Sarik *et al.*, 1996).

### 3.- EL GÉNERO *Lactococcus*

Este género comprende los llamados estreptococos lácticos segregados del género *Streptococcus* (grupo N de Lancefield). Se trata de células esféricas u ovoideas, en pares o cadenas y se caracterizan por ser homofermentadores, es decir, productores de L-(+)-ácido láctico.

Se diferencian de los miembros de *Enterococcus*, en que no crecen a 45 °C, aunque sí a 10 °C, ni en caldo a pH 9,6, ni en caldo adicionado de NaCl 6.5%. Son  $\alpha$ -hemolíticos o no hemolíticos.

La novena edición de "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" establece 5 especies (*L. lactis*, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum* y *L. raffinolactis*). La especie tipo, *L. lactis*, es sin lugar a dudas la de mayor interés desde el punto de vista industrial. En los tratados de Microbiología Industrial y de Tecnología de alimentos, sin embargo, se siguen nombrando rutinariamente las tres subsp., *cremoris*, *lactis* y *diacetylactis*, propuestas por Garvie & Farrow (1982) para *Streptococcus lactis*; sin embargo, en el citado Manual, siguiendo las indicaciones de Schleifer *et al.* (1985), la última subsp. se considera sinónima de la subsp. *lactis* y se describe una nueva subsp., la *hordniae*, dentro de *L. lactis*.

Además, desde el punto de vista de la industria láctea, se viene considerando como estreptococo láctico la especie *Streptococcus thermophilus*, que tiene una extensa aplicación en la producción de yogur y queso. De cualquier forma es muy difícil fijar el número y tipo de las estirpes de estreptococos lácticos mesofílicos que se encuentran en los productos lácteos y en los cultivos iniciadores, sobretudo en aquellos cuya elaboración está menos estandarizada.

Entre las características mas relevantes de las BAL, desde el punto de vista aplicado, sobresale su capacidad de proteolizar la caseína y fermentar la lactosa, en ambos casos de origen plasmídico. Estas capacidades se pueden perder por cultivo sobre sustratos artificiales, recuperándose por cultivo regular en leche. Además, muchas de ellas fermentan la arginina con producción de amoniaco y algunas son fermentadoras del citrato (subsp *diacetylactis*).

*L. lactis* ha sido encontrado en materiales vegetales, cereales frescos y congelados, patatas, guisantes, col, leche cruda y derivados lácteos. No se encuentra habitualmente en

heces ni en el suelo.

Los estreptococos lácticos se emplean solos o en cultivos mixtos, para la producción de todo tipo de quesos, leches fermentadas, mantequillas y caseína. En estos procesos intervienen fermentando la lactosa a ácido láctico, proteolizando la caseína, produciendo componentes del aroma e induciendo la maduración de los quesos. En este último aspecto, las proteasas producidas por los estreptococos lácticos influyen principalmente en la textura y suavidad del queso. Sin embargo, puesto que las estirpes que producen activamente enzimas proteolíticas pueden inducir sabor amargo debido a los péptidos amargos, los estreptococos lácticos y lactobacilos que se necesitan en la industria cárnica y láctea son aportados cada vez con más frecuencia por marcas comerciales e instituciones especializadas en la producción de cultivos iniciadores.

### **3.1.-Importancia biotecnológica y aplicaciones de las bacterias del género *Lactococcus***

Las BAL son uno de los grupos de microorganismos de mayor importancia industrial, extensamente empleadas en la obtención de productos lácteos fermentados y otros alimentos. Sus principales campos de aplicación son la producción de ácido láctico, quesos, leches acidificadas, mantequilla, caseína, vegetales fermentados (ensilados y encurtidos) y productos cárnicos fermentados.

El uso de estas bacterias se debe primordialmente al hecho de que producen una variedad de sustancias antimicrobianas en los ambientes donde se desarrollan, impidiendo así el crecimiento de otros microorganismos. El principal factor de inhibición es la apreciable bajada de pH que determinan en los productos fermentados como consecuencia del acúmulo de ácidos orgánicos, en especial ácido láctico. Además de la formación de ácidos orgánicos, las BAL producen otros compuestos antimicrobianos como son metabolitos del oxígeno (peróxido de hidrógeno) y ciertos productos finales del catabolismo celular (diacetilo, alcoholes, dióxido de carbono, reuterina, etc...) que además confieren propiedades relacionadas con el aroma y sabor.

Por otro lado se ha descrito que muchas cepas de bacterias lácticas son capaces de

secretar al medio bacteriocinas (Stiles and Hasting, 1991; Ray & Daeschel, 1992). Por todo ello, estos microorganismos actúan inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y deterioradoras, tales como *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Fam. Enterobacteraceae*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, siendo el desarrollo de las BAL una forma para conservar alimentos y elaborar alimentos fermentados.

Debido a la gran importancia económica de las BAL en la industria alimentaria, se están haciendo considerables esfuerzos para conocer y mejorar las características tecnológicas importantes de las razas que se utilizan como iniciadoras en las fermentaciones. En este sentido es obvio que una mayor comprensión de la genética y la fisiología de estas bacterias debe conducir, sin duda, al desarrollo de cepas iniciadoras con propiedades mejoradas. De igual forma, la adquisición de un conocimiento mas específico de las reglas que gobiernan la expresión de genes heterólogos, puede ser empleada para añadir nuevos y deseables rasgos. Además, puesto que las BAL son designadas como "GRAS", podrían ser usadas de forma segura, en nuevas aplicaciones para la producción de proteínas heterólogas de interés comercial.

En la actualidad los principales aspectos sobre los que está enfocada la investigación biotecnológica de las BAL son:

- Introducción de mejoras en la producción de cultivos iniciadores
- Mejora de la producción de proteinasas
- Control de los fagos específicos
- Introducción de la capacidad celulolítica
- Introducción de la actividad catalasa
- Control de contaminantes por selección de cultivos iniciadores productores de sustancias antimicrobianas

***OBJETO DEL TRABAJO***

---

***OBJETO DEL TRABAJO***





### **OBJETO DEL TRABAJO**

Las características estructurales, físico-químicas y de actividad biológica del péptido AS-48, anteriormente referidas, lo hacen un buen candidato para ser usado como biopreservados de alimentos. Esto se puede materializar, bien mediante su adición directa a los sistemas alimentarios, o bien introduciendo la información genética responsable de su producción en cepas usadas en el procesado de alimentos.

Para alcanzar este propósito es necesario un estudio pretecnológico encaminado a optimizar la producción del péptido, tanto en los aspectos económicos de su producción, como en los de la mejora de los rasgos de interés en este campo, referidos a su estabilidad y espectro de acción entre otros.

Es claro que para cubrir estos objetivos es necesario conocer la información genética que codifica tanto el gen estructural de AS-48, como aquellos genes implicados en su maduración, secreción e inmunidad.

Nuestro grupo de investigación viene desarrollando una intensa y fructífera investigación en este sentido, que ha dado como resultado el hallazgo y caracterización de varios de estos genes. Sin embargo cuando se planteó esta Memoria, se era conciente de que faltaba por caracterizar una parte de ellos.

En base a lo anteriormente expuesto, el Plan de trabajo de esta Memoria tuvo como objetivos:

- En primer y prioritario lugar la localización y caracterización, por completo, de todos los determinantes genéticos responsables de la producción e inmunidad frente a AS-48.
- Una vez cumplido este aspecto, intentar su transferencia a cepas bacterianas de interés industrial, como son los lactococos.



*MATERIAL Y MÉTODOS*

---

*MATERIAL Y MÉTODOS*



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.- MICROORGANISMOS Y PLÁSMIDOS

#### 1.1.-Cepas bacterianas.

En este trabajo se han empleado diferentes razas bacterianas pertenecientes a las especies de *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis* y *Escherichia coli*, cuyas características más sobresalientes se indican en la Tabla 2.

En las distintas experiencias de producción y/o sensibilidad frente a AS-48, se han utilizado, las estirpes de *Enterococcus faecalis* que se relacionan en la Tabla 2, junto con sus características más relevantes. Todas ellas pertenecen a la colección de nuestro laboratorio y han sido obtenidas mediante electroporación a partir de la estirpe libre de plásmidos, *E. faecalis* JH2-2 (Yagi & Clewell, 1980).

La estirpe de lactococo empleada en los experimentos de electrotransformación ha sido *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LM2301. Dicha estirpe está libre de plásmidos y ha sido derivada de *L. lactis* subsp. *lactis* C2, (Bourgeois *et al.*, 1991).

Las cepas de enterococos y de lactococos se cultivaron en reposo a 37 °C y 28 °C respectivamente, mientras que *Escherichia coli* se cultivó a 37 °C en agitación.

#### 1.2.- Plásmidos

Los diferentes plásmidos usados en este trabajo aparecen descritos en las Tablas 3a;3b y los vectores de clonación en la figura 5.

| Microorganismos / fagos             | Características relevantes   | Referencia                     |
|-------------------------------------|--|--------------------------------|
| <b><u>Escherichia coli</u></b>      |  |                                |
| DH5 $\alpha$                        | <i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17</i><br><i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> | Bethesda Research Laboratories |
| RYC 1000                            | F- <i>araD139</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> $\Delta$ <i>rib-7rpsL relA</i><br><i>thiA recA56</i>                                     | Moreno Felipe*                 |
| CS1045                              | Propagación del fago Lambda.   | Moreno Felipe. *               |
| V517                                | Patrón de pesos moleculares.   | Macrina <i>et al.</i> , 1978   |
| <b><u>Enterococcus faecalis</u></b> |  |                                |
| S-47                                | Estirpe AS-48 <sup>s</sup>   | Gálvez <i>et al.</i> , (1989c) |
| A-48-32                             | pMB1-del, pMB2 ,(AS-48 <sup>+</sup> )  | Gálvez <i>et al.</i> , (1989c) |
| JH2-2                               | Libre de plásmidos , Rif <sup>r</sup> Fus <sup>r</sup> AS-48 <sup>-</sup>  | Yagi and Clewell, (1980)       |
| <b><u>Lactococcus lactis</u></b>    |  |                                |
| LM2301                              | Libre de plásmidos   | Bourgeois <i>et al.</i> , 1991 |
| <b><u>Bacteriófago</u></b>          |  |                                |
| $\lambda$ 467                       | <i>c1857 Oam8 Pam29 b221</i><br><i>rex::Tn5 ( Km<sup>R</sup>)</i>  | Berg, D.(1977)                 |

**Tabla 2** .- Características mas relevantes de los microorganismos y fagos utilizados en este trabajo. Rif<sup>r</sup>: rifampicina resistente, Fus<sup>r</sup>: ácido fuscídico resistente, Km<sup>R</sup> : kanamicina resistente, AS-48<sup>-</sup> no productor de AS-48, AS-48<sup>+</sup> productor de AS-48. AS-48<sup>s</sup> ,AS-48 sensible.

$\lambda$ 467 : Contiene una copia de transposon *Tn5* el cual confiere resistencia a kanamicina y bleomicina . \* Comunicación personal Dr. Felipe Moreno. Hospital Ramón y Cajal ( Madrid- España)

## MATERIAL Y MÉTODOS

| Plásmido      | Características relevantes   | Referencia                            |
|---------------|--|---------------------------------------|
| pGEM-3Zf(+)   | Amp <sup>R</sup> Vector de clonación   | Promega                               |
| pSL1180       | Amp <sup>R</sup> Vector de clonación   | Pharmacia                             |
| pUC18         | Amp <sup>R</sup> Vector de clonación   | Promega                               |
| pAM401        | Cm <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> Vector bifuncional <i>E.coli</i> - <i>E.faecalis</i> .   | Wirth -Clewel (1987)                  |
| pMB2          | 68 kb; AS-48 <sup>+</sup> AS-48 <sup>R</sup>   | Martínez Bueno <i>et al.</i> ,(1990)  |
| pAM401-52     | Cm <sup>R</sup> ; 7,8 kb <i>SphI</i> - <i>BglII</i> - <i>BglII</i> de pMB2 en pAM401; ( <i>as-48ABCC1DD1</i> ,y ORF6 , ORF 7) ; AS48 <sup>+</sup>                | Martínez Bueno <i>et al.</i> (1998)   |
| pAM401-64     | Cm <sup>R</sup> ; 3 kb <i>EcoRI</i> de pAM401-52 en pAM401; ( <i>as-48C-as-48D1</i> ) ; AS48 <sup>-</sup>  | Martínez Bueno <i>et al.</i> (1998)   |
| pAM401-D1     | Cm <sup>R</sup> ; <i>as-48D1</i> clonado en pAM401;  | Martínez Bueno <i>et al.</i> (1998)   |
| pBgB2         | Fragmento B (6,6 kb) ( <i>BglII</i> ) del plásmido pMB2 clonado en pSI1180.  | Este trabajo                          |
| pBgBC         | Fragmento C (6,4 kb) del plásmido pMB2 clonado en pSI1180.   | Este trabajo                          |
| pBgB2x        | Amp <sup>R</sup> delección de un fragmento B (0,4 kb) <i>XbaI</i> del plásmido pBgB2 .   | Este trabajo                          |
| pSL1180-CB    | Cm <sup>R</sup> 16,4 kb Fragmento B 6,6 kb( <i>BglII</i> ) y fragmento C 6,4 kb( <i>BglII</i> ) de pMB2 clonado en pSL1180; AS48 <sup>-</sup> AS-48 <sup>R</sup> | Este trabajo                          |
| pAM401-CB     | Cm <sup>R</sup> ; 23,4 kb fragmento B ( <i>BglII</i> ) y fragmento C( <i>BglII</i> ) de pMB2 en pAM401; AS48 <sup>-</sup> AS-48 <sup>R</sup>                     | Este trabajo                          |
| pAM401-CBPst1 | Cm <sup>R</sup> ;21,4 kb Mutante de delección con <i>PstI</i> de pAM401CB; AS48 <sup>-</sup> AS-48 <sup>R</sup>  | Este trabajo                          |
| pAM401-81     | Cm <sup>R</sup> 25 kb Fragmentos <i>SphI</i> - <i>BglII</i> - <i>BglII</i> de pMB2 (D,C,B) clonados en pAM401; AS-48 <sup>+</sup> AS-48 <sup>R</sup>             | Este trabajo                          |
| pAM401- D1-F  | Cm <sup>R</sup> ; Subclonación del fragmento de <i>as-48D1EF</i> ; AS-48 <sup>-</sup> , AS-48 <sup>R</sup>   | Martínez-Bueno <i>et al.</i> , (1998) |
| pAM401- D1-H  | Cm <sup>R</sup> ; Clonación del fragmento B <i>BglII</i> de pMB2 en pAM401-D1-F, AS-48 <sup>-</sup> , AS-48 <sup>R</sup>   | Este trabajo                          |

**Tabla 3a.-** Plásmidos utilizados en este trabajo.

Cm<sup>R</sup> ; resistente a Cloranfenicol ; AS-48<sup>+</sup> ; producción de AS-48 ; AS-48<sup>-</sup> no productor de AS-48 , AS-48<sup>R</sup>: AS-48 resistente ; AS-48<sup>S</sup> ; AS-48 sensible.

| Plásmido                               | Características relevantes   | Referencia                            |
|--|--|---------------------------------------|
| pAM401-52::Tn5-52 as-48D <sup>-</sup>  | Cm <sup>R</sup> ; Mutante de inserción<br>pAM401-52::Tn5-as-48D, AS-48 <sup>-</sup> AS-48 <sup>R</sup>     | Martínez-Bueno <i>et al.</i> , (1998) |
| pAM401-52::Tn5-52 as-48C <sup>-</sup>  | Cm <sup>R</sup> ; Mutante de inserción<br>pAM401-52::Tn5-as-48C, AS-48 <sup>-</sup> AS-48 <sup>R</sup>     | Martínez-Bueno <i>et al.</i> , (1998) |
| pAM401-52::Tn5-52 as-48C1 <sup>-</sup> | Cm <sup>R</sup> ; Mutante de inserción<br>pAM401-52::Tn5-as-48C1, AS-48 <sup>-</sup> AS-48 <sup>R</sup>    | Martínez-Bueno <i>et al.</i> , (1998) |
| pAM401-52::Tn5-52 as-48B <sup>-</sup>  | Cm <sup>R</sup> ; Mutante de inserción<br>pAM401-52::Tn5-as-48B, AS-48 <sup>-</sup>   AS-48 <sup>R</sup>   | Martínez-Bueno <i>et al.</i> , (1998) |
| pAM401-52::Tn5-52 as-48E <sup>-</sup>  | Cm <sup>R</sup> Mutante de inserción<br>pAM401-52::Tn5 as-48E, AS-48 <sup>+</sup>   AS-48 <sup>R</sup>     | Martínez-Bueno <i>et al.</i> , (1998) |
| pAM401-52::Tn5-52 as-48F <sup>-</sup>  | Cm <sup>R</sup> Mutante de inserción<br>pAM401-52::Tn5 as-48F, AS-48 <sup>+</sup> AS-48 <sup>R</sup>       | Martínez-Bueno <i>et al.</i> , (1998) |
| pAM401PstE                             | Cm <sup>R</sup> Mutante de inserción pAM401-CBPst1::Tn5<br>as-48E, AS-48 <sup>-</sup>   AS-48 <sup>R</sup> | Este trabajo                          |
| pAM401PstF                             | Cm <sup>R</sup> Mutante de inserción pAM401-CBPst1::Tn5<br>as-48F, AS-48 <sup>-</sup>   AS-48 <sup>R</sup> | Este trabajo                          |
| pAM401PstG                             | Cm <sup>R</sup> Mutante de inserción pAM401-CBPst1::Tn5<br>as-48G, AS-48 <sup>-</sup>   AS-48 <sup>R</sup> | Este trabajo                          |
| pAM401-81B                             | Cm <sup>R</sup> Mutante de inserción<br>pAM401-81::Tn5 as-48B, AS-48 <sup>-</sup>   AS-48 <sup>R</sup>     | Este trabajo                          |
| pAM401-81C                             | Cm <sup>R</sup> Mutante de inserción<br>pAM401-81::Tn5as-48C, AS-48 <sup>-</sup>   AS-48 <sup>R</sup>      | Este trabajo                          |
| pAM401-81D                             | Cm <sup>R</sup> Mutante de inserción<br>pAM401-81::Tn5 as-48D, AS-48 <sup>-</sup> AS-48 <sup>R</sup>       | Este trabajo                          |
| pAM401-81G                             | Cm <sup>R</sup> Mutante de inserción<br>pAM401-81::Tn5 as-48G, AS-48 <sup>-</sup>   AS-48 <sup>R</sup>     | Este trabajo                          |

Tabla 3b.- Plásmidos utilizados en este trabajo.

Cm<sup>R</sup>; resistente a cloranfenicol; AS-48<sup>+</sup>; producción de AS-48; AS-48<sup>-</sup>; no productor de AS-48; AS-48<sup>R</sup>: AS-48 resistente; AS-48<sup>S</sup>; AS-48 sensible.



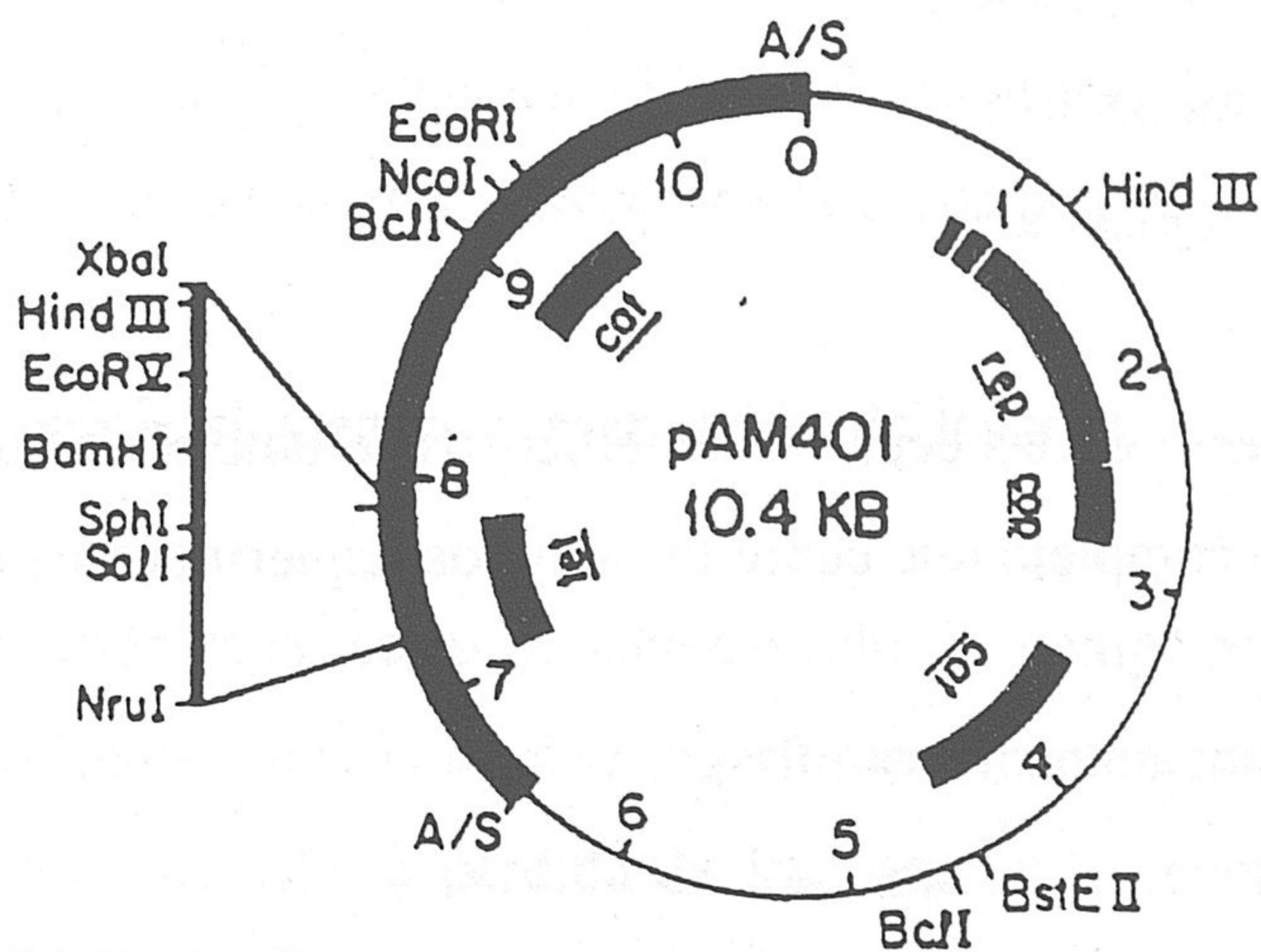
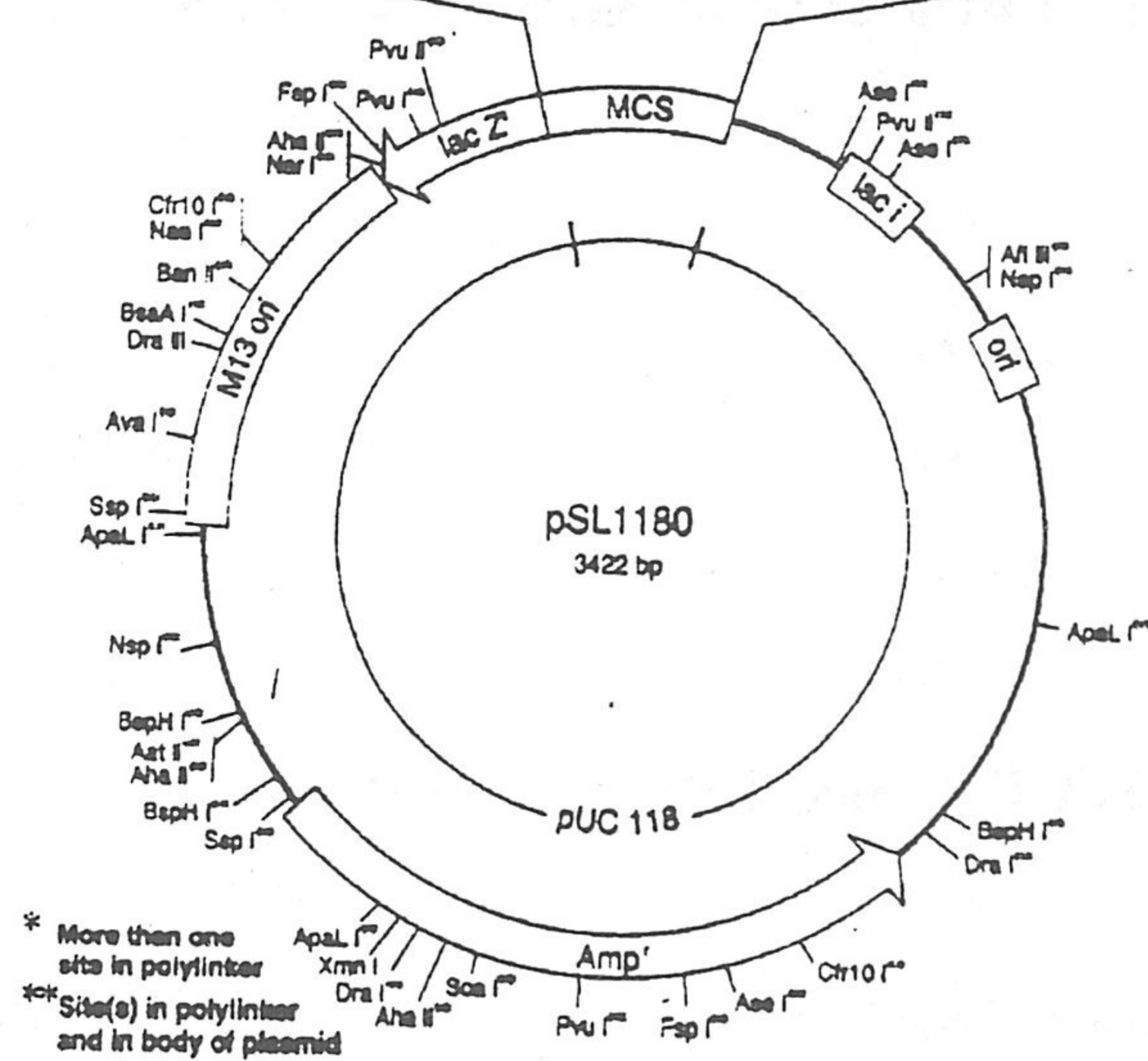


Figura 5.-Vectores de clonación utilizados en este trabajo.

## 2.- MEDIOS DE CULTIVOS

A menos que se especifique de otra forma, los componentes de los diversos medios fueron disueltos en un litro de agua o de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,2; en este segundo caso se indica con la letra B. Cuando fué preciso el uso de medios sólidos se adicionó agar al 1,5%. En todo caso, los medios se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

### 2.1.- Medios de crecimiento.

Para el cultivo de *Escherichia coli* se utilizó habitualmente el medio de Luria Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) y el medio 2xYT .

#### Medio de Luria-Bertani (Gibco BRL Life Technology)

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Tripticasa Peptona   | 10,0 g |
| Extracto de levadura | 5,0 g  |
| Cloruro de sodio     | 10,0 g |
| El pH se ajusta a 7  |        |

#### Medio 2xYT (Gibco BRL Life Technology)

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Tripticasa Peptona   | 16,0 g |
| Extracto de levadura | 10,0 g |
| Cloruro de sodio     | 5,0 g  |
| El pH se ajusta a 7  |        |

Para el crecimiento de las cepas de enterococos se empleó infusión cerebro corazón (BHI) por ser un medio complejo que cubre los amplios requerimientos nutricionales de estas bacterias.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

### Medio Infusión de Cerebro-Corazón (BHI, Oxoid)

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| Infusión de cerebro de ternera | 200,0 g |
| Infusión de corazón vacuno     | 250,0 g |
| Peptona de gelatina            | 10,0 g  |
| Cloruro de sodio               | 5,0 g   |
| Fosfato disódico               | 2,5 g   |
| Glucosa                        | 2,0 g   |

Las cepas de *Lactococcus lactis* fueron crecidas en medio M17 glucosado (GM17):

### Medio M17 Broth (Biokar Dianostics)

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Triptona                   | 2,5 g  |
| Digerido péptico de carne  | 2,5 g  |
| Digerido papaínico de soja | 5,0 g  |
| Extracto de levadura       | 2,5 g  |
| Extracto de carne          | 5,0 g  |
| Lactosa                    | 5,0 g  |
| Glicerol fosfato de sodio  | 19,0 g |
| Sulfato de magnesio        | 0,2 g  |
| Acido ascórbico            | 0,5 g  |

Este medio comercial, fue suplementado de glucosa al 1% (GM17) ya que las estirpes de lactococos utilizadas en este trabajo carecen de la capacidad de utilizar la lactosa (lac<sup>-</sup>).

### 2.2.- Medios empleados en la conservación de los microorganismos.

Para la conservación de las cepas durante periodos de tiempo prolongados, se adicionó glicerol 50% v/v, a cultivos líquidos en fase logarítmica, manteniéndolos después a -20 °C o -70 °C. De esta forma se evita la pérdida de los caracteres genéticos que ocurre en el

transcurso de sucesivas resiembras.

Para el uso rutinario, las cepas se inocularon en tubos inclinados con los respectivos medios sólidos y se mantuvieron a 4 °C. Estos cultivos eran resembrados periódicamente a partir de las muestras conservadas en glicerol.

### 2.3.- Medios empleados para detección de características bioquímicas

Los siguientes medios se utilizaron para diferenciar cepas de *Lactococcus* y *Enterococcus*.

#### Medio de crecimiento a 45 °C

|  |      |
|--|------|
| BHI  | 25 g |
| Glucosa  | 1 g  |
| Indicador (1,6 g púrpura de bromocresol en 100 ml de etanol 95%) |      |

#### Medio de crecimiento con NaCl 6,5%

Igual al anterior pero adicionado de cloruro sódico al 6,5%.

#### Agar Bilis Esculina

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Extracto de carne | 3,0 g  |
| Peptona           | 5,0 g  |
| Sales biliares    | 40,0 g |
| Citrato férrico   | 0,5 g  |
| Esculina          | 1,0 g  |
| Agar              | 15,0 g |
| Ajustar pH a 7,4. |        |

### 2.4.- Medios utilizados para la producción de AS-48

La producción de AS-48 por los transformantes de enterococos se llevó a cabo en medio de cerebro corazón disuelto en tampón fosfato pH 7,2, en estado líquido (BHI-B), o sólido (BHA-B). La producción de AS-48 en los lactococos fue ensayada en las diversas variantes del medio GM17 que se especificarán en su momento.

#### Medio Complejo MC

Su composición en gramos por litro de tampón fosfato 0,1M, pH 7,2 es la siguiente:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Casaminoácidos                   | 2 g    |
| BHI                              | 2 g    |
| Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco) | 1 g    |
| Glucosa                          | 5 g    |
| Sulfato magnésico                | 0,04 g |
| Lactosa                          | 5 g    |

Para su preparación se parte de soluciones concentradas disueltos en agua destilada (1/10 del volumen final) y se esterilizaron por filtración utilizando filtros de Millipore 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

### 2.5.- Medios sólidos utilizados en ensayos de resistencia frente a AS-48.

Para ello se emplearon placas de Petri con una base de agar de Mueller-Hinton (10ml) sobre la que se dispusieron sobrecapas de agar blando (6ml) inoculadas con la bacteria indicadora.

La baja concentración de agar permite mantenerlos en sobrefusión a 45 °C antes de ser inoculados con la bacteria indicadora.

### **Agar de Mueller Hinton (MHA, Panreac)**

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Almidón                        | 1,5 g  |
| Infusión de carne de ternera   | 300 g  |
| Peptona de caseína hidrolizada | 17,5 g |
| Agar                           | 17,0 g |

### **Sobrecapas de agar blando**

Para lactococos: Medio GM17-B adicionado de 0,75% de agar.

Para enterococos: BHI-B adicionado de 0,75% de agar.

## **2.6.- Medio utilizado para ensayos de mutagénesis con el transposon *Tn5***

El siguiente medio fue utilizado para la propagación del fago lambda  $\lambda$ 467 (*Tn5*).

### **Medio p75**

|            |      |
|------------|------|
| Tripticasa | 10 g |
| NaCl       | 8 g  |
| Bacto agar | 12 g |

## **2.7.- Medios utilizados en los experimentos de electrotransformación (electroporación)**

### **Medio SGM17**

Ha sido utilizado para el crecimiento de los lactococos antes de inducir el estado de competencia para su electrotransformación. Está basado en el medio GM17, al que se le adiciona sacarosa a una concentración final de 0,5 M y glicocola al 1,5%.

### Medio de reconstitución

Para cultivar los lactococos recién electroporados se empleó un medio de reconstitución que consiste en medio SGM17 adicionado de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (20 mM) y  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  (2 mM).

### 2.8.- Tampones utilizados en los medios de cultivo

#### Tris HCl 1M

Se disuelven 121 g de Tris (Boheringer Mannheim) en 800 ml de agua destilada, se adiciona HCl concentrado (Panreac) hasta alcanzar el pH deseado y entonces se completa a 1000 ml con agua destilada.

#### Tampón fosfato sódico 0,1M, pH 7,2

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Solución X) 0,2M

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

Se mezcla 36 ml de solución X con 14 ml de solución Y, completando con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml.

## 3.-PRODUCTOS Y REACTIVOS EMPLEADOS

### Antibióticos

Los antibióticos disueltos en agua o etanol, se adicionaron a los medios de cultivo, a partir soluciones 100 veces concentradas. Las soluciones acuosas fueron esterilizadas mediante filtración a través de membranas de  $0,45\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Minisort Sartorius).

Las concentraciones empleadas fueron Ampicilina (Amp)  $50\mu\text{g/ml}$ , Kanamicina (Km)

50 $\mu$ g/ml, Cloranfenicol (Cm) 20 $\mu$ g/ml, Tetraciclina (Tet) 10 $\mu$ g/ml (Sigma Chemical Co., USA).

### **Enzimas**

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron suministradas por Boehringer Mannheim y Amersham Life Science. La enzima T4-DNA ligasa fué suministrada por Boehringer Mannheim.

### **Electroforesis en geles de agarosa**

Tris (Boehringer Mannheim), EDTA-Na<sub>2</sub> (Boehringer Mannheim), Acido acético glacial (Boehringer Mannheim), agarosa tipo 1A de baja electroendósmosis (Sigma). Bromuro de etidio (Sigma). Como patrón de pesos moleculares de los fragmentos de restricción se usó el digerido *Hind*III del fago lambda (BioRad).

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Acrilamida (SERVA) y Bis Acrilamida (Promega), SDS (Sigma), persulfato amónico, azul de bromofenol B0126 (Merck), TEMED(N',N',N',N, Tetramethylethylenediamine, (Sigma), mercaptoetanol (SERVA), Page Blue 83 (BDH).

### **Membranas para transferencias de ADN y proteínas**

Las membranas (0,45 $\mu$ m) de nitrocelulosa (NC BA85) y de nylon (Nytran) fueron suministradas por Schleicher and Schuell.

### **Cromatografía convencional de intercambio iónico:**

Se utilizó una columna rellena con Carboximetil Sephadex CM-25 (Pharmacia Fine Chemicals), equilibrado en tampón fosfato sódico 0,2M pH 6,2.



### Cromatografía de alta resolución:

Características de las columna y matrices empleadas:

Vydac 218TP54 (4.6 x 25 mm; The Separation Group, Hesperia, CA).

### Disolventes:

Acetonitrilo, isopropanol y ácido trifluoroacético (TFA) de alta pureza para HPLC (Scharlau).

### Otros productos utilizados

Fenol, sacarosa, etanol absoluto, n-butanol, hidróxido sódico y ácido clorhídrico (Merck). Cloruro sódico, citrato sódico, cloroformo, eter etílico y ácido tricloroacético (Panreac). Albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma). Reactivo de Bloqueo (Boehringer Mannheim).

## 4.- DETERMINACION DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE AS-48.

### 4.1.- Curvas de crecimiento y de producción de AS-48.

Para realizar las curvas de crecimiento de las diferentes cepas de *Enterococcus faecalis* o de *Lactococcus lactis* se emplearon como inóculo (4%) cultivos en fase estacionaria, crecidos durante una noche a 37 °C en el medio adecuado. Las medidas de absorbancia ( $A_{620}$ ) se efectuaron cada dos horas en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB Ultraespec III), retirando muestras (1ml) de los cultivos; estas muestras fueron centrifugadas a 12.000 x g durante 5 min, para ensayar a continuación la actividad de los sobrenadantes.

#### 4.2.-Purificación de la bacteriocina AS-48.

La bacteriocina AS-48 presente en los sobrenadantes libres de células, obtenidos tras 8 h de incubación con la bacteria productora, se recuperó mediante cromatografía de intercambio iónico sobre Carboximetil-Sephadex CM25 (Pharmacia). Para ello, una vez ajustado el pH de los sobrenadantes a un valor de 6,5 con NaOH 1 M, se mezclaron con el gel en proporción 1:40 v/v mediante agitación, durante 1 h a temperatura ambiente.

El gel se recogió posteriormente por decantación y se depositó en una columna de vidrio (2 x 25 cm). La elución se llevó a cabo con dos volúmenes de columna de agua destilada seguido de dos volúmenes de NaCl 0,5 M y dos de NaCl 1,5 M (ambos en agua destilada), recogiendo distintas fracciones que fueron ensayadas para determinar su contenido en actividad antimicrobiana por la técnica de los pocillos.

Las muestras con actividad fueron repurificadas mediante cromatografía de fase reversa de alta resolución, utilizando una columna Vydac 218TP54 (4.6 x 25 mm; The Separation Group, Hesperia, Calif.). equilibrada previamente con eluyente A: 10 mM TFA en agua. 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 la línea base. El material retenido en la columna fue eluido posteriormente mediante un gradiente lineal de solvente B: isopropanol:acetonitrilo (2:1, v:v) en 4 mM TFA, a un flujo de 1,5 ml/min. El efluente de la columna fue recogido en distintas fracciones de acuerdo con los picos de absorbancia (a 280 y a 210 nm) detectados. Dichas fracciones fueron posteriormente liofilizadas y resuspendidas en 1 ml de agua destilada antes de ensayar su actividad antimicrobiana.

#### 4.3.-Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de las muestras fue determinada midiendo su absorción a 280 nm y 210 nm y calculando las concentraciones de acuerdo con los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) previamente establecidos para el péptido AS-48 [ $2,73 (\mu\text{l}/\mu\text{g}) \times \text{cm}^{-1}$  a 280 nm y  $23,4 (\mu\text{l}/\mu\text{g}) \times \text{cm}^{-1}$  a 210 nm] (Gálvez *et al.*, 1989a) según la siguiente fórmula:

$$A = \epsilon \times \text{mg/ml}$$

Donde  $A$  es la absorción a 280 o 210 nm y  $\epsilon$  los coeficientes de extinción molar a esas respectivas longitudes de onda.

La concentración se determinó calculando el valor medio entre ambas concentraciones.

### 4.4.-Valoración de la actividad AS-48

Estas técnicas también se utilizaron para determinar los niveles de resistencia frente a AS-48.

#### 4.4.1.- Detección de AS-48 en preparaciones líquidas

##### Técnica de difusión en agar o de los pocillos

La correlación entre el crecimiento bacteriano y la producción de AS-48 se determinó mediante la técnica de los pocillos (Schillinger & Lucke, 1989; Tagg & McGiven, 1971).

Para ello se colocaron pocillos estériles de acero inoxidable de 8 mm de diámetro sobre placas de Petri con una base de 10 ml de MHA. Seguidamente se vertieron 6 ml de agar blando, mantenidos en sobrefusión a 45 °C y adicionados de 0,1 ml de un cultivo en fase estacionaria de la estirpe indicadora. Una vez solidificada la sobrecapa se retiraron los pocillos y en los huecos dejados por éstos, se depositaron las muestras líquidas a valorar (0,1 ml). A continuación las placas fueron incubadas a la temperatura adecuada para permitir el crecimiento de la estirpe indicadora. Tras 18-24 h de incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento producidos en torno a los correspondientes pocillos.

La actividad de una muestra dada se expresó en Unidades Arbitrarias por ml (UA/ml), entendiéndose que el número de UA/ml de una muestra es el inverso de la mayor dilución, que permite la aparición del mínimo halo de inhibición detectable (9 mm de diámetro) en torno al pocillo, tomándose como estirpe indicadora de referencia las cepas sensibles S-47 o JH2-2 (pAM401) de *E. faecalis*.

## **Técnica de las gotas**

Para la detección y ensayo de AS-48 en muestras líquidas se inocularon 0,1 ml de las muestras sobre placas de Petri conteniendo 10 ml medio BHA-B y posteriormente se vertieron 6 ml del agar adecuado para sobrecapa con la estirpe indicadora *E.faecalis* S-47, dejándolo incubar durante 18-24 horas a la temperatura óptima de crecimiento. Finalmente fueron examinadas respecto a la aparición de halos y a el tamaño de los mismos.

### **4.4.2.-Detección y valoración de AS-48 producida en medio sólido**

#### **Técnica de la doble capa**

Para detectar la producción AS-48 en medio sólido se empleó la técnica de la doble capa (Gratia & Fredericq, 1946), utilizando como capa base medio de producción BHI o GM17, solo o adicionado con diferentes cantidades de BHI (1, 1,5 y 2%) dependiendo la estirpe a ensayar. Sobre esta capa base se dispusieron gotas de 1  $\mu$ l de un cultivo en fase estacionaria de la estirpe productora a ensayar, incubándose a la temperatura adecuada durante 18 h. A continuación se cubrió con una sobrecapa de agar blando inoculada con 0,1 ml de un cultivo de una noche de la bacteria indicadora. Una vez solidificada la sobrecapa, se volvió a incubar para permitir el crecimiento de la bacteria indicadora, observando entonces la posible aparición de zonas de inhibición del crecimiento en torno a las bacterias crecidas en la capa base.

## **5.- DETECCION Y VALORACION DE LA RESISTENCIA FRENTE A AS-48**

### **5.1.-Detección de la resistencia en medio líquido**

La resistencia frente a AS-48 en medio líquido se determinó siguiendo las curvas de crecimiento de los transformantes a evaluar, en presencia de diferentes concentraciones de AS-48.

Para ello se obtuvieron cultivos líquidos inoculando tubos (2%,v/v) con el medio

adecuado a partir de un inóculo de una noche. A continuación estos cultivos se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una absorción a 620 nm de aprox. 0,1 (30-60 min).

### **5.2.-Determinación de la resistencia en medio sólido**

La resistencia frente a AS-48 en medio sólido de las diferentes bacterias empleadas en este estudio, se estableció por la técnica de la doble capa, descrita anteriormente.

#### **Técnica de las gotas**

Para determinar la resistencia de AS-48 en medio sólido se vertieron 6 ml de sobrecapa de agar inoculadas con éstas con 0,1 ml de las muestras a ensayar, las que posteriormente se adicionaron sobre placas de Petri contenidas de BHA y una vez solidificadas las sobrecapas, se procedió a colocar sobre ellas gotas de 5  $\mu$ l conteniendo diferentes concentraciones de AS-48. Las placas se incubaron entre 18-24 h a 37 °C.

## **6.-TECNICAS GENETICAS.**

Los experimentos de clonación y transformación empleados para la obtención de los diferentes plásmidos se han realizado siguiendo la metodología expuesta en Sambrook *et al* (1989).

### **6.1.- Aislamiento rápido a partir de pequeños volúmenes de cultivo: Minipreparaciones.**

Ha sido empleado para estudiar el perfil plasmídico de los clones obtenidos en este estudio.

### 6.1.1.- Minipreparación de enterococos y lactococos

La técnica de aislamiento de plásmidos a pequeña escala tanto de *L. lactis* como de *E. faecalis*, ha sido la de Anderson & McKay (1983) y Neve *et al.* (1984) empleada habitualmente para *Lactococcus*, con algunas modificaciones.

La estirpe cuyo perfil plasmídico se quería analizar, se inoculó en 2 ml del medio adecuado para su crecimiento incubándose durante una noche a 37 °C. A partir de este cultivo, se inocularon (4%) dos tubos de 5 ml de medio y se incubaron 4-5 h a la misma temperatura. Tras centrifugar los cultivos (3.000 x g durante 15 min), se reunieron las células en un solo tubo eppendorf y se lavaron con 1 ml de tampón Tris-EDTA (TE). El sedimento se resuspendió en 458  $\mu$ l de solución I. Luego se adicionaron 115  $\mu$ l de una solución de lisozima (10 mg/ml en Tris-HCl 25 mM, pH 8) preparada extemporáneamente, y se incubó a 37 °C durante 30-45 min.

La lisis se desencadenó mediante la adición de 58  $\mu$ l de EDTA 250 mM, pH 8 y de 35  $\mu$ l de solución de lisis, agitando suavemente por inversión del tubo, durante 5-30 min. El ADN cromosómico se desnaturalizó mediante la adición de 35  $\mu$ l de una solución de NaOH 3 M recién preparada. Tras realizar suaves inversiones durante 10 min, el lisado se neutralizó adicionando rápidamente 60  $\mu$ l de Tris-HCl 2 M, pH 7,0 preenfriado en hielo. Gran parte del ADN cromosómico, ya parcialmente desnaturalizado, se precipitó adicionando 86  $\mu$ l de NaCl 5 M e incubando en hielo durante 30-60 min, siendo seguidamente retirado mediante centrifugación en microfuga a temperatura ambiente durante 10 min. El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo y se extrajo con un volumen igual de fenol saturado con NaCl al 3% en Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 centrifugándose durante 5 min. 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 adicionó un volumen igual de isopropanol (preenfriado a -20 °C), manteniéndose a -20 °C durante 2 h como mínimo), o a -70 °C (30 min), para precipitar el ADN plasmídico. A continuación se centrifugó durante 10 min para recoger el precipitado, que se lavó con 1 ml de etanol al 70 % frío. El sedimento resultante se secó mediante centrifugación a vacío en una centrífuga Speed Vacum (Dupont) y, finalmente, se resuspendió en 20  $\mu$ l de tampón TE estéril. Este ADN puede ser mantenido hasta su uso a -20 °C. El contenido de ADN plasmídico se observó mediante electroforesis en gel de agarosa.

### Tampón TE, pH 7,4:

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Tris-HCl             | 10 mM |
| EDTA-Na <sub>2</sub> | 1 mM  |

### Solución A, pH 8,0:

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Sacarosa             | 6,7 % |
| Tris-HCl             | 50 mM |
| EDTA-Na <sub>2</sub> | 1 mM  |

### Solución de lisis, pH 8,0:

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

### 6.1.2.- Minipreparación de plásmidos de *E. coli*

Para la extracción de ADN plasmídico de *E. coli* se empleó el método de lisis alcalina descrito por Birnboim & Doly (1979).

Para ello se obtuvieron cultivos de una noche, incubados en agitación a 37 °C en medio LB ó 2xYT, adicionados de Amp (50 µg/ml) o Cm (50µg/ml) dependiendo del plásmido. De cada uno de los cultivos, se tomaron 1,5 ml se centrifugaron, y las células se resuspendieron en 100 µl de solución que contenían 2mg/ml de lisozima, mezclándose por agitación durante 30-45 segundos y manteniéndose después en hielo durante 5 min. Entonces se adicionaron 200 µl de una solución 0,2 N NaOH-1% SDS y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 150 µl de acetato sódico 3M pH 4,8 y se mezcló bien. Después de mantenerse en hielo durante 30 min se centrifugó en frío (10 min) y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo adicionado de 0,8 volúmenes de isopropanol (10

min a temperatura ambiente). Tras la precipitación del ADN, se centrifugó y el sedimento se lavó con etanol al 70%. El ADN se secó al vacío en una centrífuga (Speed Vacuum) y se resuspendió en 200  $\mu$ l de agua estéril o TE.

#### **Solución de lisis:**

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

### **6.2.- Aislamiento de plásmidos a gran escala: Maxipreparaciones.**

#### **6.2.1.- Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli* mediante lisis alcalina.**

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 RNasa 40  $\mu$ g/ml) y posteriormente se adicionaron 5 ml de Solución II, dejándose actuar durante 5 min. Finalmente se adicionaron 5 ml de Solución III y la mezcla se incubó durante 15 min en hielo. Después de centrifugar a 12.000 xg durante 20 minutos, el sobrenadante se mezcló 0,8 vol de isopropanol manteniéndose a temperatura ambiente durante 20 ó 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 (se puede volver a tratar con RNasa) y se incubó 10 min a temperatura ambiente. El ADN se extrajo dos veces con fenol 2 veces y posteriormente con cloroformo-isoamílico. Para precipitar el ADN se adicionó 1/10 vol de acetato sódico 3M pH 7 y 2 vol de etanol absoluto incubándose durante 1 hora a -20 °C. Tras centrifugar el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en tampón TE o agua estéril.

#### **Solución I (lisozima 2mg/ml):**

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



### Solución II:

|      |          |
|------|----------|
| NaOH | 0,2 N    |
| SDS  | 1% (p/v) |

### Solución III:

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| CH <sub>3</sub> COONa, pH 4,8 | 3M |
|-------------------------------|----|

### 6.2.2.- Maxipreparaciones de plásmidos de *E. faecalis*.

Se llevó a cabo según la técnica descrita por Anderson & McKay (1983).

A partir de un cultivo bacteriano en fase estacionaria se inocularon (2%) 100 ml de medio BHI, y se incubó a 37 °C durante 4-5 horas. Las células se recogieron por centrifugación durante 15 min a 5.000 xg y se lavaron con 20 ml de tampon TE. El sedimento de células se resuspendió en 5 ml de solución I y se añadió entonces 1,25 ml de solución 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 pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 8. La lisis de las células, ya osmóticamente frágiles, se efectuó adicionando 0,375 ml de SDS (20% p/v) en Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM, pH 8, durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 0,4 ml de NaOH 3M, mezclándose por inversión suave durante 10 min. La solución fué neutralizada posteriormente con 0,650 ml de Tris-HCl, 2 M pH 7 (preenfriado en hielo) agitándose por inversión suave durante 3 min. Parte del ADN cromosómico y los restos celulares se precipitaron adicionando 0,95 ml de NaCl 5M. Se agitó y se incubó a 4 °C durante 1 h, entonces se centrifugó durante 15 min a 12.000 xg (4 °C). Al sobrenadante, que contenía mayoritariamente ADN plasmídico, se le adicionó un volumen de fenol saturado con NaCl 3% en Tris-HCl 100 mM, pH 8. Las dos fases, acuosa y fenólica, se separaron tras una centrifugación de 15 min a 5.000 xg y la fracción acuosa se extrajo con un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1).

Finalmente, la fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol preenfriado,

y se incubó a -20 °C durante 1-2 horas (o una noche). El ADN plasmídico se recogió por centrifugación a 12.000 xg durante 10 min, y una vez seco, se resuspendió en agua Milli-Q estéril o TE. El contenido en ADN plasmídico de la preparación se estimó mediante electroforesis en gel de agarosa.

### **6.3.-Purificación del ADN plasmídico**

#### **6.3.1- Purificación del ADN plasmídico en gradiente de cloruro de cesio**

Para la purificación a gran escala de ADN plasmídico de *E. faecalis* se siguió la metodología descrita por Maniatis *et al.*, 1982). A la preparación de ADN obtenida según la técnica descrita en el apartado previo se le añadió 1,1 g de CsCl por cada ml de solución de ADN, mezclándose hasta conseguir la disolución de la sal. Entonces se adicionó bromuro de etidio (10 mg/ml en TE) hasta una concentración final de 400 µg/ml, y se centrifugó a 12.000 xg. durante 30 min, para eliminar los restos de proteínas. Tras ajustar la solución a una densidad de 1,55 g/ml, la muestra se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman ( modelo L5-50, rotor SW41 ) a 39.000 xg y a 18 °C, durante al menos 48 h. Pasado este tiempo se iluminaron los tubos de centrífuga con luz ultravioleta visualizándose dos bandas; la inferior, correspondiente al ADN plasmídico, se recogió pinchando el tubo a ese nivel con la ayuda de una jeringa. Para eliminar los restos de bromuro de etidio, se adicionó a la solución de ADN plasmídico, un volumen igual de n-butanol saturado con agua, se agitó y finalmente se retiró la fase superior alcohólica. Este proceso se repitió varias veces hasta que desapareció el color rosado de la fase acuosa.

El ADN plasmídico se dializó, frente a 2 litros de TE, durante 24 h a 4 °C, y se precipitó finalmente por adición de acetato sódico 3 M (1/10 del volumen de la solución) y 2 volúmenes de etanol absoluto. El ADN se recogió por centrifugación a 12.000 xg durante 15 min, lavándose posteriormente con etanol 70% y secándose a vacío. Por último se disolvió en un volumen inicial de TE y se fraccionó en alícuotas, guardándose a -20 °C.

#### **6.3.2.-Extracción y purificación de ADN de *E. coli***

La extracción se realizó empleando el sistema "Flexiprep" (Pharmacia Biothech). A

partir de 50 ml de cultivo de una noche en medio LB, se extrajo el ADN plasmídico según el método de lisis alcalina y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Este sistema permite además la subsiguiente y rápida purificación del ADN mediante la retención de éste a una matriz de Sephaglas<sup>TM</sup> FP, y su posterior elución sin necesidad de realizar la centrifugación en gradiente.

### 6.3.3.- Purificación del ADN a partir de la agarosa

Se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Vogelstein & Gillespie (1979).

Una vez realizada la electroforesis en gel de agarosa, y visualizadas las bandas de ADN, se cortó el trozo de agarosa correspondiente al fragmento de ADN que se quería recuperar 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" ( 5  $\mu$ l/ $\mu$ g de ADN de solución de Sephaglass), y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación la mezcla se sometió a un pulso de centrifugación (30 seg) en la microfuga, y una vez retirado el sobrenadante, se lavó el sedimento tres veces con el 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 3 volúmenes, respecto al volumen de Sephaglass adicionado, de agua ultrapura o tampón TE.

### 6.3.4- Separación e identificación de plásmidos o fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.

La separación de plásmidos o de los fragmentos de restricción obtenidos a partir de los mismos, se llevó a cabo mediante electroforesis sumergida en geles de agarosa de baja electroendósmosis (Sigma tipo 1A) a la concentración apropiada (0,6 al 1% según el tamaño de los ADNs a resolver) en tampon Tris-Acetato-EDTA (TAE). Las muestras fueron adicionadas (1/10 de su volumen) de solución de carga y depositadas en el gel, para el desarrollo de la electroforesis a un voltaje constante de 80 V hasta que el indicador de frente llegó al borde del gel.

El ADN se visualizó mediante inmersión del gel en una solución de bromuro de etidio, a concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  (10-15 min) y posterior exposición a la luz ultravioleta en un transiluminador Spectroline (302 nm).

Para conocer el tamaño aproximado de los ADNs presentes en las muestras sometidas a electroforesis de agarosa, se utilizaron como patrones los fragmentos de restricción ( $\lambda$ -*Hind*III), cuyos tamaños son los siguientes: 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0 y 0.6 kilobases respectivamente, o bien los diferentes plásmidos de la estirpe *E.coli* V 517 ( Macrina *et al.*, 1978).

Los geles fueron así fotografiados con una cámara Praktica MLTLB, provista de película Kodak Tri-X PAN de 400 ASA ó en videocámara UVP ImageStore 5000.

#### **TAE (1000 ml):**

|   |         |
|---|---------|
| Tris-acetato                                | 40,0 mM |
| EDTA  | 2,5 mM  |
| Ajustado a pH 8,1 con ácido acético glacial |         |

#### **Solución de carga:**

|                    |        |
|--------------------|--------|
| Glicerol           | 50,0 % |
| Tris-EDTA          | 50,0 % |
| Azul de bromofenol | 0,25 % |

#### **6.4.- Determinación de la concentración de ADN y ARN.**

La determinación de la concentración de los ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante medida de la absorción, siguiendo el método descrito en Sambrook *et al.*, (1989). Para ello se determinan las absorbancias de la solución de ADN o ARN en agua a 260 nm y 280 nm utilizando como blanco agua destilada. La concentración de la muestra se calcula usando como referencia la  $A_{260}$  de una solución que contiene 50  $\mu\text{g/ml}$  de ADN de cadena doble o 40  $\mu\text{g/ml}$  de ARN, a la que se le asigna el valor de 1.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

La relación  $A_{260}/A_{280}$  se usa como comprobante de la pureza de la preparación, considerándose que valores por debajo de 1,5 son indicadores de contaminación por proteínas o fenol. En el caso de oligonucleótidos sintéticos la concentración molar de ADN de la muestra se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$C = A/0,01 \times N$$

Donde C es la concentración del ADN medida en pmoles/ $\mu$ l;

A es la absorción de la muestra a 260 nm.

N es el número de nucleótidos del oligonucleótido.

Para muestras de ADN desarrollada en un gel de agarosa y teñida con bromuro de etidio, se empleó el método de la comparación de la fluorescencia emitida bajo luz ultravioleta, frente al  $\lambda$ HindIII empleado como marcador de ADN de tamaño y concentración conocida.

### 6.5.- Digestión del ADN con endonucleasas de restricción

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

La digestión del ADN se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada tipo de enzima de restricción. Los tampones empleados, así como las condiciones óptimas de incubación fueron las indicadas por los proveedores. Las mezclas de las digestiones se incubaron entre 1 y 5 h, deteniéndose según lo indicado por la casa comercial para cada una de las enzimas.

Las digestiones dobles o triples se realizaron en distintas fases. Primero se digirió con el enzima activo a una concentración de NaCl mas baja, y posteriormente se añadió la cantidad apropiada de NaCl 1 M, hasta alcanzar la concentración óptima para el siguiente enzima. Alternativamente se extrajeron los fragmentos de restricción a partir de geles de agarosa (mediante el método de Sephaglass), para ser digeridos a continuación por la otra restrictasa.

## 6.6.- Desfosforilación del vector de ligación

La reacción de desfosforilación se utilizó para eliminar el extremo fosfato 5' del vector, evitando de esta forma la recircularización del mismo.

Para desfosforilar el ADN y su posterior ligación, se utilizó 1  $\mu\text{g}$  de ADN vector que se mezcló con 1  $\mu\text{l}$  de la enzima fosfatasa alcalina (1U/ $\mu\text{l}$ ) y se incubó durante 30 min a 37 °C. Tras 2 fenolizaciones sucesivas, el ADN se extrajo con cloroformo-isoamílico y se precipitó con 2 volúmenes de etanol y 1/10 volúmenes de acetato sódico 3M, pH 7. El precipitado, lavado con etanol al 70%, se secó a vacío y se resuspendió en un volumen apropiado para obtener una concentración final de 20-30 ng/ $\mu\text{l}$ .

## 6.7.- Ligación del ADN

Para la ligación de las moléculas de ADN se generaron fragmentos de ADN mediante digestión con los enzimas de restricción apropiados, compatibles con los sitios de clonación del vector empleado.

Se mezclaron el vector linearizado y defosforilado, y el fragmento de ADN purificado procedente de la digestión con uno o varios enzimas de restricción, en proporción 1:2 ó 1:3. La mezcla de reacción se preparó añadiendo a los ADNs, 0,1 volúmenes del tampón de ligación (10x) y una unidad de ligasa del fago T4, en un volumen final de 10-20 $\mu\text{l}$  y se incubó durante toda la noche a 14 °C, siendo a continuación sometida a electroforesis en gel de agarosa al 0,7%, para verificar la ligación.

### Tampón de ligación (x10)

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Tris-HCl 1M, pH 7,5 | 660 mM |
| MgCl <sub>2</sub>   | 50 mM  |
| Ditioeritritol      | 10 mM  |
| ATP                 | 10 mM  |

En el caso de clonaciones de ADNs amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizó el plásmido pGEM-T, según las recomendaciones del

fabricante (Promega).

### 6.8.- Transformación genética de *E. coli*

#### 6.8.1- Método del $\text{CaCl}_2$

Para obtener las células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  se inoculó en 2 ml de LB y se incubó a 37 °C con agitación durante una noche. Este cultivo se diluyó 50 veces en 50 ml de medio fresco y se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar la fase exponencial temprana de crecimiento ( $A_{590} = 0,5$ ). A partir de este momento se trabajó en frío (4 °C) porque, así, la eficiencia de transformación es muy superior.

Las células se mantuvieron en un baño de hielo durante 10 min, y se recogieron por centrifugación a 12.000 xg durante 5 min. A continuación se resuspendieron en 50 ml de una solución preenfriada de  $\text{SO}_4\text{Mg}$  10mM y se centrifugaron a 8.000 x g. El sedimento se resuspendió suavemente en 50 ml de una solución preenfriada de Tris-HCl 10 mM, pH 8 y 50 mM de  $\text{CaCl}_2$  manteniéndose en hielo durante 15 min. Tras una nueva centrifugación (5 min a 8.000 xg) las células fueron resuspendidas en 2 ml de una solución de Tris-HCl 10 mM 50 mM de  $\text{CaCl}_2$  y glicerol al 20%. Esta suspensión se repartió en tubos eppendorf preenfriados a razón de 200-300  $\mu\text{l}$ /tubo y así se guardaron a -70 °C hasta su uso.

Para llevar a cabo la transformación se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  de células competentes, previamente descongeladas en hielo, se mezclaron con 20-50 ng de ADN plasmídico y se incubaron en hielo durante 30 min. Posteriormente se sometieron a un choque térmico durante 2 min a 42 °C y se mantuvieron 5 min a temperatura ambiente.

Para conseguir la expresión fenotípica de los genes de resistencia a antibióticos codificada por el plásmido, se inocularon en 500  $\mu\text{l}$  de medio 2xYT y se mantuvieron durante 10 min en un baño a 37 °C y posteriormente 1 hora a 37 °C en agitación. La selección se realizó mediante la siembra de alícuotas de 50-200  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular en placas de LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados. 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.

### 6.8.2.- Electrotransformación

Para obtener células competentes a partir de un cultivo en fase estacionaria de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se inocularon 500 ml de medio LB (1%), y se dejó crecer a 37 °C en agitación hasta alcanzar a A<sub>590</sub>: 0,6-0,8. Entonces las células fueron recogidas por centrifugación durante 10 minutos, se lavaron 3 veces, a 4 °C con diferentes volúmenes de agua destilada (1 , 0.5 y 0.02 volúmenes respectivamente). En la última centrifugación, las células se resuspendieron en 0.002-0.003 volúmenes de glicerol estéril 10%, se alicuotaron a razón de 100  $\mu$ l en tubos eppendorf siendo seguidamente congeladas a -70 °C hasta el momento de su uso.

Para realizar la electrotransformación se utilizó la técnica descrita en el Protocolo de electroporación Electro Cell Manipulator 600, usando un electroporador Electro Cell Manipulator 600 (BTX Electroporation System) y cubetas BTX de 2 mm de distancia entre los electrodos. En la cubeta se mezclaron 1  $\mu$ l de ADN (10-20 ng) con 40  $\mu$ l de células electrocompetentes, previamente descongeladas en hielo, disponiéndose inmediatamente en el electroporador, tras lo cual se aplicó un voltaje de 2,5 kV, a una resistencia R= 129 Ohmios y una capacitancia C= 25  $\mu$ faradios.

A continuación se diluyeron rápidamente las células en medio de reconstitución 2xYT y se incubaron a 28 °C durante 2 h para permitir la expresión fenotípica del ADN incorporado.

Tras este período de incubación se inocularon 0,1 ml de la suspensión bacteriana en placas de Petri con el medio apropiado adicionado del antibiótico empleado para la selección, y se incubó a 28 °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.

### 6.9.- Electrotransformación de *Lactococcus lactis* LM2301 y *E. faecalis* JH2-2

Se utilizó la técnica descrita por Holo & Nes (1991). Para la obtención de células competentes se inocularon 100 ml de medio SGM17 (1%) con un cultivo de una noche de *L. lactis* LM2301, incubándose durante 16 h. Las células se recogieron por centrifugación a 6.000 xg en una centrífuga Sorvall (rotor GSA) durante 15 min y se lavaron cuatro veces con volúmenes decrecientes (100, 100, 50 y 25 ml) de una solución al 10% de sacarosa-



glicerol 0,5M (v/v), para ser finalmente resuspendidas en 0,5 ml de esta solución. La suspensión fué congelada a -70 °C hasta su posterior uso.

Para llevar a cabo la electrotransformación se mezclaron en la cubeta 5  $\mu$ l de ADN (100-200 ng) con 45  $\mu$ l de células electrocompetentes, previamente descongeladas en hielo, disponiéndose inmediatamente en el electroporador, tras lo cual se aplicó un voltaje de 2,5 kV, a una resistencia  $R = 186$  Ohmios y una capacitancia  $C = 25$   $\mu$ Faradios.

A continuación las células se diluyeron rápidamente en medio de reconstitución y se incubaron a 28 °C durante 2 h para permitir la expresión fenotípica del ADN; y posteriormente fueron inoculados, a razón de 0,2 ml, en placas de Petri con medio GM17<sub>cm</sub>, e incubadas a 28 °C durante 2-4 días, hasta la aparición de las colonias transformantes.

### 6.10.- Selección y análisis de los transformantes de *E. coli* seleccionados.

Cuando un fragmento de ADN procedente de la digestión de un plásmido ha sido clonado en vectores como pUC18 o pGem-Zf(+), el gen *lacZ* queda interrumpido, por lo que queda impedida la actividad  $\beta$ -galactosidasa que confiere la capacidad de hidrolizar el compuesto X-gal ( 5-bromo-4-cloro- $\beta$ -D-galactopiranosido), dando lugar a la aparición un compuesto de color azul insoluble que colorea la colonia. La aparición, por tanto, de colonias incoloras es indicativa de la presencia de insertos de ADN en el vector, lo que facilita la selección de los transformantes.

Dado que estos plásmidos portan resistencia a la ampicilina, a las placas de medio LB sólido con 2 mM IPTG y 20  $\mu$ l de X-Gal (50 mg/ml en dimetilformamida) se les adicionó Amp (50  $\mu$ g/ml).

Para hacer el análisis de los transformantes, se realizó la extracción plasmídica de las colonias seleccionadas y se analizó el perfil plasmídico mediante electroforesis en gel de agarosa, utilizando *E. coli* V530 como patrón de pesos moleculares.

### 6.11.- Estudio de la estabilidad de los plásmidos recombinantes.

Para analizar la estabilidad de los transformantes de *E. faecalis* en pAM401-81 se

siguió el comportamiento de las mismas en presencia o ausencia de presión selectiva al cloranfenicol.

Para ello se partió de un cultivo en medio BHI<sub>Cm</sub> que se dejó crecer a 37 °C durante toda la noche y posteriormente se determinó el número de células mediante recuento en placa, haciendo diluciones sucesivas ( $10^{-1}$ - $10^{-12}$ ), y se midió la absorbancia a una densidad óptica de 620 nm.

Este cultivo fue usado como preinóculo (2%) para dar inicio a dos nuevos cultivos en medio BHI, uno de ellos adicionado de Cm y el otro sin antibiótico. Ambos cultivos se incubaron a 37 °C y a partir de este momento se comenzó a determinar el número de generaciones transcurridas según el tiempo de crecimiento de esta bacteria, (25-30 minutos de acuerdo con Sargen., G.M. 1978) resembrándose cada 12 horas al 2% en medio BHI fresco con y sin cloranfenicol y dejándolos crecer hasta completar aproximadamente 120 generaciones. Transcurrido este tiempo se midió nuevamente la densidad óptica y se realizó un nuevo recuento en placa. Las placas con un número adecuado de colonias fueron cubiertas con una sobrecapa de agar BHA tamponado, inoculados con la estirpe indicadora *E. faecalis* S-47.

## 6.12.- Amplificación del ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica se ha utilizado tanto para verificar la presencia de un determinado gen, mediante su amplificación en los transformantes obtenidos, como para obtener sondas marcadas con dUTP-Dig. En ambos casos se ha realizado en un termociclador SPR 3 MiniGene (Stuart Scientific).

### 6.12.1.- Técnica de PCR

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

|                   |          |
|-------------------|----------|
| ADN molde         | 20-50 ng |
| Oligonucleótido 1 | 100 pmol |
| Oligonucleótido 2 | 100 pmol |

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

|                                   |             |
|-----------------------------------|-------------|
| dNTP (10 mM)                      | 2 $\mu$ l   |
| Tampón (10x) de la Taq polimerasa | 10 $\mu$ l  |
| Taq polimerasa                    | 1 U         |
| Volumen final                     | 100 $\mu$ l |

### Condiciones de la PCR:

C<sub>0</sub>) Desnaturalización inicial: 94 °C durante 90 seg.

C<sub>1</sub>) Desnaturalización: 94 °C durante 60 seg.

C<sub>2</sub>) Anillamiento: 1 min. La temperatura de esta etapa que corresponde a la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) menos 2 °C y se determina en cada caso según la composición de los oligonucleótidos empleados como cebadores.

La T<sub>m</sub> se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:  $T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$  (Sambrook *et al.*, 1989).

C<sub>3</sub>) Extensión: 72 °C durante un tiempo que depende de la longitud del fragmento a amplificar según la relación 1 min/1Kb.

El número de ciclos fué de 25 (incluidos C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>).

Etapa de terminación, para favorecer la extensión de las cadenas parcialmente sintetizadas:

72 °C durante 5 min.

### dNTP:

|      |       |
|------|-------|
| dATP | 10 mM |
| dGTP | 10 mM |
| dCTP | 10 mM |
| dTTP | 10 mM |

### Tampón (10x) de la Taq polimerasa:

|                |        |
|----------------|--------|
| Triton 100x    | 1 %    |
| Tris HCl, pH 9 | 100 mM |

|                   |         |
|-------------------|---------|
| KCl               | 500 mM  |
| MgCl <sub>2</sub> | 15 mM   |
| BSA o gelatina    | 2 mg/ml |

### 6.12.2.- Preparación, mediante PCR, de sondas no radiactivas marcadas con digoxigenina 11- dUTP

Las condiciones utilizadas fueron antes las descritas y los componentes de los medios de amplificación fueron los siguientes:

|                   |            |
|-------------------|------------|
| ADN molde         | 50 ng      |
| Oligonucleótido 1 | 100 pmol   |
| Oligonucleotido 2 | 100 pmol   |
| dNTP-Dg (2mM)     | 10 $\mu$ l |
| Tampón 10x        | 10 $\mu$ l |
| Taq polimerasa    | 1 U        |

La mezcla dNTP-Dig fue suministrada por Boehringer Mannheim

|          |        |
|----------|--------|
| dATP     | 2,0 mM |
| dCTP     | 2,0 mM |
| dGTP     | 2,0 mM |
| dTTP     | 1,9 mM |
| dUTP-Dig | 0,1 mM |

Finalizada la reacción de marcaje, se purifica la sonda mediante Sephaglass, según se ha descrito en el apartado 6.3.2 de Material y Métodos.

### 6.13.- Secuenciación del ADN.

Las reacciones de secuenciado se realizaron en un secuenciador (ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction de Perkin Elmer ) del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra. En cada reacción se utilizaron del orden de 0.6-1 $\mu$ g de ADN

purificado junto con 3,2 pmol del oligonucleótido seleccionado como cebador, completando hasta un volumen final de 6  $\mu$ l. Este sistema, basado en la técnica de Sanger *et al.* (1977), utiliza la polimerasa AmpliTaq FS y terminadores marcados con fluorescencia. El secuenciador detecta la fluorescencia de cuatro marcadores diferentes correspondientes a cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos, que terminan la reacción al carecer del grupo OH en 3' necesario para la elongación de la cadena de ADN. Cada marcador emite a diferente longitud de onda cuando es excitado por luz láser, lo que permite que los cuatro colores puedan ser detectados en una misma línea.

### 6.14.-Análisis de las secuencias de ADN y proteínas

El tratamiento informático de las distintas secuencias obtenidas se realizó mediante los siguientes programas del paquete de GCG (Genetics Computer Group) de la Universidad de Wisconsin, versión 9.1.

SEQED : editor de secuencias

MAP : utilizado para analizar secuencia de ADNs, traducción, mapas genéticos, etc.

GELSTART : permite solapar diferentes secuencias en ambas direcciones obteniendo una secuencia única.

REPEAT : permite obtener repeticiones de una secuencia.

STEEMLOOP: analiza las secuencias repetidas invertidas.

PEPTIDE STRUCTURE: analiza de forma teórica la estructura secundaria de proteínas (hidrofobicidad).

PILEUP: usado para el alineamiento de múltiples secuencias y obtención de secuencias "consensus" de proteínas.

MOTIF : permite detectar dominios específicos de determinadas familias de proteínas.

FASTA, TFASTA y BLAST : utilizados para comparar secuencias, búsqueda de homologías en los diferentes bases de datos (EMBL, GenBank, Swiss-Prot, PIR ).

Como complemento para los análisis de secuencias también se utilizaron otros recursos disponibles en internet y que aparecen en las siguientes direcciones;

<http://www.ebi.ac.uk>, <http://www4.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.isrec.isb-sib.ch>

## **6.15.- Mutagénesis de los plásmidos recombinantes mediante el transposón *Tn5*.**

Para experimentos de mutagénesis con *Tn5*, se utilizó el fago  $\lambda_{467}$  que transporta el citado transposón y resistencia a Kanamicina ( $Km^R$ ), utilizando la metodología referida en Martínez Bueno *et al.*, (1998). La estirpe bacteriana empleada fue *E. coli* RYC1000, previamente transformada con el plásmido a mutagenizar. Esta raza bacteriana contiene un represor de la replicación del fago  $\lambda_{467}$  facilitándose así la transposición del *Tn5*. En la figura 6 se describe en detalle la estrategia empleada.

### **6.15.1.- Obtención de una suspensión del fago lambda 467**

Para ello se empleó la estirpe *E. coli* CS1045 que fue crecida en medio líquido LB suplementado con maltosa 0,4% (p/v), 10 mM  $MgSO_4$  hasta alcanzar una densidad óptica a 590 nm de 0,6. A continuación se hicieron mezclas (por duplicado) con 0,1 ml de cultivo y 0,1 ml de distintas diluciones seriadas de la suspensión de  $\lambda_{467}$ . Las mezclas se incubaron durante 20 min a 37 °C para favorecer la adsorción del fago y entonces se añadieron 3 ml de agar blando LB mantenido en sobrefusión y suplementado con 1,5 ml de LB  $MgSO_4$  20mM-0,4 % de maltosa (p/v). Posteriormente se extendió la mezcla sobre placas con medio P75 y se incubó a 37 °C durante 16 h. Transcurrido este tiempo se pudo visualizar una red en la capa de agar blando debido a la aparición de calvas de lisis, recogiendo con tres gotas de cloroformo de esta forma posar lizar las células de la sobrecapa.

Después de agitar enérgicamente en vortex, se centrifugó a 15.000 xg durante 20 min. y el sobrenadante donde se encontrase el fago, se lavó de nuevo con cloroformo en las mismas condiciones anteriores y se guardó a 4 °C hasta el momento de su uso.

### **6.15.2.- Inserciones con el transposón *Tn5***

La cepa *E. coli* RYC1000 que portaba los plásmidos a mutagenizar se dejó crecer en 10 ml de LB adicionado de maltosa (0,4%) y el antibiótico de selección del plásmido, hasta alcanzar un valor de  $A_{590} = 1,3$ . A continuación se mezclaron 2 ml de este cultivo con 0,2 ml de suspensión de fago (con un título de  $4 \times 10^{10}$  fagos/ml, lo que representa una

MUTAGÉNESIS CON EL TRANSPOSÓN *Tn5*

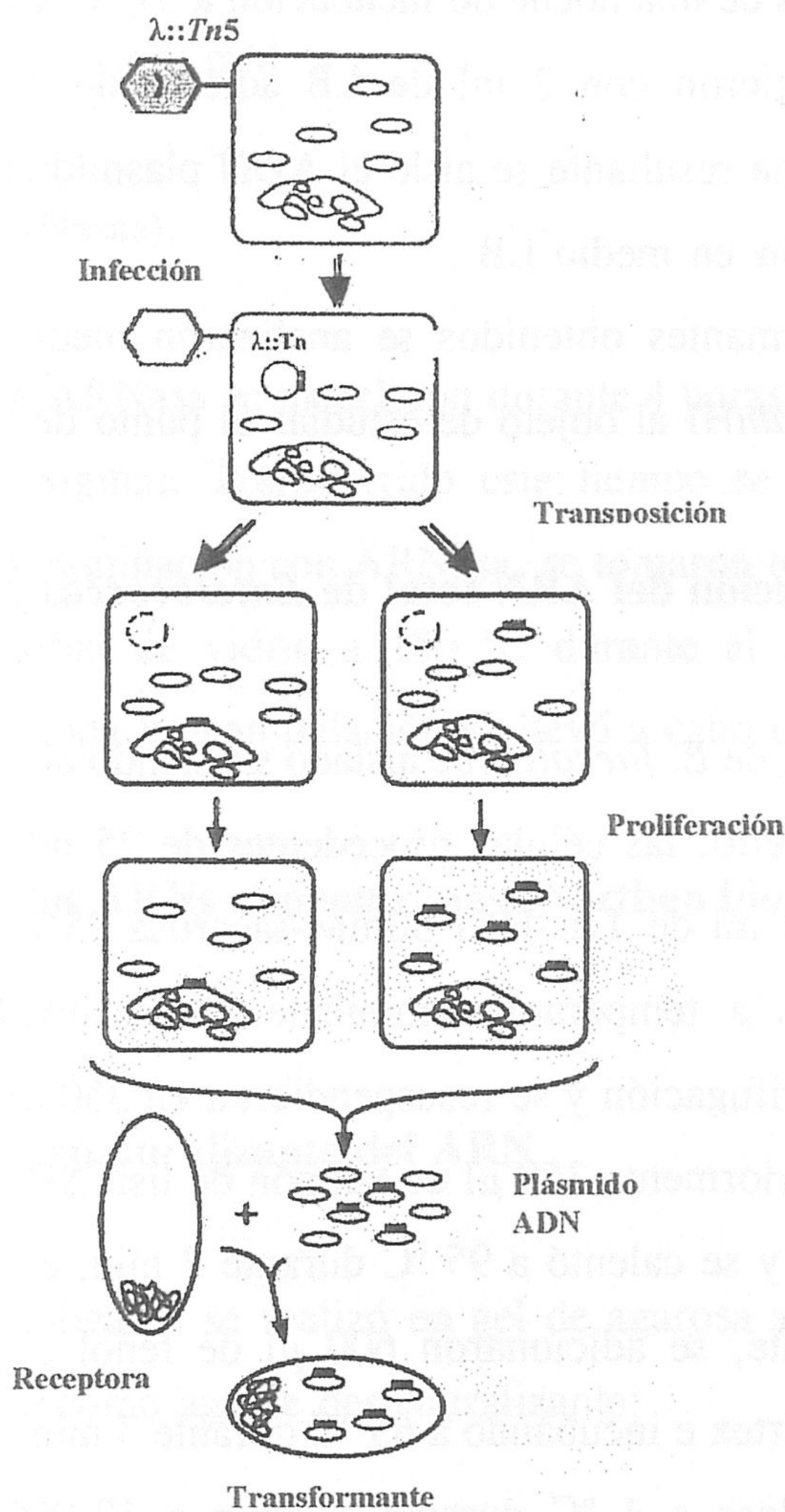


Figura 6.- Transposición conservativa con *Tn5* del fago  $\lambda$  en sistemas plasmídicos. La transposición es obtenida por la selección de colonias resistentes a kanamicina después de la infección con el fago  $\lambda$  que porta el *Tn5*. El ADN extraído de plásmidos con inserciones se emplea para transformar a un nuevo huésped.

multiplicidad de infección de aprox. 1), y se incubó a 20 min a 37 °C para permitir la adsorción. Posteriormente se tomaron 5 alícuotas de 0,2 ml que se repartieron en matraces conteniendo 2 ml de LB-citrato sódico 10 mM, incubándose a 37 °C durante 90 min en agitación. Por último se retiraron muestras de 0,1 ml y se sembraron sobre placas de LB sólido, suplementadas con 0,2 ml de citrato sódico 1 M y los correspondientes antibiótico (Cm, Km). Después de una noche de incubación a 37 °C las colonias que crecieron que eran Cm<sup>R</sup> Km<sup>R</sup> se recogieron con 2 ml de LB adicionado de citrato sódico 10 mM. De la suspensión bacteriana resultante se aisló el ADN plasmídico que se utilizó para transformar células *E. coli* DH5 $\alpha$  en medio LB .

Los transformantes obtenidos se analizaron mediante digestión del ADN con los enzimas *EcoRI* y *BamHI* al objeto de estudiar el punto de inserción del *Tn5*.

#### 6.16.-Extracción del ARN total de *Enterococcus faecalis*

El ARN total de *E. faecalis* fué aislado siguiendo el método del fenol caliente (Tomita *et al.*, 1996). Para ello, las células procedentes de 25 ml de cultivo ( $A_{590} = 0,6-0,7$ ) , se resuspendieron en 2 ml de Tris-HCl 50mM-sacarosa 25%-lisozima 5 mg/ml, incubandose durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 350  $\mu$ l de tampón de lisis, a los que se le adicionaron posteriormente 350  $\mu$ l de tampón de lisis SDS 1% (p/v). Esta mezcla se agitó por inversión suave y se calentó a 95 °C durante 2 min, enfriandose rapidamente en hielo.

Posteriormente, se adicionaron 600  $\mu$ l de fenol caliente pH 8,0 (65 °C) agitando vigorosamente en vórtex e incubando a 65 °C durante 3 min. Seguidamente se enfrió en hielo 5 min, centrifugandose a 4 °C durante 15 min a 12.000 xg. Después de una segunda fenolización se extrajo la fase acuosa 3 veces consecutivas con éter, y finalmente el ARN total se precipitó con 0,1 volúmen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto.

El ARN precipitado y parte del ADN se recogió por centrifugación a 12.000 xg a 4 °C, tratándose entonces con 3U de ADNasa I libre de ARNasa (Boehringer Mannheim) durante 15 min. Tras inactivar el enzima a 70 °C durante 10 min, el ARN se volvió a precipitar con etanol absoluto, resupendiendo finalmente en 150  $\mu$ l de agua-DEPC.



### Tampón de lisis

|                |         |
|----------------|---------|
| Tris-HCl, pH 8 | 20,0 mM |
| EDTA           | 3,0 mM  |
| NaCl           | 200 mM  |

Agua-DEPC (libre de ARNasas).

Para obtener agua libre de ARNasa se mezclaron durante 4 horas 100 ml de agua con 0,1 ml de dietil-pirocarbonato (Sigma). Transcurrido este tiempo se esterilizó a 120 °C durante 20 min. Para evitar la contaminación con ARNasa, se tomaron todas las precauciones necesarias, esterilizando el material de vidrio a 180 °C durante al menos 4 horas, las soluciones en autoclave; además toda la manipulación se llevó a cabo con guantes.

### 6.17.- Transferencia de los ARNs a membranas (Northern blotting) e hibridación con sondas

#### 6.17.1.- Electroforesis desnaturizante del ARN

La electroforesis desnaturizante se realizó en gel de agarosa al 1,2% a los que se le había adicionado formaldehído como agente desnaturizante:

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| 10xMOPS               | 10 ml |
| H <sub>2</sub> O-DEPC | 87 ml |
| Agarosa               | 1,2 g |
| Formaldehído 37%      | 3 ml  |

La composición del tampón 10xMOPS fue de MOPS 200 mM pH 7 NaAc 50 mM, EDTA 10 mM. Antes de cargar la muestra en el gel de agarosa se desnaturizó calentando a 55 °C durante 15 min en presencia de formamida y formaldehído de acuerdo con la siguiente proporción:

## Preparación de la muestra de ARN

|                   |              |
|-------------------|--------------|
| Tampón MOPS (10x) | 5,0 $\mu$ l  |
| Formaldehído 37%  | 8,75 $\mu$ l |
| Formamida         | 25,0 $\mu$ l |
| ARN (10 $\mu$ g)  | 12,0 $\mu$ l |
| Volumen total     | 50,0 $\mu$ l |

Para determinar la integridad del ARN y asegurar la presencia de la misma cantidad de ARN en todas las muestras, se añadió 1  $\mu$ l de una solución de bromuro de etidio (400  $\mu$ g/ml) por cada 10  $\mu$ l de muestra, para permitir su visualización tras la separación electroforética.

### 6.17.2.-Transferencia del ARN a membranas de Nylon

El ARN separado mediante electroforesis desnaturizante en gel de agarosa, se colocó sobre una superficie cubierta con papel Whatman 3 MM que estaba conectado a un reservorio de tampón de transferencia (20xSSC). Sobre el gely en el siguiente orden se colocaron, un filtro de nylon, cuatro piezas de papel Whatman 3MM, varias piezas de papel filtro y sobre éstas un peso suficiente para mantener ligeramente comprimido el sistema. La transferencia se completó durante una noche. Entonces, el ARN se fijó a las membranas por exposición a la luz UV (320 nm) durante 5 min.

### 6.17.3 Hibridación de ADN-ARN

Las membrana de nylon a la que se le había transferido el ARN, se incubó en una solución de prehibridación (1ml/cm<sup>2</sup>) durante al menos 2 horas a 42 °C. Transcurrido este tiempo, se cambió a la solución de hibridación (solución de prehibridación) adicionada de la sonda desnaturizada, hervida durante 10 min), incubándose a 45 °C durante toda la noche.

Finalizada la hibridación, la membrana se lavó dos veces a temperatura ambiente con 2 x SSC y SDS 0,1% durante 5 min cada vez, y dos veces a 68 °C con 0,1 x SSC-SDS 0,1% durante 15 min.

### 20 x SSC

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| NaCl                             | 3,0 M |
| Citrato sódico                   | 0,3 M |
| pH 7,0 ( ajustado con NaOH 10 N) |       |

### 6.17.4.- Revelado inmunológico

La detección inmunológica se realizó siguiendo las instrucciones del sistema de revelado DIG Luminiscent detection (Boehringer Mannheim).

Una vez terminada la hibridación se eliminó la sonda no incorporada a la membrana, lavando 5 min con 50 ml de tampón I y posterior incubación con 20 ml de tampón II durante 30 min. Entonces se adicionaron 20 ml del mismo tampón con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (dilución 1:10) y se incubó durante 30 min. El exceso de anticuerpos se eliminó mediante 2 lavados con 100 ml de tampón I. Seguidamente la membrana se equilibró con 20 ml de tampón III y posteriormente se adicionó 1 ml de tampón III con 10  $\mu$ l de CSPD, manteniéndolos durante 5 min a 37 °C. Finalmente, una vez seca la membrana sobre papel Whatman, se cubrió con un film de plástico, y se impresionó una película auto radiográfica Kodak X-OMAT por contacto durante 4-16 h.

### Tampón I

|               |        |
|---------------|--------|
| Acido maleíco | 0,10 M |
| NaCl          | 0,15 M |
| pH 7,5        |        |

**Tampón II** : Reactivo de bloqueo al 1% en tampón I

### Tampón III

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Tris-HCl          | 0,1 M |
| NaCl              | 0,1 M |
| MgCl <sub>2</sub> | 50 mM |
| pH 9,5            |       |

**Tampón de lavado:** Tampón I + Tween-20, 0,3% (w/v).

Solución stock de bloqueo al 10% en tampón I.

### 6.18.- Oligonucleótidos de síntesis empleados en este trabajo.

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se exponen en la Tabla 4 corresponden con secuencias conocidas dentro de la región de *as-48*. Fueron diseñados mediante el programa OLIGO 4-1 y suministrados por Pharmacia Biotech.

## 7.-TÉCNICAS PARA PROTEÍNAS

### 7.1.- Obtención de lisados y fracciones subcelulares de enterococos y lactococos

Los lactococos y enterococos procedentes de un cultivo (500 ml) de 8 h en medio GM17 y BHI respectivamente, se recogieron por centrifugación a 5.000 xg durante 20 min en rotor GSA de una centrífuga Sorvall, y se lavaron con 30 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,2 guardándose a -20 °C hasta el momento de su uso.

Las células se descongelaron suavemente en hielo, y se resuspendieron en 10 ml del mismo tampón adicionado de lisozima (2 mg/ml). Tras un período de incubación de 40 min a 37 °C, se añadió Tritón X-100 (concentración final 1%) a la suspensión y se incubaron durante 40 min a 4 °C. Entonces la suspensión celular fue tratada con ultrasonidos en un emisor Vibra cell™ (Sonics & Materials), a una potencia de 40 vatios en 4 pulsos de 1 min cada uno y fue centrifugada durante 30 min a 12.000 xg, a 4 °C, en rotor SS-34 de una centrífuga Sorvall, en este punto se separaron 2 fracciones: una fracción soluble A y una

## MATERIAL Y MÉTODOS

| Oligo           | Secuencia (5' a 3')   | T <sub>m</sub> (°C) | Posición inicial (*) |
|-----------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| <i>sphI1085</i> | TTTAACCTCTCATCTTCT    | 48                  | - 1085               |
| <i>as48-1</i>   | AATAAACTACATGGGT      | 42                  | + 1327               |
| <i>as48-2</i>   | TAATTTCTTTCTTAAGGT    | 44                  | - 1672               |
| <i>as48B-1</i>  | GGAGCATCAAATTGTTAT    | 48                  | + 2018               |
| <i>as48B-4</i>  | AATCCTATTACTACACAATAA | 52                  | - 2275               |
| <i>as48B-7</i>  | CATTGGAGTAATGCTTTC    | 50                  | + 2812               |
| <i>as48B-8</i>  | ACATGCGATTAGATACCA    | 50                  | + 3451               |
| <i>as48C-1</i>  | CCTATTATAATTCCTAC     | 44                  | - 3553               |
| <i>as48C-2</i>  | AAAAATGTGGAAGAAGAC    | 54                  | - 3783               |
| <i>as48C-3</i>  | TACATGTGTAGGCGTTTT    | 60                  | - 3875               |
| <i>as48C-4</i>  | AGGTATCCGTCTATTTCC    | 52                  | + 4041               |
| <i>as48C1-1</i> | GAGTATACTTATCGACTTT   | 50                  | + 4601               |
| <i>as48C1-2</i> | GGTAGGAGTAAAGTAATG    | 50                  | + 4840               |
| <i>as48C1-3</i> | CATTACTTTACTCCTACC    | 48                  | - 4857               |
| <i>as48D-3</i>  | AGGTTTCATCTAATAATAC   | 50                  | - 5341               |
| <i>as48D-4</i>  | AGGGAGTAAACTTGAAAA    | 48                  | + 5470               |

Tabla 4.- Oligonucleótidos de síntesis utilizados en este trabajo.

(\*): Referente al sitio *Sph* I del plásmido pAM401-81

(+): Dirección aguas abajo del sitio *Sph*I

(-): Cadena complementaria

Continuación tabla 4

| Oligo            | Secuencia (5' a 3') | T <sub>m</sub> (°C) | Posición inicial (*) |
|------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| <b>as48D1</b>    | GACTATAATAATAATG    | 48                  | - 5533               |
| <b>as-48D1-2</b> | AAGCTTCCTAAGATTTC   | 46                  | - 5810               |
| <b>ORF6-2</b>    | CACATAGAAAGATAAAAA  | 44                  | +6126                |
| <b>ORF6-4</b>    | CCGGTAGCTTGAACACT   | 52                  | - 6317               |
| <b>ORF7- 1</b>   | ACAACAAATTTCTTTAACG | 48                  | +6389                |
| <b>ORF7-3</b>    | AAATCGCTTATCTGTTGC  | 50                  | + 6782               |
| <b>ORF7-4</b>    | AAGGTTCTGTACAGAA    | 48                  | - 6799               |
| <b>ORF7-6</b>    | TCGTTACAGGTTGACCC   | 52                  | - 7176               |
| <b>ORF8-1</b>    | GGAACGACTTCAGGGTT   | 52                  | - 8199               |
| <b>ORF8-2</b>    | AGGAGTTGGTGCAATGA   | 50                  | + 8250               |
| <b>ORF9-1</b>    | GGGGTTTTCCCTGGAGAA  | 54                  | + 8815               |
| <b>ORF9-2</b>    | CTGCGTCAGAAGCAGCT   | 56                  | - 9416               |
| <b>ORF9-3</b>    | TTGTGTATATGTGGCGT   | 46                  | +10410               |
| <b>ORF9-4</b>    | GTCGATCTAATGATTGT   | 46                  | -10600               |

Tabla 4.- Oligonucleótidos de síntesis utilizados en este trabajo.

(\*): Referente al sitio *Sph* I del plásmido pAM401-81

(+): Dirección aguas abajo del sitio *Sph*I

(-): Cadena complementaria

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

fracción particulada B (correspondiente a células y restos celulares), que fué resuspendida en 10 ml de tampón fosfato sódico. Ambas fracciones fueron alicuotadas y guardadas a -20 °C a la espera de ser analizadas mediante electroforesis.

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

El análisis de las proteínas solubles extraídas de las diferentes razas de lactococos y enterococos se llevaron a cabo mediante electroforesis vertical en una cubeta Mini Protean II (BioRad), en geles de poliacrilamida (15%) conteniendo SDS, siguiendo el método descrito por Laemmli (1970).

#### 7.2.1.- Preparación de los geles

La separación de las proteínas se realizó mediante PAGE-SDS, usando geles a las siguientes concentraciones:

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

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| Acrilamida: Bis acrilamida (30%) | 2,3 ml    |
| Tris-HCl 1M, pH 8,8              | 2,5 ml    |
| SDS (10%)                        | 0,1 ml    |
| Agua destilada                   | 2,3 ml    |
| Persulfato amónico (10%)         | 0,1 ml    |
| TEMED                            | 4 $\mu$ l |

##### Gel de concentración al 5% de poliacrilamida (5 ml):

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| Acrilamida: Bis acrilamida (30%) | 0,83 ml |
| Tris-HCl 1 M, pH 6,8             | 0,63 ml |

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| SDS (10%)                | 0,05 ml   |
| Agua destilada           | 3,4 ml    |
| Persulfato amónico (10%) | 0,05 ml   |
| TEMED                    | 5 $\mu$ l |

### 7.2.2.- Condiciones de desarrollo de la electroforesis

Las muestras a analizar y marcadores de peso molecular (Sigma Low Maker Range 6.500-66.000 d), se mezclaron en proporciones 3:1 con solución desnaturalizante 4x y se calentaron al baño maria durante 5 min. a 100 °C antes de ser aplicadas a los pocillos del gel. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 150 V, empleando como tampón de los electrodos Tris-glicocola pH 8,3, hasta que el indicador de frente alcanzó el final del gel.

#### Solución desnaturalizante (4x):

|  |             |
|--|-------------|
| Tris-HCl 1M, pH 6,8                        | 2,5 ml      |
| SDS (10%)                                  | 4 ml        |
| Glicerol                                   | 2 ml        |
| $\beta$ -Mercaptoetanol                    | 330 $\mu$ l |
| Azul de Bromofenol                         | 0,004 g     |
| Se completa con agua destilada hasta 10 ml |             |

#### Tampón de electroforesis:

|             |         |
|-------------|---------|
| Tris base   | 0,025 M |
| Glicocola   | 0,192 M |
| SDS, pH 8,3 | 0,1 %   |

La tinción de las proteínas en los geles se realizó con azul de Coomassie al 0,25% en metanol acético: agua (50:10:40) durante 1 hora. Para la posterior decoloración se empleó una mezcla de metanol: acético:agua (5:10:85).

Los geles una vez teñidos y decolorados se conservaron sumergiéndolos en una



solución de glicerol (4 %) durante 30 min y a continuación se secaron a vacío durante 2 h a 70 °C en un secador de geles (modelo 583, BioRad). Una vez secos los geles se fotografiaron empleando una película Kodak en B/N (100 ASA).

### Colorante

|  |       |
|--|-------|
| Page Blue 83 (BDH, Chemical LTD, Inglaterra) | 0,2 g |
| Metanol                                      | 50 ml |
| Ácido acético glacial                        | 10 ml |
| Agua destilada completar hasta 100 ml        |       |

### 7.3.- Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y revelado inmunológico de las mismas.

#### 7.3.1.- Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (Western blotting)

La transferencia de las proteínas, previamente separadas por electroforesis, a una membrana de nitrocelulosa (NC) se realizó siguiendo la técnica descrita por Towbin *et al.* (1979) con un equipo semiseco de NovaBlot (modelo 2117, Pharmacia-LKB). Para asegurar que la transferencia se producía de manera uniforme, el gel, la nitrocelulosa y los papeles de filtro se sumergieron durante 15 min en la solución de transferencia.

La unidad de transferencia, compuesta por una membrana de nitrocelulosa (NC BA85, Schleicher y Schuell, 0,45  $\mu\text{m}$ ), el gel y una serie de 6 papeles de filtro (3MM, Whatman) en ambos lados, se dispuso sobre la placa de grafito previamente impregnada con el tampón de transferencia. Entonces se aplicó una corriente constante de 0,8 mA/cm<sup>2</sup>, durante 90 min para conseguir la transferencia de proteínas desde el gel hasta la nitrocelulosa.

#### Solución de transferencia:

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| Tris base, pH 8,3 | 25 mM     |
| Glicocola         | 192 mM    |
| Metanol           | 20 % v/v  |
| SDS               | 0,1 % v/v |

### 7.3.2.- Revelado inmunológico de las proteínas transferidas

Una vez realizada la transferencia a la membrana de NC, se llevó a cabo el revelado inmunológico de la misma con anticuerpos específicos frente a proteínas investigadas, en nuestro caso anticuerpos policlonales anti-AS-48, (Maqueda *et al.*, 1993).

Para realizar el revelado inmunológico la membrana de nitrocelulosa se lavó con TBS adicionado de 3% de seroalbúmina bovina (BSA) durante 2 h, y posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios (anti AS-48, dilución 1:50 en TBS-BSA 3%) durante una noche a 4 °C. Tras varios lavados con TBS, la membrana se incubó con la solución de anticuerpos secundarios (anticuerpos anti-Ig G de conejo, obtenidos en cabra, marcados con peroxidasa, dilución 1:1000 en BSA 3% (Sigma).

Finalmente, la visualización de las bandas se llevó a cabo sumergiendo la membrana en la solución de revelado. Tras la aparición de las bandas (5-15 min), la membrana se lavó con agua y se dejó secar entre papeles de filtro para ser posteriormente fotografiada.

#### TBS:

|                  |        |
|------------------|--------|
| Tris-HCl, pH 7,5 | 100 mM |
| ClNa             | 150 mM |

#### Solución de revelado:

|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| Tris-HCl 50 mM, pH 7,7              | 25 ml      |
| Agua oxigenada (30%)                | 25 $\mu$ l |
| 4-Cloro-naftol (3 mg/ml en metanol) | 5 ml       |

**RESULTADOS**



### 1.- CONSTRUCCION DE DIFERENTES PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Al inicio de esta Memoria se habían identificado parte de los genes responsables de la producción y/o inmunidad frente a AS-48, localizados en un fragmento *SphI-BglIII* de 7,8 kb del plásmido pMB2. Dicho fragmento había sido introducido en *E. faecalis* JH2-2, originando el clon JH2-2 pAM401-52, capaz de producir AS-48, si bien en cantidades sensiblemente menores que la estirpe salvaje, siendo igualmente el nivel de resistencia bastante mas bajo. El análisis de esta región puso de manifiesto la existencia de siete ORFs (*as-48BCC1DD1* y las ORFs 6 y 7) situadas aguas abajo del gen estructural *as-48A*.

Estos resultados apuntaban a que la información genética albergada en el fragmento clonado en pAM401-52 no era suficiente para expresar plenamente el carácter AS-48 (producción e inmunidad). Por ello, al objeto de delimitar toda la región genética responsable del mismo, se procedió a la construcción de diferentes plásmidos recombinantes.

#### 1.1.- Clonación parcial de pMB2 en pSL1180

Para la clonación de algunos fragmentos de pMB2 en el vector pSL1180 (3,4 kb), se extrajo el ADN plasmídico siguiendo el protocolo habitual, se digirió con *BglIII* y se purificaron los fragmentos deseados: B (6,6 kb) y C (6,4 kb) que contenía *as-48ABCC1DD1EF* ; éstos fueron finalmente subclonados en pSL1180 dando lugar a las construcciones pBgB2 (10 kb) y pBgC (9,8 kb), respectivamente (Figura 7).

Al objeto de evitar la orientación incorrecta en posteriores ligaciones de los fragmentos B y C, uno respecto del otro, se modificó el plásmido pBgB2 fué posteriormente modificado por eliminación de un sitio *BglIII* mediante digestión con *XbaI* (que retira un pequeño fragmento 0,4 kb), De esta forma se obtuvo el derivado pBgB2X con un solo sitio *BglIII*.

A continuación se elaboró una estrategia de clonación para conseguir reunir en una misma construcción los fragmentos C y B, (Figura 8):

- Purificación del fragmento C *Bgl*III a partir del vector pBgC.
- Ligación en el plásmido pBgB2X previamente linearizado por digestión con el mismo enzima.
- Transformación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  y selección de los transformantes (Amp<sup>R</sup>).
- Identificación y caracterización del inserto en el plásmido recombinante, designado como pSL1180CB, mediante análisis de restricción del mismo con las enzimas *Eco*RI y *Bgl*III.

### 1.2.- Clonación del fragmento CB en pAM401

La elección del plásmido pAM401 (10,4 kb) se hizo en base a su carácter de vector bifuncional *E. coli-E. faecalis*.

El inserto CB (12 kb) procedente de pSL1180CB, fué purificado mediante digestión con *Nru*I-*Bam*HI y ligado al vector pAM401, previamente linearizado con los mismos enzimas, para obtener la construcción pAM401-CB (22,4 kb) (Figura 9).

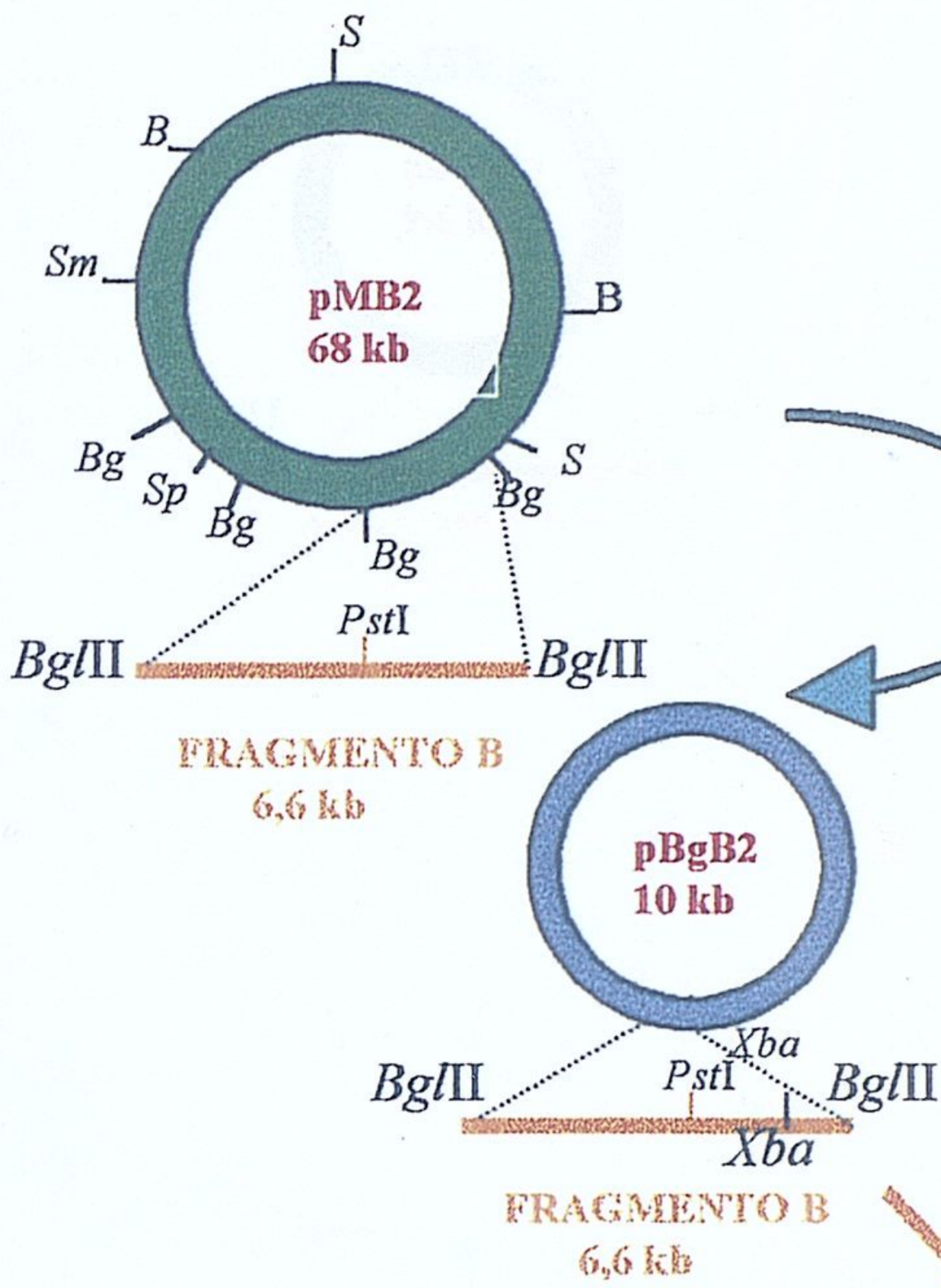
### 1.3.- Construcción del plásmido pAM401-81

Para completar la información proporcionada por la construcción pAM401-52 (Martínez-Bueno *et al.*, 1998), que contenía los fragmentos D (*Sph*I-*Bgl*III) y C (*Bgl*III) procedentes de pMB2, se procedió a la construcción de un nuevo plásmido recombinante, pAM401-81, por adición en fase del fragmento B (*Bgl*III) de pMB2. Para ello fué necesario realizar los siguientes pasos (Figura 10):

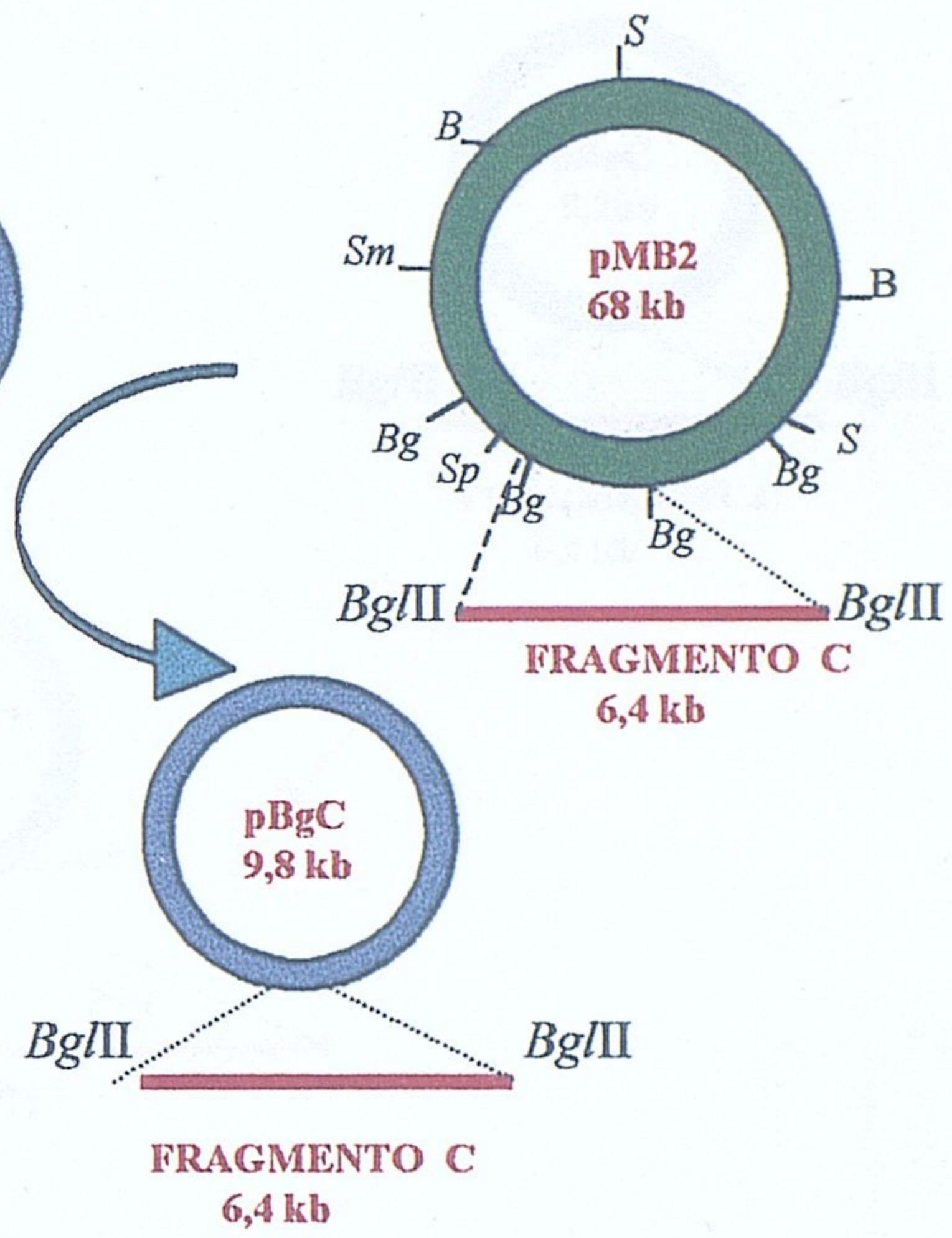
- Digestión de pAM401-52 con *Bgl*III/*Bam*HI y purificación del fragmento mayor de 12 kb.
- Purificación del fragmento B *Bgl*III de pBgB2 y ligación al fragmento de 12 kb para obtener el plásmido recombinante pAM401-71.

CLONACIÓN PARCIAL DE pMB2 EN pSL1180

1. Separación del fragmento B por digestión (*Bgl*III)



2. Separación del fragmento C por digestión (*Bgl*III)



3. Digestión *Xba* de pBgB2 y posterior religación del fragmento de 9,7 kb.

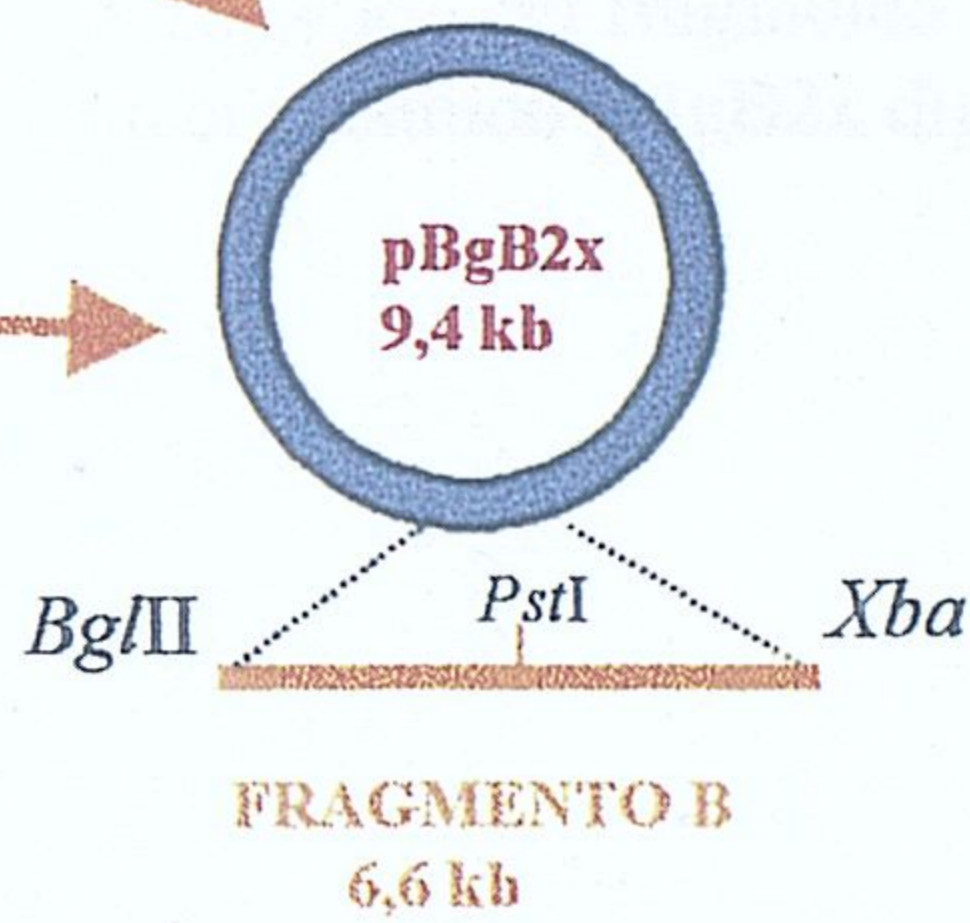
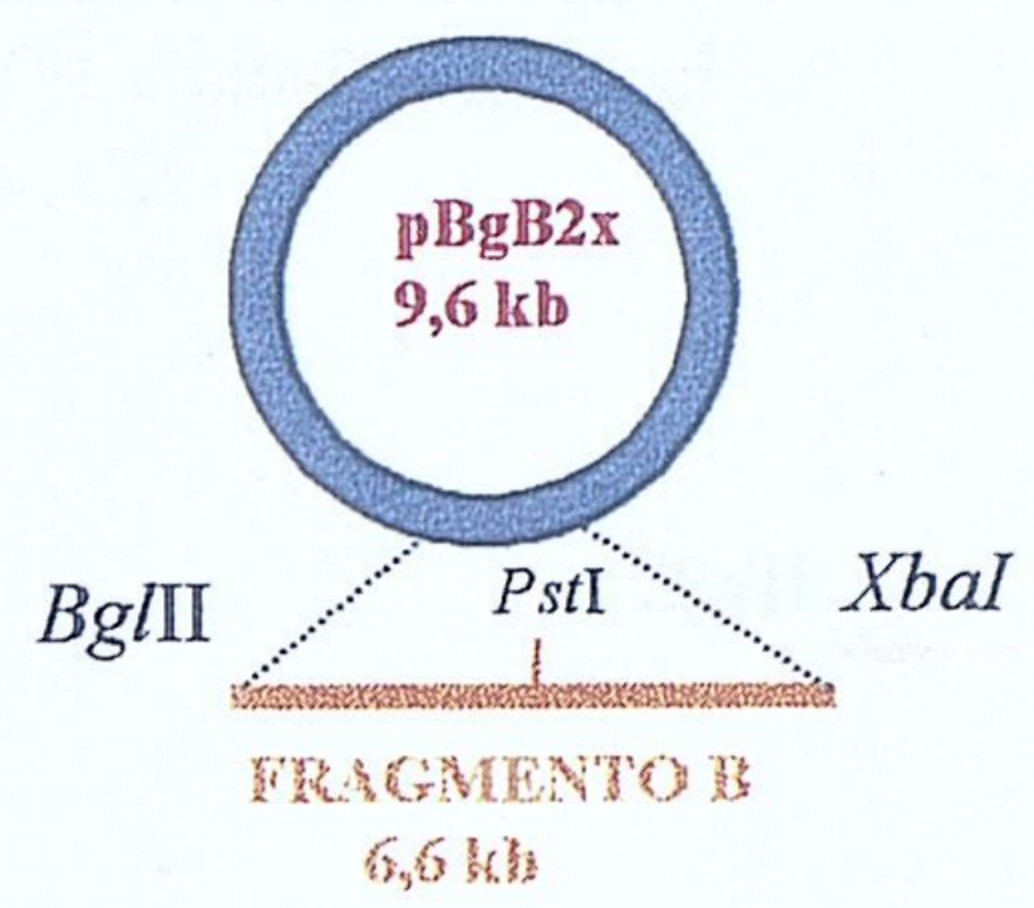


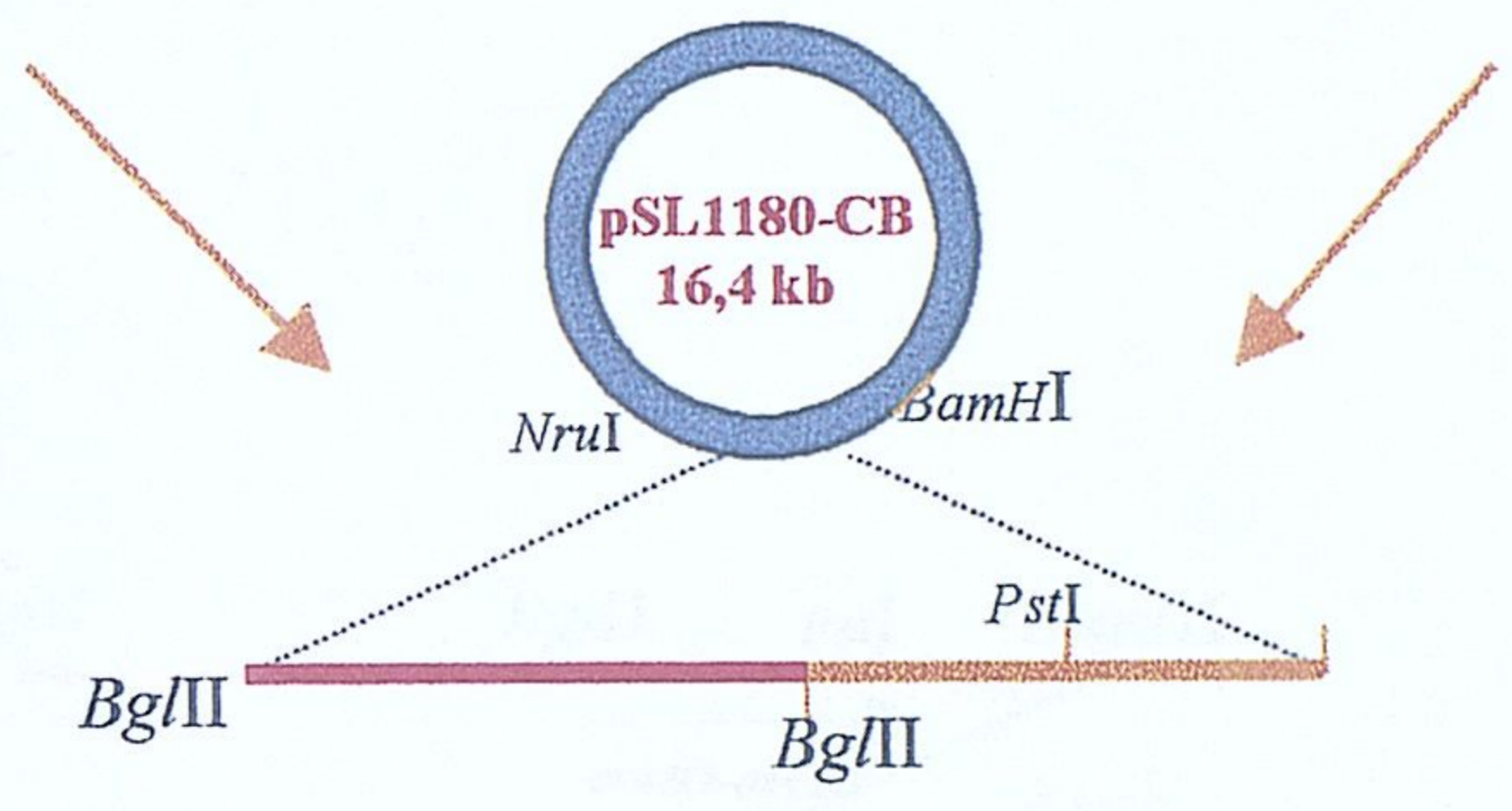
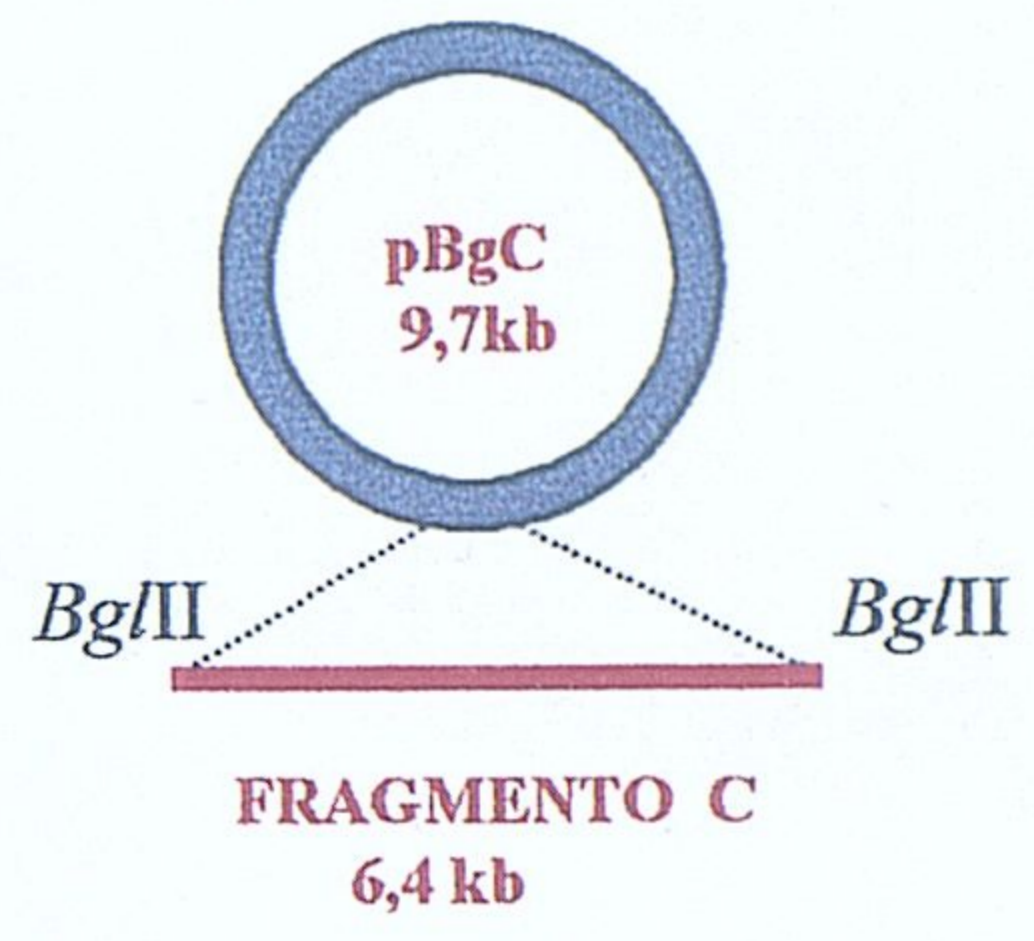
Figura 7.- Clonación de los fragmentos *Bgl*III C y B del plásmido pMB2 en el plásmido pSL1180.

### CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pSI1180-CB

1. Digestión *Bgl*II de pBgB2x



2. Digestión *Bgl*II de pBgC y purificación del fragmento C.



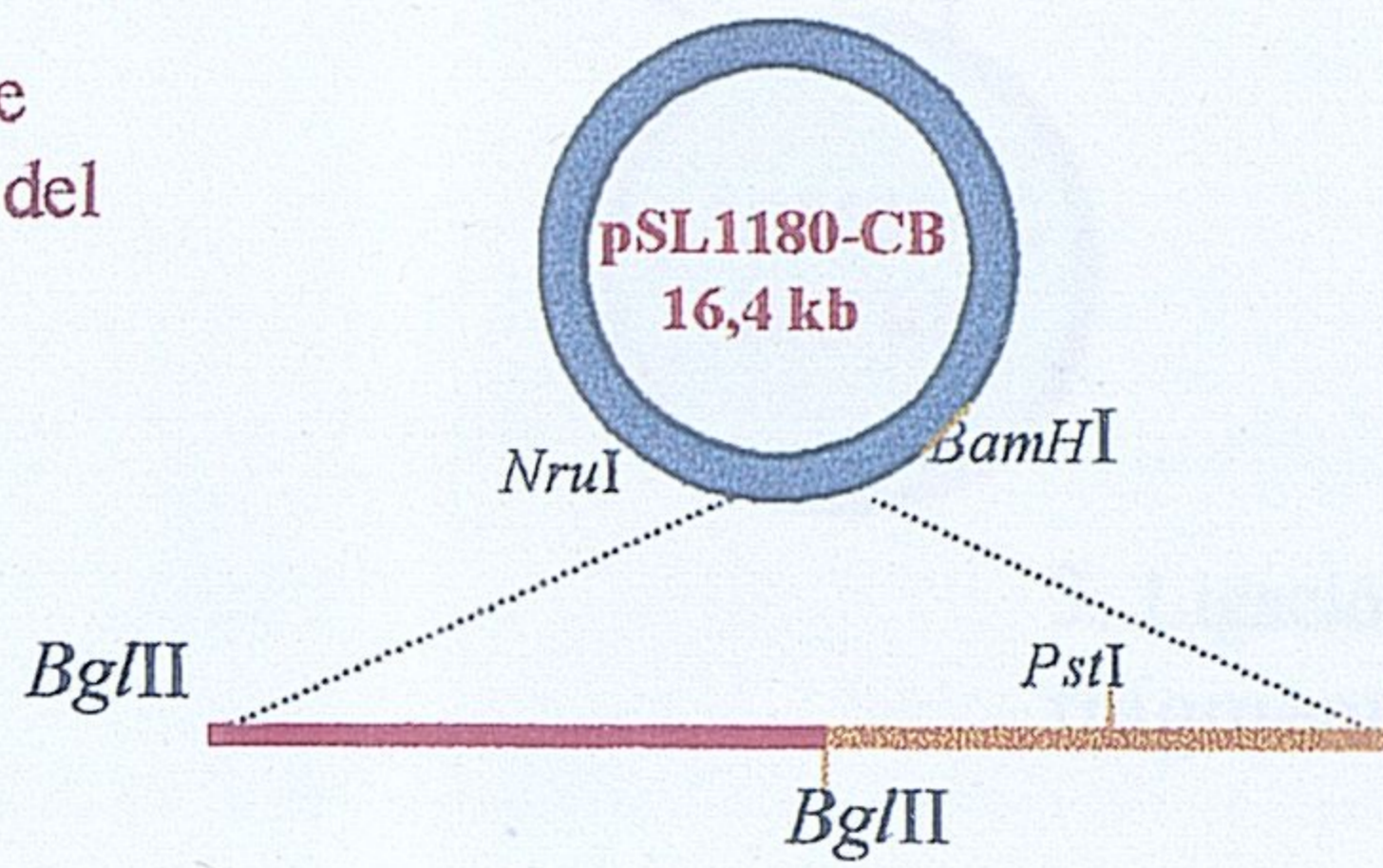
3. Ligación del fragmento C en el plásmido pBgB2x digerido *Bgl*II

Figura 8.- Construcción del plásmido pSI1180-CB



CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pAM401-CB

1. Digestión *Bam*HI/*Nru*I de pSL1180-CB y purificación del fragmento CB.



2. Ligación del fragmento CB en el plásmido pAM401

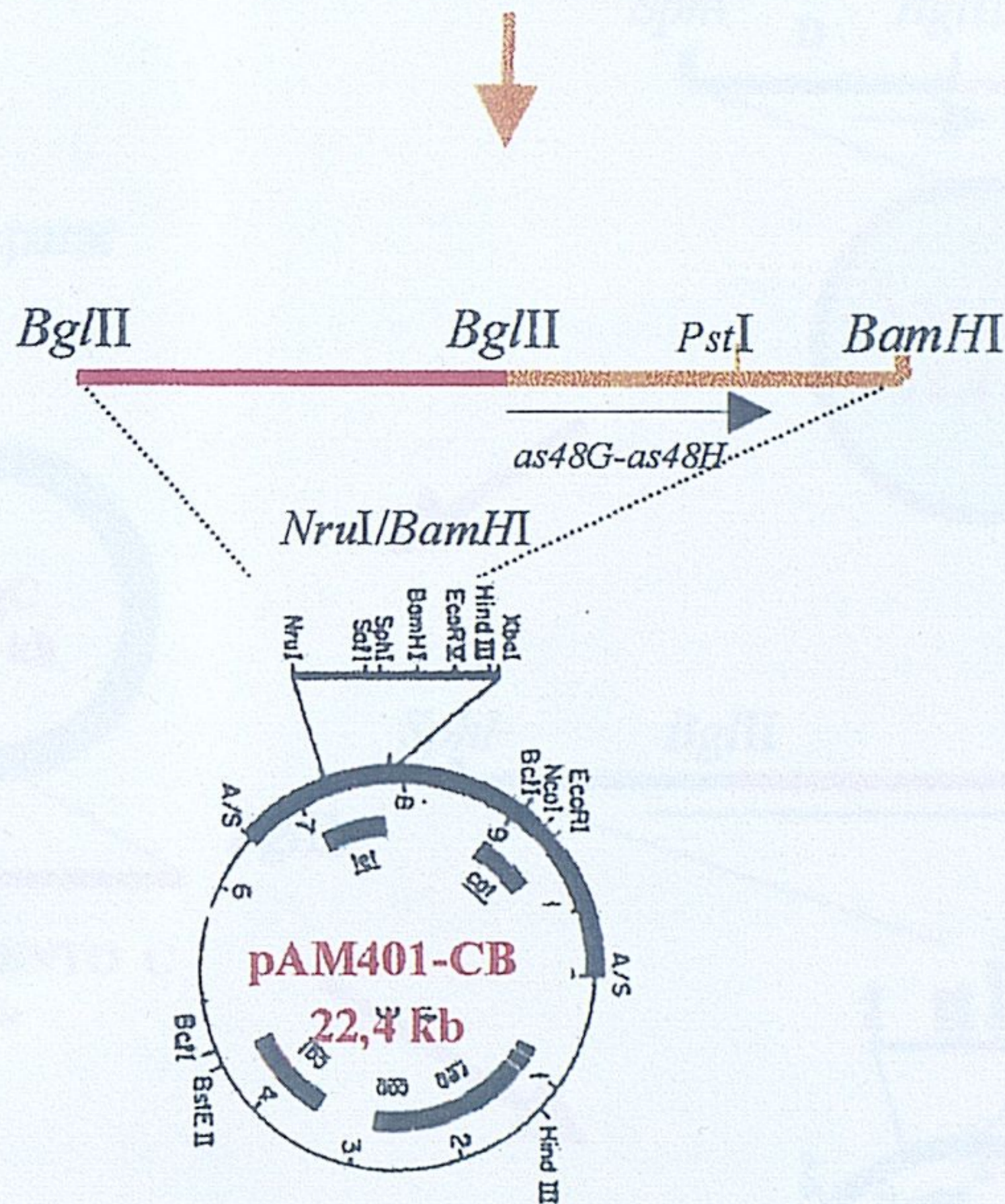


Figura 9.- Clonación del fragmento CB en el plásmido pAM401

### CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pAM401-81

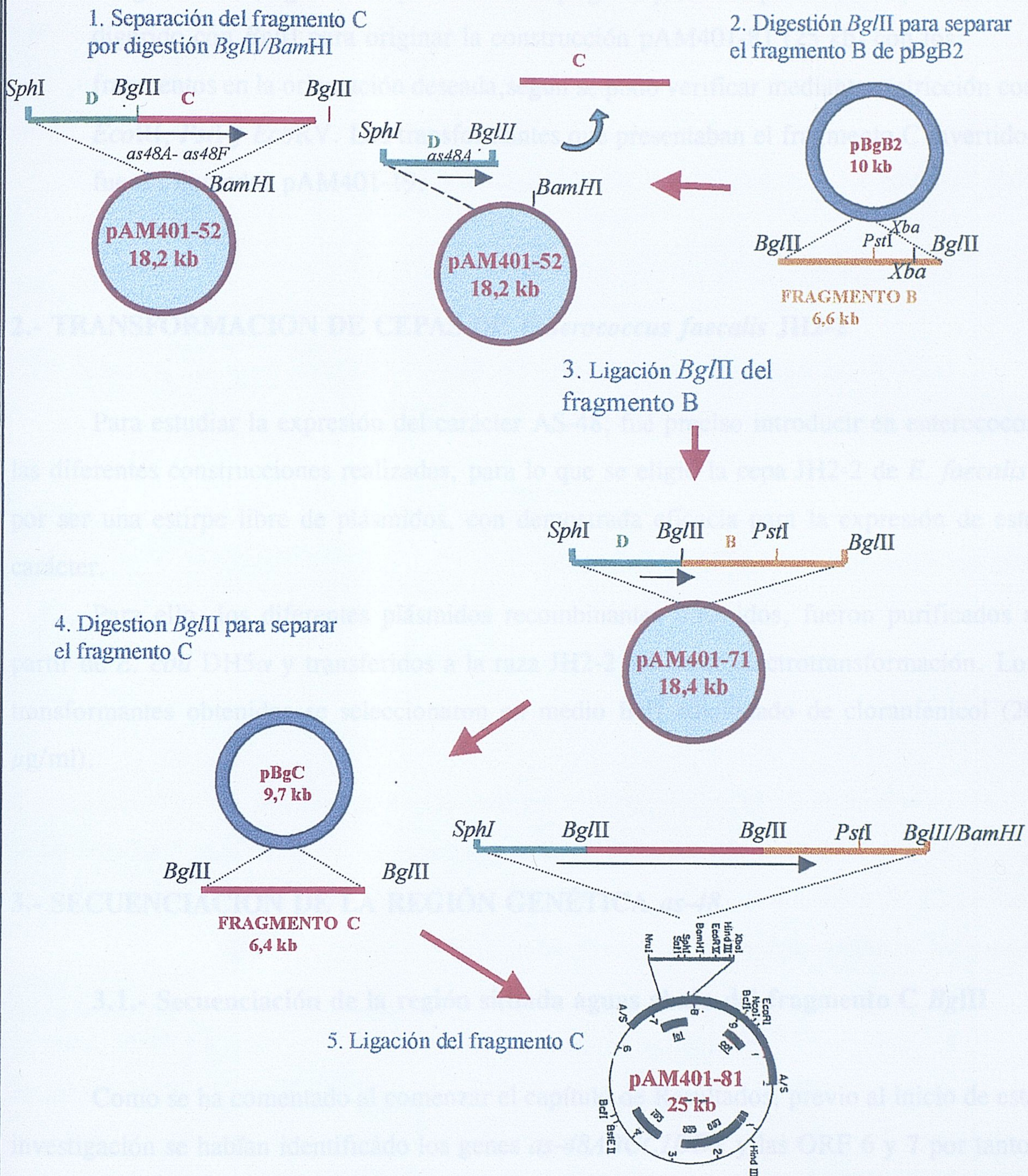


Figura 10.- Construcción del plásmido pAM401-81.

- Ligación del fragmento C procedente de pBgC al plásmido pAM401-71 previamente digerido con *Bgl*III para originar la construcción pAM401-81 (25 kb) con los fragmentos en la orientación deseada, según se pudo verificar mediante restricción con *Eco*RI, *Pst*I y *Eco*RV. Los transformantes que presentaban el fragmento C invertido, fueron llamados pAM401-19.

### 2.- TRANSFORMACION DE CEPAS DE *Enterococcus faecalis* JH2-2

Para estudiar la expresión del carácter AS-48, fué preciso introducir en enterococos las diferentes construcciones realizadas, para lo que se eligió la cepa JH2-2 de *E. faecalis*, por ser una estirpe libre de plásmidos, con demostrada eficacia para la expresión de este carácter.

Para ello, los diferentes plásmidos recombinantes obtenidos, fueron purificados a partir de *E. coli* DH5 $\alpha$  y transferidos a la raza JH2-2 mediante electrotransformación. Los transformantes obtenidos se seleccionaron en medio BHI adicionado de cloranfenicol (20  $\mu$ g/ml).

### 3.- SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN GENÉTICA *as-48*

#### 3.1.- Secuenciación de la región situada aguas abajo del fragmento C *Bgl*III

Como se ha comentado al comenzar el capítulo de Resultados, previo al inicio de esta investigación se habían identificado los genes *as-48ABCCIDD1* y las ORF 6 y 7 por tanto, una vez obtenidos los nuevos clones se procedió a obtener la secuencia del ADN localizado a partir del extremo 5' de la última fase de lectura abierta (ORF 7), secuencia correspondiente al comienzo del fragmento B (*Bgl*III) de pMB2.

La estrategia de secuenciación de esta región se muestra en la Figura 11. Para ello se hicieron diversas subclonaciones en pGEM-3Zf(+) y como cebadores se emplearon oligonucleótidos de síntesis descritos en la Tabla 4.

El análisis de la secuencia de las 2,8 kb de ADN situado aguas abajo de la ORF 7, (Figura 12) nos permitió identificar dos nuevas ORFs, ORF 8 y ORF 9 (*as-48G, as-48H*).

Dichas ORFs fueron establecidas en base a: i) uso preferencial de codon, ii) la existencia de un codon de iniciación, ATG, TTG, o GTG, iii) la presencia de una probable zona de unión a ribosomas (región Shine-Dalgarno o RBS).

Las características de las nuevas ORFs encontradas son:

ORF 8 (*as-48G*): se extiende 683 bp (nts 7583-8266), con un probable RBS (GAAAGA) y podría codificar una proteína de 227 aa.

ORF 9 (*as-48H*): nts 8263-9462, presenta un RBS típico (AAGGAG) y potencialidad para codificar una proteína de 399 residuos.

### **3.2.- Secuenciación de la región genética situada aguas arriba del gen estructural *as-48A***

La secuencia de la región genética anterior al gen estructural, fué obtenida tanto a partir de pAM401-52 como de pAM401-81, subclonando un fragmento *SphI-PstI* en el vector pGEM, mediante la técnica descrita en el apdo 6.13 de Material y Métodos, utilizando cebadores sintéticos deducidos del gen *as-48A*.

En la Figura 13 se muestra la secuencia completa de este trozo de ADN, hasta el primer sitio *BglIII* (1883 b). Se señalan tres posibles ORFs (ORF X, Y, Z) identificadas de acuerdo con los criterios expuestos anteriormente, y los sitios más probables de unión a ribosomas. Sin embargo en ningún caso se han encontrado secuencias promotoras típicas.

ESTRATEGIA DE SECUENCIACIÓN

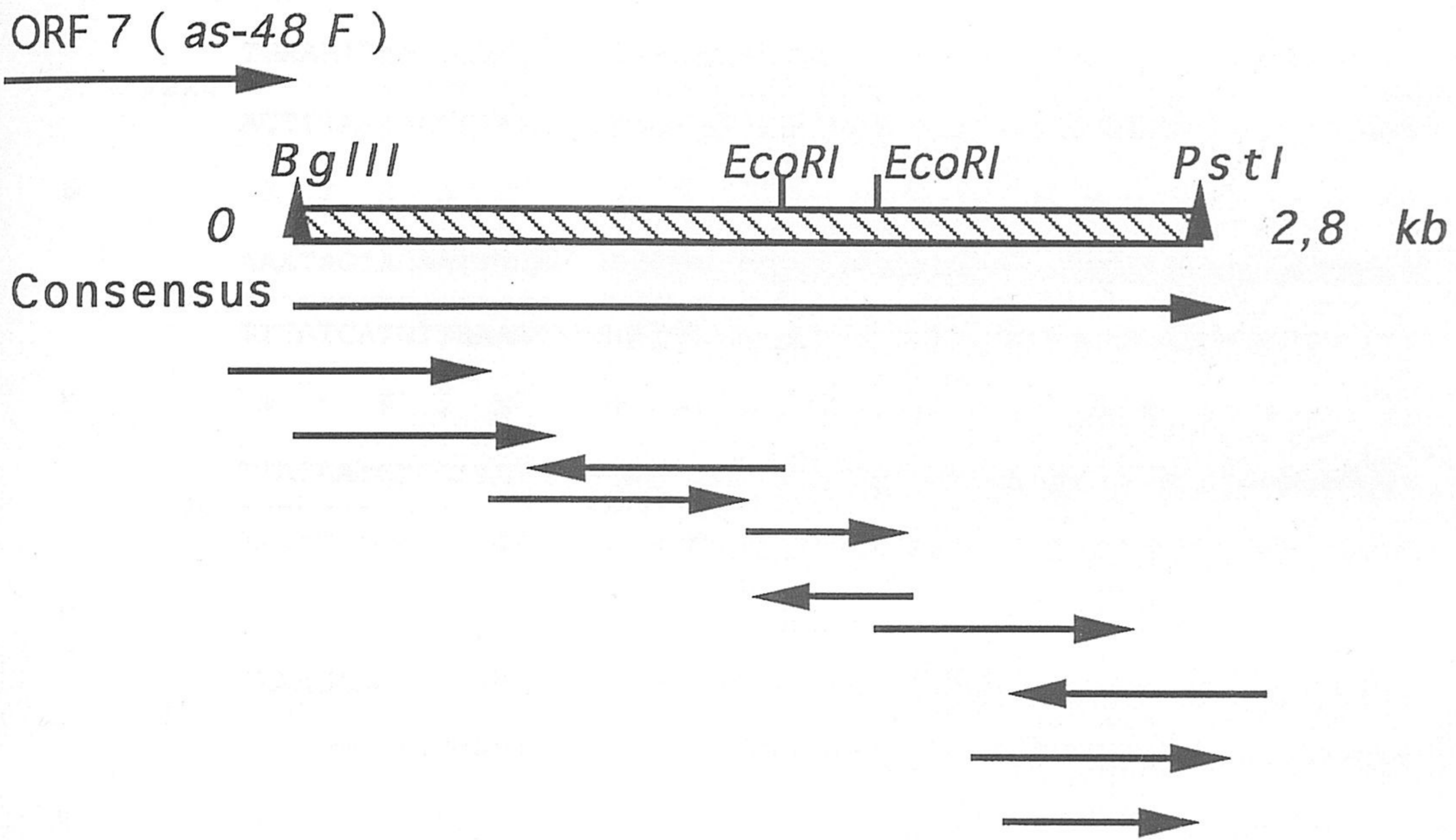


Figura 11.- Estrategia de secuenciación aguas abajo de la ORF 7 (*as-48F*)

```

GGGTCAACCTGTAACGATTAGTCAAATCAATGAAGAAAAAGCAACAGACGGAATAATTAG
7160 +-----+-----+-----+-----+-----+----- 7219
CCCAGTTGGACATTGCTAATCAGTTTACTTCTTTTTCGTTGTCTGCCTTATTAATC

b      G Q P V T I S Q I N E E K A T D G I I S -

TGAAATTAACGCATTGCCTGAAGATATGGCTGTCAGTCCACAAAATACATCATCAACTAA
7220 +-----+-----+-----+-----+-----+----- 7279
ACTTTAATTGCGTAACGGACTTCTATACCGACAGTCAGGTGTTTTATGTAGTAGTTGATT

b      E I N A L P E D M A V S P Q N T S S T K -

AAATAGTACAATTTCAACGTTCTCCTTTATAATTAGCCCTAAAGAACCTATTCATTATGG
7280 +-----+-----+-----+-----+-----+----- 7339
TTTATCATGTTAAAGTTGCAAGAGGAAATATTAATCGGGATTTCTTGGATAAGTAATACC

b      N S T I S T F S F I I S P K E P I H Y G -

TTATAATGTCCAAATCAGTGTTCCAATGAATAATTTAGAGCTGGCTAAAAAGAACACAGT
7340 +-----+-----+-----+-----+-----+----- 7399
AATATTACAGGTTTAGTCACAAGGTTACTTATTAATCTCGACCGATTTTTCTTGTGTCA

b      Y N V Q I S V P M N N L E L A K K N T V -

TAAAGAAAATAATAATGAGGTATTCGTTTTTATTATAGAGATGGAAAAGTCGTTAAACA
7400 +-----+-----+-----+-----+-----+----- 7459
ATTTCTTTTATTACTCCATAAGCAAAAATAAATATCTCTACCTTTTCAGCAATTTGT

b      K E N N N E V F V F I Y R D G K V V K Q -

AAAAATAGAAGTAAAAGAAGATAATGATAAATACGTAGTAAAGACTGGACTTAAAGAAAA
7460 +-----+-----+-----+-----+-----+----- 7519
TTTTTATCTTCATTTTCTTCTATTACTATTTATGCATCATTTCTGACCTGAATTTCTTTT

b      K I E V K E D N D K Y V V K T G L K E N -

TGATTCAATTATTGAAAACCCAGATACTAGTCTGAAAGATGGCCAAAAGTGACGGTGAA
7520 +-----+-----+-----+-----+-----+----- 7579
ACTAAGTTAATAACTTTTGGGTCTATGATCAGACTTTCTACCGGTTTTTCACTGCCACTT

b      D S I I E N P D T S L K D G Q K V T V K -

ACAATGATTGAACTCAATAAGATAAATAAATACTATGCAAATGAAGAGGAGTCACTTCAT
7580 +-----+-----+-----+-----+-----+----- 7639
TGTTACTAACTTGAGTTATTCTATTTATTTATGATACGTTTACTTCTCCTCAGTGAAGTA

a  as-48G  M I E L N K I N K Y Y A N E E E S L H -
b          Q *
c

```

Figura 12a.- Secuenciación de la región situada aguas abajo de la ORF 7 (*as-48F*) y localización del gen *as-48G*.

```

GTATTAAAAGATATTCATTTATCCATCAAAAAAGGGGAAATGATAGCGATCATGGGCCCT
7640 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7699
CATAATTTTCTATAAGTAAATAGGTAGTTTTTTCCCTTTACTATCGCTAGTACCCGGGA
a   V L K D I H L S I K K G E M I A I M G P -

TCAGGATCTGGCAAATCGACATTAATTAATCTTTTGGGATTTATCGATCGTAAGTTTGAG
7700 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7759
AGTCCTAGACCGTTTAGCTGTAATTAATTAGAAAACCCTAAATAGCTAGCATTCAAATC
a   S G S G K S T L I N L L G F I D R K F E -

                               BglIII
                               |
GGAGAATACTTGTTTGAAGGCAGATCTTTGGTTAATACAGCAGATGACATTCTTTCTAAA
7760 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7819
CCTCTTATGAACAACTTCCGTCTAGAAACCAATTATGTCGTCTACTGTAAGAAAGATTT
a   G E Y L F E G R S L V N T A D D I L S K -

ATAAGAAATCAAACAGTAGGTTTTATTTTCCAAAACCTTAGTTTGATTGAGAGTAACACA
7820 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7879
TATTCTTTAGTTTGTTCATCCAAAATAAAAGGTTTTGAAATCAAATAACTCTCATTGTGT
a   I R N Q T V G F I F Q N F S L I E S N T -

GTTTATGAAAATGTAGAACTACCTCTTCTTTATAATGGGGTGTCTCCTTTTAAAACGAAG
7880 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7939
CAAATACTTTTACATCTTGATGGAGAAGAAATATTACCCACAGAGGAAAATTTTGCTTC
a   V Y E N V E L P L L Y N G V S P F K T K -

GAAAAAGTTTTTTCCGTGTTGGATAGAGTTGGTTTTAAAAGGAAAAGAATATAAATACCCA
7940 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7999
CTTTTTCAAAAAGGCACAACCTATCTCAACCAAATTTTCTTTTCTTATATTTATGGGT
a   E K V F S V L D R V G L K G K E Y K Y P -

AAGCAGTTGTCTGGTGGCCAACAGCAGCGGGTGGCCATTGCCCGAGCATTGATTAATCAC
8000 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 8059
TTCGTCAACAGACCACCGGTTGTCGTCGCCACCGGTAACGGGCTCGTAACATAATTAGTG
a   K Q L S G G Q Q Q R V A I A R A L I N H -

CCTAAGTTTATTATAGCAGATGAACCGACAGGTGCTTTAGATACACACACCTCAGAGGAG
8060 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 8119
GGATTCAAATAATATCGTCTACTTGGCTGTCCACGAAATCTATGTGTGTGGAGTCTCCTC
a   P K F I I A D E P T G A L D T H T S E E -

ATTATGCAGCTTTTTACTACTTTAAATAAAGAAGATGACGTAACGCTTATTATGGTTACG
8120 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 8179
TAATACGTCGAAAATGATGAAATTTATTTCTTCTACTGCATTGCGAATAATACCAATGC

```

Figura 12b.- Secuenciación de la región situada aguas abajo de la ORF 7(*as-48F*) y localización del gen *as-48G* con un probable RBS(GAAAGA).

```

8180 CACAACCCTGAAGTCGTTCCCTTATTGTCACCGGTTGATTACTATTAGAGACGGTGCGATT 8239
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      GTGTTGGGACTTCAGCAAGGAATAACAGTGGCCAATAATGATAATCTCTGCCACGCTAA

a    H N P E V V P Y C H R L I T I R D G A I -

8240 ATTGAAGATAAGGAGTTGGTGCAATGAATCTTTATGTAAACATGCGTTCTGCTTGGAAAG 8299
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TAACTTCTATTCCCTCAACCACGTTACTTAGAAATACATTTGTACGCAAGACGAACCTTTC

a    I E D K E L V Q *
c    as-48H M N L Y V N M R S A W K A -

8300 CAATTAATAATAATCGAAAACGTAGTGTATTAACCATGATAGGAATTATTATAGGAATAT 8359
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      GTTAATTTTTATTAGCTTTTGCATCACATAATTGGTACTATCCTTAATAATATCCTTATA

c    I K N N R K R S V L T M I G I I I G I S -

8360 CGTCTGTTATTACAATTTTAGCTATTGGAAGAGGGTTCGAGAGGGACACCGTAAAAAATC 8419
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      GCAGACAATAATGTTAAAATCGATAACCTTCTCCAAGCTCTCCCTGTGGCATTTTTTTAG

c    S V I T I L A I G R G F E R D T V K N L -

8420 TTACTAAGAGTGATTCTAAGAATGTAGAAGTTCAACTAAATTTTACACCGAGTGATACGT 8479
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      AATGATTCTCACTAAGATTCTTACATCTTCAAGTTGATTTAAAATGTGGCTCACTATGCA

c    T K S D S K N V E V Q L N F T P S D T S -

8480 CCTTATATGATACAAATACAAAATTCTTTCAAGATGTAGACTTATCTACAGTAAGAAATG 8539
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      GGAATATACTATGTTTATGTTTTAAGAAAGTTCTACATCTGAATAGATGTCATTCTTTAC

c    L Y D T N T K F F Q D V D L S T V R N V -

8540 TAGAAGGGGTAAAAAAGCTGACTATTCTAAAATTGATGAAGAGCAAATCTACAAAGATT 8599
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      ATCTTCCCATTTTTTTTCGACTGATAAGATTTTAACTACTTCTCGTTTAGATGTTTCTAA

c    E G V K K A D Y S K I D E E Q I Y K D L -

8600 TGTCTATTAGAGGAAATAAAAAAATAAACAGATTAAACTTATAGATTCTGAAGGAAAAA 8659
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      ACAGATAATCTCCTTTATTTTTTTTTTATTTGTCTAATTTGAATATCTAAGACTTCCTTTTT

c    S I R G N K K N K Q I K L I D S E G K K -

8660 AAGTTTCTATTGGCAGGAATTTAACAGGTCAAGATAGTGAATTATTAAATAAAGTAGCAA 8719
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TTCAAAGATAACCGTCCTTAAATTGTCCAGTTCTATCACTTAATAATTTATTTTCATCGTT

c    V S I G R N L T G Q D S E L L N K V A T -

```

Figura 12c.- Secuenciación de la región situada aguas abajo de la ORF 7(*as-48F*) y localización del gen *as-48H* .



## RESULTADOS

|      |  |      |
|------|--|------|
|      | CAATTGATTCAGTTACAGCCAAAGAGTTATTTAATACACCAGAACGAGCATTGGGTAAAG | 8779 |
| 8720 | +-----+-----+-----+-----+-----+-----                         |      |
|      | GTAACTAAGTCAATGTCGGTTTCTCAATAAATTATGTGGTCTTGCTCGTAACCCATTTTC |      |
| c    | I D S V T A K E L F N T P E R A L G K G -                    |      |
|      | GAATTGAAATTGAGCAAGAATTATTTAGAGTGGTAGGGGTTTTCCCTGGAGAAGAGCCAG |      |
| 8780 | +-----+-----+-----+-----+-----+-----                         | 8839 |
|      | CTTAACTTTAACTCGTTCTTAATAAATCTCACCATCCCCAAAAGGGACCTCTTCTCGGTC |      |
| c    | I E I E Q E L F R V V G V F P G E E P D -                    |      |
|      | ATAATTTGTTTTCTTGTCAAATACAAATATTGAAATTCCAAAGATACGTATCACTATT   |      |
| 8840 | +-----+-----+-----+-----+-----+-----                         | 8899 |
|      | TATTAACAAAAGGAACAGTTTATGTTTATAACTTTAAGGTTTTCTATGCATAGTGATAA  |      |
| c    | N L F S L S N T N I E I P K D T Y H Y Y -                    |      |
|      | ATTTTAAATCGGAAAAAATAACCTCCTCTCTAACATTAACTTTAGAAGAAGGAGTTAAAC |      |
| 8900 | +-----+-----+-----+-----+-----+-----                         | 8959 |
|      | TAAAATTTAGCCTTTTTTTTATGGAGGAGAGATTGTAATTGAAATCTTCTCCTCAATTTG |      |
| c    | F K S E K N T S S L T L T L E E G V K P -                    |      |
|      | CCGATAAGGTGACGTCTAAAGTAATAAAACAATTAAAAGAGAAAGGGAGTTTAAGACATC |      |
| 8960 | +-----+-----+-----+-----+-----+-----                         | 9019 |
|      | GGCTATTCCACTGCAGATTTTATTATTTTGTAAATTTTCTCTTTCCCTCAAATTCTGTAG |      |
| c    | D K V T S K V I K Q L K E K G S L R H L -                    |      |
|      | TAGGAGAATATGAAGTATTAGATACAGCAATGTTGACAAAAGGAATTGGTCAGATTCTCA |      |
| 9020 | +-----+-----+-----+-----+-----+-----                         | 9079 |
|      | ATCCTCTTATACTTCATAATCTATGTCGTTACAACCTGTTTTCTTAACCAGTCTAAGAGT |      |
| c    | G E Y E V L D T A M L T K G I G Q I L S -                    |      |
|      | GTACAATTACTTATTTTATAACAGCTGTAGCAGGAATATCATTGTTTATTGCAGGGGTAG |      |
| 9080 | +-----+-----+-----+-----+-----+-----                         | 9139 |
|      | CATGTTAATGAATAAAATATTGTCGACATCGTCCTTATAGTAACAAATAACGTCCCCATC |      |
| c    | T I T Y F I T A V A G I S L F I A G V G -                    |      |
|      | GGGTTATGAATATGATGTATATCTCTGTATCTGAGCGAACAAAAGAAATTGGTATAAGAA |      |
| 9140 | +-----+-----+-----+-----+-----+-----                         | 9199 |
|      | CCAATACTTATACTACATATAGAGACATAGACTCGCTTGTTTTCTTTAACCATATTCTT  |      |
| c    | V M N M M Y I S V S E R T K E I G I R R -                    |      |
|      | GAGCATTAGGAGCTACTCGAAAATCTATTATGTTACAATTCCTTTTAGAAGGTTTAATTT |      |
| 9200 | +-----+-----+-----+-----+-----+-----                         | 9259 |
|      | CTCGTAATCCTCGATGAGCTTTTAGATAATAACAATGTTAAGGAAAATCTTCAAATTA   |      |
| c    | A L G A T R K S I M L Q F L L E G L I L -                    |      |

Figura 12d.- Secuenciación de la región situada aguas abajo de la ORF 7(*as-48F*) y localización del gen *as-48H*.

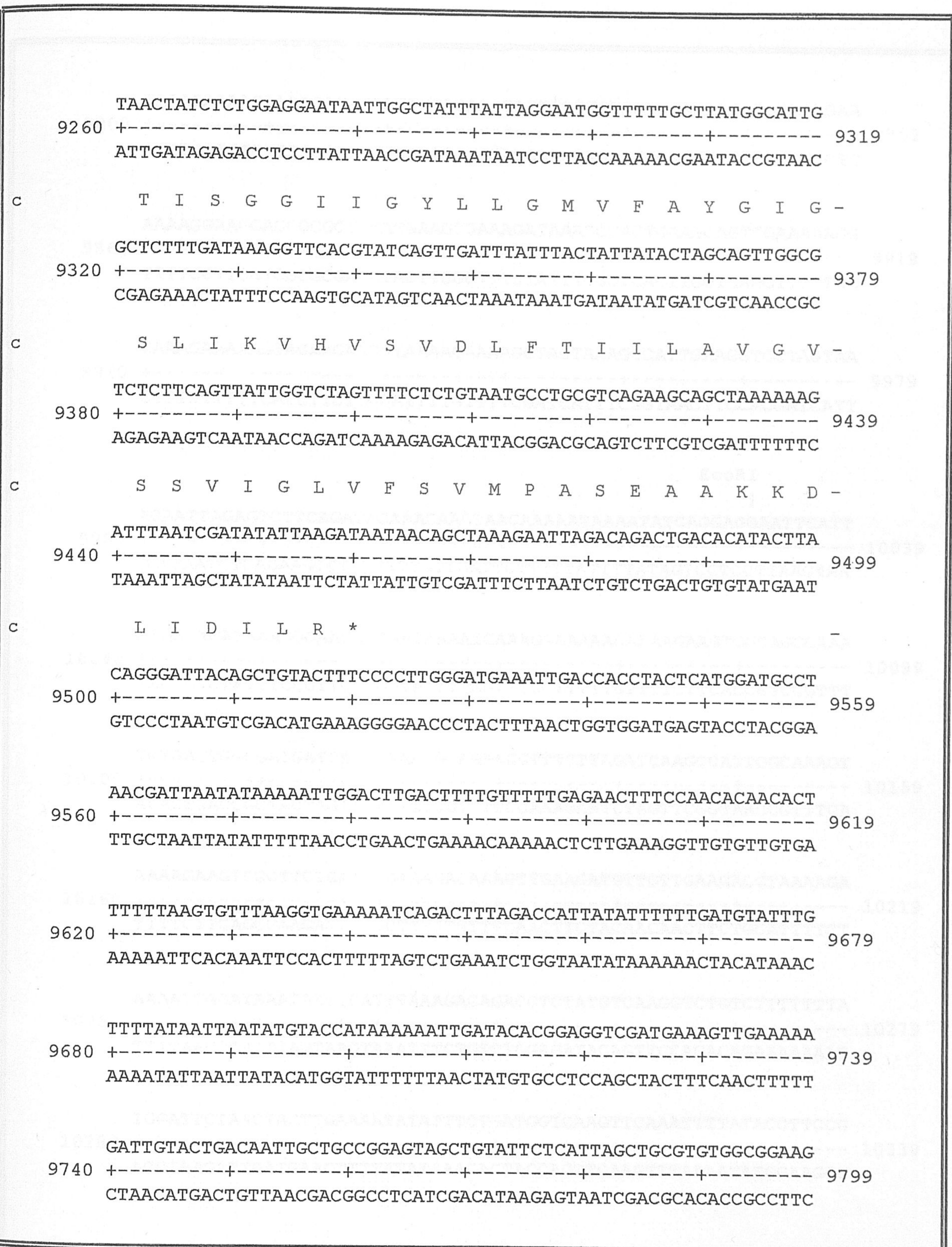


Figura 12e.- Secuenciación de la región situada aguas abajo de la ORF 7(*as-48F*) y localización del gen *as-48H*.

EcoRI

|

9800 TAAAGAAAAGAAAACAGAGAATTCACAGCTACTTTTCTAAAGTAGAAGAGGCAAAGAA 9859  
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ATTTCTTTTCTTTTGTCTCTTAAGATGTCGATGAAaAAGATTCATCTTCTCCGTTTCTT

9860 AAAAGGAAGCAGCGCGCTTGATGAAGCGAAAGATAAAGCCAGTGAAGCAGTTGAAAAGG 9919  
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TTTTCCTTCGTCGCGGAACTACTTCGCTTTCTATTTTCGGTCACTTCGTCAACTTTTCC

9920 CAAAGAAAAGTAGAAGAAGGTAAAACAAAAGCTAGTAAAGCCATTGAAGGTGCTAGTAA 9979  
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GTTTCTTTTTCATCTTCTTCCATTTTGTTCGATCATTTTCGGTAACTTCCACGATCATT

EcoRI

|

9980 AGAATTAGAGTCTTCAGATACAAACAACTAACAAAATAAAATATCAGGAGGAATTCATT 10039  
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TCTTAATCTCAGAAGTCTATGTTTGTTGATTGTTTTATTTTATAGTCCTCCTTAAGTAA

10040 ATGACAGATAAAGGGAACGACGATAAAATCAAAGGAAAAACAAAAGAAGTGGCAGGCAA 10099  
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TACTGTCTATTTCCCTTGCTGCTATTTTAGTTTCTTTTGTTCCTTTCACCGTCCGTTT

10100 TGTGACTGGCGATGATCAACAAAAGCAGAAGGTTTCTTAGATCAAGCCATTGGCAAAGT 10159  
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 AACTGACCGCTACTAGTTGTTTTTCGCTTCCAAAGAATCTAGTTCGGTAACCGTTTCA

10160 AAAAGAAGTCGCTTCTGATGCGAAAGACAAAGTTGAAGATGTTGTTGAAGACGTAAAAGA 10219  
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TTTTCTTCAGCGAAGACTACGCTTTCTGTTTCAACTTCTACAACAACTTCTGCATTTTCT

10220 AAAATTGGATAAATAATTCATTTAAAGACAGACCTCTATGTCAAGGTCTGTCTTTTTTTA 10279  
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TTTTAACCTATTTATTAAGTAAATTTCTGTCTGGAGATACAGTTCAGACAGAAAAAAT

10280 TGGATTCTAACTACTTGAAAATATATTTCTGATGGTCAAGTTCAAATTTTATACCTTCG 10339  
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ACCTAAGATTGATGAACTTTTATATAAAGACTACCAGTTCAGTTTAAAATATGGAAGGC

Figura 12f.- Secuenciación de la región situada aguas abajo de la ORF 7(*as-48F*).

```

ATCCCCACTGAATCCGAAGGGTAAACTAACCGTGTCAAAAAGTATACTTTTTGACATGCC
10340 +-----+-----+-----+-----+-----+----- 10399
TAGGGGTGACTTAGGCTTCCCATTGATTGGCACAGTTTTTCATATGAAAACTGTACGG

TTGATTTTACTTGTGTATATGTGGCGTAATAACCACATAATACAGTTTGAAACGTTTCTT
10400 +-----+-----+-----+-----+-----+----- 10459
AACTAAAATGAACACATATACACCGCATTATTGGTGTATTATGTCAAACTTTGCAAAGAA

ATTTGATGTACGCGTTTTTAAAACAAATTTAGTGAACAAAGGGTAGATAATTCTGATGAGA
10460 +-----+-----+-----+-----+-----+----- 10519
TAAACTACATGCGCAAATTTTGTTTAAATCACTTGTTTCCCATCTATTAAGACTACTCT

AAATTTTTTTATATCCGGGTCACTTGTTATGATCAATCCATCGACAACGATTGCCCGCG
10520 +-----+-----+-----+-----+-----+----- 10579
TTTAAAAAATATAGGCCAGTGAACAATACTAGTTAGGTAGCTGTTGACTAACGGGCGC

AAGGATTCAGGAA
10580 +-----+--- 10592
TTCCTAAGTCCTT

```

Figura 12g.- Secuenciación de la región situada aguas abajo de la ORF 7(*as-48F*).

RESULTADOS

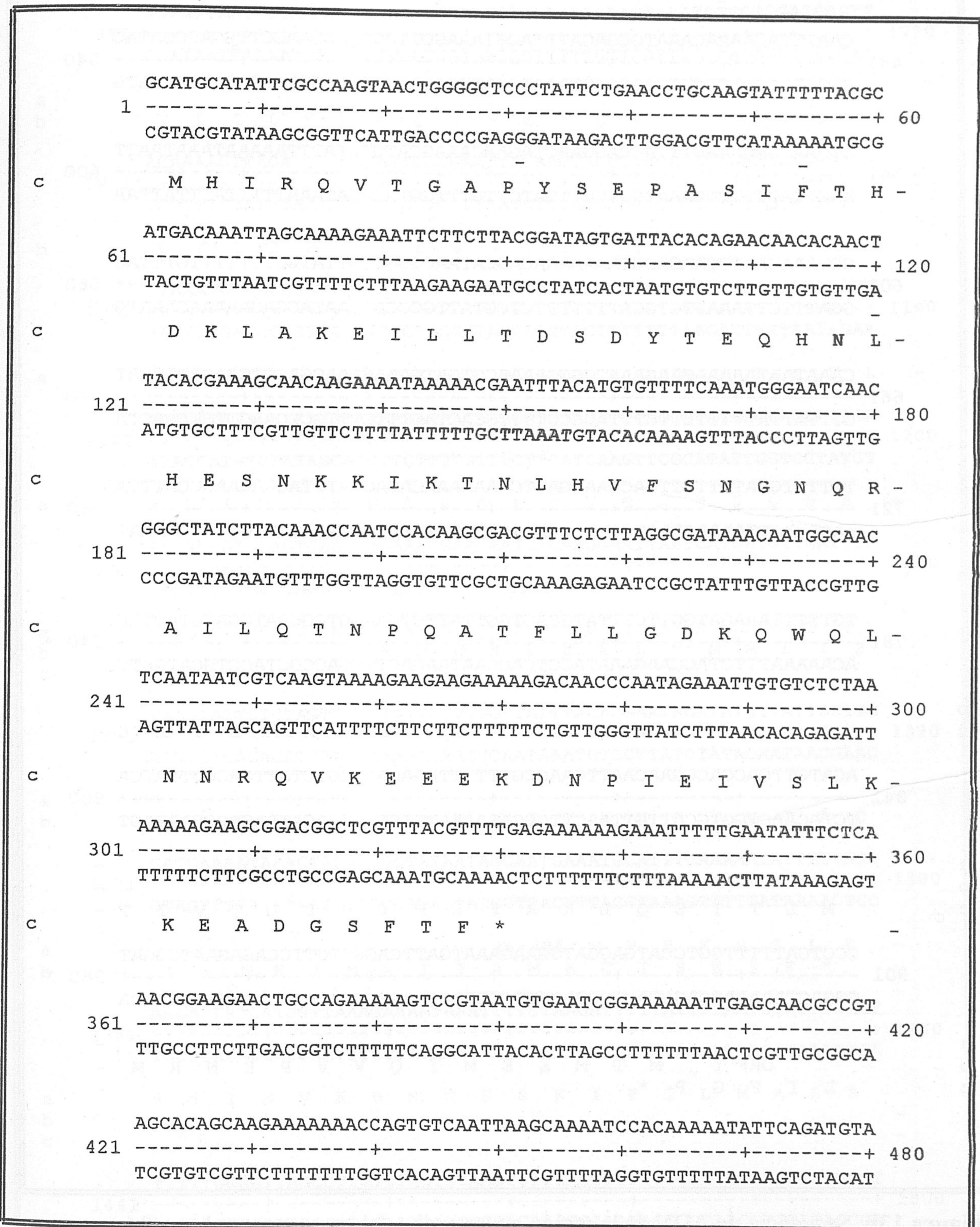


Figura 13a.- Secuencia de ADN de la región aguas arriba del gen estructura *as-48A*

CAATTTAGAAAACAAATGCGACATTTACGTAAAGCTTGCCAAGGAAGCTTGCAGCGATAC  
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540  
 GTTAAATCTTTTGTTTACGCTGTAAATGCATTTTGAACGGTTCCTTCGAACGTCGCTATG

TTGAATGAAAAAGTTTACCAGGAAGTAGAACAAAGCATGTCTATTTAAAAATAAATAATT  
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600  
 AACTTACTTTTTCAAATGGTCCTTGATCTTGTTCGTACAGATAAATTTTTATTATTAA

CCTAAACAATTTAAGACGTAAAAAAGAGCATAACGGGTGGTTATGCTCTTTTTGTTTAC  
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660  
 GGATTTGTTAAATTCTGCATTTTTTTCTCGTATTGCCACCAATACGAGAAAAACAAATG

CAAATAATAAAAAGAAGAAATGGGGAAAACGTGATGAAAGAAACGAGTTCAAGATTTGAT  
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720  
 GTTTATTATTTTTCTTCTTTACCCCTTTTGCACTACTTTCTTTGCTCAAGTTCTAAACTA

TTTTCTGAATTTTGTGACGAAGGATTCGAAAAACAGACAATTTAGAACAAGCCATTTA  
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780  
 AAAAGACTTAAAACAACCTGCTTCCTAAGCTTTTTTGTCTGTTAAATCTTGTTTCGGTAAAT

-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840  
 TGTTTTTAAAGATGGTTCTTTATGGAGTGGTTATTCTGAAGGTGGCGATGGACGTATTAG  
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840  
 ACAAAAATTTCTACCAAGAAATACCTCACCAATAAGACTTCCACCGCTACCTGCATAATC

-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900  
 AGATGTTGACCACGGAACAATTGAAGCGTTTTTTTAAAGATCCGTCTATTGACCGTTATCA  
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900  
 TCTACAACCTGGTGCCTTGTTAACTTCGCAAAAAATTTCTAGGCAGATAACTGGCAATAGT

-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960  
 CCCTGATTTTTGGTCCATGACGATGGAAGAAATGATTCAGGTTGTTCCAGAGAATCGGAT  
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960  
 GGGACTAAAACCAGGTACTGCTACCTTCTTTACTAAGTCCAACAAGGTCTCTTAGCCTA

-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ORF X M -  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 F L K M V L Y G V V I L K V A M D V L E -  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 M L T T E Q L K R F L K I R L L T V I T -  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ORF Y M T M E E M I Q V V P E N R M -  
 L I F G P \* -

**Figura 13b.** Secuencia de ADN de la región aguas arriba del gen estructural *as-48A*, localización de la ORF X con un posible RBS (GAACAAG) y la ORF Y.

# RESULTADOS

```

961  GGTATTAATTTTAAAGAACAATCAGTATTCTGAAAAACAAGTAAATGTTCTCGATCAGTT 1020
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCATAATTTAAATTTCTTGTAGTCATAAGACTTTTTGTTTCATTTACAAGAGCTAGTCAA

a
b    V L I L K N N Q Y S E K Q V N V L D Q L -

1021  ACAAAGTTAGATTTTAAAGATTGAGGAATTAGAAGTACCTTACAGATAGAAGATGAGAGG 1080
-----+-----+-----+-----+-----+
TGTTTTCAATCTAAAATTCTAACTCCTTAATCTTCATGGAATGTCTATCTTCTACTCTCC

b    Q K L D F K I E E L E V P Y R *

1081  TTAAATCTGGAAGAATATCAAGAAGCCATGATTGATGAAAAAATTCTGAAAATTATCTT 1140
-----+-----+-----+-----+-----+
AATTTAGACCTTCTTATAGTTCTTCGGTACTAACTACTTTTTTTAAGACTTTTAATAGAA

a          ORF Z      M I D E K N S E N Y L -

1141  TATGATATAGATATCGTAGAAGAAAACAAGAAGTAGTTC AAGCGTATAACCAGGATAGA 1200
-----+-----+-----+-----+-----+
ATACTATATCTATAGCATCTTCTTTTGTTCCTTCATCAAGTTCGCATATTGGTCCTATCT

a    Y D I D I V E E N K E V V Q A Y N Q D R -

1201  ATGAAAGATAAGTCAAATGAAAATGAACAATTTGAAGGAATTAGTCATGATGTTGATTTTC 1260
-----+-----+-----+-----+-----+
TACTTTCTATTTCAGTTTACTTTTACTTGTTAAACTTCCTTAATCAGTACTACAACAAAG

a    M K D K S N E N E Q F E G I S H D V D F -
b          M K M N N L K E L V M M L I S -
c

1261  TAAGAAGTGTCTAGTTATTTTTTCTTGGGTTATTTACAGGAATAGATATGTTATTGCTTG 1320
-----+-----+-----+-----+-----+
ATTCTTCACAGATCAATAAAAAAGAACCCAATAAATGTCCTTATCTATAACAATAACGAAC

a
b    *
K K C L V I F S W V I Y R N R Y V I A C -

1321  CATCAAATAAACTACATGGGTATAATAGCAATGAAATGCATTTCAAAAATATTTTGAGG 1380
-----+-----+-----+-----+-----+
GTAGTTTTATTTGATGTACCCATATTATCGTTACTTTACGTAAAGTTTTTATAAACTCC

a          as-48A M H F K N I L R -
b    I K I N Y M G I I A M K C I S K I F * -

1381  AGGAGTATCATGGTTAAAGAAAATAAATTTTCTAAGATTTTTATTTAATGGCTTTGAGT 1440
-----+-----+-----+-----+-----+
TCCTCATAGTACCAATTTCTTTTATTTAAAAGATTCTAAAATAAAATTACCGAACTCA

a
b    R S I M V K E N K F S K I F I L M A L S -
c

1441  TTTTTGGGGTTAGCCTTGTTTAGTGCAAGTCTTCAGTTTTTGCCGATTGCACATATGGCT 1500
-----+-----+-----+-----+-----+
AAAAACCCAATCGGAACAAATCACGTT CAGAAGTCAAAAACGGCTAACGTGTATACCGA

```

Figura 13c. Secuencia de ADN de la región aguas arriba del gen estructural *as-48A*, localización de las ORF Y y Z con una secuencia Shine-Dalgarno(GGAAGAA).

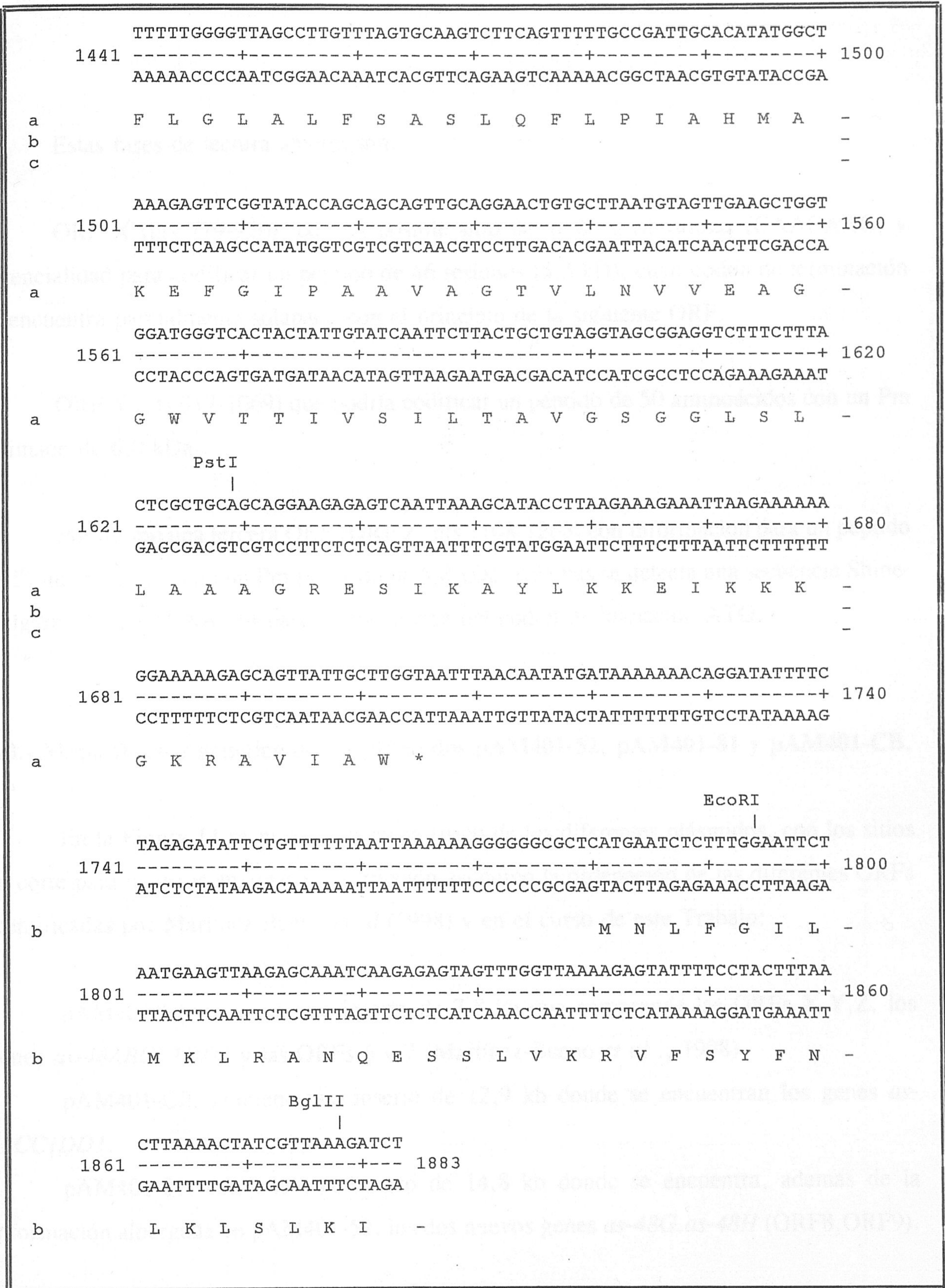


Figura 13d. Secuencia de ADN y localización del gen estructural *as-48A*.



Estas fases de lectura abierta son:

ORF X (nts 779-920), con un posible sitio de unión a ribosomas (GAACAAG) y potencialidad para codificar un péptido de 46 residuos (5,3 kD), cuyo codon de terminación se encuentra parcialmente solapado con el principio de la siguiente ORF.

ORF Y (nts 917-1069) que podría codificar un péptido de 50 aminoácidos con un Pm estimado de 6,0 kDa

Por último una tercera ORF (ORF Z, nts 1108-1263) con información para un péptido de 51 aminoácidos, con un Pm estimado de 5,8 kDa. Además se detecta una secuencia Shine-Dalgarno (GGAAGAA) 14 bases aguas arriba del codon de iniciación ATG.

### 3.3.- Mapa físico y genético de los plásmidos pAM401-52, pAM401-81 y pAM401-CB.

En la Figura 14 se muestra el mapa físico de los diferentes plásmidos, con los sitios de corte para diversas enzimas de restricción así como la ordenación de las diferentes ORFs identificadas por Martínez-Bueno *et al* (1998) y en el curso de este Trabajo:

pAM401-52: contiene una inserto de 7,8 kb que comprende las ORFs X,Y,Z, los genes *as-48ABCC1DD1* y las ORFs 6 y 7.(Martínez-Bueno *et al* ., 1998).

pAM401-CB: contiene una inserto de 12,9 kb donde se encuentran los genes *as-48CC1DD1*.

pAM401-81: contiene una inserto de 14,8 kb donde se encuentra, además de la información albergada en pAM401-52, los dos nuevos genes *as-48G,as-48H* (ORF8,ORF9).

## MAPAS GENÉTICOS DE LOS DIFERENTES PLÁSMIDOS

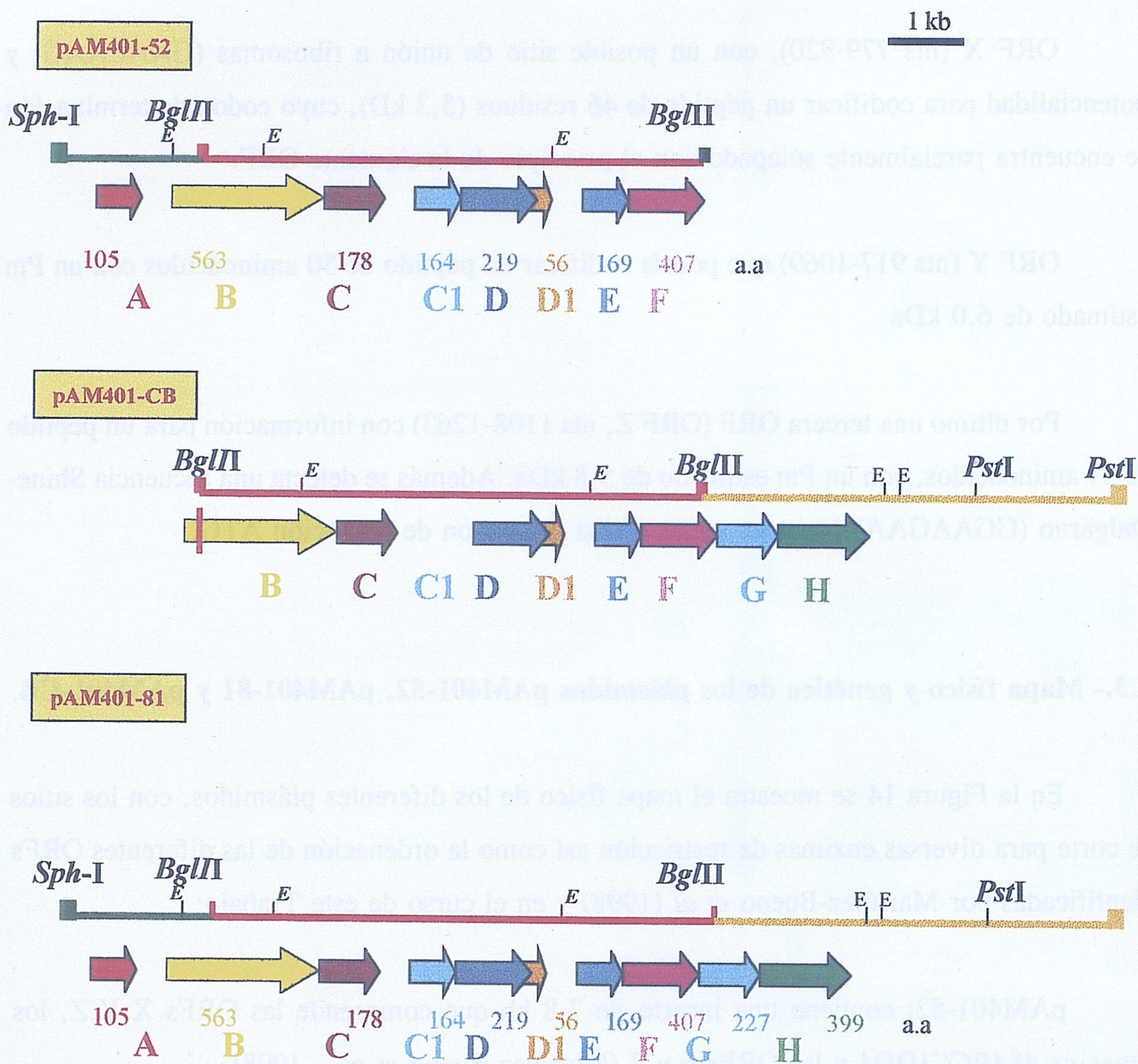


Figura 14.- Mapa genético de los plásmidos, pAM401-52, pAM401-CB, pAM401-81 con los sitios de corte para diversas enzimas de restricción (*E*; *Eco*RI, *Bgl*III, *Pst*I) y localización de los diferentes ORFs ( flechas horizontales).

### 4.- ANÁLISIS DE HOMOLOGÍA Y PREDICCIÓN DE ESTRUCTURAS

La caracterización de los productos génicos de las dos nuevas ORFs identificadas en este Trabajo se ha llevado a cabo mediante análisis de homología con proteínas depositadas en las bases SWISSPROT, PIR y EMBL, utilizando los programas FASTA, TFASTA y BLASTA. También se ha hecho predicción de estructuras empleando el programa Peptide structure (GCG), así como algunos otros existentes en diferentes bases de datos, de acuerdo con lo expuesto en Material y Métodos.

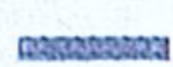





Estos estudios han sido también aplicados a las proteínas As-48B y a los productos génicos de las ORFs 6 (*as-48E*) y 7 (*as-48F*) cuyas secuencias habían sido previamente depositadas en la base de datos GenBank, sin que las proteínas deducidas hubiesen sido analizadas (GenBank número de acceso Y12234).

El análisis de As-48B, una proteína de 563 aminoácidos con pI 10,48, puso de manifiesto de forma inequívoca, que se trataba de una proteína integral de membrana con 11 segmentos capaces de atravesarla, además se han encontrado dos secuencias probables de glicosilación y trece de fosforilación (Figuras 15a;b). Sin embargo estos motivos no parecen tener un gran significado en As-48B, ya que de acuerdo con la predicción de estructura mas probable , estarían localizados en dominios extracelulares.

En cuanto al análisis de homología realizado con As-48B, no se han encontrado secuencias conservadas que sean significativas; los alineamientos sólo se establecen en las regiones hidrófobas, con proteínas de membrana implicadas en el transporte electrónico.

El producto de la ORF 6 (*as-48E*) (169 aminoácidos, 19 kDa, pI 10,21) también podría tratarse de una proteína integral de membrana, ya que presenta 4 posibles segmentos hidrófobos (Figura 16) y un posible sitio de glicosilación y de fosforilación. Tampoco en este caso se han detectado homologías significativas con ninguna de las proteínas descritas en las diferentes bases de datos, por lo que su función será difícil de determinar por esta vía.

1 MNLFGILMKL RANQESSLVK RVFSYFNLKL SLKIYLFINI FFEFSLAFVV  
 51 SLGLRLTLIK SDINVNLFPI IFFILGIVQG ASNCYRTHVF PFEELRKLAT  
 101 ISSRKISFIM<sup>.....</sup> IVTDLFYIFT FSSSILYGLL SLIYISSNAF IFQKFSLSVF  
 151 FLFIYICSFY CSNRIFGQYI YNKIVKAIGL TRLIFYSIGA ALFTYLGFFI  
 201 VSEVFSNIVY FIKKYFVNIE SVNNKVIWES FSKDIGMFYV NSASKFYESH  
 251 VYSFTYIDVF LVSAMLLILT ILLLAMEPKL YPLKTKMLPK TKIDLCNSYV  
 301 YFLNKALKKN IFFKCSLLKL ANTRWIIANN FFQNIILTYE SFFYIGVMLS  
 351 IILLNSQNRM LQIQLLFLLN ILVIGNQTFE IREEMYPYLS FGLERNQFTL  
 401 LRSSPGLNK VFNSKLM<sup>TYR</sup> LFLIIPLLIL IINIVVSLY IMIPVIFAIF  
 451 LFITFSMSVY VFPMIQMYMI PLATKLDYTN DTEIGSAKDE KIVLEKFQTV  
 501 PRYFFNIVPL VLTFIFPIVG ERYSLIIFFG ELVYFSLATI IFVFFSKKII  
 551 RKGIFVVHAI RYH

- 11  Segmentos transmembrana
- 1  Sitio de fosforilación Camp-Fosfato
- 7  Fosforilación por proteína kinasa
- 2  Sitios de glicosilación
- 4  cK<sub>2</sub> sitio de fosforilación (caseína-kinasa)
- 1  Fosforilación por Tirosina kinasa

**Figura 15a.-** Predicción y análisis de topologías de As-48B. La determinación de los segmentos de transmembrana se han realizado de acuerdo con <http://www.ebi.ac.uk>, <http://www.isrec.isb-sib.ch> <http://www4.ncbi.nlm.nih.gov>. Para la determinación de los sitios probables de fosforilación y glicosilación se ha referido a el programa MOTIFS(GCG).

| Segmento transmembrana | Posición    | Orientación       |
|------------------------|-------------|-------------------|
| 1                      | 34-59 (26)  | Exterior-interior |
| 2                      | 63- 85 (23) | Interior-exterior |
| 3                      | 115-142(28) | Exterior-interior |
| 4                      | 141-161(21) | Interior-exterior |
| 5                      | 190-212(23) | Exterior-interior |
| 6                      | 254-276(23) | Interior-exterior |
| 7                      | 335-356(22) | Exterior-interior |
| 8                      | 360-381(22) | Interior-exterior |
| 9                      | 422-439(18) | Exterior-interior |
| 10                     | 440-462(23) | Interior-exterior |
| 11                     | 527-546(20) | Exterior-interior |

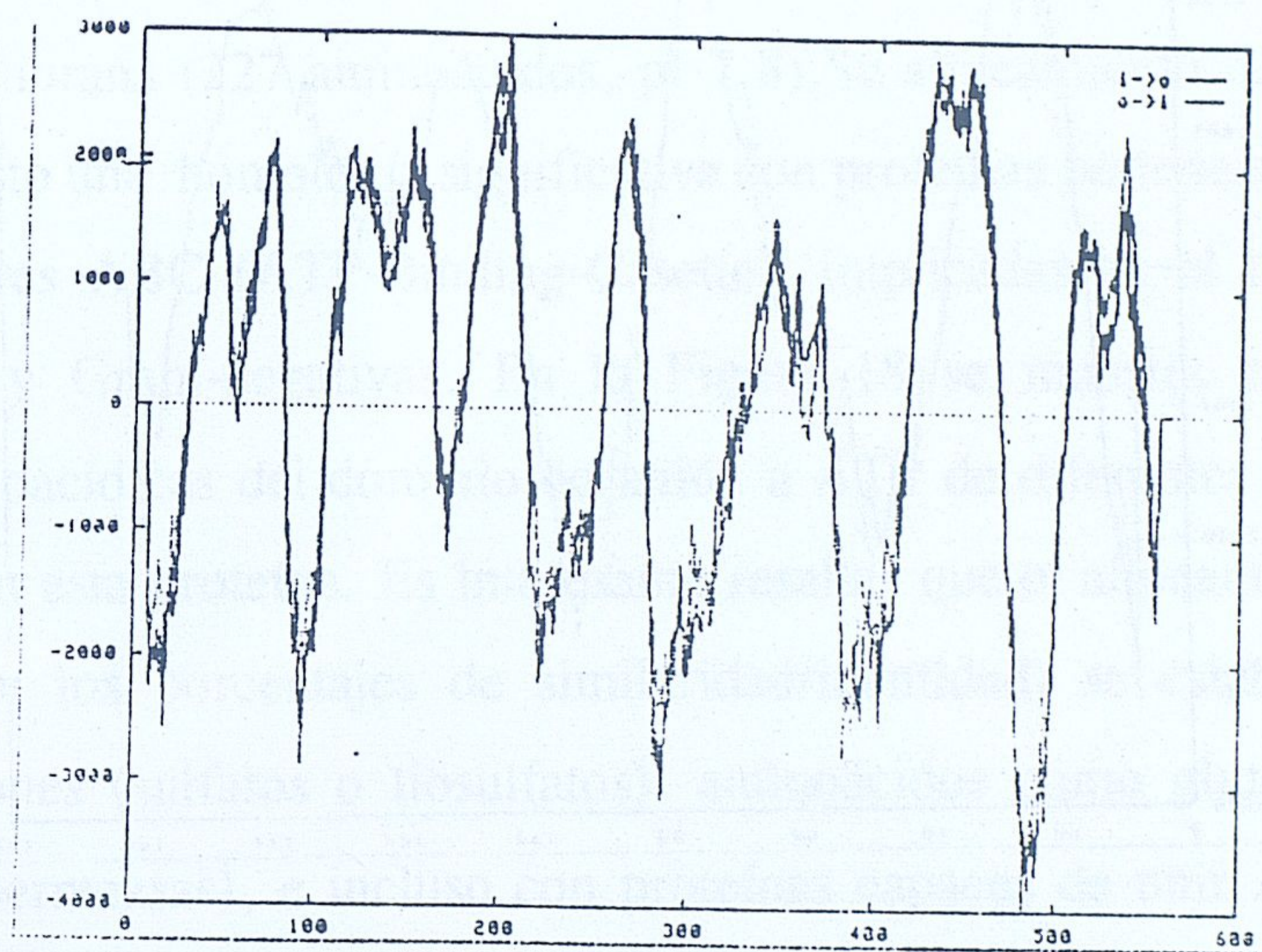
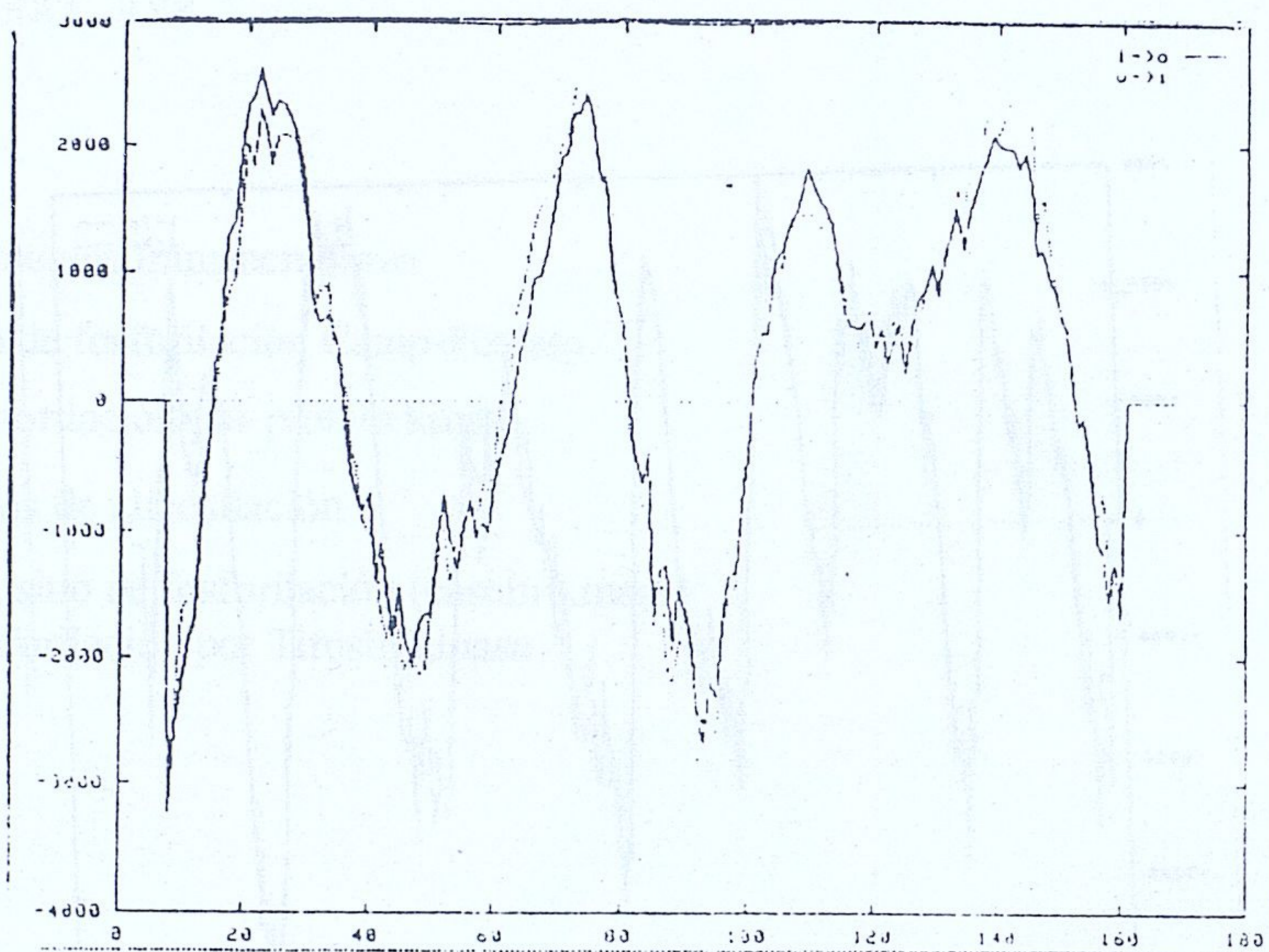


Figura 15b.- Predicción y análisis de topologías de As-48B. La determinación de los segmentos de transmembrana se han realizado de acuerdo con <http://www.ebi.ac.uk>, <http://www.isrec.isb-sib.ch> , <http://www4.ncbi.nlm.nih.gov>.

1 MNDYKKEVKK IKIWNLIALV LISIGTIESI IGLPSALNPN EKIYTSIGSD  
 51 GMDIYNQLNS MPVKVETVLN VLFSIAFVIL EFISHAKIKK DQIPVKYPYY  
 101 LNLGWTVSI IFSLLTPSF TNASETQSIG LIIGITTIIF TLVFKLPVIM  
 151 VLVYLFKVNT GENDIEKVN

- 1 — Sitio de glucosilación
- 1 — Fosforilación por proteína kinasa
- 4 — Segmentos transmembrana

| Segmento transmembrana | Posición     | Orientación       |
|------------------------|--------------|-------------------|
| 1                      | 13-31 (19)   | Interior-exterior |
| 2                      | 65- 83 (19)  | Exterior-interior |
| 3                      | 101-120 (20) | Interior-exterior |
| 4                      | 129-153 (25) | Exterior-interior |



**Figura 16.-** Predicción y análisis de topologías de ORF 6 (*as-48E*). La determinación de los segmentos de transmembrana se han realizado de acuerdo con <http://www.ebi.ac.uk>, <http://www.isrec.isb-sib.ch> <http://www4.ncbi.nlm.nih.gov>. Para la determinación de los sitios probables de fosforilación y glicosilación se ha referido a el programa MOTIFS(GCG).

La proteína deducida de la ORF 7 (45,1 kDa, 407 aminoácidos), es la única de todas las ORFs relacionadas con el carácter AS-48. Contiene una baja proporción de aminoácidos hidrófobos, si bien presenta un pequeño segmento de transmembrana en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal, siendo el resto de la molécula totalmente hidrofílica. Muestra también un gran número de sitios susceptibles de fosforilación (21) así como de glicosilación (7). Con respecto a la presencia de dominios conservados, no se han detectado homologías importantes aunque existe una cierta similitud con algunas proteínas de superficie de estreptococos, tales como la proteína M o proteínas que se unen a la fracción Fc de las inmunoglobulinas. Sin embargo no se obtuvo una secuencia consenso con ellas. De acuerdo con estos resultados, As-48F podría ser una proteína de superficie anclada a través de su extremo N-amino terminal hidrófobo en la membrana. (Figura 17).

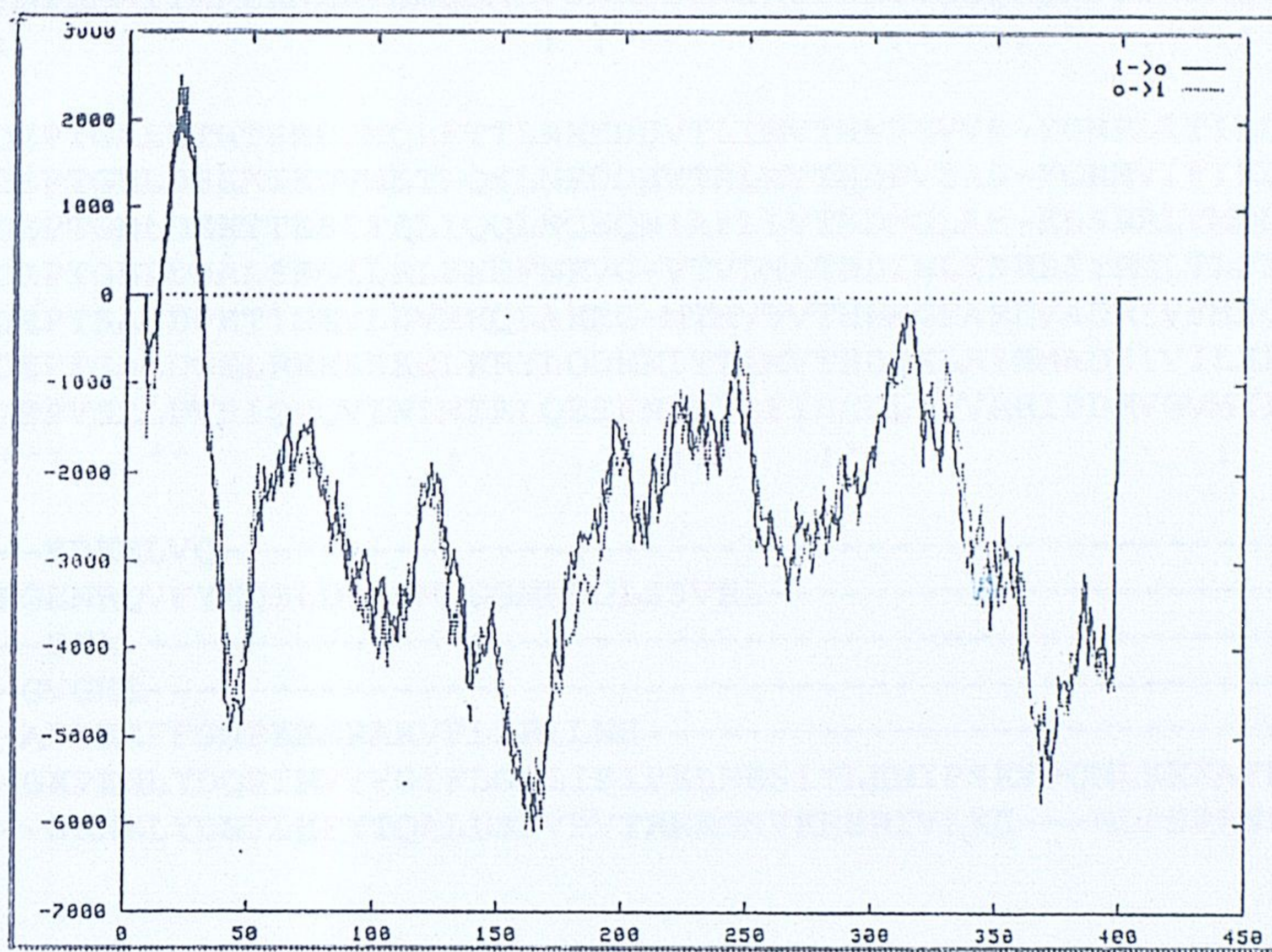
El análisis de los productos génicos de las nuevas ORFs identificadas (*as-48G* y H), con proteínas depositadas en las bases de datos, puso de manifiesto que *as-48G* podría codificar una proteína parcialmente hidrofílica, sin secuencias hidrófobas capaces de atravesar la membrana (227 aminoácidos, pI 7,8). Su alineamiento con proteínas conocidas puso de manifiesto una homología significativa con proteínas pertenecientes a la superfamilia de transportadores ABC (ATP-Binding-Casette), implicadas en el transporte de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En la Figura 18 se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas del dominio de unión a ATP de diferentes sistemas de transporte de tipo ABC con esta proteína. Es interesante resaltar que el alineamiento más significativo (de acuerdo con los porcentajes de similaridad/identidad) se establece con sistemas de transporte de iones (sulfatos o tiosulfatos), aminoácidos como glutamina y oligopéptidos (oligopéptidos permeasas), e incluso con proteínas capaces de unir ATP, relacionadas con la división celular en *E. coli* (FtsE) (Tabla 5) Figura 18.). El hipotético producto de *as-48G* también presenta homología, aunque con valores de similaridad inferiores, con proteínas de unión al ATP tales como NisF, SpaF y McbF, que están relacionadas con la secreción y resistencia de la nisina, subtilina y microcina B17 respectivamente (resultados no mostrados).

En todos los casos comentados, el mayor grado de identidad aparece en los dos sitios conservados, los motivos Walker A y B, que interaccionan con la molécula del ATP y con iones magnesio respectivamente, así como con el lazo de serina-glicina (S\*G), que en definitiva son los rasgos estructurales más representativos de esta superfamilia de transportadores (Figuras 18).

La predicción de estructura hecha para el producto de *as-48H* sugiere la existencia de 4 probables alfa-hélices con tamaño suficiente como para atravesar la membrana citoplasmática, uno situado en el extremo N-terminal y tres en el extremo C-terminal. Además, presenta dos sitios susceptibles de glicosilación y un elevado número de motivos (23) susceptibles de ser fosforilados. La posible topología de esta proteína en la membrana aparece en la Figura 19. Estos resultados se ven corroborados al investigar la homología que presenta con proteínas de las bases de datos. El mayor grado de similaridad se establece, a nivel de los residuos 18-49 y 350-400, con proteínas integrales de membrana que presentan entre cinco y ocho segmentos hidrófobos, algunas de las cuales están implicadas en procesos de transporte bacteriano (Figura 20a;b), Estos datos apoyan la hipótesis sobre la función de *as-48H* completando y constituyendo un nuevo sistema de transporte ABC.



1 MILKKLT<sup>███</sup>Q<sup>███</sup> QISLTIIGCL VGVLLISATL IYKLNATEPK EESYQIIKV  
 51 KKSDPLVLKG IVQPKTTSYL NFDQSLGKIN TI<sup>███</sup>SV<sup>███</sup>KNGQEI NENDVVATYQ  
 101 NTT<sup>███</sup>VEDQ<sup>███</sup>AEE QTQSLEKLN<sup>███</sup>L AVTNAQINLD NAT<sup>███</sup>Q<sup>███</sup>KQ<sup>███</sup>Q<sup>███</sup>EELE NRLSVAKNEQ  
 151 TTIINKK<sup>███</sup>MDD EMKKA<sup>███</sup>EKAES DSKI<sup>███</sup>ETIQQA LDAQKEAVLQ AKQALDAANV  
 201 DLSSANNTIE QT<sup>███</sup>KK<sup>███</sup>KITTTV TAPFKGIVYI NDKGKVDATI PYATIVSPET  
 251 VIKGSVTEYD YNKVKVGQPV TISQINEEKA TDGIISEINA LPEDMAVSPQ  
 301 NTSS<sup>███</sup>T<sup>███</sup>K<sup>███</sup>NSTI STFSFII<sup>███</sup>SP<sup>███</sup>K EPIHYGYNVQ ISVPMNNLEL AKKN<sup>███</sup>T<sup>███</sup>V<sup>███</sup>KENN  
 351 NEVFVFIYRD GKVVKQKIEV KEDNDKYVVK TGLKENDSII ENPDT<sup>███</sup>S<sup>███</sup>L<sup>███</sup>K<sup>███</sup>DG  
 401 QKVTVKQ  
 ■■■■■



- 7 ——— Sitios de glicosilación
- 9 ——— Sitio de Fosforilación Ck<sub>2</sub>
- 9 ..... Fosforilación por proteína kinasa
- 3 ——— Sitios de fosforilación Camp-Fosfato
- 1 - - - - - Segmento de membrana

Figura 17.- Predicción y análisis de topologías de ORF 7 (*as-48F*). La determinación de los segmentos de membrana se han realizado de acuerdo con <http://www.ebi.ac.uk>, <http://www.isrec.isb-sib.ch> <http://www4.ncbi.nlm.nih.gov>. Para la determinación de los sitios probables de fosforilación y glicosilación se ha referido a el programa MOTIFS(GCG).



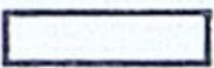


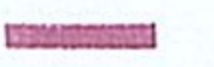
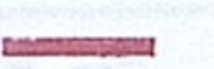

| <b>PROTEINAS</b> | <b>CARACTERÍSTICAS</b>  | <b>% SIMILARIDAD/<br/>IDENTIDAD<br/>As-48G</b> |
|------------------|---|--|
| P27675           | Proteína que une ATP relacionada con el transporte de la glutamina. | 53/40,5  |
| P10115           | Proteína que une ATP relacionada con la división celular ( FtsE)    | 55,4/41  |
| P42423           | Hipotético transportador ABC relacionado en IDH                     | 52,2/40,7                                      |
| P45247           | Hipotético ABC transportador en H11549                              | 50,2/38,5                                      |
| P10091           | Probable proteína de transporte.                                    | 48,7/33,7                                      |

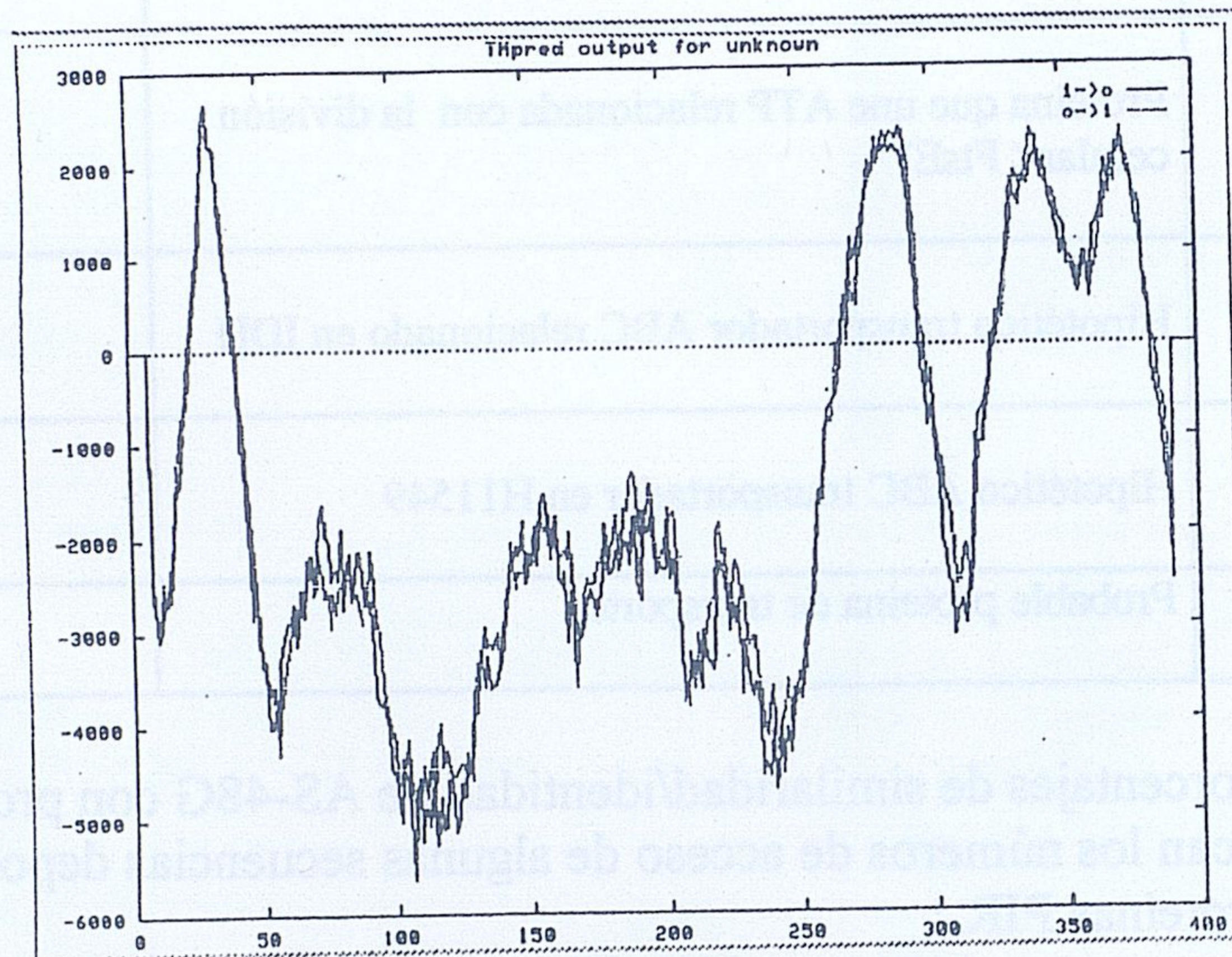
**Tabla 5.** - Porcentajes de similaridad/identidad de AS-48G con proteínas que unen ATP. Se indican los números de acceso de algunas secuencias depositadas en base de datos de proteínas PIR.

```

1  MNLYVNMRSA WKAIKNNRKR SVLTMIGIII GISSVITILA IGRGFERDTV
51  KNLTKSDSKN VEVQLNFTPS DTSLYDTNTK FFQDVDLSTV RNVEGVKKAD
101 YSKIDEEQIY KQLSIRGNKK NKQIKLIDSE GKKVSIGRNL TGQDSELLNK
151 VATIDSVIAK ELFNTPERAL GKGIEIEQEL FRVVGVPFGE EPDNLFLSN
201 TNIEIPKDTY HYYFKSEKNT SSLTLTLEEG VKPDKVTSKV IKQLKEKGSL
251 RHLGEYEVLD TAMLTKGIGQ ILSTITYFIT AVAGISLFIA GVGVMNMMYI
301 SVSERTKEIG IRRALGATRK SIMLQFLLEG LILTISGGII GYLLGMVFAY
351 GIGSLIKVHV SVDLFTIILA VGVSSVIGLV FSVMPASEAA KKDLIDILR*

```

- 2  Sitios de glicosilación      2  Sitios de fosforilación Camp-Fosfato  
 9  Sitio de fosforilación (caseín-kinasa)      4  Segmentos de transmembrana  
 9  Fosforilación por proteín kinasa  
 1  Fosforilación por Tiro sín kinasa



| Segmento transmembrana | Posición      | Orientación       |
|------------------------|---------------|-------------------|
| 1                      | 22-41 (20)    | Interior-exterior |
| 2                      | 277- 302 (26) | Exterior-interior |
| 3                      | 330- 352 (23) | Interior-exterior |
| 4                      | 364- 382 (19) | Exterior-interior |

**Figura 19.-** Predicción y análisis de topologías de AS-48H. La determinación de los segmentos de transmembrana se han realizado de acuerdo con <http://www.ebi.ac.uk>, <http://www.isrec.isb-sib.ch> <http://www4.ncbi.nlm.nih.gov>. Para la determinación de los sitios probables de fosforilación se ha referido a el programa MOTIFS(GCG).

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| AS-48H   | -----MNLVNMRS AWKAIKNNRKR-SVLTMIIGIIIGISSVITILAI GRGFE          | 46  |
| E124979  | -----MREGISAMLEHIRISFQSIFSHKLR-SILTMLGVIIGIAAIIAIVSMLKGQS       | 51  |
| G2822200 | -----MR-SMLTMLGIIIGIGAI IAFSII EGNT                             | 28  |
| P74738   | -----MIEFRESLKMATSMLLANKLR-SSLTMLGIVIGNASVVAMLGIGQGAQ           | 47  |
| P75831   | PVVNTVSGWRQFVSGFNEAL TMAWRALAANKMR-TLLTMLGIIIGIASVVSIVVVGDAAK   | 297 |
| E1253914 | SHIDLI IKDEATATRIQQRLPAGVRMETS DTQRD TVKQMTDAFTVNLTALSLIALLVGIF | 274 |
|          | * : * . . : : : .   |     |
| AS-48H   | RD----TVKNLTKS DSKNVEVQLNFTPSDTS LYDTNTKFFQD-----VDLSTVRNV      | 93  |
| E1249797 | EQ----LKQSMIGMGNNAINVYQPSGGEESGGPQVS YASAP---P-VAEETVKAIKSD     | 103 |
| G2822200 | EN----TKRQLIGGSNNTIKVVYDKKSAIDPS-IPEKSQAQKPSYIPFMGEDVLSKIKEI    | 83  |
| P74738   | EL----ATSQLEDLGNVLFVLPGPSQRNRRASFNLPKTLVLS-----DAEAIAGQV        | 94  |
| P75831   | QM----VLADIRSIGTNTIDVYPGKDFGDDD---PQYQQALK-----YDDLIAIQKQ       | 342 |
| E1253914 | LIYNTVTFNVVQRRPFFAILRCLGVTREQLFWLIMTESLVAGLIG---TGLGLLIGIWLG    | 331 |
|          | : :   |     |
| AS-48H   | EGVKKADYSKIDE---EQIYKDL SIRGN-----KKNKQIKLIDSEGKKVSI GRNLTGQD   | 144 |
| E1249797 | PMVKGLSLYYLSEG-ASVFHLTNVSYPQ-----VYGVD DDYFDMFP IRI TEGRKLTEND  | 156 |
| G2822200 | PGVKNALMTYGAD--EKIYYLSQKSSSK-----VQAVSQSVADIKQQRLL EGE GFDSEA   | 135 |
| P74738   | PSVAGVAPEINRR--LLVSHRNLNTNAT-----IVGTTPEYPAIRNF SVAQGRFLNILD    | 146 |
| P75831   | PWVASATPAVSQN--LRLRYNNVDVAAS-----ANGVSGDYFN VYGMTFSEGNTFNQEQ    | 394 |
| E1253914 | EGLIGLVTQTINDFYFVINVRNVSVAESLLKGLIIGIFAAMLATLPPAIEAMRTVPAST     | 391 |
|          | :   |     |
| AS-48H   | S---ELLNKVATIDSVTAKELFNT-PERALGKGIEIEQELFRVVG VFP---GEEP DN LFS | 197 |
| E1249797 | L---NSTHQVVMINEAVRDELFP--DGEALHKS IEMNGVPFKVGVFKEKNQQESMFEGD    | 211 |
| G2822200 | F---KNQEQVAYLEKSLYDTLFP--KGDGIGKYVEVKGNPFKVI GVF-ESTEQSGLTSG-   | 188 |
| P74738   | L---ERHRRVAVLGSEIADRLYQ--TQTPLGQNI RINNITFEVIGVM-----ETKGS SLGS | 197 |
| P75831   | L---NGRAQVVVLD SNTRRQLFPH-KADVGEVILVGNMPARVIGVA----EEKQSMFGS    | 446 |
| E1253914 | LRRSSLESKITKLPWLWVAWFG LGSFGVLMWLPGNNLVVAFVGLFS--VLIALALIAP     | 449 |
|          | : : : : : : : : : : : :   |     |
| AS-48H   | LSNTNIEIPKDTYHYFYFKSEKNTS-----SLTTLLEEGVKPKVTSKVIKQLKEKGS L--   | 250 |
| E1249797 | YANPVLVYPKQWP-LIEGF DAPT-----QIAVQAD SSEHIQEAGVMAADLLNQGLSE--   | 263 |
| G2822200 | -SEKVAIYIPLQQWHRI FDTIN VSP-----EVTVQTHKADDLKKA KVS DYLNQQMPQ-- | 240 |
| P74738   | NQDEFIFIFLDTMVAQLVGRTPYGI ELSWINVKAKDGDSVGAATFQ MENLLRLRHNI--   | 255 |
| P75831   | SKVLRVWLPYSTMSGRVMGQSWLN-----SITVRVKEGFDSAEAEQQLTRLLSLRHGK--    | 499 |
| E1253914 | PLTRFVMLRLAPGLGRLGPIGRMAP---RNIVRSLSRTSIAIAALMMAVSLMVGVSISV     | 506 |
|          | :   |     |
| AS-48H   | ---RHLG--EYEVLDTAMLTGIGQILSTITYFITAVAGISLFIAGVGMNMMYISVS--      | 303 |
| E1249797 | ---AELEKAEYSVMDLQEIAQELHSFNQSFALLGGIASISLLVGGIGVMNIMLVSVT--     | 318 |
| G2822200 | ---SDYM---FGVLNLQEFERQLDNLNQS NFVLLAGIASISLLVGGIGVMNIMLVSVT--   | 292 |
| P74738   | ---KNGED-DFGVSSAKQMLDIVNTITGGLTILLAAIAGISLIVGGIGVMNIMLVSVT--    | 309 |
| P75831   | ---KD-----FFTWNMDGVLKTVEKTTRTLQLFLTLVAVISLVVGGIGVMNIMLVSVT--    | 549 |
| E1253914 | GSFRQTLANWLEVTLKS DVYVSPPTLTSGRPSGNLPVDAVRNIS KWP GVRDAVMARYSSV | 566 |
|          | : : . * * : : :   |     |

Figura 20.-Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de AS-48H con proteínas integrales de membrana. Los números corresponden a secuencias depositadas en la base de datos (PIR o Swiss-Prot).

|          |  |     |
|----------|--|-----|
| AS-48H   | ---ERTKEIGIRRALGATRK-----SIML-QFLLEG-----                      | 330 |
| E1249797 | ---ERTREIGIKKALGAKRR-----VILF-QFLTEA-----                      | 345 |
| G2822200 | ---ERTREIGIKKALGARR-----KILASG-----                            | 314 |
| P74738   | ---ERTQEIGLRKALGAGEQ-----DILS-QFLIEA-----                      | 336 |
| P75831   | ---ERTREIGIRMAVGARAS-----DVLQ-QFLIEA-----                      | 576 |
| E1253914 | FAPDWGREVELMAVSGDISDGKRPYRWIDGNKDTLWPRFLAGKGVMLSEPMVSRQHLQMP   | 626 |
|          | : : * : . *  | ::* |
| AS-48H   | ----LILTISGG----IIGYLLGMV----FAYGIGSLIKVHVS-VDLFTIILAVGVSSVI   | 377 |
| E1249797 | ----VVLTSIGG----ILGVLAGFG----IAKLLTVIFPMPFI-VSIPAVVGALIFSMAY   | 392 |
| G2822200 | ----KRLPSVS----NFSSLGNFS----TTSR-----                          | 334 |
| P74738   | ----VIVSASGG----VIGVVLGMA----IVAIVGSLSPPLITV-ISPAVVVSLTISGSI   | 383 |
| P75831   | ----VLVCLVGG----ALGITLSLL----IAFTLQLFLPGWEIGFSPLALLLAFLCSTVT   | 624 |
| E1253914 | PRPITLMTDSGPQTFPVLAVFSDYTS DQGVILMDRAS YRAHWQDDDVTTMFLFLASGANS | 686 |
|          | : . : .  |     |
| AS-48H   | GLVFSVMPASEAAKKDLIDI----LR-----                                | 399 |
| E1249797 | GIIIFGLLPSIKASKLQPVDA----LRYE-----                             | 416 |
| P74738   | GLFFGVVPARQAAKLDPIVA----LRNA-----                              | 407 |
| P75831   | GILFGWLPARNAARLDPVDA----LARE-----                              | 648 |
| E1253914 | GALIDQLQAAFAGREDIVIQSTHSVREASMFIFDRSFT                         | 724 |

Figura 20b.-Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de AS-48H con proteínas integrales de membrana. Los números corresponden a secuencias depositadas en la base de datos (PIR o Swiss-Prot).

### 5.- GENERACION DE MUTANTES

El disponer de diferentes transformantes en *E. faecalis* JH2-2 con mutaciones en las diferentes ORFs ha sido de gran utilidad para hacer un estudio comparativo del comportamiento de los diferentes mutantes respecto del carácter AS-48 ya que nos ha permitido analizar las consecuencias que tiene la interrupción de las diferentes ORFs, con el fin de aclarar la función de las mismas en relación con la capacidad de producir AS-48 y la resistencia frente a AS-48 e incluso para identificar posibles funciones reguladoras.

#### 5.1.- Mutante de delección

Mediante digestión de pAM401-CB con *Pst*I se obtuvo un mutante que había perdido un fragmento de 2 kb. Esta nueva construcción fue denominada pAM401-CBPstI (Figura 21).

#### 5.2.- Mutantes de inserción con el transposón *Tn5*

Para aproximar las funciones de las distintas ORFs presentes en la región *as-48* se obtuvieron diversos mutantes mediante inserción del transposon *Tn5* empleando el fago lambda 467 modificado y la cepa RYC1000 de *E. coli*, en la cual se había introducido con anterioridad las diferentes construcciones (pAM401-CBPstI y pAM401-81).

La localización precisa de las inserciones de *Tn5* dentro de las diversas ORFs obtenidas, se determinó mediante análisis de restricción con *Eco*RI, amplificación mediante PCR y finalmente y de forma más precisa, mediante el análisis de la secuencia nucleotídica afectada.

En la Figura 22 se presenta, junto con el mapa físico de los plásmidos pAM401-CBPstI y pAM401-81, la posición de algunas de las inserciones transposicionales obtenidas.

## GENERACIÓN DE MUTANTES

### MUTANTE POR DELECCIÓN

1 kb

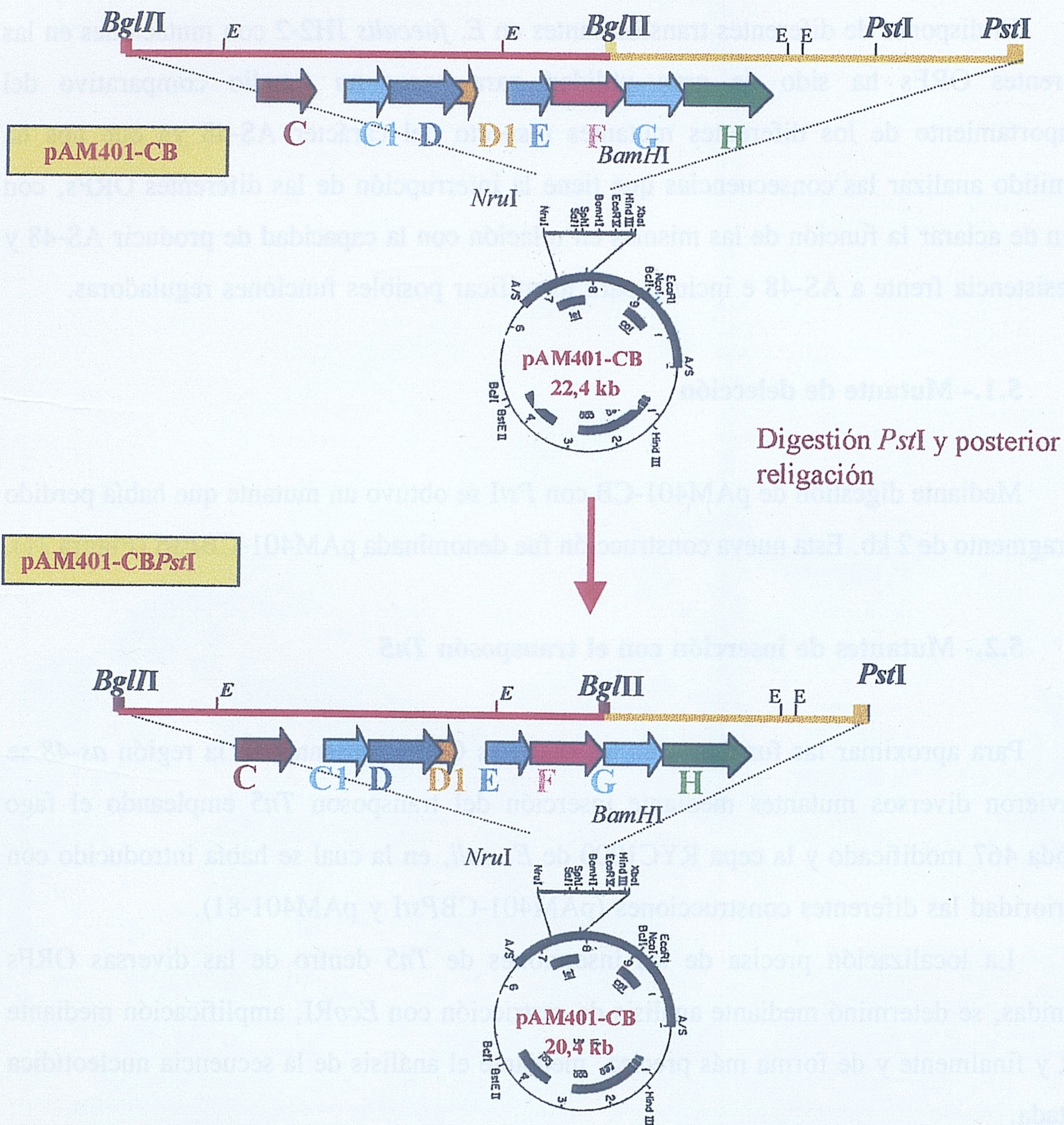


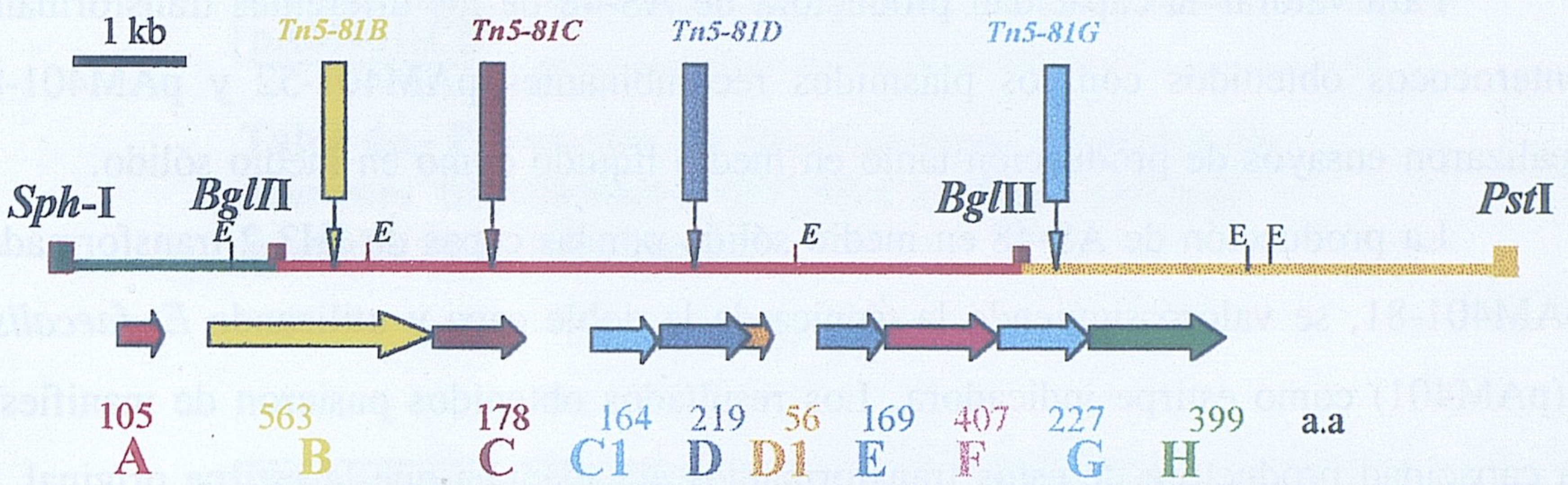
Figura 21.- Obtención del mutante pAM401-CBPst por deleción con *Pst*I de pAM401-CB



GENERACIÓN DE MUTANTES

MUTANTE POR INSERCIÓN *Tn5*

pAM401-81



pAM401-CBPstI

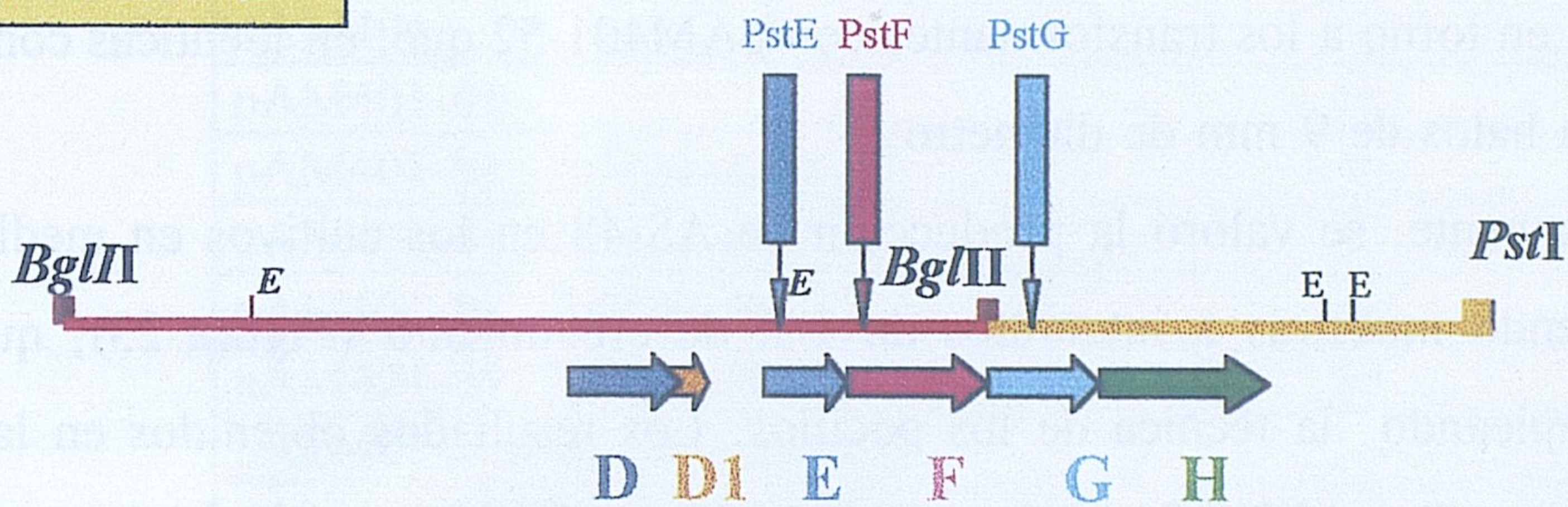


Figura 22.- Mutantes de inserción *Tn5* en *E.faecalis* pAM401-81 y *E.faecalis* pAM401-CBPst. Las flechas verticales indican el sitio de inserción del transposón y las flechas horizontales la dirección de la transcripción con los genes en estudio.

### 5.3.- Obtención de transformantes de *E. faecalis* JH2-2

Aquellos mutantes de interés, se transfirieron a *E. faecalis* JH2-2 mediante electroporación, para analizar su fenotipo en relación con el carácter AS-48 (producción y resistencia).

## 6.- PRODUCCIÓN DE AS-48

### 6.1.- Producción de AS-48 por transformantes de *E. faecalis*.

Para valorar la capacidad productora de AS-48 de los diferentes transformantes de enterococos obtenidos con los plásmidos recombinantes pAM401-52 y pAM401-81, se realizaron ensayos de producción tanto en medio líquido como en medio sólido.

La producción de AS-48 en medio sólido por las cepas de JH2-2 transformadas con pAM401-81, se valoró siguiendo la técnica de la doble capa y utilizando *E. faecalis* JH2-2(pAM401) como estirpe indicadora. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la capacidad productora de estos transformantes era idéntica que la estirpe original, A-48-32(pMB2), tomada como referencia, alcanzando 16 mm de halo de inhibición producido en torno al crecimiento de *E. faecalis* S-47 (Tabla 6a;b). Este valor es sensiblemente superior al que aparece en torno a los transformantes con pAM401-52 que, en idénticas condiciones, sólo producían halos de 9 mm de diámetro.

Paralelamente, se valoró la producción de AS-48 en los cultivos en medio líquido BHI-T extrayendo muestras a intervalos de 1 h de crecimiento (Figura 23), que fueron ensayadas empleando la técnica de los pocillos. Los resultados obtenidos en la anterior figura con *E. faecalis* pAM40-81 pusieron de manifiesto la existencia del inhibidor a partir de las 5 h de crecimiento, alcanzándose un máximo de producción a las 7 h, momento en el que el cultivo alcanzaba una  $A_{620} = 1,3$ .

Los niveles de AS-48 producidos fueron muy superiores a los de los transformantes que albergaban pAM401-52, siendo prácticamente iguales a los mostrados por la cepa A-48-32, ambas usadas como control, en las mismas condiciones de crecimiento.

| <b>TRANSFORMANTES<br/><i>E. faecalis</i> JH2-2</b> | <b>Producción AS-48<br/>(Halo mm)</b> |
|--|---------------------------------------|
| Cepa control A-48-32                               | 16                                    |
| pAM401   | -                                     |
| pAM401-81  | 16                                    |
| pAM401-52  | 9                                     |
| pAM401-CB  | -                                     |

**Tabla 6a.-** Producción de AS-48 en medio solido por los diferentes transformantes en *E. faecalis* JH2-2 mediante la técnica de la doble capa.

| <b>TRANSFORMANTES/<br/>MUTANTES <i>Tn5</i><br/><i>E. faecalis</i> JH2-2</b> | <b>Producción AS-48<br/>(Halo mm)</b> |
|---|---------------------------------------|
| Cepa control A-48-32  | 16                                    |
| pAM401  | -                                     |
| pAM401-81   | 16                                    |
| pAM401-81:: <i>Tn5(as-48B)</i>  | 0                                     |
| pAM401-81:: <i>Tn5(as-48C)</i>  | 8                                     |
| pAM401-81:: <i>Tn5(as-48D)</i>  | 0                                     |
| pAM401-81:: <i>Tn5(as-48G)</i>  | 11                                    |
| pAM401-CBPst:: <i>Tn5(as-48E)</i>   | -                                     |
| pAM401-CBPst:: <i>Tn5(as-48F)</i>   | -                                     |

**Tabla 6b.** Producción de AS-48 en medio solido por los diferentes mutantes *Tn5* pAM401-81 y pAM401-CBPst en *E. faecalis* JH2-2.

**PRODUCCIÓN DE AS-48 EN MEDIO LÍQUIDO POR LOS  
DIFERENTES TRANSFORMANTES DE *E. faecalis***

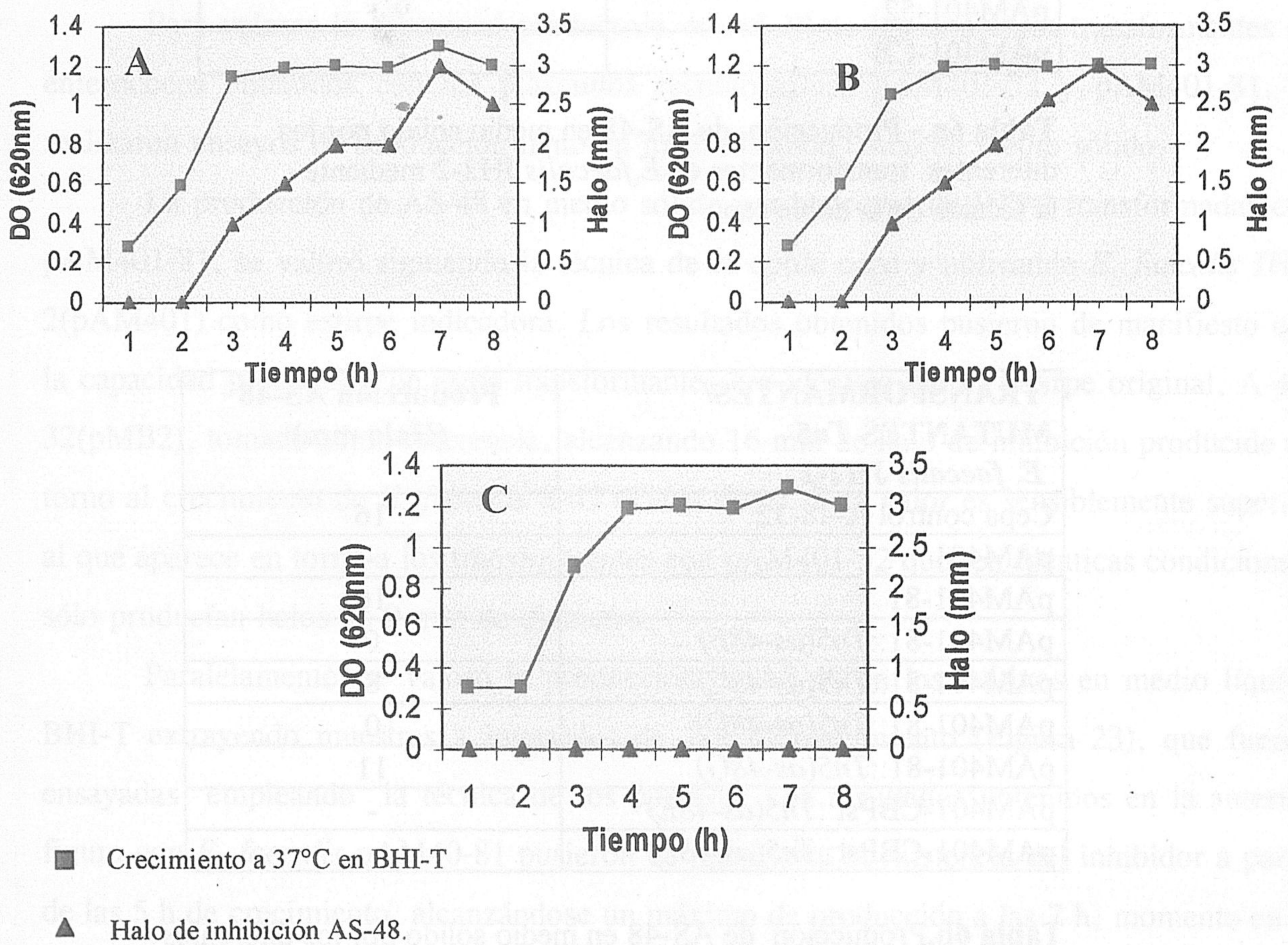


Figura 23.-Producción de AS-48 en medio líquido BHI-T. A. Cepa *E. faecalis* A-48-32 B. *E. faecalis* E.-81; C. *E. faecalis* pAM401-52.

Con el fin de intentar una mejora en la producción de AS-48, se llevaron a cabo ensayos paralelos, empleando medio BHI adicionado de Tween 80 (0,1%), de NaCl (0,5%) y de ambos compuestos conjuntamente, sin que en ningún caso se obtuviera un nivel mayor de producción que en las cepas crecidas en BHI-T (Figura 24).

La identidad del inhibidor presente en los sobrenadantes con el péptido AS-48, se estableció comparando el perfil de elución en HPLC de fase reversa de las muestras procedentes de sobrenadantes parcialmente purificados mediante cromatografía convencional de intercambio iónico (Gálvez *et al* 1986) (Figura 25).

### **6.2.- Caracterización de los los diferentes mutantes de inserción obtenidos en pAM401-81 en relación a su capacidad productora.**

La diferente capacidad para producir AS-48 en medio sólido (BHI-T), de los distintos mutantes obtenidos, nos ha llevado a clasificarlos según este criterio en:

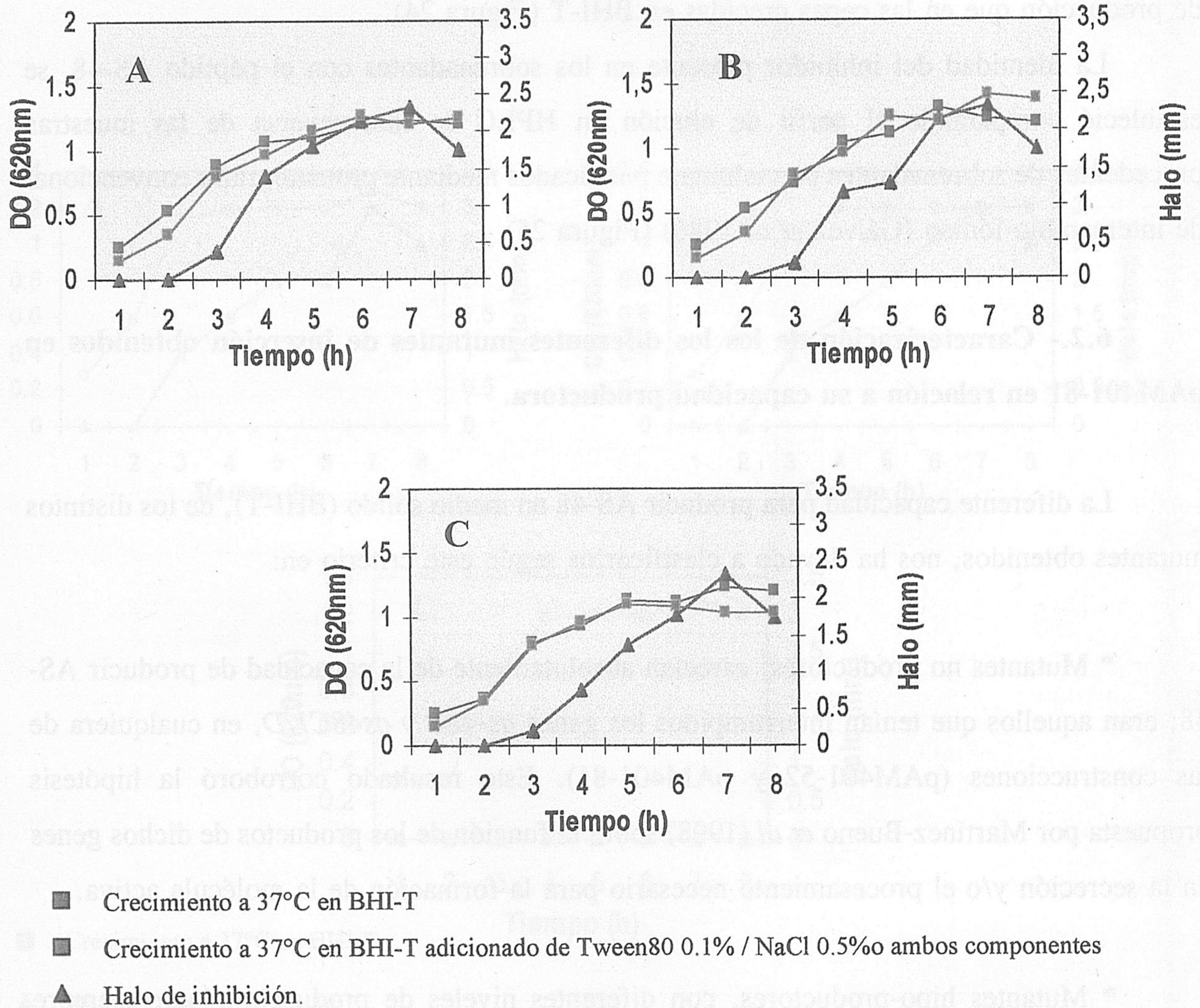
\* Mutantes no productores: carecían absolutamente de la capacidad de producir AS-48; eran aquellos que tenían interrumpidos los genes *as-48B* y *as48C1/D*, en cualquiera de las construcciones (pAM401-52 y pAM401-81). Este resultado corroboró la hipótesis propuesta por Martínez-Bueno *et al* (1998) sobre la función de los productos de dichos genes en la secreción y/o el procesamiento necesario para la formación de la molécula activa.

\* Mutantes hipo-productores, con diferentes niveles de producción, pero siempre sensiblemente mas bajos que los de la estirpe de partida. Aparecieron dos modalidades:

a) Los que tenían interrumpidos el gen *as-48C*, daban un halo de inhibición de 8mm.

b) Los que presentaban la interrupción en el gen *as-48G*, con niveles algo superiores al tipo anterior (11 mm)(Figura 26).

**PRODUCCIÓN DE AS-48 EN MEDIO LÍQUIDO  
POR *E.faecalis* pAM401-81**



**Figura 24.-** Evaluación del crecimiento *E.faecalis* pAM401-81 y de la producción AS-48 por la técnica de los pocillos en diferentes condiciones. A. Producción en medio BHI-T Tween80 0.1%-NaCl 0.5%. B; Medio BHI-T NaCl 0.5%; C. Medio BHI-T Tween80 0.1%.

PRODUCCIÓN DE AS-48 *E. faecalis* pAM401-81

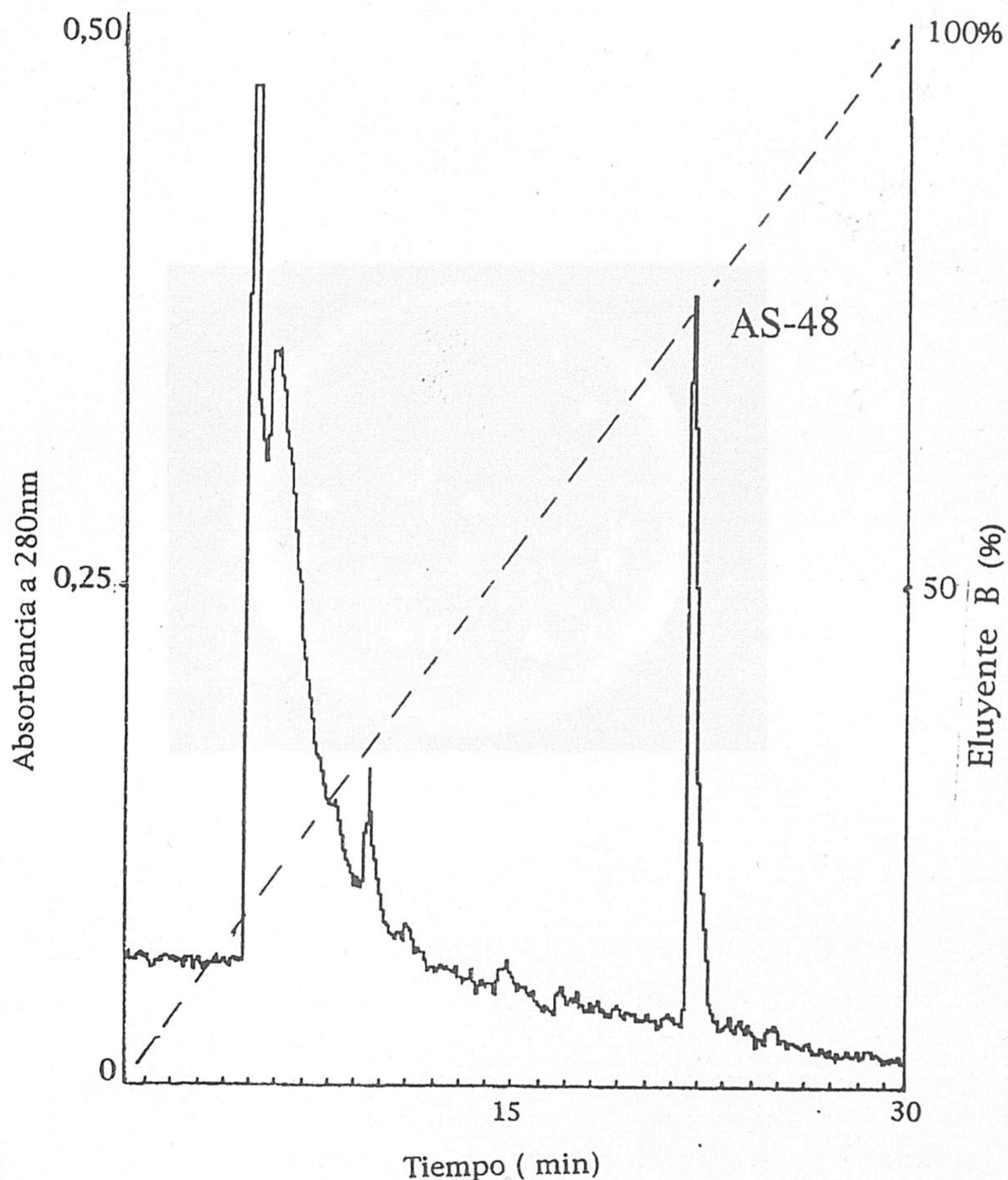
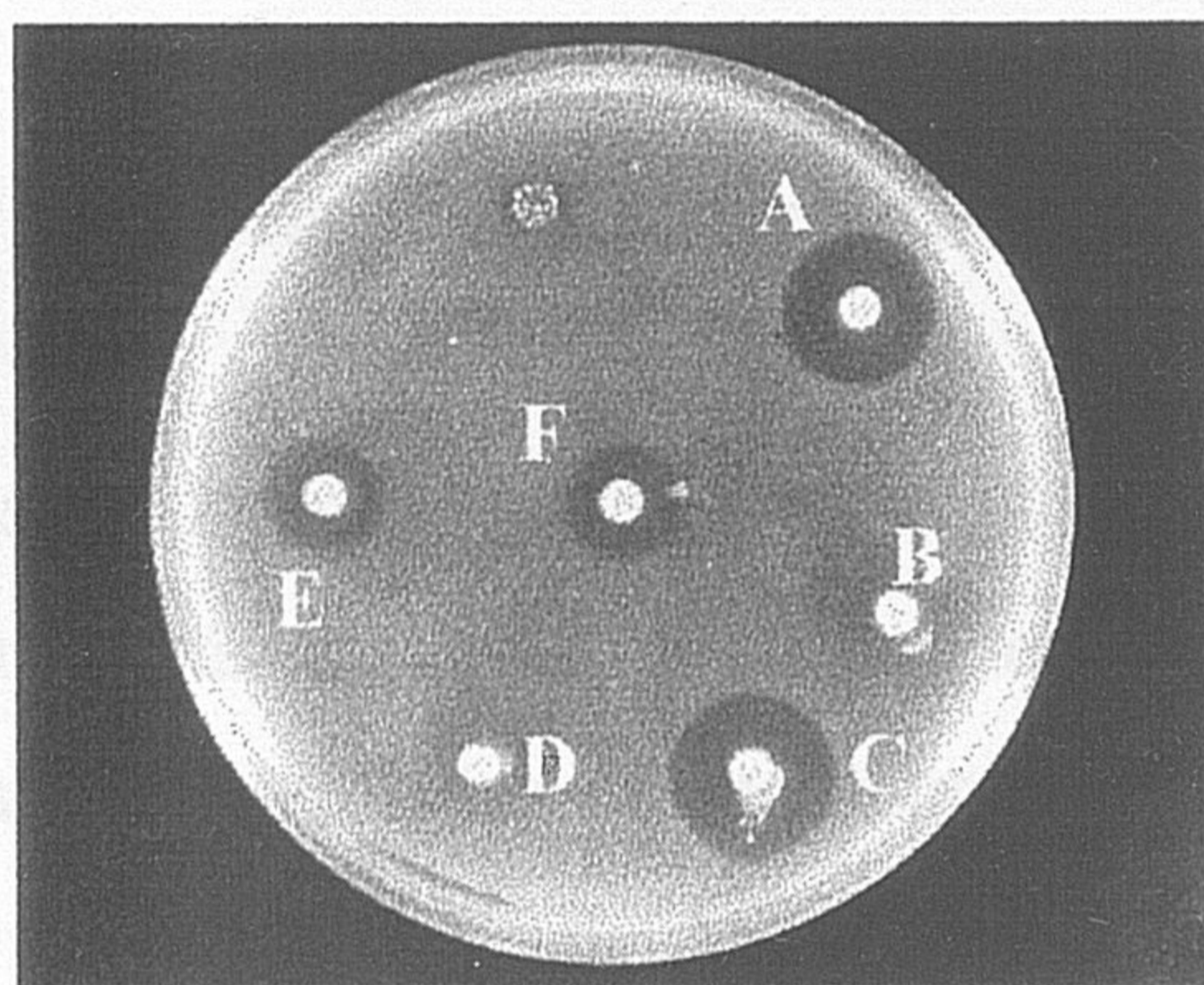


Figura 25.- Cromatografía de alta resolución (HPLC) en fase reversa de un sobrenadante de cultivo de *E. faecalis*-81 parcialmente purificado mediante intercambio iónico.

**PRODUCCIÓN DE AS-48 POR LOS DIFERENTES  
MUTANTES DE INSERCIÓN *Tn5***



**Figura 26.-** Producción de AS-48 en medio sólido por los diferentes mutantes de inserción *Tn5* mediante la técnica de la gota . A. Transformante *E.faecalis* pAM401-81 ; B. *E.faecalis* pAM401-81::*Tn5 as-48 B*; C.Cepa *E.faecalis* A-48-32; D. *E.faecalis* pAM401-81::*Tn5 as-48 D*; E. *E.faecalis* pAM401-81::*Tn5 as-48 G*; F. *E.faecalis* pAM401-81::*Tn5 as-48 C*



### 7.- ESTUDIO DE LOS NIVELES DE RESISTENCIA FRENTE A AS-48

La resistencia frente a AS-48 de los diferentes transformantes de enterococos, fué determinada en medio sólido utilizando la técnica de las gotas ( $5\mu\text{l}$ ) empleando concentraciones crecientes de AS-48. Como control positivo se utilizó la cepa A-48-32 (pMB2) y como control negativo JH2-2 (pAM401).

#### 7.1.- Resistencia de los diferentes transformantes

Los resultados presentados en la Tabla 7 pusieron de manifiesto que los transformantes que portaban el plásmido pAM401-81, que supuestamente alberga la región genética AS-48 completa, muestran niveles de resistencia similares a los de la estirpe de referencia A-48-32, resistiendo hasta  $18\mu\text{g}$  de AS-48. Este valor es doble al mostrado por los clones transformados con las construcciones pAM401-CB o pAM401-CBPstI que presentaban a partir de  $9\mu\text{g}$  de AS-48 un halo turbio de inhibición. Estos resultados demuestran que la delección con *PstI* de 2 kb que presenta el derivado pAM401-CBPstI no afecta a la expresión de la resistencia.

En todo caso, estos valores eran bastante superiores a los de esa misma estirpe transformada con el plásmido pAM401-52, que resistía sólo hasta concentraciones del orden de  $3\mu\text{g}$  de AS-48. Esto sugiere que la presencia de los dos últimos genes, *as-48G* y *as-48H*, es importante en la expresión de la resistencia frente a AS-48.

#### 7.2.- Niveles de resistencia de nuevas construcciones obtenidas

Al objeto de comprobar si el gen *as-48DI*, identificado por Martínez-Bueno *et al* (1998) como el responsable de la inmunidad, requiere para expresar niveles máximos de resistencia, la cooperación de los genes involucrados en los dos hipotéticos sistemas de secreción que han sido identificados (codificados por *as-48CID* y *as-48GH* respectivamente, Figura 27) se construyeron dos nuevos plásmidos:

- Plásmido pAM401<sub>D1-F</sub>: obtenido por subclonación en pAM401 del fragmento *Bam*HI de pAM401-52::*Tn5*-79 previamente digerido con dicha enzima. Comprende un fragmento de 2,5 kb y lleva los genes *as-48DIEF*.

\* Plásmido pAM401<sub>D1-H</sub>: obtenido por clonación del fragmento B (*Bgl*II) de pMB2 en pAM401-D1F, previa digestión con dicha enzima. De esta forma esta nueva construcción (6,9 kb) alberga los genes *as-48DIEFGH*.

Como referencia, se incluyeron, además, en este ensayo clones con la información correspondiente al gen de la inmunidad *as-48D1* (pAM401<sub>D1</sub> y pAM401<sub>D1-F</sub>) y a los genes del primer transportador ABC (*as-48CCIDD1*), los transformados con pAM401-64 (Martínez-Bueno *et al.*, 1998).

Efectivamente, como cabía esperar, los transformantes que sólo llevaban el gen de la inmunidad, o los genes *as-48E* y *F*, mostraban valores muy bajos de resistencia (hasta 1,5  $\mu$ g) tales valores eran similares a los que exhibían los portadores de la construcción pAM401-64, que incorpora además los genes de la primera bomba de exporte, si bien en este caso los halos obtenidos a las mismas concentraciones eran turbios. Sin embargo, la presencia de los genes correspondientes a la segunda bomba identificada, transformantes JH2-2(pAM401<sub>D1-H</sub>), confería un nivel de resistencia superior (hasta 2  $\mu$ g) (Tabla 8).

### 7.3.- Niveles de resistencia de los diferentes mutantes de inserción.

De forma similar al experimento anterior, se determinó la resistencia de los diferentes mutantes obtenidos por inserción de *Tn5* en el mayor número posible de genes, frente a concentraciones crecientes de AS-48. Teniendo en cuenta que los valores máximos de resistencia frente a AS-48 eran del orden de 18  $\mu$ g en la estirpe de referencia JH2-2(pAM401-81), la inserción de *Tn5* en los diferentes genes de la región bajo estudio, se tradujo, en todo caso, en una clara disminución de la resistencia de estos mutantes (hasta 6  $\mu$ g) (Tabla 9).

## RESULTADOS

| Transformantes  | 0,5µg | 1 µg | 1,5 µg | 2 µg | 3 µg | 6 µg | 9 µg | 12 µg | 18 µg | 20 µg |
|-----------------|-------|------|--------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| Control A-48-32 | -     | -    | -      | -    | -    | -    | -    | -     | -     | +     |
| pAM401-52       | -     | -    | -      | -    | -    | +    | +    | +     | +     | +     |
| pAM401          | +     | +    | +      | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     |
| pAM401-81       | -     | -    | -      | -    | -    | -    | -    | -     | -     | +     |
| pAM401-CB       | -     | -    | -      | -    | -    | -    | +    | +     | +     | +     |
| pAM401-CBPst    | -     | -    | -      | -    | -    | -    | +    | +     | +     | +     |

**Tabla 7.-** Resistencia frente a AS-48 por los diferentes transformantes *E.faecalis* JH2-2, realizado por la técnica de las gotas en un volumen de 5µl, empleando diferentes concentraciones crecientes de AS-48 expresada en µg totales; +, sensible a AS-48, - , resistencia a AS-48.

| TRANSFORMANTE          | 0,5µg | 1 µg | 1,5 µg | 2 µg | 3 µg | 6 µg | 9 µg | 12 µg | 18 µg | 20 µg |
|------------------------|-------|------|--------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| pAM401                 | +     | +    | +      | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     |
| pAM401D1               | -     | -    | +      | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     |
| pAM401 <sub>D1-H</sub> | -     | -    | -      | -    | +    | +    | +    | +     | +     | +     |
| pAM401 <sub>D1-F</sub> | -     | -    | -      | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     |
| pAM401-64              | -     | -    | -      | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     |

**Tabla 8.-** Resistencia frente a AS-48 por los las nuevas construcciones obtenidas en *E.faecalis* JH2-2, realizado por la técnica de las gotas en un volumen de 5µl, empleando diferentes concentraciones crecientes de AS-48 expresada en µg totales; +, sensible a AS-48, - , resistencia a AS-48.

| Transformante/<br>Mutante | 0,5µg | 1 µg | 1,5 µg | 2 µg | 3 µg | 6 µg | 9 µg | 12 µg | 18 µg | 20 µg |
|---------------------------|-------|------|--------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| Control A-48-32           | -     | -    | -      | -    | -    | -    | -    | -     | -     | +     |
| pAM401                    | +     | +    | +      | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     |
| pAM401-81                 | -     | -    | -      | -    | -    | -    | -    | -     | -     | +     |
| pAM401-81B                | -     | -    | -      | -    | -    | -    | +    | +     | +     | +     |
| pAM401-81C                | -     | -    | -      | -    | -    | -    | +    | +     | +     | +     |
| pAM401-81D                | -     | -    | -      | -    | -    | -    | +    | +     | +     | +     |
| pAM401-81G                | -     | -    | -      | -    | -    | -    | +    | +     | +     | +     |

**Tabla 9.-** Resistencia frente a AS-48 por los diferentes mutantes de inserción *Tn5* en *E.faecalis* JH2-2, realizado por la técnica de las gotas en un volumen de 5µl, empleando diferentes concentraciones crecientes de AS-48 expresada en µg totales; +, sensible a AS-48, - , resistencia a AS-48.

## OBTENCIÓN DE NUEVAS CONSTRUCCIONES

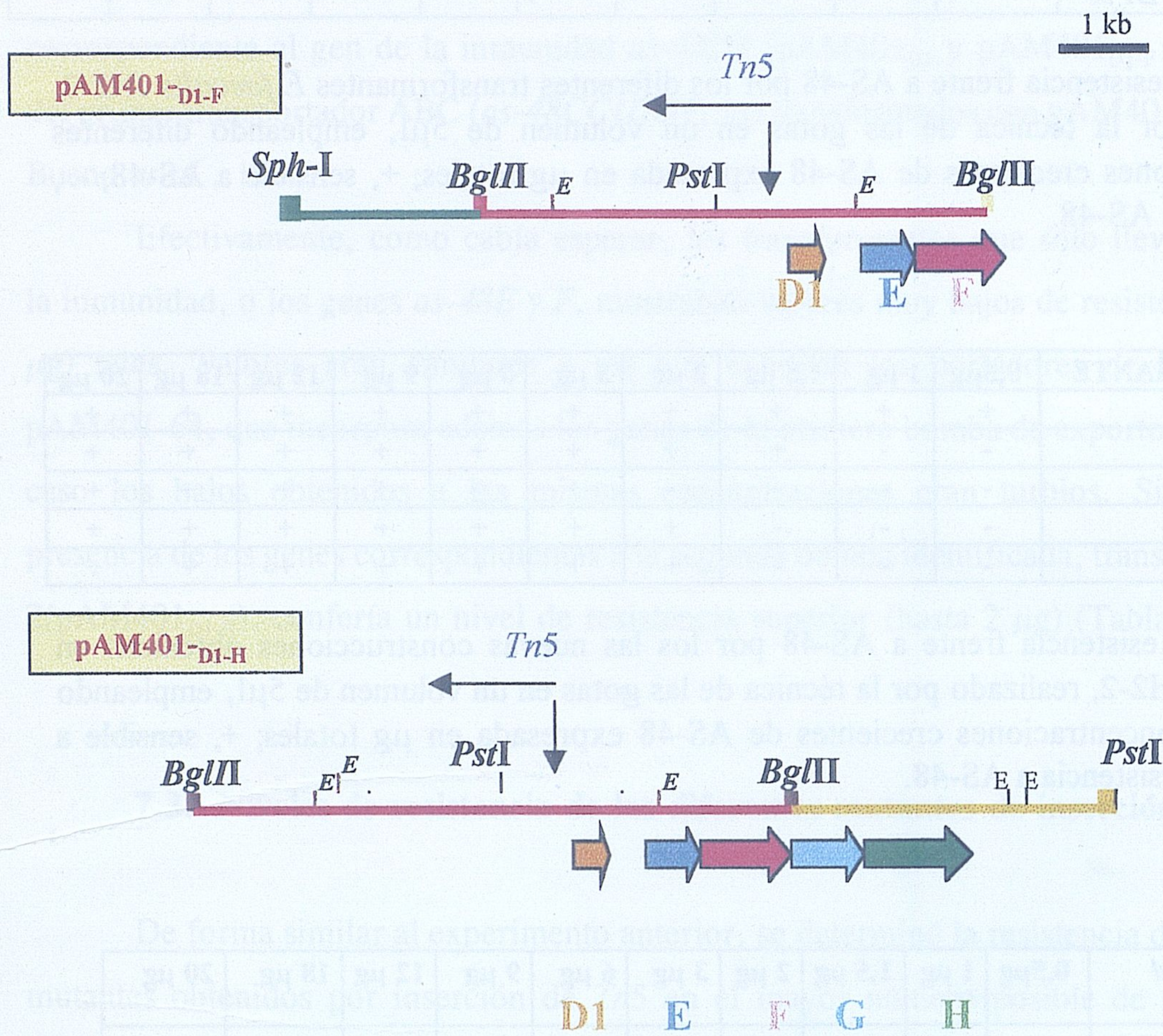


Figura 27.- Obtención de dos nuevas construcciones en los plásmidos pAM401-52 y pAM401-CB.

### 8.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE pAM401-81

Para investigar la estabilidad de pAM401-81 en *E. faecalis* JH2-2 se siguió la evolución de esta bacteria crecida durante aproximadamente 120 generaciones, en presencia y ausencia de la presión selectiva que determina la presencia de cloranfenicol en el medio de cultivo.

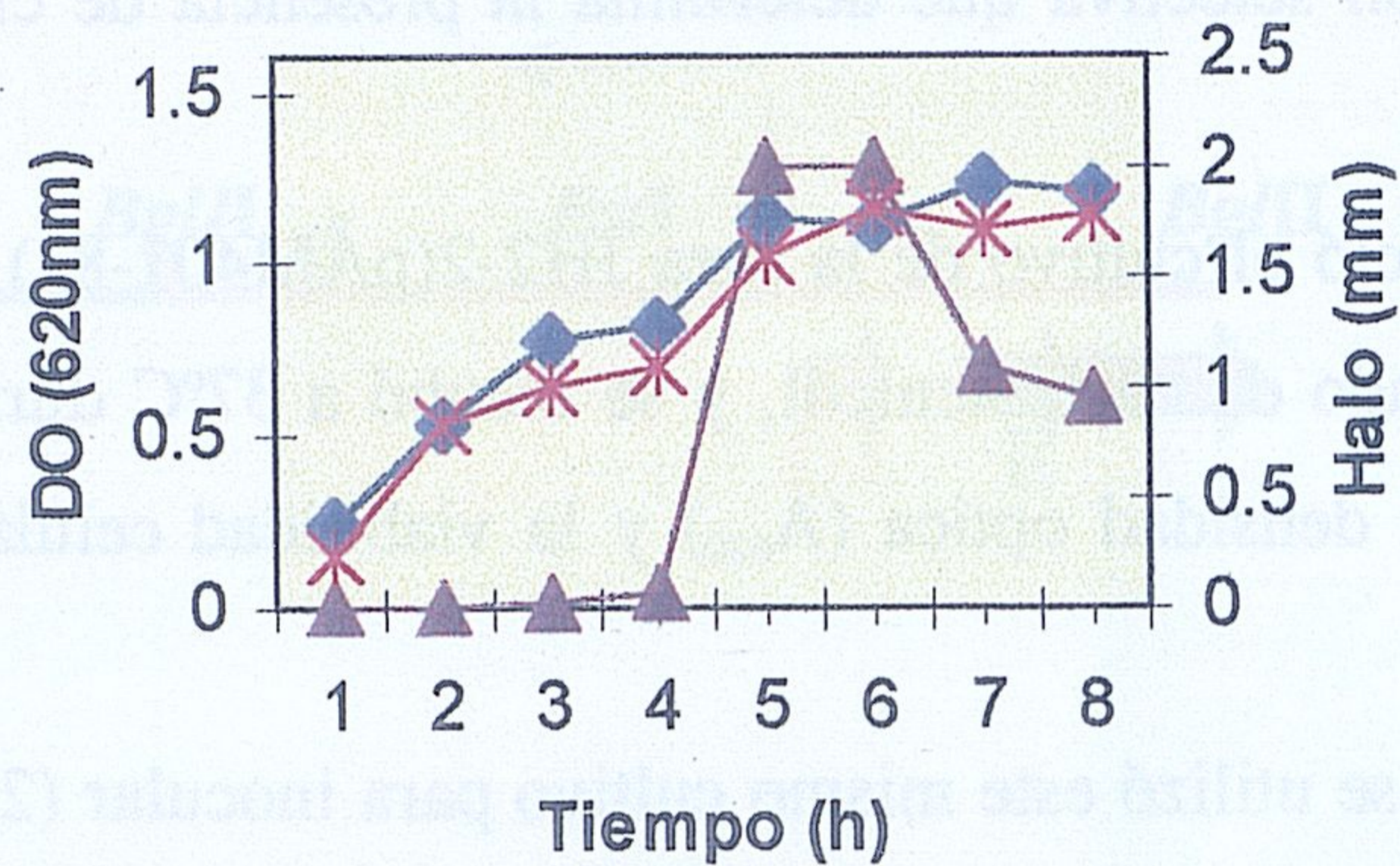
Para ello se inició el cultivo de la raza JH2-2(pAM401-81) a partir de una colonia, en medio BHI adicionado de cloranfenicol, y se incubó a 37°C durante toda la noche, para determinar entonces la densidad óptica ( $A_{620}$ ) y la viabilidad celular mediante recuento en placa (Figura 28).

A continuación se utilizó este mismo cultivo para inocular (2%) dos tubos con medio BHI fresco, uno de ellos adicionado de Cm. A partir de este momento, y considerando el tiempo de generación,  $g$ , de esta bacteria ( $g = 25-30$  min. Sargen, 1978), se sembraron (2%) en medio fresco nuevas series de tubos en idénticas condiciones cada 6-8 h, dejándolos crecer hasta completar aproximadamente 120 generaciones.

Una vez transcurrido el tiempo necesario se repitieron las mismas determinaciones (medida de la densidad óptica y recuento en placa) y aquellas placas con un número apropiado de colonias, fueron finalmente cubiertas con una sobrecapa de BHA tamponado inoculada con la estirpe indicadora *E. faecalis* S-47, para comparar los halos de inhibición producidos, en ausencia y presencia de presión selectiva.

Los resultados obtenidos, pusieron de manifiesto que no existían diferencias significativas entre los cultivos realizados en presencia o ausencia de antibiótico, por lo que se puede concluir que el plásmido pAM401-81 se mantiene y expresa de forma estable en la estirpe JH2-2 empleada como hospedadora.

## ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PLÁSMIDO pAM401-81



- ◆ Crecimiento de *E. faecalis* pAM401-81 en medio BHI-T con cloranfenicol Cm 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $3 \times 10^{-9}$  células/ml.
- \* Crecimiento de *E. faecalis* pAM401-81 en medio BHI-T sin Cloranfenicol  $2 \times 10^{-9}$  células/ml.
- ▲ Medida del halo de producción AS-48

**Figura 28.-** Estudio de la estabilidad del plásmido recombinante pAM401-81 en presencia y ausencia de presión selectiva por cloranfenicol.

## 9.- ANÁLISIS DE TRANSCRIPCIÓN

### 9.1.- Detección de ARN mensajeros

La expresión de la región genética *as-48* fue analizada mediante Northern blot usando ARN total extraído de células de la estirpe JH2-2(pAM401-81) así como de diferentes mutantes obtenidos en este trabajo. Para ello, aproximadamente 5 $\mu$ g de ARN total se separaron en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes y se transfirieron a membranas de nylon de acuerdo con la metodología expuesta en Material y Métodos. Las sondas utilizadas fueron fragmentos de las diferentes ORFs encontradas (genes *as-48ABCCIDDEFGH*) amplificados mediante PCR (Tabla 4 de Material y Métodos).

La expresión de la resistencia en algunos de los mutantes de inserción obtenidos con *Tn5*, ya apuntaba desde un principio que la región genética *as-48* estaba organizada en varios operones de expresión independiente. Esta hipótesis fue confirmada inicialmente por los estudios de transcripción del plásmido pAM401-52, que pusieron de manifiesto la existencia de dos ARNm policistrónicos: un transcrito T<sub>1</sub> (3,5 kb que cubría la transcripción de los genes *as-48ABC*) y un segundo transcrito T<sub>2</sub> (2,7 kb, abarcando la transcripción de al menos de los genes *as-48C1DD1*). Este segundo que era mucho menos patente que el primero, bien debido a los bajos niveles de expresión o a que presentase una vida media muy corta, lo que en definitiva podía ser el resultado de una gran inestabilidad de estos transformantes (Martínez-Bueno *et al*, 1998).

El análisis de transcripción de los transformantes portadores de pAM401-81, pAM401-CB y de diversos plásmidos mutados, realizado en esta Memoria, corroboró, en efecto, la existencia de los dos operones descritos, y probablemente de un tercero, tal vez inducible, que aumentaría los niveles de resistencia frente a AS-48.

Los ARN procedentes de transformantes con pAM401-81 y pAM401-CB (empleado como control negativo), hibridados con una sonda derivada de *as-48A* originaban dos señales, las correspondientes a un transcrito T<sub>1</sub> para los genes *as-48ABC*, con idénticas características

al descrito en la construcción pAM401-52 (Martínez-Bueno *et al.*, 1998), y a un segundo ARNm monocistrónico (0,33 kb) correspondiente al gen estructural *as-48A* ( $T_A$ ) que podía ser muy claramente visualizado cuando se realizaba la extracción del ARN con fenol caliente. La introducción de esta pequeña modificación metodológica eliminó el rastro de fondo debido a la degradación del ARN que, en los anteriores experimentos comentados, se solapaba y enmascaraba la existencia de esta pequeña banda (Figura 29)

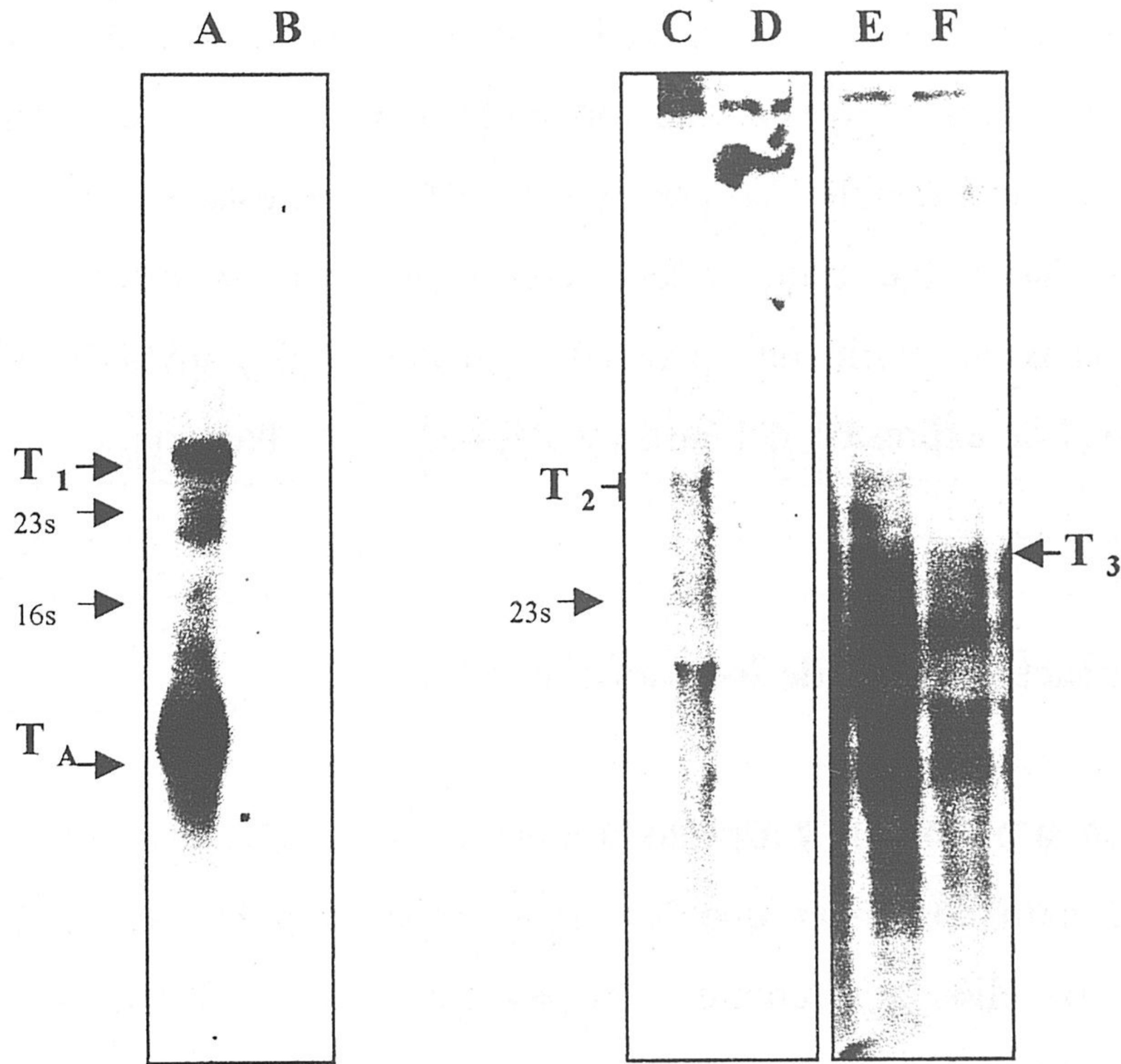
Cuando se emplearon como sondas fragmentos de genes situados aguas abajo de *as-48C* (sondas de *as-48C1* o *D*), se puso de manifiesto un segundo transcrito  $T_2$  con un tamaño muy superior al descrito inicialmente por Martínez-Bueno *et al.* (1998), próximo a las 6,4 kb y que representaba una nueva onda de transcripción con una longitud suficiente para traducir la información de los restantes genes.

Sin embargo, los resultados obtenidos con sondas derivadas de los genes *as-48F*, *G* o *H*, en JH2-2(pAM401-81) eran aún más complejos de explicar, pues producían al menos, dos bandas mayoritarias de transcripción, una que se correspondía con la banda  $T_2$ , de acuerdo con el tamaño establecido, cubriendo, por tanto, la transcripción desde *as-48C1* hasta el final (*as-48C1DD1EFGH*), y una nueva señal, curiosamente mucho más intensa, con un tamaño aproximado de 5,4 kb ( $T_3$ ), que no había sido detectada anteriormente en las hibridaciones con los genes *as-48C1* o *D*.

La identificación de esta señal con una nueva onda de transcripción ( $T_3$ ) se apoya en los resultados de los Northern obtenidos con el mutante pAM401- $D1-F$ , ya que, a) esta banda no puede ser identificada con un producto de degradación de  $T_2$ , puesto que se detecta en este mutante en el que no existe  $T_2$ , y b) la señal sólo aparece cuando se hibrida con sondas de los genes *as-48D1*, *E*, *F*, *G* y *H* (Figura 29), tanto en pAM401-81 como en pAM401- $D1-F$ .

Finalmente, en los Northern obtenidos en pAM401-81 empleando como sonda *as-48D1* se podía detectar una banda muy pequeña (entre 200-300 bases), que sorprendentemente, no se detectaba en el del mutante pAM401-CBPst (Figura 29). Este nueva señal se puede interpretar como un mensajero monocistrónico para el gen *as-48D1* ( $T_{D1}$ ) que podría ser inducida por genes ausentes en este plásmido.





**Figura 29.-** Análisis de transcripción. **A.** De ARN de pAM401-81 se originó el transcrito T<sub>1</sub>(*as-48ABC*) y T<sub>A</sub>, segundo ARNm monocistrónico(*as-48A*). **B.** pAM401-CB Control negativo *as-48A*. **C.** pAM401-81 con sondas derivadas de los genes *as-48F,G,H* se originó T<sub>2</sub>. **D.** Control pAM401-D1-H **E.** pAM401-81 con sondas derivadas de los genes *as-48D1,E,F,G,H* aparece un T<sub>3</sub>. **F.** pAM401-D1-H

## 10.- TRANSFERENCIA Y EXPRESIÓN DEL CARÁCTER AS-48 A CEPAS DE *Lactococcus lactis* LM2301

### 10.1.- Electrotransformación de *Lactococcus lactis* LM2301

La estirpe *L. lactis* LM2301 fue seleccionada por ser una raza libre de plásmidos, electrotransformable, sensible al cloranfenicol y a AS-48. Además, esta cepa es incapaz de hidrolizar la gelatina ya que muestra una actividad proteásica extracelular prácticamente nula.

El procedimiento de transformación empleado fué el de electroporación, en las condiciones previamente establecidas por Pereira (1996). De esta forma, la cepa LM2301 de *L. lactis* subsp. *lactis* fué transformada con éxito con las diferentes construcciones plasmídicas descritas anteriormente, pAM401, pAM401-CB y pAM401-81, con objeto de comprobar el nivel de expresión del carácter AS-48 en esta bacteria.

### 10.2.- Caracterización de los transformantes

Puesto que la morfología y aspecto colonial de los lactococos es muy similar a los de los enterococos, para confirmar que los transformantes obtenidos eran lactococos, se sometieron a todos ellos a diferentes pruebas bioquímicas (Tabla 10). Los resultados demostraron inequívocamente, que se trataba efectivamente de lactococos, eliminando así la posibilidad de la interferencia de contaminaciones.

Al objeto de verificar si los transformantes obtenidos presentaban los plásmido referidos, se realizaron experimentos de extracción plasmídica y electroforesis en geles de agarosa, empleándose como referencia a la estirpe *E. faecalis* JH2-2, transformada con los mismos plásmidos.

| <b>Cepas</b> | <b>Prueba de Catalasa</b> | <b>Prueba de Bilis esculina</b> | <b>Crecimiento a 45°C</b> | <b>NaCl 6.5%</b> |
|--------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|------------------|
| LM 2301      | -                         | +                               | -                         | -                |
| LM 401       | -                         | +                               | -                         | -                |
| LM 401-52    | -                         | +                               | -                         | -                |
| LM 401-81    | -                         | +                               | -                         | -                |
| E.401-81     | -                         | +                               | +                         | +                |
| E.401-52     | -                         | +                               | +                         | +                |

**Tabla 10.-** Pruebas bioquímicas realizadas para la diferenciación entre cepas de *Lactococcus lactis* y *Enterococcus faecalis*.(-) : Negativo (+) Positivo

En todos los casos los ADNs procedentes de los diferentes transformantes de *L. lactis* LM2301 mostraron el mismo perfil electroforético que los derivados de *E. faecalis* JH2-2, utilizados como control (resultados no mostrados).

Para confirmar la existencia de los insertos de ADN presentes en los plásmidos pAM401-CB y pAM401-81 en los diferentes transformantes de *L. lactis* LM2301 se recurrió a la técnica de amplificación del ADN mediante PCR en las condiciones expuestas en Material y Métodos.

### **10.3.- Producción de AS-48 por los diferentes transformantes de *L. lactis* LM2301**

La producción de AS-48 en medio sólido por las cepas de LM2301 transformadas con pAM401-81, se valoró siguiendo la técnica de la doble capa, utilizando *E. faecalis* JH2-2 pAM401 como indicadora, sin detectarse, en ningún caso, la presencia de halos de inhibición frente a dicha estirpe. Para verificar si los resultados negativos se debían a las condiciones culturales, se repitieron los ensayos modificando el medio utilizado (BHI<sub>cm</sub>, BHI<sub>cm</sub>-GM17 con glucosa 0,5% y medio complejo) y la temperatura de incubación (28 °C o 37 °C), sin que tampoco se obtuvieran resultados positivos.

Finalmente, se intentó detectar la presencia de AS-48 en sobrenadantes concentrados, procedentes de cultivos en fase exponencial tardía (6 h) en medio GM17. Los concentrados fueron obtenidos por evaporación a vacío hasta sequedad, en una centrífuga Vacum Speed, de 1 ml de sobrenadante que fue resuspendido finalmente en 100 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura.

En estos sobrenadantes 10 veces concentrados fué valorada la existencia de AS-48 mediante ensayo de inhibición de la estirpe LM2301 pAM401 empleando la técnica de los pocillos.

Los resultados obtenidos con los transformantes LM2301(pAM401-81) fueron alentadores, pues a partir de la quinta hora de crecimiento ya se detectaba un nítido halo de inhibición de 8 mm de diámetro, que aumentaba hasta valores de inhibición de 11 mm a las 7 horas de crecimiento.

#### **10.3.1.- Detección e identificación de AS-48 mediante técnicas inmunológicas**

Para confirmar que la inhibición detectada era debida a la producción de AS-48, se

realizó el revelado inmunológico de colonias de LM2301(pAM402-81) y LM2301(pAM401-52) crecidas durante 24 horas en GM17 sobre membranas de nitrocelulosa (Dot Blot).

Para ello se empleó como anticuerpo primario un suero anti-AS-48 y se reveló con un suero específico marcado con peroxidasa. Sin embargo, y a pesar de la sensibilidad del método, en ningún caso fué posible la detección de marcas específicas en las membranas en este revelado inmunológico.

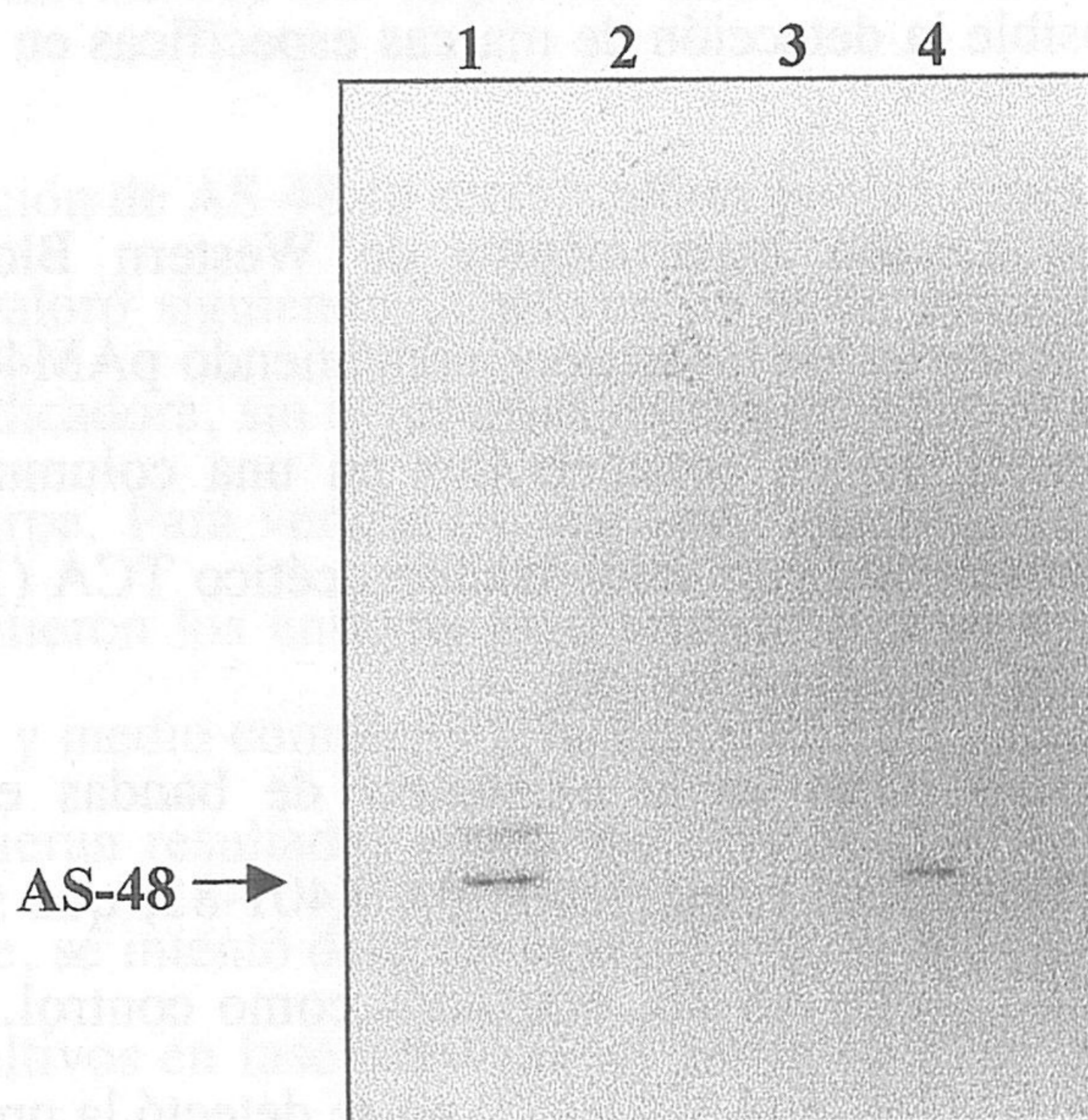
Finalmente, se llevaron a cabo experimentos de Western Blotting, empleando sobrenadantes de 7 h, de transformantes de lactococos conteniendo pAM401-52 y pAM401-81. Previamente estos sobrenadantes fueron concentrados en una columna de intercambio catiónico (CM-25) y el eluido precipitado con ácido tricloroacético TCA (10%) y finalmente sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida.

En la Figura 30 se puede observar la existencia de bandas específicas en los sobrenadantes procedentes de lactococos conteniendo pAM401-81, que se correspondían con las de una preparación purificada de AS-48, empleada como control. Sin embargo, en los sobrenadantes procedentes de LM2301(pAM401-52) no se detectó la presencia de AS-48.

### 10.3.2.- Detección e identificación de AS-48 mediante HPLC.

La producción de AS-48 también fué determinada mediante técnicas apropiadas de purificación en columnas de intercambio iónico y fase reversa (HPLC), comparando el perfil de elución obtenido con los sobrenadantes de la raza LM2301(pAM401-81) con el de una muestra purificada a homogeneidad de AS-48 (Figura 31).

**DETECCIÓN DE AS-48 POR *L. lactis* pAM401-81  
MEDIANTE INMUNOTRANSFERENCIA**



**Figura 30.-** Detección de la producción de AS-48 por *L.lactis* mediante inmunotransferencia de sobrenadantes de cultivo, purificados por columna Cm-25 y precipitados con TCA 10%.

1. AS-48 5 µg; 2. *L.lactis* pAM401 3. *L.lactis* pAM401-52
4. *L. lactis* pAM401-81

PRODUCCIÓN DE AS-48 POR *Lactococcus lactis* pAM401-81

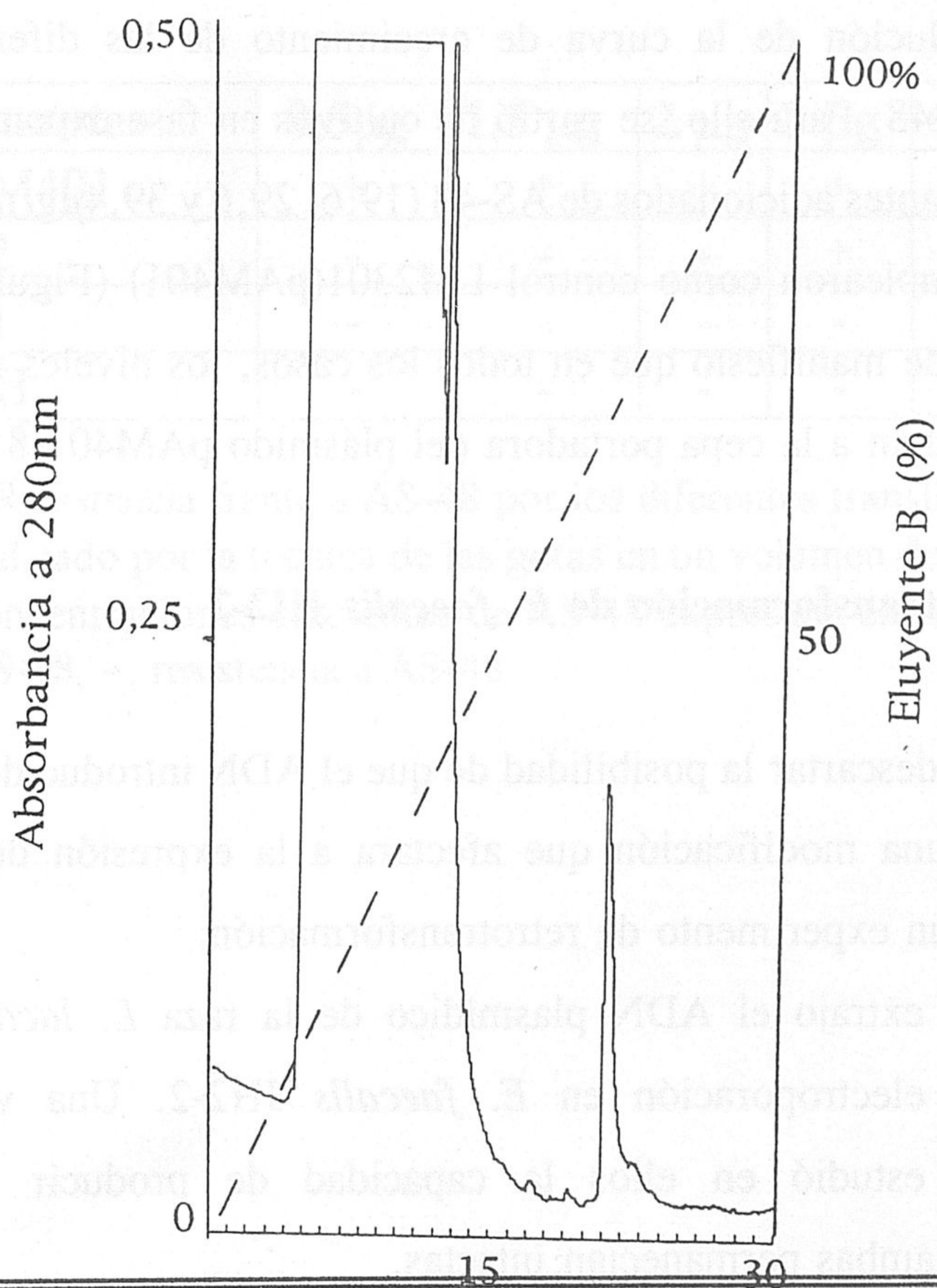


Figura 31.- Cromatografía de alta resolución (HPLC) en fase reversa de un sobrenadante de cultivo de *Lactococcus lactis*-81 parcialmente purificado mediante intercambio iónico.

#### 10.4.- Niveles de resistencia de los diferentes transformantes frente a AS-48

Para conocer el nivel de expresión en lactococos de los determinantes genéticos responsables de la resistencia frente a AS-48, se investigó también dicho carácter en los diferentes transformantes obtenidos con pAM401-CB y pAM401-81, frente a concentraciones crecientes de AS-48.

Los ensayos de resistencia se hicieron en medio sólido GM17 empleando la técnica de las gotas (5  $\mu$ l) con concentraciones crecientes de AS-48 (0,5, 1,5, 2, 3, 6 y 9  $\mu$ g) (Tabla 11 ).

Para cuantificar la resistencia se realizó además un ensayo en medio líquido, en donde observamos la evolución de la curva de crecimiento de las diferentes estirpes tras el tratamiento con AS-48. Para ello, se partió de cultivos en fase exponencial temprana de los diferentes transformantes adicionados de AS-48 (19,6, 29,6 y 39,4  $\mu$ g/ml concentración final). Paralelamente se emplearon como control LM2301(pAM401) (Figura 32). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que en todos los casos, los niveles mayores de resistencia a AS-48, correspondían a la cepa portadora del plásmido pAM401-81.

#### 10. 5.-Retrotransformación de *E. faecalis* JH2-2

Al objeto de descartar la posibilidad de que el ADN introducido en *L. lactis* LM2301 hubiese sufrido alguna modificación que afectara a la expresión del carácter AS-48, se procedió a realizar un experimento de retrotransformación.

Para ello se extrajo el ADN plasmídico de la raza *L. lactis* (pAM401-81) y se introdujo mediante electroporación en *E. faecalis* JH2-2. Una vez seleccionados los transformantes, se estudió en ellos la capacidad de producir y resistir a AS-48, comprobándose que ambas permanecían intactas.



| Transformantes | 0,5 $\mu$ g | 1,5 $\mu$ g | 2 $\mu$ g | 3 $\mu$ g | 6 $\mu$ g | 9 $\mu$ g |
|----------------|-------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Control LM401  | +           | +           | +         | +         | +         | +         |
| LM401-52       | -           | -           | -         | +         | +         | +         |
| LM401-81       | -           | -           | -         | -         | -         | +         |
| LM401-CB       | -           | -           | -         | -         | +         | +         |

**Tabla 11.-** Resistencia frente a AS-48 por los diferentes transformantes *L. lactis* LM2301, realizado por la técnica de las gotas en un volumen de 5 $\mu$ l, empleando diferentes concentraciones crecientes de AS-48 expresada en  $\mu$ g totales; +, sensible a AS-48, - , resistencia a AS-48

## ENSAYO DE RESISTENCIA *Lactococcus lactis* LM2301

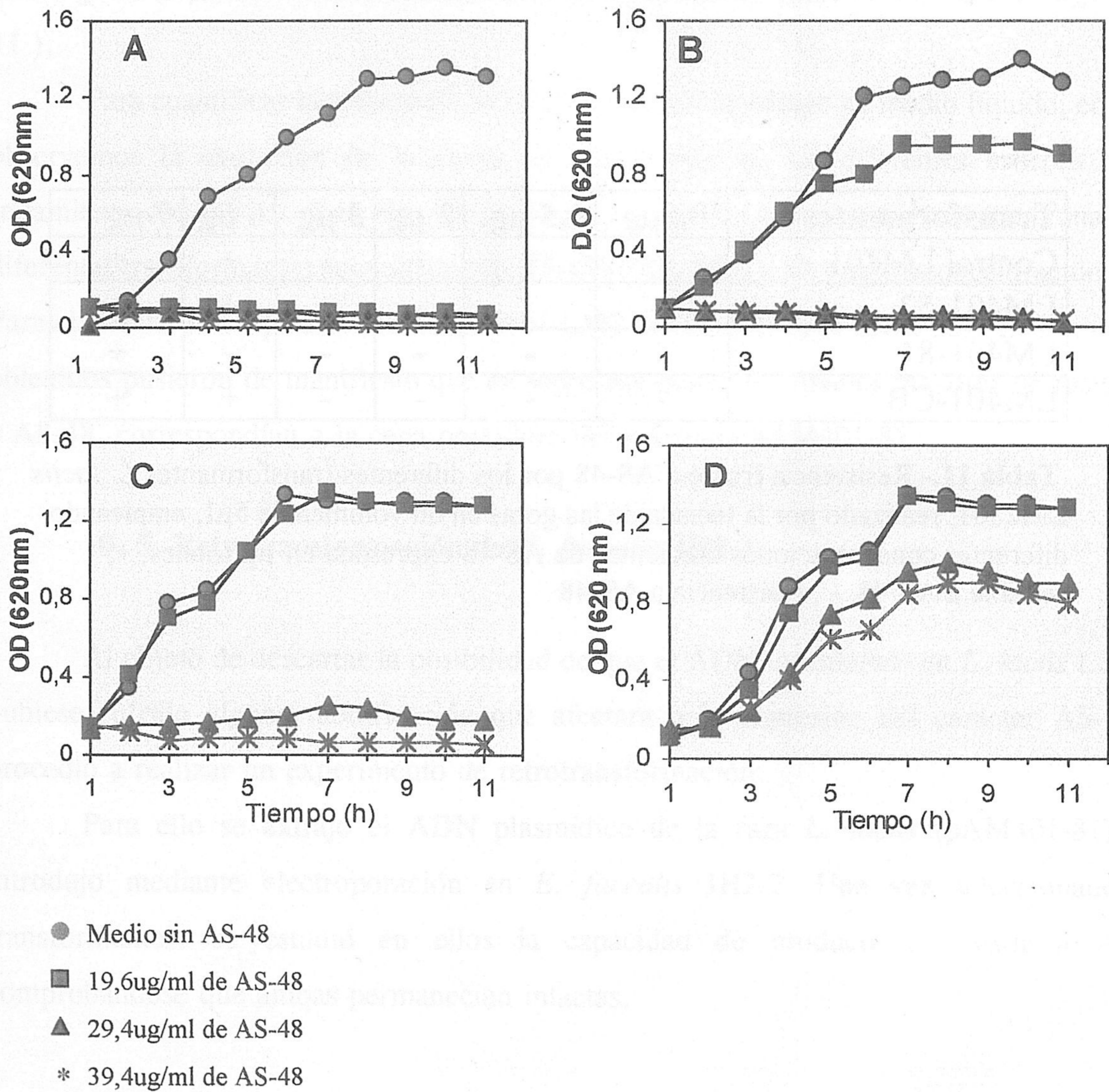


Figura 32.- Ensayo de resistencia para *Lactococcus lactis* pAM401-81. A.LM-401, B.LM-52 , C.LM-CB, D. LM-81.

*DISCUSIÓN*



### DISCUSIÓN

La producción de bacteriocinas es siempre un proceso complejo que requiere la intervención de numerosos genes, ya que, además del responsable de la estructura primaria de la molécula, se necesita un sistema de exporte al medio extracelular y la expresión de la inmunidad. Existen además varias bacteriocinas que experimentan modificaciones postraduccionales, como es el caso de los lantibióticos, en cuya maduración tiene lugar la deshidratación de ciertos residuos aminoacídicos y la formación de puentes disulfuro que estabilizan enormemente la molécula (Hansen, J.N., 1993). Tal es el caso de AS-48, si bien la situación es ciertamente inédita ya que la maduración del pre-peptido implica la formación de un enlace peptídico entre sus extremos amino y carboxilo para originar una molécula cíclica con actividad antibacteriana. Por ello la localización, secuenciación y caracterización completa de la region genética *as-48*, ha resultado una larga y laboriosa tarea, que ha dado como fruto la localización de nueve genes, además del gen estructural de AS-48, que se encuentran en la región de ADN que se extiende 2,8 kb aguas abajo del mismo.

Cuando se inició la investigación sobre los aspectos genéticos de AS-48, la hipótesis de partida fué que todos los genes *as-48*, responsables del carácter AS-48 (entendiendo por ello producción e inmunidad, AS-48<sup>+</sup> Imm<sup>+</sup>) debían de estar situados en una zona de ADN próxima al gen estructural. Este había sido localizado, secuenciado y analizado en un fragmento *SphI-BglIII* de 1,2 kb (fragmento D) del plásmido pMB2 de *Enterococcus faecalis* S-48 (Martínez Bueno, 1991; Martínez Bueno *et al*, 1994) (Fig 2 ). Por ello, en un trabajo previo se había construido el plásmido recombinante pAM401-52, subclonando en el vector bifuncional *E. coli/E. faecalis* pAM401, 7,8 kb del plásmido pMB2, mediante fusión de los fragmentos D y C, siendo este segundo el producto de la digestión de pMB2 con *BglIII* que abarca las 6,6 kb situadas aguas abajo de gen estructural.

Los clones de *E. faecalis* JH2-2(pAM401-52) presentaban un fenotipo productor (AS-48<sup>+</sup>) y además eran resistente (Imm<sup>+</sup>) aunque a bajas concentraciones de AS-48 (Martínez Bueno *et al*, 1998). Este comportamiento sugería que en esta región se encontraban genes implicados en la expresión de AS-48. Sin embargo el análisis comparativo de producción y resistencia con la estirpe salvaje o con su derivado *E. faecalis* A-48-32, portadoras ambas

del plásmido pMB2, puso enseguida de manifiesto que la expresión del carácter AS-48 en JH2-2(pAM401-52) era incompleta (Tabla 6a) en ambos aspectos.

Simultáneamente, pudimos comprobar, no sin cierta preocupación, que los transformantes que albergaban la construcción pAM401-52 eran bastante inestables, lo que se traducía en una visible disminución de la capacidad productora y de resistencia tras los sucesivos subcultivos realizados en el laboratorio.

Por este doble motivo, se planteó el Plan de Trabajo desarrollado en esta Memoria al objeto de completar la información sobre la región *as-48*, investigando en ambas direcciones para identificar y caracterizar posibles ORFs existentes aguas arriba del gen estructural y aguas abajo de la ORF 7, última ORF previamente secuenciada.

Para ello fue necesario diseñar una compleja estrategia de clonación que permitiera fusionar en la misma construcción, los fragmentos B y C producidos por digestión con el enzima de restricción *Bgl*III con el fragmento D *Sph*I-*Bgl*III, en donde se había localizado el gen estructural.

Alternativamente y con objeto de estudiar la influencia del gen estructural en la expresión de los restantes genes se llevaron a cabo construcciones alternativas como pAM401-CB (22,4 kb), pAM401-*CPPst*I expuestas en el apartado 1.2 de Resultados

Una vez conseguidas las fusiones deseadas y transformados con ellas los enterococos se pudo comprobar que la construcción pAM401-81, confería un nivel de expresión del carácter AS-48 similar al de la estirpes salvajes, con niveles de producción del orden de 16 mm de halo de inhibición y de resistencia (hasta 18 $\mu$ g), lo que se traducía en valores 3 veces superiores al de los mutantes que albergaban la construcción pAM401-52 ( $\mu$ g) (Tabla 7 ).

La secuenciación y análisis de 2,8 kb del fragmento B de pAM401-81 pusieron de manifiesto la existencia de dos nuevos marcos de lectura abierta (ORFs 8 y 9), que, siguiendo la terminología anterior, fueron denominadas *as-48G* y *as-48H*.

Igualmente, para cubrir todas las posibilidades, se analizó la región situada aguas arriba del gen estructural *as-48A*, donde presumiblemente se podrían encontrar genes reguladores, de forma similar a lo descrito para otros sistemas genéticos (Dunny *et al.*, 1978). Esto se realizó en la construcción pAM401-52 y en la pAM401-81 que presentaban un fragmento de 1,3 kb situado en el extremo 3' del gen estructural *as-48A*, delimitado por un sitio de corte del enzima *Sph*I, y cuya secuencia no había sido aún investigada.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la existencia de tres probables ORF,

de pequeño tamaño, cuya función resulta difícil de interpretar a la luz de los escasos resultados complementarios obtenidos (análisis de homología con proteínas de las Bases de Datos y carencia de mutantes en estas zonas) (Figs 13). Sin embargo la existencia de secuencias repetidas así como repeticiones invertidas encontradas en regiones próximas al gen estructural, que han sido descritas como regiones implicada en el control transcripcional, pueden ser de gran utilidad para justificar la función de genes reguladores de la expresión del gen estructural.

El siguiente paso fué analizar la función de los productos de las nuevas ORFs identificadas (8 y 9), así como la de las ORFs 6 y 7, descritas anteriormente por Martínez-Bueno *et al* (1998) pero cuya caracterización hasta ahora no había sido realizada.

La vía más rápida para la asignación de funciones es la búsqueda de homologías estructurales con proteínas de función bien establecida, depositadas en las Bases de Datos. Sin embargo, de las nuevas proteínas producto de las diferentes ORFs descritas, sólo As-48G presentaba homología significativa con proteínas depositadas en las Bases de datos PIR o Swiss Prot. Concretamente con proteínas pertenecientes a la superfamilia de transportadores ABC (ATP-Binding-Casette), que utilizan la hidrólisis del ATP como fuente de energía para la secreción. Curiosamente, los mayores porcentajes de homología se dan con proteínas implicadas en el transporte de péptidos e iones en bacterias Gram-positivas, aunque también tiene homología, aunque con valores inferiores, con proteínas relacionadas con la secreción y resistencia de bacteriocinas tales como la nisina, subtilina, y microcina B17 entre otras.

En todos los casos descritos, los transportadores ABC se caracterizan por contener una región de aproximadamente 200 aminoácidos, en la que se incluyen 2 motivos muy conservados, capaces de hidrolizar ATP: los motivos Walker A y B [que se corresponden con las secuencias G-X-G-K-S(T)-T y L-L-D-E-P] y adicionalmente un lazo de serina. Se ha propuesto que la lisina conservada en el sitio A y el aspartato que ocupa el residuo final de la lámina beta característica del sitio B, se encuentran muy próximas gracias al plegamiento de la proteína y son responsables de la interacción con la molécula de ATP (Higgins *et al.*, 1986; Fath and Kolter., 1993)

Ciertamente la proteína As-48G (227 residuos) puede actuar como un sistema ABC ya que presenta una secuencia muy conservada situada entre los residuos 45 que incluye el

la secuencia consenso GXGKST del dominio A, mientras que el sitio B se localiza entre los residuos 161

Los exportadores ABC se caracterizan, además, por presentar un segundo dominio, que puede estar en la misma proteína (exportadores del grupo A) o alternativamente en un polipéptido separado (grupo B), y que incluye una región de expansión en membrana (MSD, membrane spanning domain) en la que, teóricamente deben existir sitios de reconocimiento específico para el sustrato que van a transportar. Concretamente las proteínas formadoras de canales de los sistemas de transporte ABC se caracterizan por presentar seis dominios de transmembrana (Saier, 1994). A estas características se ajusta parcialmente la proteína AS-48H, con un perfil fuertemente hidrofóbico y una estructura predicha con 4 alfa-hélices del tamaño adecuado para atravesar la membrana, que precisamente a ese nivel muestran homología con proteínas integrales de membrana asociadas a procesos de transporte. Además, y al igual que ocurre en los restantes sistemas genéticos analizados, los dos genes responsables de cada una de las bombas de exporte se encuentran situados de forma contigua en el mismo operón.

En base a estos datos proponemos la existencia de un nuevo sistema de transporte ABC en la región *as-48*, conformado por los productos de los genes *as-48GH*, más conservado si cabe que el descrito por Martínez Bueno *et al* (1998), codificado por los genes *as-48CID*. Este nuevo exportador participa de forma evidente en la resistencia frente a AS-48 y tal vez favorezca directa o indirectamente la producción del inhibidor, de acuerdo con el comportamiento de los transformantes con el plásmido pAM401-81.

En otros sistemas genéticos relacionados, como son los responsables de la producción de algunos antibióticos (nisina, subtilina o epidermina) (Siegen *et al.*, 1996) se han descrito también sendos sistemas de transporte, habiéndosele atribuido un papel en la secreción y/o protección frente a sus propios inhibidores (Saris *et al.*, 1996). Este tipo de mecanismo de resistencia puede ser de especial relevancia cuando como, al parecer es el caso de AS-48 y de la mayoría de los antibióticos que forman poros en la membrana citoplasmática (Gálvez *et al.*, 1991) no se requieren receptores específicos para ejercer su acción,

La existencia de dos sistemas de secreción/resistencia en muchos de los péptidos catiónicos estudiados, incluso de diferente origen y naturaleza, apoya la sugerente idea de que se trata de mecanismos de resistencia muy conservados en el curso de la evolución, que deben cumplir una importante función en estos sistemas. Su acción probablemente se ejerce,



como se deduce de lo expuesto mas abajo, interaccionando cooperativamente con la proteína responsable de la inmunidad, que al igual que para AS-48, también ha sido identificada en la mayoría de los sistemas bacteriocinogénicos investigados.

En nuestro caso, el papel de la proteína de la inmunidad frente a AS-48 fué asignada por Martínez Bueno *et al.* (1998) al producto del gen *as-48DI*. Este resultado pudo deducirse de forma concluyente por la pérdida de resistencia mostrada por mutantes de delección que habían perdido la región genética correspondiente a este gen. El dato fué confirmado posteriormente mediante la construcción amplificada por PCR del gen *as-48DI* (pAM401-D1) que confería un fenotipo de resistencia frente a AS-48 y además indirectamente apoyaba la existencia de un ARNm monocistrónico ( $T_{DI}$ ) que después discutiremos.

Los resultados obtenidos con la nueva construcción generada en este trabajo, pAM401-<sub>DI-H</sub>, que alberga la región genética correspondiente a *as-48DIEFGH*, confirmaron igualmente la necesidad de que el gen de la inmunidad (*DI*) esté presente para la expresión de la misma.

As-48D1 carece de homología con otras proteínas de inmunidad y las predicciones sobre su estructura sugieren que pueda tratarse de una proteína anclada en la membrana. Si bien es cierto que la existencia de As-48D1 resulta imprescindible para conferir inmunidad a las células productoras se necesita la presencia adicional de, al menos una de las bombas de exporte (As-48CD o As-48GH) para presentar niveles superiores de resistencia (hasta 6  $\mu$ g), valores que son más llamativos cuando está presente la segunda bomba As-48GH.

Para asignar funciones a los productos de los restantes genes identificados, fue necesario realizar experimentos de mutagénesis transposicional tanto en pAM401-52 como en pAM401-CB o en pAM401-81, al objeto de disponer de mutantes que tuvieran interrumpidas las diferentes ORFs que nos permitieran analizar sus consecuencias en la expresión del carácter AS-48.

De esta forma comprobamos que la interrupción de los genes *as48C1* y/o *as48D* tanto en pAM401-52 como en pAM401-81, determinaba la pérdida de la capacidad productora de AS-48 y una clara disminución de la resistencia. Estos resultados sólo pueden ser interpretados asignando una implicación de los productos de estos genes en la secreción de

la molécula activa. De acuerdo con ello, el par AS-48C<sub>1</sub>D podría estar implicado en el transporte y secreción específicos de moléculas precursoras de AS-48 actuando como una bomba que exportara pre-AS-48 al medio extracelular, de forma similar a como lo harían las de la mayoría de las bacteriocinas, i.e. la citolisina (CylB) (Gilmore *et al.*, 1990) la nisina (NisB), la epidermina (EpiB), la pediocina PA-1 (Ped D) (Marugg *et al.*, (1992) o la subtilina (SpaB) (Klein, C *et al.*, 1994).

Sea cual fuere su función exacta, está claro que los dos transportadores ABC descritos son funcionales y eficaces en la secreción de AS-48, aunque es obligado reconocer que el primer sistema de exporte AS-48C<sub>1</sub>D, cumple una función primordial e imprescindible ya que su inactivación determina un fenotipo no productor, mientras la inactivación del segundo sistema de exporte sólo determina un fenotipo hipoprodutor. Además se ha podido comprobar que la inactivación de *as-48D* no puede, en ningún caso, ser suplida por la presencia del segundo sistema de exporte, obteniéndose siempre un fenotipo no productor. Por el contrario, los mutantes de inserción que afectan a *as-48G* (Fig 22) en pAM401-81, siguen siendo productores, aunque los niveles de AS-48 son claramente inferiores (fenotipo hipo-productor).

En relación a la resistencia frente a AS-48 administrado de manera exógena, los resultados obtenidos en esta Memoria ponen de manifiesto la necesidad de la proteína de la inmunidad (As-48D<sub>1</sub>) complementada con la presencia de uno de los dos sistemas de exporte, para conferir niveles intermedios de inmunidad. Sin embargo, es interesante recalcar la función primordial de la segunda bomba (As-48GH) en la resistencia, de acuerdo con las siguientes observaciones:

- La presencia simultánea de los genes *as-48C<sub>1</sub>D* y *as-48D<sub>1</sub>* no incrementa los niveles de resistencia respecto de la situación en que se encuentra el gen de la inmunidad sólo o éste y los genes *as-48EF*.

- Sin embargo, cuando están presentes los genes *as-48D<sub>1</sub>* y los restantes genes existentes aguas abajo (*as-48EFGH*) los niveles de resistencia son superiores a los del caso anterior. Estos resultados sugieren que la función de esta segunda bomba estaría más en relación con la protección de la célula frente a las moléculas de AS-48 que han secretado al medio las demás células productoras.

- Por último, la expresión de niveles máximos de resistencia (hasta 18 ug, similares al de la estirpe original) requiere la existencia de la región genética completa (pAM401-81),

donde se encuentran el gen de la inmunidad (*as-48D1*), los de ambos sistemas de exporte ABC (*as-48C1D* y *as-48GH*) y todos los mecanismos de regulación existentes.

De acuerdo con ello, la característica fenotípica más sobresaliente de los mutantes de inserción en *as-48B*, *C*, *C1*, *D* o *G* es en general, la disminución drástica en la resistencia que muestran (de 18 hasta 6  $\mu\text{g}$ ), lo que confirma la idea, anteriormente expuesta, de que es necesario la expresión coordinada de todos los genes para expresar un fenotipo inmune.

A pesar del esfuerzo que se está realizando para dilucidar el mecanismo de autoprotección desarrollado por las células productoras de péptidos catiónicos formadores de poros, como son AS-48 y numerosos lantibióticos, se está todavía lejos de comprender la función detallada de este complejo multiproteico en la inmunidad.

Sin embargo, pensamos que la inmunidad frente a AS-48 debe ser entendida como el resultado tanto de su translocación activa a través de la membrana (vía bombas *As-48C1D* y *As-48GH*) como de la inhibición de la inserción del péptido en la membrana, para formar poros, por parte de la proteína de la inmunidad (*As-48D1*), y de la neutralización de aquellas moléculas adicionadas desde el exterior, por un mecanismo aún no aclarado y para el cual proponemos las siguientes hipótesis alternativas:

- i) Desestabilización de las moléculas de AS-48 asociadas a la cara externa de la membrana (via bomba *As-48GH*)
- ii) Importe y ulterior degradación de AS-48 dentro de la célula, como se ha referido para la nisina (Kok, J., *et al* 1993) o la subtilina (Klein and Entian, 1994), proceso en el que se ha implicado a la segunda bomba.
- iii) Una tercera posibilidad, que también implicaría a la segunda bomba (*As-48GH*) es que ésta fuese responsable de la translocación del producto del gen *as-48F*, una proteína hidrofílica ácida, que presenta homología estructural con proteínas de superficie de estreptococos, como la proteína M. La proteína *As-48F*, que posee un característico sitio de anclaje en la membrana citoplasmática, podría actuar de receptor superficial, y al interaccionar con las moléculas de AS-48 impedir su acceso a la membrana.

En relación con la función de *as-48C*, hemos encontrado que en todos los transformantes analizados (pAM401-52 y pAM401-81), la interrupción de este gen origina

un fenotipo claramente hipo-productor, lo que nos ha llevado a atribuirle una función accesoria en la secreción o bien un papel regulador, plasmado en la activación de otro(s) gen(es), hipótesis que discutiremos más adelante al analizar los resultados de la transcripción.

Queda entonces por determinar la proteína implicada en la ciclación de AS-48. Los resultados apuntan hacia AS-48B, una proteína de 563 aa, fuertemente hidrófoba (pI 10.48) y de acuerdo con las predicciones de estructura presentadas en esta Memoria, una proteína característica de membrana con 11 dominios de expansión en la misma. La inactivación del gen *as-48B*, en todas las construcciones ensayadas (pAM401-52 y pAM402-81), inequívocamente impide la producción de AS-48, confirmando una función imprescindible para AS-48B, como podría ser el procesamiento que conduce a la maduración de AS-48, que es probable que se produzca de forma concomitante con el sistema de exporte de las moléculas pre-AS-48.

La búsqueda de homologías de As-48B en las Bases de Datos disponibles, ha sido en todo caso infructuosa, encontrándose sólo cierto grado de similitud en las regiones hidrofóbicas que la caracterizan como proteína de membrana. Este resultado, en principio desalentador, nos reafirma en la propuesta de As-48B como ciclasa, cuya actividad biocatalítica es única y por ello hasta ahora nunca descrita en la bibliografía, al tratarse de un nuevo tipo de maduración de una molécula: la formación de un péptido cíclico mediante la formación de un enlace peptídico no ribosómico.

Anteriormente, habíamos contemplado la posibilidad de que la actividad ciclasa no residiera en la región genética *as-48*, sino que fuera un determinante cromosómico, i.e. alguna PBP (proteínas de unión a la penicilina) que llevan a cabo reacciones de transpeptidación, ciertamente bastante específicas, durante el crecimiento de la pared celular. Sin embargo, el hecho de que la región genética clonada el pAM401-81 fuera capaz de expresarse en *L. lactis*, aunque lógicamente con menor eficacia que en *Enterococcus*, debido posiblemente al tipo del vector empleado, nos llevó a pensar que en la región *as-48* residen todas las actividades necesarias para la expresión de AS-48: síntesis, exporte e inmunidad, así como maduración, además de los genes reguladores que pudieran existir.

La presencia de un péptido señal característico de los sistemas *sec*-dependientes (via general de secreción), ausente en las bacteriocinas que utilizan la via de secreción ABC, nos obliga a buscar un nuevo candidato en donde resida la actividad de peptidasa-senal. De nuevo, la falta de homología de los productos génicos de *as-48* con peptidasas características,

permite sugerir que dicha actividad catalítica pudiera ser compartida por As-48B a la que se le ha asignado actividad ciclasa. De esta forma, As-48B sería la encargada de la eliminación del péptido señal seguida de la posterior ciclación de la molécula, todo ello sería posible, aprovechando la energía producida durante la rotura del enlace peptídico para la formación de uno nuevo, de forma similar a como lo hacen las PBP de la pared celular. De esta forma quedaría resuelto el problema energético, en el caso de que el dominio catalítico del enzima se encontrara localizado en la cara externa de la membrana.

Finalmente, quedan por comentar los resultados del análisis de transcripción realizado en pAM401-81 que permiten, por otra parte, explicar la inestabilidad de la construcción pAM401-52, que alberga parte de la región *as-48*. En el trabajo de Martínez-Bueno *et al.* (1998) se describe la existencia de dos ARN mensajeros policistrónicos que permitieron estructurar la región genética en dos operones de expresión constitutiva (transcrito T<sub>1</sub>: abarcando los genes *as-48ABC* y T<sub>2</sub> que cubriría la transcripción de los genes *as-48C1DD1*).

Un nuevo e interesante resultado obtenido en pAM401-81 fué demostrar la existencia de un extenso transcrito que no se correspondía, en tamaño, con ninguno de los ARNm encontrados en pAM401-52. Los estudios de hibridación con sondas específicas, deducidas de los diferentes genes, descubrió que este nuevo mensajero abarcaba la transcripción de los genes *as-48C1DD1EFGH* y probablemente se trataba del transcrito T<sub>2</sub> antes mencionado, que en pAM401-52 resultaba truncado, por la ausencia de los dos últimos genes *as-48GH*. Esta situación, permitiría, además, explicar la inestabilidad mostrada por estos mutantes y a su vez reforzaría nuestra hipótesis sobre la importancia de los primeros genes, *as-48C1DD1*, que, con un nivel de expresión mayor o menor, resultaban funcionales.

Además, los últimos análisis de transcripción realizados en pAM401-81 han demostrado la existencia de un nuevo transcrito T<sub>3</sub> (5.4 kd) que iniciaría la transcripción en un promotor no identificado, situado aguas arriba del gen *as-48D1*, cubriendo la transcripción de los cinco genes finales *as-48D1EFGH*. La existencia de T<sub>3</sub>, y su expresión constitutiva, se ve asimismo confirmada, con los resultados obtenidos con la construcción pAM401-<sub>DI-H</sub> que comprende una parte del gen *as-48D* y el resto de los genes situados aguas abajo (Fig 27 ). Los clones con este plásmido muestran los efectos de la expresión fenotípica de los genes *as-48D1* y *as-48GH*, que se traduce en un nivel intermedio de resistencia frente a AS-

48, confirmando el Northern obtenido la presencia de este nuevo mensajero (T<sub>3</sub>) que sólo hibrida con los genes finales.

Así pues, el análisis de transcripción realizado en los transformante con pAM401-81, corrobora la existencia de tres ARNm policistrónicos (T1, T2 y T3) con expresión constitutiva, y además otras dos señales sugieren la existencia de ARN monocistrónicos para el gen estructural y el de la inmunidad (T<sub>A</sub> y T<sub>DI</sub>) cuya transcripción pudiera estar regulada por otros genes. Esta última observación se apoya en resultados muy interesantes que pasamos a comentar.

En un análisis más detallado de los Northern obtenidos con mutantes de inserción en diferentes genes, encontramos que el nivel de expresión de T<sub>A</sub> parece depender de la presencia y funcionalidad del gen *as-48C*. De esta forma, la señal de hibridación de menor tamaño (de aprox. 330 bp, correspondiente a T<sub>A</sub>), obtenida en JH2-2(pAM401-81), al emplear sondas derivadas del gen estructural (*as-48A*), desaparece en el Northern del mutante de inserción con *Tn5* en el gen *as-48C*, que había sido caracterizado con un mutante hipoproducción. De esta forma parece probable que la función del gen *as-48C* pudiera ser regular la iniciación de la transcripción del gen estructural, el cual, una vez alcanzado niveles de expresión apropiados para los genes acompañantes, mediante el mensajero T<sub>1</sub>, comenzaría a transcribirse de forma independiente asegurando así, niveles suficientes de AS-48.

En relación los con mecanismos de regulación génica, hemos encontrado en la bibliografía la existencia de sistemas de transducción de señales para regular la expresión de bacteriocinas como la nisina o la subtilina (Siezen *et al*, 1996). Estos sistemas constan de dos componentes muy conservados, una proteína sensora, que presenta en su extremo amino-terminal dos hélices transmembrana y en el extremo C-terminal dos subdominios con actividad histidin-kinasa conservados y acoplada a ella, se encuentra una segunda proteína citosólica, que actúa de reguladora de respuesta hacia el interior.

Sin embargo, en otros casos, como p.e. la epidermina de *Staphylococcus epidermidis*, sólo se ha descrito la existencia de un gen regulador de respuesta, que permite la producción de epidermina mediante control transcripcional, uniéndose a una repetición invertida que se encuentra antes de la región -35 del promotor del gen estructural (Peschel, A. *et al.*, 1993).

Entre los genes *as-48* descritos, no hemos podido demostrar la existencia de homologías con proteín-kinasas que pudieran ejercer una función sensora. Sin embargo, nuestros resultados, aunque preliminares, sugieren la existencia de un gen regulador de

respuesta similar al descrito para la epidermina, cuya función recaería en *as-48C* en base a las siguientes observaciones:

- \* la interrupción de *as-48C* se traduce en un fenotipo hipo-productor con la consiguiente desaparición de  $T_A$

- \* un análisis detallado de la secuencia existente aguas arriba del gen estructural *as-48A* ha permitido encontrar secuencias invertidas (IR:) que podrían servir como sitio de unión para el regulador, permitiendo así niveles de expresión diferenciales para el gen estructural.

Por otra parte, el transcrito  $T_{D1}$  sólo aparece cuando está presente el gen estructural, caso de los Northern obtenidos en los transformantes pAM401-81, no encontrándose entre los ARNm procedentes de JH2-2(pAM401-CB ó pAM401-*DI-H*) (Figura 29). Este resultado apunta a la posibilidad de que  $T_{D1}$  pudiera ser inducido por la presencia de AS-48.

Con los datos expuestos, podemos, pues, concluir que la región genética *as-48* está estructurada en dos operones de expresión constitutiva, correspondientes a los transcritos  $T_1$  para los genes *as-48ABC* y  $T_2$  que transcribiría los genes *as-48CIDDIEFGH*. Sin embargo, y posiblemente debido a la función protectora de algunos de sus genes, existe un tercer transcrito ( $T_3$ ) muy patente, con capacidad de expresión constitutiva o tal vez inducible por la presencia de AS-48 exógeno que traduce la información de los cinco últimos genes (*as-48DIEFGH*), propiciando un mecanismo eficaz de defensa. Asimismo, los genes responsables de la biosíntesis e inmunidad frente a AS-48 que, cumplen funciones que suponen una ventaja para la célula, frente a estirpes no productoras y sensibles, parecen tener mensajeros monocistrónicos, que aumentarían la capacidad productora de la célula y simultáneamente asegurarían la supervivencia de la misma. Estos mensajeros por el contrario serían de expresión inducida: el transcrito  $T_A$  regulado por el gen *as-48C* y el transcrito  $T_{D1}$  lo sería por el gen estructural.

La organización en diversos operones, por otra parte, hecho común a la mayoría de los sistemas bacteriocinogénicos descritos, está asimismo refrendada por los resultados de mutagénesis transposicional anteriormente comentados, ya que en caso contrario, la interrupción del gen *as-48C* tendría un efecto polar, que no ha sido detectado, sobre los genes *as-48CID* impidiendo su expresión.

Con los resultados comentados, tenemos ya una idea bastante aproximada de las funciones de la mayoría de los productos génicos descritos y proponemos un modelo teórico para explicar a nivel celular las funciones de cada una de las proteínas caracterizadas.

- *as-48A*: gen estructural responsable de la biosíntesis de moléculas precursoras de AS-48.

- *as48D<sub>1</sub>*: proteína de la inmunidad, localizada probablemente a nivel de membrana.

- *as-48C<sub>1D</sub>* y *as-48GH*: sistemas de exporte ABC que translocarían las moléculas precursoras de AS-48 y por algún mecanismo aún no dilucidado, eliminarían el péptido exógeno que llegara a alcanzar la membrana, aumentando así los niveles de inmunidad.

- *as-48B*: se propone como el determinante genético responsable de la maduración, es decir, de la eliminación del péptido señal y ciclación de AS-48.

- *as-48C* jugaría un papel importante regulando la expresión del gen estructural.

Sólo quedaría por dilucidar la función de los genes *as-48E* y *as-48F* difícilmente predecibles, al carecer de homología significativa con otros productos génicos en sistemas genéticos relacionados.

Las características bioquímicas de AS-48 nos permiten considerarla como una bacteriocina de grado alimentario porque es producida por un organismo seguro, al tratarse de una cepa no hemolítica, común en la microbiota intestinal del hombre y frecuentemente aislada como integrante de la microbiota normal de quesos, donde, además, es probable que juegue un papel importante en la maduración de los mismos.

La caracterización de la región genética *as-48* realizada en este Trabajo, era, por tanto, un paso previo y esencial para desarrollar el potencial tecnológico de AS-48 en la industria de alimentación, donde probablemente pueda complementar la acción de las dos bacteriocinas, nisina y pediocina PA-1, actualmente en uso, debido al conjunto de características que AS-48 presenta:

- Naturaleza peptídica, al igual que las restantes bacteriocinas, que lo hace fácilmente degradable por los enzimas digestivos.

- Estructura cíclica, con 5 alfa-hélices que le confieren gran estabilidad en un amplio rango de temperatura y pH.

- Amplio espectro de acción, particularmente frente a bacterias deterioradoras de alimentos y patógenas vehiculizadas por ellos, como *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus*,



*Staphylococcus* e incluso algunas especies de *Salmonella*, lo que quizás sea la cualidad que lo hace más atractivo en el campo de la preservación de alimentos.

Es, además, interesante resaltar la gran estabilidad de la construcción pAM401-81 en *E. faecalis*, durante más de 12 resiembras sucesivas realizadas en el laboratorio. Esta característica será de gran utilidad aplicada ya que permitirá el cultivo de las estirpes transformadas con *as-48*, en ausencia de presión selectiva, es decir en vectores de grado alimentario carentes de marcadores de resistencia a drogas.

El principal motivo por el que las BAL han sido utilizadas en el procesado de alimentos ha sido, sin lugar a dudas, la producción por estas bacterias de una variedad de compuestos antimicrobianos, que interfieren con el crecimiento de microorganismos patógenos y deterioradores, prolongando así la vida media del material. Un aspecto de interés adicional, que en los tiempos actuales, donde existen métodos alternativos eficaces para conservar los alimentos, ha cobrado más valor, es que las BAL producen una serie de metabolitos (diacetilo, citrato) que confieren características organolépticas muy atractivas. Dos han sido los factores que han despertado el actual interés por las bacteriocinas de las BAL. Uno de ellos es la incidencia cada vez mayor y la aparición de nuevas enfermedades transmitidas por alimentos. Más del 80% de dichas enfermedades pueden ser atribuidas directamente a infecciones microbianas o intoxicaciones (Todd, 1989), estando en Estados Unidos estimado el número de casos de enfermedades vehiculizadas por alimentos entre 24-81 millones por año y los costes asociados a las mismas de 5-17 billones de dólares (Oblinger, 1988). El conocimiento relativamente reciente de que *Campilobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophila*, entre otros, son importantes patógenos alimentarios ha aumentado el interés y la magnitud de los costes de estas enfermedades. Estos dos últimos patógenos presentan además la circunstancia agravante de poder proliferar activamente a las temperaturas de refrigeración de los alimentos (6-8 °C), que eran consideradas como una garantía para frenar el crecimiento de otros patógenos alimentarios clásicos, como *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*.

La industria alimentaria está en la actualidad enfrentada al dilema de cómo conseguir alimentos de manufactura atractiva, mínimamente procesados y sin conservantes químicos

y que a la vez tengan una adecuada vida media y sean seguros sanitariamente.

Es este punto el que ha enfocado la atención hacia las tecnologías de fermentación de alimentos, debido a que forman parte de la alimentación humana desde los tiempos prehistóricos, y su seguridad está, pues, probada por la larga experiencia, confiando en que las sustancias derivadas de los alimentos fermentados puedan ser empleadas, con bastante seguridad, como aditivos de alimentos.

Sin embargo, la cuestión que se plantea es ¿qué productos antimicrobianos procedentes de las fermentaciones bacterianas deberían ser objetos de estudio?. Candidatos óptimos para ello parecen ser los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosómica, o bacteriocinas, producidos por las BAL. Las razones iniciales para la elección de estos compuestos, han sido ya enumeradas en la Introducción de esta Memoria. Aparte de estas consideraciones generales, existen otras razones más concretas que han contribuido a incrementar el interés de los investigadores por las bacteriocinas de las BAL y que se resumen a continuación (Daeschel, 1992):

- Empleo seguro y eficaz de la nisina durante los últimos 35 años.
- Reconocimiento oficial de la nisina en muchos países como sustancia "generalmente reconocida como segura" (GRAS) y empleo en aproximadamente 48 países como conservante de alimentos.
- Reticencia de los consumidores a los conservantes clásicos tradicionales.
- Sospechas justificadas sobre la seguridad de ciertos conservantes clásicos como los sulfitos y nitritos.
- Concienciación de que la bacteriocinogenia es un hecho muy frecuente en las BAL.
- Fácil empleo de la producción e inmunidad de las bacteriocinas como marcadores genéticos de selección en los cultivos iniciadores.
- Buena disposición de las instituciones financiadoras gubernamentales y de las industrias procesadoras de alimentos para subvencionar la investigación tanto básica como aplicada en este campo.

Como se ha comentado la nisina es la única bacteriocina de las BAL, cuya utilización ha sido oficialmente permitido como preservador de alimentos. Su empleo se ha practicado generalmente mediante adición directa de la nisina a los alimentos, en la forma comercial conocida como Nisaplin (Delves-Broughton, 1990; Aplin y Barret, 1991), pero también se ha intentado su producción *in situ* por parte de cepas iniciadoras de *Lactococcus lactis*

(Harris *et al.*, 1992b). Esta segunda forma de aplicación presenta el inconveniente, ya comentado, de que la introducción de la capacidad de producir nisina en una cepa iniciadora repercute, en ocasiones, de forma negativa en otras características de interés tecnológico como es su capacidad de acidificación, actividad proteolítica o resistencia al calor y bacteriófagos (Lipinska, 1973; Lipinska, 1977; Klaenhammer, 1993).

Sin embargo, aunque la nisina es ampliamente usada como conservador de alimentos, presenta deficiencias que limitan su potencial, lo que ha determinado que se estén buscando en la actualidad, alternativas a ella. Entre los inconvenientes de la nisina están el que, aunque es bastante estable a temperaturas elevadas y pH bajo (Hurst, 1981), es relativamente inestable a pH elevados (Liu y Hansen, 1990); además cuando es incorporada a productos complejos, tales como derivados cárnicos, sufre una lenta pero constante pérdida en la actividad antimicrobiana (Chung *et al.*, 1989). Otra deficiencia de la nisina es que su solubilidad disminuye a pHs no acídicos, incluso en el rango fisiológico (Liu y Hansen, 1990), limitando así su aplicación en alimentos con pHs neutros o alcalinos (carne y derivados cárnicos). Por otra parte aunque la nisina es de espectro amplio de acción, no es activa frente a bacterias Gram negativas. Otro inconveniente adicional es que el microorganismo productor no se desarrolla en muchos sustratos alimentarios distintos de los derivados lácteos.

Por todo ello se están construyendo nuevas versiones de la nisina y otros lantibióticos y se está estudiando el empleo de otras bacteriocinas de las BAL, de diferente naturaleza. Así, se ha ensayado el potencial antagonista de diversos cultivos bacteriocinogénicos en varios sistemas alimentarios. Por ejemplo, se ha comprobado que cepas de *Pediococcus* productoras de pediocinas PA-1 y PAC 1.0 tienen actividad antilisterial en carne de buey cruda (Nielsen *et al.*, 1990) y en salchichas fermentadas (Foegeding *et al.*, 1992) respectivamente. También *L. lactis* DPC3147, productora de lacticina 3147, empleada como cultivo iniciador en la fabricación del queso Cheddar, es capaz de controlar la proliferación de microorganismos indeseables durante los seis meses necesarios para la maduración de este queso (Ryan *et al.*, 1996). *Lactobacillus plantarum* LPCO10, productor de las plantaricinas S y T ha sido empleada para controlar la microbiota natural en las fermentaciones, al estilo español, de aceitunas verdes (Ruiz-Barba *et al.*, 1994).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se planteó la posibilidad de emplear el péptido AS-48 producido por *E. faecalis* S-48, como conservante de alimentos. Este péptido antibiótico es de síntesis ribosómica, muy estable al pH y al calor a pH 5, resistente a exoproteasas y presenta muy amplio espectro de acción, que afecta a la mayoría de las especies de bacterias Gram-positivas ensayadas y a algunas Gram-negativas. Estas características lo hacen interesante en extremo y nos inducen a investigar diversos aspectos relacionados con su aplicación tecnológica. En este sentido, se está estudiando su acción sobre endosporas de *Bacillus* y *Clostridium*, y frente a *Listeria monocytogenes*, así como sobre los factores que pueden incrementar su acción sobre Gram negativas, entre otras cuestiones.

Una interesante vía de aplicación se abre con nuestro objetivo de transferir la información genética necesaria para la síntesis de AS-48 a cepas de interés industrial, para su producción *in situ* por las cepas iniciadoras empleadas en la fermentación de alimentos. Además, el gran avance en el conocimiento de la genética de las bacterias lácticas, en los últimos años, nos ha permitido disponer de técnicas de clonación y expresión de genes heterólogos de interés en vectores de bacterias lácticas.

Nuestro propósito inicial fue, pues, realizar la transferencia de la región genética *as-48*, contenida en pAM401-81, para investigar las posibilidades de expresión del carácter AS-48 (producción e inmunidad) en *L. lactis*. Para ello se eligió la cepa *L. lactis* LM2301, libre de plásmidos y de fácil manipulación genética, obviando así los problemas que pudiera ocasionar el empleo de una cepa industrial, portadora de otros plásmidos responsables de las capacidades de fermentación de la lactosa y proteólisis de la caseína.

En la actualidad el método más ampliamente usado para la transferencia de genes en lactococos, cuando no se dispone de plásmidos conjugativos o bacteriófagos específicos para estas bacterias, es la electrotransformación o electroporación cuya sencillez y eficacia, ha revolucionado la tecnología de genes en las BAL, al permitir la manipulación y construcción de razas recombinantes.

En un estudio previo, quedaron establecidos los parámetros que afectan la eficacia y las condiciones óptimas de electroporación en lactococos (Gala, 1997). Sin embargo, la frecuencia de transformación obtenidas para el plásmido pAM401-81 fué del orden de ....., frecuencia que comparada con la obtenida en *Enterococcus faecalis* resulta baja, lo que interpretamos como una consecuencia de los sistemas de restricción/modificación del

hospedador y del receptor.

Una vez seleccionados los transformantes con pAM401-81, en función a la resistencia presentada al cloranfenicol conferida por el vector pAM401, se procedió a demostrar la presencia del inserto de ADN. La verificación de la presencia de las regiones de ADN, relacionadas con el carácter de producción y/o inmunidad a AS-48, se ha realizado tanto genotípicamente como fenotípicamente. En el primer caso se ha hecho empleando sondas genéticas sintetizadas de acuerdo con las secuencias de los diferentes genes albergados en el inserto de ADN. Estas sondas oligonucleotídicas se han empleado en experimentos de hibridación ADN-ADN y de amplificación por PCR, quedando claramente demostrada la presencia física, tanto del gen estructural *as-48A* como de los genes implicados en la resistencia e inmunidad, presentes en pAM401-81.

Desde el punto de vista fenotípico, ha quedado de manifiesto la producción de AS-48 en sobrenadantes de cultivo de *L. lactis*. llevando a cabo ensayos de actividad biológica y de revelado inmunológico con anticuerpos anti AS-48. Esto demuestra, de forma inequívoca, que además del gen estructural, los mecanismos de secreción o exporte de AS-48, se expresan en los distintos transformantes obtenidos.

Respecto a la adquisición de inmunidad frente a AS-48 por parte de los transformantes de *L. lactis* LM2301, los resultados demuestran que son capaces de expresar resistencia frente a AS-48, siendo los transformantes *L. lactis* LM2301 (pAM401-81) más resistente (hasta 6  $\mu$ g) a AS-48 que la estirpe control, portadora del plásmido pAM401. Hay que señalar, no obstante, que los niveles de resistencia desarrollados por los lactococos son inferiores a los presentados por los transformantes equivalentes de enterococos.

Así pues como resumen de esta discusión, se podría destacar que, si bien no hay duda de la introducción y permanencia de los diversos genes implicados en la producción y resistencia al péptido AS-48 y de la expresión de los mismos, esta es siempre más pobre que en enterococos. Este resultado probablemente sea atribuible a la existencia de niveles más bajos de expresión, motivada por el fondo genético del hospedador o a la menor eficacia de expresión del vector empleado en este hospedador, e incluso a diferencias bioquímicas y estructurales de la membrana citoplasmática, que podrían ser importantes, al tratarse, en muchos casos, de proteínas asociadas a membrana como las implicadas en la secreción y/o

inmunidad frente al péptido. La posibilidad de que hubiese ocurrido una alteración de la región genética *as-48*, al tratarse de un ADN heterólogo, por parte de los enzimas de modificación de *L. lactis* ha sido descartada al ser reintroducida en *E. faecalis* la información genética, tras ser recuperada a partir de los lactococos transformados, y comprobarse que confería la plena capacidad para producir y resistir a AS-48.

Queda, pues, abierto un largo e interesante camino para intentar mejorar la expresión de *as-48* en vectores adecuados de grado alimentario, y llevar, además, a cabo el estudio pretecnológico sobre la capacidad de producción y estabilidad de AS-48 en alimentos, donde se ha de comprobar la ausencia de interferencias en el procesado de los mismos y de antagonismo con los cultivos iniciadores propios de cada fermentación.

## *CONCLUSIONES*

---

## *CONCLUSIONES*





### CONCLUSIONES

- 1.- El carácter AS-48 se encuentra localizado en una región de ADN de 10,6 kb del plásmido pMB2, delimitada por los sitios de corte de los enzimas *SphI-PstI*. Dicha región ha sido clonada en el vector pAM401 y transferida a *E.faecalis*, y los transformantes obtenidos expresan el carácter AS-48 con una eficacia similar a la de la estirpe salvaje S-48.
- 2.- Se han identificado dos nuevos genes relacionados con la producción y resistencia frente a AS-48: *as-48G* y *as-48H*, que pueden codificar sendas proteínas, de 227 y 399 aminoácidos.
- 3.- La proteína As-48G muestra una homología significativa especialmente en los dominios de unión de ATP, con proteínas pertenecientes al grupo de transportadores ABC de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.
- 4.- La proteína As-48H, según los datos de homología y la predicción de estructura, podría estar integrada en la membrana celular, ya que posee 4  $\alpha$ -hélices de naturaleza hidrofóbica, capaces de atravesarla.
- 5.- En base a las conclusiones 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> y a los resultados obtenidos mediante mutagénesis, se propone que las proteínas As-48GH constituyen un nuevo sistema de transporte del péptido AS-48, en el cual As-48H representa la región de expansión en membrana y As-48G es la encargada de aportar la energía necesaria para el transporte, mediante hidrólisis de ATP.

6.- La expresión de la región *as-48* se lleva a cabo mediante tres ARNms policistrónicos, el transcrito T<sub>1</sub> que abarca los genes *as-48ABC*, T<sub>2</sub> para los genes *as-48C1DD1EFGH* y un tercer transcrito T<sub>3</sub>, que engloba a los genes *as-48D1EFGH*. Se han detectado, además, dos ARNms monocistrónicos para los genes *as-48A* y *as-48D1*.

7.- La región genética *as-48* ha sido transferida a *Lactococcus lactis* siendo los transformantes obtenidos capaces de expresar la producción y resistencia frente a AS-48, si bien los niveles de expresión son inferiores a los de enterococos.





- ANDERSON, D.G. & L.L. MCKAY. 1983. A simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**. 549-552.
- ANDRUP, L., J. DAMGAARD, AND K. WASSERMANN. 1993. Mobilization of small plasmids in *Bacillus thuringiensis supsp israelensis* is accompanied by specific aggregation. *J. Bacteriol.* **175**: 6530-6536.
- ASENSIO, C.J., C. PÉREZ-DÍAZ, M.C. MARTÍNEZ & F. BAQUERO. 1976. A new family of low molecular weight antibiotics from Enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**. 7-14.
- BERG, D. 1977. Insertion and excision of the transposable kanamycin resistance determinant *Tn5*. p. 205-212. In A.I. Bukhari, J. A. Shapiro, and S.L. Adhya (ed), *DNA Insertion elements, plasmids and episomes*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- BERG, C. M. & BERG, D. E. 1996. Transposable elements tools. *Escherichia and Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. 2dn edition.vol 2.ASM Press. Whashington, D.C p. 2596.
- BIRNBOIM, H. C., & J. DOLY. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- BOOTH, M. C., C. P. BOGIE, H. G. SAHL, R. J. SIEZEN, K. L. HATTER AND M. S. GILMORE. 1996. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Mol.Micobiol.* **21**: 1175-1184

- BOURGEOIS, P.L.F., M. MATA & R. RITZENTHALER. 1991. Pulsed-field gel electrophoresis as a tool for studying the phylogeny and genetic history of lactococcal strains. p. 140-145. En Dunny, Cleary y McKay (ed.), Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci and enterococci. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- BROCK, T. D., & J. M. DAVIES. 1963. Probable identity of a group D hemolysin with bacteriocin. J. Bacteriol. **86**: 708-712.
- BROCK, T., B. PEACHER, & D. PIERSON. 1963. Survey of the bacteriocin of enterococci. J. Bacteriol. **86**: 702-709.
- CLEWELL, D.B., AND B.L. BROWN. 1980. Sex pheromone cAD1 in *Streptococcus faecalis*: induction of a function related to plasmid transfer. J. Bacteriol. **143**: 1063-1065.
- CLEWELL, D.B. 1981. Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. Microbiol.Rev. **45**: 409-436.
- COLLINS, M. D., D. JONES, J. A. E. FARROW, R. KILPPER-BALZ, AND K. H. SCHLEIFER. 1984. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **34**: 220-223.
- DEVRIESE, L.A., M. D. COLLINS, AND R. WIRTH. 1992. The genus *Enterococcus*. In the Prokaryotes, 2<sup>nd</sup> ed. Balows, A., Truper, H. G., Cworkin, M., Harder, W. and Schleifer K-H. pp. 1463-1481. Springer-Verlag, New York.
- DESMAZEUD, M. 1994. Les bacteriocines des bacteries lactique. Revue Med. Vet. **145**: 711-720.
- DUNNY, G. M., B. L. BROWN, & D. B. CLEWELL. 1978. Induced cell aggregation and mating in *S. faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. Proc. Natl. Acad. Sci.

USA.75: 3479-3483.

FATH, M.J. & R. KOLTER. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**: 995-1017.

FLOREY, H.W., E. CHAIN, N.G. HEATLEY, M.A. JENNING, A.G. SANDERS, E.P. ABRAHAM & M.E. FLOREY. 1949. *Antibiotics*. Oxford University Press, London.

GÁLVEZ, A., E. VALDIVIA, M. MAQUEDA & E. MONTOYA. 1985. Production of bacteriocin-like substances by group D streptococci of human origin. *Microbios.* **43**: 223-232.

GÁLVEZ, A., M. MAQUEDA, E. VALDIVIA, A. QUESADA & E. MONTOYA. 1986. Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can. J. Microbiol.* **32**: 765-771.

GALVEZ, A., G. GIMENEZ-GALLEGO, M. MAQUEDA & E. VALDIVIA. 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., M. MAQUEDA, M. MARTÍNEZ-BUENO & E. VALDIVIA. 1989b. Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms. *Res. Microbiol.* **140**: 57-68.

GÁLVEZ, A., E. VALDIVIA, M. MARTÍNEZ & M. MAQUEDA. 1989c. Effect of peptide AS-48 on *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-47. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 641-645.

- GÁLVEZ, A., E. VALDIVIA, M. MARTÍNEZ & M. MAQUEDA. 1989d. Bactericidal action of peptide antibiotic AS-48 against *Escherichia coli* K-12. *Can. J. Microbiol.* **35**: 318-321.
- GÁLVEZ, A., M. MAQUEDA, M. MARTÍNEZ-BUENO & E. VALDIVIA. 1991. Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membranes vesicles, and channel formation on bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **173**: 886-892.
- GARRIDO, M.C., M. HERRERO, R. KOLTER & J. MORENO. 1988. The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO. J.* **7**: 1853-1862.
- GARVIE, E.I. & J.A.E. FARROW. 1982. *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* (Orla-Jensen) comb. nov. and *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* (Matuszewski et al.) nom. rev., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**: 453-455.
- GILMORE M.S., SEGARRA, R.A. AND BOOTH M.C. 1990. An HlyB type function is required for expression of the *Enterococcus faecalis* hemolysin bacteriocin. *Infect. Immun.* **58**: 3914-3923.
- GILMORE, S.M., R.A. SEGARRA, M.C. BOOTH, C.P. BOGIE, L.R. HALL, AND D.B. CLEWELL. 1994. Genetic structure of the *E. faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* **176**: 7335-7344.
- GIRAFFA, G., N. PICCHIONI, E. NEVIANI AND CARMINATI, D. 1995. Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocin during Taleggio cheesemaking and ripening. *Food Microbiol.* **12**: 301-307.
- GRANATO, P. A., AND R.W. JACKSON. 1969. Biocomponent nature of lysin from *Streptococcus zymogenes*. *J. Bacteriol.* **100**: 865-868.



- GRATIA, J. AND P. FREDERICQ. 1946. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. C.R. Soc. Biol. **93**: 1040-1041.
- GROSS, E., H. H. KILTS AND E. NEBELIN. 1973 Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 354: 810-812.
- HANSEN, J.N. 1993. The molecular biology of nisin and its structural analogs. En D. Hoover y L. Steenson (ed.), Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press, New York, NY. pp 93-120.
- HANSEN, J.N. 1994. Nisin as a model food preservative. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nut. **34**: 69-93.
- HASTINGS, J.W., M. SAILER, K. JOHNSON, K.L. ROY, J.C. VEDERAS & M.E. STILES. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. J. Bacteriol. **173**: 7491-7500.
- HAVARSTEIN, L.S., D.B. DIEP & I.F. Nes. 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. Mol. Microbiol. **16**: 229-240.
- HIGGINS, C.F., I.D. HILES, G.P.C. SALMOND, D.R. GILL, J.A. DOWNIE, I.J. EVANS, I.B. HOLLAND, L. GRAY, S.D. BUCKEL, A.W. BELL & M.A. HERMODSON. 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. Nature. **323**: 448-450.
- HOPWOOD, D.A. 1978. Extrachromosomally determined antibiotic production. Ann.Rev.Microbiol. **32**: 373-392.

HOLO, H. & I.F. NES. 1991. High-efficiency transformation of lactococci by electroporation. En Dunny, Cleary y McKay (ed.), Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci and enterococci. American Society for Microbiology, Washington D.C. pp 298.

HOLO, H., O. NISSEN & I.F. NES. 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.

HURST, A. 1981. NISIN. Adv. Appl. Microbiol. **27**. 85-123. Ingram. L. 1970. A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisin. Biochim. Biophys. Acta **224**: 263-265.

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

IKE, Y., H. HASHIMOTO, D. B. CLEWELL. 1987b. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. J. Clin. Microbiol. **25**: 1524-1528.

IKE, Y., D.B. CLEWELL, R.A. SEGARRA, AND M.S. GILMORE. 1990. Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/Bacteriocin determinants in *E. Faecalis*; Tn 917 insertional mutagenesis and cloning. J. Bacteriology. **172**: 155-163.

IKEDA, T., T. IWANAMI, M. HIRASAWA, C.H. WATANABE, J.R. Mc GHEE, R.T. SHIOTA. 1982. Purification and certain properties of a bacteriocin from *S. mutans*. Infect. Immun. **35**: 861-868.

JACK, R.W., J.R. Tagg & B. Ray. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. **59**: 171-200.

JACOB, F., S. LWOFFA & E. WOLLMAN. 1953. Définition de quelques termes relatifs á la lysogénie. Ann. Inst. Pasteur. **84**: 222-224.

JACOB, A.E., G.J. DOUGLAS, AND S.J. JOBBS. 1975. Selftransferable plasmids determining the hemolysin and bacteriocin production of *Streptococcus faecalis* var *zymogenes*. J. Bacteriol. **121**: 863-872.

KOK, J., H. HOLO, M. J. VAN BELKUM, A. HAENDRIKMAN, I. NES. 1993. Non-nisin bacteriocins in Lactococci: Biochemistry genetics and mode of action. In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Steenson, L. and Hooker, D. (eds). Washington, D.C, ASM, pp. 121-150.

KOLTER, R. & F. MORENO. 1992. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. Ann. Rev. Microbiol. **46**: 141-163.

KONISKY, J. 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. Ann. Rev. Microbiol. **63**: 125-144.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature (London). **227**: 680-685.

LANGDON, G. M., M. BRUIX., A. GÁLVEZ, E. VALDIVIA, M. MAQUEDA AND M. RICO. 1998. Sequence-specific H assignment and secondary structure of the bacteriocin AS-48 cyclic peptide. Journal of Biomolecular NMR, **12**: 173-175

MCKAY, L.L. & K.A. BALDWIN. 1990. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **87**: 3-14.

MACRINA, F. L., D. J. KOPECKO, K. R. JONES, D. J. AYERS, AND S. M.

- MACCOWEN. 1978. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid*. **1**: 417-420.
- MANIATIS, T., E. F. FRITSCH, & J. SAMBROOK. 1982. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Lab., New York.
- MAQUEDA, M., A. GALVEZ, M. MARTINEZ-BUENO, I. GUERRA & E. VALDIVIA. 1993. Neutralizing antibodies against the peptide antibiotic AS-48: immunocytological studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 148-151.
- MARTÍNEZ-BUENO, M., M. MAQUEDA, A. GÁLVEZ, B. SAMYN, J. VAN BEEUMEN, J. COYETTE & E. VALDIVIA. 1994. Determination of the gene sequence and molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **176**: 6334-6339.
- MARTÍNEZ-BUENO, M., E. VALDIVIA, A. GÁLVEZ, J. COYETTE & M. MAQUEDA. 1998. Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **27**: 347-358.
- MARUGG, J. D., C.F. GONZALEZ, B. S. KUNKA, A. M. LEDEBOER, M. J. PUCCI, M. Y. TOONEN, S. A. WALKER, L. C. ZOETMULDER, P. A. VANDENBERG. 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactic* PAC1.O. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2360-2367.
- MENDOZA, F., M. MAQUEDA, A. GÁLVEZ A. M. MARTÍNEZ-BUENO. E. VALDIVIA. Antimicrobial effects of the peptide AS-48 against *Listeria*. *Appl. Environ. Microbiol.* (Enviada a publicación).
- MORTVEDT, C.I., J. NISSEN-MEYER, K. SLETTEN & I.F. NES. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1829-1834.

- NETTLES, C. G. AND BAREFOOT, S. F. 1993. Biochemical and genetics characteristics of bacteriocines food-associated lactic acid bacteria. *J. Food. Prot.* **56**: 338-356.
- NEVE, H., A. GEIS & M. TEUBER. 1984. Conjugal transfer and characterization of bacteriocin plasmids in group N (lactic acid) streptococci. *J. Bacteriol.* **157**: 833-838.
- NISSEN-MEYER, J., L.S. HAVARSTEIN, H. HOLO, K. SLETTEN & I.F. NESS. 1993. Association of the latococcin A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1503-1509.
- PESCHEL, A. AUGUSTINS, J. KUPKE, T. STEVANOVIC, S. GOTZ, F. Regulation of epidermin biosynthetic genes by EpiQ. 1993. *Mol. Microbiol.* **9**:31-39.
- PIARD, J.C. & M. DESMAZEAUD. 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxigen metabolites and catabolism end products. *Lait.* **71**: 525-541.
- PIARD, J.C. & M. DESMAZEAUD. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.* **72**: 113-142.
- PIARD, J.C, P.M. MURIANA, M.J. DESMAZEAUD & T.R. KLAENHAMMER. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 279-284.
- QUESADA, A. E. VALDIVIA, M. MAQUEDA, GÁLVEZ A. AND E. MONTOYA. 1987. NADH-peroxidase activity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> descomposition in a peroxidogenis strain of *Streptococcus durans*. *Microbios.* **49**: 115-122.

- RAY, B. & M. DAESCHEL. 1992. Food biopreservatives of microbiological origin. CRC Press, Inc., Boca raton, Fla.
- REIS, M., M. ESCHBACH-BLUDAU, M.I. IGLESIAS-WIND, T. KUPKE & H.G. SAHL. 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**: 2876-2883.
- RENIERO, R., P. COCCONCELLI, V. BOTTAZZI, AND L. MORELL. 1992. High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 763-768.
- SAHL, H.G. & H. BRANDIS. 1981. Production, purification and chemical properties of an antistaphylococcal agent produced by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Gen. Microbiol.* **127**: 377-384.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH & T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SAMYN, B., M. MARTÍNEZ-BUENO, B. DEVREESE, M. MAQUEDA, A. GÁLVEZ, E. VALDIVIA, J. COYETTE & J. VAN BEEUMEN. 1994. The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Lett.* **352**: 87-90.
- SANGER F, S NICKLEN, AND A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.
- SAN MILLAN, J. L, C. HERNANDEZ CHICO, P. PEREDA, AND F. MORENO. 1985. Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin B17 production and immunity. *J. Bacteriol.* **163**: 275-281
- SARGENT, M. G. 1978. Surface Extension and the Cell Cycle in Prokariotes. *Advances in Microbial Physiology.* **18**: 113.

- SARIK, P.E.J., T. IMMONEN, M. REIS & H.G. SAHL. 1996. Immunity to lantibiotics. *Anton van Leeuwenhoek*. **69**: 151-159.
- SCHILLINGER, U. AND LUCKE, F. K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1901-1906.
- SCHILLINGER, U., STILES, M. E AND HOLZAPFEL, W. H. 1993. Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61. *Internacional Journal of Food Microbiology*. **20**: 131-147.
- SCHLEIFER, K.H., J. KRAUS, G. DVORAK, R. KILPPER-BÄLZ, M.D. COLLINS & W. FISCHER. 1984. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**: 183-195.
- SEGARRA R.A,M.C. BOOTH,MORALES D.A,M.M. HUYCKE, AND M.S. GILMORE. 1991. Molecular characterization of the *Enterococcus faecalis* cytolysin activator. *Infection and Immunity*. **59**: 1239-1246.
- SHERMAN, J.M. 1937. The streptococci. *Bacteriol.Rev.* **1**: 3-97
- SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- STILES, M.E. & J.W. HASTING. 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci. Technol.* **2**: 247-251.
- STOFFELS, G., J. NISSEN-MEYER, A. GUDMUNSDOTTIR, K. SLETTEN, H. HOLO & I.F. Nes. 1992b. Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1417-1422.

- TAGG, J.R., AND A.R. MACGIVEN. 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* **21**: 934.
- TAGG, J.R. 1991. Bacterial BLIS. *ASM News.* **53**: 611.
- TAGG, J.R. 1992. Bacteriocins of Gram-positive bacteria: an opinion regarding their nature, nomenclature and numbers. En *Bacteriocins, microcins and lantibiotics*. NATO ASI Series, **H 65**: 33-35.
- TAGG, J.R., A.S. Dajani & L.W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**: 722-756.
- TOMITA, H. S. FUJIMOTO, AND Y. IKE. 1996. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pY117. *J. Bacteriol.* **178**: 3583-3593.
- TOWBIN, H., T. STAЕHELIN & J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 4350-4354.
- VAN DER LELIE, D., F. CHAVARRI, G. VENEMA, AND M. J. GASSO. 1991. Identificación of a new genetic determinant for cell aggregation associated with lactose plasmid transfer in *Lactococcus lactis*. *Appl. env. Microb.* **57**: 201-206.
- VOGELSTEIN, B., AND D. GILLESPIE. 1979. Preparative method and analutical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 615-619.
- WALKER, J. E., M. SARASTE, M.J. RUNSWICK, N. J. GRAY. 1982. Distatly related sequences in the alpha- and  $\beta$  -subunits of ATP synthase, myosin kinase and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **8**: 945-951.



- WILLIAMS, A. M., J. A. E. FARROW, AND M. D. COLLINS. 1989. Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*. Lett. Appl. Microbiol. **8**: 185-189.
- WIRTH, R., F.Y. AN, D.B. CLEWELL. 1986. Highly efficient protoplast system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*Streptococcus faecalis* shuttle vector. J. Bacteriol. **165**: 831-836.
- WOROBO, R.W., M.J. VAN BELKUM, M. SAILER, K.L. ROY, J.C. VEDERAS & M.E. STILES. 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. J. Bacteriol. **177**: 3146-3149.
- YAGI, Y. & D. B. CLEWELL. 1980. Recombination-deficient mutant of *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. **143**: 966-970.



Biblioteca Universitaria de Granada



01066381