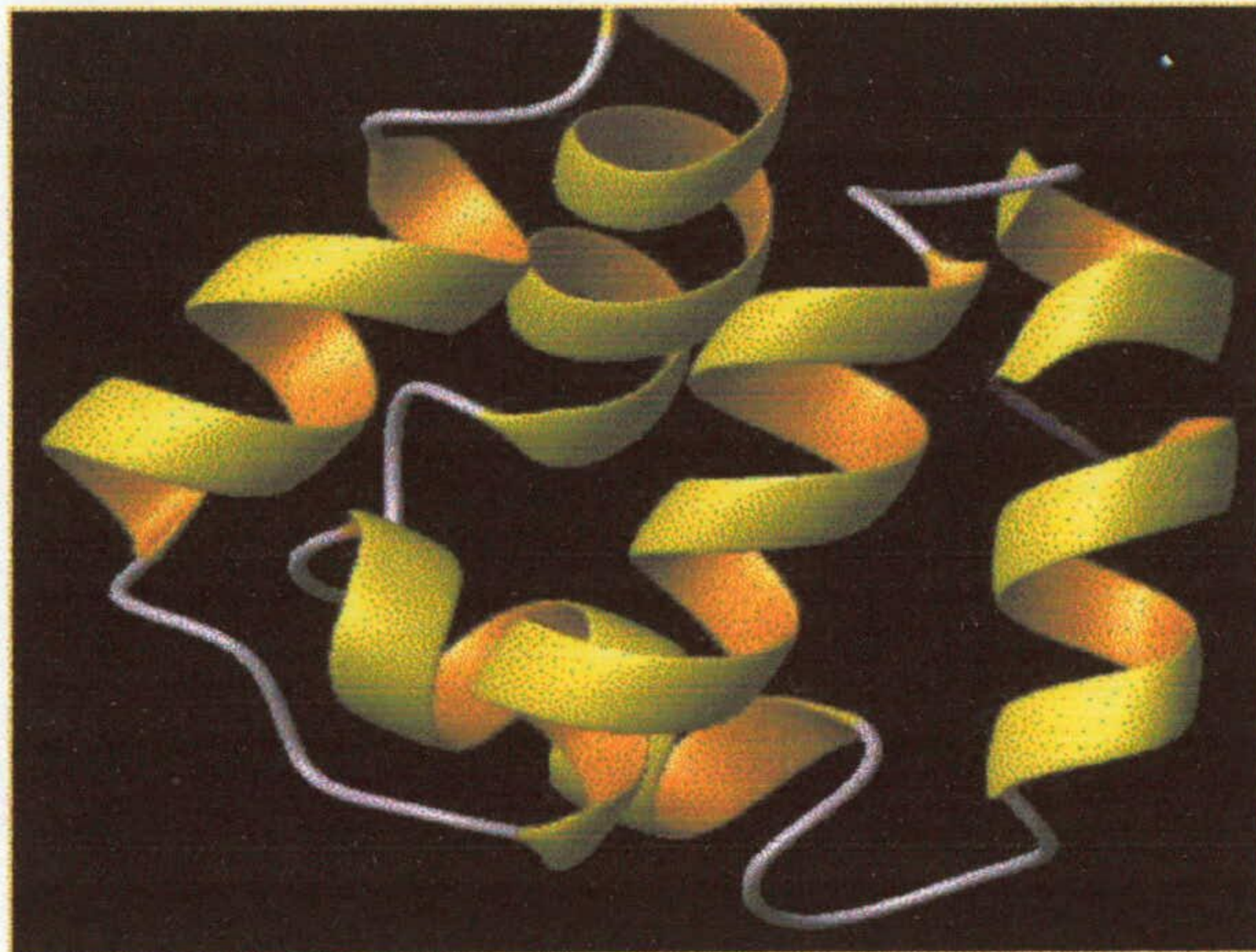


T 11-14

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 7/5/04.....
ENTRADA NUM. 1702.....



**ANÁLISIS FUNCIONAL Y DE EXPRESIÓN DE LA
ENTEROCINA AS-48 EN *Enterococcus faecalis* Y
TRANSFERENCIA A OTRAS BACTERIAS DEL ÁCIDO
LÁCTICO**

TESISI DOCTORAL
MATILDE FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

2004

**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA**
N.º Documento b 16497880
N.º Copia i 17817870

Biblioteca Universitaria de Granada

01255425

UNIVERSIDAD DE GRANADA
30 ABR. 2004
COMISION DE DOCTORADO

**ANÁLISIS FUNCIONAL Y DE EXPRESIÓN DE LA ENTEROCINA
AS-48 EN *Enterococcus faecalis* Y TRANSFERENCIA A OTRAS
BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO**

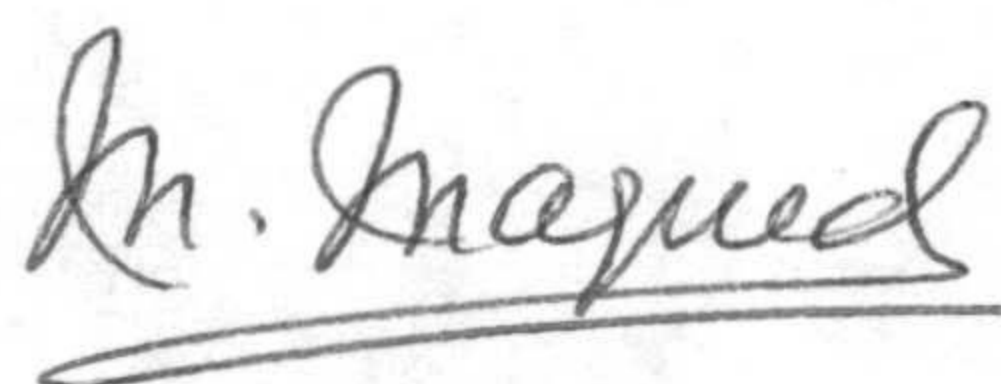
Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Ciencias

La Doctoranda



Matilde Fernández Rodríguez


Los Directores del trabajo



Mercedes Maqueda



Eva Valdivia



Manuel Martínez Bueno

Granada
2004

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada durante los años 1999-2004, dentro del Grupo de Investigación “Estudio de sustancias antagonistas producidas por microorganismos”.

La doctoranda ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia y Tecnología durante los años 1999-2002.

La investigación ha sido financiada a través del proyecto del CICYT “Estudios genéticos y moleculares del péptido antibiótico AS-48. Estudio pretecnológico para su potencial uso en la preservación de alimentos” (BIO98-0908-C02-01) y por el Plan Andaluz de Investigación (grupo CVI 160).

De la presente Tesis Doctoral se han extraído las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos.

Publicaciones

- Díaz M, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Fernández M, Soler-González AS, Ramírez-Rodrigo H, Maqueda M. 2003. Characterization of a new operon, *as-48EFGH*, from the *as-48* gene cluster involved in AS-48 immunity. *Appl Environ Microbiol.* 69, 2: 1229-1236.

Comunicaciones a Congresos

- Fernández M, Díaz M, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Soler-González AS, Ramírez-Rodrigo H, Maqueda M. "Identification of a new operon, *as-48efgh* from the *as-48* gene cluster". International Symposium Enterococci in Foods, Functional and Safety Aspects. Berlín. 2002.
- Fernández M, Martínez-Bueno M, Díaz M, Valdivia E, Maqueda M. "Enterocina AS-48: organización de la región genética *as-48*". Segunda Acción Especial de Bacteriocinas. Madrid, 2003.
- Maqueda M, Fernández M, Martín MC, Valdivia E, Martínez-Bueno M. "Expresión del carácter AS-48 en diversas bacterias lácticas". XIX Congreso Nacional de Microbiología. Santiago de Compostela. 2003.

INTRODUCCIÓN

1. BACTERIOCINAS.....	3
1.1 ¿Qué son las bacteriocinas?	3
1.2 Ventajas del empleo de bacteriocinas de las BAL	5
1.3 Clasificación de las bacteriocinas de las BAL	7
1.4 Aspectos genéticos de la producción de bacteriocinas	9
2. EL GÉNERO <i>Enterococcus</i>	12
2.1 Características genéticas del género <i>Enterococcus</i>	15
2.2 Patogenicidad	16
2.3 Principales bacteriocinas producidas por especies del género <i>Enterococcus</i>	19
2.3.1 Clase I. Lantibióticos producidos por enterococos	19
2.3.2 Clase II. Péptidos termoestables no lantibióticos.....	22
2.3.3 Clase III. Enterocinas termolábiles	33
3. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS.....	33
4. ENTEROCINA AS-48.....	37
4.1 Características bioquímicas de AS-48	37
4.2 Actividad biológica y mecanismo de acción de AS-48	40
4.3 Determinantes genéticos de AS-48: resistencia y producción	42
5. PROTEÍNAS CIRCULARES.....	45
5.1 Proteínas circulares naturales.....	47
5.1.1 Proteínas circulares de microorganismos.....	47
5.1.2 Proteínas circulares de plantas: los ciclótidos.....	49
5.1.3 Proteínas circulares de mamíferos	51
5.2 Mecanismos de síntesis de los péptidos circulares	51
5.3. Proteínas circulares sintéticas	53

OBJETIVOS

OBJETIVOS.....	57
----------------	----

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS Y PLÁSMIDOS.....	61
1.1 Bacterias y bacteriófagos	61
2. MEDIOS DE CULTIVO.....	64
2.1 Medios de crecimiento	64
2.2 Medios empleados en la conservación de microorganismos	65
2.3 Medio utilizado en los ensayos de mutagénesis con el transposón Tn5 ...	66
2.4 Medios empleados en los experimentos de electrotransformación.....	66
2.5 Medios utilizados para la producción de AS-48	66
2.6 Medio utilizado en la detección de la producción de AS-48 por enterococos	67
2.7 Medios empleados para la detección de las características bioquímicas ..	67
2.8 Tampones utilizados en los medios de cultivo.....	68
3. PRODUCTOS Y REACTIVOS EMPLEADOS.....	69
Antibióticos.....	69
Enzimas	69
Reactivos de la electroforesis en geles de agarosa.....	69
Reactivos de la electroforesis en geles de poliacrilamida.....	69
Otros reactivos utilizados.....	70
4. DETECCIÓN Y VALORACION DE LA PRODUCCIÓN Y RESISTENCIA FRENTE A AS-48	70
4.1 Determinación de la producción y resistencia en medio sólido.....	70
Técnica de la doble capa	70
Técnica de las gotas	71
4.2 Determinación de la producción y la resistencia en medio líquido	71
Técnica de los pocillos	71
4.3 Purificación de la bacteriocina AS-48.....	72
4.3.1 Cromatografía de intercambio catiónico	72
4.3.2 Cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC)	72
4.3.3 Precipitación ácida	73
5. Métodos de aislamiento de ADN	73
5.1 Aislamiento de plásmidos a pequeña escala (minipreparaciones)	73

5.1.1 Aislamiento de ADN plasmídico en <i>Enterococcus</i> y <i>Lactococcus</i>	74
5.1.2 Aislamiento de ADN plasmídico en <i>E. coli</i>	75
5.1.3 Aislamiento de ADN plasmídico en <i>Lactobacillus</i>	75
5.2 Aislamiento de plásmidos a gran escala (maxipreparaciones).....	76
5.2.1 Maxipreparaciones en <i>Enterococcus</i> y <i>Lactococcus</i>	76
5.2.2 Maxipreparaciones en <i>E. coli</i>	77
5.3 Extracción de ADN total.....	77
6. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ADN.....	78
6.1 Electroforesis en geles de agarosa.....	78
6.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	79
6.3 Determinación de la concentración de ADN	79
6.4 Digestión del ADN con endonucleasas de restricción	80
6.5 Amplificación del ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	80
6.5.1 Técnica de PCR.....	80
6.5.2 Oligonucleótidos de síntesis empleados	81
6.5.3 Secuenciación.....	81
7. TÉCNICAS PARA LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN.....	82
7. TÉCNICAS PARA LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN.....	83
7.1 Purificación del ADN a partir de la agarosa	83
7.2 Desfosforilación del vector de ligación.....	83
7.3 Ligación del ADN.....	83
7.4 Ligación de productos de PCR en pGEM-T	84
8. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE MICROORGANISMOS.....	84
8.1 Transformación en <i>E. coli</i> . Método del cloruro de calcio	84
8.2 Electrotransformación de <i>E. coli</i>	85
8.3 Electrotransformación de <i>Enterococcus</i>	86
8.4 Electrotransformación de <i>Lactococcus</i>	86
8.5 Electrotransformación de <i>Lactobacillus</i>	87
9. PREPARACIÓN DE SONDAS PARA HIBRIDACIÓN	88
9.1 Preparación de sondas no radioactivas marcadas con digoxigenina-11- dUTP mediante PCR.....	88
9.2 Marcaje del ADN con digoxigenina-11-dUTP mediante el fragmento Klenow de la polimerasa.....	88

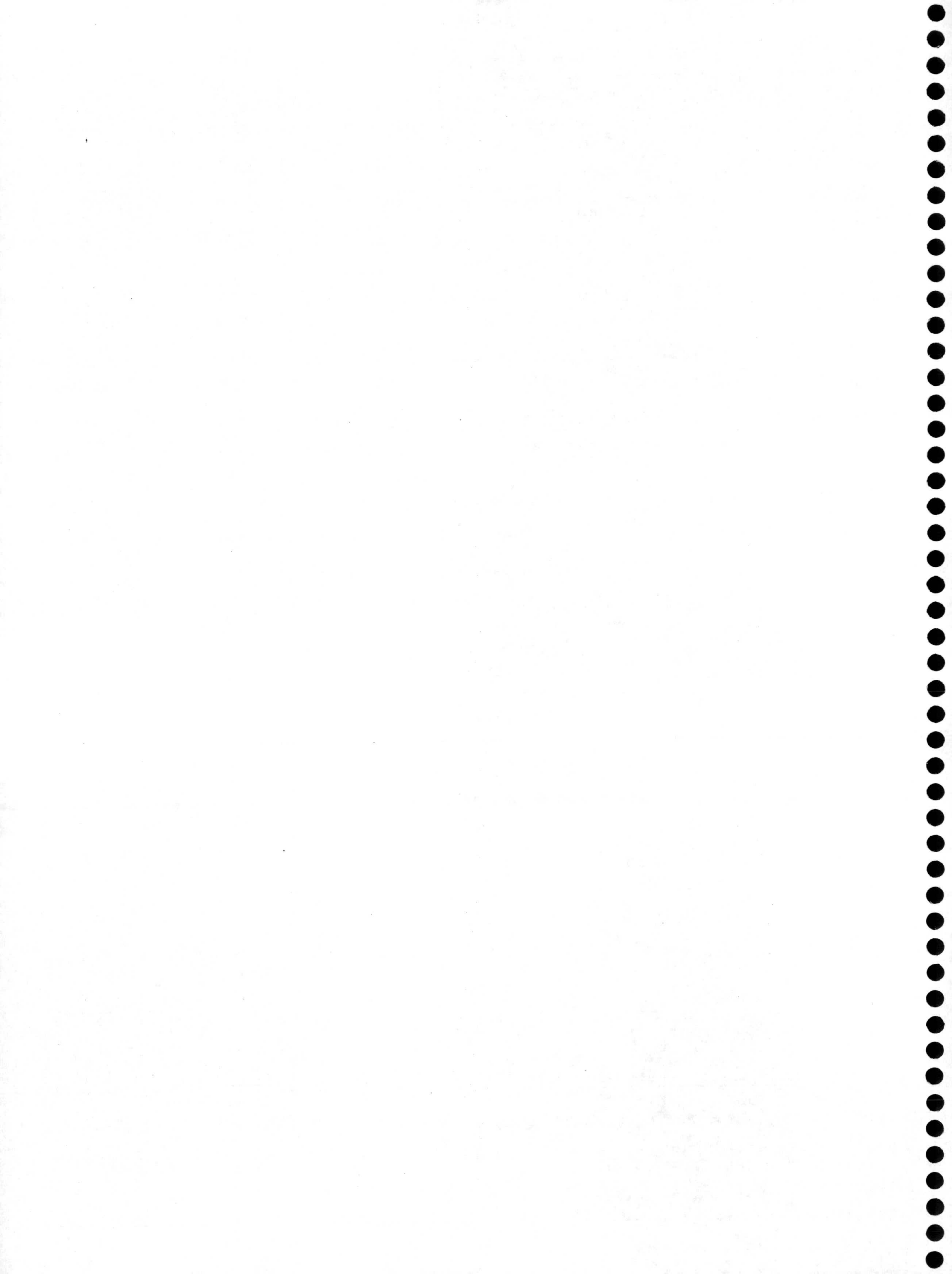
<u>9.3 Sondas empleadas</u>	89
<u>10. TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA E HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (NORTHER Y SOUTHER BLOT)</u>	89
<u>10.1 Técnicas para ARN</u>	89
<u>10.1.1 Extracción de ARN total de <i>E. faecalis</i></u>	90
<u>10.1.2 Preparación de los geles de ARN</u>	91
<u>10.2 Preparación de los geles de ADN</u>	92
<u>10.3 Transferencia a membranas de nylon (Southern y Northern Blot)</u>	92
<u>10.4 Prehibridación e hibridación ADN-ADN y ADN-ARN</u>	93
<u>10.5 Revelado inmunológico</u>	93
<u>10.6 Estimación del tamaño de los ARNs</u>	94
<u>11. Mutagénesis plasmídica mediante El transposón Tn5</u>	94
<u>11.1 Obtención de una suspensión del fago λ_{467}</u>	95
<u>11.2 Inserciones con el transposón Tn5</u>	95
<u>12. Análisis informático de secuencias</u>	96
<u>12.1 Comparación de secuencias, identificación de dominios y asignación de funciones</u>	96
<u>12.2 Predicción de segmentos transmembrana en las proteínas</u>	96
<u>12.3 Números de acceso a la secuencias nucleotídicas</u>	97

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LOS DIFERENTES PRODUCTOS GÉNICOS IDENTIFICADOS EN LA REGIÓN <i>as-48</i>	101
1.1 Generación de mutantes en la región <i>as-48</i> . Estudio fenotípico	101
1.2 Obtención de nuevas construcciones en pAM401. Análisis fenotípico..	104
1.2.1 Clonación de <i>as-48EFGH</i> en pAM401: plásmido pAM401 _{EH}	104
1.2.2 Clonación de <i>as-48C₁DD₁EFGH</i> en pAM401: plásmido pAM401 _{CIH}	106
.....	106
1.2.3 Obtención de transformantes en <i>E. faecalis</i> JH2-2. Análisis fenotípico	106
.....	106
2. ANÁLISIS DE TRANSCRIPCIÓN	108
2.1 Detección de ARNs mensajeros.....	108
2.1.1 Detección de T _A	109
2.1.2 Detección de T ₁	109
2.1.3 Detección de T ₂	112
2.1.4 Detección de T ₃	113
2.1.5 Detección de T _{D1}	114
3. CARACTERIZACIÓN DEL CLUSTER <i>as-48EFGH</i>	114
3.1 Análisis predictivo de los productos de los genes <i>as-48EFGH</i>	114
4. ESTUDIO DE COMPLEMENTACIÓN EN <i>trans</i> DE LOS DIVERSOS OPERONES IDENTIFICADOS	118
4.1 Búsqueda de vectores compatibles con pAM401	118
4.1.1 Estudio de compatibilidad entre pAM401 y pIL253.....	119
4.1.2 Estudio de compatibilidad entre pAM401 y pMG36e	119
4.2 Subclonación del gen estructural <i>as-48A</i> en pMG36e	120
4.2.1 Estudio de complementación entre pMG36-A y pAM401-81::Tn5 _A	120
.....	120
4.3. Subclonación de <i>as-48BC</i> en pMG36e	122
4.3.1 Estudio de complementación entre pMG36-BC y pAM401-81::Tn5 _B	123
.....	123
5. MEJORA DE LA EXPRESIÓN DEL CARÁCTER AS-48	127
5.1 Subclonación de <i>as-48</i> en pBR332	127



Introducción



1. BACTERIOCINAS

1.1 ¿Qué son las bacteriocinas?

En la lucha por la supervivencia, los seres vivos han desarrollado sistemas de defensa frente a los microorganismos acompañantes, competidores naturales en sus hábitats (Nissen-Meyer y Nes, 1997). La producción de pequeños péptidos antimicrobianos es una estrategia común de defensa frente a bacterias, compartida no sólo por microorganismos, sino también por numerosos taxones de animales y plantas, de los que son ejemplos típicos las defensinas de mamíferos (Lehrer *et al.*, 1993), la melitina y cecropinas de insectos (Zaslhoff, 1987, Rivas y Andreu, 2000) y las thioninas de plantas (Broekaert *et al.*, 1997). Una de las grandes diferencias entre los péptidos antimicrobianos producidos por eucariotas y los bacterianos, es la toxicidad que muestran los primeros, tal es el caso de las defensinas producidas por los neutrófilos humanos, que son citotóxicas a altas concentraciones para la propia célula productora (Higazi *et al.*, 1996).

La interacción antagonista entre bacterias fue descrita por primera vez en 1877 por Pasteur y Joubert al comprobar que algunas cepas de *Escherichia coli* interferían en el crecimiento de *Bacillus anthracis* en animales infectados. Las bacteriocinas fueron detectadas por primera vez en 1925 por André Gratia, el cual observó que el crecimiento de algunas cepas de *E. coli* se inhibía por la presencia de un compuesto antibacteriano denominado colicina V (Gratia, 1925). Esta bacteriocina fue posteriormente caracterizada como una molécula de naturaleza peptídica, termorresistente y dializable. Pierre Frédérique localizó sus determinantes genéticos en un elemento transmisible por conjugación, similar al factor conjugativo F (Frédérique, 1954). Las bacteriocinas se definen de forma amplia como "péptidos de síntesis ribosómica, modificados o no, que son secretados al medio extracelular por muchas especies bacterianas y que presentan un espectro de acción bactericida relativamente estrecho" (Tagg, 1992b; Jack *et al.*, 1995; Diep y Nes, 2002). Fueron inicialmente descritas en bacterias Gram-negativas, en particular en *E. coli* y por ello denominadas colicinas (Lazdunski, 1988). Las bacteriocinas pueden definirse como un amplio grupo de proteínas antibacterianas con capacidad para matar bacterias relacionadas desde el punto de vista filogenético, mediante mecanismos tan variados como la inhibición de la

síntesis de la pared celular, la permeabilización de la membrana, o la inhibición de diversas actividades enzimáticas. La producción de colicinas aparece inducida por proteínas pertenecientes al sistema de reparación SOS, por lo que principalmente ejercen su acción en situaciones de estrés nutricional (Riley y Wertz, 2002). Un segundo grupo de péptidos antimicrobianos que se ajusta a la definición de bacteriocina, también producidos por cepas de *E. coli*, son las denominadas microcinas, de menor tamaño y que a diferencia de las anteriores, su síntesis es independiente del sistema SOS (Papagianni, 2003).

En bacterias Gram-positivas la producción de este tipo de antagonistas está muy extendida (Jack *et al.*, 1995), si bien en los últimos quince años las investigaciones se han centrado de forma prioritaria en el estudio de las producidas por bacterias del ácido láctico (BAL), probablemente debido a la posibilidad de emplearlas como conservantes naturales de alimentos, con el fin de aumentar la vida útil y mejorar la calidad higiénica de los mismos. Las bacteriocinas producidas por las BAL presentan un conjunto de rasgos comunes, que incluyen su pequeño tamaño (20-70 aminoácidos) y su naturaleza anfifílica/hidrofóbica, a menudo cargada positivamente a pHs fisiológicos (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Epan y Vogel, 1999; Ananou, 2003). Además, estas sustancias producidas y secretadas al medio extracelular, presentan una serie de características biotecnológicas que las convierten en candidatos óptimos para ser empleadas como conservantes de alimentos (Kim, 1993; Yang y Ray, 1994; Ananou, 2003), como son: i) naturaleza proteica que las hace sensibles a las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal, ii) la falta de toxicidad e inmunogenicidad, iii) y su gran estabilidad en amplios intervalos de pH y temperatura. Además, algunas de ellas presentan un espectro antimicrobiano muy amplio, capaces de inhibir a bajas concentraciones a un gran número de bacterias Gram-positivas patógenas, toxigénicas o saprofitas frecuentemente encontradas en alimentos, como ocurre con la enterocina AS-48, cuyo espectro de acción se extiende a bacterias Gram-negativas, y cuya actividad se mejora tras tratamientos que producen daños subletales en estas células (Gálvez *et al.*, 1989; Abriouel *et al.*, 1998). Dada la creciente preocupación que, en la sociedad actual, plantean los conservantes químicos, las BAL productoras de bacteriocinas o las bacteriocinas por ellas producidas, están siendo utilizadas en el procesado y conservación de numerosos alimentos.

Las bacteriocinas a menudo se confunden en la literatura con los antibióticos (Hansen, 1993; Hurst, 1981), lo que podría entorpecer su uso en aplicaciones alimentarias desde un punto de vista legal. Pero ambos metabolitos presentan muchas diferencias en lo relativo a su síntesis, modo de acción, espectro antibacteriano, toxicidad y mecanismo de resistencia, las cuales se recogen de forma resumida en la Tabla 1 (Cleveland *et al.*, 2001).

Características	Bacteriocinas	Antibióticos
Aplicación	Alimentos	Clínica
Naturaleza	Peptídica de síntesis ribosómica	Variada
Síntesis	Metabolitos primarios	Metabolitos secundarios
Actividad	Espectro reducido	Espectro variable
Mecanismo de la Resistencia	Cambios en la diana (p.e. membrana)	Mutación o adquisición de plásmidos de resistencia
Modo de acción	Mayoritariamente formación de poros	Diversas dianas celulares
Requerimientos de la interacción	Desconocidos	Dianas específicas
Toxicidad/efectos secundarios	Desconocidos	Sí

Tabla 1.- Principales diferencias entre bacteriocinas y antibióticos (Cleveland *et al.*, 2001).

1.2 Ventajas del empleo de bacteriocinas de las BAL

A las cualidades ya enumeradas de las bacteriocinas se une el que algunas especies de BAL, en particular aquellas pertenecientes al género *Lactobacillus* y ciertas especies intestinales de *Enterococcus*, son importantes componentes de la dieta de humanos y animales, y por ello consideradas como probióticos (Becquet, 2003; Salminen *et al.*, 1996; O'Sullivan *et al.*, 1992; Mitra y Golam, 1990). Se aplica la cualidad de probiótico a organismos que pueden ser empleados como "suplemento alimentario vivo por afectar de forma beneficiosa al huésped animal mejorando su equilibrio intestinal" (Fuller, 1989). En los últimos años se ha producido un desarrollo explosivo de esta rama aplicada de la Microbiología, que ha conducido al aislamiento y desarrollo de nuevas cepas probióticas y a la puesta a punto de las metodologías

específicas que permiten agilizar la identificación de propiedades adecuadas para la obtención de nuevos alimentos funcionales (Pintado *et al.*, 2003). Se dispone ya de muchas evidencias sobre las actividades de los microorganismos considerados como probióticos que, como primer efecto beneficioso, previenen la colonización del tracto gastro-intestinal por una variedad de patógenos gracias a que estas bacterias se unen a los enterocitos e impiden la adhesión de los patógenos a la mucosa intestinal, mediante la producción de sustancias inhibidoras (mecanismo de exclusión competitiva). Además, a los probióticos se les atribuyen actividades beneficiosas ya que parecen incrementar la calidad nutritiva de los alimentos, facilitan la digestión de la lactosa, y controlan las infecciones intestinales; además de otras supuestas, y no bien demostradas, tales como la inhibición del desarrollo de algunos tipos de cánceres y la reducción del colesterol sanguíneo (Gilliland, 1990; Montville y Winkowski, 1997; Franz *et al.*, 1999). Por todo ello, los alimentos que los contienen son considerados como alimentos funcionales (nutraceúticos o farma alimentos) (Golberg, 1994).

En estudios recientes se ha demostrado la existencia de bacteriocinas en los alimentos tradicionales producidos por las BAL (Cleveland *et al.*, 2001) que por tanto han sido consumidas durante siglos, lo que representa un largo historial de empleo seguro. Muchas BAL producen uno o más tipos de bacteriocinas, pero las más útiles para su uso como bioconservantes son las producidas por bacterias consideradas "de grado alimentario" o GRAS, ("generally recognized as safe") que son reconocidas como seguras para su empleo en el procesado de alimentos. Hasta hoy, la única bacteriocina aprobada como aditivo alimentario es la nisina, cuyo uso está permitido y reglamentado, según los países, en quesos, postres, leche, yogur, bebidas fermentadas, carne, pescado y productos enlatados (WHO, 1969; FDA, 1988; Delves-Broughton *et al.*, 1996), si bien también se utilizan, a nivel industrial, cultivos iniciadores que incluyen cepas de *P. acidilactici* productoras de pediocina (Cleveland *et al.*, 2001). En la actualidad la comunidad científica está investigando la utilidad de la tecnología de barreras, que utiliza tratamientos químico o físicos combinados con el empleo de las bacteriocinas, los cuales, actuando de forma sinérgica, están siendo de gran utilidad para prolongar la vida media y seguridad de los alimentos.

1.3 Clasificación de las bacteriocinas de las BAL

Las bacteriocinas de las BAL constituyen un grupo heterogéneo de antagonistas bacterianos cuyo tamaño molecular va desde unos pocos miles de daltons hasta moléculas más complejas, siempre de naturaleza exclusivamente proteica. Atendiendo a sus características estructurales y actividad biológica, Klaenhammer (1993) estableció cuatro clases de bacteriocinas, de las que actualmente sólo se mantienen tres. La existencia de la cuarta clase de bacteriocinas, en la que se encuadraban moléculas complejas de naturaleza mixta, es decir proteínas acomplejadas con lípidos o carbohidratos, fué descartada con posterioridad al comprobarse que se trataba de artefactos, debido a la tendencia natural de este tipo bacteriocinas a formar agregados con componentes celulares y del medio (Nes *et al.*, 1996). El descubrimiento y la caracterización de nuevas bacteriocinas ha impuesto notables modificaciones en la clasificación propuesta por Klaenhammer (Nes *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1999; Van Belkum y Stiles, 2000; Cleveland *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002; Ross *et al.*, 2002), reconociéndose en la actualidad tres grupos de bacteriocinas con varias subclases:

Clase I: Lantibióticos. Formada por pequeños péptidos hidrófobos (<5 kDa) que presentan en su composición aminoácidos modificados: lantionina, metil-lantionina, dideshidroalanina y dideshidrobutilina (Sahl *et al.*, 1995). Son moléculas producidas exclusivamente por bacterias Gram-positivas, altamente termoestables que actúan a nivel de la membrana celular (McAuliffe *et al.*, 2001). Recientemente, Diep y Nes (2002) han propuesto dos subclases dentro de esta clase I:

- Subclase A: Péptidos lineales y catiónicos, capaces de formar poros en la membrana celular: la nisina, producida por *L. lactis* subsp. *lactis* (Rogers, 1928; Mattick y Hurst, 1944) es el prototipo de esta subclase de lantibióticos, pero también se incluyen la epidermina de *S. epidermidis* (Schnell *et al.*, 1989) y la lacticina 481 de *L. lactis* (Piard *et al.*, 1993; Rince *et al.*, 1994) como ejemplos de ella.
- Subclase B: Péptidos globulares, sin carga neta o con carga neta negativa: la lacticina 3147 de *L. lactis* (Ryan *et al.*, 1999), la citolisina producida por *E. faecalis*, que presenta actividad bactericida-hemolítica (Gilmore *et al.*, 1990), y la estafilococina C55 producida por *Staphylococcus aureus* (Navaratna *et al.*, 1998).

Clase II: Pequeños péptidos termoestables no-lantibióticos. (<10 kDa). En esta categoría se incluye una serie de péptidos catiónicos termorresistentes, que carecen de residuos modificados, pero con características genéticas y químicas muy variadas, por lo que su clasificación está siendo especialmente problemática. Son producidas tanto por bacterias Gram-positivas como por *E. coli* (por ejemplo la colicina V y la microcina 24) (Fath *et al.*, 1994; Håvarstein *et al.*, 1994; O'Brian y Mahanty, 1996). Al igual que la mayoría de las bacteriocinas, presentan actividad a nivel de membrana (Bruno y Montville, 1993), en la que producen poros a través de los cuales se realiza la pérdida de electrolitos, que desencadena el desequilibrio iónico y la lisis celular.

En la primitiva clasificación de Klaenhammer (1993) ya se distinguían tres subclases:

- Subclase IIa: Incluye bacteriocinas que poseen el motivo YGNGVXC, que es un sitio de procesamiento Gly-Gly⁻¹-Xaa⁺¹ para dar lugar a la bacteriocina madura. Constituyen la familia de las pediocinas con actividad anti-*Listeria*, en la que se podrían citar la pediocina PA-1/AcH producida por varias cepas de *Pediococcus acidilactici* (Henderson *et al.*, 1992; Lozano *et al.*, 1992), la sakacina A de *Lactobacillus sake* (Holck *et al.*, 1992), y la enterocina A de *E. faecium* (Aymerich *et al.*, 1996).
- Subclase IIb: Bacteriocinas heterodiméricas, cuya actividad depende de la existencia de dos péptidos, α y β : incluye la lactococcina G de *L. lactis* (Nissen-Mayer *et al.*, 1992), la lactacina F de *Lb. johnsonii* (Allison *et al.*, 1994), y las plantaricina EF y JK de *Lb. plantarum* (Anderssen *et al.*, 1998).
- Subclase IIc: Péptidos caracterizados porque su actividad depende de la presencia de un grupo tiol en su molécula (Klaenhammer, 1993), o bien porque su secreción se efectúa mediante el sistema general Sec (Nes *et al.*, 1996): las lactococcinas A y B de *L. lactis* (Holo *et al.*, 1991; Van Belkum *et al.*, 1991) y la acidocina B de *Lb. acidophilus* (Leer *et al.*, 1995). Posteriormente, tras la comprobación de que este sistema de secreción puede ser utilizado por la subclase IIa, se eliminó este criterio de la subclase IIc propuesto por Nes en 1996 (Cintas *et al.*, 1997; Cleveland *et al.*, 2001).

Sin embargo, en la última clasificación presentada por Diep y Nes (2002), se propone la existencia de tres nuevas subclases:

- Subclase IId: Bacteriocinas sin péptido señal, como las enterocinas L50A y L50B de *E. faecium* (Cintas *et al.*, 1998) y la enterocina EJ97 de *E. faecalis* (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2003).
- Subclase IIe: Bacteriocinas circulares como la enterocina AS-48 producida por *E. faecalis*, la circularina A producida por *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752 (Kemperman *et al.*, 2003), la gassericina A de *Lb. gasseri* (Kawai *et al.*, 1998) y la acidocina B de *Lb. acidophilus* (Leer *et al.*, 1995). Dadas las características estructurales y biológicas de estas bacteriocinas, diversos investigadores (Kemperman *et al.*, 2003; Maqueda *et al.*, 2004) han propuesto la creación de una nueva clase para incluir a estos péptidos circulares que presentan modificaciones postraduccionales complejas, así como actividad biológica y características físico-químicas particulares, que permiten diferenciarlas claramente de las otras clases de bacteriocinas de las BAL.
- Subclase IIIf: Bacteriocinas no agrupables, tales como la lactococcina A (Holo *et al.*, 1991), la lactococcina B (Van Belkum *et al.*, 1991) ambas producidas por *L. lactis* y la enterocina B de *E. faecium* (Casaus *et al.*, 1997).

Las bacteriocinas de las clase I y II han sido las más investigadas, probablemente debido a su estabilidad al calor que las hace más adecuadas para su empleo en la conservación de alimentos.

Clase III: Grandes proteínas termolábiles (>30 kDa). Se trata de bacteriocinas complejas en cuanto a su actividad bactericida y/o a su estructura proteica. Como ejemplo cabe citar la helveticina J producida por una cepa de *Lb. helveticus* (Joerger y Klaenhammer, 1986), la bacteriocina Bc-48 producida por *E. faecalis* (López-Lara *et al.*, 1991) y la enterolisina A de *E. faecium* (Nilsen *et al.*, 2003).

1.4 Aspectos genéticos de la producción de bacteriocinas

Los genes estructurales responsables de la síntesis de bacteriocinas han sido encontrados tanto en el cromosoma como en plásmidos, y en algunos casos se localizan en elementos genéticos móviles similares a transposones. Esto puede explicar el hecho de que sea bastante común encontrar la misma bacteriocina en diferentes especies bacterianas, como se ha referido para la enterocina AS-48 que es producida por especies de *E. faecalis* y *E. faecium* (Folli *et al.*, 2003) o como ocurre con la sakacina P, producida tanto por *Lb. sake* LB 706 como por *Lb. curvatus* LTH1174. En este sentido se han encontrado los

genes *sap* en un total de 15 aislados diferentes de *Lb. sake*, pese a que muchos de ellos no producían la bacteriocina (Diep y Nes 2002). En el caso de cepas productoras de múltiples bacteriocinas, sus determinantes genéticos pueden estar codificados por plásmidos diferentes como ocurre con las bacteriocinas Bc-48 y AS-48 producidas por *E. faecalis* (Martínez-Bueno *et al.*, 1990, López-Lara *et al.*, 1991) y las enterocinas L50A y L50B de *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1998), o en un plásmido y en el cromosoma bacteriano, caso de las carnobacteriocinas B2 y BM1 de *Carnobacterium piscicola* LV17B (Quadri *et al.*, 1995), o incluso formar parte de un mismo *cluster* de genes como ocurre con las bacteriocinas de *Lb. plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1996).

La organización genética de las bacteriocinas está en general, bien conservada. Se sabe que además del gen estructural de la bacteriocina, son necesarios determinantes genéticos relacionados con la inmunidad y el transporte y, en su caso, los responsables de las modificaciones postraduccionales cuando existen, en ocasiones formando parte del mismo operón o incluso en operones diferentes. Es interesante destacar que en muchas bacteriocinas, el gen de la inmunidad se encuentra situado a continuación del gen estructural, probablemente para asegurar la autoprotección de la cepa productora (Diep y Nes, 2002). También es frecuente que la mayoría de las bacteriocinas sean sintetizadas como prepéptidos con un péptido líder que es eliminado durante su exporte. En muchos no lantibióticos y también en algunos lantibióticos, el péptido señal contiene una doble glicocola que es reconocida como punto de rotura por un transportador de tipo ABC (Havarstein *et al.*, 1994), en otros casos, el transporte corre a cargo del sistema general de secreción (vía Sec), y aún algunas son sintetizadas sin péptido señal (Ent L50) y poco se conoce sobre su mecanismo de exporte (Floriano *et al.*, 1998). En todo caso, la región genética responsable de este tipo de bacteriocinas suele contener determinantes genéticos responsables de transportadores ABC que no requieren la existencia de estos péptidos señal y, por tanto, pueden estar directamente involucrados en el transporte de bacteriocinas (Diep y Nes 2002).

En algunos sistemas bacteriocinogénicos se ha descrito la existencia de reguladores de la expresión de bacteriocinas que responden al sistema conocido como *quorum sensing*, es decir que la producción de bacteriocina depende de la presencia de un alto número de células en el medio. Esto sugiere que el incremento del número de células productoras de bacteriocina dispara una ruta de transducción de señales, que regula la expresión de los genes involucrados. En la forma más característica se trata de un sistema regulador de tres componentes: un péptido inductor, una histidín-kinasa (HK) que sirve como sensor y un

regulador de respuesta (RR), cuya función es la activación de la expresión génica. En las bacteriocinas reguladas por este tipo sistemas, todos los operones involucrados en la producción de la bacteriocina se activan de forma concertada tras la inducción, siendo objeto de un mecanismo regulador común (Nes *et al.*, 1996; Nes y Eijsink, 1999). El análisis de la región promotora de estos operones a menudo revela la existencia de secuencias reguladoras que son repeticiones directas como las identificadas en los sistemas de la plantaricina A y sakacina P, en las que sirven como sitios de unión a los reguladores de respuesta implicados en la activación génica (Diep *et al.*, 1996; Risoen *et al.*, 2000). Los determinantes genéticos responsables de las HK y el regulador de respuesta (RR), con frecuencia se localizan adyacentes al resto de genes implicados en la producción de la bacteriocina. En el caso de los lantibióticos nisina y subtilina, fue sorprendente encontrar que las propias bacteriocinas actuaban como péptidos inductores (Entian y de Vos., 1996; Klein *et al.*, 1993). En otros sistemas lantibióticos, como la mersacidina, epidermina y estreptococcina A-FF22, el correspondiente péptido inductor no ha sido descrito, pese a que presentan genes con homologías con los genes reguladores de nisina y subtilina. En el caso de bacteriocinas no lantibióticos tales como plantaricinas, sakacinas, carnobacteriocinas y enterococinas, la organización de los genes reguladores está incluso más conservada y ha sido referida como sistema regulador de tres componentes: el gen del péptido inductor está siempre seguido por los correspondientes genes de la HK y el RR en el mismo operón (Nes *et al.*, 1996). Los péptidos inductores actúan a concentraciones mínimas, variando desde valores 10^{-12} M (plantaricina A) hasta 10^{-17} M (enterocina F), y comparten las mismas propiedades físico-químicas que las bacteriocinas, es decir, son pequeños péptidos catiónicos y a menudo se sintetizan como precursores con un péptido señal que contienen una doble glicina, por lo que se piensa que podrían seguir la misma ruta de secreción que la mayoría de las bacteriocinas (Diep *et al.*, 1995; Nilsen *et al.*, 1998). Dos casos especiales son la plantaricina A y la carnobacteriocina CB2, que también poseen actividad antimicrobiana e inductora, sin embargo, mientras que el gen que codifica la plantaricina A está localizado en un operón junto a sus correspondientes HK y RR (con la organización genética típica de un sistema regulador de tres componentes), el gen para la carnobacteriocina CB2 está seguido por un determinante responsable de la proteína de la inmunidad (organización típica de un gen estructural de una bacteriocina). Además, el sistema de la carnobacteriocina CB2 tiene también su correspondiente péptido inductor como cualquier bacteriocina regulada por *quorum sensing* (Nes *et al.*, 1996; Nes y de Vos., 1999; Quadri *et al.*, 1997; Kleereberem *et al.*, 1997). Se cree que las bacterias implicadas

en la producción de bacteriocinas reguladas mediante péptidos inductores, secretan de forma constitutiva pequeñas cantidades de péptido inductor al medio, y cuando se alcanza un cierto umbral, la señal es rápidamente reconocida y procesada por los correspondientes HK y RR, que dirige todo el proceso en el locus de la bacteriocina, incluido el propio operón regulador. Todo ello conduce a un bucle de autoactivación que incrementa fuertemente la expresión génica. También se ha sugerido que factores ambientales como pH, temperatura y nutrición pueden modificar este proceso. De hecho, la composición del medio y la disponibilidad de oxígeno afectan la producción de sakacina P (Brurberg *et al.*, 1997), y la producción de sakacina A está regulada por un sistema de dos componentes de forma dependiente de la temperatura (Diep *et al.*, 2000). La gran mayoría de cepas bacteriocinogénicas producen activamente la bacteriocina sólo durante un período discreto de tiempo, sin embargo el mecanismo mediante el cual regulan el cese de la producción es todavía desconocido, aunque recientemente se ha comenzado a estudiar el proceso de regulación negativa en *Lb. plantarum* (Diep *et al.*, 2001).

2. EL GÉNERO *Enterococcus*

Los enterococos son cocos Gram-positivos con bajo contenido en G+C (<50%), carentes del enzima catalasa, que se agrupan en parejas o cadenas cortas. Son anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, carentes de algunos citocromos y por ello con metabolismo exclusivamente fermentador. Durante el crecimiento producen ácido láctico como metabolito final (homofermentador) y cantidades muy pequeñas de acético, fórmico y etanol, pero no producen gas. Los enterococos, anteriormente clasificados dentro del género *Streptococcus* fueron descritos en 1899 por Thiercelin, y la creación del género fue propuesta por Thiercelin y Jouhaud en 1903. Andrews y Horder (1906) los clasificaron como *Streptococcus faecalis* y se consideraron como organismos potencialmente patógenos, al ser aislados en pacientes con endocarditis. El nombre específico "*faecalis*" se debe a que presentaban bastantes similitudes con cepas aisladas del intestino humano. Unos años más tarde, Rebecca Lancefield (1933) desarrolló un sistema de tipado serológico que permitió separar diversos grupos de estreptococos, en el cual aquellos de "origen fecal" constituían el grupo antigénico D, debido a la presencia de glucosa en las cadenas laterales del ácido glicerol teicoico de la pared celular. Esta agrupación está relacionada con la propuesta por Sherman (1937) que estableció 4 divisiones designadas como estreptococos piogénicos, viridans, lácticos y

enterococos. El grupo de enterococos incluía *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. bovis* y *S. equinus*, mientras que la creación de la especie *S. durans*, importante en microbiología de alimentos por no ser de origen fecal (Franz *et al.*, 1999), fue muy discutida como especie separada o como subespecie de *S. faecium*.

Aunque siguiendo los esquemas de la taxonomía clásica la clasificación de los enterococos es vaga, ya que no presentan características fenotípicas inequívocas que permitan distinguirlos de otros cocos Gram-positivos carentes de catalasa (Devriese *et al.*, 1993), la mayoría de las especies son fácilmente diferenciables por su capacidad de crecer a 10 y a 45 °C, en presencia de 6,5% de ClNa, a pH 9,6 y en presencia de 40% bilis, 0,04% de azida sódica o en leche con 0,1% de azul de metileno, y, además, por sobrevivir al calentamiento a 60°C durante 30 min (Hardie y Whiley, 1997; Morrison *et al.*, 1997). Algunas cepas de lactococos, pediococos, aerococos y leuconostoc, también crecen en presencia de 6,5% de ClNa, sin embargo, *E. cecorum*, *E. columbae* y *E. avium* no lo hacen (Devriese *et al.*, 1993). Los pediococos y algunos lactococos crecen a 45°C, mientras que la mayoría de lactococos, leuconostoc y algunos estreptococos crecen a 10°C, pero no a 45 °C (Murray, 1990, Devriese *et al.*, 1993). Más aun, la distinción filogenética de especies o "grupos de especies", requiere en algunos casos hacer uso de la composición de la pared celular, fisiología, crecimiento y actividad bioquímica (Devriese *et al.*, 1993).

La creación del género *Enterococcus* ha sido reciente, gracias a los trabajos de Schleifer y Kilpper-Bälz en 1984, que mediante hibridaciones ADN-ADN y ADN-ARNr pudieron demostrar que *S. faecalis* y *S. faecium* eran lo suficientemente distintos del resto de los estreptococos como para separarlos. Basándose en la catalogación de ARNr 16S (Ludwing *et al.*, 1985, Williams *et al.*, 1991), en hibridaciones ADN-ADN y ADN-ARNr, y en estudios serológicos con sueros anti-superóxido dismutasa (Schleifer *et al.*, 1985), los estreptococos en sentido amplio fueron subdivididos en tres géneros: *Streptococcus* "sensu stricto", *Enterococcus* y *Lactococcus* (Devriese *et al.*, 1993).

De acuerdo con la nueva clasificación filogenética, los enterococos pertenecen al Phylum II formado por bacterias Gram-positivas con bajo contenido en G+C. Forman parte del Orden *Lactobacillales* (Clase *Bacilli*), junto a otros muchos géneros reconocidos en la actualidad de las BAL con morfología cocoidea o bacilar: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* y *Lactobacillus* (Devriese *et al.*, 1993; Devriese y Pot, 1995). Dentro de este grupo, los enterococos

presentan una mayor cercanía filogenética a *Vagococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium* (Devriese y Pot, 1995).

Especie	Crecimiento a		Crecimiento en presencia de				Esculina	Antígeno Grupo D
	10°C	45°C	pH 9,6	6,5% NaCl	40% Bilis	0,04% Azida		
<i>E. asini</i>	(+)	(+)	N.D.	-	+	N.D.	+	+
<i>E. avium</i>	V	+	+	V	V/+	N.D.	+	+
<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+	V/+	+	+	+	+
<i>E. cecorum</i>	-	+	(+)	-	(+)	-	+	-
<i>E. columbae</i>	-	N.D.	N.D.	-	(+)	-	+	-
<i>E. dispar</i>	+	-	N.D.	+/-	+	-	+	-
<i>E. durans</i>	+	+	+	+	+	+	+	(+)
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>E. flavescens</i>	V/-	V/+	N.D.	+	+	+	+	+
<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. haemoprophilus</i>	+	-	N.D.	+	+	+	+	+
<i>E. hirae</i>	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>E. malodoratus</i>	+	-	+	+	+	N.D.	+	+
<i>E. moraviensis</i>	+	-	N.D.	+	+	+	+	+
<i>E. mundtii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. porcinus</i>	+	+	N.D.	+	N.D.	N.D.	+	+
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	+	+/-	V/+	N.D.	+	-
<i>E. raffinosus</i>	(+)	+	+	+	V/+	N.D.	+	N.D.
<i>E. ratti</i>	+	+	N.D.	+	N.D.	N.D.	+	(+)
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	N.D.	(+)	+	N.D.	+	-
<i>E. solitarius</i>	+	+	N.D.	+	+	N.D.	+	+
<i>E. sulfureus</i>	+	-	N.D.	+	+	N.D.	+	-
<i>E. villorum</i>	N.D.	N.D.	N.D.	+	+	+	+	N.D.

Tabla 2.- Características fisiológicas de las especies pertenecientes al género *Enterococcus*. N.D., no determinado; (+), usualmente positivo; V, variable; +/-, en la literatura aparecen datos distintos. No hemos incluido la especie *E. solitarius*, ya que según los datos moleculares pertenecería al género *Tetragenococcus* (Doming *et al.*, 2003).

Los estudios quimiotaxonómicos y filogenéticos realizados desde 1984, han concluído con la asignación de más de 20 especies al género *Enterococcus* que se exponen en la Tabla 2, en la que no se ha incluido la especie *E. solitarius* porque según los datos moleculares pertenecería al género *Tetragenococcus* (Domig *et al.*, 2003). Se trata de uno de los géneros mas importantes de las bacterias del ácido láctico por su amplia distribución ambiental y la gran variedad de nichos ecológicos que ocupan - desde diversos alimentos fermentados hasta el tracto intestinal del hombre y animales- en los cuales ejercen un papel beneficio. Como integrantes habituales de la microbiota intestinal, los enterococos pueden servir como indicadores de contaminación fecal, siendo particularmente importantes en Microbiología de Salud Pública y Alimentaria.

E. faecalis y *E. faecium* han sido sospechosos de ser agentes causales de enfermedades transmitidas por alimentos, sin embargo, esto nunca se ha podido confirmar (Dack, 1956; Stiles, 1989). *E. faecalis* se asume que es más importante en Microbiología Clínica como productor de infecciones nosocomiales (patógenos oportunistas), y tanto *E. faecalis* y en particular *E. faecium* han desarrollado resistencia a un gran número de antibióticos, incluyendo los antibióticos glucopeptídicos, vancomicina y teicoplanina (Klein, 2003). Sin embargo y como contrapartida a este panorama poco halagüeño, diversas cepas de enterococos están siendo empleadas como probióticos y otras muchas están involucradas en fermentaciones de alimentos lácteos, en particular de ciertos quesos tales como el Manchego (Ordóñez *et al.*, 1978), el de La Serena (Del Pozo *et al.*, 1988) o Cebreiro (Centeno *et al.*, 1996). Están también asociados a otras fermentaciones naturales, como las de aceitunas de mesa y de productos africanos fermentados (Olasupo *et al.*, 1994; Franz *et al.*, 1996). Además los enterococos pueden constituirse en la población dominante en carnes tratadas con calor y empaquetadas (Houben, 1982; Bell y De-Lacey, 1984; Andre-Gordon y Ahmad, 1991). Precisamente esta doble naturaleza de los enterococos es lo que provoca más reticencias a la hora de su aplicación como probióticos o como cultivos iniciadores en la industria alimentaria.

2.1 Características genéticas del género *Enterococcus*

En los enterococos se han descrito varios mecanismos de transferencia de genes, dependiendo de la presencia de plásmidos tanto conjugativos como no conjugativos, y de transposones. En estos elementos se han localizado determinantes genéticos responsables de hemolisinas, bacteriocinas y de resistencia a antibióticos (Clewel, 1990; Simjee y Gill, 1997). De todas las especies de este grupo, *E. faecalis* es, con diferencia, la mejor caracterizada genéticamente. Los plásmidos conjugativos que alberga pueden ser plásmidos que responden a feromonas o plásmidos conjugativos “normales” que se caracterizan por presentar un amplio rango de hospedadores bacterianos (por ejemplo el plásmido pAM β 1 ha sido transferido a lactococos, lactobacilos, *S. aureus* y a especies de *Bacillus*). Además, se transfieren con muy baja frecuencia en medios líquidos y presentan con frecuencia determinantes de resistencia a drogas. Los plásmidos que responden a feromonas, llamados también plásmidos sexuales, se caracterizan por tener un estrecho rango de hospedadores (normalmente intraespecífico) y se transfieren en

medio líquido con alta frecuencia. También pueden albergar genes de resistencia a antibióticos, o pueden codificar la producción de hemolisina o de bacteriocinas. Ocasionalmente, ambos tipos de plásmidos pueden coexistir en una misma célula, entonces la frecuencia de transferencia de los plásmidos normales suele incrementarse, ya que la respuesta a las feromonas provoca un estrecho y prolongado contacto físico entre las células donadora y receptora que favorece la transferencia. Hay además un tercer grupo conocido como plásmidos movilizables, que son aquellos no autotransmisibles pero que pueden ser transferidos por la acción de un plásmido conjugativo coexistente en la misma bacteria.

El primer genoma secuenciado de *Enterococcus*, llevado a cabo por el equipo de Fraser (2003), ha sido el de la cepa V583 perteneciente a la especie *E. faecalis*, en la cual se ha descrito un cromosoma bacteriano de 3,2 Mb y tres plásmidos, uno de los cuales contiene un transposón conjugativo que porta resistencia a la vancomicina. El análisis genómico ha revelado que tanto la resistencia a antibióticos como los determinantes de virulencia están codificados por elementos genéticos móviles que podrían contribuir a la propagación de estas características a otros patógenos nosocomiales Gram-positivos. La importancia de esta transferencia de genes es aun más patente por la observación de que el 10% de las ORFs están relacionadas con profagos. Aparecen, además, integrasas cerca de islas genómicas que codifican factores de virulencia encontrados en otros patógenos Gram-positivos, incluyendo *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. sanguis* (Yother *et al.*, 2002). Otra característica interesante descrita en este estudio, es la existencia de 35 sistemas de fosfotransferasas (PTS), que dirigen la entrada de muchos azúcares al interior de las bacterias anaerobias o con metabolismo fermentador de forma dependiente de la presencia de fosfoenol piruvato (PEP). También se han identificado 17 sistemas de transducción de señales de dos componentes capaces de detectar y responder a estímulos medioambientales (Yother *et al.*, 2002). En suma, el análisis genético realizado confirma que *E. faecalis* es un organismo con una importante versatilidad genética.

2.2 Patogenicidad

Los enterococos han sido reconocidos como patógenos nosocomiales causantes de bacteremia, endocarditis e infecciones del tracto urinario entre otras (Morrison *et al.*, 1997). Pueden actuar como patógenos oportunistas causando infecciones en pacientes muy debilitados o inmunodeficientes (Morrison *et al.*, 1997). Entre los enterococos

aislados de infecciones en humanos predomina *E. faecalis* (más del 80%), mientras que *E. faecium* está asociado al 20% restante (Jett *et al.*, 1994).

Una causa que está contribuyendo específicamente a la emergencia de estas infecciones es la resistencia de los enterococos a una amplia variedad de antibióticos (Leclercq, 1997); presentan resistencia intrínseca a ciertos antibióticos codificada en determinantes genéticos cromosómicos, lo que las distingue claramente de las resistencias adquiridas localizadas en plásmidos o transposones (Franz *et al.*, 2003). Entre las intrínsecas tenemos la resistencias a cefalosporinas, β -lactámicos y sulfonamidas; ejemplos de resistencias adquiridas incluyen al cloranfenicol, eritromicina, altos niveles de aminoglucósidos, tetraciclina, altos niveles de β -lactámicos, fluoroquinolonas y glucopéptidos como la vancomicina (Murray, 1990; Leclercq, 1997). La resistencia a la vancomicina es especialmente importante ya que este antibiótico es considerado el último recurso en el tratamiento de infecciones enterocócicas con resistencias múltiples.

De todas formas, y pese a este importante factor, la resistencia por sí sola no puede explicar la virulencia de los enterococos. La patogénesis implica fenómenos de colonización y adhesión a los tejidos del hospedador, invasión de éstos, resistencia a los mecanismos de defensa del hospedador, y por último el microorganismo invasor ha de producir alteraciones patológicas, ya sea directamente mediante toxinas o indirectamente a causa del proceso inflamatorio desencadenado por el hospedador (Johnson, 1994). Entre los posibles determinantes de virulencia de esta bacteria se encuentran:

- La sustancia de agregación (SA): se trata de una adhesina codificada por plásmidos que responden a feromonas, cuya función es mediar en la formación de agregados celulares, lo que permite una alta eficiencia en la transferencia de estos plásmidos (Clewell, 1993; Dunny *et al.*, 1995). La SA contiene dos motivos aminoacídicos RGD (Arg-Gly-Asp), que promueven la adhesión de *E. faecalis* a células eucariotas, entre las que se incluyen macrófagos humanos y distintas células del epitelio intestinal (Sartingen *et al.*, 2000; Sübmuth *et al.*, 2002). La SA también une a proteínas de la matriz extracelular, como la fibronectina y la trombospondina (Rozdzinski *et al.*, 2001). También parece que promueve la internalización de los enterococos por enterocitos (Sartingen *et al.*, 2000) y que la adherencia a neutrófilos en los que luego incrementa la

supervivencia intracelular. La sustancia de agregación es por tanto considerada un importante factor de virulencia, ya que actúa a la vez como adhesina y como invasina.

- La proteína de superficie enterocócica (Esp): actúa también como una adhesina y está codificada cromosómicamente. La incidencia de Esp se ha demostrado que es mayor entre las cepas clínicas de *E. faecalis* que en las aisladas a partir de individuos sanos (Shankar *et al.*, 1999). *In vitro* la incidencia de Esp incrementa la hidrofobicidad celular, así como la adherencia a superficies inertes y a la formación de biopelículas (Toledo-Arana *et al.*, 2001).
- La adhesina de colágeno de *E. faecalis* (Ace): es otra adhesina enterocócica similar a las que se unen a las proteínas de la matriz extracelular. No sólo es capaz de unirse al colágeno (tipos I y IV), sino también a la laminina. Nallapareddy *et al* (2000) demostraron que esta proteína es expresada por los enterococos durante las infecciones en humanos. Tanto Esp como Ace contienen una región central variable. Shankar *et al* (1999) propusieron que esta variabilidad podría estar relacionada con la evasión de la respuesta inmune, pudiendo ayudar al enterococo a persistir en el hospedador.
- La citolisina o bacteriocina-hemolisina (Cyl): (descrita en el apdo XX de Introducción) es capaz de lisar eritrocitos y otras células eucariotas provocando daños tisulares; esta toxina celular incrementa la virulencia en modelos animales. En Japón se ha encontrado que el 60% de las cepas clínicas involucradas en infecciones presentan fenotipo hemolítico comparado con el 17% de las aisladas en individuos sanos (Ike *et al.*, 1987). En Alemania, sin embargo, sólo el 16% de las cepas de *E. faecalis* aisladas en sangre tenían actividad hemolítica (Elsner *et al.*, 2000). Así la citolisina está involucrada, pero no es un pre-requisito para la virulencia, ya que las cepas de enterococos no hemolíticas pueden causar infección (Jonson, 1994). La citolisina, por su capacidad de lisar células del sistema inmune, contribuye también a la supervivencia del microorganismo en el hospedador (Franz *et al.*, 2003).
- Proteasas: se cree también que están implicadas en la patología enterocócica. Destaca la gelatinasa, una metalo-endopeptidasa extracelular que actúa sobre los tejidos que contienen colágeno y cuya producción incrementa la patogenicidad en modelos animales (Coque *et al.*, 1995; Qin *et al.*, 2000).

- Superóxido extracelular: la producción de superóxido extracelular es otro rasgo asociado a la virulencia en enterococos y a la bacteremia, se cree que actuaría provocando daños tisulares (Huycke *et al.*, 1988).

2.3 Principales bacteriocinas producidas por especies del género *Enterococcus*

Son muy numerosos los trabajos que describen la producción de bacteriocinas en el género *Enterococcus*, en ocasiones referidas como enterocinas. La mayoría de los estudios han sido realizados con cepas pertenecientes a las especies *E. faecalis* y *E. faecium* (Park *et al.*, 2003; De Vuyst *et al.*, 2003). El estudio de las enterocinas ha cobrado mayor interés al ser descritas en cepas aisladas de forma natural en alimentos tales como productos lácteos (Vlaemynk *et al.*, 1993; Olasupo *et al.*, 1994; Torri Tarelli *et al.*, 1994; Fariás *et al.*, 1996), embutidos fermentados (Casaus *et al.*, 1995; Aymerich *et al.*, 1996), vegetales (McKay, 1990; Villani *et al.*, 1993; Franz *et al.*, 1996), pescados (Ben Embarek, 1994), ensilados (McKay, 1990) e incluso del tracto gastrointestinal de mamíferos y aves (Siragusa, 1992; Lauková *et al.*, 1993). En los sistemas alimentarios es posible que cumplan un importante papel en el control de la microbiota indeseable, bien patógena como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* y *Bacillus cereus*, o alterante como *Clostridium* (Piard y Desmazeaud, 1992; Nettles y Barefoot, 1993; Schillinger, 1996) frente a las cuales las enterocinas son activas. De las numerosas bacteriocinas recogidas en la Tabla 3, sólo las que han sido bien caracterizadas desde el punto de vista genético y bioquímico, serán brevemente comentadas a continuación.

2.3.1 Clase I. Lantibióticos producidos por enterococos

Citolisina (bacteriocina-hemolisina)

Algunas razas de *E. faecalis*, especialmente las de origen clínico, presentan actividad lítica frente a diversas bacterias Gram-positivas y algunas células eucariotas, incluyendo los eritrocitos. Ya en los primeros estudios, se puso de manifiesto que ambas actividades eran atribuibles a la misma sustancia que fue por ello denominada citolisina (Brock y Davies, 1963) y actualmente es considerada como uno de los principales determinantes de virulencia de estas bacterias. Se trata de un lantibiótico muy complejo que presenta un componente lítico (L) constituido por dos subunidades estructurales, Cyl_L y Cyl_S, que después de ser modificadas y secretadas al medio extracelular, deben de ser activadas por un tercer componente activador (Cyl_A) (Granato y Jackson, 1969; Ike *et al.*,

1990; Booth *et al.*, 1996). La región genética *cyl* responsable de la citolisina comprende una región de 7 kb del plásmido conjugativo pAD1 (59 Kb) de *E. faecalis* subsp. *zymogenes* (Gilmore *et al.*, 1990, 1994) y también puede encontrarse dentro de islas de patogenicidad en el cromosoma de varias cepas de *E. faecalis* (Shankar *et al.*, 2002). La región *cyl* completa contiene 8 genes denominados *cylR1*, *cylR2*, *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *cylB*, *cylA* y *cylI* (Figura 1). La expresión de este *cluster* de genes está controlado por un par de promotores divergentes que se encuentran solapados P_L y P_R (Haas *et al.*, 2002). Los genes estructurales de la citolisina (*cylL_L* y *cylL_S*), los responsables de las modificaciones postraduccionales, los de secreción y activación (*cylM*, *cylB* y *cylA*) y el gen de la inmunidad (*cylI*) se transcriben como un solo operón, mientras que los reguladores *cylR1* y *cylR2* forman un segundo operón que se transcribe en dirección opuesta.

Los productos del par génico *cylL_L* y *cylL_S*, responsables de las subunidades estructurales de la citolisina se sintetizan como propéptidos de 68 y 63 aminoácidos respectivamente, que luego son modificados postraduccionalmente por el producto de *cylM* (Booth *et al.*, 1996). CylM es una proteína de 993 aminoácidos que cataliza las modificaciones propias de los lantibióticos. CylB funciona a la vez como transportador tipo ABC y como peptidasa señal (Havarstein *et al.*, 1995) y es el encargado tanto de la secreción como de la eliminación del péptido señal de las subunidades previamente modificadas. El péptido señal de CylL_L y CylL_S comprende 24 y 36 aminoácidos respectivamente, y tras su proteólisis genera las subunidades CylL_L' y CylL_S', que una vez externalizadas, sufren una modificación a cargo del producto de *cylA* que elimina seis residuos del extremo N-terminal de cada péptido. CylA es una serín-proteasa que a su vez se sintetiza como un pre-proenzima que es secretado por el sistema *sec* (Booth *et al.*, 1996). La eliminación de los seis aminoácidos de CylL_L' y CylL_S' genera las subunidades de la bacteriocina activa CylL_L'' y CylL_S'' (Figura 1). Por otra parte, aunque está demostrado que CylI es la proteína responsable de la inmunidad, se desconoce el mecanismo por el cual confiere autoprotección (Coburn y Gilmore, 2003).

La regulación de la expresión de la citolisina es dependiente de los productos de los genes *cylR1* y *cylR2*, que curiosamente no están relacionados con miembros de la familia de los sistemas reguladores de dos componentes, y cuyo mecanismo de acción no ha sido aun esclarecido. Los datos experimentales indican que también interviene CylL_S'', lo que ha hecho proponer a Haas *et al.* (2002) la existencia de un mecanismo de *quorum sensing* autoinducible en la expresión de esta bacteriocina.

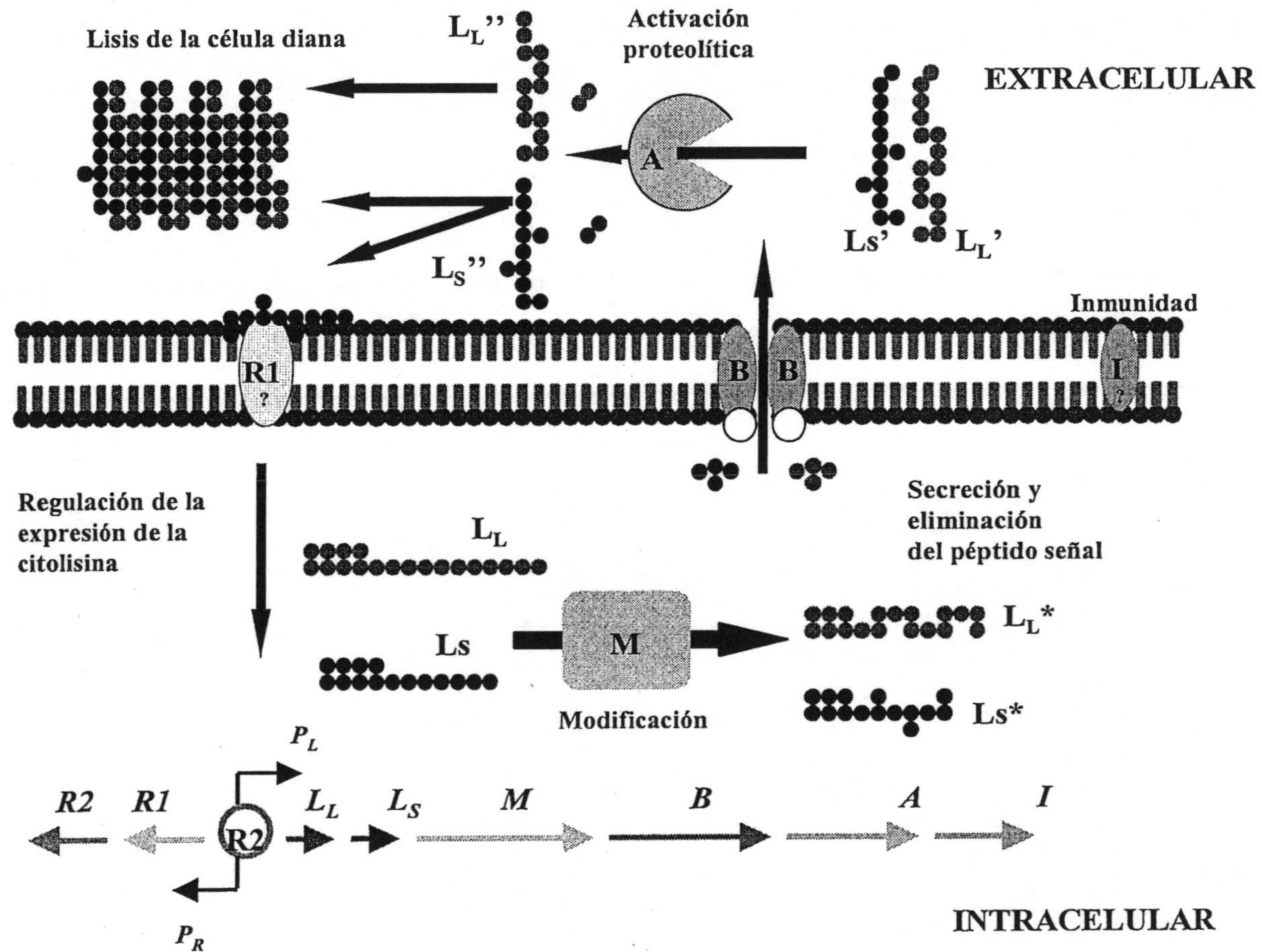


Figura 1.- Modelo de expresión de la citolisina. CylLL y CylLS son sintetizados como propéptidos y luego modificados por CylM, generando CylLL* y CylLS* respectivamente. Tras la modificación, ambas subunidades son procesadas y secretadas por CylB, dando CylLL' y CylLS' respectivamente. Una vez externalizadas, actúa CylA, que elimina en cada subunidad una secuencia de seis aa en su extremo N-terminal, lo que genera las subunidades activas CylLL'' y CylLS''. CylI es la proteína de la inmunidad. CylR1, CylR2 y CylLS'' están implicados en la regulación de la expresión de la citolisina.

2.3.2 Clase II. Péptidos termoestables no lantibióticos

Subclase IIa

Enterocina P

La enterocina P es producida por *E. faecium* P13, aislada de embutidos curados (Cintas *et al.*, 1997), aunque posteriormente ha sido descrita también en otras cepas de *E. faecium* (Herranz *et al.*, 1999; Cintas *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2002). Ent P se produce como un pre-péptido de 71 residuos que ha de sufrir la escisión del péptido señal para dar lugar a molécula madura de 44 aminoácidos (Cintas *et al.*, 1997). La secuencia del extremo amino presenta una gran homología con las bacteriocinas de la familia de las pediocinas; sin embargo el procesamiento y la secreción se realiza, a diferencia de los otros miembros de esta familia, por la vía sec-dependiente. Presenta un amplio espectro de acción que incluye a *L. monocytogenes* y un importante grupo de bacterias patógenas y alterantes de alimentos como *S. aureus*, *C. perfringens* y *C. botulinum*. En su mecanismo de acción destaca la capacidad de disipar el potencial de membrana y provocar la salida de iones K⁺ (Herranz *et al.*, 2001a y 2001b). La enterocina P reúne una serie de características interesantes en la conservación de alimentos debido a su resistencia al calor y a los procesos de congelación, liofilización y a largos períodos de almacenamiento en frío, así como su estabilidad en un amplio intervalo de pH.

Enterocina A

La enterocina A fue descrita por primera vez en *E. faecium* CTC492, aislada de embutidos españoles fermentados (Aymerich *et al.*, 1996). La proteína madura contiene 47 aminoácidos y un peso molecular de 4829, con 4 residuos de cisteína que le permiten formar puentes disulfuro intramoleculares y cuya secuencia N-terminal presenta un motivo pediocina (Aymerich *et al.*, 1996). Estudios posteriores (O'Keeffe *et al.*, 1999) han demostrado la identidad de esta bacteriocina con la enterocina 1146, producida por la cepa *E. faecium* DPC1146 perteneciente a la colección del National Dairy Products Research Centre de Irlanda (Parente y Hill, 1992). La producción de esta misma enterocina ha sido descrita también en otras razas de *E. faecium* (Casaus *et al.*, 1997; Ennahar y Deschamps, 2000; du Toit *et al.*, 2000; Herranz *et al.*, 2001; Losteintkit *et al.*, 2001; Morovsky *et al.*, 2001).

Se trata de una bacteriocina codificada por el cromosoma, cuya síntesis es inducida mediante la acción de un péptido de 25 aminoácidos, denominado EntF, el cual actúa como autoinductor. Está además demostrado que la expresión de enterocina A

depende de las condiciones ambientales: Nilsen *et al.* (1998) comprobaron que el pH óptimo de producción es 6,2 y que a pH 5,5 la producción desciende drásticamente y también se inhibe por la presencia de NaCl o etanol en el medio. La producción así mismo cesa cuando los cultivos se diluyen un millón de veces o más. En todos los casos los niveles de EntA se restauran cuando al medio se adiciona el factor inductor en cantidades suficientes.

La región *ent* completa en la cepa DPC1146 abarca 10,5 kb (O'Keeffe *et al.*, 1999), en la cual han sido identificadas 12 ORFs, aunque hasta el momento sólo se ha podido elucidar la función de siete de ellas:

- *entA*: es el gen estructural de la enterocina A, cuyo producto primario es un prepeptido de 65 aminoácidos, 18 de los cuales forman el péptido señal, que presenta un sitio de procesamiento Gly-Gly-X (motivo YGNGVXC).

- *entI*: situado sólo dos nucleótidos corriente abajo del codon stop del gen estructural, codifica una proteína de 103 aminoácidos (Aymerich *et al.*, 1996). EntI ha sido identificada como la proteína de la inmunidad, ya que en solitario es capaz de conferir resistencia a la cepa hospedadora (O'Keeffe *et al.*, 1999).

- *entF*: codifica el péptido inductor de la producción de Ent A el cual se sintetiza como un prepeptido de 41 aminoácidos, que será procesado mediante la escisión de un péptido señal de 16 aminoácidos que contiene la típica doble glicocola. Una vez maduro, EntF es un péptido catiónico e hidrófobico de 25 aminoácidos, termoestable y con un punto isoelectrico estimado de 9,88 (Nilsen *et al.*, 1998).

- *entK* y *entR*: el análisis de la secuencias de las proteínas deducidas a partir de estos genes indica que codifican un sistema regulador de dos componentes, en el que EntK es la histidina-quinasa y EntR el regulador de respuesta.

- *entT* y *entD*: codifican proteínas pertenecientes a un transportador de tipo ABC: EntT presenta un dominio característico de unión a ATP, mientras que EntD muestra importantes homologías con algunas proteínas accesorias descritas en este tipo de transportadores (Axelsson *et al.*, 1995).

La necesidad del factor de inducción en la biosíntesis de la Ent A se ha podido deducir subclonando genes de la región *ent* bajo el promotor lactocócico p32. De esta forma se ha comprobado que basta con clonar la región *entAITD* para lograr la producción de bacteriocina activa.

- ORFs 4 y 5: la proteína deducida de la secuencia de la ORF4 presenta homologías con proteasas y peptidasas señal, mientras que en el caso de la ORF5 no se han encontrado

homologías con proteínas de función conocida. Para los productos de estas dos ORFs se ha propuesto un posible papel en la maduración del péptido inductor.

-ORFs 1, 2 y 3: se transcriben en sentido opuesto al resto de la región *ent*. Sólo se han encontrado homologías para el producto de la ORF2, el cual presenta características similares a las bacteriocinas de clase II. Hasta la fecha no se les ha podido atribuir ninguna función en la biosíntesis de enterocina A.

O’Keeffe *et al.* (1999) propusieron un modelo de regulación, según el cual niveles muy bajos de EntF son suficientes para permitir la expresión a nivel basal de la región *ent*, lo que posibilita que el inductor se vaya acumulando en el medio. Cuando éste alcanza cierto umbral se une a la histidínquinasa, EntK, la cual se autofosforila y activa al regulador de respuesta, EntR, que ya se une a ciertas repeticiones directas encontradas corriente arriba de *entAIFKR*, *entTD* y de las ORFs 4 y 5, promoviendo la transcripción de toda la región *ent*. Así, cuando un cultivo productor de EntA se inocula en medio fresco con un porcentaje aprox. del 0,01%, la cantidad de factor de inducción es suficiente para mantener “encendido” el sistema, pero si las células son diluídas a niveles mucho mayores, el factor inductor resulta insuficiente y la producción de enterocina se detiene indefinidamente. El sistema actuaría así como un mecanismo de señal de *quorum*.

Enterocina CRL 35

Esta bacteriocina está producida por *Enterococcus faecium* CRL 35, aislada de muestras de queso. Es activa frente a bacterias patógenas transmitidas por alimentos, tales como *L. monocytogenes*, en las que disipa el potencial de membrana (Minahk *et al.*, 2000). Además muestra una interesante actividad antiviral, inhibiendo la multiplicación intracelular del virus del herpes simple, la primera bacteriocina en la que se describe este tipo de actividad (Wachsman *et al.*, 2003). Ent CRL 35 ha sido purificada y parcialmente secuenciada, lo que ha permitido comprobar que presenta el motivo YGNGVXC en su extremo NH-terminal (Farías *et al.*, 1996), pero sus determinantes genéticos aun no han sido localizados ni caracterizados.

Mundticinas ATO6 y KS

Estas bacteriocinas han sido caracterizadas a partir de las cepas productoras *E. mundti* ATO6, aislada de endivias y *E. mundti* NFRI 7393 procedente de forraje para ensilado. En ambos casos corresponden a un único péptido de 43 aminoácidos (Bennik

et al., 1998; Kawamoto *et al.*, 2001) y solo se diferencian en la inversión de los dos últimos aminoácidos del extremo carboxilo. Se trata por tanto de variantes naturales y que presentan el motivo YGNGVXC, y gran alta homología con bacteriocinas de tipo pediocina.

Bacteriocinas 31 y RC714

La bacteriocina 31 producida por la cepa Y1717 de *E. faecalis* (Tomita *et al.*, 1996) es un péptido de 43 aminoácidos que contiene el motivo YGNGVXC, propio de la familia de las pediocinas. El producto primario del gen estructural ha sido identificado como un péptido de 67 aminoácidos, en el que el péptido señal es altamente hidrófobo y carece de la típica doble glicocola, por lo que se ha sugerido que podría ser procesada y exportada mediante el sistema Sec (Tomita *et al.*, 1996). La bacteriocina 31 comparte homología con las bacteriocinas de la subclase IIa de las BAL (sakacinas A y P, curvacina A, carnobacteriocina MB1, pediocina PA-1 y leucocidina A) que actúan a nivel de la membrana. Su espectro de acción es muy característico y restringido a especies relacionadas, como *E. faecium* y *E. hirae* 9790, aunque también inhibe a *L. monocytogenes*, pese a que las cepas de *E. faecalis* ensayadas son resistentes. Los determinantes genéticos de la bacteriocina 31 residen en un plásmido conjugativo de 57,7 Kb, en el que ha sido localizado el gen estructural *bacA*, un segundo gen, *bacB*, que codifica una proteína de 94 aminoácidos (11 kDa) que podría ser el determinante responsable de la inmunidad, y una tercera ORF cuya función aún se desconoce. Las tres ORFs se transcriben en un mismo ARNm policistrónico, constituyendo por tanto un operón.

La bacteriocina RC714 (Del Campo *et al.*, 2001) es muy similar a la anterior, ya que sólo difiere en cinco aminoácidos de los 42 de que consta la molécula madura. Es estable al calor y en un amplio intervalo de pH. Los cambios estructurales detectados en esta variante mejoran, sin embargo, su espectro de acción que incluye especies de *E. faecalis*, *E. faecium*, *Listeria*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. El carácter productor se ha transferido en condiciones de laboratorio a *E. faecalis* JH2-2, y en este proceso se cotransfieren también los caracteres de resistencia a vancomicina y eritromicina que presenta la cepa productora.

Bacteriocina	Cepa	Espectro de actividad	Características	Referencias
Enterocina E1A	<i>E. faecium</i> E1	<i>Enterococcus</i> <i>L. monocytogenes</i>	Péptido catiónico, <10 kDa	Krämer y Brandis, 1975
Enterocina E1B	<i>E. faecium</i> E1	<i>Enterococcus</i> <i>L. monocytogenes</i>	Termosensible; resistente a proteasas	Krämer y Brandis, 1975
Bacteriocina	<i>E. faecium</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Clostridium</i>	50 kDa. Sensible a proteasas; termorresistente.	Harasawa <i>et al.</i> , 1980
Enterococcina Sf3	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Micrococcus</i>	< 9 kDa; plasmídica (pJK3, 3,5 Mda)	Krämer <i>et al.</i> , 1983
Enterocina A	<i>E. faecium</i> CTC 492	<i>Enterococcus</i> <i>Listeria</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i>	4,82 kDa; 47 a.a, 4 cys; cromosómica; inducible.	Garriga <i>et al.</i> , 1993 Aymerich <i>et al.</i> , 1996
Enterocina CCM4231	<i>E. faecium</i> CCM4231	<i>Enterococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>E. coli</i>	Sensible a proteasas, termorresistente	Lauková <i>et al.</i> , 1993
Bacteriocina Efl08	<i>E. faecium</i> 108	<i>L. monocytogenes</i>	10 kDa,. Forma agregados; sensible a proteasas; termorresistente	Dallas <i>et al.</i> , 1996
Enterocina CRL 35	<i>E. faecium</i> CRL 35	<i>L. monocytogenes</i>	Péptido de 3-4 kDa	Farías <i>et al.</i> , 1996
Enterocina B	<i>E. faecium</i> T136	<i>Lb. sake</i> <i>C. butyricum</i> <i>L. monocytogenes</i>	Aislada de muestras de embutidos. 53 a.a	Casaus <i>et al.</i> , 1997
Enterocina P	<i>E. faecium</i> P13	<i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>C. botulinum</i> <i>C. perfringens</i>	44 a.a. Termorresistente; estable a pH 2-11.	Cintas <i>et al.</i> , 1997
Enterocina L50A	<i>E. faecium</i> L50	<i>Enterococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Lactococcus</i>	44 a.a. Plasmídica. Efecto sinérgico con la enterocina L50B	Cintas <i>et al.</i> , 1998
Enterocina L50B	<i>E. faecium</i> L50	Identico al anterior pero menos activa	43 a.a. Efecto sinérgico con la enterocina L50A	Cintas <i>et al.</i> , 1998

Tabla 3.- Bacteriocinas producidas por el género *Enterococcus*.

Bacteriocina	Cepa	Espectro de actividad	Características	Referencias
Bacteriocina BC25	<i>E. faecium</i> BC25	<i>S. bovis</i>	Sensible a proteasas. < 2 kDa.	Morovsky et al., 1998
Enterococina A 2000	<i>E. faecium</i>	<i>Listeria</i> <i>Bacillus</i> <i>Streptococcus</i>	Bactericida. Sensible a proteasas.	Pantev et al., 2000
Enterocina ON-157	<i>E. faecium</i> NIAI 157	<i>E. coli</i> <i>Enterococcus</i> <i>L. sakei</i> <i>Listeria</i>	Bactericida. 2,5 kDa. Plasmídica	Ohmono et al., 2000
Enterocina Q	<i>E. faecium</i> L50	<i>Enterococcus</i> <i>Lactobacillus</i>	29 a.a. Carece de péptido señal.	Cintas et al., 2000
Bacteriocina SF 86	<i>E. faecium</i> SF86	<i>Listeria</i> <i>Clostridium</i>	Sensible a proteasas. 17,5 kDa Termorresistente.	Foulquié Moreno et al., 2003
Citolisina	<i>E. faecalis</i> var. <i>zymogenes</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>Micrococcus</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Sarcina</i>	Dos subunidades (L _L y L _S), ambas lantibióticos. Plasmídica o cromosómica	Brock y Davies 1963 Brock et al., 1963 Jacob et al., 1975 Booth et al., 1996
Bacteriocina E-1	<i>E. faecalis</i> var. <i>zymogenes</i> E-1	<i>Diplococcus</i> <i>S. pneumoniae</i>	Dializable; resistente a tripsina; termosensible.	Bottone et al., 1971
Bacteriocina E23	<i>E. faecalis</i> E23		Proteína de 310 kDa, sensible a tripsina	Nakagawa, 1979
Bacteriocina AS-48	<i>E. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> S48	Amplio espectro (incluyendo Gram-negativos)	Péptido cíclico de 7149 Da. Termorresistente; sensible a proteasas; plasmídica	Gálvez et al., 1986, 1989a, 1989b, 1989c, 1989d. Martínez-Bueno et al., 1990, 1994
Bacteriocina Bc-48	<i>E. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> S48	<i>E. faecalis</i>	Proteína de 80 kDa estable a pH 5,5-9; termosensible.	López-Lara et al., 1991
Enterocina 226 NWC	<i>E. faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> 226 NWC	<i>E. faecalis</i> <i>Listeria</i>	Péptido de 5 kDa. Termorresistente; plasmídica (pEF226, de 5,2 kb)	Villani et al., 1993

Tabla 3.- Continuación

Bacteriocina	Cepa	Espectro de actividad	Características	Referencias
Bacteriocina 31	<i>E. faecalis</i> Y1717	<i>Bacillus</i> <i>Listeria</i> <i>Staphylococcus</i>	Péptido de 43 aa. Plasmídica (pYI17, de 57,5 kb; conjugativo)	Tomita <i>et al.</i> , 1996
Bacteriocina EJ97	<i>E. faecalis</i> EJ97	<i>Bacillus</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>Staphylococcus</i>	Péptido catiónico de 5,34 kDa. Sensible a proteasas; plasmídica	Gálvez <i>et al.</i> , 1998
Enterocina 1071	<i>E. faecalis</i> BFE 1071	<i>Clostridium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i>	Formada por dos péptidos, 1071A y 1071B. Termorresistente; plasmídica.	Balla <i>et al.</i> , 2000
Enterocina SE-K4	<i>E. faecalis</i> K4	<i>Enterococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Clostridium</i> <i>L. monocytogenes</i>	5 kDa; producida por una cepa termófila; plasmídica	Eguchi <i>et al.</i> , 2001
Enterocina RJ-11	<i>E. faecalis</i> RJ-11	Amplio espectro	Termorresistente; sensible a proteasas. 5 kDa.	Yamamoto <i>et al.</i> , 2003
Enterolisina A	<i>E. faecalis</i> LMG 2333	<i>Lactobacillus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Pediococcus</i>	Clase III; 316 a.a. Péptido señal con la doble Gly.	Nilsen <i>et al.</i> , 2003
Hiraecina S	<i>E. hirae</i> C311	<i>E. faecalis</i> <i>Listeria</i>	Sensible a proteasas; termorresistente.	Siragusa, 1992
Enterocina 416K1	<i>E. casseliflavus</i> IM416K1	<i>Listeria</i>	Bactericida; 5 kDa; Termorresistente, Plasmídica	Sabia <i>et al.</i> , 2002
Mundticina ATO6	<i>E. mundtii</i> ATO6	<i>Listeria</i> <i>Clostridium</i>	Termorresistente; activa en un amplio rango de pH.4,3 kDa	Bennik <i>et al.</i> , 1998
Mundticina KS	<i>E. mundtii</i> NFRI 7393	<i>Listeria</i> <i>Salmonella</i>	43 a.a. Plasmídica	Kawamoto <i>et al.</i> , 2002
Enterocina 012	<i>E. gallinarum</i> 012	<i>Listeria</i> <i>Salmonella</i> <i>Clostridium</i>	3-4 kDa. Sensible a proteasas;bactericida.	Jennes <i>et al.</i> , 2000

Tabla 3.- Continuación

Subclase IIb**Enterocina 1071**

Originalmente descrita en *E. faecalis* BFE 1071, presenta un espectro de acción muy reducido, y su actividad antimicrobiana depende de la acción conjunta de dos péptidos, denominados enterocina 1071A y 1071B (Balla *et al.*, 2000). Ambos péptidos son sensibles a proteasas, estables al calor y en un amplio intervalo de pH; contienen el sitio de procesamiento con la doble glicocola y carecen de puentes disulfuro, así como del motivo pediocina. Ent 1071A y 1071B muestran una similitud del 61 y 64% con los péptidos alfa y beta de la lactococcina G respectivamente. Sus determinantes genéticos están codificados en el plásmido pEF1071 (50 Kb).

La enterocina 1071 también es producida por la estirpe *E. faecalis* FAIR-E 309 (Franz *et al.*, 2002), con la única diferencia que el prepéptido 1071B producido por FAIR-E 309 contiene tres aminoácidos menos (Franz *et al.*, 2002).

Subclase IIc**Enterocinas L50A (Enterocina I) y L50B**

La caracterización genética de la que había sido caracterizada como enterocina L50 producida por *Enterococcus faecium* LC50 (antes *Pediococcus acidilactici* P50; Cintas *et al.*, 1995) puso de manifiesto la existencia de dos ORFs que codificaban sendos péptidos con secuencias aminoacídicas compatibles con la previamente determinada para dicha bacteriocina. Estas ORFs codificaban péptidos de 44 (L50A) y 43 aminoácidos (L50B) idénticos en un 70 % (Cintas *et al.*, 1998). La repurificación de la enterocina L50 confirmó la existencia de ambos péptidos, que fueron secuenciados y las secuencias génicas correspondientes identificadas en el plásmido pCIZ1 de 50 Kb. Ambas bacteriocinas muestran actividad por separado (a diferencia de aquellas bacteriocinas de la subclase IIb cuya acción depende de la presencia de dos péptidos), si bien, sobre todo frente a algunas cepas, ejercen un efecto sinérgico. Más recientemente se ha descrito que la raza L50 produce otras dos bacteriocinas, las enterocinas P y Q (Cintas *et al.*, 2000). La producción de enterocinas L50 y P ha sido también descrita en otras razas de *E. faecium* (Moreno *et al.*, 2002).

La purificación y caracterización de la enterocina I a partir de *Enterococcus faecium* 6T1a, aislada a partir de aceitunas verdes fermentadas (Floriano *et al.*, 1998) arrojó una sorprendente identidad (100 %) con la enterocina L50A. El estudio de los determinantes genéticos de esta bacteriocina, localizados en un plásmido de 23 Kb, puso

de manifiesto la existencia de una organización idéntica a la encontrada en la cepa L50, en lo que se refiere a la existencia de dos ORFs contiguas: la primera de ellas responsable de la enterocina I y la segunda muestra una secuencia idéntica en un 72,7 % a la anterior. Si bien esta segunda ORF sugiere la existencia de una segunda bacteriocina, que no ha sido identificada. El rasgo más destacable de estas bacteriocinas es la ausencia de un péptido señal, lo que sugiere la existencia de mecanismos de secreción distintos a los descritos, basados en el reconocimiento de péptidos señal. Además, permite la síntesis de bacteriocina madura en el interior celular -a diferencia del resto de las bacteriocinas, que se sintetizan como precursores inactivos y son activados durante el proceso de secreción-, lo que hace suponer que las células productoras deben poseer mecanismos de protección que actúen desde el interior. En este sentido, en ninguna de las cepas descritas anteriormente se han encontrado ORFs corriente debajo de los genes estructurales que codifiquen posibles proteínas de inmunidad (Cintas *et al.*, 1998; Floriano *et al.*, 1998).

Enterocina EJ97

La enterocina EJ97 es una bacteriocina catiónica de bajo peso molecular (5323 Da) producida por *Enterococcus faecalis* EJ97, aislada en aguas residuales urbanas. Ent EJ97 tiene un modo de acción bactericida y bacteriolítico, y muestra actividad frente a numerosas bacterias Gram-positivas, en especial frente *Enterococcus* y diversas especies de bacterias patógenas como *Listeria*, *Bacillus* y *Staphylococcus aureus* (Gálvez *et al.*, 1998). Esta bacteriocina es sensible a proteasas pero muestra gran estabilidad a la desecación, así como a los disolventes orgánicos, agentes reductores y agentes quelantes. Es así mismo estable en un amplio intervalo de pHs y de temperaturas, características éstas que podrían ser de utilidad para su aplicación como bioconservante en alimentos sometidos a pasteurización o congelación (Gálvez *et al.*, 1998). Al igual que las bacteriocinas antes descritas, la bacteriocina EJ97 carece de péptido señal que participe en el mecanismo de secreción (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2003), lo que permite suponer que EJ97 no requiere ningún tipo de procesamiento postraduccional, de forma similar a las enterocinas L50A y L50B de *E. faecium* LC50 (Cintas *et al.*, 1998) o la Ent I de *E. faecium* 6T1a (Floriano *et al.*, 1998), aunque no existen homologías estructurales entre ellas, ni con otras bacteriocinas depositadas en los bancos de secuencias de proteínas. Se trata por tanto de una nueva clase de bacteriocinas que podrían seguir la vía Sec para su secreción.

Los determinantes genéticos de EJ97 han sido localizados en el plásmido conjugativo pEJ97 (60 Kb), y la región codificante se encuentra flanqueada por una estructura similar a un transposón, en el que se han identificado y secuenciado un gen de transposasa y otro de resolvasa (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2003).

La región *ej97* (Figura 2) está constituida por cuatro genes identificados y tres posibles ORFs (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2003):

- *ej97A*: es el gen estructural de 132 pb, cuyo producto coincide exactamente con la secuencia de 44 aminoácidos de la Ent EJ97.

- *ej97B*: codifica para una proteína de 583 aminoácidos que presenta los motivos Walker A y B, característicos de la superfamilia de las proteínas transportadoras dependientes de ATP (transportadores ABC) (Kolter y Moreno, 1992). Los transportadores ABC podrían participar tanto en la secreción como en los procesos de maduración (Young y Holland, 1999) y en algunos casos pueden estar implicados en el incremento de la inmunidad (Diaz *et al.*, 2003).

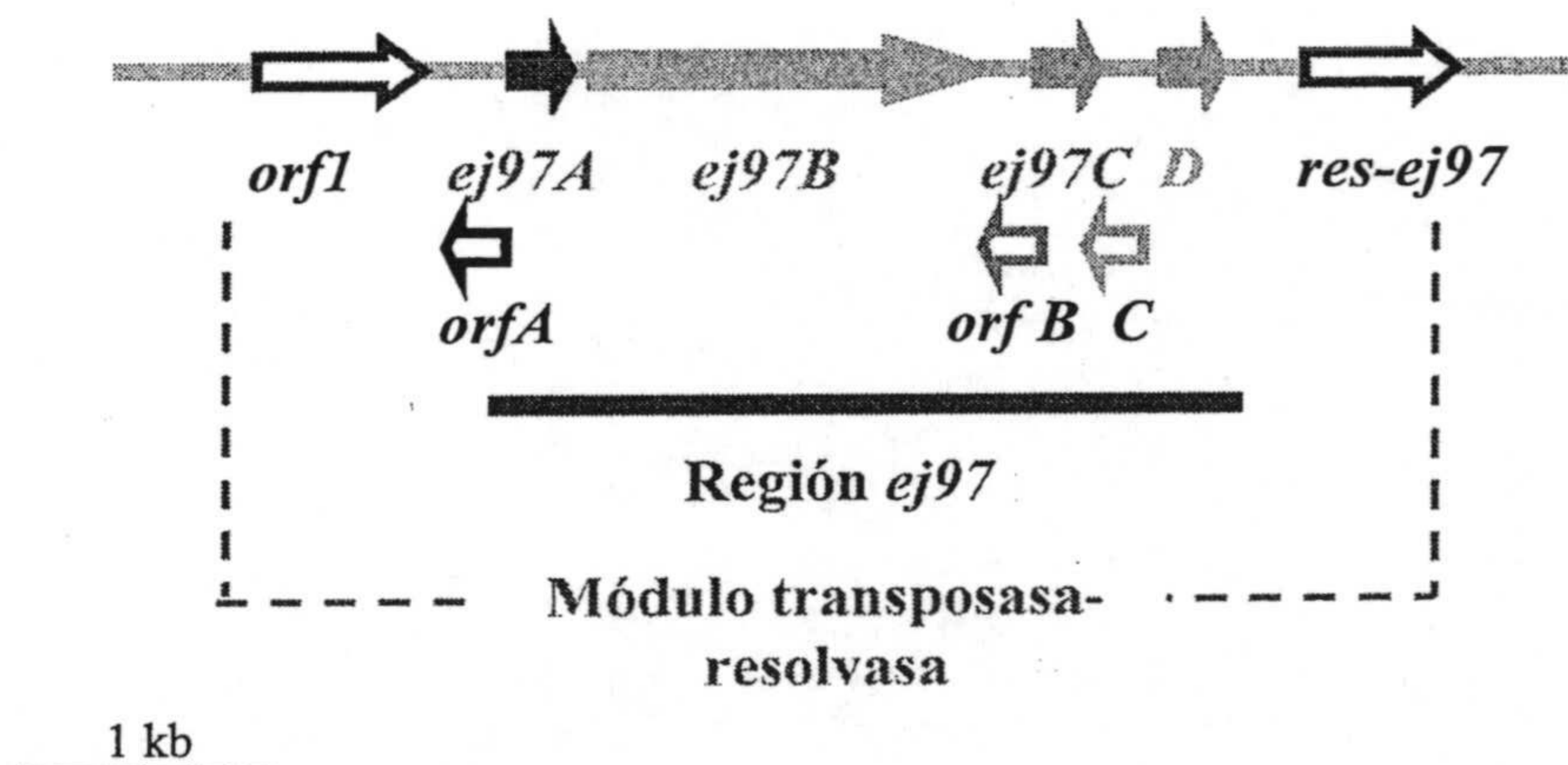


Figura 2.- Mapa físico de la región génica *ej97*. La dirección de las flechas indica el sentido de transcripción de los genes.

- *ej97C* y *ej97D*: codifican sendos péptidos, de naturaleza básica e hidrofóbica, de 71 y 64 aminoácidos respectivamente. No muestran homología con secuencias de otras proteínas disponibles en las bases de datos, y se piensa que podrían actuar como proteínas accesorias para la secreción y/o inmunidad.

- *orfA*, *orfB* y *orfC*: estas tres ORFs que se transcriben en sentido opuesto al resto de los genes *ej97*, podrían traducirse en péptidos de 51, 70 y 38 aminoácidos respectivamente, con funciones desconocidas.

La región *ent* se encuentra flanqueada por dos genes identificados con una trasposasa y una resolvasa (Figura 2):

- *orf1*: codifica una proteína de 229 aminoácidos con un grado de homología variable con la trasposasa de la secuencia de inserción ISS1 de *L. lactis*, IS1216 de *E. hirae* y con algunos transposones de *E. faecalis* (Tn916, Tn917).

- *orf6 (res-ej97)*: codifica una proteína de 213 aminoácidos que muestra un 97,2% de identidad con la resolvasa del plásmido pAM373.

Esta organización sugiere una estructura de tipo transposón, que podría facilitar la movilidad de la región *ent* del plásmido al cromosoma, así como a otras cepas, en especial en el caso del plásmido pEj97 que es conjugativo ya que contiene los genes de respuesta a feromonas, lo que redundaría en la movilidad de este carácter.

Subclase IIe

El único representante de este grupo en el género *Enterococcus*, en el que se encuentran bacteriocinas circulares, es la enterocina AS-48 a la que, al ser objeto de esta Memoria, le dedicaremos un apartado mas adelante.

Subclase II f

Enterocina B

Muchas razas productoras de enterocina A producen una segunda bacteriocina, denominada enterocina B, que actúa de modo sinérgico con la primera. La Ent B fue aislada y caracterizada en *E. faecium* T136, procedente de embutidos fermentados (Casaus *et al.*, 1997). También ha sido referida su producción en *E. faecium* CTC492, la cual es, además, idéntica a la enterocina 900 producida por la cepa *E. faecium* BFE 900 aislada de aceitunas negras de mesa (Franz *et al.*, 1996, 1999) y a la enterocina 81 producida por la raza de *E. faecium* WHE 81, que fue aislada en muestras de queso (Ennahar *et al.*, 2001). En todo caso se trata de enterocinas que se sintetizan como un prepéptido de 73 aminoácidos que presenta el sitio de procesamiento Gly-Gly-X. La eliminación del péptido señal conduce a la enterocina madura (53 aminoácidos).

En la cepa CTC492 se ha demostrado que la producción de las Ents A y B, se encuentran reguladas por EntF (Nilsen *et al.*, 1998). Sin embargo, la producción de la enterocina B en la raza BFE 900, es de expresión constitutiva por lo que no responde al regulador (Franz *et al.*, 1999). Al igual que ocurre con la enterocina A, la enterocina B es activa frente a bacterias Gram-positivas, incluyendo *L. monocytogenes*, y ambas son

consideradas de interés para el control de esta bacteria en alimentos cárnicos (Aymerich *et al.*, 2000).

2.3.3 Clase III. Enterocinas termolábiles

Bacteriocina Bc-48

La cepa *E. faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48, estirpe productora de la bacteriocina AS-48, así como su mutante B-48-28 (AS-48⁻) secretan la bacteriocina Bc-48 (López-Lara *et al.*, 1991). Esta molécula ha sido purificada a homogeneidad y consiste en una proteína (80 KDa) estable en un intervalo de pH de 5,5 a 9 pero sin embargo sensible a temperaturas superiores a 45 °C. Su espectro de inhibición es muy estrecho, restringido a cepas de *E. faecalis*, en las que inhibe la síntesis de proteínas, aunque su actividad no afecta a la captación de aminoácidos (López-Lara *et al.*, 1991)

Enterolisina A

Recientemente caracterizada (Nilsen *et al.*, 2003), la enterolisina A está producida por la cepa de *E. faecalis* LMG 2333, la cual fue aislada a partir de una muestra de pescado en Islandia. Se sintetiza como una preproteína de 343 a.a, 27 de los cuales forman un péptido señal de tipo sec-dependiente, este proceso de síntesis parece estar regulado por el pH del medio. La proteína madura, de 316 a.a, actúa de forma bacteriolítica, degradando la pared de las células sensibles. Su espectro de acción aunque es relativamente amplio, está restringido a otras bacterias del ácido láctico.

3. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS

La efectividad de las bacteriocinas de las BAL en sistemas alimentarios o alternativamente, la implantación de cepas bacteriocinogénicas en los mismos, puede verse limitada por el estrecho espectro de acción de algunas bacteriocinas, o bien por la pérdida espontánea de la capacidad de producción, la escasa adaptación de la cepa salvaje al ambiente alimentario, o incluso por la alteración de las cualidades organolépticas del alimento y/o emergencia de bacterias resistentes a la bacteriocina (Daeschel, 1993; Holzapfel *et al.*, 1995; Schillinger *et al.*, 1996). En estas situaciones, la producción heteróloga de las bacteriocinas puede ofrecer soluciones alternativas encaminadas a cubrir múltiples objetivos:

- Investigación básica de las funciones de las proteínas y péptidos recombinantes.

- Facilitar el control transcripcional y/o traduccional de la expresión de los genes recombinantes.
- Lograr niveles de producción mayores a los existentes en las estirpes salvajes (Makrides, 1996).
- Construir cepas multibacteriocinogénicas y conferir propiedades antimicrobianas a cepas de interés biotecnológico, como las que se utilizan en los cultivos iniciadores.

E. coli ha sido considerada durante mucho tiempo como el hospedador procariota de elección para la clonación y expresión heteróloga de genes, debido a la exhaustiva caracterización genética de esta bacteria. Muchos de sus procesos biológicos son bien conocidos y hay disponibles un amplio rango de herramientas genéticas para su manipulación (Billman-Jacobe, 1996). En consecuencia, esta bacteria ha sido seleccionada invariablemente como primer hospedador para la clonación de una variedad de genes involucrados en la biosíntesis de muchas bacteriocinas de las BAL. Aunque todo ello sea cierto, es claro que un único organismo no puede ser adecuado para múltiples aplicaciones y, además se ha demostrado que algunos genes no son eficientemente expresados en esta bacteria. Ello se puede deber entre otras cosas, a las diferencias en el uso de codones (que tiene aprox. un 50% de G+C, comparado con el 35% encontrado en las regiones codificantes de las BAL), y posiblemente también a que las proteínas recombinantes puedan ser tóxicas para este hospedador y las características estructurales de los genes recombinantes puedan presentar inestabilidad y/o falta de eficiencia traduccional de sus ARNm. Por otra parte, al tratarse de un microorganismo Gram-negativo, posee una pared celular muy diferente a las de las BAL y carece de los mecanismos de secreción requeridos para la producción eficiente de la proteína recombinante al medio. Aun más, la proteína o el péptido heterólogo puede ser objeto de la degradación por proteasas celulares (Makrides, 1996). Finalmente, otro hecho importante es que *E. coli* no tienen el *estatus* de microorganismo seguro (GRAS), mas bien al contrario es reconocido como patógeno alimentario. Todas estas consideraciones han llevado a los investigadores a buscar hospedadores alternativos para la expresión y producción de proteínas recombinantes de utilidad en la industria alimentaria.

En este contexto, han ido surgiendo microorganismos alternativos a *E. coli* y se han desarrollado herramientas necesarias para su manipulación genética que es, finalmente, lo que dicta la extensión de su utilidad o efectividad. En este sentido, algunas especies de las BAL, como *Lactococcus lactis* están demostrando ser muy versátiles para la expresión

heteróloga de bacteriocinas, por lo que en los últimos años se están desarrollando mecanismos para mejorar la estabilidad de los genes expresados, así como el mantenimiento y control de la expresión, incrementando de esta forma el potencial de utilidad de este microorganismo (Venema *et al.*, 1999; Konings *et al.*, 2000). Todo esto, junto con el hecho que esta bacteria sea considerada un organismo GRAS, lo convierte en un hospedador muy adecuado para la producción heteróloga de este tipo de sustancias de importancia comercial (Billman-Jacobe, 1996).

Las estrategias de producción heteróloga seguidas hasta el momento, se pueden agrupar en dos modalidades:

1.- Aquellas que utilizan la maquinaria biosintética original o nativa, lo que exige clonar toda la región genética responsable de la bacteriocina en un vector apropiado para su expresión en la cepa hospedadora. Es, con diferencia, el sistema más utilizado y el único potencialmente efectivo en el caso de bacteriocinas que requieren complejas modificaciones postraduccionales, como es el caso de los lantibióticos y de la enterocina AS-48;

2.- Las que aprovechan los sistemas de secreción existentes en la cepa hospedadora. En este caso, basta con clonar el gen estructural en fase con el péptido señal original y el gen de la inmunidad. Hay a su vez dos variantes:

2.a- Los que utilizan un transportador de tipo ABC, utilizado también por otra bacteriocina, y en cuyo caso, el péptido señal es reemplazado por el de tal bacteriocina cuyo sistema secretor ya existe en la célula hospedadora. Este sistema resulta muy interesante para la obtención de cepas multibacteriocinogénicas. En la práctica, sin embargo, el péptido quimérico no resulta muy eficiente ya que ha de competir con la bacteriocina nativa por el sistema secretor, de forma que generalmente sólo esta última es secretada a niveles adecuados.

2.b.- Utilizar el sistema general de secreción (Sec), que exige sustituir el péptido señal de la bacteriocina a clonar por otro capaz de ser reconocido por este sistema, cuya secuencia ha de ser clonada en fase con el de la bacteriocina madura.

Hasta el momento, aunque los resultados son preliminares, parece más eficiente el empleo del mecanismo de secreción mediado por transportadores de tipo ABC específicos, de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio comparativo de producción heteróloga de mesentericina Y105, en el cual se comprobó que se

alcanzaban niveles 4 veces inferiores cuando era secretada por el sistema Sec (Biet *et al.*, 1998).

La secreción heteróloga, aún en desarrollo, se enfrenta a problemas relacionados con la inestabilidad y baja eficiencia en la producción, que en algunos casos están siendo solventados empleando promotores fuertes o bien inducibles, así como seleccionando vectores con alto número de copias, para, en último término, favorecer la sobreexpresión génica (Rodríguez *et al.*, 2002).

Un repaso a la literatura científica, permite conocer las principales dificultades que se producen en el desarrollo de sistemas que permiten la expresión heteróloga de las bacteriocinas, que resulta tanto más dificultosa cuanto más alejadas se encuentren desde el punto de vista filogenético las cepas productoras (original y hospedadora). Como ejemplo comentaremos la producción heteróloga de la enterocina A, una bacteriocina inducible, producida por *E. faecium* (Aymerich *et al.*, 1996), cuyas características han sido comentadas anteriormente. O’Keeffe *et al.* (1999) clonaron la región *ent* completa (10,5 Kb) en el vector bifuncional pCI372 de *E. coli-L. lactis*. Los transformantes de *L. lactis* IL1404 y MG1363 no fueron capaces de producir la bacteriocina, ni siquiera en placas adicionadas con el factor de inducción. Sólo se logró la producción de pequeñas cantidades de Ent A en la cepa IL1404, cuando la región fue clonada bajo el promotor p32 de *Lactococcus*, aunque los transformantes obtenidos en este caso sólo producían en medio sólido y presentaban gran inestabilidad fenotípica (O’Keeffe *et al.*, 1999). Este mismo plásmido recombinante fue empleado para transformar la cepa OG1X de *E. faecalis* y, en este caso, los transformantes produjeron Ent A en medios sólidos y líquidos adicionados del inductor.

De forma similar, cuando Chikindas *et al.* (1995) subclonaron los genes *ped* bajo el promotor p32 consiguieron la hiperproducción de la pediocina PA-1 producida por *P. acidilactici* PAC1.0, en la cepa de *P. pentosaceus* PPE1.2, obteniendo cantidades 4 veces superiores a la producida por la estirpe salvaje. Los transformantes de *L. lactis* IL1403 con la misma construcción, producían sin embargo la pediocina PA-1 en concentraciones casi indetectables (<1% respecto a la producida por la cepa salvaje).

De todo ello se deduce que el diseño de un sistema de expresión eficiente para la producción de proteínas recombinantes depende de numerosos factores, que incluyen las características del crecimiento celular, los niveles de expresión, la localización final del producto recombinante, las modificaciones postraduccionales y, en el caso de la expresión heteróloga de proteínas con un posible empleo comercial, los aspectos reglamentarios de

su posterior uso (Makrides, 1996). Además, dado que los sistemas de expresión requieren células hospedadoras y elementos genéticos que implican señales de transcripción y traducción, factores reguladores, genes y plásmidos (cuya estabilidad y número de copias puede variar), la elección de cada componente puede ser crítica para el éxito de la investigación.

4. ENTEROCINA AS-48

Los primeros datos sobre la enterocina AS-48 fueron publicados por Gálvez *et al.* en 1985, dentro de un estudio acerca de la producción de sustancias tipo bacteriocina en el género *Enterococcus*. De un total de 90 cepas analizadas, 36 producían esta clase de antagonistas y en concreto la cepa productora de AS-48 fue identificada como *Enterococcus faecalis* subsp *liquefaciens* S-48. Esta cepa además produce una segunda bacteriocina de alto Pm (80 kDa), denominada Bc-48 y perteneciente a la Clase III, que está codificada plasmicamente y muestra un estrecho espectro de acción, (López-Lara *et al.*, 1991). Poco después, mediante tratamientos clásicos de curación de plásmidos (bajas concentraciones de anaranjado de acridina y bromuro de etidio), se conseguía en nuestro laboratorio el mutante A-48-32, que producía únicamente la enterocina AS-48 (Martínez-Bueno *et al.*, 1990).

Dentro de las BAL y cada vez con mayor frecuencia, hemos visto cómo una misma bacteriocina puede ser producida por distintas cepas o incluso por diferentes especies bacterianas. Se trata en realidad de variantes naturales con pequeñas diferencias en cuanto a la composición aminoacídica, los niveles de producción o incluso el espectro de inhibición de las mismas (Maqueda *et al.*, 1998). Este ha sido también el caso de la enterocina AS-48 publicada bajo diferentes nombres, como la enterococina EFS2, producida por una cepa de *E. faecalis* aislada de una muestra de corteza de queso (Maisnier-Patin *et al.*, 1996), o la enterocina 4 (Joosten *et al.*, 1996), y la bacteriocina 21 (Tomita *et al.*, 1997), y por último la producción de AS-48 también ha sido recientemente referida en la cepa 7C5 de *E. faecium* (Folli *et al.*, 2003).

4.1 Características bioquímicas de AS-48

La producción de AS-48 tiene lugar en diversos tipos de medios, tanto sólidos como líquidos, desde el comienzo de la fase exponencial de crecimiento, indicando que

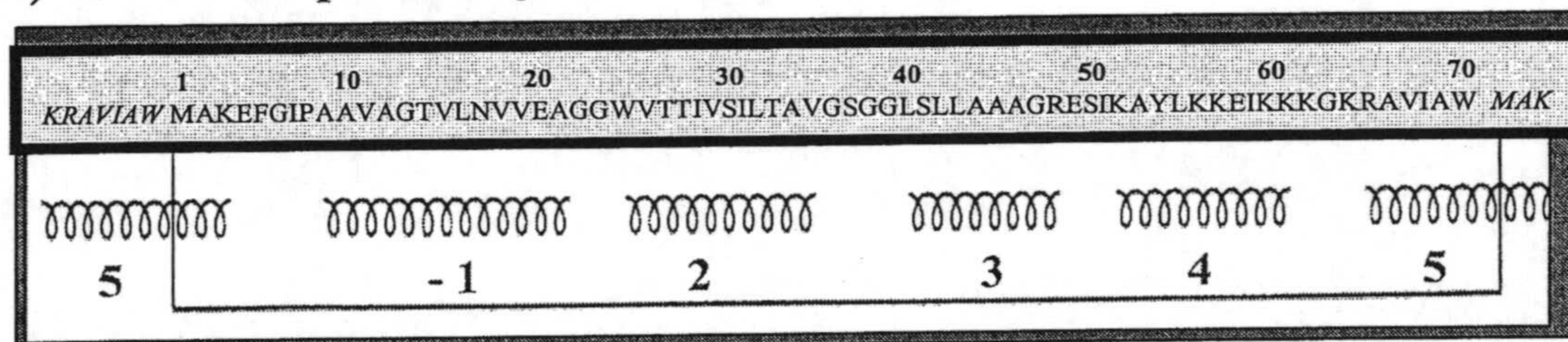
se trata de un metabolito primario (Gálvez *et al.*, 1986). Se trata de una molécula de naturaleza exclusivamente peptídica, y por tanto sensible a diversas endopeptidasas (tripsina, proteinasa K o proteasa V-8), no obstante, su carácter circular le confiere resistencia a las exopeptidasas. Es muy estable y activa en un amplio intervalo de pH (3 a 9) (Gálvez *et al.*, 1986; Abriouel *et al.*, 1998) y muy resistente al calor (Abriouel *et al.*, 2001). El análisis de su composición en aminoácidos muestra, además de la ausencia de cisteína o de los aminoácidos modificados propios de los lantibióticos, una alta proporción de aminoácidos básicos, lo que explica su carácter fuertemente catiónico (pI = 10,5). Además contiene una gran cantidad de residuos hidrófobos (Ala, Pro, Val, Met, Ile, Leu y Phe) e hidrofílicos sin carga neta (Ser, Gly, Thr, y Tyr) (Gálvez *et al.*, 1989a). De acuerdo con estas características estructurales, AS-48 se puede encuadrar entre los péptidos catiónicos antibacterianos, cuya producción se ha referido tanto en bacterias: nisina (Hurst, 1981), carnocina UI49 (Stoffels *et al.*, 1992), lactocina S (Mørtvedt *et al.*, 1991), pep-5 (Sahl y Brandis, 1981), subtilina (Gross *et al.*, 1973), bacteriocina C3603 (Ikeda *et al.*, 1982), como en varios tipos de células eucariotas: NK-lisina (Andersson *et al.*, 1995), magainina (Matsuzaki *et al.*, 1997). Sin embargo, la carencia de lantionina, su estructura circular y su capacidad de inhibir a bacterias Gram-negativas, diferencian a AS-48 claramente de los péptidos referidos.

Se ha establecido la estructura primaria de AS-48 y también su masa molecular (7149,25) mediante espectrometría de masas con MALDI-TOF. Este valor se corresponde exactamente con el calculado sumando la masa de los diferentes residuos de AS-48, y restando la de una molécula de agua, liberada durante la formación de la unión peptídica cabeza-cola, responsable de la ciclación de la molécula. Tal hipótesis ha sido confirmada confrontando los resultados de la secuenciación del gen estructural de AS-48 (Martínez Bueno *et al.*, 1994) con los de la secuencia aminoacídica de los fragmentos obtenidos mediante digestión del péptido con las endoproteinasas Glu-C y Lys-C (Samyn *et al.*, 1994). Fue el primer ejemplo de modificación postraducciona de un péptido que da lugar a una molécula con estructura circular, surgida de la unión de los residuos situados en ambos extremos, ¹Met y ⁷⁰Trp, tras la separación del péptido señal.

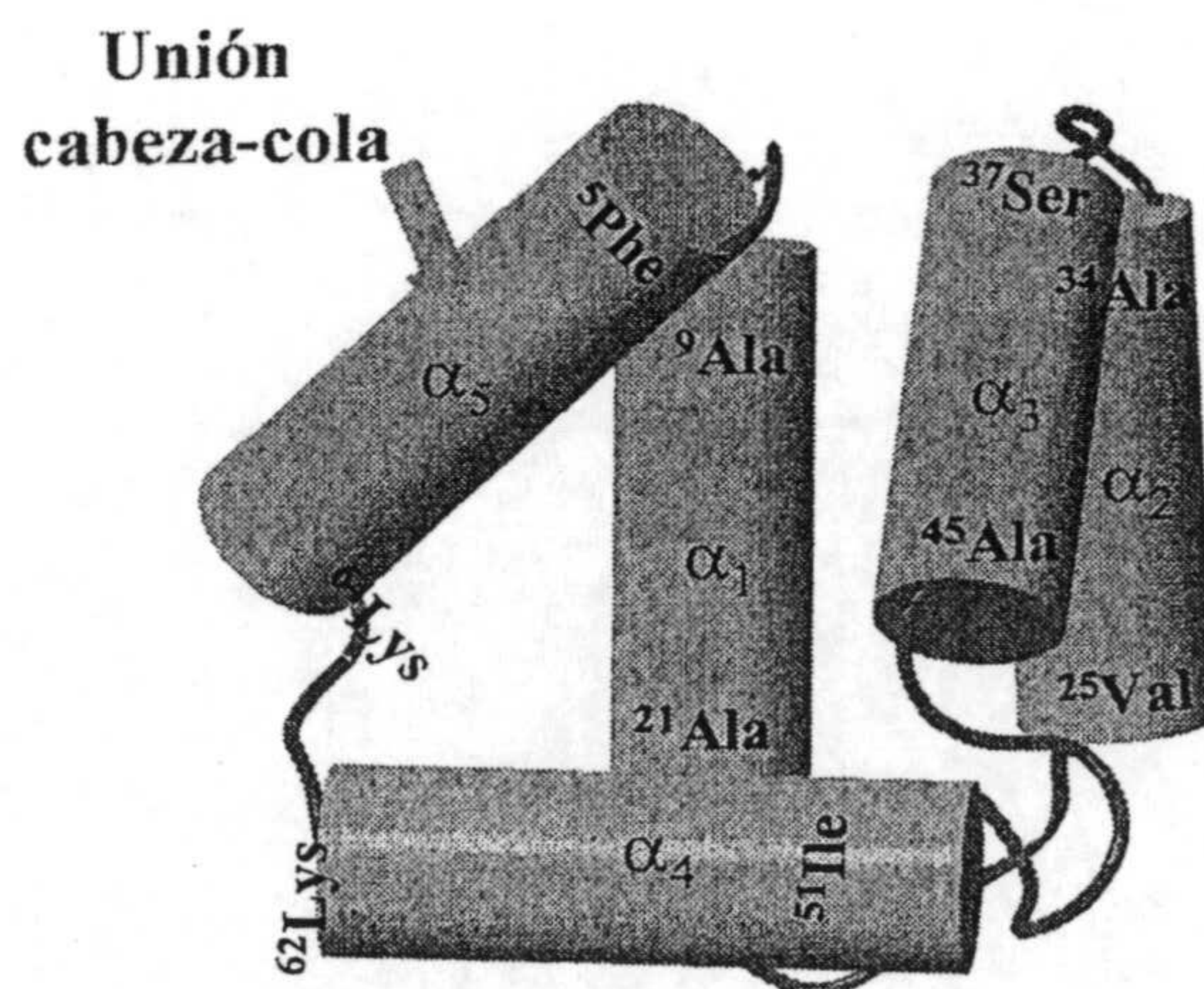
Recientemente se ha realizado un estudio de resonancia de protones (¹H RMN) de AS-48 en solución acuosa, cuyos resultados han permitido establecer la estructura secundaria de este péptido (Langdon *et al.*, 1998), requisito imprescindible para la resolución de su estructura tridimensional. AS-48 se encuentra plegada en cinco hélices

α de acuerdo con la topología indicada en la Figura 3. Las cinco hélices corresponden a los residuos Ala⁹-Ala²¹ (α -1), Val²⁵-Ala³⁴ (α -2), Ser³⁷-Ala⁴⁵ (α -3), Ile⁵¹-Lys⁶² (α -4) y Lys⁶⁴-Phe⁵ (α -5) que se encuentran conectadas por cortas regiones de giro. Esta organización da lugar a una fuerte acumulación de cargas positivas en una zona superficial de la proteína, lo que se considera determinante de su actividad formadora de poros en las membranas bacterianas (González *et al.*, 2000). La estructura global de AS-48 aparece muy compacta, con las cadenas laterales hidrofóbicas de las helices α formando el corazón de la proteína (Figura 3). Sin embargo resultados obtenidos en el análisis de cristales de AS-48 con Rayos X han permitido comprobar que AS-48 es una molécula flexible, capaz de adaptar su estructura molecular a las condiciones ambientales (Sanchez-Barrena *et al.*, 2003). De hecho se ha podido comprobar que la molécula adopta dos formas diméricas: (Figura 4) abreviadas como DF-I y DF-II que pueden explicar el mecanismo de inserción en membrana descrito para esta bacteriocina (Maqueda *et al.*, 2004, Sanchez-Barrena *et al.*, 2003).

A) Estructuras primaria y secundaria



B) Estructura 3D



B) Estructura terciaria

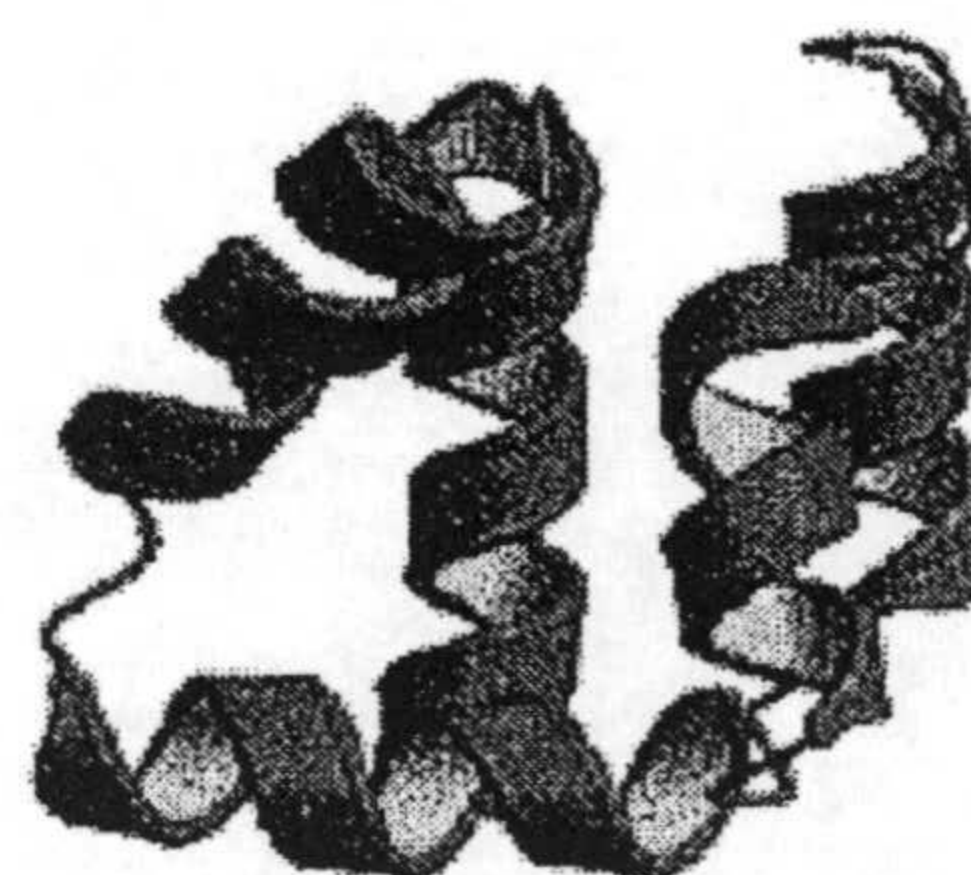


Figura 3.- Estructura primaria y secundaria (A), tridimensional (B) y terciaria (C) de la enterocina AS-48.

Es un hecho indiscutible que la ciclación confiere una gran estabilidad a la molécula, como lo demuestra, los resultados obtenidos en un estudio sobre la

desnaturalización térmica de AS-48, que requiere temperaturas superiores a los 102°C (Cobos *et al*, 2001). A ello se une la distribución asimétrica de las cargas en superficie, que parece importante para desempeñar su función biológica, y la unión cabeza-cola que se produce en mitad de la 5ª hélice α , factores todos ellos que tienen un profundo efecto en la estabilidad de la estructura tridimensional de AS-48. Ello permite explicar las condiciones extremas en las que se produce el desplegamiento de la molécula, que requiere altas concentraciones de guanidina ($> 7M$). Los estudios cinéticos del desplegamiento-replegamiento de la proteína, muestran que se trata de una de las proteínas globulares con mayor velocidad de plegamiento descritas hasta el momento, recuperando la conformación original al restablecerse las condiciones iniciales. Este hecho, de nuevo está relacionado con el bajo coste entrópico de este proceso, debido a la circularización de la cadena polipeptídica (Cobos *et al.*, 2002).

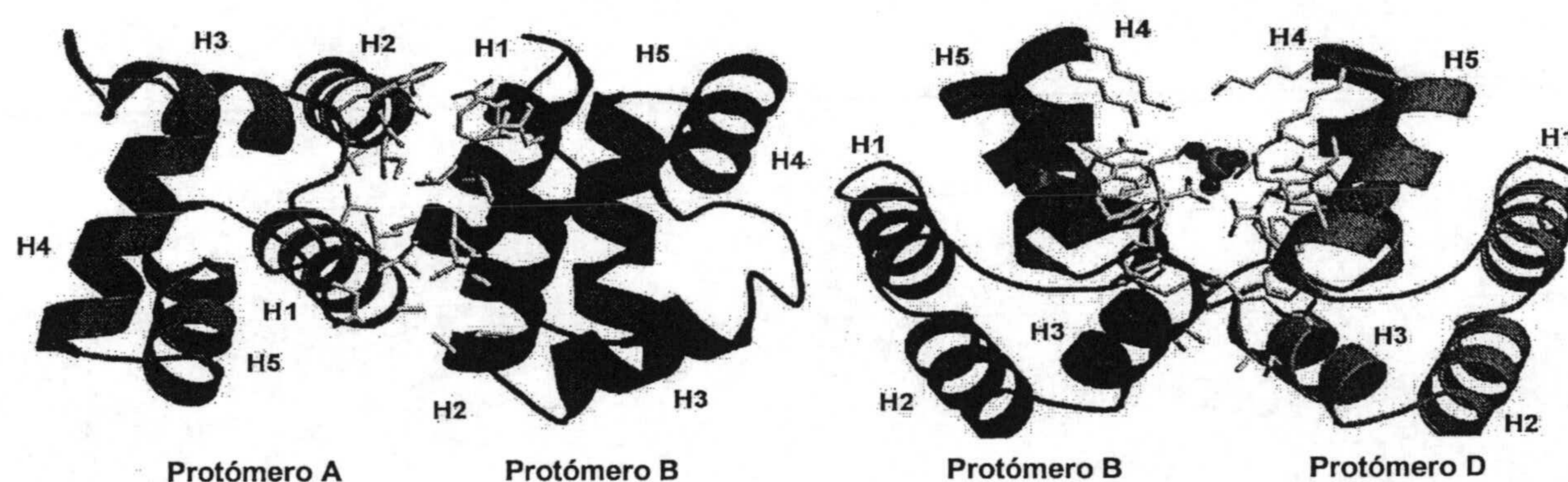


Figura 4.- Formas diméricas adoptadas por la molécula de AS48.

4.2 Actividad biológica y mecanismo de acción de AS-48

AS-48 presenta actividad bactericida sobre la mayoría de las bacterias Gram-positivas ensayadas, siendo especialmente sensibles las estirpes de *Enterococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Planococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Nocardia*. Estos tres últimos géneros, que tienen en común la presencia de ácidos micólicos en la pared celular son los que presentan mayor sensibilidad. Tal vez la incrementada naturaleza hidrofóbica de esta estructura facilita la unión y el acceso de la molécula AS-48 a su diana celular (Gálvez, 1987; Gálvez *et al.*, 1989).

Aunque AS-48 afecta también a diversas especies de bacterias Gram-negativas, éstas son mucho menos sensibles debido al efecto protector que les proporciona la

membrana externa (Gálvez *et al.*, 1989b; Abriouel *et al.*, 1998). En general, AS-48 no muestra actividad frente a la mayoría de los organismos eucariotas ensayados, tales como las levaduras *Candida albicans*, y *Saccharomyces cerevisiae*, las amebas de vida libre, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba*, eritrocitos y las líneas celulares Hela y MCDK.

Dentro de este amplio espectro de acción, es interesante destacar la sensibilidad que muestran bacterias patógenas transmitidas por alimentos y/o alterantes de los mismos, entre las que destacan *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* o *Clostridium*. Muchas otras cepas *a priori* resistentes, se vuelven sensibles cuando se emplean tratamientos combinados, como es el caso de *E. coli* O157:H7 (Ananou, 2003) o *S. choleraesuis* (Abriouel *et al.*, 1998).

AS-48 es particularmente activa frente a *L. monocytogenes*, bacteria que requiere concentraciones 50 veces menores que las necesarias para provocar un efecto bactericida y bacteriolítico similar en otras bacterias sensibles. Además, se ha podido comprobar que la cepa productora produce la enterocina cuando crece conjuntamente con *L. monocytogenes*, siendo de esta forma capaz de controlar y eliminar totalmente a las listerias cuando se encuentra en una relación inicial de enterococos/listerias=10/1 (Mendoza *et al.*, 1999).

Las células vegetativas de cepas mesófilas y psicrótrofas de *B. cereus* son muy sensibles a AS-48 a la temperatura óptima de crecimiento en un amplio intervalo de pH (Abriouel *et al.*, 2002). Otra interesante actividad de AS-48 es la inhibición de la producción de enterotoxina de *B. cereus*, incluso a concentraciones 3 veces inferiores a la concentración mínima bactericida establecida para ella (Abriouel *et al.*, 2002). Aunque se trata de resultados preliminares, abren perspectivas prometedoras para la aplicación de AS-48 en sistemas alimentarios para el control del desarrollo de los patógenos sensibles, bien mediante la adición directa de preparaciones de la bacteriocina o mediante el empleo de cepas que la produzcan *in situ*, empleadas éstas como cultivos iniciadores o como adjuntas a los cultivos iniciadores.

El modo de acción de AS-48 se ha establecido investigando su efecto sobre bacterias intactas, así como sobre protoplastos y vesículas de membrana (Gálvez *et al.*, 1989a, 1989b, 1991). La diana celular primaria de AS-48 es la membrana citoplasmática, y su adición a células sensibles determina el cese inmediato de la captación de precursores y la pérdida de la capacidad para mantener los niveles citoplasmáticos de sodio y potasio. Como consecuencia de la permeabilización de la membrana celular, se produce un rápido colapso del potencial de membrana. AS-48

actúa también sobre liposomas de fosfatidilcolina, en los que provoca la libre y rápida difusión de pequeñas moléculas (uridina o rubidio), y también la de solutos de mayor tamaño (dextrano), 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 de AS-48 se ha abordado analizando su efecto sobre la conductividad de bicapas lipídicas planas. La adición de AS-48 a bajas concentraciones desencadena una serie de señales eléctricas que se corresponden con la apertura de canales cuyo diámetro podría ser estimado de forma muy aproximada en 0,7 nm (Gálvez *et al.*, 1991b). Este mecanismo de acción permitiría la despolarización celular y la difusión de solutos de bajo peso molecular, disipando el potencial de la membrana y volviendo así a la célula inviable. Como efecto secundario, en una gran parte de las bacterias ensayadas se observa también un descenso en la densidad óptica de los cultivos, debida a la lisis celular (Gálvez, 1987; Gálvez *et al.*, 1989b). En *E. faecalis*, dicha acción es dependiente de iones Mg^{2+} , siendo atribuible a la actividad de las autolisinas presentes en la pared. Tras los daños letales ocasionados a nivel de membrana se produciría la activación de las autolisinas, encargadas de digerir la pared celular (Gálvez *et al.*, 1990).

Empleando la balanza de Langmuir, ha sido posible la formación de monocapas puras o mixtas de AS-48, lo que nos ha permitido llevar a cabo un estudio sobre el tipo de interacción que AS-48 pueda establecer con algunos componentes de la membrana citoplasmática. De esta forma se ha podido comprobar que la principal interacción que se produce entre AS-48 y el ácido dipalmitoil fosfatídico (ácido graso mayoritario en la membrana de los enterococos) es de tipo electrostático, ya que ocurre cuando el lípido está más cargado y el péptido más desplegado (pH 10.5) (Abriouel *et al.*, 2001). Ello podría explicar el notable incremento de actividad de AS-48 a pH 9 frente a bacterias Gram-negativas (Abriouel *et al.*, 2000).

4.3 Determinantes genéticos de AS-48: resistencia y producción

La producción de bacteriocinas es siempre un proceso complejo que requiere la intervención del gen estructural y de las proteínas implicadas en la secreción al medio extracelular así como del mecanismo que proporcione inmunidad a la cepa productora. En el caso de AS-48 la situación es aún más compleja, ya que la maduración del pre-péptido exige, además de la eliminación del péptido señal, la formación de un enlace peptídico entre sus extremos amino y carboxilo para originar la molécula circular madura activa.

El carácter AS-48 (producción e inmunidad) se encuentra localizado en el plásmido conjugativo pMB2 (68 Kb) que responde a la feromona cPD1 (Quirantes *et al.*, 1995). En pMB2 se encuentran los determinantes genéticos responsables de la producción y resistencia a la bacteriocina así como los implicados en la transferencia conjugativa a otras cepas de la misma especie (Martínez Bueno *et al.*, 1990; Quirantes *et al.*, 1995).

El gen estructural de AS-48 (*as-48A*) fue localizado y secuenciado por Martínez-Bueno *et al.* (1994) y los resultados obtenidos permitieron concluir que, aunque el péptido activo contiene 70 residuos, el producto primario del gen era de 105 aminoácidos, cuyos primeros 35 residuos de naturaleza hidrófoba sirven de péptido señal, que ha de ser escindido para permitir la ciclación de la molécula (Figura 5). Es probable que este proceso ocurra durante la translocación de la enterocina a través de la membrana y por ello no sea posible detectar en el citoplasma el péptido maduro.

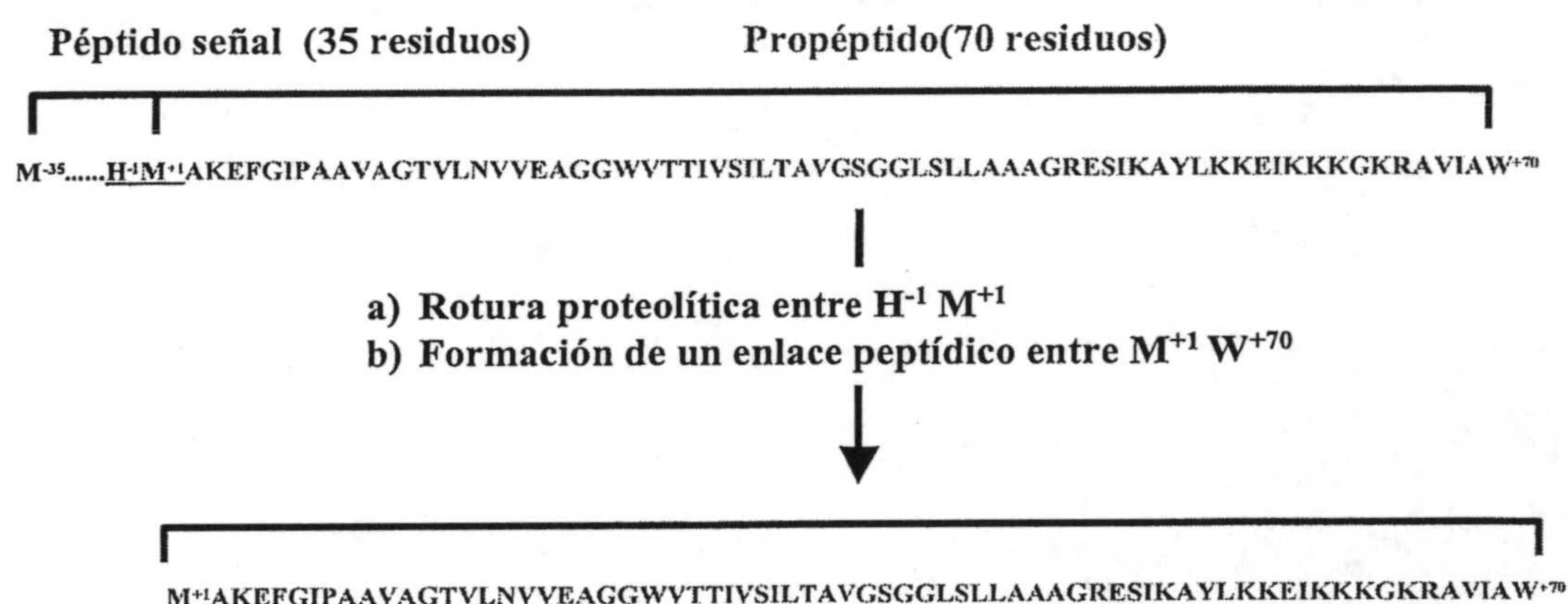


Figura 5.- Modelo propuesto para el procesamiento de la enterocina AS-48. En primer lugar ocurre la ruptura entre His⁻¹ y Met⁺¹. Después se produce un enlace peptídico entre la Met⁺¹ y el Trp⁺⁷⁰ para originar la molécula circular madura.

La región genética donde se localiza el gen estructural *as-48A* está bien definida: la secuencia se encuentra precedida por un promotor fuerte capaz de expresarse en *E. coli* (Fujimoto e Ike, 2001). Se ha identificado, además un sitio típico de unión a ribosomas (GGAGGA) y una repetición invertida a continuación del codón stop TAA identificado como un terminador *rho* independiente (Martínez-Bueno *et al.*, 1994). Subsiguientes estudios realizados en la región genética *as-48* permitieron localizar en el plásmido pMB2, además del gen estructural, un conjunto de genes situados corriente abajo de éste (Figura 6): *as-48B*, *as-48C*, *as-48C1*, *as-48D*, *as-48D1*, *as-48E*, *as-48F*, *as-48G* y *as-*

48H, que han sido identificados como los determinantes genéticos responsables de la expresión del carácter AS-48 (producción e inmunidad) en enterococos (Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Díaz-Torres, 1999). La región genética *as-48* (14,8 Kb) ha sido clonada y expresada en el vector pAM401, bifuncional para *Enterococcus-E. coli*, dando lugar al plásmido recombinante pAM401-81 y los transformantes de JH2-2 con dicha construcción, expresan en carácter AS-48 con una eficiencia similar a la de la estirpe silvestre *E. faecalis* S-48.

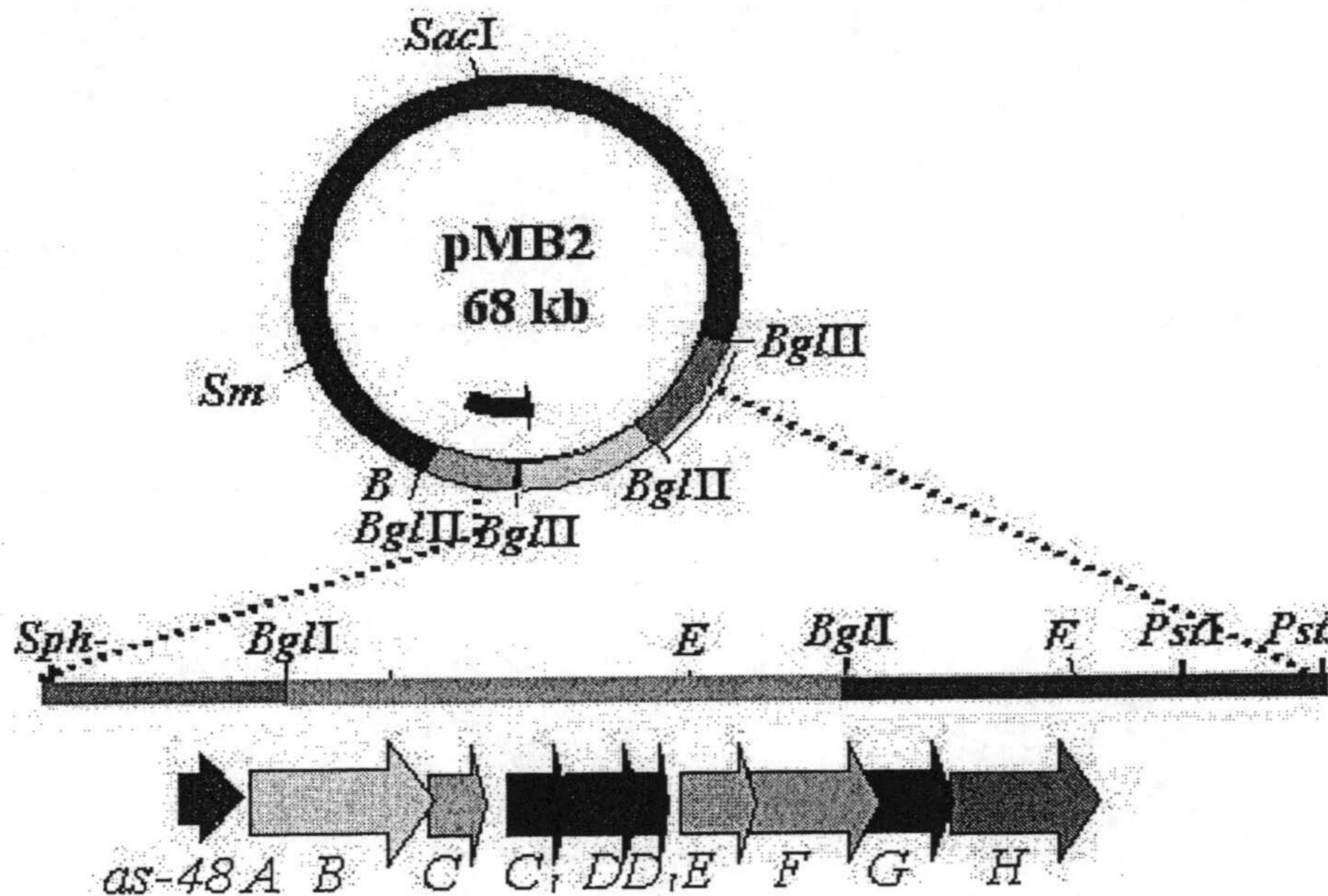


Figura 6.- Mapa físico del plásmido pMB2, con los sitios de corte de diversas enzimas de restricción, donde se destaca la región *as48* con los diferentes genes encontrados en ella. B: *Bam* HI, E: *Eco* RI, Sm: *Sma* I.

Los primeros estudios moleculares realizados permitieron identificar el producto del gen *as-48D1*, como el determinante de la inmunidad frente a AS-48, ya que es capaz de conferir por si mismo cierto grado de resistencia (Martínez-Bueno *et al.*, 1998). Se trata de un péptido catiónico (pI 10,81) fuertemente hidrófobo, cuya predicción de estructura secundaria sugiere la existencia de dos segmentos transmembrana con una conformación típica en hélice α y un extremo carboxilo hidrofílico. La existencia de tales proteínas de inmunidad ha sido también descrita en otros péptidos catiónicos, tales como Pep1 (Reis *et al.*, 1994) o lactococina A (Nissen-Meyer *et al.*, 1993). Sin embargo, no se puede descartar la existencia de mecanismos complementarios de inmunidad en los que estén implicadas otras ORFs del grupo de genes *as-48*, que actuarían aumentando la

resistencia frente a AS-48 administrado de manera exógena, como han sido descritos para la microcina B17, nisina, subtilina y Pep5 (Garrido *et al.*, 1988; Saris *et al.*, 1996).

Para el resto de los productos génicos identificados en la región *as-48*, se han propuesto algunas funciones gracias a la homología existente con secuencias de proteínas bien caracterizadas de las bases de datos, así como mediante análisis funcional por mutagénesis con el transposón Tn5 (Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Díaz-Torres, 1999). De esta forma, se ha podido demostrar que la inactivación de *as-48B*, *as-48C1* o *as-48D* determina el cese en la producción de AS-48, mientras que la inactivación de *as-48C* y *as48G* disminuye la producción de AS-48. De todas las ORFs descritas, el producto génico mejor caracterizado fué As-48D, una proteína parcialmente hidrofílica con dos sitios de unión al ATP, de acuerdo con la homología que presenta con los dominios Walkers A y B de los transportadores ABC (ATP-Binding-Casette) (Higgins *et al.*, 1986; Fath y Kolter, 1993). As-48C₁, en cambio, ha resultado ser una proteína muy hidrofóbica, con seis dominios transmembrana, por lo que ha sido propuesta como el dominio de expansión en membrana que complementaría a As-48D, proporcionando los dominios de unión al sustrato descritos en transportadores de tipo ABC. En estos sistemas, la secreción de bacteriocinas tiene lugar de forma simultánea a la separación del péptido señal y son, por tanto, necesarios para la secreción y maduración de estos péptidos (Havarstein *et al.*, 1995). Sin embargo, en el caso de AS-48 el proceso parece aún más complejo, dada la ausencia de la doble glicocola y la naturaleza circular de la molécula.

5. PROTEÍNAS CIRCULARES

Tradicionalmente, las proteínas se han venido definiendo como una cadena lineal de aminoácidos que se pliegan en el espacio, adoptando una configuración tridimensional determinada, que define su función biológica. El carácter lineal de las proteínas “convencionales” resta estabilidad a la molécula, ya que los extremos de las cadenas polipeptídicas son frecuentemente flexibles y sirven de dianas para numerosas enzimas proteolíticas. Para contrarrestar esta situación, algunas de estas proteínas sufren modificaciones postraduccionales (acetilaciones, hidroxilaciones y/o glicosilaciones) que las hacen más resistentes a las exoproteasas.

En hongos y bacterias se ha descrito la producción de otro tipo de moléculas: pequeños péptidos (>12 aa) de síntesis no ribosómica, que son producidos gracias a la existencia, en los organismos productores, de enzimas con actividad péptido-sintasa (Kohli

y Walsh, 2003). Se trata de productos que no son de origen génico directo, sino sintetizados por un multicomplejo enzimático. Estos péptidos resultan menos sensibles a las proteasas ya que presentan aminoácidos modificados mediante metilaciones, cambios en la quiralidad (formas D-aa) y enlaces no peptídicos. Además, algunas de ellas han desarrollado estrategias que aumentan su estabilidad, como el establecimiento de interconexiones mediante puentes disulfuros, que hacen que, al menos parte de la molécula adopte una estructura cíclica. Tal es el caso de la micosubtilina (Duitman *et al*, 1999), la tirocidina (Mootz y Marahiel, 1997), la ciclosporina A o la gramicidina S (Danders *et al*, 1982). Sin embargo, en los últimos años se han descrito una serie péptidos circulares de origen natural, producidos por síntesis ribosómica, que presentan una estructura tridimensional bien definida. Las proteínas circulares están constituidas por un ciclo continuo de uniones peptídicas, y por tanto carecen de extremos amino o carboxilo. Se trata por tanto de moléculas sin comienzo ni fin, bien diferenciadas de los péptidos de síntesis no ribosómica antes comentados, conocidos como péptidos cíclicos. Proteínas circulares de origen natural se han descrito en un amplio rango de organismos, incluidos bacterias, animales y plantas. Y, dadas las ventajas y el interés biotecnológico que estas moléculas presentan, se han abierto interesantes perspectivas en la investigación sobre proteínas circulares sintéticas (Trabi y Craik, 2002, Craik *et al.*, 2003, Rivas y Andreu, 2003).

La primera molécula descrita con estas características fue la bacteriocina AS-48, cuya secuencia y estructura circular fue resuelta en 1994 por Samyn *et al*. En realidad, a principios de la década de los años setenta, se había descrito las propiedades uterotónicas de un extracto procedente de la planta africana *Oldenlandia affinis* asociadas a Kalata B1, debidas a un péptido de 29 aminoácidos (Gran, 1970; Gran, 1973; Sletten y Gran, 1973). Sin embargo, tuvieron que pasar 25 años antes de que se descubriera que el péptido, que estaba codificado genéticamente, era circular y tenía una estructura tridimensional bien definida (Saether *et al.*, 1995; Jennings *et al.*, 2001).

En bacterias, las proteínas circulares descritas hasta el momento, presentan secuencias primarias y tamaños que van desde los 21 a 78 aminoácidos, y todas tienen en común una alta proporción de residuos hidrófobos. Tanto en el caso de bacterias como en el resto de los organismos, los datos estructurales disponibles sobre estas moléculas circulares derivan casi exclusivamente de los estudios de resonancia magnética nuclear (RMN). Se trata de moléculas con configuraciones bien definidas que presentan motivos que se repiten regularmente en su estructura secundaria, los cuales no

se diferencian básicamente de los que aparecen en las proteínas lineales (Craik *et al.*, 2003).

5.1 Proteínas circulares naturales

5.1.1 Proteínas circulares de microorganismos

La primera proteína circular y la mejor conocida es la enterocina AS-48 ampliamente descrita en apartados anteriores. La microcina J25 (MccJ25) producida por *Escherichia coli*, fue el segundo péptido antibacteriano cíclico descrito (Blond *et al.*, 1999). Mcc25 ejerce una potente actividad inhibidora frente a especies de *Salmonella* y *Escherichia*, inhibiendo la transcripción a través de su unión a la subunidad β' de la ARN polimerasa. La entrada de Mcc25 a cepas sensibles, requiere la proteína multifuncional FhuA de la membrana externa, la cual ha sido caracterizada como miembro de la familia de sideróforos (Rebuffat *et al.*, 2004). La región genética *mcjABCD* identificada en el plásmido pTUC100 (50 Kb) contiene la información necesaria para expresar el carácter Mcc25. La microcina madura es el resultado de la ruptura proteolítica de un precursor de 58 residuos en un sitio específico (enlace Lys-Gly), para originar un péptido maduro de 21 aminoácidos en su mayoría de naturaleza hidrófoba. Inicialmente se creyó que esta molécula tenía una estructura macrocircular debido a la unión peptídica cabeza-cola de sus extremos (Blond *et al.*, 1999), sin embargo resultados muy recientes obtenidos mediante espectrometría de masas y RMN a partir de la molécula nativa y de fragmentos peptídicos derivados de ella, han permitido establecer la existencia de un anillo de 8 residuos que se forma mediante enlace lactámico interno entre el grupo amino de la Gly¹ y el carboxilo del Glu⁸, a través del cual se introduce la cola de los 13 residuos restantes (Tyr⁹-Gly²¹). Dicho esqueleto conocido como estructura "lasso-tail" descrita en algunos inhibidores enzimáticos, se encuentra estabilizada por la posición de los residuos aromáticos, Phe¹⁹ y la Tyr²⁰, que se disponen flanqueando el anillo (Wilson *et al.*, 2003; Rosengren *et al.*, 2003; Bayro *et al.*, 2003).

Entre las bacteriocinas de las BAL de clase II, encontramos otras dos proteínas circulares, la gasericina A, producidas por dos especies del género *Lactobacillus*, *Lb. gasei* LA39 (Kawai *et al.*, 1994) y *Lb. reuteri* LA6 (Toba *et al.*, 1991) y la acidocina B producida por *Lb. acidophilus* M46 (Leer *et al.*, 1995). Ambas comparten un 98% de su secuencia. En realidad, la acidocina B difiere de la gasericina A sólo en unas pocas

posiciones, por lo que se puede considerar una variante natural de la misma, inicialmente descrita en 1991 bajo el nombre de reutericina 6, como un péptido muy pequeño (aprox. 3 Kd). Trabajos posteriores han demostrado que en realidad está compuesto por 58 residuos unidos por los extremos amino y carboxilo mediante enlace peptídico (masa molecular de 5,6 Kd) (Kawai *et al.*, 1998, 2001). La molécula presenta una estructura compacta muy estable, capaz de mantener su actividad tras ser sometida a calentamientos durante 60 min a 100°C. Presenta un alto porcentaje (74%) de residuos hidrófobos, probablemente expuestos en la superficie del péptido. Las predicciones acerca de su estructura secundaria indican que ésta es helicoidal. Presenta un interesante espectro de acción, que incluye, además de especies de *Lactobacillus*, algunos patógenos alimentarios como *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *S. aureus*.

Recientemente, ha sido descrita una cuarta bacteriocina con estructura circular, la circularina A producida por *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. Se trata de un péptido de 69 aminoácidos con un pI de 10,6 (Kemperman *et al.*, 2003a). Su espectro de acción incluye cepas de *C. tyrobutyricum*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus*. La circularina A se produce como un prepéptido de 72 aminoácidos, que es procesado hasta la forma circular madura mediante hidrólisis del puente peptídico entre la Leu³ y la Val⁴, y formación de un nuevo enlace peptídico entre la Val⁴ y la Tyr⁷² terminal. Cabe preguntarse si los tres residuos separados constituyen realmente un péptido señal capaz de dirigir el proceso de secreción y maduración. En tal caso sería el péptido señal mas pequeño descrito, pero es también probable que las señales que dirigen la modificación de la proteína estén implícitas en su propia secuencia, como se ha descrito en algunas proteínas de peroxisomas (Subramani *et al.*, 2000). Finalmente, los determinantes genéticos de la circularina A han sido localizados en el cromosoma bacteriano, región *cir*, y comprende 12 ORFs entre las que se encuentran genes que codifican posibles transportadores ABC (Kemperman *et al.*, 2003b).

Sin embargo, no todas las proteínas circulares de origen bacteriano tienen actividad antimicrobiana, dos nuevas moléculas, TrbC y pilina T, tienen una función muy diferente: promover el contacto entre células. Las pilinas son los componentes primarios de los pelos sexuales que dirigen la conjugación bacteriana. Kalkum *et al.* (2002) encontraron que TrbC y pilina T, las subunidades de los *pili* codificados por los plásmidos Inc P (RP4) y Ti, respectivamente, eran proteínas con una estructura circular establecida mediante enlace peptídico. Sus precursores son enzimáticamente procesados mediante una peptidasa señal de membrana responsable de la reacción de

circularización, necesaria antes de su ensamblaje en los pelos sexuales. Pese a las similitudes en cuanto a función y tamaño (78 y 73 aminoácidos), TrbC y pilina T no muestran grandes homologías en su secuencia, aunque sí mantienen ciertas regiones conservadas. Ambos presentan también un alto porcentaje de residuos hidrófobos (68% en TrbC y 70% en pilina T), lo que determina su fuerte tendencia a formar agregados. En ambos casos las predicciones respecto a su estructura secundaria indican la existencia de dos posibles hélices transmembrana, sin embargo los indicios apuntan fuertes diferencias en cuanto a su estructura terciaria (Kalkum *et al.*, 2004).

5.1.2 Proteínas circulares de plantas: los ciclótidos

Los ciclótidos forman el mayor grupo de proteínas circulares producidas por plantas, en el que se han descrito más de 45 moléculas diferentes, con un tamaño relativo entre 28 y 37 aminoácidos (Craik *et al.*, 1999). El descubrimiento de estas proteínas se produjo a mediados de los años noventa, en diferentes programas de rastreo para la búsqueda de nuevos compuestos con aplicaciones en medicina. Los ciclótidos presentan un variado e interesante rango de actividades biológicas. Por ejemplo, las circulinas A y B presentan actividad anti-HIV (Gustafson *et al.*, 1994), el ciclopsirolótido A inhibe la unión de la neurotensina (Witherup *et al.*, 1994), y la Kalata B1 presenta actividad uterotónica (Gran, 1970; Gran, 1973; Sletten y Gran, 1973; Saether *et al.*, 1995). Todas proceden de especies tropicales de la familia *Rubiaceae*, salvo el péptido Viola 1, encontrado en la familia *Violaceae* (Schopke *et al.*, 1993).

En los cuatro últimos años se han descrito nuevos ciclótidos, en todo caso procedentes de las familias *Violaceae* o *Rubiaceae*: circulinas de *Chassalia parvifolia* (Gustafson *et al.*, 2000), cicloviolinas A-D de *Leonia cymosa* (Hallock *et al.*, 2000), palicoureína de *Palicourea condensata* (Bokesh *et al.*, 2001), e hypa A de *Hybanthus parviflorus* (Broussalis *et al.*, 2001).

Las características comunes a esta familia de proteínas son, además de su origen vegetal, el presentar un tamaño aproximado de 30 aminoácidos y un esqueleto circular con seis residuos conservados de cisteína que forman tres puentes disulfuro. El ciclótido Kalata 1, fue el primero que se caracterizó a nivel estructural (Saether *et al.*, 1995); contiene un nudo o motivo de cisteínas consistente en un entrecruzamiento interno ocasionado por el establecimiento de puentes disulfuro entre los residuos de cisteína, es el llamado motivo CCK (*cyclic cysteine knot*). El análisis de homologías en la secuencia primaria de los ciclótidos, indica que el motivo CCK aparece conservado en todos los

miembros de esta familia, de hecho se ha demostrado su presencia en la circulina A (Daly *et al.*, 2000) y la cicloviolacina O1 (Craik *et al.*, 1999). La estructura circular de estas proteínas junto con la presencia de tres puentes disulfuro hacen que estas moléculas sean extremadamente estables, muy resistentes a la hidrólisis enzimática y a la desnaturalización por calor (Gran *et al.*, 2000). Estudios realizados con permutantes acíclicos de Kalata B1 (Daly y Craik, 2000), muestran que las formas abiertas mantienen la estructura tridimensional en la mayoría de los casos, sin embargo resultan mucho menos estables y tienen menos puentes de hidrógeno que la variante natural circular. Quizás, la circularización juegue un papel más importante en estabilizar la proteína que en definir su estructura.

Muchos ciclótidos poseen interesantes propiedades farmacológicas (Tam *et al.*, 1999), entre las que destacan: actividades uterotónicas, antiHIV, antibacterianas, antifúngicas e insecticidas. Por ejemplo, Kalata B1 actúa como un potente inhibidor del crecimiento y desarrollo de diferentes especies de insectos, como los del género *Helicoverpa* (Jennings *et al.*, 2001). Basándonos en estos hechos, podemos especular que la función natural de estas sustancias, en la mayoría de los casos, pudiera estar relacionada con mecanismos de protección del organismo productor, bien frente a infecciones por microorganismos u hongos o bien frente al ataque por parte de insectos (Trabi y Craik, 2002)

En esta familia de proteínas circulares ricas en puente disulfuro, destacan también sustancias que actúan como inhibidores de proteasas, tales como el inhibidor de tripsina. Se trata de los compuestos McoTI-I y McoTI-II (Hernández *et al.*, 2000) producidos por miembros de la familia *Cucurbitaceae*. En relación con ellos es interesante reseñar que se han encontrado también variantes lineales de los mismos (McoTI-III) que pueden coexistir con la forma circular en la misma planta en los que se ha podido demostrar claramente que las formas circulares son mucho más resistentes a la proteólisis.

En 1999, se describió en girasoles otro inhibidor circular de la tripsina, SFTI-1, que contiene 14 aminoácidos y comparte grandes homologías con la familia de pequeños inhibidores de serín-proteasas encontrados en semillas de legumbres, y conocidos como inhibidores Bowman-Birk (Luckett *et al.*, 1999). Del inhibidor SFTI-1 se ha sintetizado un análogo lineal que conserva la misma estructura espacial que la forma circular. La circularización, también en este caso, parece estar relacionada mas con la estabilización y el incremento de la vida media de la molécula que con la

determinación de su estructura tridimensional (Felizmenio-Quimio *et al.*, 2001; Heitz *et al.*, 2001).

5.1.3 Proteínas circulares de mamíferos

Hasta la fecha sólo se ha descrito un péptido circular producido por mamíferos, la defensina RTD1, y sus homólogos RTD-2 y RTD-3, producida por células leucocitarias del mono *rhesus* (Tang, 1999). En general, las defensinas son pequeños péptidos ricos en enlaces disulfuro y relacionados con los mecanismos de defensa del hospedador. RTD-1 contiene 18 aminoácidos, incluyendo 6 cisteínas y 5 argininas, unidos cabeza-cola mediante enlace peptídico. La estructura de la defensina RTD-1 consiste en dos láminas β conectadas mediante estrechas regiones de giro. Al igual que los ciclótidos contiene tres puentes disulfuro, pero, a diferencia de éstos, aparecen organizado en una escalera. A pesar de los puentes disulfuro y la estructura circular, la molécula es relativamente flexible (Trabi *et al.*, 2001).

La forma circular nativa tiene una actividad antibacteriana tres veces superior a la de los análogos lineales obtenidos, aunque la estructura tridimensional de éstos es muy parecida (Tang *et al.*, 1999). Así, la diferencia respecto a la actividad entre ambos, no puede ser atribuida a cambios estructurales producidos durante la circularización, probablemente esté más relacionado con la estabilidad de la molécula *in vivo* (Trabi *et al.*, 2001). La resistencia a las exoproteasas podría ser particularmente ventajosa durante el proceso de inflamación, que es donde estos péptidos actúan fundamentalmente.

Recientemente ha sido descrito que la médula ósea humana expresa un pseudogen que aparentemente codifica una proteína similar a la defensina RTD-1 con actividad antimicrobiana, que ha sido denominado retrociclina (Cole *et al.*, 2002).

5.2 Mecanismos de síntesis de los péptidos circulares

Poco se conoce acerca de los mecanismos de circularización de estas proteínas y mucho menos de los enzimas implicados en el proceso. En las diferentes familias de proteínas circulares, no se encuentran homologías entre los aminoácidos implicados en la formación del enlace peptídico, ni tampoco entre sus residuos flanqueantes. La disparidad de estructuras y funciones encontradas en estas proteínas, hace poco probable la existencia de un mecanismo de circularización universal (Craik *et al.*, 2003). Sin embargo, todas tienen en común el ser sintetizados como precursores más largos, que

han de sufrir un proceso de maduración consistente en la escisión del péptido señal y la unión de los extremos mediante enlace peptídico. Hasta ahora, nunca se han encontrado formas en el estadio intermedio de maduración, lo que sugiere que el proceso de circularización sucede de una manera muy rápida y muy eficiente, tras la eliminación del péptido señal (Trabi y Craik, 2002).

Las proteínas auxiliares implicadas en la expresión del carácter AS-48 y de la circularina A, están codificadas por un plásmido y por el cromosoma bacteriano respectivamente, y situadas junto a sus respectivos genes estructurales, aunque no se puede descartar la existencia de otras proteínas aún no identificadas (Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Kemperman *et al.*, 2003b). Para la producción a nivel basal de circularina A, son necesarios 5 genes (*cirABCDE*): *cirA* el gen estructural, *cirE* responsable de la proteína de la inmunidad, y las proteínas CirB y CirD que parecen ser las subunidades de un típico transportador ABC presumiblemente encargado de la secreción de esta bacteriocina. Los autores asignan, por eliminación, al producto de *cirC* la función de maduración del prepéptido. CirC presenta un cierto grado de homología (21%) con la proteína As-48C (Kemperman *et al.*, 2003b), cuya función es hasta el momento desconocida, pero accesoria en la biosíntesis de AS-48 (Martínez-Bueno *et al.*, 1998).

En el caso de la pilina T, los resultados obtenidos sobre la maduración de la proteína apuntan a que se produce de forma independiente al plásmido Ti. De hecho, la circularización de la proteína ocurre en *A. tumefaciens*, pero no en *E. coli*, por lo que se asume que el proceso está mediado por enzimas codificados por el cromosoma (Lai *et al.*, 2002). En el procesamiento de TrbC, se producen tres escisiones proteolíticas, por enzimas de origen plasmídico y cromosómico. En primer lugar, del precursor de 147 aa se eliminan 27 residuos del extremo carboxilo, mediante una actividad enzimática aún no identificada. Entonces el péptido señal de 36 residuos es escindido del extremo amino, gracias a la peptidasa señal de origen cromosómico (LepB) que genera una forma lineal de TrbC con un tetrapéptido C-terminal. La última fase de la proteólisis y posterior circularización, es atribuida a TrbF, una proteína codificada en el plásmido, que presenta homologías con peptidasas señal (Eizenbrandt *et al.*, 1999, 2000). Como posible mecanismo de circularización se ha propuesto que la escisión del péptido señal y la formación del puente peptídico ocurren de forma concertada, catalizados ambos procesos por TrbF, de forma que la energía generada en la proteólisis es directamente consumida en la formación del nuevo enlace peptídico.

La biosíntesis de proteínas circulares en plantas y animales es aun menos conocida que la de los sistemas bacterianos, y probablemente tarde mucho más en ser dilucidada debido a la carencia de sistemas de expresión eficientes (Craik *et al.*, 2003). En el caso de los ciclótidos la situación es muy compleja. Se ha estimado que estas sustancias son derivadas de una familia multigénica que comprende hasta 12 genes. Algunos de los genes estructurales investigados, codifican un precursor en el que podemos encontrar los siguientes dominios: un péptido señal de unos 20 aa probablemente relacionado con el proceso de maduración, seguido de una prosequencia N-terminal, a continuación una corta secuencia de entre 1-3 dominios de ciclótidos, y en el extremo C terminal un núcleo muy hidrófobo. El sitio exacto de procesamiento aún no ha sido establecido, pero probablemente incluya una secuencia conservada de GLP o SLP que flanquea ambos lados del dominio del ciclótido. La forma madura, contiene uno de estos sitios G/SLP que puede proceder de uno de los lados o de ambos (podríamos tener 4 posiciones distintas de procesado), y de esta forma por corte y empalme se produciría una molécula cíclica. Las enzimas implicadas aun no se conocen, incluso no se descarta que pudiera ser un proceso autocatalítico de la propia proteína.

5.3. Proteínas circulares sintéticas

De forma paralela al descubrimiento de las proteínas circulares naturales, se ha producido un avance espectacular en el campo de la síntesis química de proteínas, y los ingenieros químicos junto a los biólogos moleculares, han diseñado métodos para ciclar proteínas lineales cuyos extremos amino- y carboxilo- se encuentran lo suficientemente próximos en la estructura nativa lineal. En algunos casos, este proceso se ha llevado a cabo mediante la ligación en fase sólida de los péptidos o bien basándose en el procesamiento que sufren las inteínas de algunas proteínas. En el primer caso, hay que diseñar el péptido con un residuo de cisteína en el extremo amino, y en el extremo C-terminal unido por un enlace α -tioéster. Posteriormente estos dos grupos reaccionan para formar un intermediario tioéster, que más tarde sufre una reorganización intramolecular, y de forma espontánea se origina un enlace peptídico entre ambos extremos, quedando un grupo reactivo libre SH. En el segundo, la secuencia que queremos ciclar se incluye entre unos dominios proteicos reactivos llamados inteínas, y la circularización ocurre mediante la unión autocatalítica de ambas (Perler y Adan,

2003). La producción de la proteína circular madura implica la eliminación de los dominios auxiliares flanqueantes del precursor lineal de la proteína.

También se han aplicado con éxito otros métodos de circularización, que incluyen el uso de condiciones oxidativas para la formación de puentes disulfuro (Daly *et al.*, 1999). Otros estudios, se han centrado en aumentar la estabilidad de la proteína lineal. Utilizando un esqueleto circular para mejorar la estabilidad termodinámica de los enzimas o la estabilidad *in vivo* de proteínas de uso terapéutico. Este campo está todavía en sus comienzos, sin embargo gracias a las nuevas tecnologías en la síntesis de proteínas, probablemente permitan obtener análogos de proteínas circulares naturales tales como los ciclótidos, con interesantes aplicaciones en el diseño de nuevos medicamentos (Craik, 2001; Trabi y Craik, 2002).

Objetivos

El trabajo experimental presentado en esta Tesis doctoral se encuadra dentro de la Línea de investigación que desarrolla el Grupo “Estudios de sustancias antagonistas producidas por microorganismos” de la Universidad de Granada.

En los proyectos de investigación realizados durante los últimos años, ha merecido una especial atención el estudio de la enterocina AS-48, molécula singular por sus características estructurales, amplio espectro de acción y la complejidad de la región genética responsable de su expresión.

En estudios previos se había localizado la región *as-48* en el plásmido conjugativo pMB2 y los determinantes genéticos situados en un fragmento de 12,1 Kb. En dicha región se identificaron 10 genes, *as-48ABCC₁DD₁EFGH*, en todo caso necesarios para la completa expresión del carácter AS-48.

Al inicio de la presente investigación se planteó la necesidad de completar el estudio genético de esta enterocina, plasmado en los siguientes objetivos:

- Estudio en profundidad de los diferentes genes identificados y de la función de sus productos génicos
- Análisis de expresión génica y de su organización en diferentes operones.

Una vez realizados los estudios básicos, se consideró necesario abordar aspectos de interés aplicado relacionados con su futuro desarrollo tecnológico como bioconservante de alimentos, relativos a

- la mejora de la producción de AS-48
- la transferencia del carácter AS-48 a razas de interés industrial

Material y Métodos

1. MICROORGANISMOS Y PLÁSMIDOS

1.1 Bacterias y bacteriófagos

Las cepas de *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*, así como los plásmidos utilizados en este trabajo, junto con sus características más relevantes se indican en las tablas 4, 5a y 5b.

La cepa libre de plásmidos JH2-2 de *E. faecalis* (Yagi y Clewell, 1980) fue empleada como hospedadora de los diferentes plásmidos recombinantes, en los estudios de producción y /o resistencia frente a AS-48. La cepa de *E. faecalis* S-47 (Gálvez *et al.*, 1989) fue utilizada estirpe como indicadora sensible en la mayoría de los ensayos de producción de AS-48. Ocasionalmente se utilizaron *L. monocytogenes* CECT 4032 y *B. megaterium* de la colección de nuestro laboratorio.

BACTERIA / FAGO	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
<i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2 S-47 S-48-32	Libre de plásmidos, Rif ^R Fus ^R , AS-48 ^S AS-48 ^S pMB2, AS-48 ⁺ , AS-48 ^R	Yagi y Clewell, 1980 Gálvez <i>et al.</i> , 1989 Martínez-Bueno <i>et al.</i> , 1990a
<i>Escherichia coli</i> DH5- α RYC1000 CS1045	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> <i>F-araD139</i> Δ <i>lacU169</i> Δ <i>rib-7rpsL relA thiA recA56</i> Propagación del fago λ	Bethesda Research Lab. Moreno * Moreno *
Bacteriófago λ_{467}	c1857 <i>0am8 Pam29 b221 rex::Tn5</i> (Km ^R)	Berg, 1977
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4032	AS-48 ^S	CECT
<i>Bacillus megaterium</i> NC	AS-48 ^S	

Tabla 4.-Relación de los microorganismos y fagos utilizados en este trabajo y de sus características más relevantes. Rif^R: rifampicina resistente, Fus^R: ácido fusídico resistente, AS-48^S: sensible a AS-48, AS-48^R: resistente a AS-48, AS-48⁺: productor de AS-48, Km^R: kanamicina resistente; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; NC: de nuestra colección.

*Comunicación personal del Dr. Moreno (Hospital Ramón y Cajal, Madrid).

BACTERIA	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> LM2301	Libre de plásmidos	Bourgeois <i>et al.</i> , 1991
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremosis</i> MG1614	Libre de plásmidos, Rif ^R , Str ^R	Gasson, 1983
<i>Lactobacillus casei</i> 393	Libre de plásmidos	ATCC
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> 4005	Utilizado en la industria láctea	CECT
<i>Pediococcus pentosaceus</i> Biotipo 1 P12 Biotipo 2 S10	Aislado de encurtidos Aislado de encurtidos	Gálvez* Gálvez*
<i>Enterococcus faecium</i> S29	<i>E. faecium</i> de nuestra colección	Gálvez, 1984
S60	<i>E. faecium</i> de nuestra colección	Gálvez, 1984
32	Carente de determinantes de virulencia, Van ^S , aislado en leche	Gálvez*
34	Carente de determinantes de virulencia, Van ^S , aislado en leche	Gálvez*
1	Carente de determinantes de virulencia, Van ^S , aislado en productos cárnicos	Gálvez*
PJ	Carente de determinantes de virulencia, Van ^S , aislado en productos cárnicos	Gálvez*
S1	Aislado en encurtidos	Gálvez*
S3	Aislado en encurtidos	Gálvez*

Tabla 4 (Continuación).-Relación de microorganismos utilizados en este trabajo y de sus características más relevantes. Rif^R: rifampicina resistente, Str^R: estreptomycin resistente, Van^S: vancomicina sensible, CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, ATCC: Colección Americana de cultivos Tipo. * Comunicación personal del Dr. Gálvez del Postigo (Universidad de Jaén)

Para la transferencia del carácter AS-48 a razas de interés industrial, se electrotransformaron cepas de *L. lactis* subsp *lactis*, *L. lactis* subsp *cremosis*, *Lb. casei*, *Lb. delbruecki*, *P. pentosaceus* y *E. faecium* con distintos plásmidos recombinantes que albergaban la región *as-48*.

Las cepas de enterococos, lactobacilos, pediococos, listeria y *B. megaterium* se cultivaron en reposo a 37 °C, los lactococos también en reposo a 28°C, mientras que *E. coli* se cultivó a 37 °C en agitación.

El bacteriófago λ_{467} , amablemente cedido por el Dr. Moreno (Hospital Ramón y Cajal, Madrid) se utilizó en los experimentos de mutagénesis transposicional

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
pAM401	Cm ^R ; Tc ^R Vector bifuncional <i>E. coli-E. faecalis</i>	Wirth <i>et al.</i> , 1986
pAM401-61	Cm ^R ; gen <i>as-48A</i> clonado en pAM401; AS48 ⁻	Martínez-Bueno <i>et al.</i> , 1998
pAM401 _{D1}	Cm ^R ; gen <i>as-48D1</i> clonado en pAM401; AS-48 ^R	Martínez-Bueno <i>et al.</i> , 1998
pAM401-64	Cm ^R ; genes <i>as-48CC1DD1</i> en pAM401; AS-48 ^R	Martínez-Bueno <i>et al.</i> , 1998
pAM401-81	Cm ^R ; región <i>as-48</i> completa clonada en pAM401; AS-48 ⁺ AS-48 ^R	Díaz Torres, 1999
pAM401-81 _{EH}	Cm ^R ; genes <i>as-48EFGH</i> en pAM401; AS-48 ^S	Este trabajo
pAM401-81 _{CIH}	Cm ^R ; genes <i>as-48C1DD1EFGH</i> clonada en pAM401; AS-48 ^R	Este trabajo
pAM401-81E5	Cm ^R ; región <i>as-48</i> completa en pAM401; inserto menor que en pAM401-81; AS-48 ⁺ AS-48 ^R	Este trabajo
pGEM-T	Ap ^R ; <i>lacZ</i> ; linealizado; vector de clonación para productos de PCR	Promega
pGEM-T _{CIH}	Ap ^R Construcción intermedia; genes <i>as-48C1DD1EFGH</i> en pGEM-T	Este trabajo
pMG36e	Em ^R ; vector de expresión lactocócico, capaz de replicarse en <i>E. coli</i>	Van de Guchte <i>et al.</i> , 1989
pMG36A	Em ^R ; gen <i>as-48A</i> clonado en pMG36e	Este trabajo
PMG36 _{BC}	Em ^R ; genes <i>as-48BC</i> clonados en pMG36e	Este trabajo
pBR332	Ap ^R ; vector de clonación en <i>E. coli</i>	New England Biolabs
pBR332-81	Ap ^R ; construcción intermedia, región <i>as-48</i> completa clonada en pBR332	Este trabajo
pIL253	Em ^R ; vector lactocócico de alto número de copias	Simon <i>et al.</i> , 1988
pIL253-64	Em ^R ; región <i>as-48CC1DD1</i> clonada en pIL253; AS-48 ^R	Martínez-Bueno <i>et al.</i> , 1998
pIL253-81	Em ^R ; región <i>as-48</i> completa clonada en pIL253; AS-48 ⁺ ; AS-48 ^R	Este trabajo
pEM76	Em ^R , Ap ^R ; vector de integración para bacterias del ácido láctico; replicativo en <i>E. coli</i> .	Martín <i>et al.</i> , 2000
pEM76-81	Región <i>as-48</i> completa clonada en pEM76-81; AS-48 ⁺ ; AS-48 ^R	Este trabajo

MUTANTES DE INSERCIÓN	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pAM401-81::Tn5 _A	Cm ^R ; Tn5 en el promotor de <i>as-48A</i> ; AS-48 ⁻ AS-48 ^R .	Este trabajo
pAM401-81::Tn5 _B	Cm ^R ; Tn5 en el gen <i>as-48B</i> ; AS-48 ⁻ , AS-48 ^R	Este trabajo
pAM401-81::Tn5 _D	Cm ^R ; Tn5 en el gen <i>as-48D</i> ; AS-48 ⁻ , AS-48 ^R	Este trabajo
pAM401-81::Tn5 _{DIE}	Cm ^R ; Tn5 en la región intergénica <i>as-48D1-as-48E</i> ; AS-48 ⁺ AS-48 ^R	Este trabajo
pAM401-81::Tn5 _G	Cm ^R ; Tn5 en el gen <i>as-48G</i> ; AS-48 ⁺ , AS-48 ^R	Este trabajo
pAM401-81::Tn5 _H	Cm ^R ; Tn5 en el gen <i>as-48H</i> ; AS-48 ⁺ , AS-48 ^R	Este trabajo

Tabla 5a.- Plásmidos utilizados en este trabajo y **Tabla 5b.-** Mutantes de inserción con el transposón Tn5. Cm^R: resistente al cloranfenicol, AS48⁺: productor de AS-48, AS-48⁻: no productor de AS-48, AS-48^R: resistente a AS-48, AS-48^S: sensible a AS-48, Ap^R: resistente a ampicilina, Em^R: resistente a eritromicina.

2. MEDIOS DE CULTIVO

Salvo cuando se indica expresamente, los componentes de los medios fueron disueltos en un litro de agua destilada. Los medios empleados para producción y ensayo de la actividad de la bacteriocina se prepararon en tampón fosfato sódico 0,1M, pH 7,2, con objeto de neutralizar el posible efecto inhibitor de los ácidos orgánicos producidos, y se denotan con una T. Cuando fue preciso el uso de medios sólidos se adicionó agar al 1,5% a los correspondientes medios líquidos. En la preparación de sobrecapas, se empleó el medio de crecimiento correspondiente suplementado de agar al 0,75%. En todo caso, a menos que se indique lo contrario, los medios se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

Para los ensayos de crecimiento en medio líquido, se suplementó con glucosa al 1% y, como indicador de pH, para detectar mejor el crecimiento, 0,5% de solución de púrpura de bromocresol (1,6 g de púrpura de bromocresol en 100 ml de etanol al 95).

2.1 Medios de crecimiento

Para el cultivo de *E.coli* se utilizó habitualmente el medio de Luria-Bertani (LB) o el 2xYT (ambos suministrados por Gibco BRL).

Medio de Luria-Bertani

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

Medio 2xYT

Tripticasa Peptona	10,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g

Todas las cepas pertenecientes al género *Enterococcus* se crecieron en medio de infusión cerebro corazón (BHI, Oxoid) por ser un medio complejo que cubre los amplios requerimientos nutricionales de estas bacterias. El mismo medio fue utilizado para *L. monocytogenes* y *B. megaterium*.

Medio Infusión de Cerebro-Corazón

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* se crecieron en medio M17 (Biokar Diagnostics) glucosado (GM17).

Medio M17

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
Ácido ascórbico	0,5 g

Este medio comercial, fue suplementado con un 1% de glucosa (GM17), ya que la mayoría de las estirpes utilizadas carecen de capacidad de utilizar la lactosa (lac⁻). Para evitar la caramelización de la glucosa, el medio se esterilizó en autoclave a 115 °C durante 20 min.

Para *Lactobacillus*, así como para las cepas de *Pediococcus*, empleamos medio Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Scharlau).

Medio Man, Rogosa and Sharpe

Proteosa peptona	10,00 g
Extracto de carne	8,00 g
Extracto de levadura	4,00 g
Glucosa	20,00 g
Acetato sódico	5,00 g
Citrato triamónico	2,00 g
Sulfato magnésico	0,20 g
Sulfato manganésico	0,05 g
Fosfato dipotásico	2,00 g
Polisorbato 80	1,00 g

2.2 Medios empleados en la conservación de 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 posible pérdida de los caracteres genéticos que puede ocurrir en el transcurso de sucesivas resiembras.

Para uso rutinario, las cepas se inocularon y crecieron en tubos con los respectivos medios sólidos dispuestos en pico de flauta o en placas de Petri y se mantuvieron a 4 °C. Estos cultivos fueron resemebrados periódicamente a partir de las cepas conservadas en glicerol.

2.3 Medio utilizado en los ensayos de mutagénesis con el transposón Tn5

Para la propagación del fago λ_{467} se utilizó el medio P75.

Medio P75

Tripticasa	10,0 g
NaCl	8,0 g
Agar	12,0 g

2.4 Medios empleados en los experimentos de electrotransformación

En los experimentos de electrotransformación de *Enterococcus*, se utilizó el medio Todd Hewitt Broth (THB, Difco).

Medio Todd Hewitt Broth

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

En *Lactococcus* el medio de crecimiento empleado en la preparación de células competentes fue SGM17: GM17 adicionado de 0,5M sacarosa y glicina 2,5%. Para cultivar los lactococos recién electroporados se empleó un medio de reconstitución que consiste en medio SGM17 adicionado de MgCl₂ (20mM) y CaCl₂ (2mM).

2.5 Medios utilizados para la producción de AS-48

La producción de AS-48 por los transformantes de enterococos se ensayó en medio BHI-T, alternativamente, cuando fue necesaria una producción mayor, empleamos medio Complejo (MC).

Medio Complejo

BHI	2,00 g
Casaminoácidos	2,00 g
Base nitrogenada de levadura (YNB, Difco)	1,00g
Glucosa	5,00 g
Sulfato magnésico	0,04 g
Lactosa	5,00 g

Para su preparación la glucosa y el sulfato magnésico se disolvieron en 950 ml de tampón fosfato sódico 0,1M pH7,2, autoclavando a 115°C durante 20 min. El BHI junto a los casaminoácidos, en 40 ml de agua destilada, autoclavando a 120°C 20 min; por último la base nitrogenada, disuelta en 10 ml de agua, fue esterilizada por filtración utilizando filtros de Millipore de 0,45 µm de diámetro de poro.

Para *E. faecium* también se ensayó la producción en leche (Puleva).

La producción en lactococos fue ensayada diversos medios: GM17-T, BHI-T, BHI adicionado de un 50% de leche y medio de lactoalbúmina: 60 g/L de lactoalbúmina (Esprión 300 DKW International) en agua destilada.

2.6 Medio utilizado en la detección de la producción de AS-48 por enterococos

El medio empleado como capa base en los ensayos de detección de producción de AS-48 por enterococos fue el Agar Mueller-Hinton (MHA, Panreac), por ser un medio adecuado para la difusión de la bacteriocina.

Agar Mueller-Hinton

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

2.7 Medios empleados para la detección de las características bioquímicas

En los experimentos de diferenciación entre las cepas de *Enterococcus* y *Lactococcus*, como medio de crecimiento a 45°C se empleó BHI adicionado de 1% de glucosa y 0,5% de solución de púrpura de bromocresol (1,6 g de púrpura de bromocresol en 100 ml de etanol al 95%). En las pruebas de crecimiento con NaCl al 6,5%, se utilizó el mismo medio adicionado de con este porcentaje de la sal. La prueba de bilis-esculina se ensayó en el medio de Agar Bilis Esculina (Scharlau).

Agar Bilis Esculina

Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Sales biliares	40 g
Citrato férrico	0,5 g
Esculina	1,0 g
Agar	15,0 g
El pH se ajustó a 7,4	

Para la diferenciación entre *E. faecalis* y *E. faecium* se ensayó la fermentación de la arabinosa en medio Hugh-Leifson.

Medio Hugh-Leifson

Azúcar problema (arabinosa)	10,0g
Peptona	2,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato potásico	0,3 g
Púrpura de bromocresol al 1%	3,0 ml
Agar	3,0 g

Este medio se autoclavó a 115°C durante 20 min.

2.8 Tampones utilizados en los medios de cultivo

En los experimentos de producción de la bacteriocina en medio sólido, a fin de evitar una posible inhibición del crecimiento de la cepa indicadora por la producción de ácidos, los medios se tamponaron con tampón fosfato sódico 0,1M pH 7,2

Tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,2

Fosfato disódico 2H ₂ O (Solución X)	0,2M
Fosfato monosódico H ₂ O (Solución Y)	0,2M

Se mezclaron 36 ml de solución X con 14 ml de solución Y, y se completó 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 de soluciones 1000 veces concentradas. Las soluciones acuosas se esterilizaron por filtración a través de membranas de 0,45µm de tamaño de poro (Millipore).

Las concentraciones empleadas fueron las siguientes: Kanamicina (Km) 50µg/ml, Cloranfenicol (Cm) 20µg/ml, Tetraciclina (Tc) 10µg/ml, Ampicilina (Ap) 50 µg/ml y Eritromicina (Em) 6µg/ml para bacterias Gram-positivas y 300µg/ml para *E. coli*, todos ellos de Sigma-Aldrich.

Enzimas

Las enzimas de restricción utilizadas, así como sus correspondientes tampones, fueron suministradas por Roche y Amersham Pharmacia Biotech. La DNA ligasa del fago T4 fue suministrada por Roche, al igual que la fosfatasa alcalina, la ADNasa I libre de ARNasa y la proteinasa K. La casa Sigma-Aldrich suministró la ARNasa y la mutanolisina. La Taq polimerasa fue suministrada por Dynazyme y la lisozima por Amersham-Pharmacia Biotech.

Reactivos de la electroforesis en geles de agarosa

Los reactivos empleados, junto con las casas proveedoras, fueron las siguientes: Tris-hidroximetil-aminometano (Tris) (Roche), etilen-diamino-tetraacetatosódico (EDTA-Na₂) (Roche), ácido acético glacial (Roche), agarosa tipo 1A de baja electroendósmosis (Amresco), bromuro de etidio (Sigma-Aldrich).

Como patrones de pesos moleculares de los fragmentos de restricción se usó el digerido *Hind*III del fago lambda.

Reactivos de la electroforesis en geles de poliacrilamida

Los reactivos usados, junto con las casas proveedoras, fueron las siguientes: acrilamida (Serva) y Bis acrilamida (Promega), persulfato amónico (APS), azul de

bromofenol (Merck), TEMED (N',N',N',N-Tetramethylethylenediamine, Sigma-Aldrich) y sodio dodecil sulfato (SDS, Sigma-Aldrich).

Otros reactivos utilizados

En las diversas técnicas empleadas, extracción de ADN y ARN, hibridaciones, mutagénesis...etc, se han empleado una serie de reactivos, algunos comunes a varias de ellas, que se relacionan a continuación: fenol, sacarosa, etanol absoluto, hidróxido sódico, ácido clorhídrico (Merck); cloruro sódico, citrato sódico, cloroformo, éter etílico, ácido tricloroacético (Panreac); albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich); reactivo de bloqueo (Roche).

4. DETECCION Y VALORACION DE LA PRODUCCIÓN Y RESISTENCIA FRENTE A AS-48

4.1 Determinación de la producción y resistencia en medio sólido

La producción de AS-48 en medio sólido se determinó mediante la técnica de la doble capa (cultivando la cepa a ensayar en la capa base); la resistencia frente a AS-48 en medio sólido se estableció por la técnica de la doble capa (inoculando la bacteria a ensayar en la sobrecapa), o por la técnica de las gotas.

Técnica de la doble capa

Para detectar la producción de AS-48 en medio sólido se empleó la técnica de la doble capa (Gratia y Fredericq, 1946), utilizando como capa base el medio de crecimiento tamponado correspondiente. Sobre esta capa base se dispusieron gotas de 1 µl de cultivo en fase estacionaria de la estirpe productora a ensayar, incubándose a la temperatura óptima de crecimiento 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, en la mayoría de las experiencias esta cepa fue *E. faecalis* S-47. Una vez solidificada la sobrecapa, se volvió a incubar durante 18-24 h 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.

Técnica de las gotas

Para determinar la resistencia de AS-48 en medio sólido se vertieron 6 ml de sobrecapa de agar blando inoculada con 0,1 ml de la bacteria cuya resistencia se quería ensayar, sobre placas de Petri con una capa base de medio sólido. Una vez solidificada la sobrecapa, se procedió a colocar sobre ella, gotas de 5 μ l con diferentes concentraciones de AS-48 purificado, incubándose posteriormente las placas durante 18-24 h a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria. La aparición de halos de inhibición del crecimiento en las zonas donde se depositaron las gotas era indicativo de la sensibilidad de la bacteria.

4.2 Determinación de la producción y la resistencia en medio líquido

Para determinar la resistencia frente a AS-48 en medio líquido partimos de un cultivo de una noche de la bacteria a ensayar, con el que inoculamos al 2% tubos de medio fresco adicionado de glucosa y púrpura de bromocresol. Tras haber incubado a la temperatura óptima durante 1h, procedimos a añadir las distintas concentraciones de bacteriocina ensayadas. Tras 24h de incubación a la temperatura adecuada, procedimos a leer los resultados según el viraje del indicador.

Técnica de los pocillos

La producción de AS-48 en medio líquido se determinó mediante el ensayo de la actividad presente en sobrenadantes libres de células por la técnica de los pocillos (Shillinger y Lucke, 1989; Tagg y McGiven, 1971). Para ello colocamos pocillos estériles de acero inoxidable de 8 mm de diámetro sobre placas de Petri con una capa base de MHA-T. Seguidamente se vertieron 6 ml de agar blando (mantenidos en sobrefusión a 45°C) 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 depositó 0,1 ml de la muestra líquida a ensayar (sobrenadante libre de células). A continuación las placas se incubaron a la temperatura adecuada para el crecimiento de la estirpe indicadora.

La obtención de los sobrenadantes libres de células de cultivos en medios de laboratorio, se realizó mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 10 min. En los cultivos en leche fue necesaria una homogenización previa con HCl 0,02N en proporción 1/1 (v/v). Tras la centrifugación la fracción acuosa fue neutralizada con NaOH hasta pH 6.

4.3 Purificación de la bacteriocina AS-48

4.3.1 Cromatografía de intercambio catiónico

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

Posteriormente el gel fue recogido por decantación y depositado 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 1,5M (ambos en agua destilada), recogiendo distintas fracciones que fueron ensayadas para determinar su actividad antibacteriana mediante la técnica de los pocillos.

Las muestras con actividad fueron repurificadas mediante cromatografía de fase reversa de alta resolución, utilizando una columna Vydac 218TP54, equilibrada previamente con eluyente A (10mM de TFA en agua). El material no adsorbido a la columna se eliminó mediante lavado con solvente A, hasta que la densidad óptica a 210 nm del efluente 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 en 4mM de 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 210 nm detectados. Dichas fracciones fueron posteriormente liofilizadas y resuspendidas en 1 ml de agua destilada antes de ensayar su actividad.

4.3.2 Cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC)

Las muestras con actividad antibacteriana procedentes de intercambio iónico fueron repurificadas mediante cromatografía de fase reversa de alta resolución, utilizando una columna Vydac 218TP510 (10 x 250 mm; The Separation Group, Hesperia, Calif.) con un relleno tipo C18, de tamaño medio de partícula de 10 micras, y un tamaño de poro de 300 Å. La muestra se aplicó a un flujo de 3 ml/min sobre la columna equilibrada previamente en solvente A (ácido trifluoroacético, TFA, 10 mM en agua de grado MilliQ). El material no adsorbido sobre la columna se eliminó mediante

lavado con solvente A, hasta que la absorbancia a 210 nm del efluente (A_{210}) descendió a línea base. El material retenido en la columna fue eluido posteriormente mediante un gradiente lineal compuesto (0-40 % B en 5 min; 40-80 % B en 20 min; 80-100 % B en 5 min), siendo el solvente B una mezcla de isopropanol:acetonitrilo (2:1, v/v) en TFA 4 mM, a un flujo de 3 ml/min. El efluente de la columna fue recogido en distintas fracciones de acuerdo con los picos de absorbancia (a 280 y a 210 nm) detectados. Dichas fracciones fueron posteriormente liofilizadas y redisueltas en 1 ml de agua destilada antes de ensayar su actividad antimicrobiana.

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

En todas las etapas cromatográficas de alta resolución se utilizó agua desionizada de grado Milli-Q. Se utilizó un equipo cromatográfico provisto de los siguientes módulos: dos bombas peristálticas de alta presión (HPLC Pump 2248, Pharmacia-LKB) con mezclador dinámico en alta presión y un detector de luz ultravioleta (VWM 2141, Pharmacia-LKB), controlados desde un sistema informático. Así mismo, se empleó un registrador gráfico BD41 de Kipp & Zonen. Para la recogida de fracciones se utilizó un microcolector de fracciones Gilson Mod. 203.

4.3.3 Precipitación ácida

Con el objetivo de concentrar los sobrenadantes, para intentar detectar cantidades mínimas de enterocina, éstos fueron adicionados de ácido tricloroacético a una concentración final del 20%. Tras incubar en hielo durante 30 min, el precipitado fue recogido mediante centrifugación a 14.000 rpm 15 min y resuspendido el tampon fosfato a pH neutro.

5. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE ADN

5.1 Aislamiento de plásmidos a pequeña escala (minipreparaciones)

5.1.1 Aislamiento de ADN plasmídico en *Enterococcus* y *Lactococcus*

Para el aislamiento de plásmidos a pequeña escala en estas bacterias, se utilizó la técnica de Anderson y McKay (1983), con pequeñas modificaciones.

La estirpe cuyo perfil plasmídico se quería analizar, se inoculó en 2 ml del medio de crecimiento adecuado, incubándose durante una noche. A partir de los cultivos crecidos en fase estacionaria, se vuelve a inocular al 4%, un tubo que contiene 10 ml de medio, incubándose posteriormente durante 4 ó 5 h a la temperatura óptima de crecimiento. Las células fueron recogidas por centrifugación (14.000 rpm durante 1 min), y se lavaron posteriormente con 1 ml de tampón TE.

El sedimento se resuspendió en 458 µl de solución A, y luego se adicionaron 115 µl de una solución de lisozima (10 mg/ml en Tris-HCl 25mM, pH 8) preparada extemporáneamente, y se incubó a 37 °C durante 10-15 min.

La lisis se desencadenó mediante la adición de 58 µl de EDTA 250mM, pH 8 y de 35 µl de solución de lisis, mezclándose suavemente por inversión del tubo, e incubando después a 37°C durante 5-10 min. El ADN cromosómico se desnaturizó mediante la adición de 35 µl de una solución de NaOH 3M recién preparada. Tras realizar suaves inversiones durante 10 min, el lisado se neutralizó rápidamente con 60 µl de Tris-HCl 2M, pH 7 y preenfriado en hielo. Gran parte del ADN cromosómico, ya parcialmente desnaturizado, se precipitó adicionando 86 µl de NaCl 5M; a continuación se adicionó un volumen de fenol equilibrado y saturado con NaCl (3% p/v- Tris-HCl 100mM, pH 8), centrifugándose durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo donde se le retiraron los residuos de fenol por tratamiento con un volumen igual de cloroformo-isoamílico (24:1). El ADN finalmente se precipita mediante la adición a la fase acuosa anterior con un volumen de isopropanol (preenfriado a -20°C), incubándose posteriormente a -20°C (1 ó 2 h mínimo), ó -70°C (30 min). El ADN plasmídico se recogió por centrifugación durante 10 min a 14.000 rpm y se lavó con etanol al 70%. Una vez seco, el ADN se resuspendió en 20-25 µl de agua estéril o tampón TE. Este ADN puede ser mantenido hasta su uso a -20°C. El análisis de los resultados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

Solución A

Sacarosa	6,7 %
Tris-HCl	50mM
EDTA	1mM

Solución de lisis

SDS	20 %
Tris-HCl	50mM
EDTA	20mM

5.1.2 Aislamiento de ADN plasmídico en *E. coli*

En la extracción de ADN plasmídico de *E. coli* se empleó el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (1979), con algunas modificaciones.

Para ello se obtuvieron cultivos de una noche en medio LB, incubados en agitación a 37 °C. De cada uno de los cultivos, se tomaron 1,5 ml y se recogieron las células por centrifugación, resuspendiendo posteriormente en 200 µl de solución I. Seguidamente se efectuó la lisis mediante la adición de 200 µl de solución II e incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el lisado se neutralizó con 200 µl de solución III, mezclando por agitación suave. El ADN cromosómico se eliminó mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 10 min y el sobrenadante, que contenía mayoritariamente ADN plasmídico, se transfirió a un nuevo tubo, y se precipitó tratando con 0,8 volúmenes de isopropanol durante 10 min a temperatura ambiente. El ADN plasmídico se recogió por centrifugación durante 10 min a 14.000 rpm y se lavó con etanol al 70%. Una vez seco el ADN se resuspendió en 200 µl de agua estéril o tampón TE.

Tampón Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl	10mM
EDTA	1mM
pH 7,4.	

Solución I

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

Solución II

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

Solución III

Acetato sódico pH 4,8	3M
-----------------------	----

5.1.3 Aislamiento de ADN plasmídico en *Lactobacillus*

El procedimiento que se utilizó para las cepas de *Lactobacillus* en una modificación de la lisis alcalina utilizada en *E. coli*. Para ello, se parte de 10 ml de cultivo en fase estacionaria. Las células se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min y lavadas con 5 ml de TE. El sedimento se resuspendió en 200 µl de solución L1, incubándose a 37°C durante 30 min. Pasado este tiempo se adicionaron 400 µl de solución L2, dejándolo incubar 7 min a temperatura ambiente, tras lo cual se adicionaron 300 µl de solución L3 incubando, ahora en hielo durante 5 min.

La muestra fue sometida a centrifugación a 12.000 rpm durante 10 min, y el sobrenadante se extrae una vez con un volumen de fenol-cloroformo (pH 8), y otra con cloroformo:isooamílico (24:1). El sobrenadante obtenido se mezcló con un volumen de isopropanol e incubando a -20°C durante 30 min. El ADN plasmídico se recogió mediante centrifugación a 14.000 rpm 10 min y se lavó con etanol al 70%. Una vez seco a vacío, los ADNs fueron resuspendidos en 11 μl de agua estéril o tampón TE para su posterior análisis.

Solución L1

Lisozima	30 mg/ml
Mutanolisina (150U/ml)	1 μg
ARNasa (50mg/ml) (Disuelto en TE)	1 μl

Solución L2

SDS	3 %
NaOH	0,2N

Solución L3

Acetato potásico pH 4,8	3M
-------------------------	----

5.2 Aislamiento de plásmidos a gran escala (maxipreparaciones)

5.2.1 Maxipreparaciones en *Enterococcus* y *Lactococcus*

En extracciones a gran escala se utilizó el protocolo descrito por Anderson y McKay (1983), con ligeras variaciones. Para ello, 100 ml de medio de cultivo adecuado se inocularon al 2 % con cultivos en fase estacionaria, incubándose posteriormente durante 5 h a la temperatura óptima. Las células se recogieron por centrifugación a 5000 rpm a 4°C durante 15 min y se lavaron con 20 ml de tampón TE.

Tras resuspender el sedimento de células en 5 ml de la solución A, se adicionaron 1,25 ml de solución de lisozima (10 mg/ml), incubándose la mezcla a 37°C , 30-45 min. Posteriormente se adicionaron 0,625 ml de una solución de EDTA 250mM-Tris-HCl 50mM (pH 8). Tras mezclar bien, se indujo la lisis añadiendo 0,38 ml de la solución de lisis e incubando 5 min a temperatura ambiente.

Posteriormente se añadieron 0,4 ml de NaOH 3M, mezclando por inversiones suaves durante 10 min. Rápidamente se neutralizó el contenido de los tubos adicionándoles 0,65 ml de Tris-HCl 2M pH 7 (preenfriado en hielo) y se realizaron suaves inversiones durante 3 min. El ADN cromosómico, junto a los restos celulares, se precipitaron mediante la adicción de 0.95 ml de NaCl 5M.

A continuación la mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 15-20 min, a 4°C y se realizaron dos fenolizaciones sucesivas, centrifugando cada vez a 14.000 rpm 10 min a 4°C para conseguir la separación de las fases fenólica y acuosa. Tras la última fenolización, la fase acuosa se extrajo con un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1), centrifugándose en las mismas condiciones. A la fase acuosa se le añadió un volumen igual de isopropanol preenfriado, incubándose a -20°C al menos 4 horas.

El ADN plasmídico se recogió por centrifugación a 4°C, (14000 rpm durante 20 min), lavándose posteriormente con etanol 70 %. Una vez secado al vacío, se resuspendió en 300 µl de tampón TE.

Para concentrar el ADN plasmídico obtenido de esta forma, se procedió a precipitarlo adicionando acetato sódico 3M, pH 6 (1/10 del volumen de partida) y 2 volúmenes de etanol absoluto (preenfriado a -20 °C). Tras mantener la mezcla 30 min en hielo, el ADN precipitado se recogió por centrifugación, lavándose posteriormente con 1 ml de etanol al 70 %. Una vez seco, se disuelve en un volumen adecuado de agua o tampón TE.

5.2.2 Maxipreparaciones en *E. coli*

Las células procedentes de un cultivo de 50 ml en fase estacionaria, se resuspendieron en 5 ml de Solución I (adicionada de lisozima 2 mg/ml y ARNasa 40 µg/ml) y posteriormente se añadieron 5 ml de Solución II, dejándose actuar durante 5 min. A continuación se adicionaron 5 ml de Solución III y la mezcla se incubó durante 15 min en hielo. Después de centrifugar a 14.000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se mezcló con 0,8 vol de isopropanol, manteniéndose a temperatura ambiente durante 20 ó 30 min. Tras centrifugar, el precipitado de ADN se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 2 ml de Tris-HCl 0,2M, pH 8 (cuando se consideró oportuno, se volvió a tratar con ARNasa) incubándose 10 min a temperatura ambiente. El ADN se extrajo dos veces con fenol y posteriormente con cloroformo-isoamílico. Para precipitar ahora el ADN se adicionó 1/10 volúmenes de acetato sódico 3M pH 7 y 2 volúmenes de etanol absoluto incubándose durante 1 hora a -20 °C. Tras centrifugar, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en un volumen adecuado de tampón TE o agua estéril.

5.3 Extracción de ADN total

Para la obtención de ADN total en *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus* seguimos un protocolo basado en el método descrito por Mora *et al* (2000).

Para ello partimos de 5 ml de cultivo en fase estacionaria, las células fueron recogidas por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min, lavadas en 1 ml de TE y resuspendidas de nuevo en 1 ml del mismo tampón. De esta muestra se tomaron 50 µl, a los que se añadieron otros 50 µl de TE y 400 µl de solución de lisozima (8 mg/ml de lisozima en TE) recién preparada, incubándose a 37°C durante 30 min. Posteriormente, se adicionaron 30 µl de SDS (10%) y 10 µl de Proteinasa K (20 mg/ml), incubándose de nuevo a 37°C durante 30 min. Después se realizaron dos extracciones con fenol y una con cloroformo-isoamilico (24:1), centrifugando en cada una de ellas a 14.000 rpm durante 5 min. El ADN resultante se precipitó mediante la adición de 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto, e incubando a -20°C durante un mínimo de 1 h. El ADN se recogió por centrifugación a 14.000 rpm durante 10 min, el sedimento fue lavado con etanol al 70% y secado a vacío. Una vez seco se disolvió en 100 µl de TE o agua estéril.

6. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ADN

6.1 Electroforesis en geles de agarosa

La separación de plásmidos, fragmentos de restricción de los mismos o productos de PCR, se llevó a cabo mediante electroforesis submarina horizontal en geles de agarosa cuya concentración varió entre el 0.7 y el 1%, dependiendo del tamaño de los ADNs a resolver. El tampón de la electroforesis fue Tris-acetato-EDTA (TAE).

Las muestras (9µl) mezcladas con la solución de carga (1µl), fueron depositadas en el gel para el desarrollo de una electroforesis a un voltaje constante de 80 V hasta que el indicador de frente alcanzó el borde del gel.

Una vez terminada la electroforesis, el gel se coloreó sumergiéndolo durante 10-20 min en una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml en agua destilada) y se visualizó por exposición a luz ultravioleta (302 nm) en un transiluminador (Spectroline Transilluminator, modelo TS-302).

Los geles se fotografiaron con un sistema UVP Image Store 5000 (Ultra Violet Products).

Tampón TAE

Tris base	40 mM
Acético glacial	2,5 mM

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

Donde C es la concentración del ADN medida en pmoles/ μ l, A es la absorción de la muestra a 260 nm, N es el número de nucleótidos del oligonucleótido y f el factor de dilución.

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

6.4 Digestión del ADN con endonucleasas de restricción

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 la reacción según lo indicado por la casa comercial para cada uno de los enzimas.

6.5 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 en los transformantes obtenidos, mediante su amplificación, como para obtener sondas no radiactivas. En ambos casos se utilizaron indistintamente los termocicladores SPR 3 MiniGene (Stuart Scientific) e iCycler (BioRad).

6.5.1 Técnica de PCR

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

ADN molde	50-100 ng
Oligonucleótido 1	100 picomoles
Oligonucleótido 2	100 picomoles
dNTPs (10mM)	2 μ l
Tampon de la Taq polimerasa (10x)	10 / 5 μ l

Taq polimerasa	1 U
Volumen final	100 / 50 μ l

Condiciones de la PCR:

C₀) Desnaturalización inicial: 95°C durante 90 seg.

C₁) Desnaturalización: 95 °C durante 60 seg.

C₂) Alineamiento: 1 min. La temperatura de esta etapa se calcula en cada caso según la composición de los oligonucleótidos empleados como cebadores. Para ello se calcula la temperatura de fusión (T_m) de cada oligonucleótido y a ésta se le restan 2 °C . La T_m se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: $T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$ (Sambrook *et al*, 1989).

C₃) 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 fue de 25 (incluidos C₁ a C₃).

Etapa de terminación, para favorecer a extensión de las cadenas parcialmente sintetizadas: 72°C durante 5 min.

6.5.2 Oligonucleótidos de síntesis empleados

Los oligonucleótidos *as-48* empleados en esta Memoria, aparecen expuestos en la Tabla 6; los que presentan una especificidad distinta, se recogen en la Tabla 7. Todos fueron suministrados por Amersham Pharmacia Biotech o por el Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Biomedicina y Parasitología López-Neyra (Granada).

6.5.3 Secuenciación

Las reacciones de secuenciado se llevaron a cabo 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 μ g de ADN purificado, junto con 3,2 pmol del oligonucleótido seleccionado como cebador, completando hasta un volumen final de 6 μ l. Este sistema, basado en la técnica de Sanger *et al.* (1977), utiliza la polimerasa AmpiTaq 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 hidróxilo 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.

OLIGONUCLEÓTIDO <i>as-48</i>	SECUENCIA (5'-3')	POSICIÓN INICIAL(*)
<i>as-48-1</i>	AATAAACTACATGGGT	+ 1327
<i>as-48-2</i>	TAATTTCTTTCTTAAGGT	- 1672
<i>as-48-4</i>	GATAAAAAAACAGGATAT	+ 1719
<i>as-48-5</i>	CCAAGCAATAACTGCTCTTT	-1704
<i>as-48B_{Xma}</i>	CGCCCGGGGATGAATCTCTTTGGAATTCTA	+1780
<i>as-48B-1</i>	GGAGCATCAAATTGTTAT	+ 2018
<i>as-48B-4</i>	AATCCTATTACTACACAAA	- 2275
<i>as-48B-5</i>	GCGGGCTCCAATGCT	- 2352
<i>as-48B-8</i>	ACATGCGATTAGATACCA	+ 3451
<i>as-48C-1</i>	CCTATTATAATTCCTAC	- 3553
<i>as-48C-3</i>	TACATGTGTAGGCGTTTT	- 3875
<i>as-48CH1</i>	CTGCAGCATGCCCGGGATATCCCA	+ 4075
	CGAACCAAAAATGCTGAGTTAA	
<i>as-48AC2</i>	CTGCAGCATGCGGATCCGATATCG	- 4400
	TAATACCGATGCACTTTTTTCAA	
<i>as-48C1-2</i>	GGTAGGAGTAAAGTAATG	+ 4840
<i>as-48D-3</i>	AGGTTTCATCTAATAATAC	- 5341
<i>as-48D-4</i>	AGGGAGTAAACTTGAAAA	+ 5470
<i>as-48D1-4</i>	TTCTATTGTACAGCTTC	-5696
<i>as-48E-2</i>	CACATAGAAAGATAAAAA	+6126
<i>as48E-4</i>	CCGGTAGCTTGAACAC	- 6317
<i>as-48F-1</i>	ACAACAAATTTCTTTAAG	+6389
<i>as-48F-6</i>	TCGTTACAGGTTGACCC	- 7176
<i>as-48F-8</i>	CAAATCAGTGTTCCAA	+ 7349
<i>as-48G-3</i>	CAATGGCCACCCGCTGC	- 8039
<i>as-48H-2</i>	CTGCGTCAGAAGCAGCT	- 9416
<i>as-46CH2</i>	CTGCAGCATGCGGATCCGATATCT	- 9800
	TCCGCCACACGCAGCTAATGAGAAT	
<i>as-48H-4</i>	GTCGATCTAATGATTGT	-10600

Tabla 6. – Oligonucleótidos *as-48* utilizados en este trabajo. (*): Referente al sitio *SphI* del plásmido pAM401-81;(+): Dirección aguas abajo del sitio *SphI*; (-): Cadena complementaria.

OLIGOS	ESPECIFICIDAD	SECUENCIA 5'-3'
<i>18Tn5</i>	Transposón Tn5	
<i>pIL253-A</i>	Plásmido pIL253	TGTGATCCGTAGCGGTT
<i>pIL253-B</i>	Plásmido pIL253	ÁTCCGAGCTTCCCA
<i>Lacto1</i>	Género <i>Lactococcus</i>	GTAACCTACCGAGAAAGGG
<i>Lacto2</i>	Género <i>Lactococcus</i>	ATCTCTAGGAATAGCAC

Tabla 7.- Oligonucleótidos no pertenecientes a la región *as-48* utilizados en este trabajo.

7. TÉCNICAS PARA LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

7.1 Purificación del ADN a partir de la agarosa

Se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Vogelstein y Gillespie (1979). Una vez realizada la electroforesis en gel de agarosa, y visualizadas las bandas de ADN, se cortó el trozo de agarosa correspondiente al fragmento de ADN que se quería recuperar y se añadieron 1,5 volúmenes de NaI 7M. Esta mezcla se fundió en un baño a 55 °C durante 5 min y a continuación se adicionó "Sephaglass" (Amersham Pharmacia Biotech) (5 µl/µg de ADN), incubándose 5 minutos a temperatura ambiente. Luego 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 y 50% de solución de lavado). Finalmente el ADN se eluyó con 3 volúmenes, respecto al volumen de Sephaglass adicionado, con agua ultrapura o tampón TE.

Solución de lavado

Tris-HCl pH 7,4	20 mM,
EDTA	1 mM
NaCl	100 mM

7.2 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 de cara a su posterior ligación, se utilizó 1 µg de ADN vector que se mezcló con 1 µl de el enzima fosfatasa alcalina (1U/µl) y se incubó durante 30 min a 37 °C. Tras dos fenolizaciones sucesivas, y una extracción con cloroformo-isoamílico, el ADN 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/µl.

7.3 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 linealizado y desfosforilado, 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 (Roche), en un volumen final de 10-20 μ l, incubándose toda la noche a 14 °C.

Antes de electrotransformar, para evitar el exceso de sales, la mezcla de ligación se dializó en filtros de nitrocelulosa con 0,025 μ m de tamaño de poro (Millipore).

Tampón de ligación (10x)

Tris-HCl 1M, pH 7,5	660mM
MgCl ₂	50 mM
Ditioeritritol	10 mM
ATP	10 mM

7.4 Ligación de productos de PCR en pGEM-T

Para subclonar fragmentos obtenidos mediante amplificación por PCR en pGEM-T, utilizamos el kit pGEM-T Vector System I (Promega), siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante (pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems Technical Manual).

8. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE MICROORGANISMOS

8.1 Transformación en *E. coli*. Método del cloruro de calcio

Para obtener células competentes de *E. coli* DH5 α se partió de cultivos de una noche en LB, crecidos a 37 °C en agitación. El cultivo se diluyó 50 veces en medio fresco, y fue puesto en incubación hasta alcanzar la fase exponencial temprana de crecimiento (A_{590} = 0,5). Las medidas de absorbancia se efectuaron en un espectofotómetro Pharmacia LKB Ultraespec III,

Las células fueron mantenidas en un baño de hielo durante 10 min, y a partir de este momento se trabajó en frío (4°C), ya que así aumenta el eficiencia de transformación.

Se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min y a continuación se resuspendieron en un volumen de una solución preenfriada de MgSO₄ 10mM, centrifugando después en las mismas condiciones. El sedimento se resuspendió suavemente en un volumen de una solución preenfriada de Tris-HCl 10 mM, pH 8 y 50 mM de CaCl₂ manteniéndose en hielo durante 15 min. Tras una nueva centrifugación (10 min a 5.000 rpm) las células fueron resuspendidas en 0,04 volúmenes de una solución de Tris-HCl 10mM, 50mM de CaCl₂ y glicerol al 20%. Esta suspensión se repartió en tubos eppendorfs preenfriados a razón de 100µl / tubo y fueron mantenidas a -70 °C hasta su uso.

Para llevar a cabo la transformación se mezclaron 100 µl de células competentes, previamente descongeladas en hielo, con 20-50 ng de ADN plasmídico, incubándose en hielo durante 30 min, seguidamente fueron sometidas a un choque térmico durante 2 min a 42 °C.

Para conseguir la expresión fenotípica de los genes de resistencia a antibióticos codificada por el plásmido transferido, las células se diluyeron en 900 µl de medio LB, manteniéndose durante 5 min en hielo y posteriormente 1 hora a 37 °C en agitación. La selección se realizó mediante siembra de 200 µl de la suspensión celular en placas de LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados. Las placas fueron incubadas 16 h a 37 °C hasta la aparición de colonias transformantes. Paralelamente se llevaron a cabo experimentos control sin la adición de ADN.

8.2 Electrotransformación de *E. coli*

La obtención de células electrocompetentes de *E. coli* se realizó partiendo de cultivos en LB inoculados al 2%, que fueron incubados hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento ($A_{590} = 0,7$). Las células se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min a 4°C (ya durante todo el resto del proceso trabajamos a esta temperatura). A continuación las células fueron sometidas a sucesivos lavados con volúmenes decrecientes de agua preenfriada (1, 1/2, 1/2 y 1/50 volúmenes). Por último, las células se resuspendieron en 1/500 volúmenes de solución de glicerol al 10% y fueron alicuotadas en tubos eppendorf a razón de 50 µl/tubo, para ser conservadas a -70°C hasta el momento de su uso.

Las electrotransformaciones se efectuaron siguiendo las condiciones descritas en el protocolo del electroporador, Electro Cell Manipulator 600 (BTX Electroporation System), y cubetas BTX de 2 mm de distancia entre los electrodos.

En las cubetas preenfriadas se mezclaron 1-5 μ l de ADN (10-20 ng) con 45 μ l de células electrocompetentes, previamente descongeladas en hielo, disponiéndose en el electroporador, tras lo cual se aplicó un voltage de 2,45 kV, a una resistencia de 129 Ω y una capacitancia de 25 μ F.

Inmediatamente las células se diluyeron en 950 μ l de medio LB frío, y se incubaron en agitación a 37°C durante 60-90 min para permitir la expresión fenotípica del ADN transferido. Posteriormente se sembraron en placas de LB sólido adicionado del antibiótico de selección, incubando a 37°C durante 24h.

8.3 Electrotransformación de *Enterococcus*

Para la obtención de células competentes se inocularon al 2 % matraces de medio THB adicionado de glicina al 2,5%, con un cultivo bacteriano de una noche, incubándose hasta alcanzar una densidad óptica a 590 nm entre 0,4-0,6. A continuación las células se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 15 min a 4°C en una centrífuga Sorval, y se lavaron 4 veces, en las mismas condiciones, con volúmenes decrecientes (1, 1/2, 1/2 y 1/10 volúmenes) de una solución preenfriada de glicerol al 10%. Finalmente las células se resuspendieron en 1/200 volúmenes de la misma solución, se alicuotaron y se guardaron a -70°C hasta su uso.

Para llevar a cabo la electrotransformación se mezclaron en la cubeta de electroporación 5 μ l de ADN con 45 μ l de células electrocompetentes, previamente descongeladas en hielo, disponiéndose en el electroporador, tras lo cual se aplicó un voltage de 1,25 kV, a una resistencia de 480 Ω y una capacitancia de 25 μ F.

Inmediatamente se diluyeron en 950 μ l de THB frío, y se incubaron a 37°C durante 90 min para permitir la expresión fenotípica del ADN. Después se sembraron en placas de BHA adicionado del antibiótico de selección a razón de 0,2 ml/placa, incubando a 37°C durante 2-3 días.

8.4 Electrotransformación de *Lactococcus*

En los experimentos de electrotransformación de bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* se empleó la técnica descrita por Holo y Nes (1991), con pequeñas modificaciones.

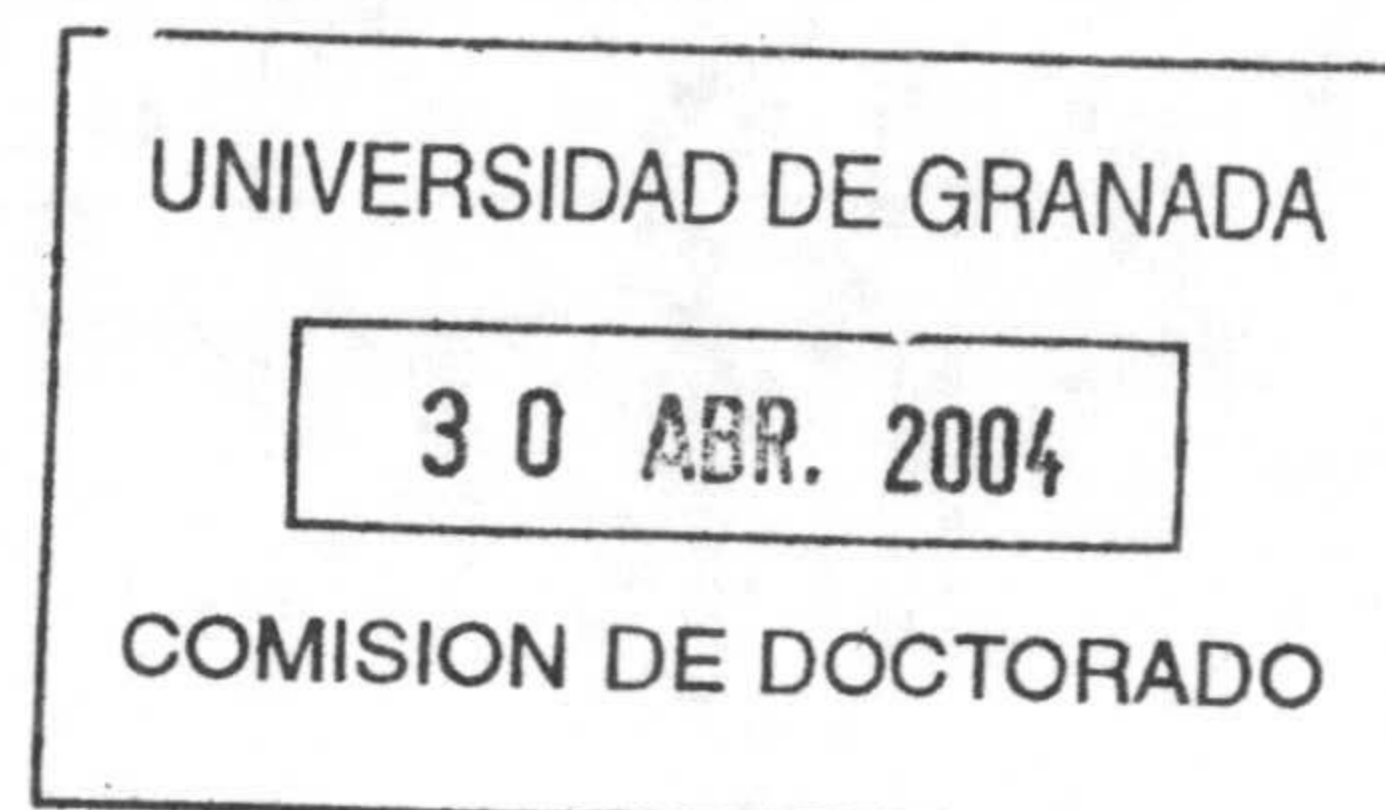
Para la obtención de células competentes los cultivos fueron crecidos en medio SGM17 hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm entre 0,5 y 0,8; entonces se diluyeron 100 veces en SGM17 fresco, incubándose hasta obtener una densidad óptica a 600 nm entre 0,2 y 0,7. Las células se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm 10min a 4°C y fueron sometidas a tres lavados consecutivos con volúmenes decrecientes (1, 1/2 y 1/10) de una solución preenfriada de sacarosa 0,5M y glicerol al 10%. Finalmente las células se resuspendieron en 1/100 volúmenes de la misma solución, repartidas en alícuotas y mantenidas a -70°C hasta el momento de su uso.

Para electrotransformar estas bacterias se mezclaron en la cubeta de electroporación 1-3 µl de ADN con 45 µl de células electrocompetentes, previamente descongeladas en hielo, disponiéndose en el electroporador, tras lo cual se aplicó un voltage de 2,28 kV, a una resistencia de 186 Ω y una capacitancia de 25 µF.

Inmediatamente se diluyeron en 950 µl de medio de reconstitución, y se incubaron a 28°C durante 2 h. Posteriormente se sembraron en placas de GM17 con agar adicionado del antibiótico de selección; las placas fueron incubadas a 28°C durante 2-3 días.

8.5 Electrotransformación de *Lactobacillus*

En los experimentos de electrotransformación de bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* se empleó la técnica descrita por Wei *et al* (1995). Las células electrocompetentes de esta cepa se prepararon a partir de cultivos crecidos durante una noche en medio MRS suplementado con un 1% de glicina. Posteriormente se recogieron las células por centrifugación a 4 °C, resuspendiéndose en 5-10 volúmenes de medio fresco MRS. Tras incubación una hora a 37 °C, las células fueron recogidas de nuevo por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min a 4 °C y lavadas 3 veces con volúmenes decrecientes (1,1/2 y 1/10) de agua estéril y preenfriada a 4°C. Finalmente las células se resuspendieron en 1/100 del volumen inicial de partida de glicerol al 10 %, repartiéndose en alícuotas y de esta forma se mantuvieron a -70 °C hasta su uso.



La electrotransformación se efectuó mezclando en la cubeta 45 μ l de células competentes con 1-4 μ l de ADN y aplicando un pulso de 2,5 kV, a una capacitancia de 25 μ F y una resistencia de 400 Ω . Rápidamente se diluyeron en 450 μ l de medio MRS frío, incubándose luego a 37 °C durante al menos 1h. La selección de los transformantes se realizó mediante siembra en placas de MRS-agar adicionado del antibiótico adecuado e incubación de las mismas a 37 °C durante 3-4 días.

9. PREPARACIÓN DE SONDAS PARA HIBRIDACIÓN

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

Las condiciones utilizadas fueron las anteriormente descritas en el apartado 6.5.1. y los componentes de la mezcla de amplificación fueron los siguientes:

ADN molde	50 ng
Oligonucleótido 1	100 picomoles
Oligonucleótido 2	100 picomoles
dNTPs-Dig (2 mM)	10 μ l
Tampon de la Taq polimerasa (10x)	10 / 5 μ l
Taq polimerasa	1 U
Volumen final	100 / 50 μ l

Los dNTPs-Dig fueron suministrados por Roche. Finalizada la reacción de marcaje, las sondas fueron purificadas mediante el kit de Promega Wizard PCR Preps, DNA Purification System.

9.2 Marcaje del ADN con digoxigenina-11-dUTP mediante el fragmento Klenow de la polimerasa

Este método, conocido como “multicebador”, fue descrito por Feinberg y Vogelsheim (1983, 1984), y consiste en la síntesis parcial de ADN a partir de un ADN molde, utilizando como cebador una mezcla de hexanucleótidos, digoxigenina-11-dUTP como nucleótido marcado, y el fragmento Klenow de la polimerasa. La presencia del nucleótido marcado en el ADN sintetizado permite su posterior detección.

Para marcar cantidades de 0,2-1 μg de ADN, se procedió a su desnaturalización incubándolo a 95°C durante 10 min; a continuación se pasó rápidamente a hielo. En este momento se preparó la siguiente mezcla:

ADN molde	0,2-1 μg
Mezcla de hexanucleótidos (1 μM)	2 μl
dNTPs 1 mM	2 μl
Klenow	2 U
Volumen total	20 μl

La mezcla se incubó a 37°C durante 60 min. Para detener la reacción e inactivar el enzima, se añadió Na₂-EDTA hasta una concentración final de 10 mM.

Para separar el ADN sonda de los nucleótidos no incorporados, se añadieron 2 μl de LiCl 4M y 60 μl de etanol absoluto preenfriado, incubándose durante al menos 30 min a -70°C. El ADN fue recogido por centrifugación, lavado con etanol al 70% y una vez seco se resuspendió en 50 μl de agua o tampón TE.

9.3 Sondas empleadas

Las sondas utilizadas en este trabajo son las recogidas en la Tabla 8.

SONDAS <i>as-48</i>	OLIGO 1	OLIGO 2	TAMAÑO
<i>as48-A</i>	<i>as-48-1</i> (+1327)	<i>as-48-2</i> (-1672)	345 pb
<i>as48-B</i>	<i>as-48-4</i> (+1719)	<i>as-48B-5</i> (-2352)	633 pb
<i>as48-C</i>	<i>as-48B-8</i> (+3451)	<i>as-48C-3</i> (-3875)	424 pb
<i>as48-D</i>	<i>as-48C1-2</i> (+4840)	<i>as-48D-3</i> (-5341)	501 pb
<i>as48-D1*</i>	<i>as-48D-4</i> (+5470)	18Tn5	255 pb
<i>as-48F</i>	<i>as-48F-1</i> (+6389)	<i>as-48F- 6</i> (-7176)	787 pb

Tabla 8.- Sondas génicas de la región *as-48* utilizadas en este trabajo. (*) como molde se utilizó el pAM401-81::Tn5_{DIE}.

10. TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA E HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (NORTHER Y SOUTHER BLOT)

10.1 Técnicas para ARN

En todos los procesos de manipulación de ARN se extremaron las condiciones de limpieza del material con la finalidad de evitar la contaminación fortuita con ARNasas.

El agua y tampones empleados fueron tratados con dietil-pirocarbonato al 0,1% (DEPC, Sigma-Aldrich) durante 4 h y después esterilizada en autoclave a 120°C 20 min.

El material de vidrio se esterilizó en un horno Pasteur a 180°C durante un tiempo mínimo de 4 horas.

Todo el material empleado en la electroforesis fue previamente tratado con H₂O₂ al 3% o con NaOH 40mM y después lavado con abundante agua estéril.

10.1.1 Extracción de ARN total de *E. faecalis*

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

Se inocularon 5 ml de medio BHI al 2 % con un cultivo en fase estacionaria con la correspondiente cepa bacteriana, y se incubó hasta alcanzar una $Ab_{590} = 0,6-0,7$ (aproximadamente 3h). Las células se recogieron por centrifugación (10 min a 5.000 rpm, 4 °C) y se resuspendieron en 1 ml Tris-HCl 50mM-25 % sacarosa (p/v). A esta suspensión celular se adicionó posteriormente 500 µl de EDTA 0,5M y 25 µl lisozima (20 mg/ml de Tris-ClH sacarosa), dejando incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Trascurrido este tiempo, las células volvieron a ser recogidas por centrifugación, y ahora resuspendidas en 150 µl de tampón de lisis, adicionando a continuación 150 µl de tampón de lisis + SDS 1% (p/v). La mezcla se mezcló por inversión suave y posteriormente calentada a 95°C durante 2 min, para después enfriarla rápidamente en hielo.

Luego se adicionaron 300 µl de fenol-saturado (pH 8) precalentado a 65°C, agitando vigorosamente en vórtex hasta lograr mezclarlo.

Esta muestra se incubó a 65 °C durante 3 min, mezclándose ocasionalmente. Seguidamente se enfrió en hielo 5 min, y se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a 14.000 rpm. A continuación el sobrenadante se volvió a fenolizar y fue extraído tres veces consecutivas con éter etílico.

Finalmente para precipitar el ARN se añadieron 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto preenfriado a -20°C. El ARN se recogió por centrifugación 4°C, y una vez seco se disolvió en 10 µl de agua estéril-DEPC. En este

momento la muestra fue tratada con 10U (1 μ l) de ADNasa I libre de ARNasa, para eliminar posibles restos de contaminación por ADN, incubándose durante 15 min a temperatura ambiente.

La ADNasa fue inactivada a 70 °C durante 10 min y el ARN de la muestra se volvió a precipitar con acetato sódico y etanol absoluto, resuspendiendo finalmente en 12 μ l de agua-DEPC.

El ARN obtenido puede conservarse a -70°C hasta el momento de su uso, aunque nosotros encontramos que la degradación del mismo era mucho menor si se procedía inmediatamente a realizar la electroforesis.

Tampón de lisis

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

10.1.2 Preparación de los geles de ARN

Los ARNs presentes en cada muestra se separaron mediante electroforesis desnaturizante en un gel de agarosa con formaldehído.

La muestra, antes de cargarla en el gel, fue desnaturizada calentando a 55°C durante 15 min en presencia de formamida y formaldehído en la siguiente proporción:

ARN (10 μ g)	12 μ l
Tampón MOPS (10x)	5 μ l
Formaldehído 37%	8,75 μ l
Formamida desionizada	25 μ l
Volumen final	50 μ l

Una vez desnaturizada, a la muestra se le añaden 5 μ l de solución de carga.

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

	<u>Para 100 ml</u>	<u>Para 30 ml</u>
10xMOPS	10 ml	3 ml
H ₂ O	87 ml	26 ml
Agarosa	1,2 g	0,36 g
Una vez fundida la agarosa se añade Formaldehído 37%	3 ml	0,9 ml

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

10 x MOPS

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

Las condiciones de la electroforesis fueron 70-80V durante 90 min a 4°C. Finalizada la electroforesis se colocó el gel en el transiluminador para visualizar las bandas de ARNr; para ello, se dispuso previamente un plástico protector, encima el gel y otro plástico para marcar el frente, los pocillos y las bandas de referencia correspondientes a los ARNr 23S, 16S y 5S respectivamente.

10.2 Preparación de los geles de ADN

Se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Southern en 1975. Para ello realizamos la electroforesis de forma habitual, en gel de agarosa al 0,7%. Tras realizar la tinción del gel con bromuro de etidio y fotografía del mismo, procedimos a efectuar la depurinización ácida del ADN sumergiendo el gel en 3 volúmenes de HCl 0,25N durante 10-15 min.

A continuación el ADN se sometió a desnaturalización alcalina sumergiéndolo en 3 volúmenes de NaOH 0,5N-NaCl 1,5M, durante 15 min. Por último se sumergió en gel en 3 volúmenes de en Tris-HCl 0,5M-NaCl 1,5M (pH 7,4) durante 15 min.

10.3 Transferencia a membranas de nylon (Southern y Northern Blot)

Una vez realizada la electroforesis, los geles se transfirieron a una membrana de nylon, realizando brevemente un lavado con agua y después con solución de transferencia 10 x SSC durante 15 min.

Para la transferencia se fueron colocando sobre un cristal estéril, situado encima de una bandeja con tampón de transferencia, en este orden: papel Whatman 3MM, el gel, la membrana de Nylon, cuatro piezas de papel Whatman 3MM y un bloque de

papel de filtro de 5 cm de altura aproximadamente. Para mantener ligeramente comprimido el sistema se colocó un peso adecuado (0,5 kg). Todo ello se conectó con dos tiras de 3MM al reservorio de tampón de transferencia 20xSSC, dejándolo durante una noche.

Finalizada la transferencia, los ácidos nucleicos se fijaron a las membranas por exposición a la luz UV (320 nm) durante 5 min.

10.4 Prehibridación e hibridación ADN-ADN y ADN-ARN

Tanto la prehibridación como la hibridación se llevaron a cabo según la técnica recomendada por el fabricante (Roche).

Para ello la membrana se incubó a 55 °C en una bolsa sellada, con 10 ml solución de hibridación 2ml/10cm², durante al menos 2 horas. Posteriormente, esta solución fue sustituida por 2 ml de una nueva solución de hibridación conteniendo la sonda marcada y previamente desnaturalizada (100-200 ng), incubándose a 55 °C durante toda la noche en un horno de hibridación. Esta solución puede ser congelada a -20°C y reutilizada posteriormente.

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

Solución de hibridación (250 ml)

Formamida	125,0 ml
30 x SSC	41,5 ml
Fosfato sódico 1M	12,5 ml
N-Lauril sarcosina 10%	2,5 ml
Reactivo Bloqueo al 1%	50,0 ml
SDS	17,5 g

20 x SSC

NaCl	3,0 M
Citrato sódico	0,3 M
pH	7

10.5 Revelado inmunológico

Todo el proceso de revelado inmunológico se realizó siguiendo las instrucciones del sistema de revelado DIG Luminiscent detection (Roche).

La membrana se equilibró previamente con 50 ml de tampón I durante 5 min en agitación. Posteriormente fue incubada con 20 ml de tampón II (tampon I + agente de bloqueo) durante 30 min. Transcurrido este tiempo se adicionaron 3-4 ml del tampón II con Ac anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (dilución 1:10.000) en una bolsa sellada y se incubó durante 30 min a 37°C. El exceso de anticuerpos no incorporados fue eliminado mediante 2 lavados con 100 ml de tampón I durante 15 min en agitación.

Finalmente la membrana se equilibró con 20 ml de tampón III durante 2 min, y después se adicionaron de 0,5 a 1ml (según tamaño de la membrana) de tampón III con 10 µl de CSPD manteniéndolos durante 5 min a 37 °C en la oscuridad.

Una vez seca la membrana con papel de filtro, se cubrió con un film de plástico y se impresionó por contacto una película autorradiográfica Kodak X-OMAT entre 30 min-4 h, revelándose posteriormente.

Tampón I

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

Tampón II

Reactivo de bloqueo al 1% en Tampón I

Tampón III (pH 9,5)

Tris-HCl	0,1 M
NaCl	0,1 M

10.6 Estimación del tamaño de los ARNs

El tamaño de los diferentes tipos de ARNm detectados en los experimentos de Northern blot, se determinó mediante la comparación de su migración en los geles de agarosa con los correspondientes ARNr, cuyos tamaños respectivos son los siguientes: 120 b para el ARNr 5S, 1.540 b para el ARNr 16S y 2.900 b el 23S.

11. MUTAGÉNESIS PLASMÍDICA MEDIANTE EL TRANSPOSÓN TN5

Para experimentos de mutagénesis con Tn5, se utilizó el fago λ_{467} que porta 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. Dicha cepa contiene un represor de la replicación del fago λ_{467} facilitándose así la transposición del Tn5.

11.1 Obtención de una suspensión del fago λ_{467}

Se empleó la estirpe *E. coli* CS1045 crecida en medio líquido LB suplementado con maltosa 0,4% (p/v) y 10mM $MgSO_4$ 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 λ_{467} . Las mezclas fueron incubadas 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 suplementado con $MgSO_4$ 20mM y 0,4 % de maltosa (p/v). Posteriormente se extendió la mezcla sobre placas con medio p75, incubándose a 37 °C durante 16 h.

Transcurrido este tiempo se pudieron visualizar las calvas de lisis en la capa de agar blando y los fagos se recogieron con unas gotas de cloroformo. Después de agitar enérgicamente en vortex, se centrifugó a 5.000 rpm durante 20 min, el sobrenadante, donde se encontraba el fago, se lavó de nuevo con cloroformo en las mismas condiciones y se guardó a 4 °C hasta el momento de su uso.

11.2 Inserciones con el transposón Tn5

La cepa *E. coli* RYC1000 que portaba el plásmido a mutagenizar se dejó crecer en 10 ml de LB adicionado de maltosa (0,4%) y el antibiótico para la 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 4×10^{10} fagos/ml, lo que representa una multiplicidad de infección de aprox. 1), y se incubó 20 min a 37 °C para permitir la adsorción. Posteriormente se tomaron 5 alícuotas de 0,2 ml que se repartieron en tubos 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 1M y los correspondientes antibióticos (Cm y Km). Estas placas se incubaron una noche a 37°C.

Los transformantes obtenidos se analizaron mediante digestión del ADN con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* al objeto de estudiar el punto de inserción del Tn5. Cuando fue preciso, el punto exacto de inserción del transposón Tn5 se determinó mediante secuenciación del ADN.

12. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS

12.1 Comparación de secuencias, identificación de dominios y asignación de funciones

La comparación de secuencias y las búsquedas de homologías en las distintas bases de datos, se utilizaron los programas FASTA, y BLAST. En la identificación de dominios y la asignación de funciones a las secuencias fueron utilizados SMART (Schultz *et al.*, 2000), SCANPROSITE (Appel *et al.*, 1994) y GENEQUIZ (Iliopoulos *et al.*, 2000). En la búsqueda de homologías se emplearon los programas FASTA, WU-BLAST2 y PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997; Pearson y Lipman, 1988). REPRO (George y Heringa, 2000) y SAPS (Brendel *et al.*, 1992) se usaron en el estudio de las repeticiones proteicas internas así como, en el análisis estadístico de las secuencias. La obtención de modelos para las secuencias que presentaban homologías con otras de estructura conocida, fueron obtenidas con Swiss-Model (Peitsch, 1996; Peitsch y Guex, 1997). Los alineamientos múltiples se llevaron a cabo con MULTALIN (Corpet, 1998) y el perfil de Gribskov fue realizado a través del W2H del Genetics Computer Group (Senger *et al.*, 1998).

12.2 Predicción de segmentos transmembrana en las proteínas

La predicción de segmentos proteicos transmembrana (TM) se ha efectuado mediante seis métodos diferentes, empleando los ajustes dados por defecto: TopPred11 (von Heijne, 1996) SMART, TMPred (Hoffman y Stoffel, 1993), TMAP (Person y Argos, 1994), MEMSAT (Jones *et al.*, 1994), PHD (Sambrook *et al.*, 1989) y SOSU1 (Hirokawa *et al.*, 1998). PHD también fue utilizado en el análisis de homologías y en la predicción de la estructura secundaria de las secuencias.

12.3 Números de acceso a la secuencias nucleotídicas

Las secuencias de *as-48ABCC1DD1* y *as-48EFGH* obtenidas del plásmido pMB2, están depositadas en la base de datos EMBL con los números de acceso Y12234 y AJ438950, respectivamente.

Resultados

Como se ha expuesto en el apartado de Introducción de esta Memoria, en trabajos previos había sido identificada la región genética *as-48* como el determinante responsable de la producción y/o inmunidad frente la enterocina AS-48. Dicha región fue localizada en un fragmento *SphI-PstI* (10,6 Kb) del plásmido pMB2 presente en la cepa salvaje S-48 de *Enterococcus faecalis* (Martínez-Bueno *et al.*, 1998). La región *as-48* fue clonada en el vector bifuncional (*E. coli-E. faecalis*) pAM401(10,4 Kb). El plásmido recombinante se designó como pAM401-81 (25 Kb). La transferencia de pAM401-81 a la cepa JH2-2 de *E. faecalis*, carente de material extracromosómico, ha permitido la expresión del carácter AS-48, y el análisis de los determinantes genéticos que codifican esta bacteriocina (Figura 6) (Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Díaz, 1999).

1. CARACTERIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LOS DIFERENTES PRODUCTOS GÉNICOS IDENTIFICADOS EN LA REGIÓN *as-48*

En la caracterización de los diferentes productos génicos codificados por la región *as-48*, se han seguido diversas estrategias. De una parte se obtuvieron mutantes mediante mutagénesis transposicional con Tn5, que presentaron interrumpidos algunos de los genes identificados, y de otra, se clonaron por separado algunos de los operones identificados, para estudiar su capacidad de expresión y determinar las características fenotípicas que confieren. Por último, ha sido realizado un estudio teórico sobre la función de algunos productos génicos, mediante la búsqueda de homologías y similitudes con proteínas y genes bien caracterizados, depositados en las principales bases de datos.

1.1 Generación de mutantes en la región *as-48*. Estudio fenotípico

Para aproximar las funciones de los distintos productos génicos identificados en la región *as-48*, y completar el trabajo iniciado por Díaz (1999), se ha llevado a cabo un estudio de mutagénesis mediante inserción del transposón Tn5 en regiones codificantes, empleando el fago λ_{467} y como hospedador del mismo, la cepa RYC100 de *E. coli* previamente transformada con la construcción pAM401-81.

Para ello realizamos la transformación mediante electroporación de *Escherichia coli* RYC100 con el plásmido recombinante pAM401-81 y posterior selección con cloranfenicol. Una vez obtenidos los transformantes se realizó la inducción a la transposición con Tn5 y selección de los posibles mutantes con cloranfenicol y kanamicina. Este experimento de mutagénesis tuvo que ser repetido en múltiples ocasiones debido a la escasa frecuencia de mutantes obtenida. De un total de 458 colonias aisladas, 60 presentaban el transposón en el plásmido pAM401-81, y de ellas, sólo 12 tenían el transposón en la región *as-48*. La localización de las inserciones dentro de la región *as-48* fue establecida mediante análisis de restricción con *EcoRI* y *BamHI*, amplificación por PCR y electroforesis en geles de poliacrilamida de los fragmentos obtenidos, y por último, y de forma precisa, mediante secuenciación de los productos de PCR obtenidos.

De esta forma se pudo comprobar la existencia de Tn5 en el promotor del gen estructural *as-48A* (posición -15), así como interrumpiendo los genes *as-48B*, *as-48D*, *as-48G* y *as-48H*. También se obtuvo un mutante con Tn5 en el espacio intergénico existente entre los genes *as-48D1* y *as-48E* (pAM401-81::Tn5_{D1-E}). Es interesante destacar que no ha sido posible la obtención de mutantes en los genes *as-48D1* cuyo producto se considera responsable de la inmunidad, ni en *as-48E* y *as-48F* y curiosamente en *as-48C* sólo se han obtenido inserciones en el extremo 3' terminal. En la Figura 7 se presenta, junto con el mapa físico del plásmido pAM401-81, la posición de las inserciones transposicionales obtenidas.

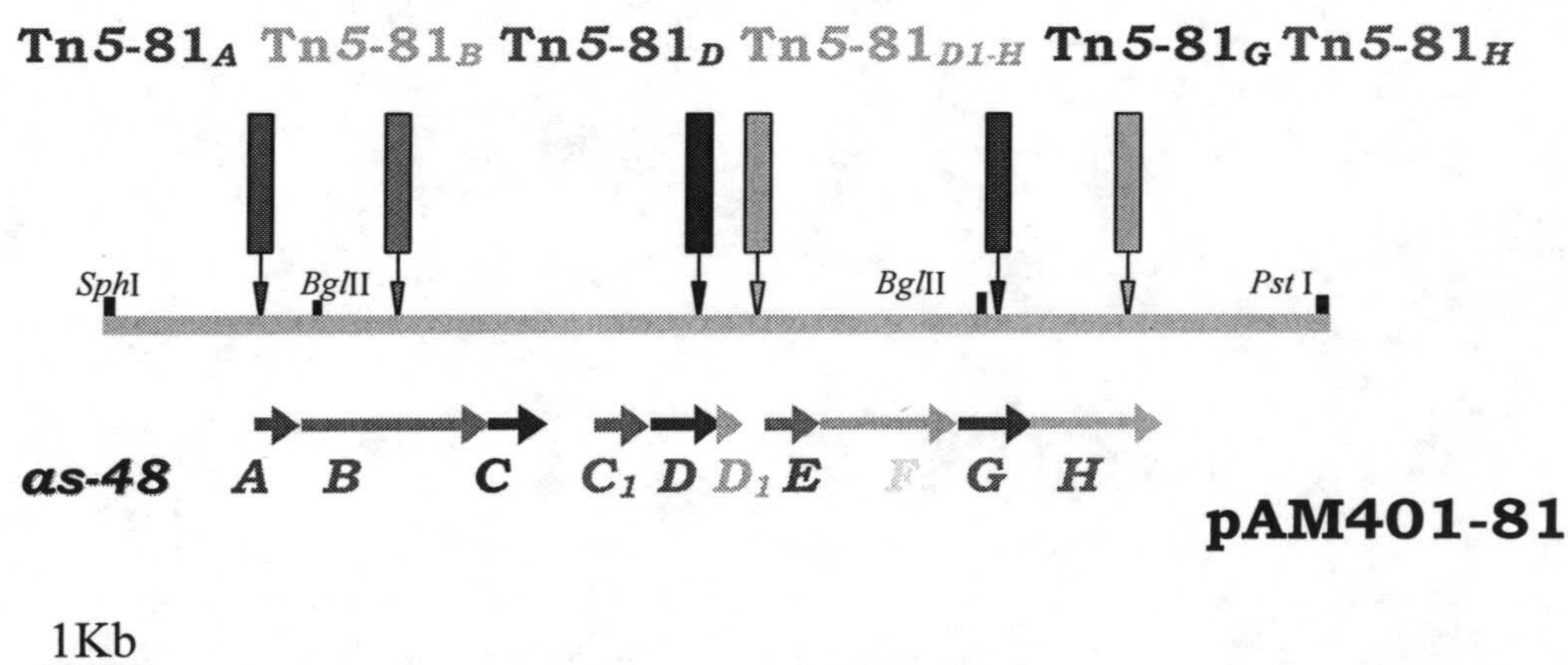


Figura 7 .- Mutantes de inserción de la región *as-48* obtenidos con Tn5. Las flechas verticales indican el lugar de inserción del transposón y las horizontales la dirección de transcripción de los genes.

Cada uno de los mutantes fueron transferidos a la cepa JH2-2 de *E. faecalis* para analizar el fenotipo resultante, usando como controles las cepas JH2-2 transformadas con los plásmidos pAM401-81 y pAM401. De esta forma se han investigado las posibles alteraciones fenotípicas del carácter AS-48 (producción e inmunidad) resultantes de la inactivación génica causada por el transposón.

En relación a la capacidad productora de AS-48, valorada en función del diámetro del halo de inhibición (mm) frente a la cepa indicadora S-47, empleando la técnica de la doble capa, se ha podido comprobar que (Tabla 9):

- i) la interrupción de los genes *as-48A*, *as-48B* y *as-48D* determina de forma inequívoca la incapacidad de producir AS-48 (fenotipo no productor), lo que confirma que estos determinantes están directamente implicados en la producción de AS-48.
- ii) La inserción en los genes *as-48G* y *as-48H* confiere solo un fenotipo hipo-productor (11 mm de halo de inhibición frente a 16 mm de la cepa no mutada)
- iii) Mientras que la interrupción de la región intergénica *as-48DI-E*, no afecta la capacidad de producir AS-48

CEPA	PLÁSMIDO	PRODUCCIÓN DE AS-48 (mm)
<i>E. faecalis</i> JH2-2	pAM401-81 (control positivo)	16
	pAM401-81::Tn5 _A	0
	pAM401-81::Tn5 _B	0
	pAM401-81::Tn5 _D	0
	pAM401-81::Tn5 _{DI-E}	16
	pAM401-81::Tn5 _G	11
	pAM401-81::Tn5 _H	11
	JH2-2 (control negativo)	0

Tabla 9.- Producción de AS-48 en medio sólido por los diferentes transformantes de *E. faecalis* JH2-2.

Los niveles de resistencia mostrados por estos mutantes, valorados en medio sólido empleando la técnica de las gotas frente a concentraciones crecientes de AS-48 semipurificado, permitió comprobar que la interrupción de la mayoría de los genes

determinaba una disminución en la resistencia a AS-48, con excepción del mutante JH2-2(pAM401-81::Tn5_{DI-E}) que muestra fenotipo salvaje (Tabla 10).

CEPA	PLÁSMIDO	RESISTENCIA FRENTE A AS-48 (µg/5µl)					
		0,5	1	3	6	9	18
<i>E. faecalis</i> JH2-2	pAM401-81(control positivo)	R	R	R	R	R	R
	pAM401-81::Tn5 _A	R	R	R	R	S	S
	pAM401-81::Tn5 _B	R	R	S*	S*	S	S
	pAM401-81::Tn5 _D	R	R	R/S	S	S	S
	pAM401-81::Tn5 _{DI-E}	R	R	R	R	R	R
	pAM401-81::Tn5 _G	R	R	R/S	S	S	S
	pAM401-81::Tn5 _H	R	R	R/S	S	S	S
	pAM401-81 _{CIH}	R	R	S	S	S	S
	pAM401-81 _{EH}	S	S	S	S	S	S
	JH2-2 (control negativo)	S	S	S	S	S	S

Tabla 10.- Ensayo de la sensibilidad frente a AS-48, realizado por la técnica de las gotas, de los diferentes transformantes de *E. faecalis* JH2-2. R: resistente; S: sensible; R/S: aparición halos apenas medibles; S*: aparición de halos turbios.

1.2 Obtención de nuevas construcciones en pAM401. Análisis fenotípico

Con objeto de profundizar en el estudio de las funciones de los productos génicos identificados y determinar su influencia en relación a la resistencia frente a AS-48, procedimos a obtener dos nuevas construcciones en el vector bifuncional pAM401.

1.2.1 Clonación de *as-48EFGH* en pAM401: plásmido pAM401_{EH}

La construcción pAM401_{EH} fue obtenida a partir del mutante de inserción pAM401-81::Tn5_{DIE} previamente digerido con *SphI*. La digestión origina dos fragmentos, uno de mayor tamaño (21,1 Kb) que contiene la región situada corriente arriba de la inserción (genes *as-48ABCC₁DD₁*), junto con la mayor parte del ADN del transposón y un 2º fragmento de 9,7 Kb que contiene el resto del transposón y los cuatro últimos genes *as-48EFGH*. Este 2º fragmento, una vez purificado, fue religado en el plásmido pAM401 (construcción pAM401_{EH} de 21,1 Kb) y finalmente transferida a la cepa DH5-α de *E. coli* mediante transformación, utilizada como hospedadora

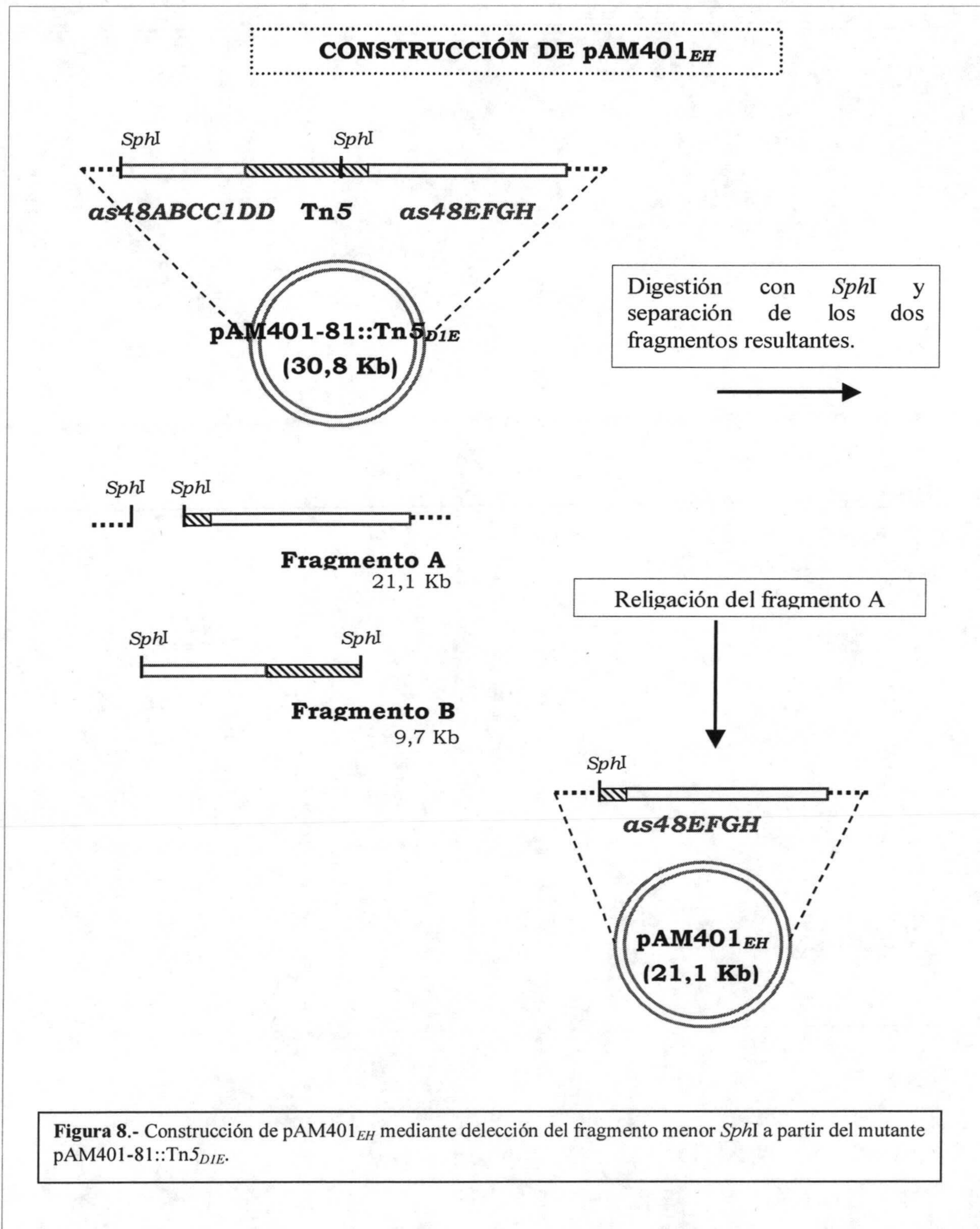


Figura 8.- Construcción de pAM401_{EH} mediante delección del fragmento menor *Sph*I a partir del mutante pAM401-81::Tn5_{DIE}.

intermediaria para la obtención de ADN (Figura 8). La confirmación de la región genética clonada fue obtenida mediante perfil de restricción y amplificación por PCR.

1.2.2 Clonación de *as-48C₁DD₁EFGH* en pAM401: plásmido pAM401_{CIH}

Debido a la carencia de dianas de restricción apropiadas para clonar la región genética comprendida entre los genes *as-48C₁* y *as-48H*, se decidió llevarla a cabo mediante amplificación por PCR, diseñando para ello cebadores específicos (*as48CH1* y *as48CH2*) a los cuales se les añadieron colas de nucleótidos con diversos sitios de restricción:

- *as48CH1*: hibrida con la región situada corriente abajo del gen *as-48C* y presenta sitios de cortes para los enzimas *SphI*, *XmaI* y *EcoRV*.
- *as48CH2*: hibrida con la región adyacente al extremo 3' terminal del gen *as-48H* y contiene dianas para los enzimas *EcoRV*, *BamHI* y *SphI*.

El producto de PCR obtenido (5.725 pb) empleando dichos cebadores y la construcción pAM401-81 como ADN molde, fue subclonado en el vector intermediario pGEM-T, dando lugar a la construcción pGEM-T_{CIH} (8,7 Kb). A partir de ésta, se realizó la digestión con *SphI* y *BamHI*, para liberar el fragmento mayor de 5,7 Kb que se corresponde exactamente con el tamaño del producto de PCR y contiene la región *as-48C₁DD₁EFGH*. Este fragmento fue posteriormente subclonado en pAM401, previamente digerido con las mismas enzimas, originando la construcción pAM401_{CIH} (15,9 Kb) que ya fue introducida mediante transformación en la cepa DH5- α de *E. coli* (Figura 9)

1.2.3 Obtención de transformantes en *E. faecalis* JH2-2. Análisis fenotípico

Las construcciones pAM401_{EH} y pAM401_{CIH} fueron transferidas a la estirpe JH2-2 de *E. faecalis* para investigar su comportamiento frente a la adición de enterocina AS-48.

Los resultados expuestos en la Tabla 10 permiten comprobar que la presencia de los cuatro últimos genes (pAM401_{EH}) no confieren por si mismos resistencia frente a AS-48, cuando es administrado desde del exterior, mientras que la presencia de los genes *as-48C₁DD₁EFGH* (pAM401_{CIH}) confiere a los transformantes obtenidos (pAM401_{CIH}) la supervivencia frente a 1 μ g de AS-48 semipurificado disuelto en 5 μ l de agua.

CONSTRUCCIÓN DE pAM401_{C1H}

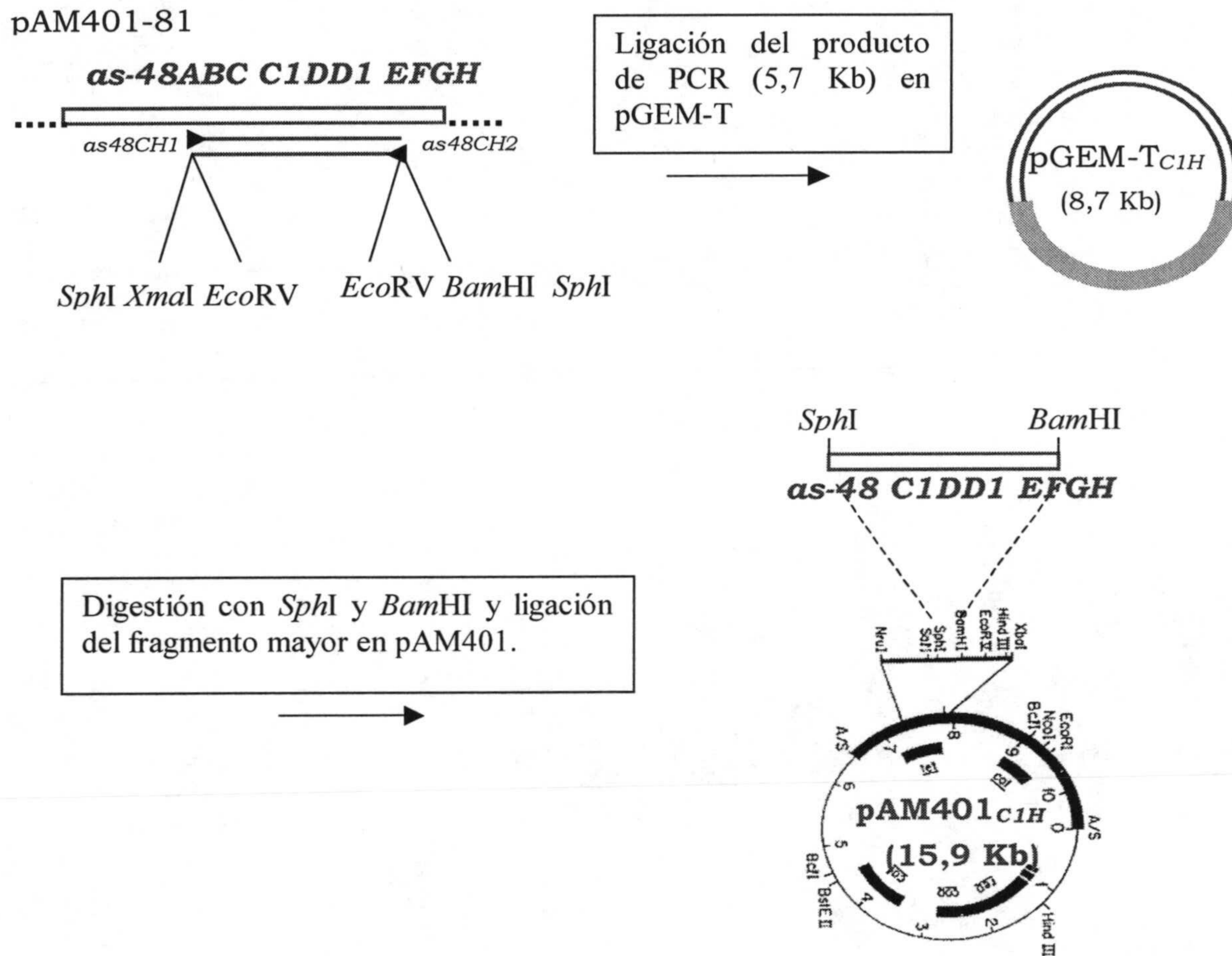


Figura 9.- Estrategia de construcción de pAM401_{C1H}: obtención del fragmento mediante PCR, ligación del mismo en pGEM-T y posterior subclonación en *SphI*-*BamHI*.

2. ANÁLISIS DE TRANSCRIPCIÓN

La organización y expresión de la región *as-48* ha quedado definitivamente establecida en esta Memoria. Los resultados obtenidos en los experimentos de Northern blotting usando ARN total extraído de los diferentes transformantes así como de los nuevos mutantes de inserción obtenidos, han permitido confirmar la organización de la región *as-48* en varios operones y corregir la interpretación de resultados anteriormente obtenidos por Martínez-Bueno *et al.* (1998) y Díaz-Torres (1999). Efectivamente en estudios de transcripción realizados en nuestro laboratorio empleando JH2-2(pAM401-81) se había descrito la existencia de tres transcritos policistrónicos T₁ (*as-48ABC*), T₂ (*as-48C1DD1EFGH*) y T₃ (*as-48D1EFGH*) y dos transcritos monocistrónicos para el gen estructural, T_A y el gen de la inmunidad T_{D1}. Sin embargo, quedaban por aclarar cuestiones tan importantes como el tamaño de T₁ e investigar las posibles interrelaciones entre la expresión de los distintos operones, y finalmente establecer la expresión génica durante el crecimiento exponencial de los transformantes.

2.1 Detección de ARNs mensajeros

La extracción de los ARNs totales se ha realizado siguiendo la técnica de Tomita *et al.*, (1996) con las modificaciones expuestas en el apdo 10.1.1 de Material y Métodos. En trabajos anteriores se empleó el kit Qiagen (RNeasy Mini Kit), pero en enterococos se obtiene bajo rendimiento y degradación del ARN, lo que origina artefactos que dificultan la observación de las bandas. Fue, pues, necesario establecer la relación entre el volumen del cultivo y la concentración óptima de lisozima empleada y las condiciones más adecuadas de extracción para evitar la degradación de los ARNm. Este estudio se completa con la extracción del ARN a diferentes horas del crecimiento exponencial para comprobar si hay una expresión diferencial en el tiempo. Los ARN totales extraídos han sido desarrollados en geles de agarosa en presencia de formaldehído y transferidos a membranas de nylon mediante capilaridad, para así llevar a cabo su hibridación con sondas obtenidas mediante PCR a partir de oligonucleótidos deducidos de las diferentes regiones genéticas.

2.1.1 Detección de T_A

En las hibridaciones realizadas con ARN extraído del clon JH2-2(pAM401-81) empleando una sonda procedente del gen estructural, se identificó una única señal, muy patente, con un tamaño aprox. de 0,3 Kb, que coincide con el tamaño de gen estructural *as-48A*. Tal banda identificada como un transcrito monocistrónico T_A, había sido descrita anteriormente por Díaz (1999) pero se desconocía la etapa del crecimiento en que se producía su expresión y el carácter constitutivo o inducible de la misma.

Por ello se repitió la extracción a diferentes horas del crecimiento logarítmico (1,5, 3, 5 y 8 h) de JH2-2(pAM401-81), lo que permitió comprobar que la intensidad de la señal era prácticamente la misma durante todo el periodo investigado (1,5 a 8 h) (Figura 10, parte I, líneas 1, 2, 3 y 4).

Interesó entonces investigar si la expresión de T_A se producía de forma constitutiva o, por el contrario dependía de la expresión de otras regiones génicas. Para ello, repetimos el ensayo con ARN extraído de la cepa JH2-2 transformada con diversas construcciones de nuestra genoteca. Partimos de la construcción pAM401-61 en la que sólo se había clonado el gen estructural (pAM401_A) y obtuvimos el resultado antes comentado al hibridar con una sonda derivada del gen estructural: una señal de 0,3 Kb que tenía la misma intensidad que la de la construcción completa (pAM401-81). Finalmente y como era de esperar, no hubo señal para T_A, cuando se empleó ARN del mutante pAM401-81::Tn5_A, en el que el transposón se encuentra interrumpiendo el promotor del gen estructural (Figura 10, parte I, línea 5).

2.1.2 Detección de T₁

A continuación del gen estructural y separado por una corta región intergénica en la que se sitúa un terminador fuerte para el mismo, se encuentran los genes *as-48B* y *as-48C*. Cuando se emplea una sonda derivada del gen *as-48B* para conocer el estudio de transcripción de estos genes en JH2-2(pAM401-81), aparece la señal T₁ con un tamaño aproximado a 2,3 Kb, que se corresponde exactamente con el tamaño estimado para ellos. Este transcrito es, sin embargo, de difícil observación debido a que se encuentra situado en la zona distorsionada por el ARNr 23S (Figura 10, parte II, líneas 1, 2 y 3) y solo en buenas preparaciones de ARN se puede observar con cierta claridad.

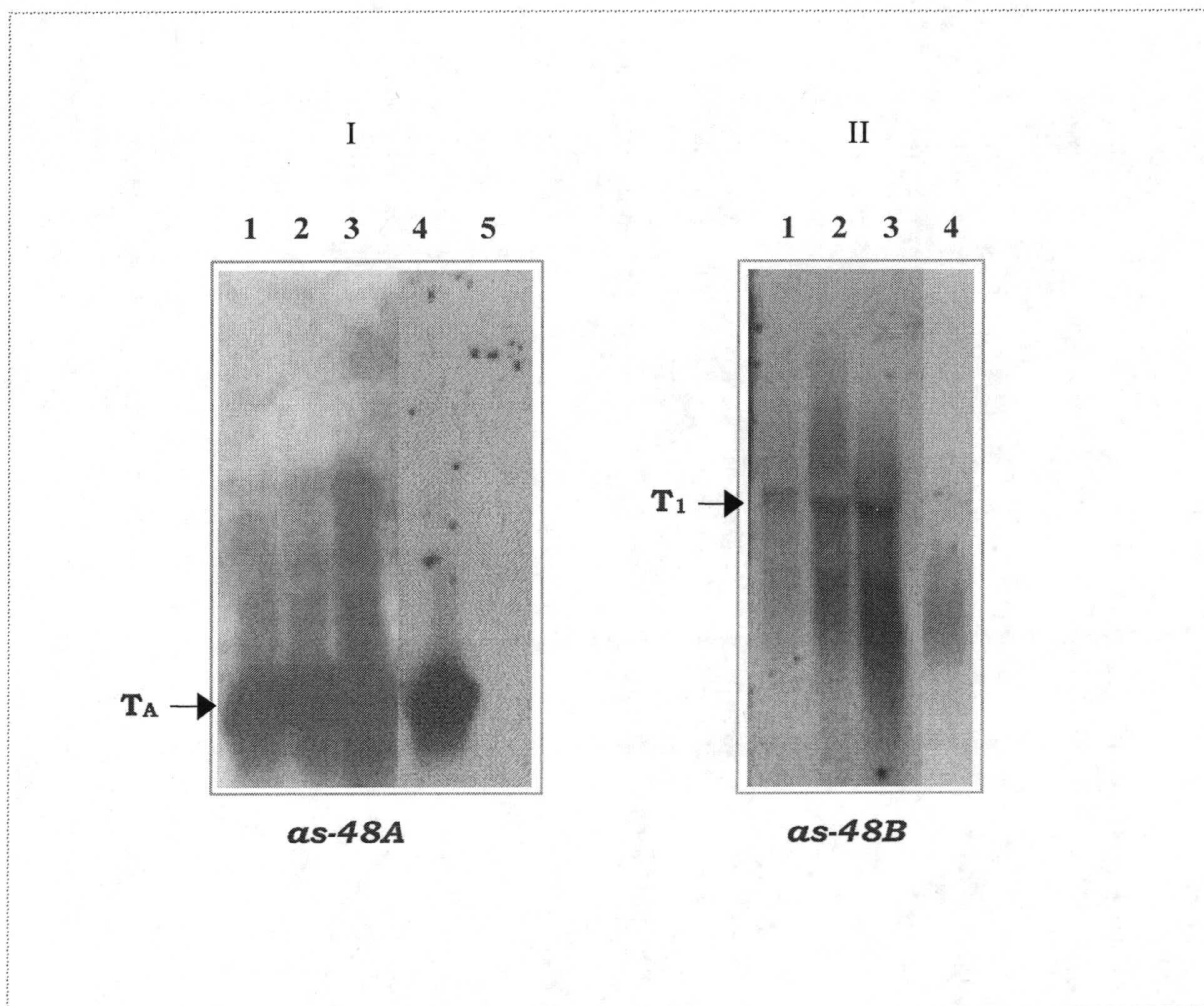


Figura 10.- Análisis de transcripción de la región genética *as-48* en *E. faecalis* JH2-2 (pAM401-81) y varios mutantes obtenidos en este trabajo.

Parte I: ARN total de JH2-2 (pAM401-81) extraído a 1.5, 3, 5 y 8 h. (líneas 1, 2, 3 y 4, respectivamente) y de JH2-2 (pAM401-81::Tn5A) extraído a las 3 h. (línea 3), hibridado con una sonda derivada del gen *as-48A*.

Parte II: ARN total de JH2-2 (pAM401-81) a las 1.5, 3 y 5 h. de crecimiento (líneas 1, 2 y 3) y del mut. JH2-2 (pAM401-81::Tn5A) a las 3 h. de crecimiento (línea 4) hibridados con una sonda derivada del gen *as-48B*.

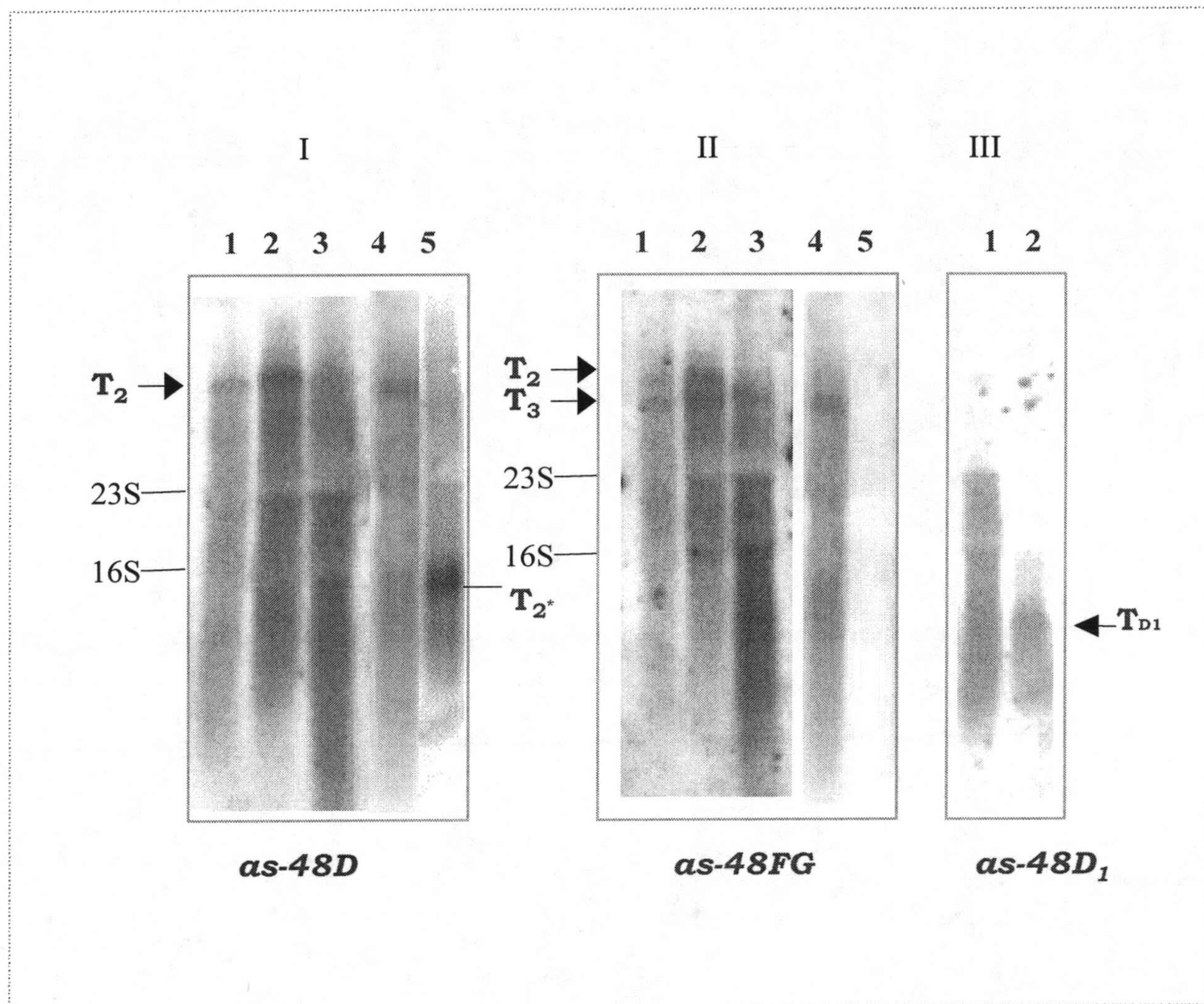


Figura 11.- Análisis de transcripción de la región genética *as-48* en *E. faecalis* JH2-2 transformado con los diversos plásmidos derivados de pAM401.

Parte I: ARN total de JH2-2 (pAM401-81) extraídos a las 1,5, 3 y 5 h. de crecimiento (líneas 1, 2 y 3), JH2-2(pAM401-81::Tn5_A) a las 3 h de crecimiento (línea 4) y de JH2-2 (pAM401-81::Tn5_{DI-E}) a las 3 h. de crecimiento, hibridados con una sonda derivada del gen *as-48D*. T_2^* corresponde al transcrito T_2 truncado (línea 5).

Parte II: ARNs totales de JH2-2 (pAM401-81) a 1,5, 3 y 5 h. de crecimiento (líneas 1, 2 y 3), de JH2-2 (pAM401-81::Tn5_{DI-E}) a las 3 h. de crecimiento (línea 4) y del mutante de delección pAM401-81_{EH} a las 3 h. de crecimiento (línea 5), hibridados con una sonda derivada de los genes *as-48FG*.

Parte III: ARNs totales obtenidos de cultivos de 5 h de los transformantes JH2-2 (pAM401-81) (línea 1) y de JH2-2 (pAM401_{D1}), hibridados con una sonda derivada del gen *as-48D1*.

Para verificar la existencia de T_1 , se empleó como control negativo el mutante JH2-2(pAM401-81::Tn5_B) que no da señal a ese nivel.

La extracción de los ARNs totales se ha realizado a diferentes horas del crecimiento logarítmico de JH2-2 (pAM401-81) y se ha podido observar que prácticamente no hay variación en los niveles de expresión entre las 1'5 y 5 h de crecimiento.

Se ha investigado así mismo la influencia del gen estructural en la expresión de T_1 gracias a la disposición de la construcción pAM401-81::Tn5_A. Los resultados obtenidos con este mutante fueron sorprendentes, pues no fue posible la detección del transcrito a pesar de que el ensayo fue repetido varias veces y a diferentes horas de crecimiento en Figura 10, II-4 se muestran los resultados obtenidos a las 3h de crecimiento.

2.1.3 Detección de T_2

La existencia de un largo transcrito T_2 (aprox. 6,4 Kb) descrito inicialmente por Díaz (1999) se pudo confirmar cuando se emplearon sondas obtenidas de cualquiera de los genes situados a continuación del operón *as-48BC*. Efectivamente, en la membrana en la que se habían transferido los ARNs procedentes de JH2-2(pAM401-81) extraídos a las 1,5, 3 y 5 h de crecimiento, se observa un largo transcrito policistrónico, denominado T_2 , al emplear una sonda derivada del gen *as-48D*. T_2 corresponde a una onda de transcripción con longitud suficiente para cubrir la expresión de los restantes genes identificados en *as-48* (*as48C₁DD₁EFGH*) (Figura 11, I-1,2,3). El mismo resultado puede ser observado cuando se utiliza una sonda derivada de los genes *as-48FG* (Figura 11, II-1,2). Es importante destacar que la intensidad de la señal de T_2 tiene una expresión diferencial a lo largo del tiempo: comienza a detectarse desde las primeras etapas del crecimiento (90 min) y alcanza su máxima intensidad a las 3 h, pero entonces comienza a declinar hasta ser prácticamente indetectable a las 5 h de crecimiento.

Como era de esperar, en el perfil de transcripción del mutante pAM401-81::Tn5_{DIE} se observa una banda de menor tamaño correspondiente a un transcrito truncado (T_2^*), debido a la inserción de Tn5 en el espacio intergénico *as-48D₁-E*, que

tiene efecto polar, ya que impide la transcripción de los cuatro últimos genes (Figura 11, I-5).

Así mismo se ha observado que la transcripción de T_2 no es dependiente de la expresión del gen estructural, ya que puede ser detectada en los Northern obtenidos con el mutante JH2-2(pAM401-81::Tn5_A) (Figura 11, I-4).

2.1.4 Detección de T_3

De acuerdo con anteriores resultados, una nueva onda de transcripción T_3 permite la expresión de los cuatro últimos genes *as-48EFGH* (Díaz, 1999). Para confirmarlo y estudiar los mecanismos de regulación a los que esta nueva ronda de transcripción pudiera estar sometida, ha sido de gran utilidad disponer del mutante pAM401-81::Tn5_{DI-E} (Tn5 insertado en el espacio intergénico) y de la construcción pAM401_{EH}. El empleo de sondas derivadas de los genes *as-48FG* permitió confirmar la existencia de las dos ondas de transcripción, el transcrito T_2 antes comentado y T_3 con un tamaño aprox. de 5,4 Kb que cubre la expresión de los cuatro últimos genes *as-48EFGH* (Figura 11, II-1,2,3) y se detecta durante todo el crecimiento logarítmico (1,5 a 8 h) de JH2-2(pAM401-81), a diferencia de lo encontrado para T_2 .

Resultados similares fueron obtenidos al estudiar la expresión del mutante de inserción pAM401-81::Tn5_{DIE}. La hibridación con sondas deducidas de *as-48FG* permitió observar con toda claridad una banda a nivel de T_3 (Figura 11, II,4).

Fue sorprendente, sin embargo, el resultado obtenido con células transformadas con la construcción pAM401_{EH}, en las que no fue posible detectar ninguna señal que se pudiera identificar con T_3 (Figura 11, II-5), sugiriendo que la expresión de este transcrito pudiera estar condicionada por la expresión de otros genes.

Finalmente y para comprobar la influencia del gen estructural en la expresión de T_3 , se repitió el ensayo empleando el mutante JH2-2(pAM401-81::Tn5_A). En las hibridaciones obtenidas se pueden observar las bandas correspondientes a los transcritos T_2 y T_3 , lo que permite concluir que su expresión es independiente de la del gen estructural.

2.1.5 Detección de T_{D1}

Prácticamente desde el comienzo de nuestro trabajo se identificó el gen *as-48D₁* como el determinante responsable de la inmunidad frente a AS-48, en base a que los transformantes JH2-2(pAM401_{D1}) presentaban un cierto nivel de resistencia y en ellos se había comprobado la existencia de una pequeña banda T_{D1} (200-300 b), correspondiente a un transcrito monocistrónico para dicho gen (Martínez-Bueno *et al.*, 1998). Este resultado ha sido confirmado en esta Memoria con el ARN obtenido de transformantes JH2-2(pAM401_{D1}), sin embargo no ha sido posible poner de manifiesto una banda similar en los transformantes con la construcción completa pAM401-81 (Figura 11, III,1 y 2), ni siquiera a las 5h de crecimiento de los cultivos, que, como hemos visto anteriormente, es la etapa en la que los niveles de T₂ comienzan a declinar. Este resultado permite pensar que la expresión de T₂ asegura los necesarios niveles de inmunidad para la célula, y que la expresión de T_{D1} podría, por ello, estar reprimida.

3. CARACTERIZACIÓN DEL CLUSTER *as-48EFGH*

En estudios previos en los que se identificaron los cuatro últimos genes *as-48EFGH* de la región *as-48*, se realizó un estudio muy preliminar para caracterizar los nuevos productos génicos, basado en la búsqueda de homologías con proteínas depositadas en las bases SWISSPROT, PIR y EMBL, utilizando programas convencionales. Sin embargo, los resultados obtenidos no permitieron asignar una función clara a As-48E (169 aminoácidos, 19 kDa, pI 10,21) caracterizada como proteína integral de membrana (con 4 segmentos transmembrana, TM), debido a la ausencia de homologías significativas, ni tampoco a la proteína As-48F, la cual por su carácter hidrofílico (45,1 kDa, 407 residuos), se le supuso una localización superficial anclada en membrana a través de su extremo N-amino terminal hidrófobo. Sólo los productos génicos As-48G y As-48H fueron caracterizados como un nuevo sistema de transporte ABC (ATP-Binding-Casette) en el cual As-48H representaba la región de expansión en membrana (4 TM), mientras As-48G era la encargada de aportar la energía necesaria para el transporte, gracias a la hidrólisis del ATP.

3.1 Análisis predictivo de los productos de los genes *as-48EFGH*

En esta Memoria se ha profundizado en la caracterización de las cuatro proteínas As-48EFGH aplicando métodos analíticos de alta fiabilidad, un trabajo realizado en colaboración con los Dres. Soler y Ramírez del Dpto de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada. La búsqueda de homología de estas proteínas con las depositadas en la base de datos SWALL reveló importantes similitudes con la familia de transportadores ABC de muy diverso origen.

El producto génico mejor caracterizado ha sido As-48G, una proteína parcialmente hidrofílica carente de dominios hidrofóbicos capaces de atravesar la membrana. Efectivamente, aplicando SCANPROSITE se ha podido confirmar la existencia de dos motivos de unión al ATP/GTP, la secuencia **GPSGSGKSTLINL** (residuos 38-45) y **RALINHPKFIIADEPT**, algo menos conservada, (posiciones 142-156) identificados como los motivos Walker A y B, propios de los transportadores ABC (Fath y Kolter, 1993). Además, hay una secuencia muy conservada, conocida como motivo C, **LSGGQ(Q)QR**, en la que la segunda Gln supone un cambio conservativo en relación a las Arg o Lys de la secuencia **LSGGQ(RK)QR**. Empleando los programas WU-BLAST y FASTA, se ha encontrado un importante grado de homología con transportadores YVRO ($P=10^{-54}$) y YKNY ($P=10^{-52}$) de *Bacillus*, aunque muchos otros sistemas de transporte ABC también muestran homologías significativas (en el rango de 10^{-49} a 10^{-41}). El alineamiento múltiple realizado en PDB con un conjunto representativo de transportadores ABC, incluido la subunidad de unión al ATP de la histidín-permeasa HisP de *Salmonella typhimurium*, ha permitido establecer la existencia de cuatro regiones con importancia funcional: i) el segmento 31-47 en el que se encuentra el dominio Walker A. ii) los residuos encontrados entre las posiciones 80-89, en torno a la secuencia **RNxxxGFIFQ**, situada entre los dominios Walker A y B, iii) el segmento que ocupa las posiciones 126-174, que abarca la secuencia señal y el motivo Walker B contiguo y finalmente, iv) el segmento 194-205, que incluye la secuencia **MVTHNPEV**, próxima al extremo C-terminal. La existencia de regiones tan conservadas, nos ha llevado a proponer para la proteína As-48G la estructura tridimensional que se muestra en la Figura 12, realizada con el programa Swiss Model en la que se pueden comparar los motivos A, B y C de la proteína HisP con las regiones equivalentes encontradas en la estructura propuesta para As-48G (se marcan en color los residuos de las secuencias *consensus* de los motivos).

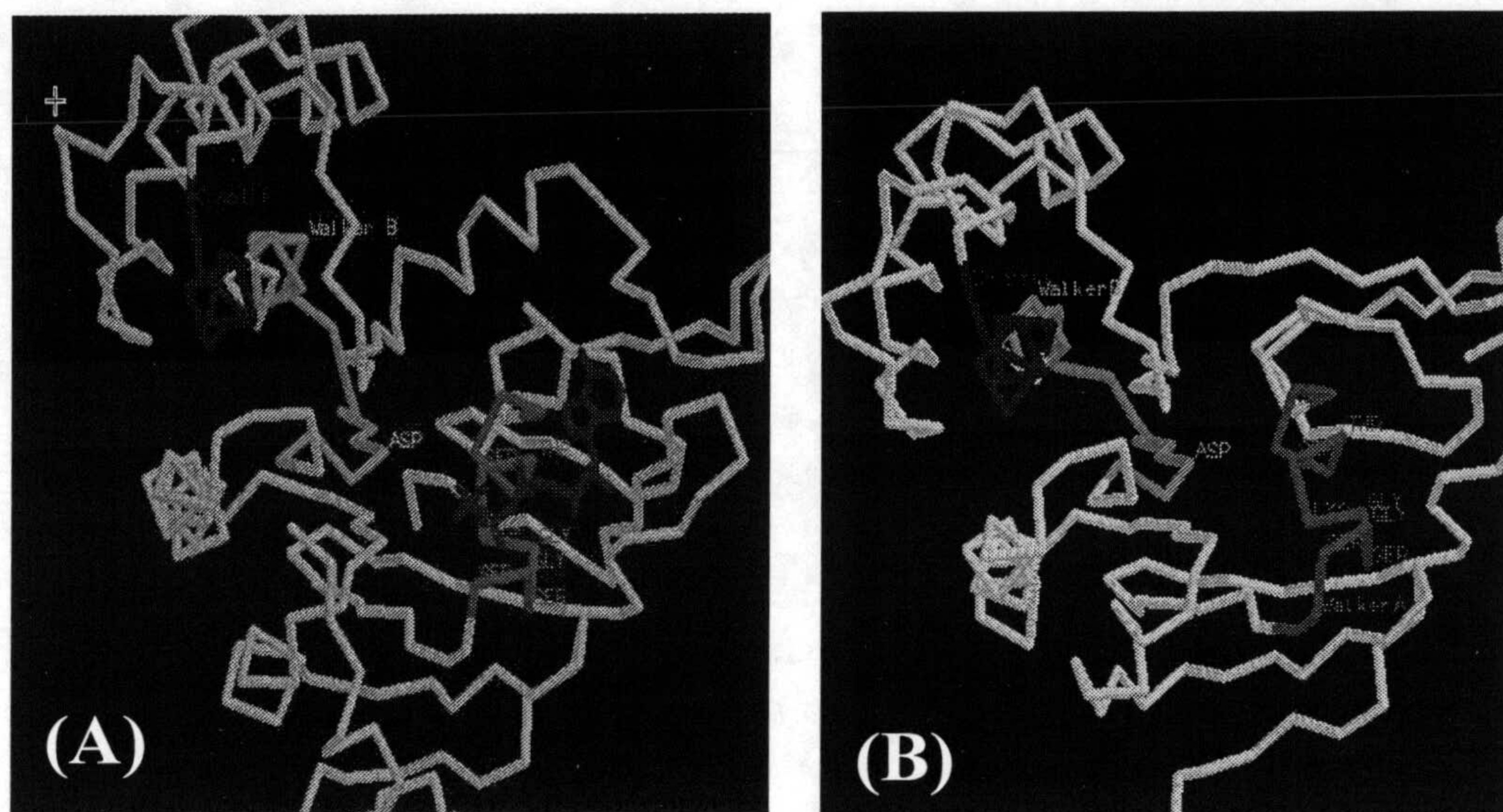


Figura 12.- Estructura propuesta para la proteína As-48G (B), basada en la homología con la estructura de la subunidad de unión al ATP de la histidín permeasa (HisP) de *Salmonella typhimurium* (A) obtenida empleando el programa SwissModel. Los motivos Walker A, B y C son mostrados en rojo, verde y azul respectivamente.

En cuanto a As-48H todos los métodos empleados (TMpred, MEMSAT, PHD, TMAP, SOSUI, y TOPPRED) predicen la existencia de 4 segmentos transmembrana (TM), uno situado en el extremo amino y los otros tres agrupados a una distancia de 200 residuos, en el extremo carboxilo. Además, se han encontrado similitudes entre los segmentos TM1 y TM3 y entre TM2 y TM4, que en ambos casos presentan la misma orientación en la membrana. De acuerdo con el programa GENEQUIZ, As-48H muestra gran homología (con valor de confianza o exactitud del 0.99) con la proteína YBJZ del transportador ABC de *E. coli*, una proteína de 648 aminoácidos en la que se encuentra el sitio de unión al ATP seguida de 5 dominios de expansión en membrana. El alineamiento de As-48H con transportadores homólogos ha permitido conocer que los segmentos mejor conservados son TM1 y TM2 cuya distancia está muy conservada (alrededor de 230 residuos), también están conservados el asa entre TM2 y TM3, que podría ser el sitio de reconocimiento para la subunidad As-48G, y la zona final de TM4 (Figura 13). Nuestros resultados han permitido también conocer las similitudes existentes en la región soluble de As-48H con la región de expansión en membrana de las proteínas YVRN e YKNZ de *Bacillus*, a pesar de ser éstas proteínas que tienen integradas en la misma molécula el dominio ABC y el de expansión en membrana. En un intento de aproximar la función de As-48H se realizaron alineamientos de la región

soluble existente entre los segmentos TM1 y TM2 de As-48H con proteínas relacionadas para obtener el perfil de Gribskov. Estos alineamientos han permitido encontrar homologías muy interesantes con proteasas, en particular con aquellas del tipo cisteín-serín-aspártico-proteinasas y metionín aminopeptidasas, que pueden ser muy orientativas para proponer una función para esta proteína a nivel celular (Díaz *et al*, 2003).

```

                261                                     310
AS-48H      KAIKNNRKRS VLTMIIGIIG ISSVITILAI GRGFERDTVK NLTKSDSKNV
Q9K885     HSIKAHKMRS VLTMLGIVIG VAAVIIIVVAI GQGGEALLKS QIAGEEN.TV
YKNZ_BACSU SSVLAHKMRS ILTMLGIIIIG VGSVIVVVAV GQGGEQMLKQ SISGPGN.TV
YVRN_BACSU QSIFSHKLRs ILTMLGVIIG IAIIIAIVSM LKGQSEQLKQ SMIGMGNNAI
Q9K6Q4     QSIFAHKLRs ALTMLGVIIG IAIIIAIVSI IEGQSEALKS SMIGLGNNTI
Q9PHQ9     SSILAHKLRs ILTMLGIIIIG IASVVCVVAL GLGSQAKVLE SIARLGTNTI
Q9K0N7     QAVLAHKMRS LLTMLGIIIIG IASVVSVAL GNGSQKKILE DISSIGTNTI
LOLC-ECO   AADRFGRFVS WLSTIGITLG VMLVTVLSV MNGFERELQN NILGLMPQAI
Consensus  .si.ahk.rS .LtmlG!iiG !aav!.!va. g.G.e..l.. .i.g.g..t!

                551                                     610
AS-48H      AGISLFIAGV GVMNMMYISV SERTKEIGIR RALGATRKS I MLQFLLEGLI LTISGGIIGY
Q9K885     AGISLFGVGGI GVMNIMLVSV TERTREIGIR KSLGATRQQI LIQFLIEAVI LTLIGGILGI
YKNZ_BACSU AGISLLVGGI GVMNIMLVSV TERTREIGIR KSLGATRQGI LTQFLIESV LTLIGGLVGI
YVRN_BACSU ASISLLVGGI GVMNIMLVSV TERTREIGIK KALGAKRRVI LFQFLTEAVV LTSIGGILGV
Q9K6Q4     ASISLLVGGI GVMNIMLVSV TERTREIGIK KALGAKRHVI LLQFLTEAVV LTSLGGALGI
Q9PHQ9     AVIALIVGGI GVMNIMLVSV SERTREIGIR MAIGARREDI MMQFLIEAVM ICTIGAILGV
Q9K0N7     ALISLVGGI GVMNIMLVSV TERTKEIGIR MAIGARRGNI LQQFLIEAVL ICVIGGLVGV
LOLC-ECO   LSLIVAVAAF NIITSLGLMV MEKQGEVAIL QTQGLTPRQI MMVFMVQGAS AGIIGAILGA
Consensus  a.isl.!ggi g!mni$lvsv tErtrE!gIr .alGatr..I $.qF$.#av. lt.iGgilG.

                631                                     679
AS-48H      ...KVHVSV DLFTIILAVG VSSVIGLVFS VMPASEAAKK DLIDILR..
Q9K885     ...GWPSLI SVQVIVGGLL FSMLIGVIFG LLPANRAAKL NPIESLRYE
YKNZ_BACSU ...GWPSLI SWQVVCVGGV FSMLIGVIFG MLPANKAAKL DPIEALRYE
YVRN_BACSU ...PMPFIV SIPAVVGALI FSMVAVGIFG LLPSIKASKL QPVDALRYE
Q9K6Q4     ...GMPFII SLPVAVIGGLL FSMIVGIFG FLPSFKASNL QPVDALRYE
Q9PHQ9     ...TDFPMIL NAYSVLLGGL SSMFIGVVFG FFPARNAANL NPISALSKE
Q9K0N7     ...TDFPMDI SAMSVIGAVA CSTGIGIAFG FMPANKAAKL NPIDALAQD
LOLC-ECO   LDGAALPVAI EPLQVIVIAL VAMAIALLST LYPSWRAAAT QPAEALRYE
Consensus  .....p..! s...!ig..l .sm.!g..fg ..Pa..Aakl #pi#aLrye

```

Figura 13.- Alineamiento múltiple de As-48H con numerosas secuencias relacionadas usando MULTALIN (9). Las secuencias usadas han sido Q9K885 (*Bacillus halodurans*), YKNZ e YVRN (*B. subtilis*), Q9K6Q4 (*B. halodurans*), Q9PHQ9 (*Campylobacter jejuni*), Q9K0N7 (*Neisseria meningitidis*) y LOLC (*E. coli*).

En relación a la proteína As-48E, todos los métodos empleados confirman la existencia de 4 segmentos transmembrana, y una disposición en la que los dos extremos de la molécula se orientan hacia la cara citoplasmática de la membrana. La predicción de estructura secundaria obtenida con PHD asigna, además, una hélice externa entre los dos primeros segmentos transmembrana. Los resultados obtenidos con GENEQUIZ permiten establecer cierta homología con el transportador LctE de *Lactococcus lactis*, responsable de la inmunidad frente a la lacticina 481 (Rince *et al.*, 1997).

Finalmente, se confirma que As-48F, que podría actuar como proteína accesoria del transportador ABC, es la única proteína ácida encontrada en el *cluster as-48*, con un perfil hidrófilo con excepción del fragmento N-terminal que es hidrófobo y puede constituir un dominio de anclaje en membrana. Los datos obtenidos con los programas SMART, GENEQUIZ y PHD predicen la existencia de una región superenrollada en posición 100-218, conocida como "*coiled coil region*". Con el programa SMART se han encontrado homologías de As-48F con el factor intercambiador de nucleótidos GrpE (a nivel de los residuos situados en la posición 113-268) que podría estar implicado en estimular la actividad ATPasa de la chaperonina DnaK, acelerando la liberación del ADP y permitiendo así un reciclaje más eficiente. Se han encontrado también similitudes de As-48F con los transportadores ABC YKNX y YVRP de *Bacillus*, y en menor grado con la familia de proteínas de secreción Hlyd (a nivel de los residuos 74-335), colaboradoras en el exporte de proteínas que no requieren la ruptura del péptido señal. Al igual que As-48F, todas estas proteínas accesorias se encuentran ancladas en la membrana citoplasmática por el extremo amino-terminal y presentan la región superenrollada. En cuanto a la estructura secundaria, la predicción de estructura establece la existencia de una hélice α en la región 100 a 200 seguida por un largo dominio con conformación en β (aproximadamente desde el residuo 220 al final), organización $\alpha + \beta$ similar a la presentada por la proteína GrpE, con la que comparte homología.

4. ESTUDIO DE COMPLEMENTACIÓN EN *TRANS* DE LOS DIVERSOS OPERONES IDENTIFICADOS

Una vez conocida la organización de la región *as-48* en diferentes operones, unos de expresión constitutiva y otros posiblemente inducible, iniciamos un estudio de complementación en *trans* para investigar las relaciones entre las distintas unidades de transcripción. Estos ensayos precisan de vectores que sean capaces de expresar el carácter AS-48 en *trans*, por lo que han de pertenecer a diferentes grupos de incompatibilidad. Dadas las inmejorables características del vector pAM401 para la expresión del carácter AS-48, se inició la búsqueda de vectores específicos de las BAL, que fueran compatibles con él.

4.1 Búsqueda de vectores compatibles con pAM401

4.1.1 Estudio de compatibilidad entre pAM401 y pIL253

El plásmido pIL253 (4,8 Kb) es un vector propio de *Lactococcus* que también se expresa en el género *Enterococcus*, que fue seleccionado por ser de alto número de copias, por presentar un poli-ligador con dianas de restricción adecuadas y por albergar un marcador de resistencia a eritromicina (Ery^R) que facilita su selección.

La estrategia seguida para llevar a cabo el estudio de compatibilidad, fue la obtención de células competentes de la cepa JH2-2 conteniendo el plásmido pAM401-81 (Cm^R Tc^R), y su subsiguiente electrotransformación con el vector pIL253 (Ery^R) en las condiciones expuestas en Material y Métodos (apdo. 8.3). La selección de los transformantes se realizó en placas adicionadas de cloranfenicol y eritromicina, empleando como control placas con eritromicina. A pesar de que el ensayo fue repetido varias veces, no fue posible el crecimiento en presencia de los dos antibióticos, aunque sí había colonias en la placa control adicionada sólo de eritromicina. Ello nos llevó a pensar que ambos plásmidos no eran capaces de coexistir en la célula, y que probablemente pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad, por lo que el vector pIL253 no parecía apropiado para nuestros fines.

4.1.2 Estudio de compatibilidad entre pAM401 y pMG36e

El plásmido pMG36e (3,6 Kb) se caracteriza por presentar un promotor fuerte para los lactococos (P32) que permite su empleo como vector de expresión en estas bacterias, y tiene, además, un determinante de resistencia a la eritromicina. Este plásmido resulta muy versátil ya que tiene un origen de replicación de amplio rango de hospedador y puede ser utilizado también en *Enterococcus*. Su manipulación resulta fácil por contener un sitio de clonación múltiple y por su capacidad de replicarse en *E. coli* (van de Guchte *et al.*, 1989).

Para establecer su posible compatibilidad con pAM401, se siguió la misma estrategia que en el caso anterior y tras la electrotransformación de células competentes de JH2-2(pAM401-81) con el plásmido pMG36e, se obtuvieron un alto número de colonias en presencia de cloranfenicol y eritromicina, en número muy similar al de los controles con eritromicina. Para confirmar que se trataba de los dobles transformantes buscados, se realizó la extracción del ADN plasmídico de colonias Cm^R Ery^R aisladas al

azar y tras el análisis electroforético de las mismas, se pudo confirmar la presencia de ambos plásmidos, que por tanto, deben de ser compatibles.

4.2 Subclonación del gen estructural *as-48A* en pMG36e

Para conocer de una parte la eficacia de pMG36e en la expresión del carácter AS-48, y de otra, la existencia de posibles complementaciones en *trans* del gen estructural *as-48A* con otros de la región *as-48* así como su influencia en la expresión de estos otros genes *as-48*, se procedió a la subclonación de *as-48A* en dicho vector, siguiendo la metodología que se muestra en la Figura 15. En primer lugar se digirió pAM401-81 con las enzimas *EcoRV* y *EcoRI*, lo que liberó un fragmento de 644 pb que contiene el gen estructural completo. Dicho fragmento fue entonces subclonado en pMG36e previamente digerido con *EcoRI* y *SmaI* (construcción pMG36-A). Dado el carácter bifuncional de ambos vectores, todas las manipulaciones fueron efectuadas en *E. coli*. Esta construcción asegura además que el gen *as-48A* está expresándose desde su propio promotor, ya que durante la digestión de pMG36e con *EcoRI-SmaI* se elimina el promotor P32 presente en el vector.

4.2.1 Estudio de complementación entre pMG36-A y pAM401-81::Tn5_A

Para investigar si el gen estructural y los diversos operones identificados en la región *as-48* se complementan en *trans* y estudiar su papel específico en la expresión del carácter AS-48, se llevó a cabo el estudio de complementación de pMG36-A con el mutante de inserción JH2-2(pAM401-81::Tn5_A) que tiene interrumpido el gen estructural. Para ello se prepararon células competentes del mutante que fueron electrotransformadas con la nueva construcción pMG36-A, seleccionándose los dobles transformantes en presencia de cloranfenicol y eritromicina.

El perfil plasmídico de los dobles transformantes obtenidos (Cm^R Ery^R) permitió comprobar la existencia de ambas construcciones plasmídicas, que, además, parecen mantenerse de forma estable tras ser crecidas las células en presencia de los dos antibióticos por separado durante varias resiembras consecutivas (Figura 14).

En los transformantes JH2-2(pAM401-81::Tn5_A y pMG36-A) se investigó además el carácter AS-48, determinando de una parte la capacidad de producir la enterocina y de otra la resistencia que mostraban al inhibidor. Para ello se siguió la metodología empleada de rutina frente a JH2-2 en ausencia de antibióticos y se tomó

como referencia el comportamiento de las estirpes JH2-2(pAM401-81::Tn5_A) y JH2-2(pMG36-A) por separado, empleando como controles positivo y negativo las cepas JH2-2(pAM401-81) y JH2-2. De esta forma se pudo comprobar que la presencia del gen

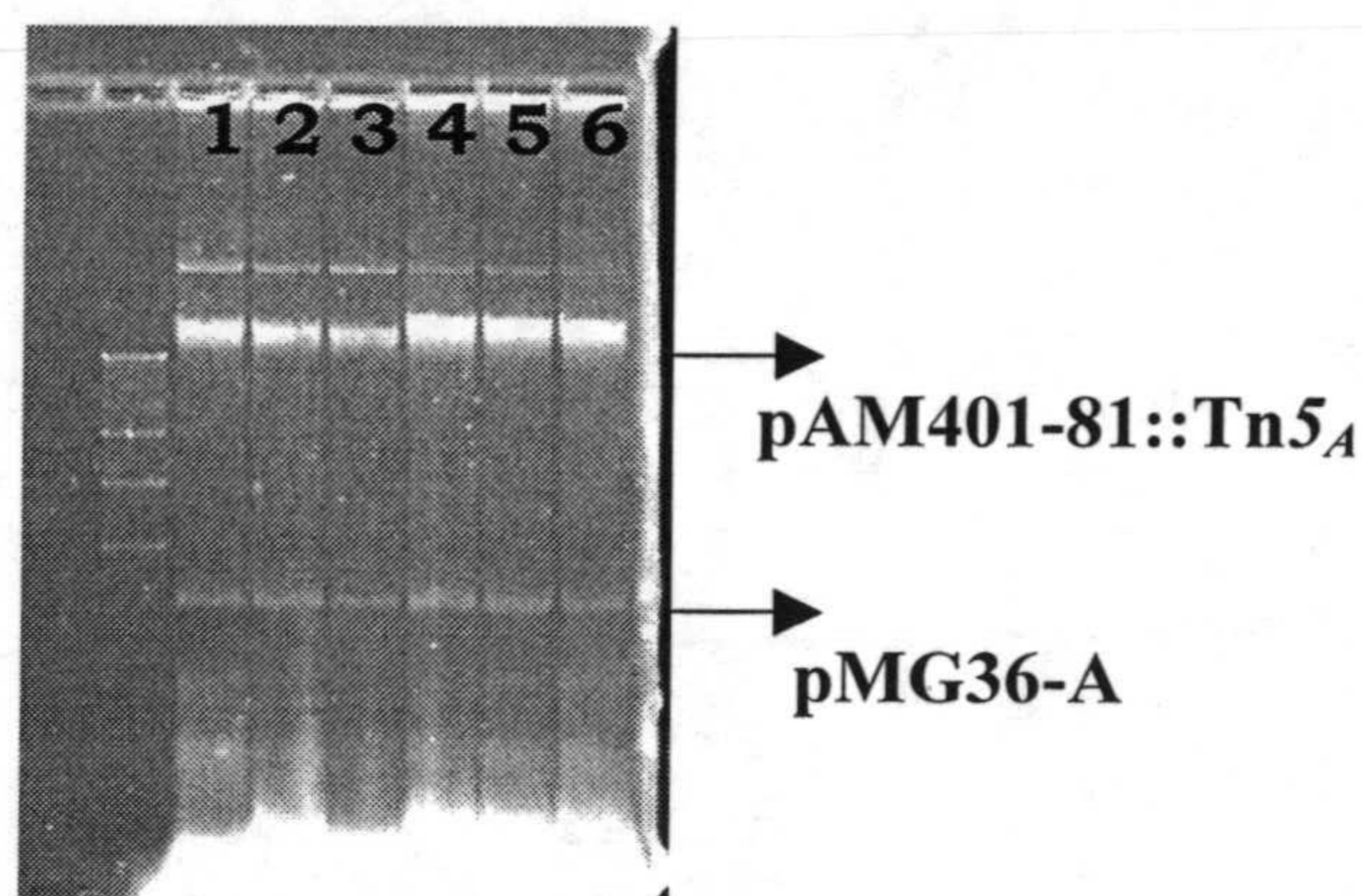
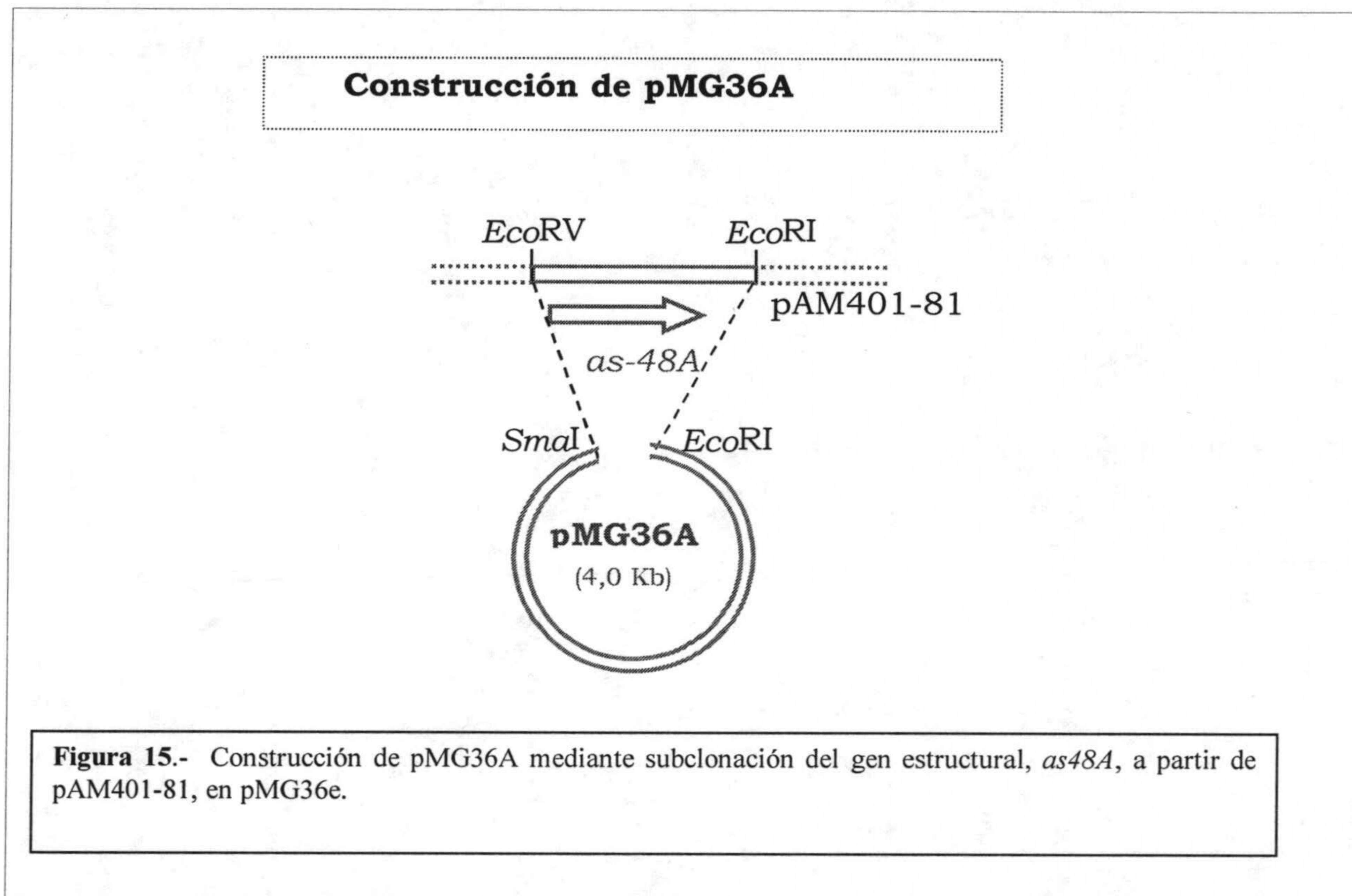


Figura 14.- Perfil plasmídico de los dobles transformantes JH2-2. Las líneas 1, 2 y 3 corresponden a un mismo clon (pAM401-81Tn5_A, pMG36A) crecido en presencia de Cm, Em y de ambos antibióticos respectivamente. Las líneas 4, 5 y 6 corresponden a un segundo clon conteniendo los mismos plásmidos crecido en idénticas condiciones que el anterior.

estructural clonado en pMG36-A restauraba parcialmente en los dobles transformantes la capacidad de producir AS-48 perdida en JH2-2(pAM401-81::Tn5_A) por la inserción del transposón en el promotor del gen estructural. Ahora bien, aunque la complementación funcionó en *trans*, la producción de AS-48 fue sensiblemente inferior

que en el control positivo JH2-2(pAM401-81) (7 mm de halo de inhibición frente a 16 mm) (Tabla 11). También es importante destacar que la expresión del gen *as-48A* en *trans* no fue capaz de restituir la resistencia completa en los dobles transformantes, los cuales siguieron expresando los mismos niveles de resistencia a AS-48 (hasta 6µg/5µl) en presencia de pMG36-A que en su ausencia, niveles apreciablemente inferiores a los del control positivo JH2-2(pAM401-81). (Tabla 12).

CEPA	PLÁSMIDO	PRODUCCIÓN DE AS-48 (mm)
<i>E. faecalis</i> JH2-2	pAM401-81(control positivo)	16
	pMG36A	0
	pAM401-1Tn5 _A	0
	pAM401-1Tn5 _A , pMG36A	7
	JH2-2 (control negativo)	0

Tabla 11.- Producción de AS-48 en medio sólido por los dobles transformantes de *E. faecalis* JH2-2, medida como el diámetro del halo de inhibición (en mm) producido frente a *E. faecalis* S-47

CEPA	PLÁSMIDO	RESISTENCIA FRENTE AS-48 (µg/5µl)					
		0,5	1	3	6	9	18
<i>E. faecalis</i> JH2-2	pAM401-81(control positivo)	R	R	R	R	R	R
	pMG36A	S	S	S	S	S	S
	pAM401-1Tn5 _A	R	R	R	R	S	S
	pAM401-1Tn5 _A , pMG36A	R	R	R	R	S	S
	JH2-2 (control negativo)	S	S	S	S	S	S

Tabla 12.- Ensayo, mediante la técnica de las gotas, de la sensibilidad frente a AS-48 de los dobles transformantes de *E. faecalis* JH2-2, R: resistente; S:sensible.

4.3. Subclonación de *as-48BC* en pMG36e

La carencia de dianas de restricción adecuadas para clonar la región *as-48BC*, nos llevó a obtenerla mediante amplificación por PCR, diseñando para ello cebadores específicos (*as-48BXma* y *as-48AC2*) a los que se les añadieron colas de nucleótidos con los sitios de restricción apropiados:

- *as-48BXma*: comienza en el codon de inicio del gen *as-48B* (evitando así la región promotora) y contiene una diana de restricción para los enzimas *XmaI* y *SmaI*.
- *as48AC2*: hibrida con la región adyacente al extremo 3' terminal del gen *as-48C* y presenta sitios de corte para *EcoRV*, *BamHI* y *SphI*.

El producto de PCR obtenido (2620 pb) fue digerido con *SmaI* y *SphI* para ser después subclonado en el vector pMG36e, previamente sometido a una doble digestión con las mismas enzimas, y la mezcla de ligación empleada para transformar *E. coli*. De los 24 transformantes analizados, en 4 de ellos se encontró la construcción deseada pMG36-BC (6,2 Kb) en la que la onda de transcripción, si se produce, sólo puede iniciarse desde el promotor P32, a diferencia de la construcción pMG36-A que estaba clonada bajo su propio promotor.

4.3.1 Estudio de complementación entre pMG36-BC y pAM401-81::Tn5_B

Para realizar el estudio de complementación de los genes *as-48BC* clonados en pMG36e fue necesario comprobar si la nueva construcción obtenida podía expresarse en *trans*, para lo cual se transfirió pMG36-BC al mutante de inserción JH2-2(pAM401-81::Tn5_B) que, al tener interrumpido el gen *as-48B*, posee un fenotipo no productor y bajos niveles de resistencia (Tablas 9 y 10). Para ello, se realizó la transformación con la construcción pMG36-BC anteriormente obtenida, en células competentes del mutante, empleando la técnica habitual de electrotransformación, y seleccionando los posibles dobles transformantes en placas con cloranfenicol y eritromicina.

Una vez obtenidos los dobles transformantes, se confirmó la expresión de los genes *as-48BC* en *trans* ya que se recuperaba en parte la capacidad de producir AS-48. Sin embargo los halos de inhibición aparecidos frente a la estirpe JH2-2, empleada como indicadora, en ausencia de presión selectiva presentaban diámetros muy variables (Figura 15), lo que apunta a una coexistencia inestable de ambos plásmidos en los dobles transformantes. Este resultado obligó a obtener una cepa de JH2-2 con las dos construcciones, pAM401 y pMG36e, para ser utilizada como indicadora en presencia de presión selectiva.

El estudio de la estabilidad del carácter conferido por los genes *as-48BC* en los dobles transformantes se llevó a cabo en placas de BHA en presencia de cada uno de los antibióticos por separado y de forma conjunta. Los resultados expuestos en la Tabla 13 confirmaron que la capacidad de producción valorado por el tamaño del halo, dependía del antibiótico usado, siendo mayores en presencia de eritromicina y mayores y más homogéneos en presencia de los dos antibióticos, lo que sugiere que en ausencia de presión selectiva apropiada el vector pMG-BC podría perderse.

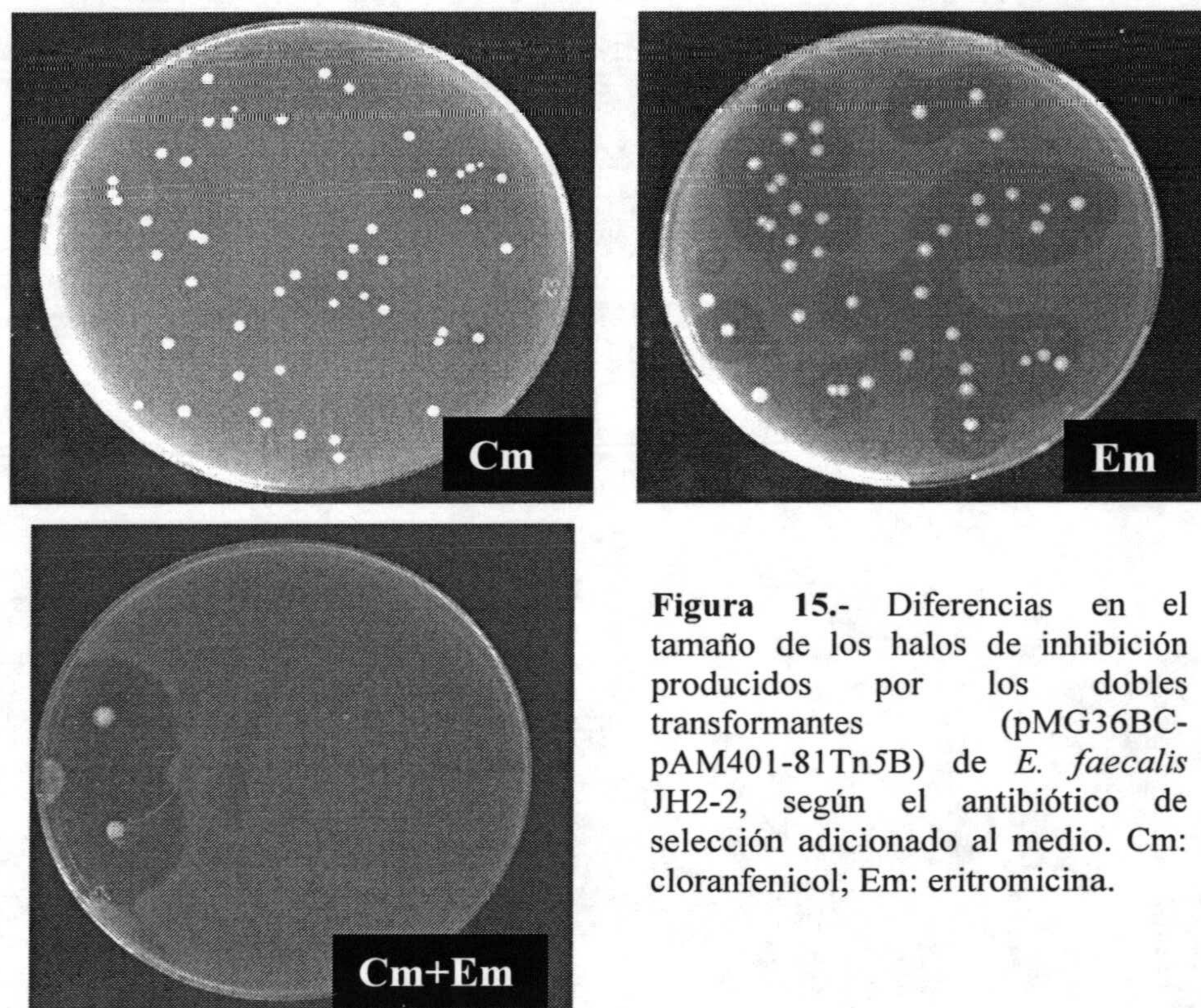


Figura 15.- Diferencias en el tamaño de los halos de inhibición producidos por los dobles transformantes (pMG36BC-pAM401-81Tn5B) de *E. faecalis* JH2-2, según el antibiótico de selección adicionado al medio. Cm: cloranfenicol; Em: eritromicina.

Por ello se realizó un seguimiento de la estabilidad de los dobles transformantes obtenidos JH2-2(pAM401, pMG36), JH2-2(pMG36-BC, pAM401-81::Tn5_B) y JH2-2(pMG36-A, pAM401-81::Tn5_A) en medio BHI sin antibióticos y a partir de estos cultivos se hizo el recuento del número de células sobre placas adicionadas de Em, Cm o Em+Cm (Tabla 14). Este ensayo nos ha permitido confirmar la inestabilidad de la construcción pMG-BC, que de acuerdo con nuestros resultados, se pierde en el 100% de los casos en ausencia del antibiótico, lo que, en principio no puede atribuirse a incompatibilidad entre los vectores empleados ya que la construcción pMG36-A se mantuvo en el 88% de las colonias. Además, en el caso de los transformantes JH2-2(pMG36-BC, pAM401-81::Tn5_B), el número de UFC/ml obtenidas es diez veces superior cuando crecen en ausencia de antibióticos, lo que indica que un número

importante de colonias han perdido de forma espontánea algunos de los vectores. Esto lo confirma el hecho de que no existan diferencias notables a este respecto en los dobles transformantes de JH2-2 que albergan simultáneamente pMG36-A y pAM401-81::Tn5_A, ni en cuanto al número de colonias ni en lo relativo al tamaño de los halos de inhibición.

Medio de Cultivo	Diámetro Halo (mm)
BHA	5-8
BHA+ Cm	4-11
BHA + Em	6-9
BHA+ Cm + Em	8-11

Tabla 13.- Diámetro de los halos detectados en diversas réplicas de una misma colonia productora doble transformante (pMG36BC-pAM401-81Tn5B) de *E. faecalis* JH2-2.

	MEDIO DE CULTIVO			
	BHA	BHA +Cm	BHA + Em	BHA +Cm+ Em
Complement. as-48A				
Diámetro halo (mm)	7	7	7	7
UFC/ml	2,5 x 10 ⁹	3,4 x 10 ⁹	2,9 x 10 ⁹	3,1 x 10 ⁹
Pérdida carácter	12%	2,5%	3,2%	0%
Complement. as-48BC				
Diámetro halo (mm)	0	5	14	19
UFC/ml	1,3 x 10 ⁹	5,5 x 10 ⁸	4,1x 10 ⁸	2,6 x 10 ⁸
Pérdida carácter	100%	28%	23%	0%

Tabla 14.- Comparación entre los dobles transformantes para *as-48A* y para *as-48BC*. La pérdida del carácter se expresa como el porcentaje de colonias no productoras encontradas tras el recuento.

La pérdida del plásmido recombinante pMG-BC fue también confirmada mediante el análisis del perfil plasmídico de uno de los clones productores, tras su resiembra en BHI en presencia y ausencia de antibióticos. Los resultados demostraron, que, en efecto, la presencia de eritromicina favorecía el mantenimiento de pMG36-BC sin modificar la presencia de pAM401-81::Tn5_B (Figura 16). También se pudo observar que la densidad celular alcanzada en medio líquido en presencia de antibióticos era menor que en ausencia de ambos y la viabilidad celular parecía además afectada en

presencia de pMG36-BC, ya que las células se teñían muy débilmente con los colorantes habituales (resultados no mostrados).

El análisis de resistencia de JH2-2(pMG36-BC, pAM401-81::Tn5_B) frente a AS-48, ensayado mediante la técnica de las gotas, reveló que, si bien en presencia de eritromicina éstos expresan la inmunidad a niveles similares a los de la estirpe salvaje; aunque en medio sin antibiótico el fenotipo no es totalmente resistente.

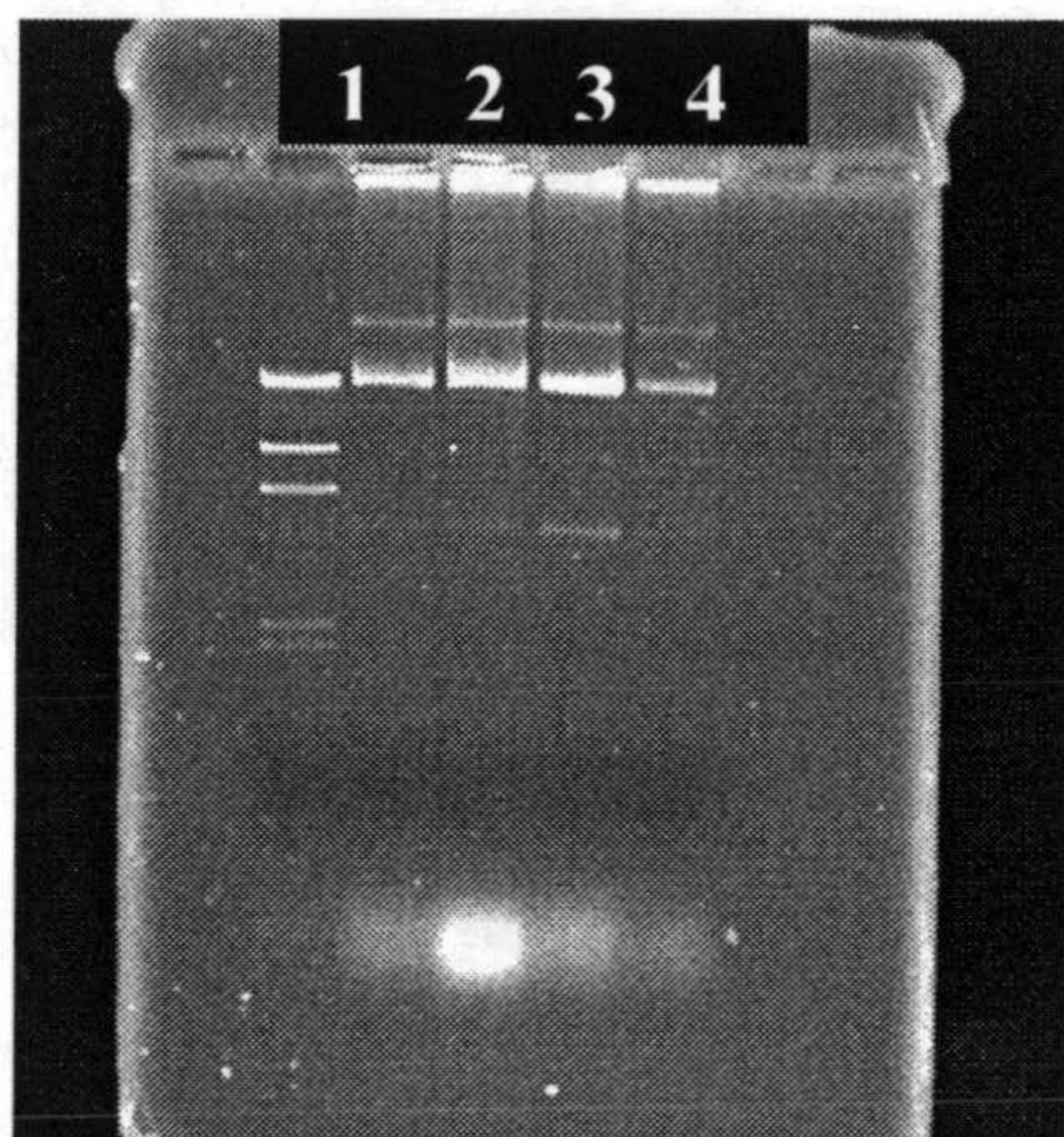


Figura 16.- perfil plasmídico de los complementantes para *as-48BC* crecidos en BHI : (1), BHI+ Cm (2), BHI+ Em (3) y BHI+ Cm+ Em (4).

4.4 Subclonación de *as-48ABC* en pMG36e

Dada la carencia de dianas de restricción adecuadas, la región *as-48ABC* fue amplificada por PCR, para lo cual se diseñaron cebadores específicos (*as-48AC1* y *as-48AC2*) a los que se les añadieron colas de nucleótidos con diversos sitios de restricción:

- *as-48C1*: híbrida con la región adyacente al extremo 5' del gen *as-48A*, y contiene sitios de corte para las enzimas de restricción *SphI*, *XmaI*, *EcoRV* y *SmaI*.
- *as48AC2*: hibrida con la región adyacente al extremo 3' terminal del gen *as-48C* y presenta sitios de corte para *EcoRV*, *BamHI* y *SphI*.

El producto de PCR, de 3250 pb, fue subclonado inicialmente en pGEM-T, originando la construcción intermedia pGEM-T_{AC} (6,2 Kb.), a partir de la cual se intentó realizar la nueva construcción mediante diversas estrategias:

Digiriendo pGEM-T_{AC} con *EcoRV*, y el fragmento mayor, de 3,2 Kb, purificado y ligado en pMG36e digerido con *SmaI*, que deja extremos romos al igual que *EcoRV*. También se intentó digerir directamente el producto de PCR con estas enzimas y purificar, para más tarde emplearlo en la mezcla de ligación.

Digiriendo pGEM-T_{AC} con *Sma*I y *Sph*I, y una vez purificado el fragmento mayor, ligado en pMG36e previamente digerido con ambas enzimas. Como en el caso anterior, también digerimos el producto de PCR con estas enzimas, para luego purificar y utilizar este producto en la mezcla de ligación.

Digiriendo pGEM-T_{AC} con *Sph*I, y una vez purificado el fragmento mayor, de 3,3 Kb, ligado en el vector pMG36e, previamente digerido con el mismo enzima.

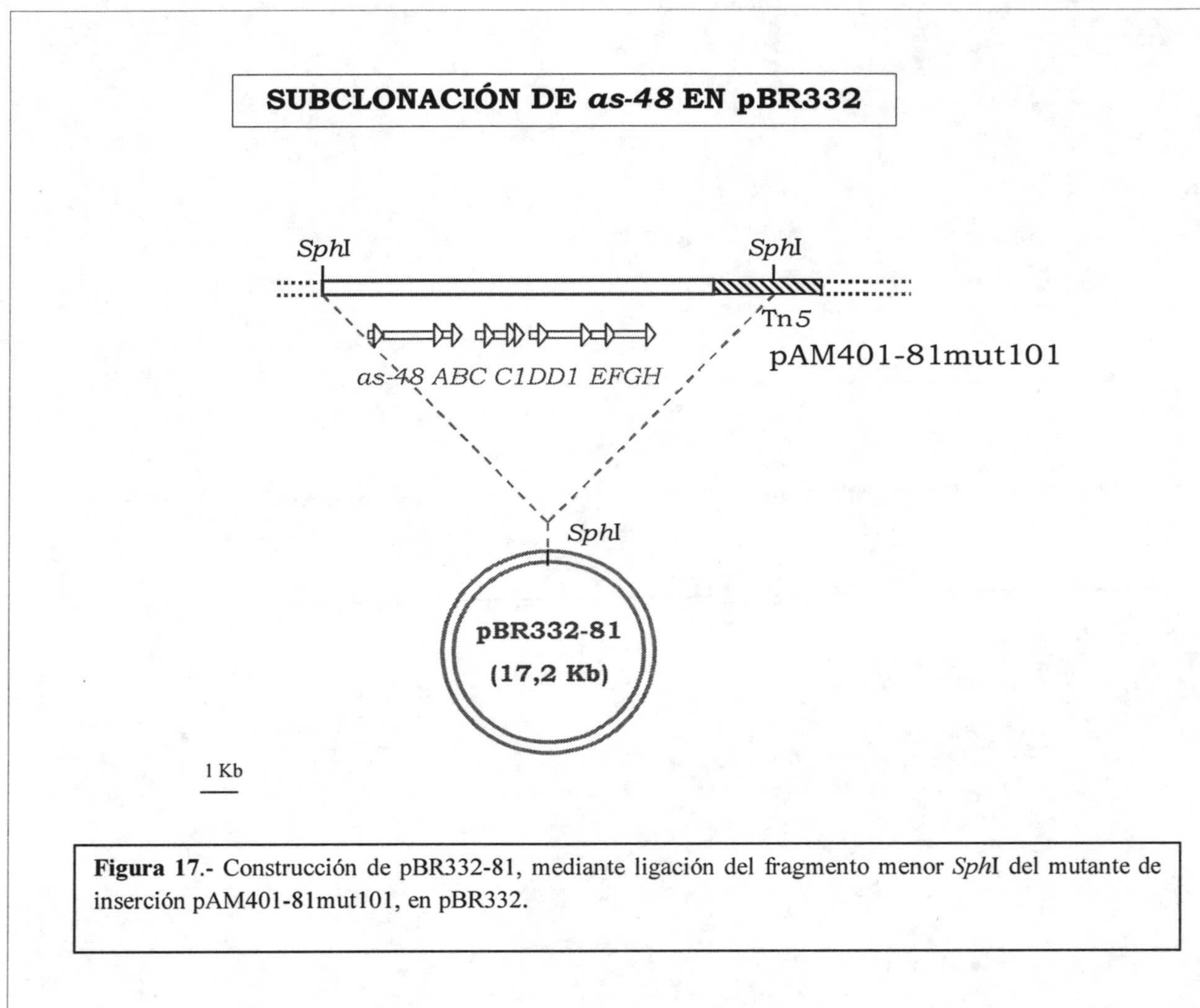
En todos los casos, la mezcla de ligación fue empleada para electrotransformar tanto *E. faecalis* JH2-2(pAM401_{D1E}) como *E. coli* DH5- α seleccionando, en los medios apropiados, adicionados con Cm y Em. En el primer caso, los transformantes fueron investigados a nivel fenotípico para determinar su capacidad de producir AS-48, mediante la técnica de la doble capa. En ningún caso, y eso que fueron investigadas más de 200 colonias transformantes, detectamos una colonia productora de AS-48. Los transformantes de *E. coli* fueron analizados a nivel genotípico, mediante análisis del perfil plasmídico; tras el análisis de más de 600 colonias transformantes, no encontramos ninguna que albergara la nueva construcción deseada.

5. MEJORA DE LA EXPRESIÓN DEL CARÁCTER AS-48

La optimización de la expresión del carácter AS-48 en *E. faecalis* es *a priori* una tarea difícil ya que se trata de una región de ADN muy extensa (>10,5 Kb) en la que se encuentran diez genes organizados en tres operones policistrónicos y dos monocistrónicos, cuya expresión parece estar regulada de forma compleja. Por otra parte, la expresión del gen estructural es de por sí bastante alta en la cepa salvaje ya que, además de ser constitutiva, el gen posee un promotor fuerte, capaz de expresarse incluso en *E. coli* (Tomita *et al*, 2000). Un reto adicional que hay que tener en cuenta a la hora de intentar mejorar la expresión de AS-48 es la necesidad de la maduración del producto primario (prepéptido), mediante una modificación post-traducciona, que supone la ruptura del péptido señal y la unión peptídica entre los extremos del propéptido resultante.

Para empezar, pareció conveniente acotar al máximo la extensión de la región *as-48*, eliminando zonas no codificadoras que pudieran flanquearla, y, a su vez, incluir nuevas dianas para enzimas de restricción que facilitarían la clonación de *as-48* en otros vectores.

5.1 Subclonación de *as-48* en pBR332



La subclonación en el vector pBR322 de *E. coli* es un paso intermedio de rutina para su clonación en otros vectores. Fue elegido por contener sitios múltiples de restricción que permiten obtener nuevas dianas a ambos lados de la región *as-48*; se trata además, de un vector de sencillo manejo por su pequeño tamaño (4,4 Kb) y la fácil selección de los clones con insertos, sensibles a la tetraciclina, al tener el marcador de resistencia a la ampicilina.

La ausencia de sitios de corte detrás de *as-48H*, llevó a buscar un mutante de inserción en el segundo fragmento *Eco*RI de pAM401-81 (Figura 6) que permitiera aprovechar las dianas presentes en el transposón, siempre que presentara un fenotipo

salvaje respecto al carácter AS-48, lo que indirectamente confirmaría la inutilidad de esta región.

La búsqueda se hizo mediante PCR, empleando oligonucleótidos deducidos de la secuencia del Tn5 (*18Tn5*) y derivados del gen *as-48H* (*as-48H-2*, situado en la posición +9416). Ello permitió la obtención de una banda de 1,6 Kb aprox. en el mutante pAM401-81::*Tn5*₁₀₁, nomenclatura que indica que la inserción se había producido a esta distancia del gen *as-48H*. La confirmación de que dicho mutante contenía intacta la región *as-48*, se obtuvo obteniendo transformantes en JH2-2 y analizando su fenotipo (producción y resistencia) que resultó ser idéntico al conferido por la construcción pAM401-81. Aprovechando el nuevo sitio de corte *SphI* presente en el mutante 101, se pudo llevar a cabo la clonación en pBR332 (posición 1,8 en Tn5) del nuevo fragmento de ADN (12,8 Kb) que contenía la región *as-48* completa, dando lugar a la construcción pBR332-81 (17,2 Kb) (Figura 17).

5.2 Construcción de pAM401-81E5

Corriente arriba del gen estructural existe una región de 1,3 Kb, en la que, una vez secuenciada, se propuso la existencia de tres posibles ORFs (X, Y y Z) (Díaz, 1999). Si embargo, la confirmación del transcrito T_A (0,3 Kb), con un tamaño casi exacto al del gen estructural, sugiere que la información codificada en dicho fragmento no está implicada en el carácter AS-48. Por ello se planteó su eliminación, mediante digestión con el enzima *EcoRV*, y la introducción de nuevas dianas de restricción que facilitarían sucesivas subclonaciones en otros vectores.

Para ello, la región *as-48* (12,1 Kb) clonada en la construcción intermedia pBR332-81, fue digerida con *EcoRV*, purificada y posteriormente subclonada en pAM401 digerido con el mismo enzima. Se originó así la construcción pAM401-81E5 (Figura 18), que en un último paso fue transferida a *E. faecalis* JH2-2. Se pudo comprobar que los nuevos transformantes con pAM401-81E5 expresaban el carácter AS-48 con igual eficiencia que la estirpe salvaje, confirmando que la región de 1,1 Kb delecionada no afectaba al fenotipo AS-48.

CONSTRUCCIÓN DE pAM401-81E5

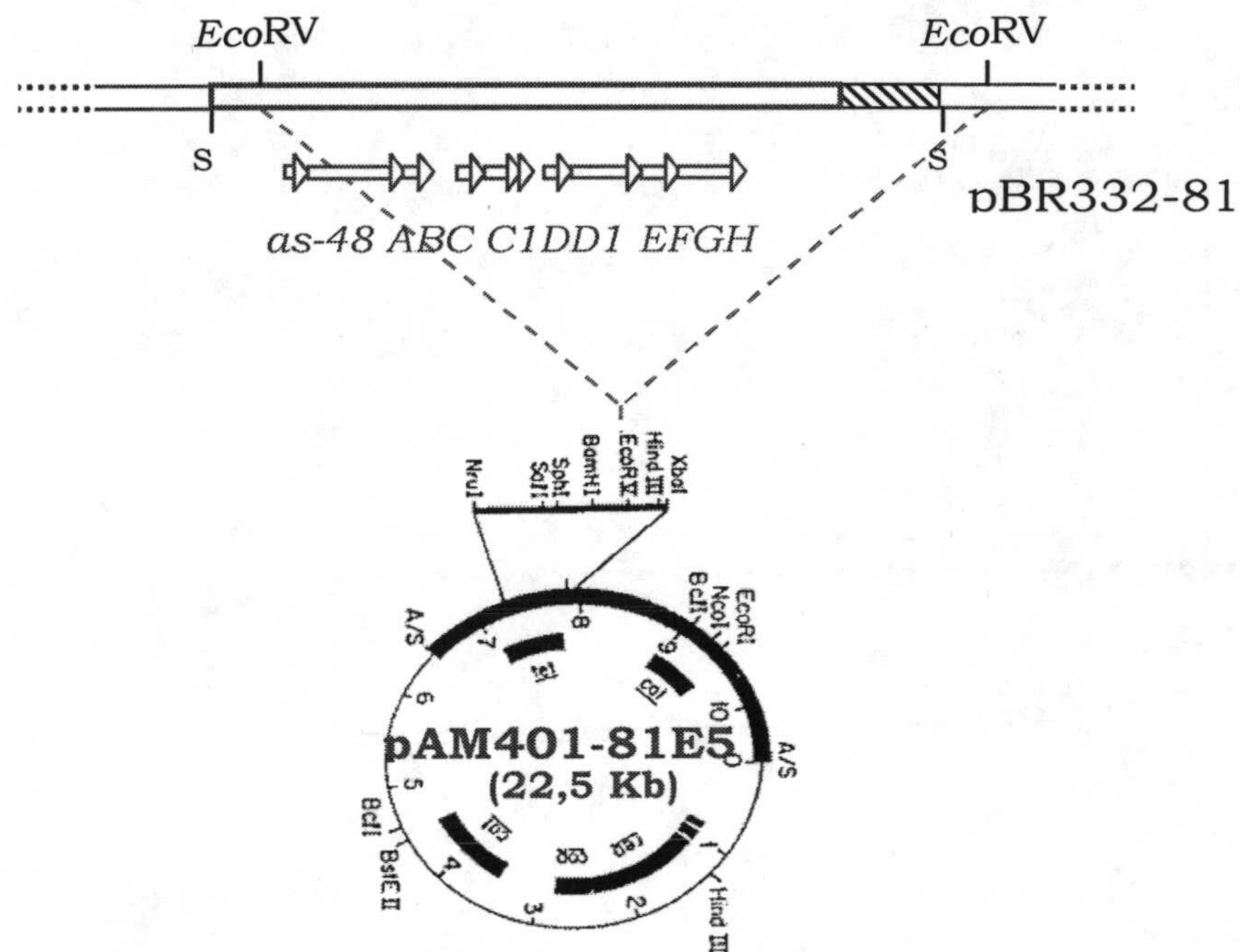


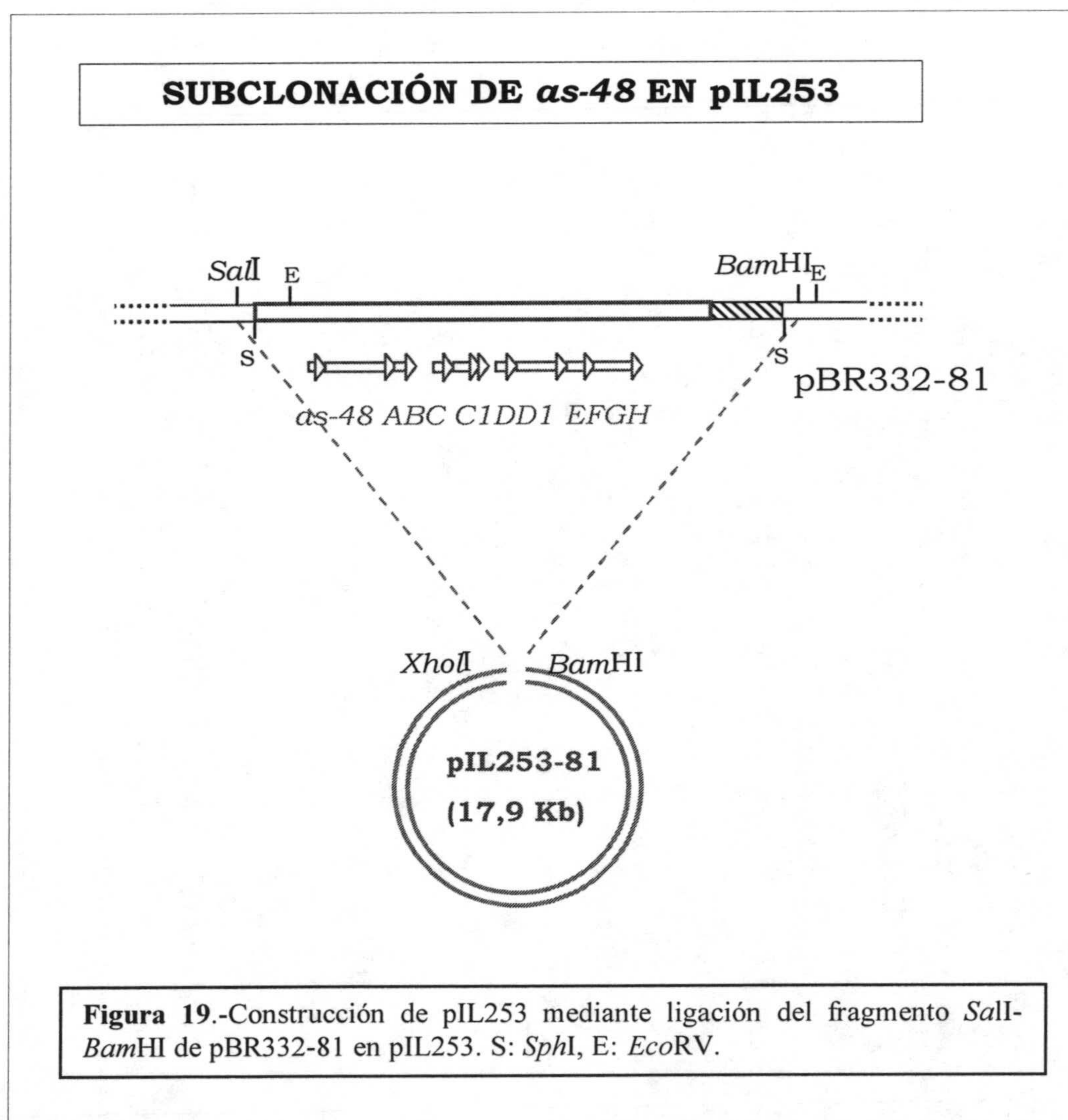
Figura 18.- Subclonación del fragmento mayor *EcoRV* de pBR332 en pAM401. S: *SphI*.

6. TRANSFERENCIA DEL CARÁCTER AS-48 A CEPAS DE INTERÉS INDUSTRIAL

Uno de los principales objetivos planteados al inicio de esta investigación fue la transferencia del carácter AS-48 a cepas de interés industrial, del grupo de las bacterias del ácido láctico, para conseguir su expresión en ellas. El beneficio obvio es, que al disfrutar estas bacterias del *status* GRAS (*generally recognized as safe*), pueden ser aceptadas por parte de los consumidores y además superar las barreras reglamentarias y por tanto, ser empleadas en alimentos sin despertar recelos. Una vez conseguida la expresión en tales bacterias habría que introducir la información genética en vectores de grado alimentario o en el cromosoma.

6.1 Subclonación de *as-48* en el vector pIL253

Para llevar a cabo la subclonación de la región *as-48*, se partió de la construcción intermedia pBR332-81 digerida con las enzimas *SalI* y *BamHI*, purificándose el fragmento mayor (aprox. 13,1 Kb) que contiene la región genética *as-48*. Paralelamente, el vector pIL253 fue digerido con *BamHI* y *XhoI* (que deja extremos cohesivos compatibles con los generados por *SalI*) y purificado (Figura 19). Con esta mezcla de ligación se electrotransformó la cepa JH2-2 de *E. faecalis*, empleando presión selectiva con eritromicina e investigando la capacidad productora de los transformantes.



Una vez aislado un clon productor de AS-48, se purificó el ADN plasmídico para comprobar la existencia del inserto mediante amplificación por PCR, empleando cebadores deducidos de los genes *as-48A* y *as-48F*. También se comprobó la identidad del vector mediante Southern blotting, empleando una sonda específica para pIL253 construida mediante PCR a partir de los oligonucleótidos *pIL253A* y *pIL253B*, lo que confirmó que se trataba de la construcción deseada, que denominamos pIL253-81 (17,9 Kb).

El análisis fenotípico de los transformantes JH2-2(pIL253-81) obtenidos, puso de manifiesto su reducida capacidad para producir AS-48 en medio sólido frente a JH2-2- halos de 11 mm frente a 16 mm del control, siendo la resistencia que confería en medio sólido también inferior a la proporcionada por pAM401-81 (Tabla 15).

6.1.1 Transferencia de la región *as-48* a cepas de *Lactococcus*. Análisis fenotípico de los transformantes

La transferencia de la región *as-48* a cepas de *Lactococcus lactis* se realizó mediante electrotransformación de *L. lactis* subsp. *lactis* LM2301 y *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1614, cepas electroporables, libres de plásmidos y sensibles al cloranfenicol y a la eritromicina, con las construcciones pAM401-81 y pIL253-81. De la cepa LM2301 es además bien conocida su incapacidad para hidrolizar la gelatina (Pereira,1997) ya que posee una actividad proteasa prácticamente nula.

Dadas las similitudes existentes entre las cepas donadora y receptora en lo relativo a la morfología y aspecto colonial, se consideró necesario eliminar las interferencias por contaminación, sometiendo a los transformantes obtenidos a las pruebas bioquímicas habituales para su diferenciación: crecimiento a 45°C, en presencia de NaCl al 6,5% y en bilis esculina. Todo ello se completó con la realización de pruebas moleculares, basadas en la amplificación mediante PCR de secuencias genéticas específicas para lactococos, empleando los oligonucleótidos *lacto1* y *lacto2*.

Así mismo, y con objeto de confirmar que los transformantes obtenidos albergaban las construcciones deseadas, se llevó a cabo la extracción del ADN plasmídico para analizar su perfil y comprobar mediante amplificación por PCR la

existencia de la región *as-48* transferida, empleando cebadores específicos deducidos de los genes *as-48A* y *as-48F*.

6.1.2 Expresión del carácter AS-48 en los transformantes de *L. lactis*

La producción de AS-48 por los nuevos transformantes obtenidos a partir de las cepas LM2301 y MG1614, con pAM401-81 o pIL253-81, se valoró en medio sólido empleando la técnica de la doble capa, frente a *E. faecalis* JH2-2. Es importante destacar que en todos los casos, los transformantes presentaron fenotipo no productor de AS-48. El ensayo fue repetido frente a *L. monocytogenes* CETC 4032 por ser la especie con mayor sensibilidad frente a la enterocina, pero los resultados fueron en todo caso negativos.

Para descartar que la ausencia de producción se debiera a las condiciones culturales empleadas, se repitieron los ensayos a distintas temperaturas de incubación (28°C, 37°C y 40°C) y en distintos medios de cultivo (BHI-T, BHI adicionado de leche al 50%, lactoalbúmina y GM17-T), sin obtener en ningún caso producción de AS-48. Para confirmar este resultado, considerando la posibilidad de que la producción fuera tan escasa que superara el umbral de sensibilidad de la técnica empleada, se valoró la presencia de AS-48 en los sobrenadantes mediante concentración y purificación parcial de los mismos, siguiendo la metodología empleada de rutina. Para ello se partió de sobrenadantes de 8 h de cultivo de *L. lactis* (pAM401-81) en medio GM17, uno de los cuales fue 20 veces concentrado mediante precipitación con ácido tricloroacético. De forma paralela el otro sobrenadante fue sometido a cromatografía mediante intercambio catiónico empleando la matriz CM-25, débilmente catiónica y muy apropiada para nuestros propósitos. La actividad de las fracciones eluidas de CM-25 empleando 1,5 M de NaCl, así como en el precipitado resuspendido en tampón, fue ensayada frente a *L. monocytogenes* mediante la técnica de las gotas, por su mayor sensibilidad; en ningún caso se obtuvieron halos de inhibición del crecimiento que revelaran la presencia de AS-48.

En un intento de comprender las razones por las que esta especie tan cercana genéticamente a *Enterococcus* es incapaz de producir la bacteriocina AS-48, se analizó la expresión del gen estructural *as-48A* en *Lactococcus*, empleando ARNs totales y siguiendo el protocolo descrito en el apartado 10 de Material y Métodos. La hibridación

se realizó con la misma sonda derivada de *as-48A* empleada en los ensayos con enterococos. Los resultados expuestos en la Figura 20 muestran que no hay transcripción del gen estructural desde la construcción pIL253-81, mientras que sí se detecta una banda con mínima intensidad en los lactococos transformados con pAM401-81.



Figura 20.- Análisis de transcripción del gen estructural en *Lactococcus*. Línea 1: JH2-2(pAM401-81) (control positivo). Línea 2: JH2-2(pAM401-81Tn5_A) (Control negativo). Línea 3: *L. lactis*(pAM401-81). Línea 4: JH2-2 (pIL253-81). Línea 5: *L. lactis* (pIL253-81). Línea 6: JH2-2(pMG36-A). Línea 7: JH2-2 (pAM401-81::Tn5_A/pMG36A)

ESPECIE	PLÁSMIDO	RESISTENCIA A AS-48 ($\mu\text{g}/5\mu\text{l}$)						C.I.M. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
		0,5	1	3	6	9	18	
<i>E. faecalis</i>	pAM401	S	S	S	S	S	S	9
<i>L. lactis</i>		S	S	S	S	S	S	15
<i>E. faecalis</i>	pAM401-64	R/S	S	S	S	S	S	150
<i>L. lactis</i>		S	S	S	S	S	S	75
<i>E. faecalis</i>	pAM401-81	R	R	R	R	R	R	>3.000
<i>L. lactis</i>		R	R	R	S	S	S	800
<i>E. faecalis</i>	pIL253	S	S	S	S	S	S	9
<i>L. lactis</i>		S	S	S	S	S	S	15
<i>E. faecalis</i>	pIL253-64	R	R/S	S	S	S	S	400
<i>L. lactis</i>		R	R	R	S	S	S	800
<i>E. faecalis</i>	pIL253-81	R	R	R	R	R	S	2.300
<i>L. lactis</i>		R	R	R	R	S	S	1500

Tabla 15.- Análisis comparativo de la resistencia aportada por las distintas construcciones obtenidas en pAM401 y pIL253, introducidas en *Enterococcus* y *Lactococcus*. C.M.I.: concentración mínima inhibitoria en medio líquido. R: resistente; S: sensible.

Para investigar en estos transformantes el grado de resistencia que expresan, se hicieron ensayos preliminares en medio sólido, encontrándose una cierta expresión de la inmunidad frente a AS-48, ya que tanto la cepa LM2301 como la MG1614 resistían hasta una concentración de $3\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ con la construcción pAM401-81, y hasta $6\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ cuando habían sido transformadas con pIL253-81. Dada la coincidencia de resultados entre ambas cepas, seleccionamos la cepa LM2301 para llevar a cabo el estudio comparativo de la resistencia con enterococos, transformados con diversas construcciones, pAM401-64, pAM401-81, pIL253-64 y pIL253-81. En este análisis, además de la resistencia en medio sólido, se determinó la mínima concentración inhibidora (MIC) para cada uno de los transformantes. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 15 y ponen de manifiesto importantes diferencias en la expresión de la resistencia en función del huésped utilizado. Así en los transformantes de *E. faecalis* derivados de pAM401, los niveles de resistencia eran siempre mayores que en los lactococos, con valores de MIC dos (pAM401-64) o cuatro veces más altos (pAM401-81). Sin embargo, conviene destacar que para la expresión de la resistencia en *Lactococcus*, resulta más adecuado el vector pIL253 que pAM401, de forma contraria al resultado obtenido sobre la capacidad productora, ya que en este caso se duplican e incluso alcanzan valores muy superiores cuando se comparan la resistencia que expresan con las diversas construcciones empleadas.

6.1.3 Retrotransformación de *E. faecalis* JH2-2

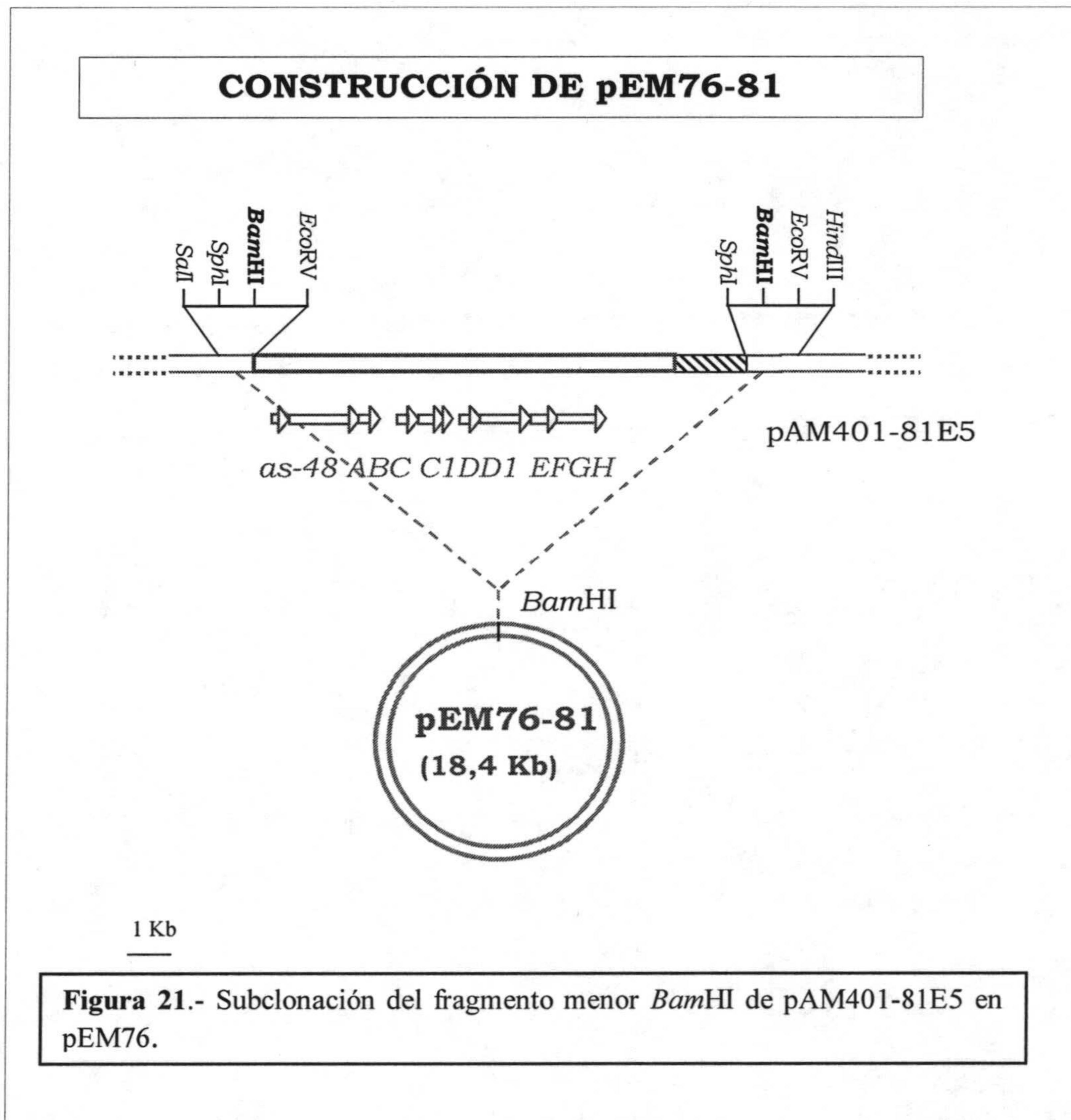
Para verificar que los plásmidos no habían sufrido ninguna modificación en el transcurso de las manipulaciones realizadas, se realizó un ensayo de retrotransformación, extrayendo el ADN plasmídico obtenido de los transformantes de *L. lactis* para transferirlo de nuevo a *E. faecalis* JH2-2. En los retrotransformantes obtenidos se pudo comprobar la capacidad de expresar el carácter AS-48 con igual eficacia que la cepa de partida.

6.2 Subclonación de *as-48* en pEM76

Para realizar la subclonación de la región *as-48* en el vector pEM76, se partió del plásmido pAM401-81E5, que fue digerido con *Bam*HI y, el fragmento menor (12,1 Kb) que contiene la región *as-48* completa, purificado. Tras linearizar el vector con el mismo enzima, se purificó, desfosforiló y ligó con la región *as-48*. La mezcla de

ligación se empleó para electrotransformar *E. coli*, seleccionando con ampicilina. La nueva construcción obtenida fue denominada pEM76-81 (18,2 Kb) (Figura 21).

Pese a los repetidos intentos de introducir pEM76-81 en *E. faecalis* no se obtuvieron resultados positivos. La búsqueda informática mediante el programa nBLAST de regiones similares al sitio *attB* de *Lb. casei*, donde integra el plásmido pEM76, en el genoma de *E. faecalis*, mostró que existía coincidencia en 12 de las 19 pb



de que consta *attB*; sin embargo esta secuencia de *E. faecalis* se localiza en una zona teóricamente codificante y conservada.

6.2.1 Transferencia a *Lactobacillus*

En un intento de obtener cepas de *Lactobacillus* productoras de AS-48 para su posterior empleo en alimentos, se seleccionaron las cepas *Lb. casei* 393 y *Lb. delbruecki*

4005 para ser transformadas con los plásmidos recombinantes disponibles (pEM76-81, pAM401-81 y pIL253-81).

En todos los casos y a pesar de los múltiples intentos llevados a cabo, modificando los protocolos de electroporación disponibles, sólo se obtuvieron transformantes de *Lb. casei* 393 con los plásmidos pAM401-81 y pEM76-81. En ellos se confirmó la existencia de la región *as-48* mediante extracción de ADN total y amplificación de *as-48DIE* mediante PCR.

Sin embargo ninguno de estos transformantes mostraron un fenotipo productor de AS-48, si bien los niveles de resistencia eran ligeramente superiores a los de la estirpe sin transformar, empleada como referencia (Tabla 16).

CEPA	PLÁSMIDO	RESISTENCIA A AS-48 ($\mu\text{g}/5\mu\text{l}$)					
		0,5	1	2	3	5	11
<i>L. casei</i> 393	393 (control negativo)	S*	S	S	S	S	S
	pAM401-81	R	R	S*	S	S	S
	pEM401-81	R	R	S*	S*	S*	S

Tabla 16.- Determinación de la resistencia en medio sólido de los transformantes de *L. casei*. R: resistente; S: sensible; S*: aparición de halos turbios.

6.3 Transferencia de *as-48* a *Pediococcus*

Tratando una vez más de conseguir cepas bacterianas de uso alimentario productoras de AS-48, seleccionamos las cepas *Pediococcus pentosaceus* Biotipo 1 P12 y Biotipo 2 S10 para emplearlas como hospedadoras heterólogas de pAM401-81 y pIL253-81. En ninguno de los intentos realizados, utilizando distintos protocolos de electroporación y variantes de los mismos, fue posible la obtención de transformantes.

6.4 Transferencia de *as-48* a *Enterococcus faecium*

A la vista de los resultados negativos obtenidos con estirpes pertenecientes a otros géneros de bacterias del ácido láctico, se planteó la posibilidad de transferir el carácter AS-48 a especies más próximas a la cepa salvaje.

E. faecium fue seleccionada dado su interés creciente para la industria alimentaria y su cercanía genética a *E. faecalis*.

En un primer ensayo se electrotransformaron las cepas de nuestra colección *E. faecium* S-29 y S-60 con el plásmido pAM401-81. Tras verificar mediante análisis electroforético la presencia de éste en los transformantes, se procedió al estudio fenotípico de los mismos, comprobándose en ambas cepas de *E. faecium* tanto la producción de la bacteriocina como la resistencia frente a ella y a iguales niveles que en la estirpe salvaje *E. faecalis* S-48.

6.4.1 Transferencia a cepas *E. faecium* adecuadas para uso alimentario

Ante lo prometedor de los resultados anteriores se decidió realizar un estudio más minucioso en cepas de *E. faecium* que fueran adecuadas para uso alimentario. Para ello se seleccionaron cepas aisladas de alimentos, sensibles a la vancomicina y carentes de determinantes de virulencia: *E. faecium* 32 y 34, aisladas de leche, y *E. faecium* 1 y PJ, aisladas de muestras cárnicas. También se utilizaron *E. faecium* S1 y S3, que pese a no haber sido aun caracterizadas respecto a los determinantes de virulencia, habían sido aisladas de muestras de encurtidos.

Tras la electrotransformación de estas cepas con pAM401-81E5, se obtuvieron transformantes para las estirpes 32, 34, S1 y S3, en los que la presencia del plásmido se verificó mediante extracción de ADN y análisis electroforético del mismo (Figura 22). La transferencia de pIL253-81 no fue posible ya que *E. faecium* presenta una cierta resistencia intrínseca a la eritromicina.

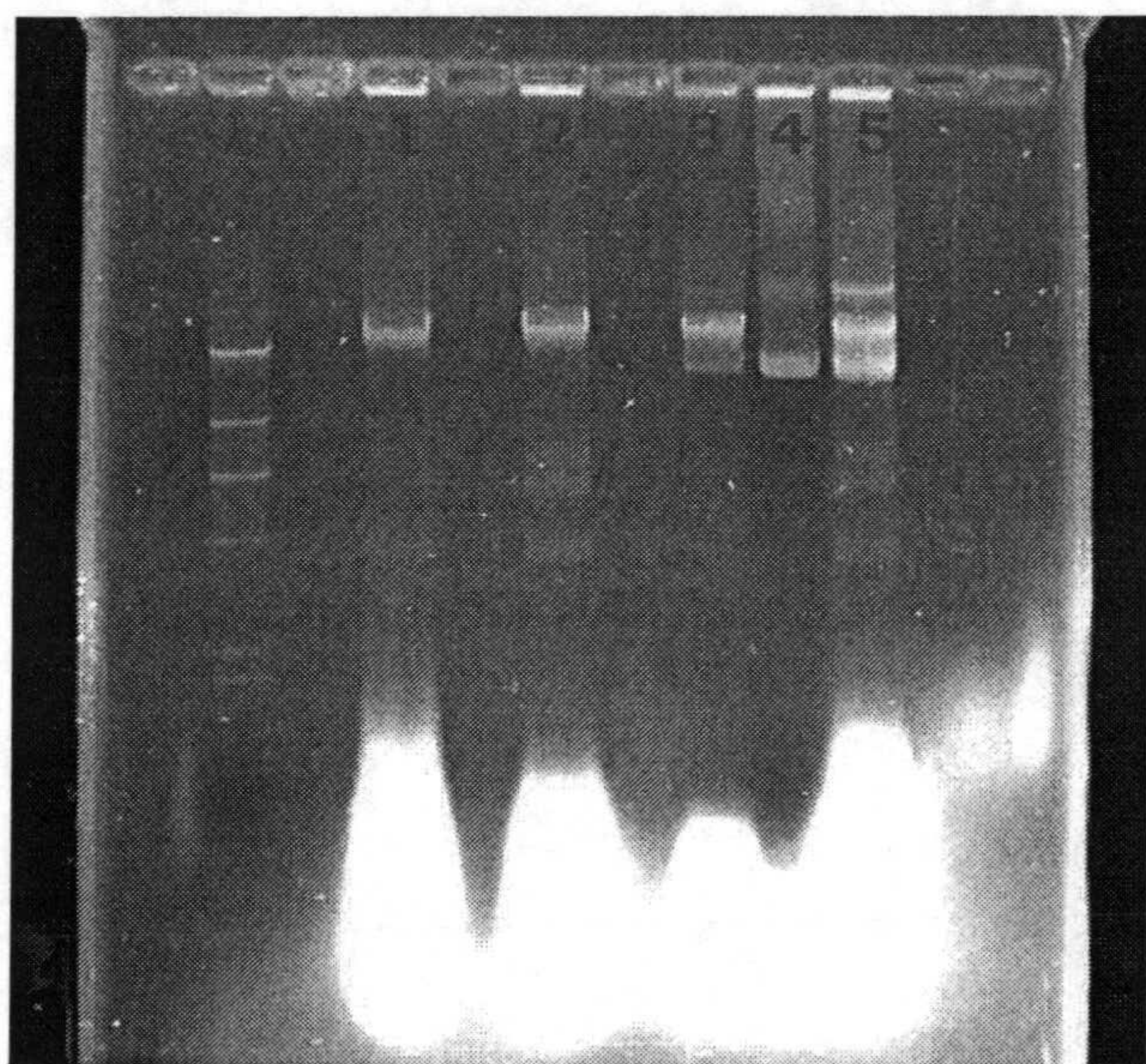


Figura 22.- Perfil plásmidico de *E. faecium* 34 sin transformar y transformado con pAM401-81E5 (líneas 1 y 3) y de *E. faecium* 32 sin transformar y transformado con pAM401-81E5 (líneas 2 y 5) y pAM401-81E5 purificado (línea 4).

Dada la imposibilidad de distinguir entre las especies *E. faecalis* y *E. faecium* por el aspecto de las colonias o por observación microscópica, decidimos someter a los transformantes a la prueba de la fermentación de la arabinosa en medio Hugh-Leifson, el resultado (arabinosa negativo) nos permitió descartar la posibilidad de contaminación de las placas por *E. faecalis*.

6.4.2 Análisis fenotípico de los transformantes

El análisis fenotípico de los transformantes mostró que en todos los casos, y al igual que en las cepas S-29 y S-60, el carácter AS-48 era expresado a niveles similares a los encontrados en la estirpe salvaje: aparición de halos de producción en medio sólido de 16 mm y capacidad de resistencia superior a los 18 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$.

6.4.3 Caracterización del inhibidor

La identidad del inhibidor con AS-48 fue verificada mediante experimentos de sensibilidad cruzada en medio sólido con JH2-2(pAM401-81) (Tabla 17), así como por ensayos de actividad frente a otras bacterias incluidas en el espectro de acción de AS-48, como *Listeria monocytogenes* y *Bacillus megaterium*. Todas estas pruebas nos confirmaron que la sustancia inhibidora producida por *E. faecium* era la bacteriocina AS-48.

FRENTE A	ACTIVIDAD DE				
	32	32(E5)	34	34(E5)	JH2-2 (E5)
32	-	+	-	+	+
32(E5)	-	-	-	-	-
34	-	+	-	+	+
34(E5)	-	-	-	-	-
JH2-2	-	+	-	+	+
JH2-2(E5)	-	-	-	-	-

Tabla 17.- Ensayo de sensibilidad cruzada entre las cepas de *E. faecium* 32 y 34 sin transformar y transformadas con pAM401-81E5 (E5), frente a JH2-2 sin transformar y transformada con el mismo plásmido. (+): aparición de halo de inhibición; (-): no aparición de halo de inhibición.

Finalmente, y para despejar cualquier tipo de duda, se llevó a cabo la purificación del inhibidor a homogeneidad a partir de sobrenadantes de *E. faecium* 32(pAM401-81) crecido durante 8 h en medio complejo, mediante intercambio en

columnas de CM25. El análisis del patrón de elución en HPLC mostró el pico correspondiente a la bacteriocina AS-48.

6.4.4 Análisis de producción en medio líquido

Por último se comprobó la producción de AS-48 en medios líquidos, tanto BHI como leche, mediante la técnica de los pocillos. En BHI fueron detectados halos de inhibición de 16 mm a las 12 h de crecimiento, similares también a los de la estirpe salvaje.

En leche, sin embargo, sólo se pudieron detectar halos de 11 mm a las 24 h de crecimiento. Este resultados puede ser atribuible a que las cepas *E. faecium* no son proteolíticas, aspecto que fue confirmado mediante siembra en medio agar-leche, ya que, tras la pertinente incubación, no aparecieron halos de aclaración del medio alrededor de la zona de crecimiento bacteriano.

Discusión

La enterocina AS-48 es una molécula singular por sus características estructurales, es un péptido circular con unión peptídica entre sus extremos carboxilo y amino, su amplio espectro de acción antibacteriano y por la complejidad de la región genética responsable de su expresión. Los genes responsables del carácter AS-48 se han localizado en una región de 12,1 Kb, situada en el plásmido conjugativo pMB2 de la cepa salvaje *E. faecalis* S-48, en la que se han identificado 10 de ellos (*as-48ABCC₁DD₁EFGH*) que son necesarios para la expresión óptima del carácter AS-48. Uno de los objetivos globales de esta Investigación era completar el estudio de sus determinantes genéticos, tanto en lo referente a su función como a su organización en diferentes operones. Completado este estudio, se planteaba también la necesidad de mejorar la producción de AS-48 y de transferir el carácter a razas de interés industrial, dada la aplicación tecnológica de AS-48 como conservante natural de alimentos, actualmente en desarrollo.

La región as-48 completa consta de los genes as-48ABCC₁DD₁EFGH

Para comenzar el estudio fue preciso localizar, clonar y secuenciar la región *as-48* situada entre los sitios de corte *SphI*-*BglII* del plásmido pMB2, responsable del carácter AS-48. Para ello se eligió el vector pAM401, seleccionado por tener dos orígenes de replicación y sendas resistencias a antibióticos, lo que permite trabajar en diversos sistemas celulares (*Enterococcus*, *Lactococcus* y *E. coli*) (Wirth *et al.*, 1986). Probablemente uno de los aciertos de este trabajo fue utilizar este vector de clonación y la cepa JH2-2 como hospedadora, a pesar de que pAM401 carece de promotor que asegure la expresión constitutiva de los genes clonados en él (Wirth *et al.*, 1986). La experiencia ha demostrado que pAM401 es un vector muy eficiente para la expresión de los caracteres estudiados (producción y resistencia frente a AS-48) ya que los transformantes de JH2-2(pAM401-81) en los que se clonó la región *as-48*, producen AS-48 a niveles muy similares a los de la cepa salvaje S-48 y son tan resistentes a AS-48 como ella. La carencia de un promotor no representó un obstáculo en nuestro trabajo ya que el gen estructural *as-48A* posee un fuerte promotor, que ha sido incluso utilizado para la sobre-expresión de otros genes en vectores derivados de pAM401 (Fujimoto e Ike, 2001).

De hecho otros vectores empleados en esta Memoria para la expresión de la enterocina AS-48 no han resultado tan eficaces como pAM401. Ni tan siquiera pIL253

(4,8 Kb), un vector de *Lactococcus* seleccionado por reunir una serie de características muy apropiadas para nuestros propósitos por tratarse de un vector de alto número de copias, útil para la expresión en *Enterococcus* y *Lactococcus*, de pequeño tamaño (4,8 Kb) y fácilmente seleccionable ya que posee un marcador de resistencia a la eritromicina. Además, se han confirmado los resultados obtenidos en trabajos anteriores en los que se había clonado el fragmento *EcoRI* de 3 Kb con los genes *as-48CC₁DD₁* (construcción pIL253-64), en los que se mostró eficaz para la expresión de la inmunidad frente a AS-48. También se ha realizado la clonación en pEM76, un vector de grado alimentario muy adecuado para la expresión de caracteres biotecnológicos como las bacteriocinas y por ello elegido para clonar la región *as-48* e intentar su expresión en *Lactobacillus casei*, como será discutido mas adelante. Aunque la expresión del carácter AS-48 en un plásmido como pAM401 haya sido muy eficaz en las dos especies de enterococos, tanto en medios de laboratorio como en sistemas alimentarios, su uso no está indicado en la industria alimentaria por incluir determinantes de resistencia a antibióticos. Incluso aunque se tratara de un vector de grado alimentario, existirían cuestiones aún por resolver, como la estabilidad del carácter o incompatibilidad con otros plásmidos e incluso su posible adquisición por otras cepas. Por ello, se intentó la clonación de la región *as-48* en un vector de integración como pEM76 (plásmido recombinante pEM76-81), para disponer de una cepa sin los inconvenientes antes señalados, al tener la región integrada en el cromosoma. Dicho vector pEM76 fue cedido por el grupo del Dr. Suárez de la Universidad de Oviedo (con quien se ha realizado este trabajo en colaboración), y contiene la región *attP* y el gen *int* (integrasa del fago A2), lo que le permite integrarse en el cromosoma de *Lb. casei* y presumiblemente en otras bacterias Gram-positivas, mediante recombinación específica de sitio entre las regiones *attP* del plásmido y el sitio *attB* del cromosoma bacteriano. Los recombinantes obtenidos son fácilmente seleccionables en presencia de eritromicina; se trata además un vector de fácil manipulación ya que se replica en *E. coli*, y le confiere resistencia a la ampicilina (Martín *et al.*, 2000). Este plásmido contiene además dos secuencias *six* en la orientación adecuada que permite la delección de la región que contiene el gen *int* y los dos genes de resistencia a antibióticos. Para ello se ha de transformar con el plásmido replicativo pEM68 que codifica la β -recombinasa que cataliza esta reacción (Martín *et al.*, 2000) Sin embargo, los repetidos intentos de introducir este plásmido en *E. faecalis* no han tenido éxito, y una de las causas podría ser la ausencia del sitio *attB* en el

cromosoma de *E. faecalis* ó *E. faecium*. Efectivamente, la búsqueda informática de regiones similares a la secuencia consenso *attB* de *Lb. casei* (Alvárez *et al.*, 1998) no dio resultados positivos en *E. faecalis*, encontrándose sólo 12 de las 19 pb de esta región, lo que imposibilita, en principio, que este plásmido pueda integrarse en el cromosoma mediante recombinación específica.

Una vez obtenida la construcción pAM401-81 (25 Kb) en la que se habían clonado en fase los fragmentos D (*SphI*-*BglII*), C (*BglII*) y B (*BglII*) de pMB2, en los que se encuentra la región *as-48* en su totalidad (Figura 6 de Introducción), se procedió a verificar de forma definitiva el inicio de la misma, investigando si era necesaria la presencia de un fragmento de 1,3 Kb, delimitado por un sitio de corte para el enzima *SphI* y situado corriente arriba del extremo 3' del gen estructural *as-48A*. En la secuencia de dicho fragmento se habían identificado tres probables marcos de lectura abierta (ORFs X, Y y Z) de pequeño tamaño (Díaz, 1999), cuya función no pudo entonces ser avanzada debido a la escasa complementariedad obtenida en los análisis de homología realizados con proteínas de las bases de datos y, tal vez, también a la carencia de mutantes en esta zona. En principio se planteó la posibilidad de que en esta zona pudieran encontrarse genes reguladores ya que el estructural posee, delante de su región promotora, diversas secuencias repetidas y una invertida, muy similares a las referidas en otros sistemas genéticos como implicadas en el control transcripcional (Dunny *et al.*, 1978). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Memoria demuestran de forma concluyente, que, en dicha región, no existe información relacionada con la expresión del carácter AS-48, ya que su eliminación mediante digestión con *EcoRV*, no modifica los fenotipos AS-48⁺, AS-48^R de los transformantes JH2(pAM401-81-E5) (22,5 Kb). Estos resultados contrastan con los obtenidos para la circularina A, una bacteriocina cíclica producida por *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752, que muestra un cierto grado de homología con AS-48, en particular en cuanto al modo de ciclación del péptido y también en la organización de la región genética responsable de la resistencia, exporte e inmunidad (Kemperman *et al.*, 2003 a,b). En la región próxima al gen estructural *cirA*, se han descrito 4 pequeños genes (*cfg*, *cgjK*, *cfg0*, *cfg02*), de los cuales dos parecen responsables de un sistema regulador de respuesta de dos componentes (CfgR y CgjK), descrito con frecuencia en la regulación de bacteriocinas producidas por las BAL tanto de Clase I como de Clase II (Risoen *et al.*, 1998). Estos genes se encuentran situados en regiones próximas al operón u

operones en los que estas bacteriocinas se organizan (Ennahar *et al*, 2000; Kleerebezem y Quadri, 2001). Sin embargo, en el caso de AS-48, parece probado que no existe este tipo de genes reguladores, ya que no se han podido identificar tras secuenciar toda la región genética próxima a *as-48*. Las tres ORFs (X,Y,Z) descritas por Díaz (1999), en el caso de que sean tales, no son necesarias para la expresión del carácter AS-48. Tal afirmación se fundamenta en los resultados obtenidos con los transformantes JH2-2(pAM401-81E5), construcción en la que se ha eliminado la región de 1,1 Kb situada corriente arriba del gen estructural que contiene dichas ORFs, los cuales expresan el carácter AS-48 con igual eficiencia que el clón de partida.

La organización de la región genética *as-48* sigue la pauta de la mayoría de las bacteriocinas caracterizadas a nivel genético, nisina, pediocina PA-1, lacticinas 481 y F, lactococin G, helveticina J o carnocinas, (recogidas por Kolter y Moreno, 1992) y Klaenhammer, 1993) u otras estudiadas más recientemente como Ent A, P, sakacina A y P, mesentericina Y105, leucocidina A, cytolina, lactocina S o mersacidina (Sahl y Bierbaum, 1998; Ennahar *et al*, 2000). En todas ellas, los genes de resistencia y exporte e incluso el del factor accesorio, se encuentran agrupados formando un *cluster* con el gen estructural, el cual en la mayoría de los casos incluido AS-48, codifica un pre-péptido (Nissen-Meyer y Nes, 1997). Sin embargo, la región *as-48* es, junto a la de la nisina, de las más complejas descritas hasta la fecha ya que requiere el concurso de 10 genes para la completa expresión del carácter.

Análisis genético de la región as-48 mediante mutagénesis con Tn5. Predicciones sobre los diversos productos génicos

La mutagenésis mediante inserción de transposones es una estrategia utilizada por muchos investigadores por su probada eficacia para el análisis de genes bacterianos. Los transposones actúan como marcadores genéticos y físicos, permitiendo su fácil localización mediante análisis de restricción. En este trabajo se ha empleado el Tn5, un transposón compuesto con amplio rango de hospedador que pertenece a la familia IS4 y está formado por dos secuencias de inserción IS50 y un gen de resistencia a kanamicina. La transposición ocurre gracias a la transposasa, proteína responsable de un mecanismo conservativo que, mediante un mecanismo de “corte y empalme”, permite el movimiento del donador a su diana sin crear copias adicionales del mismo (Brandon y Reznikoff, 2003). Inicialmente se pensaba que la inserción de Tn5 se producía al azar, pero trabajos muy recientes han demostrado la existencia de “zonas calientes”, es decir

secuencias del ADN que favorecen la sinapsis. Efectivamente, el mejor sitio de reconocimiento es el motivo TTATA flanqueado por pares de secuencias GC, aunque secuencias relacionadas que contengan entre 1 y 4 bp diferentes a este motivo también sirven como dianas para la transposición (Peterson y Reznikoff, 2003).

Los resultados obtenidos con Tn5 en este trabajo han sido muy útiles y hoy se dispone de una genoteca parcial de mutantes en la cepa JH2-2(pAM401-81) gracias a las numerosas rondas de mutagénesis realizadas. Sin embargo, y a pesar de ello, no ha sido posible la inserción de Tn5 en ciertos genes, en particular en el determinante de la inmunidad, *as-48D1*, y tampoco en los genes *as-48E* y *as-48F*. En el caso de *as-48D1* la razón podría ser que se trata de una secuencia muy corta (170 bp) particularmente rica en A-T, como, por otra parte, es característico en enterococos. No ocurre así en los genes *as-48EF*, en los que la ausencia de inserciones solo es explicable por la aleatoriedad del método, ya que se han encontrado inserciones en construcciones parciales realizadas, como pAM401-52 (Martínez-Bueno *et al.*, 1998) y en pAM401_{D-H} (Díaz, 1999). Además, Tomita *et al.* (1997), que han analizado la región correspondiente a Bac-21, una variante natural de AS-48, las describe así mismo en los genes homólogos (*bacF* y *bacG*) localizados en el plásmido pPD1.

El estudio fenotípico de los mutantes de inserción con Tn5 en la región *as-48* en relación al carácter AS-48, ha permitido confirmar las funciones asignadas a los diferentes productos génicos identificados por Díaz (1999) y su organización en diversos operones que, actuando de forma cooperativa, aseguran una eficiente expresión de la enterocina. Por otra parte, la avalancha de secuencias de aminoácidos disponibles en las bases de datos, ha permitido llevar a cabo un profundo análisis de homología e identificar los motivos característicos conservados, en muchas de las proteínas que configuran el sistema de expresión del carácter AS-48. De esta forma se ha podido concluir que la capacidad de producir AS-48 requiere, además del gen estructural *as-48A*, procesos complejos de maduración y exporte, siendo imprescindible la coexpresión de los genes *as-48BC₁D*, ya que, como después comentaremos, la interrupción de cualquiera de ellos determina un fenotipo no productor. Este resultado confirma en todos sus aspectos la propuesta realizada por Martínez-Bueno *et al.* (1998) y Díaz (1999) para el *tándem* de proteínas As-48C₁D, identificadas como miembros de la superfamilia de transportadores ABC (ATP-Binding-Casette). Tales transportadores constituyen un sistema de transporte activo que utiliza la hidrólisis del ATP como fuente de energía (Higgins *et al.*, 1986; Fath y Kolter., 1993; Kolter y Moreno, 1992; Saris, 1996

En todos ellos se ha reconocido una región de unos 200 aminoácidos que incluye 2 motivos muy conservados implicados en la hidrólisis del 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 uno tercero, identificado como un lazo de glicocola-serina. Se ha propuesto que la lisina conservada en el sitio A y el aspartato que ocupa el residuo final de la lámina β característica del sitio B, se encuentran muy próximas gracias al plegamiento de la proteína y son las responsables de la interacción con el ATP (Fath y Kolter, 1993). As-48C₁D muestra homología, además, con proteínas implicadas en el transporte de aminoácidos, oligopéptidos e iones en bacterias Gram-positivas, e incluso, aunque con valores inferiores, con proteínas relacionadas con la secreción y resistencia de bacteriocinas como la nisina, la subtilina, y la microcina B17 (Díaz, 1999). Es interesante destacar que en el estudio recientemente publicado sobre la circularina A (Kemperman *et al.*, 2003), se describen también grados variables de homología de las proteínas Cir con todos los productos génicos de *as-48*: As-48B/CirB (19%), As-48C/CirC (21%), As-48D/CirD (31'6%), As-48D₁/CirE (30%), As-48F/CirG(17%), As-48G/CirH (40%) y As-48H/CirI (32%), y se les asigna funciones, también muy similares, a las atribuidas a los diversos componentes implicados en el carácter AS-48, que se discuten a continuación.

Los resultados obtenidos con los mutantes de inserción en los últimos genes han llevado a establecer la existencia de un sistema de protección frente a AS-48, procedente del exterior celular, que complementaría al producto del gen de la inmunidad *as-48D₁*. El análisis de homología expuesto en esta Memoria confirma la existencia de una segunda bomba de transporte de tipo ABC, más compleja que la propuesta por Díaz (1999). Los resultados obtenidos han permitido proponer que se trata de un sistema de bombeo de tres componentes (As-48EGH), actuando junto con un factor accesorio, As-48F, que muestra homología con proteínas responsables de la secreción de hemolisinas en diversas bacterias, como se discutirá mas adelante. Este 2º transportador ABC es homólogo a otros transportadores bacterianos como el de *Bacillus* (proteínas YKN-XYZ y YVR-(M)NOP) y, en menor medida, al sistema LOL-CDE de *E. coli* implicado en el transporte de lipoproteínas a través de la membrana externa de esta bacteria. En este 2º transportador, As-48G es la única proteína hidrófila, carente de segmentos transmembrana, a la que sin dificultad se le puede asignar la función de transportador ABC. Efectivamente, As-48G cumple un riguroso *consensus* con los motivos Walker A y B antes descritos y también con un nuevo motivo C, situado justo después del B, que se ha implicado en la transferencia de la energía liberada durante al

hidrólisis del ATP para producir el necesario cambio conformacional del dominio integral de membrana y así facilitar la translocación del sustrato. Es más, la gran homología encontrada entre As-48G y la proteína HisP de *Salmonella typhimurium*, subunidad de unión al ATP de la histidín-permeasa, en la que se encuentran las cuatro regiones conservadas descritas en los resultados, ha llevado a proponer una posible estructura 3D para esta proteína, realizada con la ayuda del programa SwissModel, que se muestra en la Figura 12.

Los transportadores ABC presentan, además del dominio en el que localiza el sitio de unión al ATP, un segundo dominio que puede estar en la misma proteína o en un polipéptido separado, pero que en cualquier caso incluye una región de expansión en membrana (TM) en la que, teóricamente, deben existir sitios de reconocimiento específico para el sustrato que van a transportar. Aunque es característico en las proteínas formadoras de canales de los sistemas de transporte ABC la presencia de seis TM (Saier, 1994), también se han descrito transportadores con sólo cuatro regiones de expansión en membrana. Tal sería el caso de nuestro sistema ABC, en el que los productos de los genes *as-48E* y *as-48H*, con perfiles fuertemente hidrofóbicos y con solo 4 hélices α de tamaño suficiente para atravesar la membrana, se proponen como candidatos para esta función, debido a la homología que presentan con proteínas integrales de membrana asociadas a procesos de transporte. En cuanto a consideraciones estructurales, es posible que la función de As-48E en el sistema multicomponente en el que se encuentra integrada, sea la formación del canal para el importe de la molécula, mientras que As-48H, de acuerdo con las funciones asignadas a las proteínas con las que se alinea en el perfil de Griskov, podría actuar como proteasa, actividad que sería de gran utilidad en la función protectora frente a AS-48. Sin embargo estas propuestas deberán ser comprobadas experimentalmente.

Uno de los resultados más interesantes derivados de nuestro estudio de homología entre proteínas, ha sido la caracterización de la proteína As-48F, única con un perfil mayoritariamente hidrófilo. Se trata de un polipéptido con un dominio de inserción en membrana en su extremo amino-terminal, una hélice α en la región comprendida entre las posiciones 100-200, seguida por un largo dominio en conformación β (aproximadamente desde el residuo 220 hasta el extremo carboxilo). Para discutir las posibles funciones de esta proteína es de crucial importancia conocer su localización a nivel celular. Considerando únicamente los resultados obtenidos con el

programa WU-BLAST, utilizado para predicción de topologías, cabría atribuirle una localización extracelular, similar a la predicha para sus homólogas las proteínas YVRP/YKNX de *Bacillus* o AcrA/AcrE de *Neisseria meningitidis*. Pero no se debe olvidar que, en tales casos, la localización asignada está basada exclusivamente en la homología que muestran con la proteína periplásmica H de *E.coli* (Schülein *et al.*, 1992)). En el nuestro, sin embargo, se dispone de información adicional que puede ayudar a decidir la orientación de As-48F en la célula, tal como la homología que presenta con GrpE, un factor de localización citoplasmática que actúa como intercambiador de nucleótidos y que presenta la estructura ($\alpha+\beta$) descrita para As-48F. Estos datos permiten proponer una novedosa e importante función para el factor accesorio As-48F: estimular la actividad ATPasa de As-48G, acelerando la liberación del ADP lo que permitiría así un rápido reciclaje, con la finalidad última de aumentar su eficacia.

Como se ha comentado anteriormente, para confirmar la función de los dos sistemas ABC descritos, As-48C₁D y As-48EFGH, se han obtenido mutantes alterados en la expresión de AS-48 mediante inserción de Tn5 en los diferentes genes clonados en pAM401-81. Los resultados confirman que la interrupción de *as-48B*, *as-48C₁* o *as-48D* impiden completamente la producción de AS-48 y también disminuyen la resistencia. Sin embargo, las inserciones en los cuatro últimos genes, según se ha comprobado en las inserciones en *as-48G* y/o *as-48H*, aunque determinan un fenotipo hipo-productor, probablemente debido a problemas de expresión génica dado que forman parte del operón *as-48C₁DD1EFGH*, el efecto más claro es una reducción en los niveles de inmunidad comparados con los de la cepa no mutada. Estos resultados nos llevan a proponer una función esencial en la producción de AS-48 para el primer transportador ABC identificado (*as-48C₁D*), que en ningún caso puede ser sustituida por la presencia del segundo transportador, As-48EFGH, último responsable de la auto-protección frente a AS-48, posiblemente interactuando de forma cooperativa con la proteína de la inmunidad, el producto del gen *as-48D₁*.

Es sabido que AS-48 es una molécula formadora de poros en la membrana citoplasmática y se ha postulado que podría ejercer su acción mediante un mecanismo de electroporación molecular gracias al potencial electrostático positivo existente en la superficie de la molécula (González *et al.*, 2000). No se descarta, por otra parte, que la formación de poros se pudiera deber a la inserción en membrana de una de las dos formas diméricas identificadas en los cristales de AS-48 en solución a pH neutro. Tal

dímero una vez que ha interactuado mediante fuerzas electrostáticas con la superficie celular negativamente cargada, podría sufrir una reorganización estructural que condujera a la inserción de la molécula en la membrana y la consiguiente formación del poro (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003). Sea cual fuere el mecanismo de acción de AS-48, se propone como hipótesis que la actividad protectora de As-48EFGH podría ejercerse mediante un eficaz importe- facilitado por la cooperación de As-48F en el reciclaje de As-48G- que condujera a la degradación de la enterocina gracias a la posible actividad proteasa del dominio soluble de As-48H, consiguiendo de esta forma mantener la concentración de AS-48 en la membrana citoplasmática por debajo del umbral necesario para la formación del poro.

La existencia de sendos sistemas de transporte para la secreción y resistencia en muchos de los péptidos catiónicos estudiados (nisina, subtilina o epidermina) (Siezen *et al.*, 1996), incluso algunos 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 particular en aquellos inhibidores que no requieren receptores específicos para ejercer su acción, como es el caso de las bacteriocinas (Saris *et al.*, 1996).

Cuatro transcritos son necesarios para la expresión de la región as-48

La complejidad de la región genética *as-48* se empezó a comprender cuando se inició el análisis de expresión del carácter AS-48 a partir de los ARN totales obtenidos de diversos transformantes (Figuras 10 y 11). El estudio realizado en esta Memoria ha confirmado la existencia de tres operones, tres transcritos policistrónicos (uno más que los publicado anteriormente) y dos ARNm monocistrónicos, cuyo tamaño se corresponde con el de los genes que transcriben. Pero la aportación más interesante presentada en este estudio se refiere al estudio de la expresión diferencial de los transcritos durante el crecimiento de los transformantes y las interrelaciones existentes entre los transcritos.

De esta forma se ha podido constatar que el transcrito monocistrónico T_A (0,3 Kb) que da una intensa señal acorde con la fuerza de su promotor (Tomita *et al.*, 1997), es de expresión constitutiva, ya que una señal similar se obtiene en los transformantes JH2-2 con las construcciones pAM401-61 (pAM401_A) o pMG36_A, en las que solamente se ha clonado el gen estructural bajo su propio promotor (Figura 20). Por tanto se puede concluir que la expresión del gen estructural no se encuentra regulada ni por sistemas de

transducción de señales a través de un sistema de *quorum sensing* similar al que controla la expresión de la nisina o la subtilina (Siezen *et al.*, 1996), ni tampoco mediante control transcripcional ejercido por proteínas capaces de reconocer secuencias repetidas (*iterones*) (Peschel *et al.*, 1993), que por cierto, se han identificado precediendo a la región -35 del promotor del gen estructural *as-48A* (Martínez-Bueno *et al.*, 1998), aunque su función hasta la fecha se desconoce.

El transcrito T₁ cubre la expresión de los genes *as-48BC*: se trata de un pequeño operón de difícil observación debido a la coincidencia de su tamaño con el rastro del ARN ribosómico 23S. Ello podría justificar la diferencia de tamaño publicada para T₁ en un trabajo anterior (Martínez-Bueno *et al.*, 1998), en el que se proponía que la transcripción se iniciaba 1 Kb corriente arriba del gen *as-48A*. El tamaño propuesto para T₁ está de acuerdo con los resultados publicados por Tomita *et al.* (1997) con mutantes de inserción con Tn5 en la región intergénica existente entre *BacA* y *BacB*, equivalentes a *as-48A* y *as-48B*, un sistema genético muy similar al de *as-48* encontrado en el plásmido pPD1. Sin embargo en este trabajo no se dan razones que expliquen el fenotipo hipoprodutor que presentan estos mutantes. Por ello, se ha analizado con detalle la región intergénica que separa los genes *as-48A* y *as-48BC*. Se trata de una región muy pequeña (78b) en la que se encuentran un fuerte terminador identificado al final del gen estructural y la región promotora de los genes *as-48BC* que, en principio, y de acuerdo con el consenso establecido para ello, la región -35 podría encontrarse solapada con el final del gen estructural, lo que tal vez justifique un cierto grado de dependencia del mismo. Por otra parte, los resultados sobre el transcrito T₁ obtenidos en el mutante JH2-2(pAM401-81::Tn5_A) no son fáciles de entender, pues aunque en las hibridaciones no se observa con claridad la señal correspondiente a dicho transcrito en ninguno de los ensayos realizados, debe existir un nivel básico de expresión de los genes *as-48BC* pues los valores de resistencia que muestra este mutante frente a AS-48 son superiores a los del mutante JH2-2(pAM401-81::Tn5_B) en los que no hay expresión del gen *as-48B* (6 µg/ml frente a 1 µg/ml). Este resultado indica que el transcrito T₁ debe poseer un sofisticado sistema de expresión y de regulación, de tal forma, que la plena expresión de estos genes podría depender de la expresión del gen estructural. Tal vez analizando los resultados de complementación obtenidos con estos mutantes con las construcciones pMG36_A y pMG36_{BC} realizadas, se encuentren argumentos para fundamentar tal suposición. En efecto, si la expresión de T₁ solo requiriera la presencia de T_A, los dobles transformantes obtenidos JH2-2(pAM401-81::Tn5_A y pMG36_A)

deberían mostrar un fenotipo salvaje (en cuanto a los niveles de producción y resistencia) al tratarse de una complementación que debería contrarrestar la mutación producida por la inserción de Tn5 en la región promotora del gen estructural. Sin embargo los resultados demuestran que, aunque se restaura parcialmente el fenotipo productor, lo que se justifica por la banda correspondiente a T_A se refleja en los 7 mm de halo de inhibición producido por este doble transformante, no se mejoran los niveles de resistencia que presentan frente a AS-48, lo que apunta a la expresión incompleta del gen *as-48B*. Se ha descartado la posibilidad de que el fenotipo hipo-productor fuese debido a problemas con la transcripción de *as-48A* en los transformantes con la construcción pMG36_A, ya que en los Northern se observa una señal para T_A similar a la que se obtiene en JH2-2(pAM401-81) (Figura 20). Parece, pues claro, que la expresión del gen estructural se produce en el doble transformante JH2-2(pAM401-81::Tn5A y pMG36_A), pero dicha señal en "trans" no es capaz de inducir la completa expresión de los genes *as-48BC*, los cuales actuando junto a los genes *as-48C₁D* son los que proporcionan el fenotipo productor a la bacteria. Hay además otro dato importante que podría fundamentar la hipótesis barajada sobre el doble mecanismo de regulación de los genes *BC*: si en JH2-2(pAM401-81::Tn5A y pMG36_A) no existiera la expresión basal de estos genes, el fenotipo debería ser no productor como ocurre en el mutante JH2-2(pAM401-81::Tn5B) y los niveles de resistencia tan bajos como en el caso en el que el gen *as-48B* se encuentra interrumpido. Otros resultados que se comentarán mas adelante al discutir los resultados de complementación obtenidos con el doble transformante JH2-2(pAM401-81::Tn5A y pMG36_{BC}) apoyan igualmente esta hipótesis.

Es importante destacar que a pesar de los numerosos intentos realizados utilizando diferentes estrategias, no haya sido posible obtener la construcción pMG36_{ABC} en la que los tres primeros genes *as-48ABC* se encontrarían en fase bajo sus propios promotores. Esta construcción hubiera sido muy útil para comprobar si la expresión en *cis* de los tres genes en los transformantes de JH2-2 con el resto de la información genética (pAM401_{CIDDEFGH}) restaura el fenotipo productor y la resistencia frente a AS-48 adicionado de manera exógena. Si así fuera, habría que considerar la posibilidad de que *as-48BC* se transcribiera desde dos ARNm, uno que se iniciaría en el promotor de *as-48BC* y sería responsable del nivel basal de resistencia encontrado al interrumpir el gen estructural y una segunda ronda de transcripción que partiría de *as-48A* y en ese caso se podría pensar que los *iterones* descritos por Martínez-Bueno *et al.*,

(1998) que se encuentran situados justo antes de la región promotora del gen estructural pudieran estar implicados en la regulación de la expresión de los genes *as-48BC*.

Las características del transcrito T_2 también han sido investigadas en el transcurso de esta Memoria y los resultados confirman que se trata de un largo ARNm (aprox. 6,4 Kb) que cubre la expresión de los 7 últimos genes de la región *as-48*. En esta región se encuentran los dos transportadores ABC antes comentados (*as-48C₁D* y *as-48EFGH*) y el gen de la inmunidad (*as-48D₁*). La expresión de T_2 parece de carácter constitutivo pues la señal se detecta en ausencia de T_A y de T_1 y aparece prácticamente desde el comienzo del crecimiento logarítmico (90 min), alcanzando un máximo a las 3 h del crecimiento, sin embargo después declina de forma que a las 5 horas de cultivo, T_2 es prácticamente indetectable. Estos resultados corroboran la importancia para la célula de los productos que transcribe T_2 : las dos bombas de transporte ABC identificadas, una implicada en la secreción de AS-48 y otra responsable de la resistencia, además del gen de la inmunidad. La expresión de T_2 desde el comienzo del crecimiento está justificada ya que T_A también se expresa desde el inicio de la fase logarítmica y así asegura a la célula las diferentes capacidades conferidas por la presencia de la región *as-48*: la secreción e inmediata autoprotección frente a la enterocina. Como era de esperar la inserción de Tn5 en la región intergénica *as-48D₁-E* impide la completa transcripción de T_2 y origina un T_2^* mas corto, correspondiente a un transcrito truncado por el efecto polar que tiene la inserción de Tn5 en la expresión de los genes situados a continuación. Pero los estudios llevados a cabo con el mutante JH2-2(pAM401-81::Tn5_{D₁-E}) han permitido además, conocer la importancia de T_2 en la expresión de T_3 , el mensajero para los 4 últimos genes *as-48EFGH* existentes.

Efectivamente, el transcrito T_3 identificado por Díaz (1999) con un tamaño aprox. de 5,4 Kb, se detecta desde el comienzo de la fase logarítmica y cubre todo el periodo de crecimiento celular, incluida la fase exponencial tardía en la que ya no se observa la expresión de T_2 . Se trata por tanto de un operón que debe tener su propio promotor, a partir del cual se inicia una onda de transcripción, un ARNm que está presente durante un periodo de crecimiento más largo que en el caso de T_2 , de cuya expresión, sin embargo, parece depender, según se deduce de los resultados que a continuación se discuten. Como acabamos de comentar en los transformantes JH2-2(pAM401-81::Tn5_{D₁-E}) se detecta con toda claridad T_2^* y T_3 , lo que indica que basta con que se inicie la transcripción de T_2 para que se transcriba T_3 . Se podría argumentar que la transcripción de T_3 podría iniciarse desde el propio Tn5, sin embargo esto no

parece probable, ya que el tamaño de la onda de transcripción T_3 en este supuesto debería ser de mayor tamaño y en nuestros resultados coincide con el esperado. Por otra parte, la presencia del transposón no altera los niveles de resistencia del mutante, confirmando que los cuatro últimos genes se expresan a través de dos ondas diferentes de transcripción (T_2 y T_3), y la última complementa los niveles de resistencia conferidos por T_2 .

Es importante destacar que en JH2-2(pAM401_{EF_{GH}}) en el que no puede haber expresión de otros mensajeros, no ha sido posible la detección de T_3 y la ausencia total de resistencia en estos transformantes lo confirman (Tabla 10). Parece descartable la influencia de T_A en la regulación de T_3 al analizar los resultados obtenidos con JH2-2(pAM401_{CIDDIE_{EF_{GH}}}). En este transformante sólo es posible la presencia de T_2 y T_3 y solo en ausencia de T_2 , como ocurre en JH2-2(pAM401_{EF_{GH}}), se encuentra impedida la expresión de T_3 , último responsable de la expresión de la resistencia frente a AS-48, cuyo larga vida media se explica admitiendo su función protectora en la célula, ya que asegura la supervivencia de la misma cuando los niveles de T_2 comienzan a declinar.

Finalmente un corto transcrito monocistónico para *as-48D1*, el gen de la inmunidad, fue en su día demostrado y confirmado por la presencia de ciertos niveles de resistencia en el transformante de JH2-2(pAM401_{D1}), una construcción en la que sólo está presente el gen identificado y que por ello fue identificado como el determinante de la inmunidad (Martínez-Bueno *et al.*, 1998). Sin embargo, este gen que, de acuerdo con lo expuesto debe tener su propio promotor, no parece que se exprese de forma independiente cuando la construcción pAM401-81 lo está haciendo a través del transcrito T_2 , ni siquiera durante el crecimiento logarítmico tardío en el que disminuye la expresión de este transcrito. Ello se justificaría como a través de un mecanismo de (auto?) regulación negativa en aras de un "ahorro genético" para la célula, que en la célula se vería compensada por la expresión de los cuatro últimos genes.

Como conclusión se podría destacar que la región *as-48* está organizada en 3 operones T_1 , T_2 y T_3 y dos ARNm monocistrónicos T_A y T_{D1} , de los cuales T_A , T_2 y en parte T_1 (a nivel básico) se expresan de manera constitutiva. Se han presentado datos para sugerir que la expresión de T_3 depende de la de T_2 , que a su vez podría regular de forma negativa la de T_{D1} . Así mismo la expresión completa de los genes *as-48BD* implicados en la expresión del carácter AS-48, tanto en lo que se refiere a la capacidad productora como la de resistencia en la estirpe salvaje, podría estar regulada por T_A .

Estudios de complementación en "trans" permiten investigar las relaciones entre las distintas unidades de transcripción

Para poder llevar a cabo análisis de complementación en "trans" entre los diversos operones identificados, lo que nos permitiría conocer las relaciones existentes entre los mismos y discutir la importancia de los diferentes productos génicos, es imprescindible disponer de vectores compatibles con pAM401 en el que se ha clonado parte o toda la región genética y se dispone además, de una importante genoteca de mutantes para llevar a cabo los estudios.

Disponer de vectores de enterococos de un grupo de incompatibilidad diferente al del pAM401, no ha sido nada fácil ya que la mayoría de los vectores ensayados resultaban excluidos de la célula en ausencia de presión selectiva. Tal fue también el caso de pIL253 (4,8 Kb) un vector propio de *Lactococcus* que se expresa en el género *Enterococcus*, y que fue seleccionado por ser de alto número de copias y presentar un marcador de resistencia a la eritromicina que facilita su selección. Sin embargo los resultados obtenidos con el plásmido pMG36e (3,6 Kb) fueron mucho más alentadores, ya que según comprobamos se mantiene de forma estable en presencia de pAM401-81. pMG36e es un vector construido con un promotor fuerte de lactococos (P32), por lo que es usado como vector de expresión y también presenta un determinante de resistencia a la eritromicina. Este plásmido resulta muy versátil ya que tiene un origen de replicación de amplio rango de hospedador lo que permite su utilización en *Enterococcus*. Además, su manipulación resulta fácil por contener un sitio de clonación múltiple y por su capacidad de replicarse en *E. coli* (van de Guchte *et al.*, 1989).

La clonación de los genes *as-48A* y *as-48BC* en pMG36e se ha realizado siguiendo diferentes estrategias. En el primer caso, la clonación del gen estructural junto a su propio promotor, se logró liberando el fragmento que lo contenía en la construcción pAM401-81, mediante digestión con enzimas de restricción. Mientras que en el caso de *as-48BC* se obtuvo la región genética correspondiente mediante amplificación por PCR utilizando sendos oligonucleótidos deducidos de su secuencia, con sitios de corte adecuados, para su posterior clonación bajo el promotor P32 del vector. Una vez obtenidas las construcciones fueron transferidas mediante electroporación a la cepa JH2-2 con diversas construcciones, para así realizar los estudios de complementación deseados.

El primer objetivo era investigar si el gen estructural podía ser expresado en "trans": para ello, la construcción pMG36_A obtenida, fue transferida a la cepa mutante JH2-2(pAM401::Tn5A) y en los dobles transformantes obtenidos, en los que se confirmó la presencia de ambas construcciones, se investigó el fenotipo que conferirían. De esta forma se pudo comprobar que la expresión del gen estructural en *trans*, a partir de pMG36_A, restaura en parte la capacidad de producir AS-48 perdida en JH2-2(pAM401::Tn5A), sin embargo los niveles producidos son sensiblemente inferiores a los de la estirpe control (7 mm frente a 16 mm). Curiosamente, la resistencia no se mejora por la presencia del gen estructural que estaba interrumpido en el mutante. Una vez demostrada la eficacia de pMG36_A para expresar T_A en los experimentos de Northern Blotting realizados, se buscaron las razones que pudieran explicar este inesperado comportamiento y la argumentación más plausible parece ser la falta de expresión de aquellos genes que estuvieran afectados por la interrupción de T_A. Ello nos lleva a considerar de nuevo la posibilidad de una doble transcripción necesaria para completa expresión de los genes *as-48BC*, cuyos niveles no pueden ser alcanzados por la expresión del gen estructural *as-48A* (T_A) en "trans", por las razones aducidas anteriormente.

A la vista de la importancia de los genes *as-48BC* en el carácter AS-48, se procedió a clonar esta región en el vector pMG36e, con una doble finalidad. Por un lado, investigar si era posible restaurar la pérdida de expresión de ciertos mutantes mediante complementación y por otro comprobar si era posible la obtención de transformantes hiper-productores de AS-48, considerando que la limitación para ello pudiera encontrarse en el delicado mecanismo de regulación que parece presenta el operón *as-48BC*. Así mismo este trabajo permitiría aclarar la importancia de los productos de ambos genes, cuya función hasta la fecha permanecía oscura.

Una vez obtenida sin grandes dificultades la construcción pMG36_{BC}, fue transferida a la cepa original JH2-2(pAM401-81) con el fin de comprobar si mejoraba la capacidad de producir AS-48 y también al mutante JH2-2(pAM401-81::Tn5B) para estudiar la posibilidad de restaurar el fenotipo no productor e hipo-resistente debido a la interrupción de los genes *as-48BC*

Expresión heteróloga de AS-48 en otras BAL

Como se ha expuesto en la Introducción de esta Memoria, las bacteriocinas producidas por las BAL han despertado la atención durante las dos últimas décadas, tanto de científicos como de responsables de la industria alimentaria por sus posibilidades de empleo, cada vez más cercano, como conservantes naturales de alimentos. El desarrollo de sistemas de expresión heteróloga de tales compuestos antimicrobianos ofrece una serie de ventajas sobre el empleo de los sistemas nativos u originales ya que podría facilitar su sobreproducción y posterior purificación, pero lo más interesante es la posibilidad de producirlos por microorganismos seguros para su empleo en alimentos que podrían ser utilizados como cultivos iniciadores, protectores y/o probióticos. Por otra parte, la expresión heteróloga de los sistemas genéticos responsables de estos caracteres permite la obtención de cepas multi-bacteriocinogénicas de indudable interés industrial, para resolver los problemas higiénicos que tiene hoy planteada la industria alimentaria, ofreciendo al mismo tiempo los alimentos naturales y seguros demandados por la sociedad.

La importancia de estos estudios aumenta cuando se trabaja con cepas del género *Enterococcus*, considerado como microorganismo indicador de contaminación fecal, y mas aun teniendo en cuenta la existencia de cepas con determinantes de virulencia como la resistencia a antibióticos y otros factores de patogenicidad (Jett et al, 1994; Franz et al, 1999, 2001; Eaton y Gasson, 2001 Bibliografía del libro de la red pg 61). Tal vez por ello, numerosos grupos de investigación han invertido esfuerzos en la clonación, producción y expresión funcional de diversas bacteriocinas como la enterocina P expresada con cierto éxito en *E. coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Lactococcus lactis* e incluso en la levadura *Picchia pastoris* (Gutierrez et al, 2003 Red pag 61). Aunque inicialmente *E. coli* fue la primera bacteria considerada como hospedador primario en la clonación y expresión de genes heterólogos, en el caso de las bacteriocinas de las BAL dicha bacteria puede no ser la mejor elección, debido a una serie de circunstancias que han quedado expuestas en el apdo. 3 de la Introducción.

La expresión de la enterocina AS-48 es más compleja que las de otras bacteriocinas, por las razones que a continuación se exponen: i) en primer lugar se sintetiza como un precursor que ha de sufrir un proceso de maduración postraducciona para originar la molécula circular con actividad, lo que haría inútil su expresión bajo un péptido señal que no pudiera ser reconocido por el sistema de maduración; ii) la complejidad de la región genética constituida por 10 genes que se encuentran agrupados

en tres operones; iii) de acuerdo con los resultados expuestos, el sistema de expresión parece que funciona de forma óptima en *cis*, es decir cuando los genes se encuentran físicamente agrupados. En tal situación se ha considerado que la mejor estrategia para la expresión heteróloga de AS-48, es la clonación de la región *as-48* en vectores apropiados, seguido de su transferencia e intento de expresión en otros hospedadores de las BAL.

Transferencia a *L. lactis*. En ensayos preliminares se logró con éxito la transferencia del plásmido pAM401-81 a *L. lactis* LM2301 mediante electroporación, en los cuales se expresaba una débil resistencia frente a AS-48 ($< 6 \mu\text{g}$ valorada mediante la técnica de las gotas), y una nula producción de AS-48. Continuando este estudio, se ha realizado en primer lugar la subclonación de la región genética de *as-48* en el vector pIL253, considerado mas apropiado para este hospedador. Tampoco en este caso ha sido posible la detección del inhibidor AS-48 en ninguno de los transformantes derivados de *L. lactis* con los plásmidos pAM401-81 ó pIL253-81, ni siquiera utilizando la bacteria indicadora mas sensible, *L. monocytogenes*, lo que confirma los resultados obtenidos previamente por Díaz (1999). La falta de expresión comentada no se vió modificada cambiando las condiciones de cultivo (temperatura de incubación 28°-40 °C, medios de cultivo, etc.). La posibilidad de que hubiese ocurrido una mutación en los plásmidos recombinantes fue, así mismo descartada mediante experimentos de retrotrans-formación, consistentes en introducir en *E. faecalis* JH2-2 las construcciones pAM401-81 ó pIL253-81 purificadas a partir de *L. lactis* LM2301. Es importante destacar, por otra parte, que en el seguimiento realizado mediante Northern blot para valorarla expresión del gen estructural *as-48A* en *Lactococcus*, se encontró una señal débil en las membrana en las que se había transferido el ARN total derivado de pAM401-81, y no había señal en la de pIL253-81, resultado que apunta a una menor eficacia en la transcripción de este gen en lactococos. Además no se puede descartar la necesidad de un gen o genes adicionales, necesarios para la maduración y/o secreción de AS-48, propios de los enterococos que fueran inexistentes en estas bacterias, a pesar de la proximidad filogenética que muestran.

Es llamativo, sin embargo, los resultados obtenidos respecto a la expresión de la resistencia frente a AS-48: al contrario de lo encontrado para la producción, ambos transformantes resistían en medio sólido hasta una concentración de $3 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ en las cepas con pAM401-81 y del doble, hasta $6 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ para las que albergaban pIL253-81.

Valores sensiblemente superiores a los de la cepa sin transformar pero muy inferiores a los mostrados por las correspondientes cepas de enterococos ($>18 \mu\text{g}/5\mu\text{l}$ y hasta $9 \mu\text{g}/5\mu\text{l}$, respectivamente).

Transferencia a cepas de *Pediococcus*. Siguiendo una estrategia similar a la anteriormente descrita, se intentó la transferencia del carácter AS-48 a *Pediococcus pentosaceus* Biotipo 1 P12 y Biotipo 2 S10, utilizando para ello los plásmidos recombinantes disponibles pAM401-81 y pIL253-81. Sin embargo no fue posible obtener transformantes en estos ensayos, incluso variando las condiciones en la técnica de electroporación. La ausencia de transformantes podría deberse a diversos motivos: que estos plásmidos no puedan replicarse en *Pediococcus* y/o expresar la resistencia del marcador (cloranfenicol ó eritromicina respectivamente), hipótesis avalada por el hecho de que tampoco se logró la transferencia de los vectores pAM401 ó pIL253, empleados como control o bien que las técnicas de electroporación utilizadas no fueran adecuadas para ellas. En este sentido conviene añadir que, aunque se utilizaron técnicas de descritas para *Pediococcus*, éstas no siempre resultan eficientes en todas las cepas ensayadas, y, además, no todas ellas son susceptibles de ser electrotransformadas. Por el momento se carece de datos que apoyen una u otra hipótesis.

Transferencia a *Lactobacillus*. Otro intento de expresión heteróloga se realizó en las cepas 393 de *Lb. casei* y 4005 de *Lb. delbruecki* a las cuales se les transfirieron los plásmidos recombinantes pAM401-81, pIL253-81 y pEM76-81 anteriormente descrito. Sin embargo, y a pesar de los múltiples experimentos llevados a cabo, sólo se obtuvieron transformantes de *Lb. casei* 393 para los plásmidos pAM401-81 y pEM76-81; en el último caso debería estar integrado en el cromosoma del hospedador heterólogo. La ausencia de transformantes para pIL253-81 confirma su baja eficiencia en la transferencia y/o expresión heteróloga de AS-48, probablemente debido a una baja o nula tasa de replicación o incluso a la falta de expresión del marcador Em. Al igual que en *L. lactis*, los transformantes de lactobacilos con pAM401-81 o pEM76-81 mostraron un fenotipo no productor de AS-48, y tan sólo una muy débil expresión de la resistencia. Probablemente el motivo sea similar a lo propuesto para *L. lactis*, estando relacionado con una débil o inexistente transcripción del gen *as-48A*, o bien a una baja eficacia en la secreción y maduración de la molécula madura, no descartándose la existencia de alguna proteína adicional propia de los enterococos.

Transferencia a cepas de *E. faecium*. Especie de enterococos que fue seleccionada por su interés en la industria alimentaria ya que carece de algunos de los determinantes de virulencia descritos en *E. faecalis* (proteínas de agregación y producción de hemolisinas) y también por la cercanía genética con la cepa original. Las cepas de *E. faecium* empleadas para la transferencia del plásmido recombinante pAM401-81, procedían de nuestra colección (S-29 y S-60) o habían sido aisladas de alimentos y bien caracterizadas (1, PJ, 32, 34). Se obtuvieron transformantes con las cepas de colección y además con las de origen lácteo (32 y 34) y vegetal (S1 y S3), y en todos los casos mostraron un fenotipo salvaje respecto al carácter AS-48, es decir expresaron la capacidad de producir la enterocina y la resistencia, con igual eficacia que la estirpe de procedencia.

A partir de los sobrenadantes de diversos transformantes con pAM401-81 obtenidos en medio complejo se identificó el inhibidor producido como AS-48, tras su purificación a homogeneidad empleando las técnicas clásicas (cromatografía de intercambio catiónico y HPLC). Así mismo los ensayos de resistencia, sensibilidad cruzada y espectro de acción dieron los mismos resultados que *E. faecalis*. Las únicas diferencias encontradas se referían a la escasa producción en agar-leche, en el cual hay una reducción importante respecto del control, lo que puede atribuirse a la falta de actividad proteolítica de las cepas de *E. faecium*, lo que, en último término determinaría un crecimiento inferior en este ambiente. Ello no impide, como ya se ha comprobado en estudios paralelos realizados en nuestro laboratorio, que este transformante pueda ser empleado para el control de *S. aureus* y *L. monocytogenes* en sistemas alimentarios, como el queso y masa cárnica modelo salchichón. De hecho, los resultados obtenidos en estos ensayos de laboratorio han puesto de manifiesto que, si bien su capacidad de implantación es algo inferior a la de la cepa *E. faecalis* A-48-32 empleada como control, la producción de enterocina y el control del desarrollo de ambas patógenos bacterianos es similar e incluso superior por la cepa de *E. faecium* (Muñoz *et al.*, 2004; Ananou *et al.*, 2004).

Conclusiones

1. El carácter AS-48 está determinado exclusivamente por 10 genes, *as-48ABCC₁DD₁EFGH*, habiéndose descartado de forma definitiva la implicación de otros determinantes genéticos del plásmido pMB2.
2. Los estudios teóricos sobre la topología de las proteínas As-48EFGH demuestran que conforman un sistema de transporte de tipo ABC, en el que As-48F es un factor accesorio, As-48EH son los componentes integrales de membrana y en As-48G se localiza el sitio de unión al ATP.
3. La región *as-48* está organizada en tres operones que abarcan los genes *as-48BC* (transcrito T₁), *as-48C₁DD₁EFGH* (transcrito T₂) y *as-48EFGH* (transcrito T₃), además del gen estructural, que se expresa mediante un mensajero monocistrónico (T_A).
4. La expresión del gen estructural es constitutiva, sin embargo las de T₁ y T₃ dependen de la presencia del gen *as-48A* y de los genes *as-48C₁DD₁EFGH*, respectivamente.
5. Todos los ARNm correspondientes a los genes identificados se detectan desde el inicio del crecimiento bacteriano, aunque en las etapas finales del crecimiento logarítmico sólo se observan T_A y T₃.
6. Los genes *as-48ABC* se expresan de forma óptima cuando se encuentran en *cis* con el resto de los determinantes genéticos presentes en la región *as-48*.
7. El plásmido pAM401 es, sin duda, el más adecuado de los ensayados para la clonación del carácter AS-48 en enterococos, confiriendo niveles de producción y de resistencia idénticos a los de la estirpe salvaje S-48.
8. Se ha conseguido la transferencia de la región *as-48* a cepas de *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *E. faecium*. En *E. faecium* se expresa el carácter con una eficacia similar a la de *E. faecalis*, pero en el resto de las bacterias transformadas solo se ha obtenido una débil expresión de la resistencia.



Bibliografía

- Abriouel H, Maqueda M, Gálvez A, Martínez-Bueno M, Valdivia E.** 2002. Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. *Appl Envir Microbiol.* **68**: 1473-1477.
- Abriouel H, Sánchez-González J, Maqueda M, Gálvez A, Valdivia E, Gálvez-Ruiz M.** 2001. Monolayer characteristics of bacteriocin AS-48, pH effect and interactions with dipalmitoyl phosphatidic acid at the air-water interface. *J Colloid Interface Sci.* **233**: 306-312.
- Abriouel H, Valdivia E, Gálvez A, Maqueda M.** 1998. Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48. 1998. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 4623-4626.
- Abriouel, H.** 2000. Estudios físico-químicos y biológicos de la bacteriocina AS-48. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Allison GE, Fremaux C, Klaenhammer TR.** 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J Bacteriol.* **176**: 2235-2241.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Alvarez, MA, Herrero M, Suarez JE.** 1998. The site-specific recombination system of the *Lactobacillus* species bacteriophage A2 integrates in gram-positive and gram-negative bacteria. *Virology* **250**:185-193
- Ananou, S.** 2003. Estudio de la eficacia de la enterocina AS-48 en el control de bacterias patógenas transmitidas por alimentos. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Anderson DG, McKay LL. 1983. A simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl Environ Microbiol.* **46:** 549-552.

Anderssen EL, Diep DB, Nes IF, Eijsink VGH, Nissen-Mayer J. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: Two new two-peptide bacteriocins, plantaricin EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl Environ Microbiol.* **64:** 2269-2272.

André Gordon CL, Ahmad MH. 1991. Thermal susceptibility of *Streptococcus faecium* strains isolated from Frankfurters. *Can J Microbiol.* **37:**609-612

Andrewes FW, Horder TJ. 1906. A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet II:* 708-713.

Appel RD, Bairoch A, Hochstrasser DF. 1994. A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the Expasy WWW server. *Trends Biochem. Sci.* **19:**258-260.

Aymerich T, Garriga M, Ylla J, Vallier J, Monfort JM, Hugas M. 2000. Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J Food Prot.* **63:** 721-6.

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

Balla E, Dicks LM, Du Toit M, Van Der Merwe MJ, Holzapfel WH. 2000. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl Environ Microbiol.* **66:** 1298-304.

- Bayro MJ, Mukhopadhyay J, Swapna GV, Huang JY, Ma LC, Sineva E, Dawson PE, Montelione GT, Ebricht RH.** 2003. Structure of antibacterial peptide microcin J25: a 21-residue lariat protoknot. *J Am Chem Soc.* **125**:12382-12383.
- Becquet P.** 2003. EU assesment of enterococci as feef additives. *Int J Food Microbiol.* **88**: 247-254.
- Bell RG, DeLacey KM.** 1984. Heat injury and recovery of *Streptococcus faecium* associated with the souring of chub-packed luncheon meat. *J Appl Bacteriol.* **57**: 229-236.
- Ben Embarerek PK.** 1994. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *Int J Food Microbiol.* **23**: 17-34.
- Bennik MH, Vanloo B, Brasseur R, Gorris LG, Smid EJ.** 1998. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim Biophys Acta.* **1373**: 47-58.
- 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, plasmid and episomes. Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y.
- Billman-Jacobe H.** 1996. Expression in bacteria other than *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* **7**: 499-504
- Birnboim HC, Dolly J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Blond A, Peduzzi J, Goulard C, Chiuchiolo MJ, Barthelemy M, Prigent Y, Salomon RA, Farias RN, Moreno, F Rebuffat.** 1999. The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. *S. Eur. J.Biochem.* **259**:747-755

- Bokesch HR, O'Keefe BR, McKee TC, Pannell LK, Patterson GM, Gardella RS, Sowder RC 2nd, Turpin J, Watson K, Buckheit RW Jr, Boyd MR.** 2001. A novel anti-HIV macrocyclic peptide from *Palicourea condensata*. *J Nat Prod.* **64**: 249–250
- Booth MC, Bogie CP, Sahl HG, Siezen RJ, Hatter KL, Gilmore MS.** 1996. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolyisin, a novel lantibiotic. *Mol Microbiol.* **21**: 1175-84.
- Bourgeois LF, Mata M, Ritzenthaler R.** 1991. Pulsed-field gel electrophoresis as a tool for studying the phylogeny and genetic history of lactococcal strains. P. 140-145. Dunny, Cleary and McKay (ed.). *Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci and enterococci.* ASM. Washington D.C.
- Brandon Ason B, Reznikoff W .** 2003. DNA Sequence Bias During Tn5 transposition . *J. Mol. Biol.* **335**: 213-1225).
- Brendel V, Bucher P, Nourbakhsh L, Blaisdell BE, Karlin S.** 1992. Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2002-2006.
- Brock TD, Davie JM.** 1963. Probable identity of a group D-hemolysin with a bacteriocine. *J. Bacteriol.* **86**: 709-712.
- Broekaert WF, Cammue BPA, De Bolle MFC, Thevissen K, Samblanx GW, Osborn RW.** 1997. Antimicrobial peptides from plants. *Crit Rev Plant Sci* **16**: 297-323.
- Broussalis AM, Goransson U, Coussio JD, Ferraro G, Martino V, Claeson P.** 2001. First cyclotide from *Hybanthus* (Violaceae). *Phytochemistry* **58**: 47–51.
- Bruno MEC, Montville TJ.** 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **59**: 3003-3010.

Brurberg MB, Nes IF, Eijsink VC. 1997. Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. *Mol Microbiol.* **26:** 347-360.

Casaus P, Cintas LM, Rodríguez JM, Hernández PE, Holo H, Nes IF. 1995. Partial biochemical characterization of an enterocin produced by an *Enterococcus faecium* strain of meat origin. Abstract of the 1st Meeting of the EU-Biotech Project in LAB Antimicrobial Compounds.

Casaus P, Nilsen T, Cintas LM, Nes IF, Hernandez PE, Holo H. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology.* **143:** 2287-94.

Chikindas ML, Venema K, Ledebøer AM, Venema G, Kok J. 1995. Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Lett Appl Microbiol.* **21:** 183-189.

Cintas LM, Casaus P, Havarstein LS, Hernandez PE, Nes IF. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol.* **63:** 4321-30.

Cintas LM, Casaus P, Herranz C, Havarstein LS, Holo H, Hernandez PE, Nes IF. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J Bacteriol.* **182:** 6806-14.

Cintas LM, Casaus P, Holo H, Hernandez PE, Nes IF, Havarstein LS. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J Bacteriol.* **180:** 1988-94.

Cintas LM, Rodríguez JM, Fernández MF, Sletten K, Nes IF, Hernandez PE, Holo H. 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from

Pediococcus acidilactici with a broad inhibitory spectrum. *Appl Environ Microbiol.* **61**: 2643-8.

Cleweland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol.* **71**: 1-20.

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

Clewell, DB. 1993. Bacterial Sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* **73**: 9-12.

Cobos E, Filimonov V, Gálvez A, Valdivia E, Maqueda M, Martínez JC, Mateo PL. 2002. The denaturation of circular enterocin AS-48 by urea and guanidinium hydrochloride. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1598**: 98-107.

Cobos E, Filimonov VV, Gálvez A, Maqueda M, Valdivia E, Martínez JC, Mateo PL. 2001. AS-48: a circular protein with an extremely stable globular structure. *FEBS Lett.* **505**: 379-382.

Coburn PS, Gilmore MS. 2003. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cellular Microbiol.* **5**:661-669.

Cole AM, Hong T, Boo LM, Nguyen T, Zhao C, Bristol G, Zack JA, Waring AJ, Yang OO, Lehrer RI. 2002. Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci. USA* **99**: 1813-1818.

Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. 1995. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J. Infect. Dis.* **171**: 1223-1229.

Corpet, F. 1998. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**:10881-10890.

- Craik DJ, Daly NL, Bond T, Waine C.** 1999. Plant cyclotides: a unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J Mol Biol.* **294**: 1327–1336.
- Craik DJ, Daly NL, Saska I, Trabi M, Rosengren KJ.** 2003. Structures of naturally occurring circular proteins from bacteria. *J Bacteriol Review* **185**: 4011–4021.
- Craik, DJ.** 2001. Plant cyclotides: circular, knotted peptide toxins. *Toxicon* **39**: 1809–1813.
- Dack GM.** 1956. *Food Poisoning* (3rd ed. ed.). The University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Daeschel MA.** 1993. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in food and beverages. In: Hoover, D.G. and Steenson, L.R., Editors, 1993. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, Academic Press, USA, pp. 63–91.
- Daly NL, Craik DJ.** 2000. Acyclic permutants of naturally occurring cyclic proteins: characterization of cystine knot and β -sheet formation in the macrocyclic polypeptide Kalata B1. *J Biol Chem.* **275**: 19068–19075.
- Daly NL, Koltay A, Gustafson KR, Boyd MR, Casas-Finet JR, Craik DJ.** 1999. Solution structure by NMR of Circulin A: a macrocyclic knotted peptide having anti-HIV activity. *J Mol Biol.* **285**: 333–345.
- Daly NL, Love S, Alewood PF, Craik DJ.** 1999. Chemical synthesis and folding pathway of large cyclic polypeptides: studies of the cystine knot polypeptide Kalata B1. *Biochemistry* **38**: 10606–10614.
- Danders W, Marahiel MA, Krause M, Kosui N, Kato T, Izumiya N, Kleinkauf H.** 1982. Antibacterial action of gramicidin S and tyrocidines in relation to active transport, in vitro transcription, and spore outgrowth. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**: 785–790.

De Ruyter PG, Kuipers OP, Beerthuyzem MM, van Alen-Boerringter I, de Vos WM. 1996. Funcional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. **178**: 3434-3439.

Del Campo R, Tenorio C, Jimenez-Diaz R, Rubio C, Gomez-Lus R, Baquero F, Torres C. 2001. Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. Antimicrob Agents Chemother. **45**: 905-12.

Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie van Leeuwenhoek **69**: 193-202.

Devriese LA, Pot B, Collins MD. 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. J Appl Bacteriol. **75**: 399-408.

Devriese LA, Pot B. 1995. In: Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. Editors, 1995. The Lactic Acid Bacteria, The Genera of Lactic Acid Bacteria, The genus *Enterococcus* **2** Blackie Academic, London, pp. 327-367.

Diaz M, Valdivia E, Martinez-Bueno M, Fernandez M, Soler-Gonzalez AS, Ramirez-Rodrigo H, Maqueda M. 2003. Characterization of a new operon, *as-48EFGH*, from the *as-48* gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. Appl Environ Microbiol. **69**:1229-36.

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

Diep BD, Myhre R, Johnsborg O, Aakra A, Nes IF. 2003. Inducible bacteriocin production in *Lactobacillus* is regulated by differential expression of the *pln* operons and by two antagonizing response regulators, the activity of wich is enhanced upon phosphorylation. Mol Microbiol **47**: 483-494.

- Diep DB, Axelsson L, Grefslí C, Nes IF.** 2000. The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology*. **146**: 2155-2160.
- Diep DB, Havarstein LS, Nes IF.** 1995. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol Microbiol* **18**: 631-639.
- Diep DB, Havarstein LS, Nes IF.** 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J Bacteriol* **178**: 4472-4483.
- Diep DB, Johnsborg O, Risoen PA, Nes IF.** 2001. Evidence for dual functionality of the operon *plnABCD* in the regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum*. *Mol Microbiol* **41**: 633-644.
- Diep DB, Nes IF.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram-positive bacteria. *Current Drug Targets*. Vol. 2, No.2.
- du Toit M, Franz CM, Dicks LM, Holzapfel WH.** 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J Appl Microbiol*. **88**: 482-94.
- Duitman EH, Hamoen LW, Rembold M, Venema G, Seitz H, Saenger W, Bernhard F, Reinhardt R, Schmidt M, Ullrich C, Stein T, Leenders F, Vater J.** 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci. USA* **96**:13294-13299.
- Dunny GM, Leonard BA, Hedberg PJ.** 1995. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. *J. Bacteriol*. **177**:871-876.

Eisenbrandt R, Kalkum M, Lai EM, Lurz R, Kado CI, Lanka E. 1999. Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J Biol Chem.* **274**: 22548-55.

Eisenbrandt R, Kalkum M, Lurz R, Lanka E. 2000. Maturation of IncP pilin precursors resembles the catalytic Dyad-like mechanism of leader peptidases. *J Bacteriol.* **182**: 6751-61.

Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth R. 2000. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**: 39-42.

Engelke G, Gutowski-Eckel Z, Kiesau P, Siegers K, Hammelmann M, Entian KD. 1994. Regulation of the nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl Environ Microbiol.* **60**: 814-825.

Ennahar S, Asou Y, Zendo T, Sonomoto K, Ishizaki A. 2001. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *Int J Food Microbiol.* **70**: 291-301.

Ennahar S, Deschamps N. 2000. Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol.* **88**: 449-57.

Entian KD, de Vos WM. 1996. Genetics of subtilin and nisin biosyntheses: biosynthesis of lantibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**: 109-117.

Farías ME, Farías RN, Ruíz Holgado AP, Sesma F. 1996. Purification and N-terminal amino acid sequence of enterocin CRL35, a pediocin like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL35. *Lett Appl Microbiol.* **22**: 417-419.

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

- Fath MJ, Zhang LH, Rush J, Kolter R.** 1994. Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants. *Biochem.* **33**: 6911-6917.
- FDA.** 1988. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. Food and Drugs Admin., Fed.Reg. **53**:11247.
- Feinberg AP, Vogelstein B.** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* **132**: 6-13.
- Feinberg AP, Vogelstein B.** 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity (addendum). *Anal Biochem.* **137**: 266-267.
- Felizmenio-Quimio ME, Daly NL, Craik DJ.** 2001. Circular proteins in plants: solution structure of a novel macrocyclic trypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis*. *J Bio Chem.* **276**: 22875-22882.
- Floriano B, Ruiz-Barba JL, Jimenez-Diaz R.** 1998. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 4883-90.
- Folli C, Ramazzina I, Arcidiaco P, Stoppini M, Berni R.** 2003. Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. *FEMS Microbiol Lett.* **221**: 143-9.
- Franz CM, Grube A, Herrmann A, Abriouel H, Starke J, Lombardi A, Tauscher B, Holzapfel WH.** 2002. Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 2550-4.
- Franz CM, Schillinger U, Holzapfel WH.** 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int J Food Microbiol.* **29**: 255-70.

Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapel WH. 2003. Enterococci in foods a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **88**(2-3): 105-22. Review

Franz CM, Worobo RW, Quadri LE, Schillinger U, Holzapel WH, Vederas JC, Stiles ME. 1999. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 2170-8.

Franz CMA, PU Schillinger, Holzapel WH. 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int J Food Microbiol.* **29**: 255-270.

Franz CMA, Schillinger PU, Holzapel WH. 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Intl J Food Microbiol.* **29**: 255-270.

Franz, CM, Holzapel WH, Stiles ME. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol.* **47**: 1-24.

Frédéricq P. 1954. Transduction génétique des propriétés colicinonènes chez *E. coli* et *Shigella sonnei*. *C R Soc Biol* **148**: 399-402.

Fujimoto S, Ike Y. 2001. pAM401-based shuttle vectors that enable overexpression of promoterless genes and one-step purification of tag fusion proteins directly from *Enterococcus faecalis*. *Appl Environ Microbiol* **67**:1262-1267.

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

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

Gálvez A, Maqueda M, Martínez-Bueno M, Valdivia E. 1991. Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J Bacteriol.* **173**: 886-892.

Gálvez A, Valdivia E, Abriouel H, Camafeita E, Mendez E, Martínez-Bueno M, Maqueda M. 1998. Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Arch Microbiol.* **171**: 59-65.

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

Gálvez A, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Maqueda M. 1990. Induction of autolysis in *Enterococcus faecalis* S-47 by peptide AS-48. *J Appl Bacteriol.* **69**: 406-13.

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

Gálvez, A. 1984. Producción de sustancias antibacterianas por estreptococos del grupo D. Tesis de Licenciatura. Universidad de Granada.

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

Garrido MC, Herrero M, Kolter R, Moreno J. 1988. The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO J.* **7**: 1853-1862.

Gasson MJ. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCD0 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol.* **154**:1-9.

- Gálvez A, Maqueda M, Martínez-Bueno M, Valdivia E.** 1991. Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J Bacteriol.* **173**: 886-892.
- Gálvez A, Valdivia E, Abriouel H, Camafeita E, Mendez E, Martínez-Bueno M, Maqueda M.** 1998. Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Arch Microbiol.* **171**: 59-65.
- Gálvez A, Valdivia E, Maqueda M, Montoya E.** 1985. Production of bacteriocin-like substances by group D streptococci of human origin. *Microbios* **43**: 223-232.
- Gálvez A, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Maqueda M.** 1990. Induction of autolysis in *Enterococcus faecalis* S-47 by peptide AS-48. *J Appl Bacteriol.* **69**: 406-13.
- Gálvez, A, Maqueda M, Valdivia E, Quesada A, Montoya E.** 1986. Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can J Microbiol.* **32**: 765-771.
- Gálvez, A.** 1984. Producción de sustancias antibacterianas por estreptococos del grupo D. Tesis de Licenciatura. Universidad de Granada.
- Gálvez, A.** 1987. Purificación, caracterización y actividad biológica de una sustancia antibacteriana de amplio espectro producida por *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. Tesis Doctoral. Universidad de Granada
- Garrido MC, Herrero M, Kolter R, Moreno J.** 1988. The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides innmmunity for the host cell. *EMBO J.* **7**: 1853-1862.
- Gasson MJ.** 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDo 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol.* **154**:1-9.

George RA, Heringa J. 2000. The REPRO server: finding protein internal sequence repeats through the web. *Trends Biochem. Sci.* **25**:515-517.

Gilliland SE. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 175-188.

Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR, Clewell DB. 1994. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol.* **176**: 7335-44.

Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC. 1990. An HlyB-type function is required for expression of the *Enterococcus faecalis* hemolysin/bacteriocin. *Infect Immun.* **58**: 3914-23.

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

Gran L, Sandberg F, Sletten K. 2000. *Oldenlandia affinis* (R&S) DC. A plant containing uteroactive peptides used in African traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* **70**: 197-203.

Gran L. 1970. An oxytocin principle found in *Oldenlandia affinis* DC. An indigenous, Congolese drug "Kalata-Kalata" used to accelerate delivery. *Meddelsem fra Norsk Farmaceutisk selskap* **32**: 173-180.

Gran L. 1973. On the effect of a polypeptide isolated from "Kalata-Kalata" (*Oldenlandia affinis* DC) on the oestrogen dominated uterus. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **33**: 400-408.

Granato PA, Jackson RW. 1969. Bicomponent nature of lysin from *Streptococcus zymogenes*. *J Bacteriol.* **100**: 865-8.

- Gratia J, Fredericq P.** 1946. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. C. R. Soc. Biol. **93**: 1040-1041.
- Gregory P., Reznikoff W.** 2003. Tn5 Transposase Active Site Mutations Suggest Position of Donor Backbone DNA in Synaptic Complex J. Biol. Chem., **278**: 1904-1909.
- Gustafson KR, Sowder RC, Henderson LE, Parsons IC, Kashman Y, Cardellina JH, McMahon JB, Buckheit Jr. RW, Pannell LK, Boyd MR.** 1994. Circulins A and B: novel HIV-inhibitory macrocyclic peptides from the tropical tree *Chassalia parvifolia*. J Am Chem Soc. **116**: 9337-9338.
- Gustafson KR, Walton LK, Sowder RC Jr, Johnson DG, Pannell LK, Cardellina JH Jr, Boyd MR.** 2000. New circulin macrocyclic polypeptides from *Chassalia parvifolia*. J Nat Prod. **63**: 176-178.
- Haas W, Shepard BD, Gilmore MS.** 2002. Two component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. Nature **415**: 84-87.
- Hallock YF, Sowder RC 2nd, Pannell LK, Hughes CB, Johnson DG, Gulakowski R, Cardellina JH 2nd, Boyd MR.** 2000. Cycloviolins A-D, anti-HIV macrocyclic peptides from *Leonia cymosa*. J Org Chem. **65**: 124-128.
- Hansen JN.** 1993. Antibiotics synthesized by post translational modification. Annu. Rev. Microbiol. **47**: 535-564.
- Hardie JM, Whiley RA.** 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement **83**: 1S-11S.
- Havarstein LS, Diep DB, Nes IF.** 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. Mol Microbiol. **16**: 229-40.

Havarstein LS, Holo H, Nes IF. 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus with the leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiol.* **140**: 2383-2389.

Heitz A, Hernandez JF, Gagnon J, Hong TT, Pham TT, Nguyen TM, Le-Nguyen D, Chiche L. 2001. Solution structure of the squash trypsin inhibitor MCoTI-II. A new family for cyclic knottins. *Biochemistry* **40**: 7973-7983.

Henderson JT, Chopko AL, Wassenaar PD. 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1. *Arch. Biochem. and Biophys.* **295**: 5-12.

Hernández JF, Gagnon J, Chiche L, Nguyen TM, Andrieu JP, Heitz A, Trinh Hong T, Pham TT, Le Nguyen D. 2000. Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. *Biochemistry* **39**: 5722-5730.

Herranz C, Chen Y, Chung HJ, Cintas LM, Hernandez PE, Montville TJ, Chikindas ML. 2001a. Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl Environ Microbiol.* **67**: 1689-92.

Herranz C, Cintas LM, Hernandez PE, Moll GN, Driessen AJ. 2001. Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 901-4.

Herranz C, Mukhopadhyay S, Casaus P, Martinez JM, Rodriguez JM, Nes IF, Cintas LM, Hernandez PE. 1999. Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. *Curr Microbiol.* **39**: 282-90.

Higazi AAR, Ganz T, Kariko K, Cines DB. 1996. Defensin modulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen binding to fibrin and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 17650-17655.

Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW, Hermodson MA. 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature*. **323**: 448-50.

Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14**:378-379.

Hoffmann K and W Stoffel. 1993. TMbase—a database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **347**:166.

Holck AL, Axelsson L, Birkeland S, Aukrust T, Blom H. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactococcus sake* Lb706. *J Gen Microbiol.* **138**: 2715-2720.

Holo H, Nes IF. 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremosis* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 3119-3123.

Holo H, Nilssen O, Nes IF. 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.

Holzappel WH, Geisen R, Schillinger U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol.* **24**: 343–362.

Houben JH. 1982. Heat resistance of *Streptococcus faecium* in pasteurized ham. *Fleischwirtschaft* **62**: 490–493.

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

Huycke MM, Gilmore MS, Jett BD, Booth JL. 1992. Transfer of pheromone-inducible plasmid between *Enterococcus faecalis* in the Syrian hamster gastrointestinal tract. *J. Infect. Dis.* **166**: 1188-1191.

Ike Y, Clewell DB, Segarra RA, Gilmore MS. 1990. Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. *J Bacteriol.* **172**: 155-63.

Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. 1987. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1524-1528.

Iliopoulos I, Tsoka S, Andrade MA, Janssen P, Audit B, Tramontano A, Valencia A, Leroy C, Sander C, Ouzounis CA. 29 December 2000, posting date. Genome sequences and great expectations. *Genome Biol.* **2**:interactions0001.1-0001.3. [Online.] <http://genomebiology.com/2000/2/1/interactions/0001>.

Jack RW, JR Tagg, Ray B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive Bacteria. *Microbiol Rev* **59**: 171-200.

Jacob AE, Douglas GJ, Hobbs SJ. 1975. Self-transferable plasmids determining the hemolysin and bacteriocin of *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J Bacteriol.* **121**: 863-72.

Jennings C, West J, Waine C, Craik D, Anderson M. 2001. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 10614-9.

Jett BD, Huyke MM, Gilmore MS. 1994. Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 462-478.

Joerger MC, TR Klaenhammer. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* **167**: 439-446.

Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. 1994. A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* **33**:3038-3049.

Jonson AP. 1994. The pathogenicity of enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**: 1083-1089.

Joosten HM, Nunez M, Devreese B, Van Beeumen J, Marugg JD. 1996. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 4220-3.

Kalkum M, Eisenbrandt R, Lanka E. 2004. Cyclic proteins as subunits of conjugative pili. *Current Protein & Peptide Science.*

Kalkum M, Eisenbrandt R, Lurz R, Lanka E. 2002. Tying rings for sex. *Trends Microbiol.* **10**: 382-7. Review.

Kawai Y, Ishii Y, Uemura K, Kitazawa H, Saito T, Itoh T. 2001. *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. *Food Microbiol.* **18**: 407-415 .

Kawai Y, Saito T, Kitazawa H, Itoh T. 1998. Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C-terminal ends. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 2438-2440.

Kawai Y, Saito T, Toba T, Samant SK, Itoh T. 1994. Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. *Biosci Biotechnol Biochem.* **58**: 1218-21.

Kawamoto S, Shima J, Sato R, Eguchi T, Ohmomo S, Shibato J, Horikoshi N, Takeshita K, Sameshima T. 2002. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 3830-40.

Kemperman R, Jonker M, Nauta A, Kuipers OP, Kok J. 2003a. Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 5839-48.

Kemperman R, Kuipers A, Karsens H, Nauta A, Kuipers O, Kok J. 2003b. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 1589-97.

Kevin, G. 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int J of Food Microbiol.* **88**: 123-131.

Kim WJ. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria: their potentials as food biopreservative. *Food Reviews International* **9, 2**: 299-313.

Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 39-85.

Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, WM de Vos. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **24**: 895-904.

Kleerebezem M, Quadri LE. 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides* **22**:1579-1596.

Klein C, Kaletta C, KD Entian. 1993. Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by histidine kinase / response regulator system. *Appl Environ Microbiol* **59**: 296-303.

Kohli RM, Walsh CT. 2003. Enzymology of acyl chain macrocyclization in natural product biosynthesis. *Chem. Commun. (Cambridge)* **2003**: 297-307.

- Kolter R, Moreno F.** 1992. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu Rev Microbiol.* **46**:141-63. Review.
- Konings WN, Kok J, Kuipers OP, B Poolman.** 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr Opin Microbiol.* **3**: 276–282.
- Kuipers OP, Beerthuyzen MM, de Ruyter PG, Luesink EJ, WM de Vos.** 1995. Autorregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduccion. *J Biol Chem.* **270**: 27299-27304.
- Kuipers OP, Beerthuyzen MM, Siezen RJ, de W.M Vos.** 1993. Characterization of the nisin genes cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*: requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *Eur. J. Biochem.* **216**: 281-291.
- Lai EM, Eisenbrandt R, Kalkum M, Lanka E, Kado CI.** 2002. Biogenesis of T pili in *Agrobacterium tumefaciens* requires precise VirB2 propilin cleavage and cyclization. *J Bacteriol.* **184**: 327-30.
- Lancefield RC.** 1933. A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **57**: 571-595.
- Langdon GM, Bruix M, Gálvez A, Valdivia E, Maqueda M, Rico M.** 1998. Sequence-specific ¹H assignment and secondary structure of the bacteriocin AS-48 cyclic peptide. *J Biomol. NMR* **1**: 173-175.
- Lauková A, Mareková M, Javorsky P.** 1993. Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM4231. *Lett Appl Microbiol.* **16**: 257-260.
- Lazdunski CJ.** 1988. Pore-forming colicins: síntesis, extracelular release, mode of action, immunity. *Biochimie* **70**: 1291-1296.
- Leclercq, R.** 1997. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin. Infect. Dis.* **24**: (Suppl. 1), S80-S84.

Leer RJ, Van der Vossen JMBM, van Giezen M, van Noort JM, Pouwels PH. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol.* **141**: 1629-1635.

Lehrer RI, Lichtenstein AK, Granz T. 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* **11**: 105-128.

López-Lara I, Gálvez A, Martínez-Bueno M, Maqueda M, Valdivia E. 1991. Purification, characterization, and biological effects of a second bacteriocin from *Enterococcus faecalis* ssp. *liquefaciens* S-48 and its mutant strain B-48-28. *Can J Microbiol.* **37**: 769-74.

Losteinkit C, Uchiyama K, Ochi S, Takaoka T, Nagahisa K, Shioya S. 2001. Characterization of bacteriocin J15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes. *J Biosci Biotechnol.* **91**: 390-395.

Lozano JCN, Meyer JN, Sletten K, Pelaz C, Ness IF. 1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J Gen Microbiol.* **138**: 1985-1990.

Luckett S, Garcia RS, Barker JJ, Konarev AV, Shewry PR, Clarke AR, Brady RL. 1999. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. *J Mol Biol.* **290**: 525-533.

Ludwing W, Seewaldt E, Kilpper-Bälz R, Schleifer KH, Magrum L, Woese CR, Fox GE, Stackebrandt G. 1985. The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Gen Microbiol.* **131**:543-551.

Maisnier-Patin S, Forni E, Richard J. 1996. Purification, partial characterisation and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *Int J Food Microbiol.* **30**: 255-70.

Makrides SC. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* **60**, pp. 512-538.

Maqueda M, Gálvez A, Martínez-Bueno M, Valdivia E. 1998 Widespread production of AS-48-like bacteriocins in strains of *Enterococcus faecalis*? Mol Microbiol. **29**: 1318-9.

Maqueda M, Gálvez A, Martínez-Bueno M, Sánchez-Barrena MJ, González C, Albert A, Rico M, Valdivia E. 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. Current Protein & Peptide Science.

Martín MC, Alonso JC, Suárez JE, Álvarez MA. 2000. Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination. Appl Environ Microbiol. **66**:2599-2604.

Martínez-Bueno M, Gálvez A, Valdivia E, Maqueda M. 1990. A transferable plasmid associated with AS-48 production in *Enterococcus faecalis*. J Bacteriol. **172**: 2817-8.

Martínez-Bueno M, Maqueda M, Gálvez A, Samyn B, Van Beeumen J, Coyette J, Valdivia E. 1994. Determination of the gene sequence and molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. J Bacteriol. **176**: 6334-6339.

Martínez-Bueno M, Valdivia E, Gálvez A, Coyette J, Maqueda M. 1998. Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. Mol Microbiol. **27**: 347-58.

Mattick ATR, Hurst A. 1944. A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. Nature. **154**: 551.

McAuliffe O, Ros RP, Hill C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiol. Rev. **25**: 285-308.

McKay LL, Baldwin KA. 1990. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **87**:3-14.

- Mendoza F, Maqueda M, Gálvez A, Martínez-Bueno M, Valdivia E.** 1999. Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48-adapted strain of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 618-625.
- Minahk CJ, Farias ME, Sesma F, Morero RD.** 2000. Effect of enterocin CRL35 on *Listeria monocytogenes* cell membrane. *FEMS Microbiol Lett.* **192**: 79-83.
- Mootz HD, Marahiel MA.** 1997. The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol.* **179**:6843-6850.
- Mora D, Fortina MG, Parini C, Daffonchio D, Manachini PL.** 2000. Genomic subpopulations within the species *Pediococcus acidilactici* detected by multilocus typing analysis: relationships between pediocin AcH/PA-1 producing and non-producing strains. *Microbiology.* **146**: 2027-38.
- Moreno MR, Leisner JJ, Tee LK, Ley C, Radu S, Rusul G, Vancanneyt M, De Vuyst L.** 2002. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *J Appl Microbiol.* **92**: 147-57.
- Morovsky M, Pristas P, Javorsky P, Nes IF, Holo H.** 2001. Isolation and characterization of enterocin BC25 and occurrence of the *entA* gene among ruminal gram-positive cocci. *Microbiol Res.* **156**: 133-8.
- Morrison D, Woodford N, Cockson B.** 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement* **83**: 89S-99S.
- Murray BE.** 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol. Rev.* **3**: 46-65.
- Nallapareddy SR, Singh KV, Duh RW, Weinstock GM, Murray BE.** 2000. Diversity of *ace*, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive

matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of Ace during human infection. *Infect. Immun.* **68**: 5210-5217.

Navaratna MADB, Sahl HG, Tagg JR. 1998. Two-Component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 4803-4808.

Nes IF, Diep DB, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**: 113-128.

Nes IF, Eijsink V. 1999. Cell-Cell Signaling in bacteria. Book Chapter in ASM book on *Quorum Sensing*. Eds. G.M. Danny and S.C. Winan., page 175-192.

Nettles CG, Barefoot SF. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J Food Prot.* **56**: 338-356.

Nilsen T, Nes IF, Holo H. 1998. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J Bacteriol.* **180**: 1848-54.

Nissen-Mayer J, Holo H, Håvarstein LS, Sletten K, Nes IF. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* **174**: 5686-5692.

Nissen-Meyer J, Havarstein LS, Holo H, Sletten K, Nes IF. 1993. Association of the lactococcal A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. *J Gen Microbiol.* **139**: 1503-9.

Nissen-Meyer J, Larsen AG, Sletten K, Daeschel M, Nes IF. 1993. Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *J Gen Microbiol* **139**: 1973-1978.

Nissen-Meyer J, Nes IF. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* **167**: 67-77.

O'Brian GJ, Mahanty HK. 1996. Complete nucleotide sequence of microcin 24 genetic region and analysis of a new ABC transporter. Accession number ECU47048.

O'Keeffe T, Hill C, Ross RP. 1999. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin a production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 1506-15.

Olasupo NA, Schillinger U, Franz CM, Holzapfel WH. 1994. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from 'wara', a fermented skimmed cow milk product from west Africa. *Lett Appl Microbiol.* **19**: 438-441.

Papagianni, M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotech Advan* **21**: 465-499.

Parente E, Hill C. 1992. A comparison of the factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *J Appl Bacteriol.* **73**: 290-298.

Pearson WR and Lipman DJ. 1988. Improved tools for biological sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2444-2448.

Peitsch MC, Guex N. 1997. Swiss-Model and the Swiss-PDBViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**:2714-2723.

Peitsch, MC. 1996. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* **24**:274-279.

Perler FB, Adam E. 2000. Protein splicing and its applications. *Curr Opin Biotechnol.* **11**: 377-383.

Persson B and P Argos. 1994. Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* **237**:182-192.

Peschel A, Gotz F. 1996. Analysis of the *Staphylococcus epidermidis* genes *epiFEG*, involved in epidermin immunity. *J Bacteriol.* **178**: 531-536.

Piard JC, Desmazeaud M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.* **72**: 525-541.

Piard JC, Kuipers OP, Rollema HS, Desmazeaud MJ, de Vos WM. 1993. Structure, organization, and expression of the *lct* gene for lactacin 481, a novel lantibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem.* **22**:16361-8.

Pintado J, Guyot JP, Ampe F. 2003. Multiple competitive PCR-DGGE as a tool for quantifying and profiling defined mixed cultures of lactic acid bacteria during production of probiotics from complex polysaccharides. *J Appl Microbiol.* **95**: 921-33.

Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. 2000. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and serine protease and virulence. *Infect. Immun.* **68**: 2579-2586.

Quadri LE, Kleerebezem M, Kuipers OP, de Vos WM, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME. 1997. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence from global inducer-mediated transcriptional control. *J Bacteriol* **179**: 6163-6171.

Quadri LE, Sailer M, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME. 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J Biol Chem* **269**: 12204-12211.

Quiao M, Saris PEJ. 1996. Evidence for a role of NisT in transport of the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* N8. *FEMS Microbiol Lett.* **144**: 89-93.

Quirantes R, Gálvez A, Valdivia E, Martín I, Martínez-Bueno M, Méndez E, Maqueda M. 1995. Purification of specific sex pheromones for pMB1 and pMB2 plasmids of *Enterococcus faecalis* S-48. *Canadian Journal Microbiology.* **41**: 629-632

Rauch PJG, de Vos WM. 1992. Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* **174**:1280-1287.

Rebuffat SA, Blond, Destoumieux-Garzón D, Goulard C, Peduzzi J. 2004. Microcin J25, from the macrocyclic to the lasso structure: implications for biosynthetic, evolutionary and biotechnological perspectives. *Current Protein & Peptide Science.*

Reis M, Eschbach-Bludau M, Iglesias-Wind MI, Kupke T, Sahl HG. 1994. Producer immunity towards the lantibiotic Pep5: identification of the immunity gene *pepI* and localization and functional analysis of its gene product. *Appl Environ Microbiol.* **60**: 2876-83.

Riley MA, Wertz. JE. 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* **84**: 357-364.

Rince A, Dufour A, Le Pogam S, Thuault D, Bourgeois CM, Le Pennec JP. 1994. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of lactococcin DR, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ*

Risoen PA, Brurberg MB, Eijsink V, Nes IF. 2000. Functional analysis of promoters involved in quorum sensing-based regulation of bacteriocina production in *Lactobacillus*. *Mol Microbiol* **37**: 619-628.

Rivas L, Andreu D. 2000. Eukaryotic antibiotic peptides: a evolutionary relic or therapeutic remedy? *Rev Esp Quimioter.* **13**: 17-9. Spanish.

Rogers LA. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* **16**: 321-325.

Rosengren KJ, Clark RJ, Daly NL, Goransson U, Jones A, Craik DJ. 2003. Microcin J25 has a threaded sidechain-to-backbone ring structure and not a head-to-tail cyclized backbone *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 12464-12474.

Ross RP, Morgan S, Hill C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int J Food Microbiol* **79**: 3-16.

Rozdzinski E, Marre R, Susa M, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A. 2001. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb. Pathog.* **30**: 211-220.

Ryan MP, Jack RW, Josten M, Sahl HG, Jung G, Ross RP, Hill C. 1999. Extensive-translational modification, including a serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lacticine 3147. *J. Biol Chem.* **274**: 37544-37550.

Saether O, Craik DJ, Campbell ID, Sletten K, Juul J, Norman DG. 1995. Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. *Biochemistry.* **34**: 4147-58.

Sahl HG, Bierbaum G. 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol.* **52**:41-79.

Saier MH Jr. 1994. Bacterial protein kinases that recognize tertiary rather than primary structure? *Res Microbiol.* **145**:647-50.

Sahl HG, Jack RW, Bierbaum G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur J Biochem.* **230**: 827-853.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Samyn B, Martínez-Bueno M, De0vreese B, Maqueda M, Gálvez A, Valdivia E, Coyette J, Van Beeumen J. 1994. The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Lett.* **352**: 87-90.

Sánchez-Barrena M, Martínez-Ripoll G, Gálvez A, Valdivia E, Maqueda M, Cruz V, Albert A. 2003. Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state. *Journal of Molecular Biology.* **334**: 541-549.

Sánchez-Hidalgo M, Maqueda M, Galvez A, Abriouel H, Valdivia E, Martínez-Bueno M. 2003. The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 1633-41.

Saris PE, Immonen T, Reis M, Sahl HG. 1996. Immunity to lantibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **69**: 151-9. Review.

Sartingen S, Rozdzinski E, Muscholl-Silberhorn A, Marre R. 2000. Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. *Infect. Immun.* **68**: 6044-6047.

Schillinger U, Geisen R, Holzappel WH. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci Technol.* **7**: 158-164.

Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 31-34.

Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Kilpper-Bälz R, Collins MD, Fischer W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst Appl Microbiol.* **6**: 183-195.

Schnell N, Entian KD, Gotz F, Horner T, Kellener R, G Jung. 1989. FEMS Microbiol Lett. **49**: 263-267.

Schöpke T, Hasan Agha MI, Kraft R, Otto A, Hiller K. 1993. Hämolytisch aktive Komponenten aus *Viola tricolor* L. und *Viola arvensis* Murray. Sci Pharm. **61**: 145-153.

Schülein, R I, Gentschev H, Mollenkop J, Goebel W. 1992. A topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. Molecular General Genetic. **234**: 155-163.

Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P. 2000. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. Nucleic Acids Res. **28**:231-234.

Segarra RA, Booth MC, Morales DA, Huycke MM, Gilmore MS. 1991. Molecular characterization of the *Enterococcus faecalis* cytolysin activator. Infect Immun. **59**: 1239-46.

Senger M, Flores T, Glatting K, Ernst P, Hotz-Wagenblatt A, Suhai S. 1998. W2H: www interface to the GCG sequence analysis package. Bioinformatics **14**:452-457.

Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. 2002. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Nature **417**: 746-750.

Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. Infect. Immun. **67**: 193-200.

Sherman JM. 1937. The streptococci. Bacteriol. Rev. **1**: 3-97.

Shillinger U, Lucke FK. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. **55**: 1901-1906.

Siegers K, Entian KD. 1995. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl Environ Microbiol.* **61**: 1082-1089.

Simjee S, Gill MJ. 1997. Gene transfer, gentamycin resistance and enterococci. *J Hosp. Infect.* **36**: 249-259.

Simon D, Chopin A. 1988. Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie.* **70**:559-566.

Siragusa GR. 1992. Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus hirae*. *Appl Environ Microbiol.* **58**: 3508-3513.

Sletten K, Gran L. 1973. Some molecular properties of kalatapeptide B-1. A uterotonic polypeptide isolated from *Oldenlandia affinis* DC. *Meddelelser fra Norsk Farmaceutisk Selskap* **8**: 69-82.

Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **98**: 503-575.

Stiles ME, Holzapel WH. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.* **36**: 1-29.

Stiles ME. 1989. **Less recognized or presumptive foodborne pathogenic bacteria.** In: **Doyle, M.P.** Editor, , 1989. *Foodborne Bacterial Pathogens.* Marcel Dekker Inc, New York, pp. 674-735.

Subramani S, Koller A, Snyder WB. 2000. Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annu Rev Biochem.* **69**: 399-418. Review.

Süßmuth SD, Muscholl-Silberhorn A, Wirth R, Susa M, Marre R, Rozdzinski E. 2002. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect. Immun.* **68**: 4900-4906.

Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev.* **40**: 722-756.

Tagg JR, McGiven AR. 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* **21**: 934.

Tam JP, Lu YA, Yang JL, Chiu KW. 1999. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **96**: 8913-8918.

Tang YQ, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller CJ, Ouellette AJ, Selsted ME. 1999. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins. *Science* **286**: 498-502.

Thiercelin ME, Jouhaud L. 1903. Reproduction de l'enterocoque; taches centrales: granulations p eripheriques et microblastes. *C.R. Séances Soci et  Biologie.* **55**: 686-688.

Thiercelin ME. 1899. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. *C.R. Séances Soci et  Biologie.* **5**: 269-271.

Toba T, Samant SK, Yoshioka E, Itoh T. 1991. Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. *Lett Appl Microbiol.* **13**:281-286.

Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penades JR, Lasa I. 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4538-4565.

Tomita H, Fujimoto S, Tanimoto K, Ike Y. 1996. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J Bacteriol.* **178**: 3585-93.

Tomita H, Fujimoto S, Tanimoto K, Ike Y. 1997. Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *J Bacteriol.* **179**: 7843-55.

Torri Tarelli G, Carminati, Giraffa G. 1994. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy Enterococci. Food Microbiol. **11**: 234-252.

Trabi M, Craik DJ. 2002. Circular proteins--no end in sight. Trends Biochem Sci. **27**: 132-8. Review.

Trabi M, Schirra HJ, Craik DJ. 2001. Three-dimensional structure of RTD-1, a cyclic antimicrobial defensin from rhesus macaque leukocytes. Biochemistry **40**: 4211-4221.

Van Belkum MJ, Kok J, Venema G, Holo H, Nes IF, Konings WN, Abee T. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. J Bacteriol. **173**: 7934-7941.

Van Belkum MJ, Stiles ME. 2000. Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. Nat Prod Rep. **4**:323-35.

Van de Guchte M, Van der Vossen JMBM, Kok J, Venema G. 1989. Construcción of a lactococcal expression vector: expresión of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* IL1403. Appl Environ Microbiol. **62**:1689-1692.

Van der Meer JR, Polman J, Beerthuyzen MM, Siezen RJ, Kuipers OP, de Vos WM. 1993. Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon: genes *nisP*, encoding a subtilin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. J Bacteriol. **175**: 2578-2588.

Venema G, Kok J, Sinderen D. 1999. From DNA sequence to application: possibilities and complications. Antoine van Leeuwenhoek **76**: 3-23.

Villani F, Salzano G, Sorrentino E, Pepe O, Marino P, Coppola S. 1993. Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.* **74**: 380-387.

Vlaemynck G, Herman L, Coudijzer K. 1994. Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* **24**: 211-25.

Vogelstein B, Gillespie D. 1979. Preparative method and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad. Sci. USA.* **76**: 615-619.

von Heijne, G. 1996. Prediction of transmembrane protein topology, p. 1001-1109. *In* M. J. E. Sternberg (ed.), *Protein structure prediction. A practical approach.* IRL Press, Oxford, United Kingdom.

Wachsman MB, Castilla V, de Ruiz Holgado AP, de Torres RA, Sesma F, Coto CE. 2003. Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication in vitro. *Antiviral Res.* **58**: 17-24.

Wei MQ, Rush CM, Nonma JM, Hafner LM, Epping RJ, Timmus P. 1995. An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation. *J Microbiol Methods.* **21**:97-109.

WHO. 1969. Specification for the identity and purity of food aditives and their toxicological evolution: some antibiotics. 12th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Aditives. WHO Tech. Rept. Series No. **430**. World Health Org., Geneva, Switzerland.

Williams AM, Rodrigues UM, Collins MD. 1991. Intra-generic relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small sub-unit rRNA. *Res Microbiol.* **142**: 67-74.

Wilson KA, Kalkum M, Ottesen J, Yuzenkova J, Chait BT, Landick R, Muir T, Severinov K, Darst SA. Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail. 2003. *J Am Chem. Soc.* **125**: 12475-12483.

Wirth R, An FY, Clewell DB. 1986. Highly efficient protoplast system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*Streptococcus faecalis* shuttle vector. *J Bacteriol.* **143**: 966-970.

Witherup KM, Bogusky MJ, Anderson PS, Ramjit H, Ransom RW, Wood T, Sardana M. 1994. Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*. *J Nat Prod.* **57**: 1619-25.

Yagi Y, Clewell DB. 1980. Recombination-deficient mutant of *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol.* **143**:966-970.

Yang R, Ray B. 1994. Prevalence and biological control of bacteriocin-producing psychrotrophic leuconostocs associated with spoilage of vacuum-packaged processed meats. *J Food Prot.* **57**: 209-217.

Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 5449-5453.